

SEMAINE D'ETUDE
SUR
LE PROBLEME DES OLIGOELEMENTS
DANS LA VIE VEGETALE ET ANIMALE

(24-IV-1955)



PONTIFICIA
ACADEMIA
SCIENTIARVM

EX AEDIBVS ACADEMICIS IN CIVITATE VATICANA

MCMVLI

SEMAINE D'ETUDE

SUR

LE PROBLEME DES OLIGOELEMENTS DANS LA VIE VEGETALE ET ANIMALE

(24-IV-1955)



PONTIFICIA
ACADEMIA
SCIENTIARVM

LE PROBLÈME DES OLIGOÉLÉMENTS
DANS LA VIE VÉGÉTALE ET ANIMALE

Vers le début de notre siècle on était généralement convaincu que la matière indispensable à la vie biologique ne se composait que d'une douzaine environ d'éléments chimiques, tels que le carbone, l'hydrogène, l'oxygène, l'azote, le soufre, le phosphore, le magnésium, le fer, etc. En effet, à peu près 999 millièmes du poids total des organismes végétaux et animaux sont presque entièrement constitués de composés de ces éléments. Toutefois les recherches conduites pendant les dernières cinquante années, ont permis de découvrir que les organismes vivants contiennent toujours, ne fût-ce que sous forme de traces minimes, un grand nombre de composés d'autres métaux et métalloïdes, tels que le manganèse, le zinc, le nickel, le cobalte, l'aluminium, le bore, le titaniun, l'iode, etc.

Il ne subsiste aucun doute aujourd'hui que ces microéléments ou oligoéléments représentent des parties constitutantes physiologiques vraies et propres et qu'ils agissent en quantités extrêmement réduites.

La recherche moderne sur les oligoéléments offre une preuve certaine du fonctionnalisme providentiel qui assure le passage des éléments chimiques dans la succession: « rocher, terrain, plante, animal, homme ».

Chaque élément peut être étudié durant ce passage sous le double aspect physiologique et pathologique. Ce dernier aspect a ouvert la voie aux recherches de caractère hygiénique et social, puisqu'elles étudient les phénomènes pathologiques attribuables au manque d'éléments chimiques

qui se trouvent habituellement sous forme de traces infinitésimales dans les organismes.

L'importance biologique et le mécanisme d'action des oligoéléments dans la vie des plantes et des animaux, n'ont pas encore pu être illustrés d'une façon satisfaisante.

La Semaine d'Etude organisée par l'Académie Pontificale des Sciences poursuit précisément le but de donner au cours d'une discussion tenue dans un cercle restreint de spécialistes en matière, un exposé synoptique des nombreuses recherches conduites dans ce domaine, de déterminer clairement le point atteint par l'étude des différents problèmes inhérents et d'indiquer enfin la voie que devraient suivre ces recherches et qui semble à présent, la plus indiquée, la plus logique, la plus certaine et la plus promettante.

Au point de vue naturaliste, chimique, biochimique, pathologique et pharmacologique, le problème des oligoéléments est encore plein de mystère. C'est un problème qui est ouvert à la recherche, de sorte qu'un grand nombre de savants s'en occupent actuellement dans le monde entier. Son étude systématique et approfondie pourrait donner des résultats très significatifs. En premier lieu elle pourrait éclairer certains problèmes d'importance immédiate pour la vie humaine et animale, surtout par rapport au rôle de ces éléments dans l'alimentation, l'hygiène, etc., et à la possibilité d'améliorer les conditions de vie, d'éviter des maladies et de guérir les troubles pathologiques attribuables au manque ou au déséquilibre, dans leur ensemble, des microéléments alimentaires. Les résultats de cette étude devraient fournir surtout des moyens pour protéger et aider la vie biologique des collectivités humaines que doivent vivre souvent aujourd'hui dans des conditions artificielles ne correspondant pas toujours aux exigences d'une vie physiologiquement saine.

En second lieu, l'étude de ces éléments quasi impondérables peut porter à des considérations plus profondes et plus élevées. L'étude du monde

des entités extrêmement petites qui dominent obscurément les phénomènes vitaux et dont on ne soupçonnait pas l'existence il y a quelques années seulement, a modifié radicalement nos conceptions biochimiques et nous a mis en présence de mystères extrêmement suggestifs et attrayants. Ces mystères posent à notre esprit des questions formidables, en présence desquelles notre raison commence à se rendre compte de ce que dans la vie biologique existe quelque chose qui se trouve au-dessus de la réalité sensible et qui pourrait être un ordre préconstitué, une finalité clairement perceptible qui nous porte vers des buts sublimes et mystérieux qui échappent à notre raison et qui ne peuvent être révélés que par la Foi.

PIETRO SALVIUCCI

Chancelier de l'Académie

INTRODUCTION

C'est pour nous un grand honneur que l'Académie Pontificale des Sciences ait accepté le thème que nous lui avons proposé comme objet de cette Semaine d'Etudes: « Le problème des oligoéléments dans la vie végétale, animale et humaine ».

Il y a quelques années à peine, on n'aurait pu concevoir une réunion de chercheurs dans des domaines scientifiques si divers; le chercheur qui possédait de précieuses techniques de travail, avait l'habitude de les appliquer au développement de sa science propre; les travaux, pour la plupart individuels, les résultats acquis à l'aide de techniques homogènes qu'une personne peut élaborer et appliquer, contribuaient considérablement à l'avancement de la science; chaque technique reflétait la façon de voir propre à chaque observateur, à l'aide de laquelle il interprétrait un grand nombre de faits qui passaient comme une série d'évènements devant un puissant appareil discriminatoire. Nous sommes arrivés aujourd'hui à nous convaincre de la complexité des faits, de la diversité de leurs aspects, de la nécessité de faire converger les techniques diverses. Nous nous sommes aperçus de l'insuffisance de l'effort du chercheur individuel, de la nécessité d'un travail d'équipe et de la normalisation des techniques pour aboutir à des connaissances claires et précises.

La recherche étudie, chaque jour davantage, des faits qui représentent des ensembles (ensembles de positions, de structures) ou des successions de positions et de processus. Leur interprétation exige l'apport de

points de vue les plus variés. Aujourd'hui on a besoin de la collaboration des géologues, des édaphologues (pédologues), des microbiologues, des analystes, des biochimistes, des physiologues et des pathologues spécialisés dans l'étude des végétaux, des animaux et de l'homme. Comment pouvait-on concevoir autrement la possibilité d'arriver à coordonner cette diversité de travaux? Et cependant il était clair que lorsqu'il s'agissait d'oligoéléments, il était nécessaire de déterminer leur rôle, de suivre leur trajet du règne minéral au règne animal, de vérifier leurs effets, de définir leur influence, leur participation au processus de la nutrition, et cela, à chaque échelon: microbien, végétal, animal et humain.

L'étude des oligoéléments et de leur influence sur la nutrition est féconde quant à ses résultats qui s'appliquent aux problèmes pratiques de la pathologie végétale, animale et humaine. Mais, en plus de ce caractère appliqué, les recherches sur les oligoéléments ont également une valeur doctrinale, car elles permettent d'établir une étroite liaison entre certaines sciences qui avaient été très dissociées jusqu'à présent.

Pendant tout le siècle passé, les institutions qui se trouvaient en première ligne au point de vue du développement de la science, exigèrent une division du travail, une stricte spécialisation, la création de chaires et d'instituts avec des buts toujours plus délimités et spécialisés. La création, au cours de ces dernières années, dans différents pays de nouvelles institutions exclusivement consacrées à la recherche, a consolidé et accentué cette orientation dans des proportions surprenantes.

Ce genre de travail scientifique spécialisé continue à se développer dans les laboratoires et les instituts consacrés à des branches ou à des problèmes scientifiques strictement définis; mais, en même temps, la collaboration entre les différentes branches et la liaison entre les différents travaux scientifiques augmentent de plus en plus.

Cette liaison s'accroît toujours plus et aboutit souvent à de véritables sciences nouvelles. Ces dernières finissent par s'occuper de problè-

mes scientifiques qui semblaient indépendants par suite de la limitation de nos connaissances.

L'histoire naturelle classique, avec ses trois règnes (le règne minéral, le règne végétal et le règne animal) avait atteint son point culminant au XIX-ème siècle, grâce surtout aux travaux des hommes de science et des instituts scientifiques français, mais elle a perdu une grande partie de son importance par suite des progrès de la Cytologie, unificatrice des êtres vivants. En même temps, une science s'est créée, la Biologie, dont le grand développement l'éloigne de plus en plus de la Géologie. On dirait que le naturaliste qui se borne à décrire morphologiquement les êtres naturels les plus divers, soit devenu un anachronisme. Dans les musées, à côté des collections incertes, apparaît le dynamisme des laboratoires qui pénètrent dans les secrets intérieurs des différents processus. La géologie et la biologie s'affirment, et, selon la conception anglo-germanique des sciences naturelles qui embrasse la Physique et la Chimie, le rapide développement de la Géochimie, de la Biophysique et de la Biochimie consacre la séparation entre la géologie et la biologie. Quelles relations va-t-on découvrir entre la Géochimie et la Biochimie? La première se base sur les analyses chimiques des roches du Clarke et les concepts physico-chimiques de Goldschmidt, dans lesquels certains facteurs, tels les rayon ioniques, jouent un rôle décisif. La Biochimie a commencé déjà à dépasser l'étape structurale statique des Fischer, des Willstater, etc., et les efforts actuels des chercheurs, avec Krebs, Lipmann, etc. se dirigent davantage vers l'aspect métabolique, dynamique des êtres vivants en suivant des études éminemment enzymatiques. L'unité cellulaire et son analyse est la mission de la Biochimie; la Génétique est entrée dans son orbite et la compénétration entre la Biochimie et cette science représente un des grands développements de la recherche scientifique de ces quinze dernières années.

La Biologie et la Géologie élargissent leurs domaines en se servant des armes puissantes offertes par la Chimie et la Physique, non seulement

en absorbant ou en appliquant ces sciences, mais aussi en utilisant leurs techniques et leurs instruments de recherche.

C'est ainsi que la séparation entre la Géologie et la Biologie, entre le monde inorganique et les êtres vivants, se fait plus profonde. Un lien demeure : le tribut que les êtres vivants offrent à la mort, détermine, en de nombreux cas, un recul de l'élément biologique vers l'élément géologique, les formes se fossilisent et il existe une science spéciale, la Paléontologie, qui unit la Géologie à la Biologie par la voie descendante de l'être vivant au minéral. Voyons, cependant, s'il existe aussi entre ces deux sciences une liaison ascendante.

Le sol ne peut être considéré simplement comme une formation pétrographique sédimentaire, sans tenir compte de ce qu'il est également une formation biologique.

La Pédologie établit une liaison entre la Géologie et la Biologie en suivant la voie ascendante qui amène les éléments lithologiques dans le cycle de la nutrition végétale.

Nous sommes donc au commencement d'un retour au principe d'une unité naturelle, très différente de celui des trois règnes constitutifs de l'ancienne Histoire Naturelle. Ce sont les processus, les êtres dans leurs activités physiologiques, qui déterminent les liaisons entre les différentes Sciences naturelles. Une nouvelle doctrine est en train de se forger, que nous pourrions appeler Biogéologie.

L'Edaphologie (Pédologie) est la science centralisatrice de ce retour vers l'unité.

Le système colloïdal du sol, d'après Lundegårdh, peut s'entrelacer avec le système radiculaire des plantes. Ainsi, au moyen de ce vis-à-vis de deux systèmes dispersés, le sol et le végétal, un pont est tendu entre deux mondes, le monde géologique et le monde biologique. Les oligo-éléments, à cause de l'intensité de leur activité et de la spécifité de leurs

fonctions biochimiques, ont été les indices évidents de cette trajectoire qui va de la formation géologique aux activités enzymatiques.

Le caractère essentiel de ce point de vue unificateur est le « fonctionnalisme du système sol-plante-nutrition animale ». Le problème est d'utiliser les données connues sur le sol et la plante pour l'étude de la question essentielle, à savoir du rapport existant entre la constitution du sol et la nutrition des végétaux, des animaux et de l'homme. Toutefois il y aura encore beaucoup de grands efforts à faire avant d'atteindre cette unification.

L'étude du sol, par exemple, a obligé à considérer séparément certains aspects distincts qui, dans leur développement, ont établi des contacts avec certaines sciences particulières et s'y sont incorporés. Ces sciences sont la Cristallographie, la Chimie physique, la Microbiologie, la Chimie organique, etc. Cette circonstance pourrait porter à la subdivision de la Science du Sol et à sa transformation dans de simples chapitres de ces sciences fondamentales. On pourrait dire la même chose des branches des sciences botaniques et des sciences se rapportant à la nutrition animale et humaine.

Notre réunion a donc un intérêt très particulier à cause de la signification scientifique des oligoéléments, que nous avons signalée à partir de leurs positions géologiques jusqu'à leur fonctionnalisme vital — normal ou pathologique.

Le cadre des applications agricoles a été un aiguillon pour l'étude des oligoéléments.

L'éminent Professeur Bertrand a été le premier à commencer ces études vers la fin du siècle passé. Nous avons l'honneur de l'avoir parmi nous. Ses travaux actuels, illustrés directement ici par lui-même, font partie de notre Semaine d'Etude. Ils ont démontré l'importance des sels solubles de manganèse, non seulement pour le développement des moi-

sissures et des bactéries, mais également pour celui des plantes supérieures, et ils ont permis de constater une augmentation des récoltes grâce à l'addition de sels solubles de manganèse aux terres qui en contiennent trop peu. Le Professeur Antonio de Gregorio Rocasolano, en Espagne (1), a suivi la même voie dans ses travaux classiques publiés en 1915, dans lesquels il a démontré que la quantité de l'azote atmosphérique fixé dans le sol ou dans les plantes par certains micro-organismes tels que *Bacillus radicicola*, *Azotobacter chroococcum* et *Clostridium pasteurianum*, augmentait par suite de l'addition de petites quantités de manganèse ou de fer au milieu de culture.

Grâce aux travaux de ces maîtres, nous avons pu profiter des résultats et des enseignements importants et variés de la recherche scientifique moderne. Les études qui se font maintenant en Espagne sur les oligoéléments doivent beaucoup au grand savoir et à l'exemple des savants qui se sont le plus distingués dans le domaine de la recherche sur ces matières et dont quelques uns se trouvent parmi nous.

On a pu constater, en observant des symptômes pathologiques, que les êtres vivants dans leur énorme majorité sont détecteurs d'oligoéléments dont les quantités infimes ont pu être déterminées grâce au perfectionnement des méthodes analytiques. Cette partie de la pathologie a introduit le problème des oligoéléments dans les grands domaines de la Biologie appliquée: l'Agriculture, la Science vétérinaire, la Médecine. Il est surprenant de constater le grand nombre des sciences qui ont été pour

(1) GREGORIO ROCASOLANO A.: *Investigaciones sobre la alimentación nitrogenada de las plantas por vía bacteriana*. « Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural », 1915, pp. 113, 141 et 199.

GREGORIO ROCASOLANO A. et FERNÁNDEZ BENEDID: *Infuencia del mangano-ion y del ferri-ion sobre la cantidad de nitrógeno atmosférico absorbido por el Bacillus radicicola, el Clostridium pasteurianum y el Azotobacter chroococcum*. « Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural », 1915.

GREGORIO ROCASOLANO A.: *El manganeso como catalizador de las reacciones bioquímicas, por las cuales, el nitrógeno atmosférico, por vía bacteriana, es assimilado por las plantas*. « Revista de la Real Academia de Ciencias de Madrid », 1916. « Revue Scientifique », pp. 11-18, 1916. « Bull. Inst. Intern. d'Agricult. », Rome, Septembre 1916.



ainsi dire bouleversées par le problème aigu des maladies dues à la carence des oligoéléments. Seul un problème aussi important et dont les applications pourraient être appelées classiques ait pu bouleverser ainsi et faire converger un si grand nombre de sciences aussi diverses. A l'origine, on s'est consacré, d'une part, à l'étude des oligoéléments dans leur distribution géochimique et dans leur stabilité minérale, pour arriver, d'autre part, à la connaissance de leur mobilisation, de leurs formes assimilables, de leur passage aux êtres vivants et, surtout, aux végétaux. Mais, dans le monde biologique, il ne s'agit plus uniquement d'une appréciation quantitative que permet d'atteindre la précision des méthodes analytiques; il s'agit d'étudier le fonctionnalisme de ces oligoéléments et de déterminer les processus enzymatiques, dans lesquels ils agissent comme activateurs. De la rigidité de la cristallisation magnétique au dynamisme des processus enzymatiques, la voie est longue. Elle englobe des disciplines scientifiques très variées. Les oligoéléments, considérés scientifiquement, ont eu la vertu de lier entre elles des sciences distinctes dans l'unité des processus suivis par chaque oligoélément.

Mais, à côté de toutes ces trajectoires variées et complexes, un autre aspect actuel apparaît: l'interaction des oligoéléments entre eux et l'activité de ces oligoéléments dans leur milieu. Une carence ne signifie pas simplement absence d'un oligoélément; mais elle reflète sa position, elle indique qu'il ait pu subir une fixation dans un réseau cristallin ou par suite d'une concurrence alimentaire entre divers êtres vivants, ou qu'il ait pu être assimilé de préférence par des micro-organismes. En dehors de cette fixation minérale ou végétale, il faut considérer également si la carence dépend du développement d'un processus déterminé par des agents physiques: un même oligoélément peut apparaître insuffisant ou suffisant selon le degré d'insolation ou selon la longueur d'onde donnée des radiations. Dans n'importe quelle partie de la trajectoire d'un oligoélément, nous rencontrons les plus diverses relations et influences. Il n'est donc pas

surprenant que la bibliographie sur les oligoéléments ait atteint une ampleur insoupçonnée. Et cependant il reste encore beaucoup à faire. Nous nous trouvons encore, en effet, dans la phase descriptive d'accumulation des données, et, dans certains secteurs, on a réussi seulement à se rapprocher à la possibilité d'établir des principes généraux et de fonder une science élaborée.

A cause de cela, l'initiative d'une réunion, comme la nôtre, organisée par l'Académie Pontificale des Sciences, mérite la plus grande gratitude de tous les hommes de sciences, car son ordre du jour traite des problèmes très actuels, dont l'étude est en plein développement, dont la solution exige l'apport des disciplines scientifiques très différentes et devra aboutir nécessairement à une synthèse très significative.

JOSÉ MARÍA ALBAREDA HERRERA
Académicien Pontifical

LA SEMAINE D'ÉTUDE
SUR LE PROBLÈME DES OLIGOÉLÉMENTS
DANS LA VIE VÉGÉTALE ET ANIMALE

Le but des « Semaines d'Etude » de l'Académie Pontificale des Sciences a été ainsi défini par son Président, S. E. le Rev. Père A. GEMELLI :

« Tandis qu'on fixait, après sa fondation, les travaux de l'Académie, un problème se présenta bien vite avec évidence : les sciences posent chaque jour des problèmes nouveaux qui donnent lieu d'ordinaire à divers essais de solution, souvent contradictoires. Il arrive ainsi constamment que parmi les représentants les plus autorisés d'une science et, en particulier, entre ceux qui se sont consacrés à l'étude d'une même question, on rencontre des opinions opposées. Pareilles divergences se maintiennent parfois pendant de longues périodes et constituent à la fois une grave difficulté pour l'enseignement des sciences et fréquemment aussi un obstacle considérable à leur développement. D'ailleurs, l'expérience montre que les méthodes actuellement pratiquées dans la discussion des problèmes scientifiques, n'ont qu'une efficacité limitée au point de vue de l'établissement d'une unité de doctrine. Il serait hautement souhaitable de promouvoir tout ce qui pourrait favoriser une entente sur les points en discussion.

« Un procédé pareil semble devoir être particulièrement utile sous ce rapport : savoir établir des contacts personnels prolongés entre quelques représentants d'opinions différentes au sujet d'une question déterminée ».

Dans ce but, l'Académie Pontificale des Sciences a organisé, en 1948, la première « Semaine d'Etude » qui a été dédiée au « Problème biologique du Cancer ». Elle a été présidée par l'Académicien Pontificale, S. E. PIETRO RONDONI, et y ont participé personnellement 15 professeurs tandis que 3 autres ont envoyé des mémoires. Les comptes-rendus de la « Semaine d'Etude » ont été publiés dans le 7-ème volume des « Scripta Varia » de l'Académie; ils représentent un volume de 364 pages.

La deuxième « Semaine d'Etude » a eu lieu du 19 au 26 novembre 1951; elle a été dédiée au « Problème des Microséismes ». Elle a tenu

également ses séances au Siège de l'Académie Pontificale des Sciences, dans la « Casina Pio IV », dans les jardins du Vatican; elle a été présidée par l'Acémicien Pontifical S. E. FRANCESCO VERCCELLI; y ont participé personnellement 15 professeurs tandis que 4 autres ont envoyé des mémoires (L. DONN, C. MORELLI, F. PRESS, E. ROSINI). Les comptes-rendus de la « Semaine d'Etude » ont été publiés dans le 12-ème volume des « Scripta Varia » de l'Académie; ils forment un volume de 466 pages.

La « Semaine d'Etude » actuelle, troisième de la série, a été dédiée au « Problème des Oligoéléments dans la vie végétale et animale »; elle a eu lieu du lundi 24 avril au mardi 2 mai 1955; ainsi que la précédente, elle a tenu ses séances au siège de l'Académie Pontificale des Sciences, dans la « Casina Pio IV », dans les jardins du Vatican.

La présidence de cette « Semaine d'Etude » sur « Le Problème des Oligoéléments dans la vie végétale et animale » a été confiée à l'Acémicien Pontifical, Prof. Dr. JOSÉ MARÍA ALBAREDA HERRERA, Directeur de l'Institut de Pédologie e de Physiologie Végétale de l'Université de Madrid, Secrétaire Général du Conseil Supérieur des Recherches Scientifiques d'Espagne. L'organisation générale de la « Semaine » a été confiée au Chancelier de l'Académie Pontificale des Sciences, le Dr. PIETRO SALVIUCCI.

Ont été invités à la réunion les savants suivants:

S.E. Prof. Dr. J. ALBAREDA HERRERA, Académico Pontificio, Director del Instituto de Edafología y Fisiología Vegetal de la Universidad - Madrid (Espagne); Prof. Dr. D. I. ARNON, Professor of Plant Physiology at the University of California - Berkeley, Calif. (U.S.A.); Prof. Dr. W. R. AYKROYD, Director of Nutrition Division F.A.O. - Roma (Italie); Prof. Dr. G. BERTRAND, Chef du Service de Chimie biologique à l'Institut Pasteur - Paris (France); S. E. Prof. Dr. G. B. BONINO, Accademico Pontificio, Ordinario di Chimica fisica nell'Università di Bologna e Direttore della Sezione di Chimica della Facoltà Agraria dell'Università Cattolica di Milano - Milano (Italie); Prof. Dr. F. C. GERRETSEN, Hoogleeraar in de Microbiologie aan de Universiteit - Groningen (Pays-Bas); S. E. Prof. Dr. F. GIORDANI, Accademico Pontificio, Ordinario di Chimica Generale nell'Università - Napoli (Italie); S. E. Prof. Dr. G. GOLA, Accademico Pontificio, Ordinario di Botanica nell'Università - Padova (Italie);

Prof. Dr. W. LAATSCH, Ordinarius für Bodenkunde an der Universität und Vorstand des Instituts für Bodenkunde der Forstlichen Forschungsanstalt - München (Allemagne); Prof. Dr. J. LAVOLLAY, Professeur titulaire de Chimie agricole et biologique du Conservatoire National des Arts et Métiers - Paris (France); Prof. Dr. H. LUNDEGÅRDH, Director of the Institute of Plant Physiology - Uppsala (Suède); Prof. Dr. A. McCANCE, Director of Department of Experimental Medicine in the University - Cambridge (Grande-Bretagne); Prof. Dr. R. L. MITCHELL, Head of the Department of Petrochemistry in the Macaulay Institute of Soil Research - Aberdeen (Grande-Bretagne); Prof. Dr. E. G. MULDER, Laboratorium voor Microbiologie des Rijksuniversiteit - Groningen (Pays-Bas); S. E. Prof. Dr. G. QUAGLIARIELLO, Accademico Pontificio, Ordinario di Chimica biologica nell'Università - Napoli (Italie); S. E. Prof. Dr. P. RONDONI, Accademico Pontificio, Ordinario di Patología generale e sperimentale nell'Università - Milano (Italie); Prof. Dr. A. SANTOS RUIZ, Director del Instituto Español de Fisiología y Bioquímica en la Universidad Madrid (Espagne); Prof. Dr. K. SCHARRER, Direktor des Agrikulturalchemischen Instituts der Justus-Liebig Hochschule - Giessen (Allemagne); Prof. Dr. L. SEEKLES, Director Laboratorium voor medisch-veterinaire chemie der Rijksuniversiteit - Utrecht (Pays-Bas); Prof. Dr. S. TONZIG, Direttore dell'Istituto di Botanica della Facoltà Agraria della Università Cattolica - Milano (Italie); Prof. Dr. L. VILAS, Catedrático de Microbiología en la Facultad de Farmacia de la Universidad - Madrid (Espagne); Prof. Dr. A. I. VIRTANEN, Director of the Biochemical Institute - Helsinki (Finlande); Prof. Dr. T. WALLACE, Director of Department of Agriculture in the University - Bristol (Grande-Bretagne).

Le règlement des « Semaines d'Etude » prescrit que le nombre des participants doit être rigoureusement limité, ce qui, à grand regret, a empêché d'inviter d'autres illustres savants. Tous les invités, à l'exception des Proff. GIORDANI, GOLA, QUAGLIARIELLO et RONDONI, qui n'ont pas pu intervenir, ont participé à la Réunion.

Ont aussi participé à la Réunion: en qualité d'interprète et redactrice des procès-verbaux M.me VALENTINE PRÉOBAJENSKI; en qualité de sténographes de séance M.lles MARIE PINO, JOSEPHINE LUCAS et REBECCA WILLIAMSON; en qualité de dactylographe polyglotte M.me FERNANDA MARESCI. Le Comité de Réception pour les Dames était composé de M.me HÉLÈNE LOTTI, la Comtesse KARINA CALVI DI COENZO, M.lle GIANNA

MICELI; le Bureau de Presse était présidé par le Dr. FRANCESCO SALVIUCCI; en qualité de technicien pour la régistration des discours et la projection M. MAURO ERCOLE, assisté par des opérateurs.

Les savants participants ont pu faire des démonstrations techniques et des projections.

Les séances se tenaient deux fois par jour, le matin et l'après-midi; chaque séance était présidée par un différent Participant à la réunion.

Le dimanche 24 avril tous les participants à la « Semaine d'Etude » ont été reçus en audience solennelle par le Saint Père.

Après l'audience a eu lieu, au siège de l'Académie Pontificale des Sciences, une Réunion extraordinaire de l'Académie, à laquelle ont été invités les Participants à la « Semaine d'Etude ».

Les travaux de la « Semaine d'Etude » ont été consignés dans les « Conclusions » qui ont précisé les différents points des questions et les suggestions relatives aux recherches paraissant les plus aptes à résoudre les difficultés.

Dans les pages qui suivent, après le compte-rendu de l'audience du Saint-Père et le règlement de la « Semaine d'Etude », sont imprimés les rapports originaux présentés à la Réunion, et les discussions qui les ont suivis. Les rapports sont publiés dans l'ordre dans lequel ils ont été présentés. Les « Conclusions » de la « Semaine d'Etude » se trouvent à la fin du présent volume.

L' AUDIENCE
ET LE DISCOURS DU SAINT-PÈRE

Le matin du dimanche 24 avril, le Saint Père a accordé dans la Salle du Concistoire du Palais Apostolique Vatican, une audience solennelle à l'Académie Pontificale des Sciences à l'occasion de la « Semaine d'Etude » promue par l'Académie même. Ont participé aussi à l'audience de nombreux hauts personnages et des représentations.

Etaient présent Leurs Eminences les Cardinaux: TISSERANT, MICARA, PIZZARDO, académicien honoraire, PIAZZA, VERDE, COSTANTINI, CICOGNANI et OTTAVIANI.

De nombreux Académiciens Pontifical sont intervenus, et précisément Leurs Excellences: le Rèv.me Père AGOSTINO GEMELLI, O.F.M. Président, AMALDI, ARMELINI, BOLDRINI, CASTELLANI, COLONNETTI, CROCCO, GIORDANI, LOMBARDI, PANETTI, PENSA, PISTOLESI, PIERANTONI, SEVERI, BONINO, DE BLASI, GARCÍA-SÍÑERIZ, ALBAREDA-HERRERA, DE KAR-MANN, NIEHANS, TISELIUS, VIRTANEN; les Académiciens Surnuméraires Rèv. PP. ALBAREDA, O'CONNELL, JUNKES; le Chancelier de l'Académie Dr. PIETRO SALVIUCCI.

Assistait en outre l'Académicien Honoraire Prof. Nob. RICCARDO GALEAZZI-LISI, Directeur des Services Sanitaires de la Cité du Vatican.

Parmi le groupe des académiciens assistaient les Participants à la « Semaine d'Etude » MM. les professeurs: D. ARNON, W. R. AYKROYD, G. E. BERTRAND, F. C. GERRETSEN, W. LAATSCH, J. LAVOLLAY, H. LUN-DEGÅRDH, R. A. MC CANCE, R. L. MITCHELL, A. SANTOS RUIZ, K. SCHARRER, L. SEEKLES, S. TONZIG, L. VILAS, T. WALLACE.

Ont été présents aussi S. E. Rèv.me Monseigneur TARDINI, Pro-Secrétaire d'Etat; les hauts Prélats du Secrétariat de l'Etat, LL.EE. Rèv.mes les Monseigneurs SAMORÉ, GRANO et DELL'ACQUA; un groupe d'Assesseurs et de Secrétaire des Sacrées Congrégations, ainsi qu'un groupe d'Archevêques et d'Evêques, parmi lesquels LL.EE. Rèv.mes les Monseigneurs VE-

NINI, VAN LIERDE, FERRETTO, BRACCI, ROBERTI, SIGISMONDI, CONFALONIERI, PRINCIPI, NARDONE, COSTANTINI GIOVANNI, O'CONNOR; KNOX, Délégué Apostolique en Afrique Orientale et Occidentale Britannique; DEFEBVRE, Evêque de Ningpo; KELLETER, Evêque de Bethlém (Afrique du Sud); LUECK, Evêque d'Aliwall; VAN ELSWICK, Evêque de Morogoro; RAIBLE, Vicaire Apostolique de Wamba; VERHILLE, Vicaire Apostolique de Fort-Rousset; SUENENS, Evêque Auxiliaire de Malines; les Rév.mes Pères COUSSA et LARRAONA, et autres personnages de la Curie et de l'Etat de la Cité du Vatican.

Étaient présents du Corps Diplomatique Leurs Excellences les Ambassadeurs de Pologne, France, Espagne, Argentine, Autriche, Colombie, Haïti, Bolivie, Équateur, Liban, République Dominicaine, Portugal, Venézuela, Iran, Panama, Allemagne, Paraguay, Irlande et Pérou; Leurs Excellences les Ministres du S.O.M. de Malte, Pays-Bas, Nicaragua, Japon et Chine; M.M. les Chargé d'Affaire de El Salvador, Uruguay et Indonésie; le Conseiller de l'Ambassade d'Italie, le Secrétaire de l'Ambassade du Chili et de nombreux autres Conseillers, Secrétaires et Conseillers Ecclésiastiques.

Le Saint Père a fait son entrée dans la salle à 10 heures, accompagné par sa Noble Antichambre avec S. E. Rev. Monseigneur CALLORI DI VIGNALE, Maître de Chambre, Monseigneurs TORALDO e NASALLI ROCCA DI CORNELIANO, Caméliers Secrets Participants, et sa Garde Noble.

Une déférente manifestation d'hommage a accueilli l'arrivée du Saint-Père.

Monté au trône, le Saint-Père a adressé à l'assemblée le savant discours qui suit:

Au moment où Nous vous adressons la bienvenue dans cette maison, dont les portes ont toujours été largement ouvertes à ceux qui cultivent les arts et les sciences, Nous voulons vous exprimer Notre vive satisfaction à vous tous, Excellentissimes Messieurs, membres de Notre Académie.

Votre vie, consacrée à l'étude des phénomènes naturels, vous permet d'observer chaque jour de plus près et d'interpréter les merveilles, que le Très-Haut a inscrites dans la réalité des choses. Oui, vraiment, le monde créé est une manifestation de la sagesse et de la bonté de Dieu, parce que toutes choses ont reçu de Lui l'existence et reflètent sa grandeur. Chacune d'elles est comme une de Ses paroles et porte la marque de ce que Nous pourrions appeler l'alphabet fondamental, ces lois naturelles et universelles, dérivées de lois et d'harmonies encore plus hautes, dont le travail de la pensée s'efforce de découvrir toute l'ampleur et le caractère d'absolu.

Les créatures sont des paroles de vérité, qui en soi, dans leur être, ne renferment ni contradictions ni confusions, toujours cohérentes entre elles, souvent difficiles à comprendre à cause de leur profondeur, mais conformes toujours, quand elles sont clairement connues, aux exigences supérieures de la raison. La nature s'ouvre devant vous comme un livre mystérieux, mais étonnant, qui demande à être feuilleté page à page et lu avec ordre, dans le souci de progresser sans cesse; de la sorte tout pas en avant continue les précédents, les redresse, et monte sans arrêt vers la lumière d'une plus profonde compréhension.

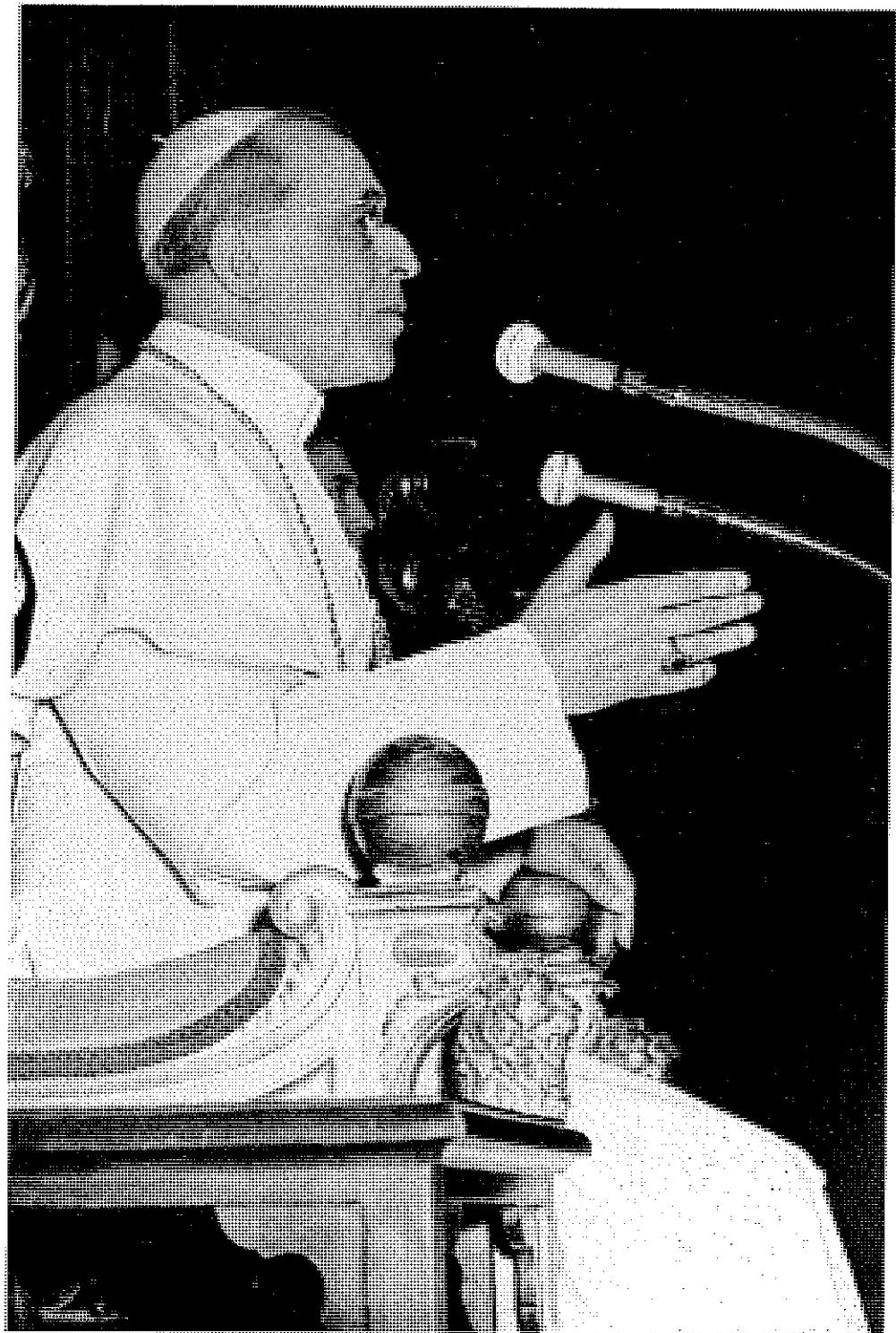
La mission qui vous a été confiée compte ainsi parmi les plus nobles, car vous devez être, en un certain sens, les découvreurs des intentions de Dieu. Il vous appartient d'interpréter le livre de la nature, d'en exposer le contenu et d'en tirer les conséquences pour le bien commun.

Tout d'abord, vous êtes les interprètes du livre de la nature. Il est donc nécessaire que vous fixiez le regard sur chacune de ses lignes et restiez bien attentifs à n'en passer aucun détail. Ecartez toute préven-

tion personnelle et pliez-vous avec docilité à tous les indices de vérité qui s'y font jour.

Nous savons l'importance exceptionnelle de l'époque que traverse la science à l'heure actuelle, importance dont tous ne parviennent pas à se rendre compte. En effet, devant les problèmes scientifiques, on trouve trois attitudes différentes. Certains, et c'est le grand nombre, se contentent d'admirer les résultats extraordinaires obtenus dans le domaine technique et croient, semble-t-il, que ces résultats constituent le but exclusif ou du moins principal poursuivi par les sciences. D'autres, plus cultivés, sont capables d'apprécier la méthode et les efforts qu'impose la recherche scientifique. Ils peuvent ainsi en suivre et en comprendre les progrès géniaux, les angoisses et les joies, les succès et les arrêts; ils observent avec intérêt l'incessant perfectionnement des instruments mathématiques, des procédés expérimentaux, des appareils; assistent avec passion à l'élaboration des hypothèses, à l'établissement des conclusions, au labeur de l'intelligence pour harmoniser les données selon certains schémas, modifier les considérations antérieures et formuler les théories nouvelles qu'on s'efforcera de vérifier. Ces multiples aspects sont bien compris de tous ceux qui, pour divers motifs, s'intéressent au travail des savants. Quant aux problèmes les plus essentiels du savoir scientifique, ou dont l'ampleur intéresse tout son domaine, les esprits, qui les perçoivent, demeurent. Nous semble-t-il, relativement peu nombreux, et Nous Nous réjouissons à la pensée que vous êtes parmi eux. La science n'en est-elle par arrivée au point d'exiger que le regard pénètre aisément les réalités les plus profondes et s'élève jusqu'à une vue complète et harmonieuse des ensembles?

1. - Il y a un peu plus d'un siècle et demi, en partant de bases rationnelles, on formulait les premières hypothèses sur la structure discontinue de la matière et sur l'existence des plus petites particules, considérées comme les ultimes constituants des corps. Et depuis lors jusqu'à nos jours, on a compté, pesé, analysé les molécules; puis l'atome qui passait d'abord pour indivisible, fut divisé en ses éléments, examiné, attaqué dans ses structures les plus profondes; on détermina la charge électrique élémentaire, la masse du proton; le neutron, les mésons, le positron et bien d'autres particules élémentaires furent identifiés et leurs caractéristiques précisées. On a trouvé le moyens de guider ces particules, de les accélérer et de les lancer comme il faut contre les noyaux atomiques,



mais c'est spécialement en utilisant les neutrons que l'on a réussi à produire la radioactivité artificielle, la fission des noyaux, la transformation d'un élément en d'autres éléments, la production d'énormes quantités d'énergie.

Des théories et de géniales représentations du monde ont vu le jour; on a créé de nouveaux instruments mathématiques et des géométries de conception originale. Nous ne pouvons que citer la relativité restreinte et la relativité généralisée, les quanta, la mécanique ondulatoire, la mécanique quantique, les idées récentes sur la nature des forces nucléaires, les théories sur les origines des rayons cosmiques, les hypothèses sur la source de l'énergie stellaire.

Tout ceci permet d'entrevoir à quelle profondeur la science se meut et l'on devine aisément les problèmes d'ordre intellectuel qui vont surgir. Qu'on veuille bien considérer en outre que, si l'audacieuse milice des conquérants ouvre toujours de nouvelles brèches dans la citadelle de la nature, le reste de l'armée se répand en d'innombrables autres champs du savoir: et voici le point de vue de l'extension, qui s'ajoute à celui de la profondeur. On souhaiterait, comme le hardi grimpeur parvenu au sommet de la montagne, pouvoir embrasser d'un seul coup d'œil toute l'étendue du panorama.

S'il Nous était possible, Nous voudrions vous montrer les points les plus avancés des divers secteurs de la science, pour qu'apparaisse à vos yeux l'ensemble de la situation présente.

Voyez l'astronomie qui, au moyen d'instruments entrés depuis peu en service, réussit à dévoiler dans les cieux des mystères entièrement nouveaux et qui, aidée par les sciences physiques, s'est engagée sur la voie qui la conduira peut-être à expliquer l'origine des énergies stellaires; voici la géologie qui détermine l'âge absolu des roches par les méthodes de la radioactivité et des rapports isotopiques: l'âge même de la terre commence à être déterminé; en minéralogie, les structures cristallines révèlent leurs secrets aux analyses puissantes exécutées à l'aide de radiations très courtes; la chimie inorganique et organique résout les problèmes complexes de la structure des macromolécules; elle réussit à construire des chaînes moléculaires très grandes et transforme, par les applications qui en dérivent, des secteurs entiers de l'industrie; la radiotechnique est arrivée à produire des ondes électromagnétiques, qui touchent la limite des radiations lumineuses de plus grande longueur d'onde; on fouille la

terre pour en découvrir les trésors cachés, on explore les couches les plus élevées de l'atmosphère; la génétique découvre, dans certains complexes cellulaires particuliers, des aspects nouveaux de la puissance de la vie; la physiologie et la biologie, partant des positions conquises par la chimie, la physico-chimie et la physique, rencontrent chaque jour des merveilles insoupçonnées et, chaque jour, interprètent, expliquent, prévoient et réalisent des faits nouveaux; le monde des virus cède aux assauts du microscope électronique et de la technique de la diffraction électronique; le spectrographe de masse, les compteurs de Geiger, les isotopes radioactifs, tous ces instruments facilitent l'avance des sciences qui affrontent la plus grande énigme de toute la création sensible: le problème de la vie.

Dans cette synthèse de tout le savoir, la philosophie vient préciser, avec l'étendue de ses conceptions, les traits distinctifs des faits vitaux, le caractère nécessaire du principe substantiel d'unification, la source interne de l'agir, de la croissance, de la multiplication, l'unité vraie de l'être vivant. Elle montre aussi ce que doit être la matière, dans certains de ses aspects fondamentaux, pour que puissent ensuite se réaliser dans l'être vivant les propriétés caractéristiques qui le constituent.

Telles sont, sans doute, les domaines qui donneront le plus de travail à la science de demain.

2. - Mais le sentiment d'euphorie qui saisit l'esprit en face de tels résultats, est contrarié par une impression de désarroi et d'angoisse chez ceux, qui suivent, en responsables, le déroulement des faits. Angoisse et désarroi à comprendre au sens le plus élevé, comme signe d'une aspiration vers une organisation toujours plus parfaite de la pensée, vers une clarté toujours plus grande dans les perspectives. Car les triomphes de la science sont eux-mêmes à l'origine des deux exigences, auxquelles Nous avons fait allusion plus haut.

a) Il s'agit avant tout de pénétrer la structure intime des êtres matériels et de regarder les problèmes qui intéressent les fondements substantiels de leur être et de leur action. Alors se pose la question: « La science expérimentale peut-elle par elle-même résoudre ces problèmes? Sont-ils de son ressort et tombent-ils dans le champ d'application de ses méthodes de recherche? ». Il faut répondre que non. La science procède à partir des sensations, qui sont externes par nature, et, par elles, à travers le processus de l'intelligence, elle descend toujours plus profondément dans les

replis cachés des choses; mais elle doit s'arrêter à un certain point, quand surgissent des questions qu'il est impossible de trancher par le moyen de l'observation sensible.

Quand le savant interprète les données expérimentales et s'attache à expliquer des phénomènes qui ont pour siège la nature matérielle en tant que telle, il a besoin d'une lumière qui procède par voie inverse, de l'absolu au relatif, du nécessaire au contingent, et qui soit capable de lui révéler cette vérité que la science n'est pas en mesure d'atteindre par ses propres méthodes, parce qu'elle échappe totalement aux sens: cette lumière, c'est la philosophie, c'est-à-dire la science des lois générales, qui valent pour tout être, et donc aussi pour le domaine des sciences naturelles, au delà des lois connues empiriquement.

b) *La seconde exigence jaillit de la nature même de l'esprit humain, qui veut avoir une vue cohérente et unifiée de la vérité. Si l'on se contente de juxtaposer les diverses disciplines et leurs ramifications comme une sorte de mosaïque, on obtient une composition anatomique du savoir, d'où la vie semble s'être ensuie. L'homme exige qu'un souffle d'unité vivante anime ses connaissances: c'est ainsi que la science devient féconde et que la culture engendre une doctrine organique. De là naît une seconde question: « La science peut-elle effectuer, avec les seuls moyens qui lui sont caractéristiques, cette synthèse universelle de la pensée? Et en tout cas, étant donné que le savoir est fractionné en d'innombrables secteurs, quelle est, parmi tant de sciences, celle qui pourrait la réaliser? ». Nous croyons, ici encore, que la nature de la science ne lui permet pas de mener à bien une synthèse aussi universelle.*

Cette synthèse demande un fondement solide et très profond, d'où elle tire son unité et qui serve de base aux vérités les plus générales. Les diverses parties de l'édifice ainsi uniifié doivent trouver en ce fondement les éléments qui les constituent dans leur essence. Une force supérieure est requise ici: unifiante par son universalité, claire dans sa profondeur, solide par son caractère d'absolu, efficace par sa nécessité. Encore une fois, cette force c'est la philosophie.

3. - *Hélas! depuis un certain temps la science et la philosophie se sont séparées. Il serait difficile d'établir les causes et les responsabilités d'un fait aussi dommageable. Il est certain que la cause de ce divorce n'est pas à chercher dans la nature même des deux voies qui conduisent*

à la vérité, mais dans les contingences historiques et dans les personnes, qui ne possédaient pas toujours la bonne volonté et la compétence qui eussent été nécessaires.

Les hommes de science ont cru, à un moment donné, que la philosophie naturelle était un poids inutile et ils ont refusé de se laisser orienter par elle. D'autre part, les philosophes n'ont plus suivi les progrès de la science, et se sont attardés sur des positions formelles qu'ils auraient pu abandonner. Mais à l'heure où, comme Nous l'avons montré, s'est imposée la nécessité inéluctable d'un travail sérieux d'interprétation, ainsi que de l'élaboration d'une synthèse unifiante, les savants ont subi l'influence des philosophies que les circonstances du moment mettaient à leur disposition. Beaucoup d'entre eux, peut-être, ne se sont même pas aperçus nettement que leurs investigations scientifiques se ressentaient de tendances philosophiques particulières.

Ainsi, par exemple, la pensée mécaniste a guidé pendant longtemps l'interprétation scientifique des phénomènes observés. Les tenants de cette position à caractère philosophique croyaient que tout phénomène naturel se ramenait à un ensemble de forces physiques, chimiques et mécaniques, dans lequel le changement et l'action résultaient uniquement d'une disposition différente des particules dans l'espace et des forces ou déplacements, auxquels chacune d'elles était soumise. Il s'ensuivait que, théoriquement, on pouvait prévoir avec certitude un effet futur quelconque, à condition de connaître, au départ, toutes les données géométriques et mécaniques. Selon cette doctrine, le monde ne serait qu'une énorme machine, composée d'une série innombrable d'autres machines unies entre elles.

Les progrès ultérieurs de la recherche expérimentale ont montré cependant l'inexactitude de ces hypothèses. La mécanique déduite des faits du macrocosme est incapable d'expliquer et d'interpréter tous les phénomènes du microcosme: d'autres éléments entrent en jeu qui échappent à toute explication de nature mécaniste.

Qu'on prenne, par exemple, l'histoire des théories sur la structure de l'atome. Au début, elles se basaient essentiellement sur une interprétation mécaniste, qui représentait l'atome comme un système planétaire minuscule, constitué par des électrons tournant autour du noyau selon des lois entièrement analogues à celles de l'astronomie. La théorie des quanta imposa ensuite la révision complète de ces conceptions et suscita des inter-

prédictions géniales, certes, mais aussi indiscutablement étranges. On connaît en effet un type d'atome qui, sans éliminer l'aspect mécaniste, mettait en évidence celui des quanta.

On se représenta donc différemment la façon de se comporter des corpuscules: des électrons, qui, bien que tournant autour du noyau, ne rayonnaient pas d'énergie — alors que, selon les lois de l'électro-dynamique, ils auraient dû en rayonner —, des orbites qui ne pouvaient varier de façon continue, mais seulement par sauts: des émissions d'énergie qui se réalisaient uniquement à l'occasion du passage de l'électron d'un état quantique à un autre, produisant aussi des photons d'une fréquence particulière, fixées par la différence des niveaux d'énergie.

Ces hypothèses de départ furent ensuite précisées, lorsque naquit la mécanique ondulatoire, qui les encadra dans une perspective mathématique et intellectuelle plus générale et plus cohérente, d'où les concepts mécanistes traditionnels ont disparu.

Alors, spontanément, on se pose la question: « Comment se fait-il que le monde macroscopique, bien que constitué d'éléments qui appartiennent tous au monde microscopique, obéisse cependant à des lois différentes? ». La science répond avant tout par cette remarque: quand le nombre des éléments en jeu est très grand (des milliards de milliards de particules), les lois statistiques dérivant du comportement des divers éléments pris dans leur ensemble, sont celles que l'on considère comme rigoureuses dans le monde directement observable.

Mais si la méthode statistique satisfait aux fins de la science, elle fait voir aussi combien fausses étaient certaines hypothèses philosophiques, qui s'arrêttaient à des constatations externes sensibles et les étendaient arbitrairement à tout le cosmos.

On trouve confirmation de ceci dans les théories de la physique nucléaire moderne. En effet, les forces qui tiennent unis les noyaux sont différentes de celles que l'on a découvert en étudiant le macrocosme. Pour les interpréter, il faut même changer la façon habituelle de concevoir la particule corpusculaire, l'onde, la valeur exacte de l'énergie et la localisation rigoureusement précise d'un corpuscule, comme aussi le caractère prévisible d'un événement futur.

L'insuccès de la théorie mécaniste a conduit des penseurs à des hypothèses entièrement différentes, empreintes plutôt d'une espèce d'idéalisme scientifique, dans lequel la considération du sujet agissant tient le rôle

principal. Par exemple, la mécanique des quanta et son principe fondamental d'indétermination, avec la critique du principe de causalité qu'il suppose, apparaissent comme des hypothèses scientifiques influencées par des courants de pensée philosophique.

Mais parce que ces hypothèses elles-mêmes ne comblient pas le désir d'une entière clarté, beaucoup de penseurs illustres en sont réduits au scepticisme en face des problèmes de philosophie des sciences. Ils prétendent qu'il faut se contenter de simples constatations de faits, et tenter de les faire entrer dans des représentations formelles synthétiques et simples, afin de prévoir les développements possibles d'un système physique à partir du donné initial. Cet état d'esprit signifie qu'on renonce à l'introspection conceptuelle et qu'on perd l'espoir d'accomplir des synthèses géniales universelles. Nous ne croyons cependant pas qu'un tel pessimisme soit justifié: Nous estimons plutôt que les sciences naturelles, en contact permanent avec une philosophie du réalisme critique qui fut toujours celui de la « philosophia perennis » chez ses représentants les plus éminents, peuvent arriver à une vision d'ensemble du monde visible, qui satisfasse en quelque manière la recherche et le désir ardent de la vérité.

Mais il est nécessaire de souligner un autre point: si la science a le devoir de chercher sa cohérence et de s'inspirer de la saine philosophie, jamais celle-ci ne doit prétendre à déterminer les vérités, qui relèvent uniquement de l'expérience et de la méthode scientifique. Seule en effet l'expérience, entendue au sens le plus large, peut indiquer quelles sont, dans l'infinie variété des grandeurs et des lois matérielles possibles, celles que le Créateur a voulu vraiment réaliser.

Interprètes autorisés de la nature, soyez aussi les maîtres qui expliquent à leurs frères les merveilles qui se déploient dans l'univers, et que, mieux que les autres, vous voyez rassemblées en un seul livre. En effet, la majorité des hommes ne peut guère se consacrer à la contemplation de la nature; ils ne tirent des faits sensibles que des impressions superficielles. Vous, qui interprétez la création, devenez des maîtres avides d'en divulguer la beauté, la puissance et la perfection et de les faire goûter à d'autres. Enseignez à regarder, à comprendre, à aimer le monde créé, pour que l'admiration des splendeurs aussi sublimes fasse plier le genou et invite les esprits à l'adoration.

Ne trahissez jamais ces aspirations, ces espérances. Malheur à ceux qui se servent de la science exposée faussement pour faire sortir les hom-

mes du droit sentier! Ils ressemblent à des pierres jetées par malveillance sur le chemin du genre humain; il sont l'achoppement sur lequel vont trébucher les esprits en quête de vérité.

Vous avez en mains un puissant instrument pour faire le bien. Rendez-vous compte des joies indicibles que vous procurez aux autres, quand vous leur dévoilez les mystères de la nature et leur en faites saisir les harmonies secrètes: les cœurs et les regards de ceux qui vous écoutent, sont comme suspendus à votre parole, prêts à chanter un hymne de louange et d'action de grâces.

A la fin de Son discours écouté avec une attention profonde et émue, Sa Sainteté accorda la Bénédiction Apostolique aux participants à l'audience qui exprimèrent leur pieuse reconnaissance par des applaudissements unanimes.

Après être descendue du trône, Sa Sainteté s'entretint d'abord avec les Em.mes Cardinaux et ensuite avec LL.EE. les Evêques présents à l'audience.

Ensuite Sa Sainteté s'arrêta parmi Leurs Excell. les Académiciens Pontificaux, et les Participants à la Semaine d'Etude, en commençant par le Président, le Rév.me Père Gemelli. Sa Sainteté a eu des paroles aimables et exprima Sa satisfaction aux représentants des différentes Pays en s'adressant à chacun dans sa propre langue.

Une manifestation chaleureuse d'hommage se renouvela au moment où le Saint-Père laissa la Salle du Concistoire.

Après la solennelle Audience Pontificale eu lieu au siège de l'Académie Pontificale des Sciences à la Casina de Pie IV dans la Cité du Vatican, la séance ordinaire de l'Académie. Y prirent part aussi les nouveaux Académiciens, accueillis cordialement par leurs doyens, ainsi que les savants, Participants à la Semaine d'Etude.

A l'ouverture de la séance, le Rév.me Père Gemelli, O.F.M., Président de l'Académie, proposa aux participants d'envoyer un message d'hommage et de remerciement à Sa Sainteté qui s'état daignée de les illuminer par Son Auguste enseignement. L'assemblée donna son consentement par des applaudissements unanimes, tandis que les présents se levaient pour mieux exprimer leur révérand hommage filial.

Ensuite plusieurs Académiciens présentèrent leurs communications scientifiques originales.

LES « SEMAINES D'ÉTUDE »
ET LEUR RÈGLEMENT

Losque l'Académie Pontificale des Sciences fut fondée en 1936 par le Saint-Père Pie XI, de vénérée mémoire, dans son « Motu Proprio » du 28 octobre 1936 « In multis solaciis », cette création suscita dans les milieux scientifiques un mouvement général de sympathie et d'admiration. Cette institution unique au monde, qui groupait en une même assemblée des représentants de toutes les Nations civilisées, était appelée en effet à de hautes destinées dans le développement de la pensée scientifique.

D'autre part, cette oeuvre de coopération fut accueillie avec un véritable soulagement par tous ceux que plongeait dans le désarroi le plus profond la période d'après-guerre 1914-1918. On voyait, en effet, s'altérer profondément les caractères d'objectivité et de désintérêt propre au travail scientifique, et s'affirmer même une tendance à asservir la science à des fins pragmatiques.

Tout au contraire, dans l'immortel « Motu Proprio » du 28 octobre 1936, le Pape Pie XI proclamait solennellement la dignité de la recherche de la vérité pour elle-même et, élévant sa pensée au-dessus de toute

English Summary

THE STUDY WEEKS

When the Pontifical Academy of Science was founded in 1936 by His Holiness Pius XI who convened in an assembly of scientists the representatives of all civilised Nations, its creation met with favour, admiration and expectation in the scientific world. The birth of the Academy took place after the turmoil which followed the 1914-1918 world war and which had deeply modified the character of objectivity of scientific work, sometimes even subjected to pragmatic aims.

His Holiness Pius XI in his immortal « Motu Proprio » of 28 October 1936, solemnly proclaimed the dignity of the search for truth as such and even stated that he asked his « Pontifical Academicians » to dedicate themselves with ever increasing fervour to the progress of science and, consequently, to the cult of truth. His Holiness emphasised his thinking by nominating a certain number of new non Catholic Pontifical Academicians and this gesture served to acknowledge the eminent place which is reserved to purely intellectual values within the fold of the Catholic Church. The foundation of the Pontifical Academy of Science

préoccupation utilitaire, affirmait qu'il ne demandait rien d'autre aux nouveaux « Académiciens Pontificaux » que de se consacrer avec une ferveur toujours plus grande au progrès de la science et, par là, au culte de la vérité: « C'est Notre souhait ardent et Notre ferme espérance: que par cet Institut, à la fois Notre et leur, les « Académiciens Pontificaux » contribuent toujours plus et mieux au progrès des sciences. Nous ne leur demandons pas autre chose; car en ce dessein généreux et ce noble labeur consiste le service, qu'en faveur de la vérité, nous attendons de leur part » (*).

La consécration pratique de cette pensée, par la nomination d'un certain nombre de non-catholiques parmi les nouveaux Académiciens Pontificaux a fait une profonde impression sur beaucoup d'esprits, comme l'ont montré les réactions de la presse internationale de l'époque et de nombreux témoignages individuels d'hommes de science et des plus grands savants du monde.

Pour toutes ces raisons, la fondation de l'Académie Pontificale des Sciences a été hautement appréciée dans le monde scientifique et y a

(*) « Nobis autem in votis expectationeque est, fore ut « Pontificii Academicorum » vel per hoc Nostrum suumque studiorum Institutum, ad scientiarum progressionem fovendam amplius excelsiusque procedant, ac nihil praeterea aliud petimus, quando quidem hoc eximio proposito praeclaroque labore famulatus illi inititur servientium veritati, quem ab iisdem postulamus ».

was therefore highly appreciated by the scientific world and gave rise to great hopes as to its possibility of action.

His Holiness Pius XII, actually reigning, who had collaborated with his Predecessor to the foundation of the Academy, has given proof of his high appreciation for the Institution both by presiding the solemn academical meetings, where he has proffered speeches of high scientific concept, as by granting, by an Apostolic Brief of 25 November 1940, the title of Excellency to the members of the Academy in token of his high satisfaction.

English Translation

Science daily brings forth new problems which usually afford diverse and often contradictory attempts towards their solution. Thus it happens often that we meet with opposing opinions even amongst the most authorised representatives of a branch of science, and especially amongst those who are dedicated to the study of the same problem. These divergencies sometimes last over long periods of time and even constitute a serious difficulty to the imparting of science and frequently also a considerable obstacle towards its development.

fait naître de grands espoirs quant aux possibilités d'action d'une institution si opportune.

Le Saint-Père Pie XII, qui avait collaboré avec son Prédécesseur au projet et à la fondation de l'Académie et qui l'avait représenté comme Légat personnel lors de l'inauguration solennelle, ne s'est pas borné à maintenir à son égard ses sentiments de haute estime par sa présence à de solennelles séances académiques où il daigna prononcer des discours d'une haute portée scientifique. Il a tenu en outre à lui donner un nouveau témoignage de son auguste satisfaction en donnant à ses membres le titre d'Excellence, par le Bref Apostolique du 25 novembre 1940.

* * *

Les sciences posent chaque jour des problèmes nouveaux qui donnent lieu d'ordinaire à divers essais de solution, souvent contradictoires. Il arrive ainsi constamment que parmi les représentants les plus autorisés d'une science, et en particulier parmi ceux qui se sont consacrés à l'étude d'une même question, on rencontre des opinions opposées. Pareilles divergences se maintiennent parfois durant de longues périodes et constituent à la fois une grave difficulté pour l'enseignement des sciences, et fréquemment aussi un obstacle considérable.

Par ailleurs, l'expérience montre que les méthodes actuellement pratiquées dans la discussion des problèmes scientifiques, n'ont qu'une efficacité limitée au point de vue de l'établissement d'une unité de doctrine.

On the other hand, experience has shown that the methods which are applied nowadays in the discussion of scientific problems have but a limited efficacy so far as the establishing of a unity of doctrine is concerned.

It would therefore be highly desirable to promote all that could facilitate an agreement on the points being discussed.

A procedure seems to be especially useful in this respect, that is the establishing of extensive personal contacts between representatives of differing opinions in relation to a given subject.

Personal contact among scientists in fact undoubtedly constitutes the best means towards reaching the solution of scientific controversies.

It is towards this aim that the Pontifical Academy of Science has resolved to organise such scientific encounters, and the organisation of these encounters, which are called « Study Weeks » is governed by the following:

REGULATIONS OF THE « STUDY WEEK »

1. - The Academy invites a few illustrious scientist amongst those who, having studied specific question carefully have come to a different conclusion, to convene in Rome, at the « Casina di Pio IV » in the grounds of the State of the

Il serait dès lors hautement souhaitable de promouvoir tout ce qui pourrait favoriser un accord sur les points en discussion.

Un procédé semble devoir être particulièrement utile sous ce rapport; savoir, l'établissement de contacts personnels prolongés entre quelques représentants d'opinions différentes au sujet d'une question déterminée.

Et, en effet, le contact personnel des hommes de science constitue, sans aucun doute, le moyen le plus efficace de résoudre les controverses scientifiques.

Dans ce but, l'Académie Pontificale des Sciences, a décidé d'organiser de pareilles rencontres scientifiques. L'organisation de ces rencontres qu'on a appelées « Semaine d'étude » a été établie de la manière suivante.

REGLEMENT DES « SEMAINES D'ETUDE »

1. - L'Académie invite quelques illustres savants, parmi ceux qui, ayant étudié spécialement une question déterminée, sont arrivés à des conclusions différentes, à se rencontrer à Rome, à son siège, la « Casina di Pio IV », à l'intérieur de l'Etat de la Cité du Vatican, afin d'y procéder en commun, en dehors de toute autre préoccupation, à un examen général de toutes les données du problème.

2. - Le but essentiel de ces discussions est de chercher à formuler de façon précise les raisons qui sont à la base de la divergence des opi-

Vatican City, so as to proceed together, free of any other preoccupation, to a general study of all the findings related to the problem.

2. - Principal object of these discussions will be to try and formulate the exact reasons which form the basis of divergency of opinions. The scientists invited to these meetings pledge themselves beforehand (*a priori*) to concentrate all their efforts towards this aim.

3. - A critical appraisal of these reasons will lead to either an agreement on a determined solution or to the acknowledgment that, at the present stage of findings, it is impossible to establish a uniform doctrine for the problem envisaged.

In the latter case, the scientists will have the task to:

a) specify the motives for which an agreement is at present unattainable;
b) define the kind of research which it would be desirable to undertake in view of the solution of the problem.

4. - The Academy shall only invite a very restricted number of representatives of each branch of science and these shall be chosen among illustrious scientists who do not belong to the Academy itself whilst Academicians versed in the same

nions. Les savants conviés aux réunions s'engageraient d'avance à concentrer leurs efforts dans cette direction.

3. - Un examen critique de ces raisons pourra aboutir soit à un accord sur une solution déterminée, soit à la constatation que, dans l'état actuel des connaissances, il est impossible, d'établir une unité de doctrine au sujet du problème envisagé.

Dans ce dernier cas, les savants invités auront pour tâche :

- a) de préciser les motifs pour lesquels un accord s'avère présentement irréalisable;
- b) de définir le genre de recherches qu'il serait souhaitable d'entreprendre en vue de résoudre le problème envisagé.

4. - L'invitation n'est adressée par l'Académie qu'à un très petit nombre de représentants de chaque science : ceux-ci sont choisis parmi des personnalités étrangères à l'Académie auxquels se joindront, dans la discussion, les Académiciens versés dans la même discipline. Cette invitation, de plus, ne se rapportera qu'à l'étude d'une question déterminée, pour chaque science.

5. - Les discussions ont un caractère strictement privé; elles ont la forme de conversations particulières, sans autre assistance que celle de quelques membres de l'Académie Pontificale des Sciences particulièrement compétents dans la matière.

branch of science will also attend. Furthermore, this invitation is only related to the study of one specified question for each science.

5. - Discussions shall be of a strictly private nature; they shall take the form of specific conversations, without any assistance other than that of a few Pontifical Academician particularly competent on the subject.

Interpreters stenographers and precis writers will be placed at the disposal of the scientists convened.

6. - The conclusions of these discussions will be published in the form of a Collective Report (to which individual reports may eventually be added) and shall mention :

- a) the points on which agreement may have been reached;
- b) the points on which agreement may not have been deemed possible;
- c) the reasons for which agreement may not have been reached;
- d) proposals related to research which seems the most apt to solve difficulties.

Des interprètes polyglottes, des sténographes, des rapporteurs, etc., seront à la disposition des savants réunis.

6. - Les conclusions de ces discussions seront publiées sous la forme d'une Note collective (à laquelle pourront éventuellement être jointes des annotations individuelles), mentionnant :

- a) les points sur lesquels un accord aurait été réalisé;
- b) les points sur lesquels un accord n'aurait pas paru réalisable;
- c) les raisons pour lesquelles l'accord n'aurait pu être réalisé;
- d) des suggestions relativement aux recherches paraissant les plus aptes à résoudre les difficultés.

7. - Les conclusions seront aussitôt imprimées et communiquées, par les soins de l'Académie Pontificale des Sciences, à tous les centres scientifiques qu'elles seraient de nature à intéresser.

8. - Tous les frais du voyage et du séjour à Rome des personnalités invitées sont à la charge de l'Académie Pontificale des Sciences.

L'Académie se fera un plaisir d'offrir la même hospitalité aux épouses des savants invités, à l'exclusion toutefois des frais de voyage.

7. - The conclusions shall immediately be printed and communicated by the Pontifical Academy of Sciences to all scientific centres which might be interested in receiving them.

All travel and hotel expenses shall be met by the Pontifical Academy of Science. Hospitality will be tendered in one of the principal hotels of Rome.

The Academy will be pleased to extend the same hospitality to the wives, of scientists, with the exclusion, however, of their travel expenses.

TRAVAUX SCIENTIFIQUES

ORIGINE DE LA NOTION D'OLIGOELEMENTS DE LA MATIERE VIVANTE

M. GABRIEL BERTRAND

I.

La notion des oligoéléments, qui intéresse de plus en plus les chercheurs et avec eux les utilisateurs, est apparue, dans les dernières années du siècle passé, comme une conséquence de la découverte du manganèse dans la laccase de l'arbre à laque [1] et du rôle attribuable à ce métal dans les réactions chimiques provoquées par ce type alors nouveau de ferment soluble.

Mon attention fut attirée en 1896 sur la présence probable de sesquioxide de manganèse dans les cendres de la laccase, préparées à température relativement basse, par une légère mais nette coloration rougeâtre. J'ai acquis la certitude de cette présence par la réaction de W. CRUM, c'est-à-dire la transformation du métal soupçonné en acide permanganique par chauffage des cendres avec du bioxyde de plomb et de l'acide nitrique. Un dosage, réalisé en mesurant l'intensité de cette réaction par colorimétrie, montra qu'il y avait, dans un gramme de laccase extraite du latex de l'arbre à laque du Tonkin, 46 milligr. de cendres et 0 mg 12 de manganèse [2].

La laccase possède la propriété, en solution aqueuse, de fixer l'oxygène libre sur les polyphénols dont les hydroxyles sont situés en position para ou ortho, mais non en méta. C'est ainsi qu'elle transforme quantitativement l'hydroquinol en quinone, avec formation intermédiaire et précipitation de quinhydrone cristallisée, ce qui est une réaction très caractéristique [3]. La laccase est très répandue dans la nature. Son existence a été reconnue d'une manière

générale dans les plantes et signalée souvent chez les animaux [4]. Extraite du latex de l'arbre à laque (*Rhus succedanea* L.), elle est particulièrement active.

Pour savoir s'il existait une relation entre la présence du manganèse et la propriété oxydante de la laccase, diverses expériences ont été réalisées. Tout d'abord, une solution aqueuse de cette substance a été soumise à une précipitation fractionnée par des additions progressives d'alcool; on a obtenu ainsi trois fractions de ferment dont la première était la plus active et la troisième moins que la laccase primitive. Il a été trouvé que l'activité oxydante des trois fractions variait dans le même sens que leur teneur en manganèse [5].

Encouragé par ce résultat, on a essayé d'éliminer tout le manganèse de la préparation tirée de l'arbre à laque. Le problème étant sans doute trop délicat à résoudre à cette époque, on n'a pu y réussir d'une manière satisfaisante. Mais on a atteint le but cherché d'une autre manière.

La laccase ayant été décelée par des recherches parallèles dans des plantes vertes, surtout dans les feuilles, on l'a extraite d'une série d'espèces différentes; vraisemblablement à la faveur d'une composition spéciale du suc cellulaire, on a obtenu, à partir de la luzerne, un produit très pauvre en manganèse, peu actif dans ces conditions, mais qui reprenait son activité par addition d'une quantité minime d'un sel de manganèse.

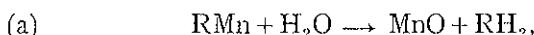
Ainsi, en opérant dans un ballon à robinet sur 50 cc. de solution aqueuse d'hydroquinol, o gr. 1 de la préparation oxydasique et o gr. 001 de manganèse à l'état de sulfate, on a constaté, après six heures d'agitation à la température ordinaire (vers +15°), les absorptions d'oxygène suivantes:

en présence de manganèse seul	0 cc 3
» » de laccase seule	0 cc 2
» » de laccase et de manganèse	6 cc 3 (*)

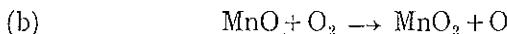
(*) Les premiers cristaux de quinhydrone sont apparus ici après 2 heures et demi d'agitation.

La même expérience effectuée en remplaçant le manganèse par le fer, l'aluminium, le cérium, le zinc, le cuivre, le calcium, le magnésium et le potassium, toujours à l'état de sulfates, a montré que le manganèse n'était remplacable par aucun de ces métaux.

On peut dès lors considérer la laccase comme une combinaison facilement hydrolysable de manganèse avec une substance organique acide et colloïdale. Son action aurait lieu de la manière suivante :



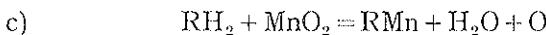
puis transformation du protoxyde de manganèse en bioxyde aux dépens de l'oxygène moléculaire, comme dans le procédé de régénération Weldon



Au cours de cette transformation, la molécule d'oxygène libre O_2 est nécessairement scindée en deux atomes, atomes non saturés et, par conséquent, plus actifs; l'un d'eux se porte sur une molécule de protoxyde de manganèse, pour donner du bioxyde, tandis que l'autre peut se fixer indifféremment sur une nouvelle molécule de protoxyde ou sur un autre corps oxydable, tel que l'hydroquinol, qui, seul, résisterait au contact de l'oxygène moléculaire.

L'expérience montre, en effet, qu'une solution d'hydroquinol contenant en suspension du protoxyde de manganèse donne à la fois, au contact de l'air, du bioxyde de manganèse et la quinone.

Cette réaction doit donc tout d'abord se passer quand on ajoute un sel manganeux à une solution d'hydroquinol. Après celle-ci, il y a en présence de l'acide libre, du bioxyde de manganèse et un excès du corps oxydable. Grâce à ce dernier, dont la chaleur d'oxydation s'ajoute à celle de formation du sel manganeux, il y a réaction entre l'acide et le bioxyde



l'atome d'oxygène se fixe sur une nouvelle quantité d'hydroquinol et le sel primitif de manganèse est régénéré.

On peut constater, à l'appui de cette manière de voir, que le bioxyde de manganèse, stable dans l'eau acidulée, s'y réduit aussitôt en donnant un sel manganeux quand on ajoute de l'hydroquinol. En même temps ce dernier se transforme en quinone,

Il suit de là qu'un poids déterminé de sel manganéux peut oxyder aux dépens de l'air un poids illimité d'hydroquinol, ou de tout autre corps pareillement oxydable.

Les expériences ci-dessus, succinctement rapportées, et les principales considérations qu'elles suggèrent ont été publiées en 1897; elles ont établi l'importance physiologique du manganèse uni à la laccase et inauguré la notion dite aujourd'hui des oligoéléments de la matière vivante.

II. MANGANÈSE

Quels faits nouveaux sont venus confirmer et élargir l'importance biologique du manganèse? Ce métal est-il, comme la connaissance de la laccase le donnait à supposer, un élément répandu chez les végétaux, les animaux et l'espèce humaine?

Découvert par SCHEELE en 1774, dans « les cendres du cumin sauvage et du bois » [6], le manganèse avait été signalé plusieurs fois ça et là, et pas toujours d'une manière constante, chez certaines espèces végétales [7], avec moins de certitude dans le sang et quelques organes d'origine animale ou humaine. De nombreuses recherches ont été effectuées pour élucider ce point. Une méthode analytique très sensible et très précise a d'abord été élaborée [8]. Elle a servi et sert encore à la détermination du manganèse dans le sol, l'eau des fleuves et des mers, les plantes, les animaux et l'homme. Dans aucun cas, il y en a des milliers, on n'a manqué de rencontrer et on a pu doser le métal en cause [9].

Une objection grave s'est présentée au cours de cette enquête, résultant d'un travail alors classique de RAULIN sur la culture en milieu artificiel de l'*Aspergillus niger* [10]. Au début de ses expériences, en 1863, ce chercheur considérait le manganèse comme un élément très utile et presque nécessaire au développement de la moisissure. Mais, dans la suite, lorsqu'il découvrit l'importance, passée d'abord inaperçue, du fer et du zinc, il n'obtint plus avec le manganèse que des résultats inconstants. « Faut-il en conclure, écrit-il dans sa thèse, que les sels de manganèse ont agi par les sels de fer ou de zinc qu'ils pouvaient contenir ou bien que le manganèse remplace le fer (ou même le zinc) physiologiquement, comme

[1] Bertrand - pag. 4

il le remplace souvent dans les réactions chimiques? ». Il ajouta qu'il ne saurait se prononcer à cet égard et supprima le manganèse de la formule primitive de son milieu de culture.

Examinant la raison de cette controverse, je me suis rendu compte que le sulfate ferreux employé par RAULIN contenait du sulfate de manganèse, ce dont on ne pouvait guère s'apercevoir à l'épo-

MILIEUX DE CULTURE																													
<u>utilisés par Gabriel Bertrand pour étudier l'action du Manganèse sur la culture de l'Aspergillus niger.</u>																													
Les cultures ont été faites dans des matras cylindro-coniques à large col, de 750 centm.cub. de capacité, en quartz fondu. Chaque matras contenant:																													
<table> <tbody> <tr> <td>Eau pure(redistillée dans le vide).....</td><td>200 gr</td></tr> <tr> <td>Carbonate de potassium.....</td><td>0,08 gr</td></tr> <tr> <td>Nitrate d'ammonium.....</td><td>0 60</td></tr> <tr> <td>Phosphate d'ammonium.....</td><td>0 08</td></tr> <tr> <td>Sulfate d'ammonium.....</td><td>0 04</td></tr> <tr> <td>Sulfate de magnésium.....</td><td>0 17</td></tr> <tr> <td>Alun ferrico-natronical.....</td><td>0,0172(0,002 de Fe)</td></tr> <tr> <td>Sulfate de zinc cristal.....</td><td>0,0086(0,002 de Zn)</td></tr> <tr> <td>Silicate de potassium.....</td><td>0,008</td></tr> <tr> <td colspan="2"> Et:</td></tr> <tr> <td>Acide succinique.....</td><td>0,05</td></tr> <tr> <td colspan="2"> ou:</td></tr> <tr> <td>Saccharose.....</td><td>0,09</td></tr> <tr> <td>+ acide succinique(pour acidifier).....</td><td>0,10</td></tr> </tbody> </table>		Eau pure(redistillée dans le vide).....	200 gr	Carbonate de potassium.....	0,08 gr	Nitrate d'ammonium.....	0 60	Phosphate d'ammonium.....	0 08	Sulfate d'ammonium.....	0 04	Sulfate de magnésium.....	0 17	Alun ferrico-natronical.....	0,0172(0,002 de Fe)	Sulfate de zinc cristal.....	0,0086(0,002 de Zn)	Silicate de potassium.....	0,008	 Et:		Acide succinique.....	0,05	 ou:		Saccharose.....	0,09	+ acide succinique(pour acidifier).....	0,10
Eau pure(redistillée dans le vide).....	200 gr																												
Carbonate de potassium.....	0,08 gr																												
Nitrate d'ammonium.....	0 60																												
Phosphate d'ammonium.....	0 08																												
Sulfate d'ammonium.....	0 04																												
Sulfate de magnésium.....	0 17																												
Alun ferrico-natronical.....	0,0172(0,002 de Fe)																												
Sulfate de zinc cristal.....	0,0086(0,002 de Zn)																												
Silicate de potassium.....	0,008																												
 Et:																													
Acide succinique.....	0,05																												
 ou:																													
Saccharose.....	0,09																												
+ acide succinique(pour acidifier).....	0,10																												

FIG. 1 --- Composition du milieu de culture sans manganèse de GABR. BERTRAND.

que, et même en proportion plus grande que celle nécessaire au bon développement de l'*Aspergillus* [11].

Poursuivant alors la purification des substances nutritives, minérales et organiques, dans des conditions très rigoureuses, en n'utilisant pour cela que des récipients de porcelaine et, pour finir les opérations et procéder aux cultures, en platine ou en quartz fondu (*), je suis parvenu à obtenir des solutions nutritives (Fig. 1) dans lesquelles il y avait encore germination des conidies et production de petites plantules, à cause de la très minime quantité de manganèse

(*) Les matras tronconiques qui ont servi à ces expériences, d'une capacité de 750 cent. cub., ont été fabriqués aimablement pour moi par HAEREUS en 1910.

que contiennent normalement les conidies (Fig. 2 - Matras de gauche), mais plus ensuite de développement, tandis qu'il suffisait d'ajouter à la solution un milliardième et même un décimilliardième de manganèse, sous forme de sulfate, pour obtenir déjà un début de développement appréciable à la balance et même perceptible à simple vue. L'introduction d'une partie de manganèse pour 100 millions de liquide nutritif donnait lieu, par contre, à la formation

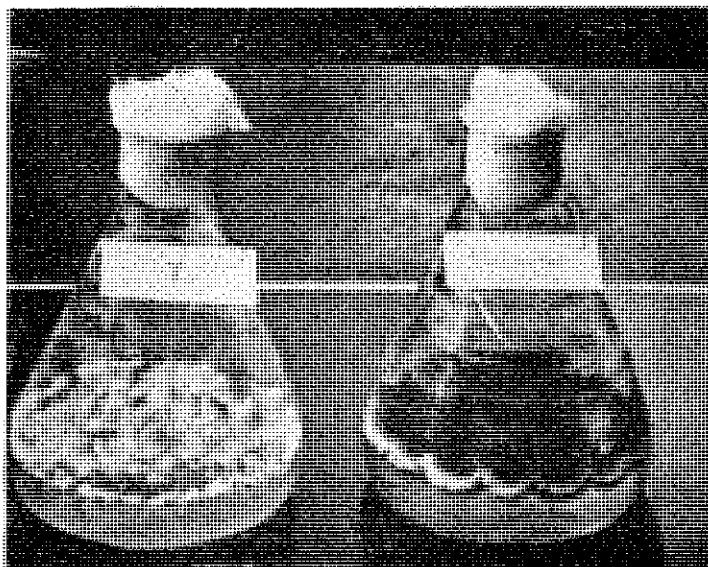


FIG. 2 — 1/100.000.000. Culture d'*A. niger* dans le milieu sans Mn (matras de gauche T) et avec 1/100.000.000 de n/n (matras de droite).

d'un abondant mycélium, replié en tous sens et complètement recouvert de conidies de coloration brun noir [12] (Fig. 2 - Matras de droite).

La netteté de ces résultats de contrôle est probante: on est sûr désormais que l'*Aspergillus* a besoin de manganèse pour s'accroître d'une manière normale, c'est-à-dire jusqu'au terme définitif de la production des conidies.

Bien plus, on peut évaluer la proportion de métal qui suffit à la moisissure pour atteindre son complet développement.

Dans les matras de quartz renfermant la solution nutritive au 1/100.000.000 de l'oligoélément, il y avait 200 cent.cub. de cette solution, par conséquent 1/500 de milligramme de manganèse. En admettant qu'à ce degré de très grande dilution, cette quantité soit absorbée tout entière par l'*Aspergillus*, dont le poids moyen de 4 récoltes était de 2 gr. 25, cela correspond à une proportion de man-

SENSIBILITÉ DE L'ASPERGILLUS NIGER VIS-A-VIS DU MANGANESE.					
Numéros des expériences.	Durée en jours	Poids sec, en grammes, des récoltes obtenues:	Sans addition de Mn	Après addition de 1/500 de milligramme de Mn	Un diximillardième de Mn
1	9 ¹	1,55 1,70	2,05		
2	9	0,865	1,715	1,260	
3	10	0,66 0,58	1,09	1,38	1,11
4	10	0,51 moy. de 3 cultures	1,49		
5	10	1,16		1,29	1,27
6	10	1,14		1,73	
7	12	1,23			
8	10	0,64	1,69		0,685
9	9	0,657 moy. de 3 cultures	2,35 2,20	1,18	0,603 moy. de 3 cultures

FIG. 3 — Résultats des neuf expériences de cultures en solutions sans manganèse ou additionnées de manganèse.

ganèse de l'ordre de grandeur de 0 mg. 9 seulement par kilogramme du champignon sec.

On ne peut manquer de rapporter ici qu'au cours de ces dernières expériences il a été fait une observation précieuse: le manganèse peut intervenir dans le développement total de la plante de deux manières différentes, suivant sa concentration (Fig. 3).

En cultivant, en effet, la moisissure en présence de doses croissantes de manganèse, on arrive à une concentration critique qui convient à un bon développement du mycélium, mais ne permet pas

sa fructification. Si, après une période d'attente, pouvant dépasser une à plusieurs fois celle de la formation du tissu mycélien, on ajoute une quantité supplémentaire de manganèse, on provoque la formation des organes reproducteurs. Ainsi, dans une expérience, ayant ajouté un milligramme de manganèse le soir avant de quitter le laboratoire, le mycélium était déjà, le lendemain matin, complètement noirci par les conidies [13].

Cette expérience permet de comprendre comment, dans la nature, lorsqu'on laisse un sol s'appauvrir peu à peu en manganèse ou quelque autre oligoélément, on peut observer l'infécondité de la végétation parmi les premiers signes de la déficience minérale.

J'ai observé que la Germandrée (*Teucrium Scorodonia* L.), abondamment répandue dans les bois et forêts de la région parisienne, s'y trouve en fleurs mais sans graines; il n'y a plus que des flots où la plante parvient encore à fructifier. Ainsi, au bois de Meudon où le phénomène de dépérissement est très avancé, il y a, au voisinage de l'ancien laboratoire de Berthelot, une bande de terrain parcourue par un fossé dans lequel coule parfois l'eau. Cette cause d'humidité, favorable à la végétation, permet à la German-drée de se développer normalement et toutes les fleurs produisent des graines.

J'ai observé des faits semblables avec l'Ortie blanche (*Lamium album* L.), le Marrube (*Marrubium vulgare* L.), etc.

III. ARSENIC

Un des premiers éléments que les circonstances m'amènèrent à étudier, comme pouvant présenter quelque lien avec le manganèse au point de vue biologique, a été l'arsenic.

Sous la forme d'acide arsénieux, ce métalloïde a été la cause, depuis l'antiquité, d'innombrables empoisonnements, soit accidentels, soit criminels.

Jusqu'à la fin du XIXème siècle on admettait d'une manière absolue l'absence de l'arsenic dans le corps de l'homme. Les quelques cas où des traces de cet élément avaient été signalées s'expliquaient

[1] Bertrand - pag. 8

sinon par l'impureté des réactifs employés dans les recherches, du moins par quelque circonstance accidentelle, comme l'ingestion de médicaments, d'aliments ou de poussières contenant l'arsenic.

ARMAND GAUTIER annonça en 1899 et 1900 qu'il avait rencontré dans certaines parties de l'homme et des animaux, principalement dans les glandes thyroïdes, de petites quantités d'arsenic. Cette déclaration susceptible, si elle était confirmée, de retourner totalement l'opinion des experts légistes et d'introduire l'étude de l'arsenic dans le domaine de la physiologie, ne fut pas acceptée sans réserve. Elle fut même considérée comme inexacte par plusieurs d'entre eux [14].

Vivement intéressé par le rôle possible de l'arsenic dans l'organisme vivant, j'ai été conduit à examiner de très près les expériences d'ARMAND GAUTIER.

La purification des réactifs, notamment des acides sulfurique et nitrique, qui sont utilisés depuis la destruction des matières organiques jusqu'à la libération finale de l'arsenic, a été poussée à un haut degré. Il en a été de même de l'amélioration de l'appareil dit « appareil de Marsh », déjà très avantageusement modifié par la Commission de l'Académie des Sciences en 1841.

Ainsi pourvu, il devenait possible d'obtenir des anneaux visibles avec des poids d'arsenic aussi minimes qu'un millième et même un demi millième de milligramme [15].

Je n'ai pas pu confirmer les résultats quantitatifs de A. GAUTIER, mais j'ai reconnu, et dans quelques cas évalué, de très petites proportions présentes dans divers organes d'origine animale.

Ce résultat était intéressant pour un toxicologue, mais il ne répondait pas encore à la question qui me préoccupait: savoir, avant tout, si l'arsenic est un élément normal et donc constant de la matière vivante. Il m'apparaissait, en effet, que les résultats des expériences entreprises jusqu'à ce jour sur l'homme et sur les animaux domestiques étaient entachées d'erreurs, par suite du développement de l'industrie, cause non négligeable de contamination arsenicale.

Non seulement les énormes quantités de houille qui sont consommées par les usines, les chemins de fer, etc., déversent dans l'atmosphère de certaines régions des proportions notables d'acide

arsénieux, mais tous les produits qui, de près ou de loin, ont eu contact avec l'acide sulfurique, dérivé lui-même des pyrites, contiennent une certaine quantité du métalloïde. C'est ainsi que les superphosphates, le sulfate d'ammoniaque, employé par tonnes comme engrais, ont introduit l'arsenic dans presque tous les sols cultivés. De là, le métalloïde a dû passer dans les plantes qui servent de nourriture aux animaux et à l'homme. L'acide arsénieux servait déjà vers 1840 à chauler le blé. Les drêches qui résultent de la saccharification de diverses céréales en présence d'acide sulfurique sont utilisées pour la nourriture des bestiaux. Le malt desséché dans les gaz de combustion de la houille a quelquefois introduit assez d'arsenic dans la bière pour qu'on explique ainsi certains accidents. Le glucose, obtenu par l'action de l'acide sulfurique sur l'amidon, rend compte de la présence de l'arsenic dans un grand nombre de produits alimentaires: bières, confitures, liqueurs, etc. Sans parler d'une foule d'autres substances: matières colorantes, produits chimiques ou de toilette, médicaments, etc. qui renferment aussi de l'arsenic.

Il n'est pas étonnant, dans ces conditions, de rencontrer des traces minimes d'arsenic dans le corps de l'homme et des animaux qui habitent les régions soumises au régime industriel. Une telle constatation ne prouve pas qu'il y ait toujours eu de l'arsenic dans l'organisme, que la présence de ce métalloïde chez l'homme et les animaux soit véritablement normale, par conséquent indépendante des temps et des lieux.

Pour trancher la question, soit dans un sens soit dans l'autre, il faut recourir à des organismes éloignés de toutes les causes de contamination arsenicale énumérées plus haut, il faut s'adresser à des êtres vivant, s'il est possible, dans un milieu de composition constante, que n'aient pu influencer ni l'apparition, ni le développement des industries humaines.

Il m'a été possible d'opérer dans ces conditions précises grâce au généreux accueil de S. A. S. le Prince de Monaco, lors d'une croisière scientifique (18 juillet-17 septembre 1902) à bord du yacht « Princesse Alice ».

J'ai pu rassembler alors avec les soins nécessaires et soumettre ensuite à l'analyse chimique les organes d'une assez longue série d'animaux marins, capturés loin des côtes, quelquefois à une grande profondeur dans l'Atlantique. J'ai examiné aussi les plumes d'un oiseau de haute mer, le Pétrel, et les cornes d'un mouton, élevé à l'état libre sur les pentes du mont Pico, aux îles Açores.

Chaque fois (20 échantillons provenant de 16 espèces), j'ai isolé une quantité appréciable d'arsenic.

Mis à part le dernier cas, cet arsenic a évidemment été puisé dans les eaux de l'Océan, c'est-à-dire dans un milieu dont la composition chimique ne doit subir, à cause de sa masse formidable, que des modifications insensibles à travers les siècles.

L'existence du métalloïde, établie sans exception dans les organes et chez tous les animaux examinés, depuis les spongiaires jusqu'aux vertébrés supérieurs, apparaît dès lors comme tout à fait générale, indépendant à la fois des temps et des lieux, des espèces et des tissus [16].

Je ne me suis cependant pas tenu pour complètement satisfait par ces résultats.

Malgré les précautions prises pour détruire la partie organique des échantillons d'origine vivante sans risquer soit d'introduire, soit de perdre de l'arsenic, j'ai cru nécessaire de trouver une méthode plus simple et plus sûre que celle dont je m'étais servi. J'y ai réussi en brûlant, d'une manière intégrale, la substance organique sèche dans un vase clos, tout en platine, en présence d'oxygène.

BERTHELOT avait déjà préparé et mis en pratique l'emploi de sa bombe calorimétrique pour le dosage de divers corps simples dans les composés organiques.

J'ai essayé si des organes secs, d'origine animale ou végétale, subissaient, malgré leur structure et leur richesse en sels alcalins, une combustion aussi complète que les composés organiques définis et si, après cette combustion, on pourrait retrouver les traces d'arsenic qui y étaient contenues. Avec certaines précautions, le succès a été complet.

L'allumage de la substance ne peut être fait à l'aide du fil de fer, à cause de l'arsenic qui est toujours présent dans ce métal. Il

faut employer un fil de platine, fil dans la boucle duquel on place, suivant un artifice déjà indiqué par BERTHELOT, une petite mèche de fulmicoton. Mais ici, une précaution s'impose: celle d'employer du fulmicoton préparé avec des acides absolument purs. Le fulmicoton ordinaire renferme des traces appréciables d'arsenic.

La capsule de platine, dans laquelle on place la substance, divisée en petits morceaux et desséchée, doit être assez grande et tout-à-fait plate: son diamètre atteint 40 millimètres et sa profondeur seulement 5 millimètres.

La pression de l'oxygène, préparé par électrolyse de l'eau en présence de soude, n'a pas besoin d'être aussi grande que dans les déterminations calorimétriques. Peu importe, en effet, qu'il reste un peu d'oxyde de carbone dans la bombe; il suffit que la matière organique disparaîsse entièrement à l'état gazeux.

Après la combustion et le refroidissement, on attend encore quelques minutes, afin que les dernières particules en suspension dans l'atmosphère de la bombe, soient tout-à-fait déposées. S'il est nécessaire, on accumule dans la bombe le produit de plusieurs combustions.

Celles-ci terminées, on trasvase le contenu de la bombe dans une capsule de quartz ou de porcelaine et l'on évapore avec précaution pour chasser l'acide nitrique dû à la combustion partielle de l'azote. Le résidu est repris par quelques gouttes d'acide sulfurique et un peu d'eau et on introduit directement la solution dans l'appareil à hydrogénéation.

Avec du camphre ou du sucre purs, on n'obtient pas la plus petite trace d'enduit arsenical; au contraire, quelques grammes d'écaille de tortue de mer, d'éponge, de blanc ou de jaune d'oeuf, suffisent à donner des anneaux d'arsenic très nets.

Ces résultats d'une méthode très simple et très précise contrôlent ceux antérieurement obtenus et lèvent tous les doutes concernant l'existence normale de l'arsenic dans les organismes [17].

* * *

Tandis que se poursuivaient les recherches analytiques sur le manganèse et sur l'arsenic qui viennent d'être rappelées, des essais

[1] Bertrand - pag. 12

étaient entrepris pour vérifier si l'addition de sels solubles de manganèse à des sols était capable, comme on était en droit de l'espérer, d'améliorer les récoltes de plantes utiles que l'on y cultive d'ordinaire.

Ces essais rencontrèrent au début de nombreuses difficultés et ce n'est qu'après assez longtemps qu'il fut possible de connaître les conditions de leur succès. Des données pratiques intéressantes furent obtenues peu à peu au cours de ces années sur la variété des états sous lesquels certains éléments peuvent exister dans la terre arable, sur les moyens de les reconnaître et de les doser, sur la nature et sur les proportions, en particulier, des engrains à base de manganèse qu'il convient d'utiliser, selon les sols et les espèces végétales, etc. Mais, surtout, il fut reconnu avec une entière certitude la présence de deux éléments: le manganèse et l'arsenic dans un nombre d'espèces végétales et animales si variées et si étendues qu'elle peut passer pour aussi générale que celle du carbone et de l'azote. Avec cette différence, toutefois, que ces nouveaux éléments n'existent dans la matière vivante qu'en proportions extrêmement petites.

La preuve a également été établie, du moins pour l'un d'eux, le manganèse, que malgré la petitesse de sa proportion, il joue un rôle essentiel, celui d'agent de fixation de l'oxygène ordinaire, libre ou dissous, sur certaines substances de l'organisme. Un grand nombre de phénomènes naturels ont déjà pu être expliqués par cette action catalytique. C'est ainsi que la laccase de l'arbre à laque est devenue le premier type des réactifs naturels appelés depuis *oxydases* (coloration des jus des fruits, bleuisissement de certains champignons, etc. mis au contact de l'air, vieillissement du vin, coloration du pain bis, etc.) [18].

Le rôle physiologique de l'arsenic n'est pas encore connu et l'on ne peut même affirmer que ce métalloïde en possède un, mais on a l'assurance qu'il est toujours présent dans l'organisme et cela a déjà une grande importance en médecine légale, car on sait maintenant le doser et l'on ne peut plus prétendre à une introduction accidentelle ou criminelle du poison tant que l'on n'a pas démontré qu'il s'en trouve dans les organes incriminés une proportion supé-

rieure à celle que l'on peut considérer comme normale. Des erreurs judiciaires dues à la méconnaissance de faits acquis sur l'existence d'une certaine proportion d'arsenic au titre d'oligoélément ne doivent plus pouvoir se produire aujourd'hui.

IV. ZINC ET BORE

Après une communication au « V^e Congrès international de Chimie appliquée » tenu à Berlin en 1903, sur l'intérêt que paraissait mériter en Agriculture l'utilisation du manganèse et très probablement aussi de quelques autres éléments découverts en petites quantités dans les plantes, tous éléments englobés sous l'appellation d'« engrains complémentaires » (*), je pris la décision d'approfondir avec quelques-uns des meilleurs travailleurs de mon laboratoire la question devenue riche de promesses de la composition élémentaire de la matière vivante. C'est ainsi que furent abordées avec JAVILLIER l'étude du zinc et avec AGULHON celle du bore.

ZINC. — Des botanistes ont signalé l'existence de plantes particulières dans certaines régions riches en minéraux de zinc. C'est ainsi qu'à la frontière germano-belge, entre Aix-la-Chapelle et Liège, où la Société de la Vieille-Montagne exploitait un gisement de calamine ou carbonate de zinc, se rencontrait, encore assez abondante, une sorte de Pensée sauvage, appelée *Viola lutca* ou *Viola calaminaria*. Cette espèce et quelques autres ont passé pour caractéristiques de la présence de minéraux zinciques.

Pour la première fois, en 1854, BRAUN a publié dans les « Annales de Poggendorf » une analyse qualitative confirmant l'existence du zinc dans les cendres de ces plantes. Ce travail chimique a été suivi d'une série d'autres et l'on est assuré que les plantes surnommées calaminaires sont effectivement riches en zinc.

Outre ces observations, RAULIN ayant cherché, par la culture d'une moisissure *l'Aspergillus niger*, dans une solution aqueuse de sucre, d'acide tartrique et de sels minéraux aussi purs que possible,

(*) Communication qui reçut l'accueil assez inattendu auquel j'ai fait allusion à Rome en 1952 au IX^e Congrès international des Industries agricoles en traitant des « Oligoéléments dans la nutrition des plantes ».

quels étaient les métalloïdes et les métaux nécessaires au développement de la moisissure, avait découvert qu'il fallait ajouter à la liste de ceux alors connus une petite quantité de zinc (0 gr. 01 par litre de solution) pour obtenir la récolte la plus élevée [19].

RAULIN opérait ses cultures dans des cuvettes à photographie et n'avait pas cherché si le zinc pénétrait dans l'organisme de la moisissure, s'il était un des éléments de composition de ce végétal.

Le zinc n'existe-t-il vraiment que chez les plantes calaminaires qui se seraient montrées alors comme des espèces exceptionnelles, capables d'absorber le métal sans périr, ou bien le zinc était-il, comme le fer et le manganèse, un élément indispensable de la vie et présent en très petites proportions dans tous les organismes?

Ces questions et d'autres encore méritaient d'être examinées.

Comme, a priori, il ne pouvait s'agir que de faibles quantités de zinc à évaluer, il était nécessaire de posséder une méthode de dosage sensible et sûre pour y répondre. Une méthode pondérale répondant à ce besoin fut d'abord mise au point. Elle permettait de découvrir et de doser le zinc présent dans 5 gr. de cendres, à partir d'un milligramme [20].

Des échantillons d'espèces calaminaires et non calaminaires provenant d'une cinquantaine d'espèces et appartenant à 30 familles botaniques furent ensuite récoltés en des régions différentes et analysés selon la nouvelle méthode. En opérant sur 5 gr. de cendres, le zinc put être dosé, sauf dans 3 cas. Les chiffres de métal trouvé varient de 0 gr. 085 à 0 gr. 745 chez les échantillons des plantes calaminaires et de 0 gr. 0002 à 0 gr. 024 chez les autres [21].

Ces résultats étaient favorables à l'idée de compter le Zinc parmi les oligoéléments de la matière végétale.

En procédant alors à des expériences de culture à l'aide de solutions nutritives ne contenant que des substances purifiées avec soin, JAVILLIER réussit à montrer que le zinc est un aliment nécessaire à l'*Aspergillus niger*. La privation aussi complète que possible de ce métal a entraîné tout un ensemble de modifications morphologiques et physiologiques de la plante et n'a permis d'obtenir que des récoltes réduites.

Au lieu de 100 parties en poids de champignon recueilli sur un milieu nutritif contenant du zinc, il n'en a plus, en moyenne, obtenu que 37 gr. lorsque ce milieu était privé de zinc. Cette différence est très significative, mais JAVILLIER n'a pu aller plus loin, car les matras de verre dans lesquels il opérait cédaient toujours un peu de zinc à la solution nutritive et ce peu de zinc passait dans la plante (*).

BORE. — L'étude du bore comme oligoélément se présentait sous un jour très particulier et tout à fait digne d'attirer l'attention.

La présence de ce métalloïde avait été découverte déjà en 1857 par WITTSTEIN et APOIGER dans les grains de Saoria (*Maesa picta*), primulacée d'Abyssinie [22]. On l'avait retrouvé dans des végétaux de terrains boracifères et dans un grand nombre de vins de Californie. On le crut d'origine frauduleuse, mais plusieurs expérimentateurs parvinrent à le retrouver dans des vins naturels, en Italie, en Allemagne, et dans plusieurs végétaux.

La question de la présence de l'acide borique dans les vins paraissait bien réglée lorsque VILLIERS et FAYOLLE annoncèrent en 1895 qu'ayant perfectionné la méthode de recherche par la flamme de l'alcool en présence d'acide sulfurique — ce qui donne une coloration verte — ils ne trouvaient pas de bore dans les vins.

La controverse se ralluma: JAY et DUPASQUIER rencontrant et dosant l'acide borique dans des vins, des fruits, des légumes, VILLIERS déclarant les chiffres de JAY impossibles et affirmant à nouveau l'inexistence du bore dans les vins naturels non sophistiqués.

Ce qui n'empêcha pas v. LIPPmann d'en déceler en 1902 dans les citrons, les oranges, le houblon et AZZARELLO d'en signaler en 1906 dans les vins de Sicile.

Pensant que ces discordances devaient provenir de l'insuffisance des méthodes d'analyse utilisées par les différents auteurs et pressentant de plus qu'il pouvait s'agir de l'existence d'un nouvel oligoélément, je proposai à AGULHON d'examiner avec moi ce qu'il en était.

(*) Cette difficulté rappelait celle que j'avais rencontrée en étudiant le manganèse et que j'ai pu résoudre seulement en 1910 à l'aide du matériel en quartz fondu de HERCUS.

Les techniques de la séparation préalable du métalloïde à l'état de borate de méthyle (fig. 4), de l'essai à la flamme après transformation en fluorure de bore, avec emploi du spectroscope (fig. 5), de la réaction au papier de curcuma (fig. 6) furent étudiées successivement et grandement perfectionnées. Avec ces techniques un mil-

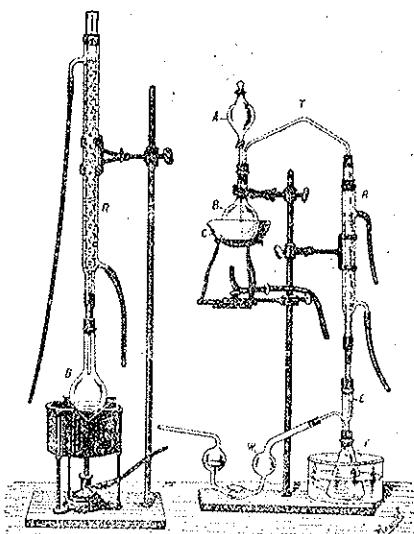


FIG. 4 — Dosage du bore. Appareils pour la séparation du bore à l'état de borate de méthyle.

lième de milligr. de bore à l'état d'acide borique peut largement suffire pour donner à la fois la réaction complète du curcuma et la coloration verte de la flamme accompagnée de l'examen spectroscopique [23].

Avec ces méthodes le bore fut recherché et dosé dans une série d'échantillons d'origine végétale; il fut trouvé sans exception: de quelques milligr. à quelques centaines par kilog. de matières sèches.

Mais ce qui est particulièrement intéressant et qui a fortement retenu notre attention est que JAY et DUPASQUIER, qui ont eu raison en reconnaissant le bore chez les plantes, avaient déclaré l'avoir

recherché sans succès dans un os et dans la chair musculaire du boeuf, l'avoir aussi cherché sans le trouver dans le lait de vache, le sang du boeuf et du mouton. Ils en avaient trouvé seulement dans l'urine chez l'homme, les ruminants et le cheval, donnant ainsi à penser qu'il n'était pas retenu, mais expulsé, par l'organisme animal.

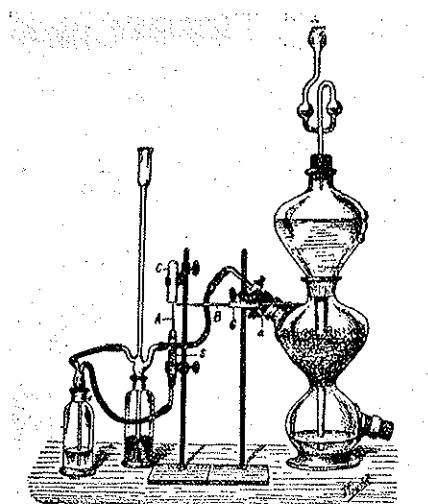


FIG. 5 — Recherche du bore par la coloration
de la flamme d'hydrogène

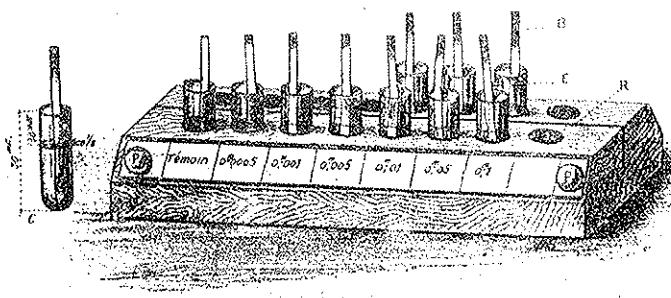


FIG. 6 — Recherche et dosage de très petites quantités de bore
par le papier de curcuma.

Avec AGULHON, grâce à la précision et à la sensibilité des techniques mises au point avant d'aborder le problème [24], le bore a été cherché et aussi trouvé dans le principaux organes du cheval, du boeuf, du mouton, du lapin et du cobaye, de plus d'une trentaine d'organes ou d'animaux entiers allant des Mammifères aux Echinodermes, enfin dans une série de laits, humains et animaux, et dans plusieurs oeufs d'oiseaux.

Le bore a été trouvé dans tous les cas, mais — d'une manière très générale — en proportions beaucoup plus petites, de 100 à 200 fois moins, que chez les végétaux.

Ainsi le bore apparaît-il comme un oligoélément de la matière vivante, mais avec ce caractère nouveau d'être en proportions plus petites chez les espèces animales que chez les espèces végétales.

Une application importante de ces recherches à l'Agriculture a été le traitement de la « maladie du cœur de la betterave » par l'addition de quelques kgs. de bore sous forme d'acide brique à l'hectare (fig. 7) [25].

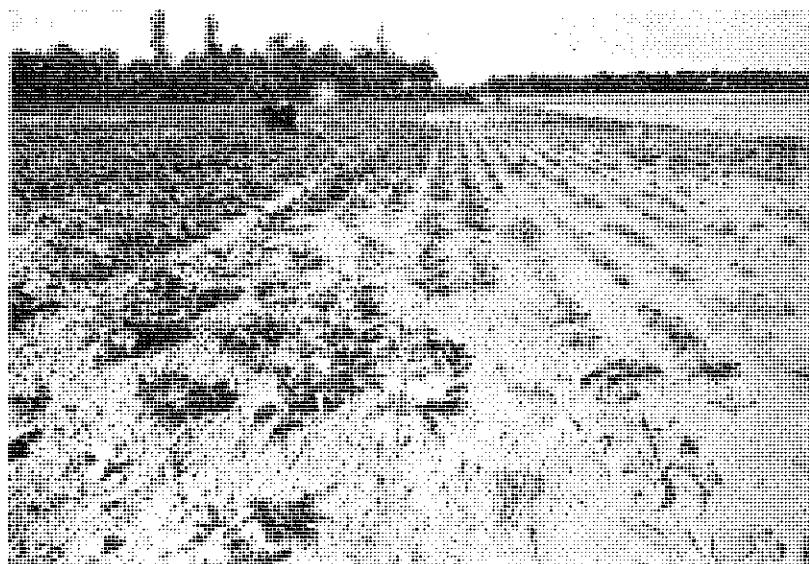


FIG. 7 — Champ de betteraves atteint par la déficience de bore (en face et à droite). La partie à gauche et en haut a été protégée par un traitement préalable borique.

V. ACTIVITE DES OLIGOÉLÉMENTS CHEZ LES ANIMAUX ET CHEZ LES VÉGÉTAUX

Il a été possible, à l'aide de méthodes analytiques appropriées, de déceler la présence d'un nombre de plus en plus grand de métaux et de métalloïdes présents en petites quantités chez les plantes, il en a été de même en appliquant ces méthodes aux animaux et ceci a suffi, compte tenu des circonstances de la récolte des échantillons soumis aux analyses, pour savoir si les éléments envisagés pouvaient être comptés parmi ceux dont la présence est normale ou, au contraire, accidentelle, autrement dit si ces éléments pouvaient être rangés ou non, au sens strict de l'appellation, parmi les oligoéléments.

Mais ce qui est intéressant au point de vue biologique n'est pas la présence passive mais surtout, comme on le découvre de plus en plus, la présence active des oligoéléments.

Celle-ci ne peut être établie que par des méthodes biologiques, telles que celles dites de culture ou d'élevage, selon qu'il s'agit de végétaux ou d'animaux, à l'aide de milieux nutritifs artificiels préparés avec des substances définies et de la plus grande pureté.

Ces méthodes, déjà très exigeantes de soins lorsqu'il s'agit des végétaux — voir ce qui a été rapporté dans le cas de *l'Aspergillus niger* — le sont bien davantage lorsqu'on a affaire à des animaux. Ces derniers n'exigent pas seulement, en effet, les mêmes éléments minéraux que les plantes, mais, en outre, une quantité de substances organiques diverses, dont la nature n'était même pas encore parfaitement connue.

Après bien de recherches préliminaires, j'ai réussi avec BENZON en 1922 [26] à établir le rôle du zinc par des expériences directes d'alimentation.

Les expériences ont consisté à comparer deux lots de souris d'une même portée, nourries comparativement avec des aliments débarrassés de zinc et avec les mêmes aliments additionnés d'une quantité connue et très petite de ce métal. Si l'on se rappelle qu'une

[1] Bertrand - pag. 20

souris adulte ne renferme pas plus de quelques dixièmes de milligramme de zinc, dont un dixième est déjà apporté à la naissance, on comprend que la première difficulté à résoudre a été de préparer des aliments assez purs pour ne pas fournir de zinc au lot carencé pendant la durée d'une expérience.

Une telle purification a entraîné comme conséquence la sous-traction de ces facteurs alimentaires, de nature inconnue, que l'on désigne de différentes manières et, notamment, sous le nom de vitamines. Or il n'était pas possible d'ajouter certains de ces facteurs aux aliments purifiés, par exemple le facteur B sous la forme d'extrait de levure, sans introduire en même temps un peu de zinc. On a donc dû se résoudre à soumettre les animaux à un régime particulièrement carencé, avec tous les risques de terminaison fatale qu'il comporte. Malgré cette nouvelle difficulté, le but poursuivi a pu être largement atteint.

Les souris mises en expériences ont été séparées de leur mère au moment du sevrage, c'est-à-dire à l'âge d'environ trois semaines. On les a placées isolément, non point dans des cages, mais dans des bocaux munis d'un couvercle de verre, ce couvercle étant perforé pour les besoins de la respiration. Chaque bocal était garni d'un fond de papier et d'un lit de coton, l'un et l'autre exempts de zinc. En outre, une sorte de pipette, passant à travers le couvercle, fournit de l'eau pure à la souris pour étancher sa soif (fig. 8 et 9). Comme aliment, les animaux ont reçu, par portions renouvelées et à discrédition de petits pains préparés avec un mélange de matières organiques et minérales purifiées avec le plus grand soin et dont la composition est donnée sur la fig. 10.

A ce mélange on avait ajouté, pour l'un des lots, 0 g. 010 de sulfate de zinc cristallisé, ce qui correspondait à 2 mg. de zinc pour 100 g. de petits pains terminés, à 10 pour 100 d'eau.

Voici, à titre d'exemple, les résultats de deux séries d'expériences :

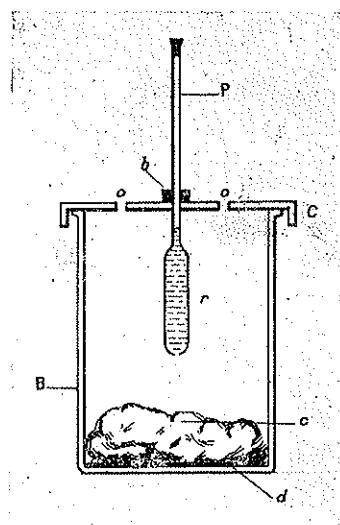


FIG. 8

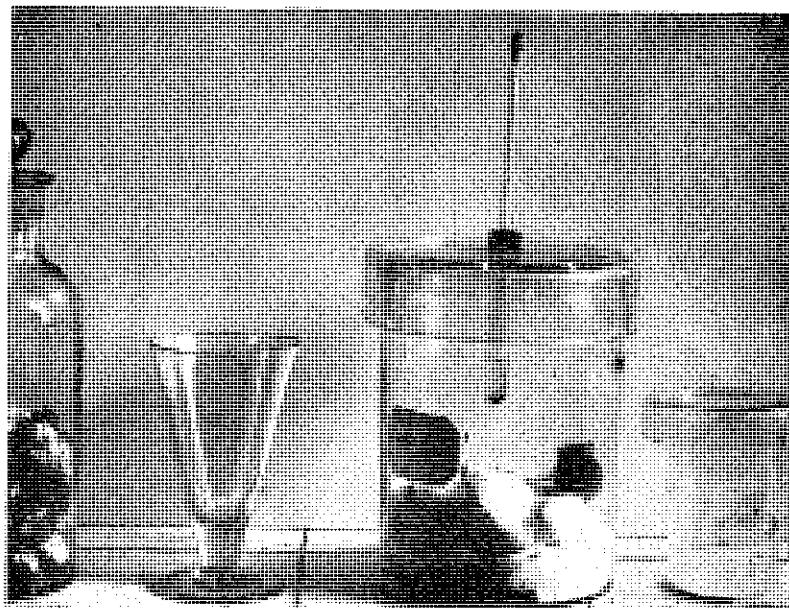


FIG. 9

[1] Bertrand - pag. 22

Ainsi, dans chaque série, les animaux qui ont trouvé du zinc dans leur alimentation ont vécu plus longtemps que ceux qui n'en ont pas trouvé. L'importance du métal a été telle qu'un dixième et demi à trois dixièmes de milligramme, ingérés pendant la durée

COMPOSITION DE L'ALIMENT SYNTHÉTIQUE DU GABRIEL BERTRAND ET B. BENZON	
<hr/>	
Poudre de poire de terre	75 g.
Caséine	33 g.
Cellulose	6 g.
Lactose cristallisé	2 g.00
Beurre de coco	2 g.00
Lactate de calcium (+ 6 H ₂ O)	2 g.00
Phosphate monopotassique	0 g.30
Phosphate bisodique orni.	0 g.70
Chlorure de calcium anhydre	0 g.10
Sulfate de magnésium orni.	0 g.25
Alun ferrico-ammoniaque	0 g.000
Alun alumino-potassique	0 g.000
Fluorure de sodium	0 g.000
Sulfate de cuivre crist.	0 g.002
Culfate de manganese	0 g.002
Iodure de potassium	0 g.0008
Bromure de potassium	0 g.0008
<hr/>	

FIG. 10

tetale de l'expérience, ont suffi à prolonger cette durée de 25 à 50 pour 100. Il semble bien que si d'autres facteurs de croissance n'avaient pas fait défaut, ces résultats auraient encore été dépassés

* * *

D'autres expériences du même genre ont été effectuées au sujet du Fer [27] (fig. 13 et 14), du Manganèse [28] (fig. 15 et 16) et même de l'association Nickel et Cobalt [29] (fig. 17 et 18).

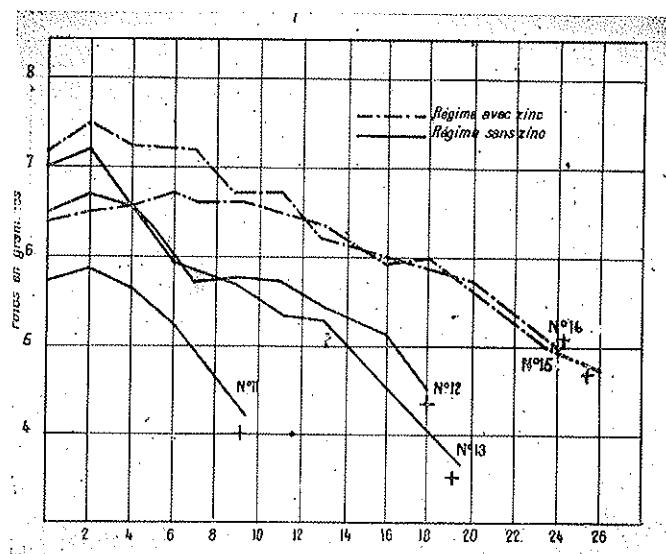


FIG. 11

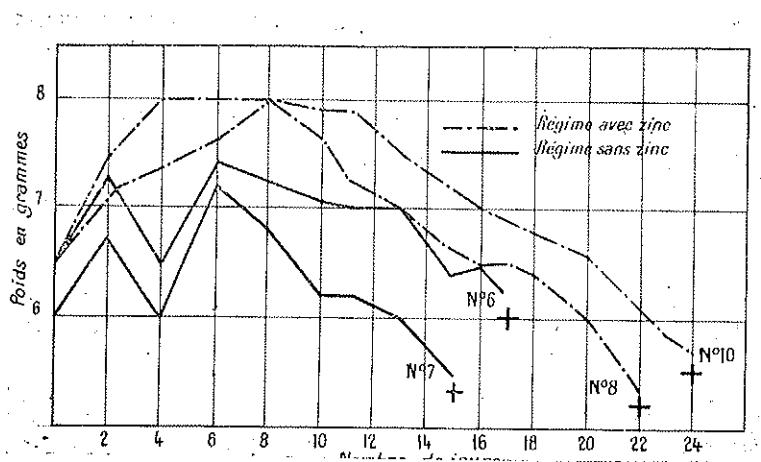


FIG. 12

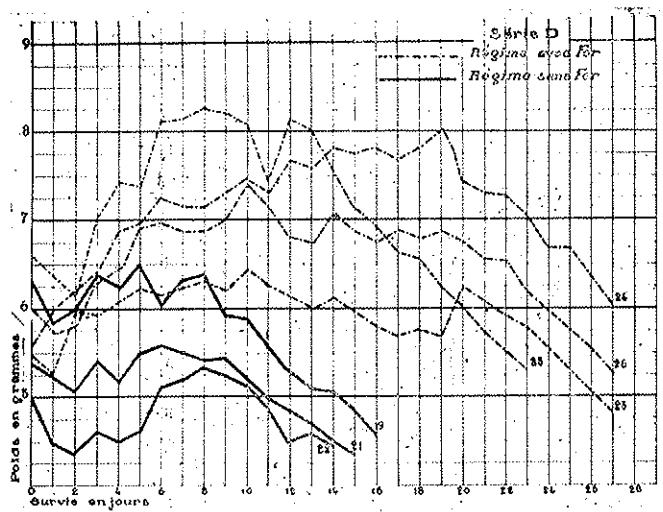


FIG. 13

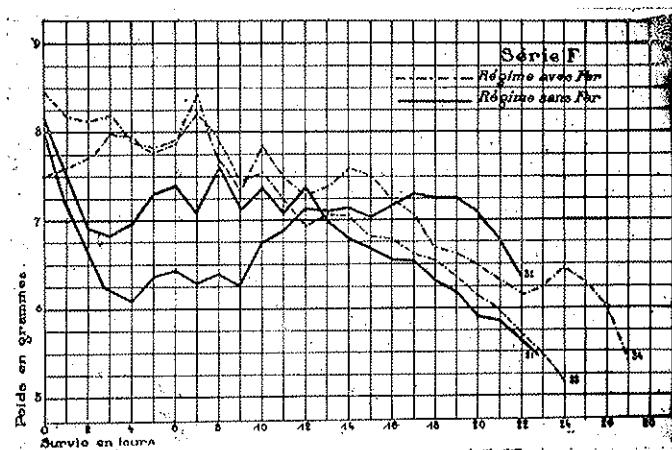


FIG. 14

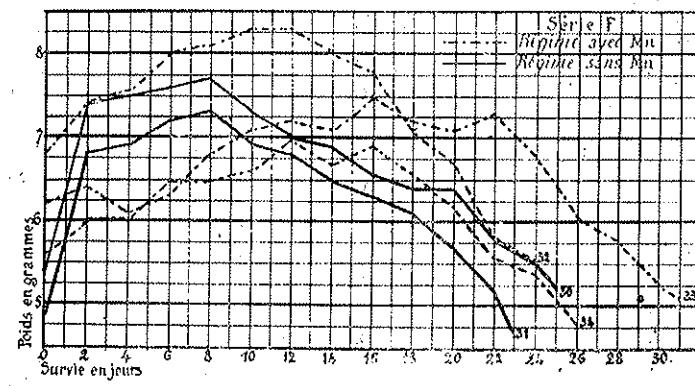


FIG. 15

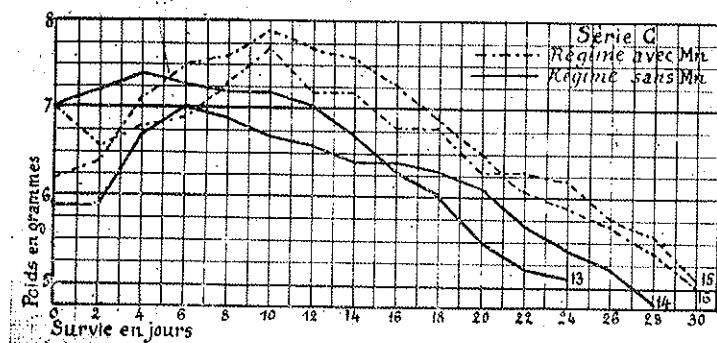


FIG. 16

[1] Bertrand - pag. 26

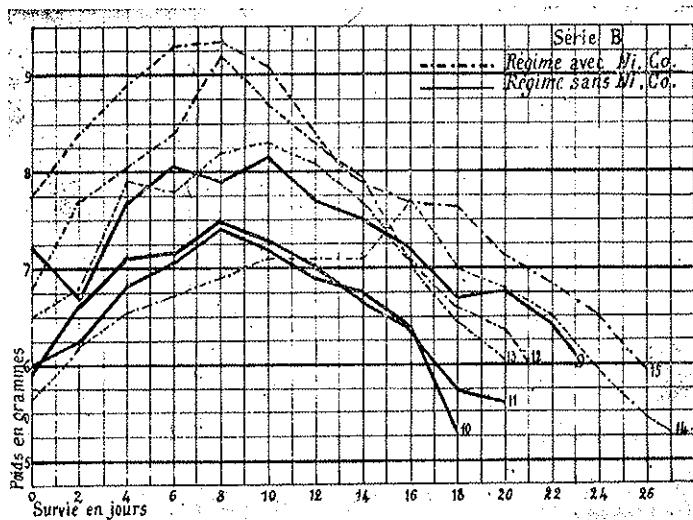


FIG. 17

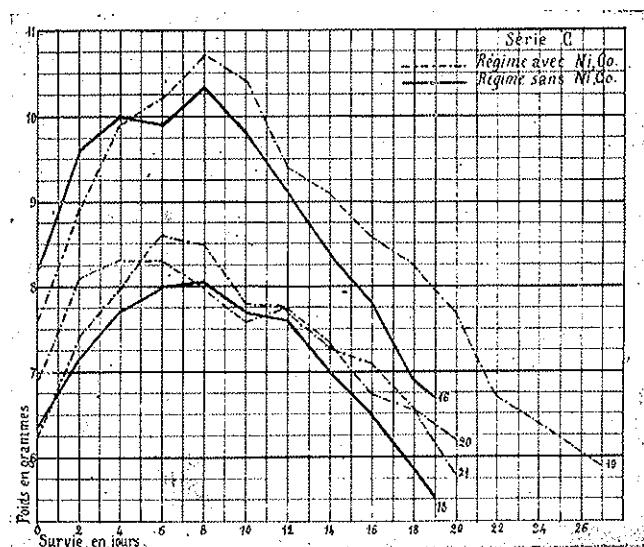


FIG. 18

VI. ACTION SYNERGIQUE DU ZINC ET DES VITAMINES

Quelques années plus tard, tenant compte des découvertes du Nickel et du Cobalt dans la matière vivante végétale [30] et animale [31] et de l'intervention de ces deux métaux dans l'alimentation [32], les expériences de 1922 ont été reprises avec l'espérance d'arriver, si possible, à des preuves plus marquées de l'importance du Zinc dans la nutrition des animaux avec ou sans vitamines [33] (fig. 19 à 23).

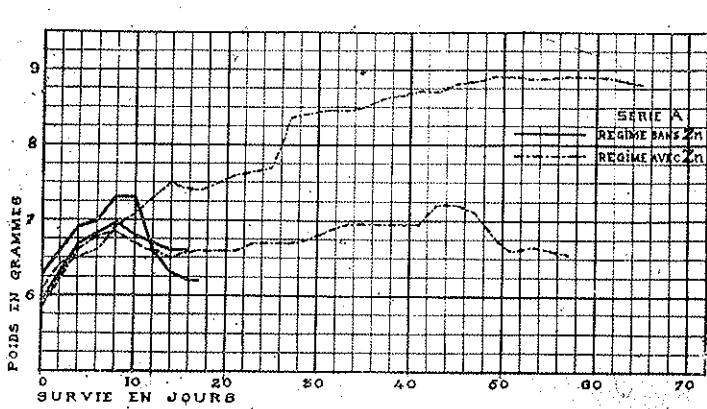


FIG. 19

La purification des substances organiques et minérales a été poussée plus encore que dans les expériences de 1922, dans lesquelles la teneur en Zinc de 100 gr. du mélange alimentaire purifié s'élevait déjà à moins de 0 gr. 00005 de Zn, quantité correspondant à la limite de la sensibilité de la méthode d'analyse utilisée. Ces substances alimentaires ont été additionnées avant leur mise en petits pains d'une petite quantité de Nickel et de Cobalt: 0 gr. 00025 de chlorure de Ni et 0 gr. 0001 de chlorure de Co pour 100 gr.

Bien entendu, il a été préparé séparément un mélange alimentaire sans zinc pour les souris témoins et un mélange alimentaire

[1] Bertrand - pag. 28

additionné de zinc: 0 g. 010 de sulfate cristallisé équivalant à 0 g. 002 de métal pour 100 g., pour les autres souris. Chaque matin, des fragments de ces pains étaient distribués à discrédition aux animaux.

On a procédé autrement pour les vitamines. Celles-ci ont été administrées aux souris sous forme de solutions titrées, versées par microgouttes sur un petit fragment de pain synthétique. Le fragment imprégné de vitamines a été donné avant le renouvellement de la ration journalière; les animaux l'ont mangé presque toujours avec avidité.

On a pris: comme vitamine A, du carotène cristallisé, obtenu à partir de la racine de carotte, dissous dans l'huile d'olive et donné chaque jour à la dose de 0 g. 00001; comme vitamine D, de l'ergostérol irradié, obligamment préparé et titré par O. BAILLY, aussi en solution dans l'huile d'olive; une microgoutte de cette solution correspondait à la dose journalière de 0 g. 000001 de substance active; enfin, comme vitamine B₁ et B₂, un extrait de levure de bière n°34H, préparé par A. SENDELL [34] et que l'on a enrichi d'après le procédé de M. I. SMITH [35]. L'activité de l'extrait enrichi était environ 100 fois plus grande en vitamine B₁ et de 60 à 70 fois plus grande en vitamine B₂ que la levure sèche. Il a été distribué, dissous dans l'eau, à la dose de 0 g. 001 par jour.

On n'a pas ajouté de vitamine antiscorbutique, la souris passant, avec le rat et le pigeon, pour ne pas avoir besoin de cette substance.

L'action des vitamines a été expérimentée de deux manières. Lorsque les souris sont séparées de leur mère, à l'âge de vingt et un jours, elles renferment dans leurs organes une petite provision de vitamines qui assure leur accroissement à l'aide du pain synthétique pendant une dizaine de jours. Utilisant cette observation et pour rendre plus apparente l'action des vitamines, on n'a administré ces substances aux deux lots de souris, dans certaines séries d'expériences, qu'à partir du dixième jour. A ce moment, le poids des animaux cessait d'augmenter ou même commençait à diminuer. Malgré la présence des vitamines, les souris appartenant aux lots sans zinc ont continué à maigrir, leur pelage s'est hérisssé, puis elles sont

mortes en quelques jours avec des troubles manifestes de l'équilibre, accompagnés de paralysie du train postérieur. Au contraire, les souris appartenant aux lots avec zinc, après avoir présenté parfois et passagèrement des symptômes de même nature, ont maintenu ou même augmenté leur poids et ce n'est que beaucoup plus tard qu'elles ont peu à peu succombé.

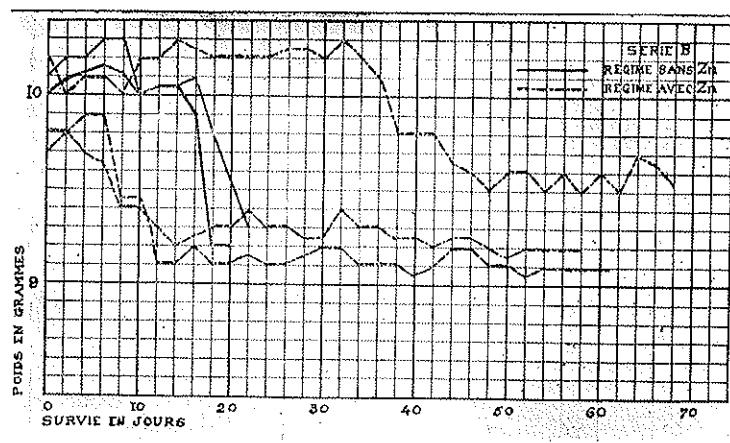


FIG. 20

On a aussi administré les vitamines aux animaux dès le premier jour de l'alimentation artificielle. L'allure des résultats n'a pas été modifiée.

Ces expériences ont été effectuées sur 22 animaux provenant de cinq portées. Douze de ces animaux ont été soumis au régime alimentaire sans zinc et dix au régime alimentaire contenant du zinc.

Les douze souris sans zinc ont vécu de 14 à 23 jours, soit en moyenne 16 jours 9 dixièmes, et les dix souris avec zinc de 57 à 74 jours, soit en moyenne 64 jours 4 dixièmes.

On a dosé le zinc contenu dans les cadavres des animaux morts, après avoir vidé aussi bien que possible leur tube digestif. Les douze souris du lot alimenté sans zinc renfermaient en moyenne 0 mg. 22 de métal et les dix souris du lot ayant reçu du zinc 0 mg. 434. Sur 1 mg. au plus de métal présent dans le pain qu'elle avait consommé,

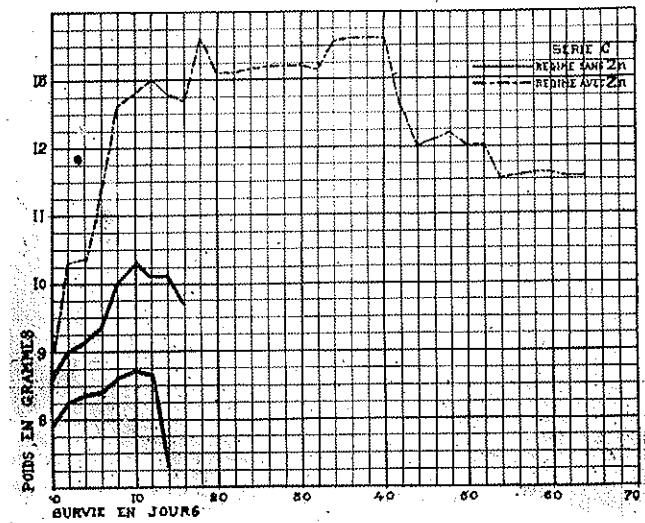


FIG. 21

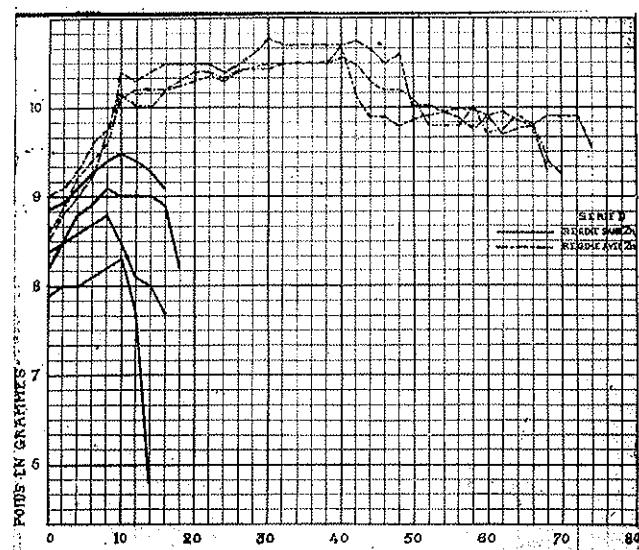


FIG. 22

chacune des souris du dernier lot en avait ainsi fixé dans ses tissus 0 mg. 207, en moyenne.

Il a donc suffi que les animaux assimilent environ deux dixièmes de milligramme du zinc contenu dans les aliments pour que leur survie expérimentale passât de deux à trois semaines, quand ils étaient soumis au régime sans zinc, à près de deux mois et même

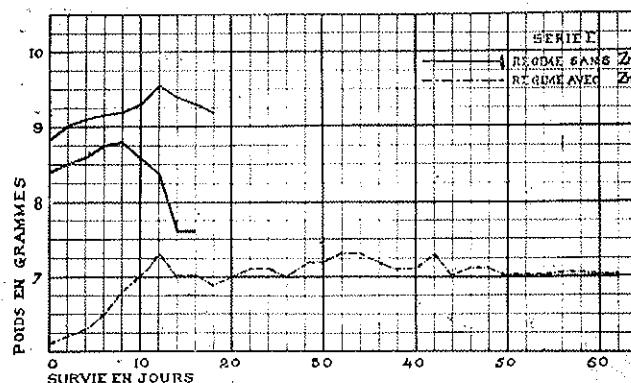


FIG. 23

de deux mois et demi, lorsque ce régime était additionné d'une minime quantité de ce métal.

Ces résultats ne démontrent pas seulement d'une manière indiscutable l'importance individuelle du zinc dans l'alimentation des animaux, ils mettent en évidence l'action synergique du même métal et des vitamines ou, tout au moins, de l'une des vitamines introduites dans le régime artificiel.

Il est remarquable en effet, que si le zinc n'est intervenu, en l'absence de vitamines, que d'une manière très limitée dans les phénomènes de nutrition des animaux, les vitamines n'ont manifesté aucune action lorsqu'elles ont été administrées à l'exclusion de toute trace de zinc. Il y a là un fait nouveau d'un grand intérêt au point de vue biologique.

[1] Bertrand - pag. 32

* * *

A l'égard des plantes, il a été bien établi, en particulier pour la moisissure noire (*Aspergillus niger*), que le zinc joue un rôle alimentaire [36], mais il n'a pas encore été possible de rencontrer d'effet synergique du métal permettant d'étendre aux plantes la portée d'une découverte issue de recherches sur le règne animal. Les expériences décrites ci-dessous permettent de combler en partie cette lacune [37].

On a entrepris la culture de *Rhodotorula glutinis* var. *Saitoi* dans des séries de matras contenant le milieu nutritif de READER [38] et, comparativement, ce milieu additionné de certains catalyseurs, chaque série comprenant des matras sans folliculine et des matras additionnés de folliculine.

Quatre milieux de culture ont été préparés et diversement utilisés:

- A. Le milieu de READER seul [39];
- B. Le milieu de READER + 1 mg. de zinc par litre;
- C. Le milieu de READER + 1 mg. de bore + 1 mg. d'iode + 0 mg. 1 de cuivre + 1 mg. de manganèse + 1 mg. de thallium par litre;
- D. Le milieu C + 1 mg. de zinc par litre.

Dans les milieux avec folliculine, cette hormone était ajoutée à la dose de 1 mg. par litre.

Les matras contenaient 50 cc. de milieu nutritif. On les a ensemencés à la pipette, à partir d'une culture de 24 heures sur malt gélosé, préalablement diluée dans l'eau pure. Un centimètre cube de la dilution, introduit dans chaque matras, contenait 0 mg. 1 de matière sèche. Les matras ensemencés ont été maintenus dans un bain-marie à secousses mécaniques à la température constante de + 30°. Les récoltes ont été faites sur filtre à plaque poreuse d'Iéna n° 1 G4, lavées à l'eau distillée et séchées à l'étuve à + 105°. Les poids de matières sèches sont exprimés en milligrammes.

Voici les résultats de ces expériences:

TABLEAU

	Sans folliculine	Avec folliculine	Augmentations dues à la folliculine
	mg	mg	%
<i>Durée de la culture: 51 heures et demie</i>			
Milieu A	3,0	3,1	3
" B	3,1	6,4	107
<i>Durée de la culture: 53 heures</i>			
Milieu A	3,8	4,4	16
" B	4,0	5,0	25
" C	4,8	8,6	79
<i>Durée de la culture: 67 heures</i>			
Milieu A	3,3	3,7	12
" B	7,6	9,0	150
" C	3,4	9,8	178
" D	4,0	14,4	260

Ces résultats mettent nettement en évidence l'intervention conjuguée de l'hormone et de plusieurs métalloïdes et métaux dans le développement de la levure. La synergie du catalyseur organique et d'un catalyseur minéral a été particulièrement élevée dans le cas du zinc.

Ainsi, tandis que l'addition de la folliculine seule au milieu primitif de culture n'a augmenté la récolte que de 12 à 16 pour 100 et celle du zinc seul au plus de 10 pour 100, l'addition des deux catalyseurs à la fois a porté le rendement de 100 à 179 dans la culture de 53 heures et même à 250 dans celle de 67 heures.

Ce nouvel exemple de synergie *in vivo* des catalyseurs biologiques n'est pas spécial à la folliculine et au zinc; le mélange des autres métalloïdes et métaux essayés a permis d'obtenir, bien qu'à un degré moindre, un résultat analogue. On remarquera enfin que les catalyseurs ont additionné leurs effets dans une certaine mesure: en les faisant agir tous à la fois, le rendement de levure est passé de 100, en l'absence de la folliculine, à 360, en présence de cette hormone.

[1] Bertrand - pag. 34

BIBLIOGRAPHIE

- [1] GAB. BERTRAND, « C. R. Ac. Sc. », 118, 1894, 1215 et 122, 1896, 1215.
- [2] — « C. R. Ac. Sc. », 124, 1897, 1032.
- [3] — « C. R. Ac. Sc. », 120, 1895, 266 et 122, 1896, 1132.
- [4] — « C. R. Ac. Sc. », 121, 1895, 166 et *Conférences faites à la Société chimique de Paris de 1893 à 1900*, année 1903, p. 193-218; GAB. BERTRAND et E. BOURQUELOT, « C. R. Ac. Sc. », 121, 1895, 783.
- [5] Voir en [2].
- [6] SCREELE, *Mémoires de Chymie* [1], p. 39, Dijon 1785.
- [7] GAB. BERTRAND, *Ergebnisse der Vitamin-und Hormonforschung*, 2, 1939, 192-212.
- [8] — « Bull. Soc. Chim. », 4^e série, 9, 1911, 361; GAB. BERTRAND et L. SILBERSTEIN, « C. R. Ac. Sc. », 232, 1951, 2386; 235, 1952, 1458; 236, 1953, 1113; 237, 1953, 481 et 1607.
- [9] GAB. BERTRAND, Reale Accademia d'Italia, *Estratto degli Atti del VII Congresso Volta*, Roma, 26 settembre 1937.
- [10] RAULIN, *Etudes chimiques sur la végétation*. Thèse pour le Doctorat ès Sciences physiques, Paris, 1870, rééditée en 1905.
- [11] GAB. BERTRAND, « C. R. Ac. Sc. », 154, 1912, 381.
- [12] — « C. R. Ac. Sc. », 154, 1912, 616.
- [13] Voir en [11].
- [14] HÖDLMOSER, « Zeits. phys. Chem. », 33, 1901, 329; Ziemke, « Apotheker Zeitung », 1902, t. 17; Cerny, « Zeits. phys. Chem. », 1902, 408.
- [15] GAB. BERTRAND, « Bull. Soc. chim. », 3^e série, 27, 1902, 847 et 850; GAB. BERTRAND et DE VÁMOSSY, « Ann. Chim. Phys. », 8^e série, 7, 1906, 523.
- [16] — « Ann. Chim. Phys. », 7^e série, 29, 1903, 242.
- [17] — « Bull. Soc. chim. », 3^e sér., 29, 1903, 920.
- [18] — *Conférences*. Voir en [4] et *Conférence faite à la Clôture du VII^e Congr. intern. de Physiologie*, Heidelberg, 16 avril 1907.
- [19] RAULIN, *Thèse*. Voir en [10].
- [20] GAB. BERTRAND et M. JAVILLIER, « C. R. Ac. Sc. », 143, 1906, 900 et 145, 1907, 924.
- [21] JAVILLIER M., *Thèse*, Paris, 1908.
- [22] « Liebigs Ann. f. Chemie », 103, 1857, 362.
- [23] GAB. BERTRAND et H. AGUILHON, « Bull. Soc. chim. », 4^e série, 7, 1910, 90 et 125.

- [24] — « Bull. Soc. chim. », 15, 1913, 197.
- [25] Voir, par exemple: GAB. BERTRAND, *Sur la maladie du cœur de la Béterave*, Conférence faite devant la Société technique et chimique de Sucrerie de Belgique, reproduite dans les « Annales des Fermentations », 5, 1939, 349-370, ainsi que les publications de GAB. BERTRAND et L. SILBERSTEIN, « C. R. Ac. Sc. », 209, 1939, 270 et « Ann. Inst. Pasteur », 64, 1940, 264, etc.
- [26] GAB. BERTRAND et B. BENZON, « C. R. Ac. Sc. », 175, 1922, p. 289 et pour plus de détails: « Ann. Inst. Pasteur », 38, 1924, p. 405.
- [27] GAB. BERTRAND et H. NAKAMURA, « C. R. Ac. Sc. », 179, 1924, 129 et avec plus de détails: « Bull. Soc. chim. », 4^e série, 37, 1924, 1555.
- [28] — « C. R. Ac. Sc. », 186, 1928, 1480 et « Bull. Soc. chim. », 77, 1936, 81.
- [29] — « C. R. Ac. Sc. », 185, 1927, 321 et « Bull. Soc. Chim. biol. », 16, 1934, 1366.
- [30] GAB. BERTRAND et MOKRAGNATZ, « C. R. Ac. Sc. », 175, 1922, 458 et « Bull. Soc. chim. », 37, 1925, 554; GAB. BERTRAND et H. NAKAMURA, « C. R. Ac. Sc. », 190, 1930, 21 et « Bull. Soc. chim. », 47, 1930, 326.
- [31] GAB. BERTRAND et M. MACHEBOEUF, « C. R. Ac. Sc. », 180, 1925, 1380 et 1993; 182, 1926, 1304; 183, 1926, 5 et 257.
- [32] Voir en [29].
- [33] GAB. BERTRAND et R. CH. BHATTACHERJEE, « C. R. Ac. Sc. », 198, 1934, 1823 et « Bull. Soc. Chim. biol. », 17, 1935, 1137.
- [34] A. SEIDELL et V. BIRCKER, « J. Amer. Chem. Soc. », 53, 1931, 2288.
- [35] On trouvera la description de ce procédé, avec d'autres détails, dans: « Bull. Soc. Chim. biol. », 17, 1935, 1137.
- [36] M. JAVILLIER, « Ann. Inst. Pasteur », 22, 1908, 720.
- [37] GAB. BERTRAND et A. PH. WEBER, « C. R. Ac. Sc. », 202, 1936, 1629.
- [38] V. READER, « Biochem. J. », 21, 1927, p. 904.
- [39] Ce milieu renferme par litre:
- 3 g. de $\text{SO}_4^{2-} (\text{NH}_4)^2$ + 0 g. 7 de SO_4^2Mg , $7\text{H}_2\text{O}$ + 1 g. $\text{PO}_4^{3-}\text{K}^+$ + 0 g. 16 $\text{PO}_4^{3-}\text{K}^2$ (pour porter le pH à 7,4) + 0 g. 5 de ClNa + 0 g. 4 $(\text{NO}_3)^2\text{Ca}$ + 10 g. de glucose.

On a remplacé le $\text{PO}_4^{3-}\text{K}^2$ par la quantité correspondante du sel de sodium, plus facile à purifier et à conserver; en compensation, on a pris du ClK au lieu de ClNa , de manière à ne pas changer les concentrations ioniques. L'eau et les substances dissoutes avaient été purifiées avec soin.

THE GEOCHEMICAL AND PEDOLOGICAL DISTRIBUTION OF TRACE ELEMENTS IN SOILS

R. L. MITCHELL

THE GEOCHEMICAL DISTRIBUTION OF TRACE ELEMENTS

The total contents of trace elements in soils generally follow closely those in the geological parent materials from which the soils were derived, and to obtain an overall picture it is necessary to look first of all at the principles controlling the geochemical distribution in rocks and minerals. It is of interest first to consider GOLDSCHMIDT's estimate of the average abundance of the elements in the crust of the earth and then to examine their distribution throughout the various igneous and sedimentary rocks and the metamorphic rocks derived from them. Table 1 gives average abundance values in parts per million for some 65 elements and indicates the wide differences in natural abundance of such biologically essential elements as Mn, Zn, Co, B, Mo and I. The latter is the least abundant of the essential trace elements so far recognised.

It is interesting to note that the eight elements O, Si, Al, Fe, Ca, Na, K and Mg constitute almost 99% of the crust, and that oxygen contributes almost 50% of the weight and over 90% of the volume. These major constituents are of importance from the trace element point of view as they form the major rock-forming minerals, which in turn guide the trace constituents into the various igneous rocks and minerals. This process is best illustrated by a simple example. When a basic (high Mg, low Si) magma is crystallizing, one of the commonest of the minerals which separates is

olivine, a magnesium-ferrous iron silicate of the general composition $(\text{Mg}, \text{Fe})_2 \text{SiO}_4$. This mineral consists of a series of independent silicon-oxygen tetrahedra with the metallication occupying the space between 6 oxygen atoms of adjoining tetrahedra. This space can accommodate a cation, preferably divalent, of approximately 0.8\AA ionic radius, and as Mg (0.78\AA) and Fe^{**} (0.83\AA) are the most abundant of the suitable cations they do to complete the olivine crystal lattice, with Mg olivines forming earlier, as there is a preference for ions of somewhat smaller radii within the acceptable limit of 14% variation. But any other cation of suitable size is equally capable of completing the lattice and any Ni (0.78\AA) present in the magna is incorporated into the early olivines, as is Co (0.82\AA) into those formed at a somewhat later stage of crystallization. Thus Mg and Fe^{**} of silicate of aluminosilicate minerals can be replaced (although actual displacement does not in fact occur — it is rather competition during formation) by such actions as Ni, Co, Cu (0.83\AA) or even Li (0.78\AA) in which case a complementary substitution elsewhere in the lattice is necessary to balance the charge. Similarly Ga (0.62\AA) can take the place of Al (0.57\AA), Ba (1.43\AA) or Tl (1.47\AA) that of K (1.33\AA), and Na (0.98\AA) or even Sr (1.27\AA) that of Ca (1.06\AA), although the latter can occur only in certain minerals where the basic structure is spacious enough to accommodate the larger ion. Table 2 details the ionic radii of the more important elements. This process of substitution results in the distribution of the trace constituents in the rocks and minerals in a predictable manner.

An example of fractional crystallization of igneous rocks from a typical magma is given by the results from a suite of rocks from the Skaergaard Intrusion of East Greenland which vary in composition from ultrabasic through basic and intermediate stages to acidic rocks similar in composition to granites. Although this intrusion shows some unusual features, for our purpose it can be assumed that rather similar factors have operated to give a similar differentiation of trace elements in most igneous rocks and analyses from all over the world go to substantiate this assumption. We observe in Table 3 the preference of Ni, Co and particularly Cr for the more

[2] Mitchell - pag. 2

basic rocks, the greater abundance of V in the intermediate rocks in which the ratio of Ni to Co may fall below unity, the almost uniform distribution of Cu except in the ferrogabbro in which a sulphide phase is present, the occurrence of Mo in both ultrabasic and acidic rocks (for entirely different reasons) and Ba, Rb, Y, La, and Sr in the more acidic rocks. Mn is fairly uniformly distributed. Results for B and Zn are not available for these rocks but normal ranges are 30 p.p.m. B and 100-200 p.p.m. Zn in basic rocks to 10 p.p.m. B and less than 50 p.p.m. Zn in acidic rocks.

The distribution of trace elements in the individual minerals of a rock is illustrated in Table 4, which considers one of the Greenland rocks in more detail. The pronounced preference of trace elements for specific minerals in accordance with the principles already described, is very obvious, and in most instances, allowing for errors in analysis and assessment of mineral proportions, the total content in the rock is accounted for in the three minerals examined. Exceptions are Cr, V, Sc, Zr and Cu which occur also in accessory minerals such as spinels and iron oxides. Analytical errors probably account for the Ba discrepancy.

All sedimentary and metamorphic rocks are derived in the first instance from igneous rocks, but the factors involved in the redistribution of the trace elements are quite different from those already discussed, and are in fact much more complex. Ninety-five per cent of the crust of the earth is composed of igneous rocks, but the surface area which these cover which is the important factor from the soil point of view, is considerably less, as the sediments are distributed as a rather thin layer in the upper most part of the crust. The distribution of the different classes of sediments is roughly 80% shales and argillaceous rocks, 15% sandstones and 5% limestones.

The simplest form of weathering to which igneous rocks are subject is straightforward physical weathering, which leads to sandstones or conglomerates composed of some or all of the original minerals of the parent rock. These initially contain the same trace elements as the constituent minerals of the igneous rocks, but as they are often quite porous and in close proximity to impervious sediments, they are liable to be affected by percolating waters which

can introduce further trace elements. On occasion sandstones can therefore contain unexpectedly high contents of metals such as lead or zinc. Generally, however, the trace element most typical of sandstones is zirconium; contained in the difficulty weathered zircon which usually follows silica in the course of sedimentation.

Not all minerals of igneous rocks are equally easily decomposed by the various factors involved in weathering, and as they are differently affected by changing conditions, it is not possible to give an order of stability which holds in all circumstances. Table 5 presents the approximate order of stability for the commoner rock forming minerals. This table also indicates the trace elements most likely to be present, and therefore suggests the order of release of these elements in a soil containing such minerals. It is particularly significant that the bulk of such important trace elements as Zn, Mn, Co and Cu occurs in the more easily weathered constituents of igneous rocks.

The chemical weathering which produces the breakdown of these minerals inevitably involves a solution process, with subsequent precipitation influenced by such physico-chemical factors as ionic potential, pH value, oxidation-reduction potential, and colloidal stats. These control the distribution of trace elements in most sedimentary rocks. Some formations, including coals, oil shales and certain limestones, also involve biological factors.

The fate of the trace elements released from igneous rocks during chemical weathering is of particular interest because of the great importance of sedimentary rocks, especially the shales or hydrolysates, as soil parent materials over large areas of the earth's surface. In Table 6 will be seen simplified diagrammatic representation of the process of sedimentation, showing the chief sedimentary deposits and the trace elements commonly associated with them. This table indicates where relative concentration may be expected to occur, taking into account the terrestrial abundance of the individual elements; mention of an uncommon constituent does not necessarily imply that it is present in an amount greater than a more common element which is not mentioned. The general distribution is governed by the ionic potentials which were detailed

in Table 4. Elements with values below 2 to 2.5 tend to remain in ionic solution during the processes of weathering and transportation, those between 2 and 12 are precipitated in the hydrolyzates, above 12 they form soluble oxyacid anions.

The shales and associated rocks are the most important group of sediments from a soil point of view, as they form some 80% of the total. Sandstones are formed almost entirely from minerals which weather with difficulty and would *a priori* be expected to produce soils deficient in available trace elements, quite apart from such accentuating factors as low clay content and high drainage loss. Many reports of plant and animal deficiencies are in fact from sandstone areas. Limestones and dolomites are of more interest as soil additives than as soil parent materials. The trace elements in soils derived from limestones, such as rendzinas, come from the contaminants of the limestones rather than from the limestones themselves. The importance of ore deposits is very local; very high contents of what are normally trace elements may be found in the neighbourhood of such occurrences.

The hydrolyzate sediments can be divided into shales and bauxite deposits. The shales in turn may be subdivided into those of essentially inorganic origin comprising mainly the kaolin, montmorillonite and hydromica groups of clay minerals, which also make up the colloidal fraction of most soils, and the bituminous shales of biological origin. Formation of the clay minerals in a medium in which the trace elements of the original igneous rocks are present gives conditions in which the trace element could either be incorporated into the crystal lattice or adsorbed as exchangeable cations. The average diameter of these clay minerals is less than 0.005 mm. and the precise location of the trace constituents is difficult to establish, but it has been reported that in the montmorillonite structure Al can be replaced by Fe***, Mg, Zn or small amounts of Li, Cr, Mn or Ni. Similar substitutions can occur in illite, the commonest of the hydrous micas. But both of these clay minerals have a high cation exchange capacity, and the power which such trace elements as Cu, Ni, Co and Mn are adsorbed is such that they

might be expected to occur as rather difficultly extractable exchangeable cations. Clay minerals represent the end products of geochemical and pedochemical weathering, although they may suffer changes through metamorphism.

The process of formation makes it more difficult to state normal contents of the more important trace elements for shales than for specific igneous rocks, but the orders of values to be anticipated are, in p.p.m.f, B 20-200, Co 10-50, Ni 30-150, Cr 100-500, V 100-250, Zn 20-100, Mn 500-5000, Cu 20-200, Se 0.1-5, and Mo 1-5. Greater enrichment of certain elements, including U, is often but not invariably encountered in bituminous shales, possibly as a result of sulphide precipitation. In bauxitic and lateritic deposits Be and Nb are among the trace elements that are relatively enriched.

The effects of metamorphism on igneous and sedimentary rocks may be briefly considered at this point. In igneous rocks the effects are probably less important than in sediments, where pressure and heat can produce a recrystallization, as a result of which the clay minerals are transformed into minerals more closely related to those of igneous rocks, in which adsorbed ions will become incorporated in the crystal lattice, and their availability will depend once more on the rate of weathering of the minerals concerned. Boron, for instance, becomes an essential part of the very resistant tourmaline crystal and becomes much less available. The total contents of trace elements in slates, schists and gneisses are unlikely to be much different to those in the parent rocks, although thermal effects may have brought about a loss of the more volatile constituents. Igneous intrusions often have associated with them zones where the surrounding rocks have been impregnated with the more volatile products derived from the intruding material. Near one basic igneous intrusion in Scotland, limestone with a B content approaching 1% has been observed; the surloures of mineralization with such elements as Sn, Pb and Zn around granitic intrusions are of a similar nature. At this point it is convenient to mention the high contents of such elements as Li, Rb, Cs, Be, Sc, Zr, Mo, In, W, Nb, Ta, U, Th and the rare earths which occur in certain pegmatitic veins. These are of residual origin, being the last dregs from

the process of fractional crystallisation of igneous rocks, in which are disposed some of those elements for which adequate provision had not previously been made.

THE TRACE ELEMENT CONTENT OF SOILS

In Scotland we are fortunate in having available for study a wide variety of rocks which provide the parent materials for many types of soils. These are all essentially of a podzolic character, varying from brown forest soils of low base status through slightly podzolized soils to true podzols with iron pan, peaty podzols and non-calcareous gleys. They have been developed on such divergent igneous rocks as granites, diorites, basalts and even serpentines, and on sandstones, shales, quartzites, mica schists and other metamorphosed rocks. The results to be presented can illustrate only a few of a large number of profiles which have been examined spectrochemically for trace elements. The elements which have been studied most intensively are the metallic elements.

The total trace element contents of some typical Scottish surface soils given in Table 7 reveal the operation of the geochemical principles which have been discussed. In the 4 soils of igneous origin, Co, Ni, Cr and Mn all occur in greater amount in the two basic soils; V, Cu and Sr are highest in the olivine gabbron and Zr and Rb highest in the granite. The relatively high Zr in the serpentine is difficult to explain other than by contamination from neighbouring rocks. The distribution of such elements as Co, Ni and Cr is in line with the foregoing geochemical discussion. The difference between the granite and the granitic gneiss is marked, particularly for Cr, Co, Ni and V and one may venture to suggest that this indicates a sedimentary origin for this granitic gneiss. This is however not the place to enter one of the biggest or current geological arguments, other than to mention that some granitic areas carry Co-deficient stock, others are free from this disorder.

The three remaining soils were certainly derived from rocks of sedimentary origin, and the quartz mica schist, at least, has been subject to some metamorphism. The soil derived from sandstone

of Old Red Sandstone (Devonian) Age, is low in Co, Ni, Cr and V, as would be anticipated, while the gneiss, the schist and the shale are relatively uniform and fall within the levels of contents expected in argillaceous sediments.

Contents reported in a very extensive study of soils from Florida are of a like order to these reported here, as are also those quoted by Vinogradov for Russian soils. There are not many other comprehensive series of analyses available. The ranges of trace element contents likely to be encountered in different soils, based on our own findings and results in the literature, are indicated diagrammatically in Fig. 1. This shows that a 10 to 100-fold range from soil to soil is common for most elements, in sharp contrast with the major constituents which seldom vary more than five-fold. This wide spread means that the total content is a better indication of the status of a soil, as far as trace elements are concerned, than for major constituents, particularly if the nature of the parent material and other soil characteristics such as acidity and drainage are kept in mind. The total content is particularly useful as an indicator of the possibility of excess of such elements as nickel or zinc, although even in such cases the availability must be considered before any disorder can definitely be ascribed to such a cause.

Before considering the pedological effects in so far as they affect the distribution of trace elements in soil profiles, it will be useful to consider the assessment of their availability, as this must be related to the form in which they occur in soils. The trace elements which are chiefly present in the first instance incorporated in the crystal lattices of the main rock-forming minerals, including Cu, Co, Ni, Zn, Mn, Ga, Li, Ba and Sr, must be considered to be unavailable until released by weathering. These elements, in so far as they are not immediately washed out, will then be adsorbed or complexed by the clay minerals or the organic fraction. Precipitation, for instance as sulphide or sulphate, appears in most instances less probable. The clay minerals, which constitute the main inorganic cation exchange materials, include montmorillonite, illite, kaolin, and occasionally vermiculite or hydrobiotite. The cation exchange capacity varies from 1 m.c. per gram for montmorillonite

to less than 0.1 m.e. per gram for some kaolins. Comprehensive studies of the behaviour of the trace elements in such exchange materials at the levels present in soils are lacking. There is little doubt that the metallic cations are very readily adsorbed and are correspondingly difficult to displace, the order of firmness of binding being approximately

Cu	Pb	Ni	Co	Zn	Ba	Ca.
----	----	----	----	----	----	-----

It must be remembered that in surface soils the organic fraction must make an appreciable contribution to the exchange capacity, but that the relative degree of adsorption of the trace elements is even less well known, and that organic complexes which render the complexed ion unavailable also occur.

Certain other important trace constituents on release by weathering probably appear as complex anions. This group includes Be, Mo, Se and possibly V. These may be lost in drainage, be precipitated by, for instance, excess Ca or organic complexes, or under certain circumstances, as has been suggested for Mo, be absorbed as anions by anion exchange materials. Molybdate appears to be less strongly bound in anion or borate.

The element which may occur as complex anions are those which are frequently assessed on the basis of their water solubility, and the diagnostic findings would appear to be rather more reliable than those for the cationic trace elements. Boron and molybdenum are examples of elements whose status is often determined by water solubility. Assessment of availability of cationic trace elements is more difficult; the amounts extracted by neutral normal ammonium acetate are generally exceedingly small; considerably larger amounts of such elements as Co, Ni and Ti are removed by acetic acid at pH 2.5, the increase being often ten-fold. Hydrochloric acid at the same pH removes similar amounts of these trace elements from many Scottish soils. On the other hand, the amounts of K, Ca and in most instances Mg are similar for all three reagents; the difference in the case of the trace elements may be due to a firmer adsorption, leading to replacement more readily by hydrogen than by ammonium. Soils from which more Mg is extracted by acid reagents are

those derived from ultrabasic rocks containing ferromagnesian minerals, mainly olivines, which are presumably being broken up under acid treatment. If this were the explanation of the increased amounts of Go and Ni extracted from the soils by acids, an increase in Mg would also be anticipated in all cases. Manganese shows a similar effect between neutral and acid extraction. In this instance much of the element occurs in soils as insoluble oxides, and its availability is small in neutral or alkaline conditions, being probably related to the state of oxidation and aging of the Mn compounds. Extraction of Mn with a neutral salt after treatment with a weak reducing agent appears to give a value closely related to plant availability with many soils.

Factors such as soil pH organic matter content play such an important role in controlling plant uptake that any method of chemical extraction can be little more than an indicator of possible trace element behaviour. The effect of altering the soil acidity by liming is seen in Table 8, while Table 9 indicates the type of difference which can occur from the species when grown in intimate admixture on the same soil at the same pH value. No extractant can make adequate allowance for such differences and indicate probable plant content. The amount extracted by an reagent is no more than one factor which can assist in the assessment of soil trace element status.

The amount of trace elements usually extracted from surface layers of arable Scottish soils by 2.5% acetic acid at pH 2.5 are within the following ranges, in p.p.m.:

Co 0.05-2.0, Cr 0.01-1.0, Cu 0.05-1, Mn 5-100, Mo 0.02,
Ni 0.1-5.0, Pb 0.2-4, Sn 0.5, Sr 0.2-10, Ti 0.1-1,
V 0.05-1, Zn 2-30.

Of these, only Sr gives similar amounts on extraction with ammonium acetate at pH 7. Quite similar values have been obtained with soils classed as black cotton and red lateritic from widely separated areas in Africa. When one compares these amounts with the amounts removed by crops it is found that for elements such as Co, Ni, Zn, Mn much more is removed by the extractant than by the

plant per unit of soil, suggesting that the extractant is rather too vigorous for diagnostic purposes. Much better correlation is obtained between water soluble B or ammonium acetate soluble Mo and plant extraction. Here, as already mentioned, we are not dealing with elements held by cationic adsorption.

THE DISTRIBUTION OF TRADE ELEMENTS IN SOILS PROFILES

Neither the rather scattered results in the literature nor the findings at the Macaulay Institute suggest any simple trend in the contents of the different trace elements in soil profiles which can be ascribed to pedological processes. The factors which operate, separately and jointly, include straightforward weathering and leaching of soluble constituents as in podzolization and lateritzation, movements related to gleying and its associated oxidation-reduction effects and variable water table, plant extraction and surface enrichment, size sorting with clay movement down the profile, and possibly also effects resultant from microbiological activity, all of which may be superimposed on variations in total content of the parent material, which, if it is glacial drift or alluvial origin, may be quite appreciable.

Effects due to biological enrichment of the surface horizons are well established. The surface layers of most Scottish soils that have been studied have significantly higher Pb content than the underlying layers, a finding also reported in other countries. The fact that the absolute increase is greatest in soils with high Pb content suggests that it is due to long term plant accumulation rather than to fertilizer addition or atmospheric pollution, neither of which could produce increases of from 20 to 70 p.p.m. or more in the areas in question. These results are stated on a dry matter basis, so that the effect is still more apparent in uncultivated organic-rich surface horizons calculated on a mineral matter basis. In uncultivated soils this, the GOLDSCHMIDT enrichment, would appear to apply also under Scottish moorland conditions, but generally only on a mineral basis, to A, Cu, Mo, Sn and Zn, but not, except in occasional

instances, to Co, Ni, Cr, V, Mn, Ti, Ga, Li, Rb, Ba, or Sr. The effect is most marked with Pb presumably because it passes readily into insoluble organic or inorganic combination. The high content of Ag and Cu in many fungi suggests that these may be active in the mobilization of trace elements. That Ag is a constant, if small, constituent of plant material is confirmed by its invariable detection in all animal livers which have been examined at the Macaulay Institute.

Size sorting in soils leads to the formation of clay-rich layers, and since the clay fraction has been shown to be richer in some trace elements than its associated sands, those trace elements will show relative accumulation in clay layers formed by this process. This may be the cause of the higher Co and Ni contents of the sub-surface layers of grey brown podzolic soils such as Sassafras silt loams. On the other hand if great changes in clay content in a profile are not accompanied by corresponding changes in the total contents of these trace elements in the whole soil then the assumption can be made that the clays have been formed in situ, the differentiation being due to changes in rate of weathering in the different horizons rather than to translocation of clay.

Effects due to leaching and subsequent precipitation would be expected to be greatest in soils in humid regions. In a survey of Indian profiles, it has been shown that increase of total Mn down the profile is more marked in humid than in arid, semi-arid, per-humid and calcareous areas. In well drained Scottish soils there is a tendency for a lower Li content to be observed in surface horizons, presumably due to removal of Li in solution. Lithium is the least firmly adsorbed and most easily displaced of all cations. After weathering it is least likely to be fixed and therefore the most likely to show this effect. It might be expected that accumulation of certain trace elements in the alluvial layers of podzols might be observed in total analysis. There is some experimental evidence of increase in Cr, V and Ti of the order of 50-100% in the B horizons of a podzolized granitic profile with total contents of 30 p.p.m. Cr, 50 p.p.m. V and 2000 p.p.m. Ti. Results for Co and Ni from different profiles are rather more variable: accumulation of the same

order occurring in certain instances but not in others. There is often a loss of Cr, Ni and Co from the upper layers of soils derived from ultrabasic rocks. Generally, however, the changes in total trace element contents in a soil profile as a result of pedological processes are not particularly spectacular.

Acetic acid extraction shows, as would be anticipated, a large increase in the amount of soluble Fe in the B, particularly B₁, horizon of podzols. There may be an increase of the order of twenty-fold compared with the A₂ horizon. Extractable Co and Ni, on the other hand, seldom increase, if at all, by more than twice, in the alluvial layers of Scottish podzols. Ten-fold increase in extractable Al may occur in the B, or even in the lower part of the A₂ horizon, and with it there is often a corresponding increase in extractable Cr, Ti, and sometimes V. A typical podzol profile on felsitic lava parent material is given in Table 10. The increase in the extractable content in the A₂ layer may occur in a profile in which the total content increases in the B layer. In other words, this extractant is presumably removing potentially transportable rather than accumulated material. Comparative values for soils after ignition, which might free organically bound elements but bind those in clay exchange complexes, would be of interest.

The most outstanding pedological effect in the soil profiles studies in Scotland has been on the content of extractable cations in soils with impeded drainage. Table IX illustrates some typical results obtained from two adjoining profiles of cultivated soils on glacial till of basic igneous origin. The mobilization of Co, Ni, Fe, V, Cu, and Mn in the gleyed sub-surface layers is remarkable; particularly the fact that much of the Co and Ni (20-40% of the total content) is ammonium acetate soluble; although Fe is not. The reduction of Al solubility in gleyed soils is another feature which is consistently found. Water extracts of the gleyed layers remove appreciable amounts of Co, Ni, and Fe⁺⁺.

Other profiles have shown increased solubility of Mo (in ammonium acetate) and Ag and Pb (in acetic acid) in horizons with impeded drainage. The mechanism of the effect is still under examination. One practical result of this effect of impeded drainage

is the increased availability of certain trace constituents to plants, noted also in New Jersey, where poorly drained soils are associated with high contents of Co in plants growing on them. We have instances in Scotland of the Co content of herbage increasing 10 times, from 0.1 to 1.0 p.p.m., in poorly drained portions of a field.

In this connection it is interesting to consider the total contents in three horizons of a Scottish *scirpus-sphagnum* deep peat, given in Table 12. On the basis of the mineral matter content, one might in this profile anticipate a two-fold increase in any trace elements in the bottom layer, given no contamination, species variation in the peat or leaching effect. Ti alone is in reasonable agreement with this expectation. The middle horizon shows a very marked increase of Mo, V and Cr, and to a lesser extent Cu, while the second and third layers are equally high in Co and Ni. There is a marked increase in Fe and particularly Mn in the third horizon. The drop in Sr in the middle layer is also interesting. Acetic acid extractions of basal mineral matter from this area show contents of up to 2 p.p.m. Co, 3 p.p.m. Ni, 0.5 p.p.m. Mo, 13 p.p.m. V, 1.4 p.p.m. Cr, and 4.5 p.p.m. Cu. The implications of these results cannot be discussed here, but it is possibly instructive to note that the same elements are accumulated in the peats as are mobilized in the mineral with impeded drainage.

No comprehensive study of the trace elements in tropical soil profiles has been made. In lateritic soils little variation in total content of individual elements with depth has been reported for Cr and Mn in Samoa, or for Mn in India. In Indian soils exchangeable and water soluble Mn decreases regularly with depth, contents of 15-40 p.p.m. exchangeable Mn at the surface falling to 4-16 p.p.m. at 5 feet, only a fraction of this being water soluble. Reducible Mn is less uniformly distributed, being generally 20-25% of the total contents, which lie between 300 and 1500 p.p.m. Decreased amounts of reducible Mn often occur in horizons with CaCo_3 concretions. Black soils (mont-morillonitic) are well supplied with active Mn, while lateritic and acid soils (kaolinitic) have generally smaller amounts.

Vinogradov, who has reported total trace element contents for

some twenty Russian soils profiles, lays considerable stress on the variation of content with soil type. This may be due to the rather uniform character of the parent materials from which all the types examined, Tundra soils, podzols, grey and brown forest soils, chernozems, solonetz, and laterites, have been developed, and also to the fact that the soils are rather more mature than those which have been investigated in Scotland. He however recognises the importance of the geological parent material, pointing out for instance the occurrence of Co, Ni and Cu in soils from basic igneous parent materials.

Copper in Russian soils of all types has shown contents of 3-79 p.p.m. depending on the parent material, with little profile differentiation except in some podzolic soils where there may be a slight (50-100%) increase in the B horizons. A surface accumulation is often observed. Mean contents of Cr and V are 190 and 100 p.p.m. respectively, again with possible slight accumulation in B horizons of podzols and grey forest soils in line with our findings. Chernozems generally have higher contents of Cr and V than other zonal soils.

In the United States a number of valuable profiles studies of the total contents of specific elements have been carried out. An investigation into the contents of 9 trace elements in profiles from Erosion Experiment Stations indicated, apart from some loss from surface horizons of Se, V and Cu in some instances, that soil forming processes have not extensively modified the amounts present in soils from quite widely scattered locations in the mid western and southern states covering podzolic, rendzina, chernozem, prairie, and lateritic types. Relatively constant profile distribution was obtained for As, Co, Ni, Zn, Ba and Cr. Arsenic contents of 1-20 p.p.m. and Se contents of 0.02-2.5 p.p.m., with abnormally high values up to 80 p.p.m. As and 20 p.p.m. Se on certain shales, were found; other elements fall into the ranges indicated as normal in Scottish soils. Further investigation of Cu and Zn in these and other profiles has confirmed these findings, variations within the profiles being considered to be due to changes in clay and organic matter contents. Barium has been studied in a series of infertile

soils, in which it occurs at between 0.1% and 3.5%. Profile distribution was again found to be reasonably uniform in the soils with the lower contents, but rather variable in the higher which were influenced by barytes deposits. Contents of 1000 p.p.m. cannot be considered abnormal in view of results from other areas. Exchangeable Ba was highest in surface soils, and in infertile soils approached that of Ca or Mg. Soils with high Ba derived from limestone, with high soluble Ca, were seldom infertile. In podzolized soils, there is some accumulation of Ti and B and sometimes A₂ horizons in agreement with the previously mentioned Scottish findings, but it is not mobile to any extent. In lateritic types the highest contents of Ti occur in surface horizons. In arid regions surface accumulation of soluble salts may occur, and in such areas with soils derived from Cretaceous shales Se accumulation can cause animal disorders, while areas where B toxicity in plants occurs are also reported.

In profiles, the effects which are most apparent under the appropriate conditions may be summarized as follows:

- a) leaching of constituents which are present as soluble ions, such as Mn, Li, B and Se, from surface layers, either completely out of the profile or to layers of accumulation, particularly important for Mn;
- b) surface accumulation of elements taken up by plants, especially obvious in uncultivated profiles;
- c) movement in course of podzolization of certain trace elements together with Fe and Al but apparently to a less marked extent; Cr, V, Ti, Ni and Co may be included in this category;
- d) mobilization of many trace elements notably Ni, Co, Fe, V, Mo, Pb, Mn, Cu, and Ag as a result of gleying; reduction may be involved in some instances but not in others;
- e) translocation of clay down the profile, thereby increasing the content of trace elements in which it is high in the layers of accumulation;
- f) surface accumulation of soluble salts such as borates or selenates in arid regions.

The foregoing account is an attempt to present some of the relevant facts regarding the distribution of trace elements in rocks and soils in so far as they may concern workers in the fields of plant and animal nutrition. It has been quite impossible to review all the published work in the space available, and much of the information given is based on work carried out in the Department of Spectrochemistry of the Macaulay Institute for Soil Research, in collaboration, in the geochemical investigations, with Prof. L. R. WAGER of the University of Oxford. I should like to acknowledge the assistance of Dr. D. J. SWAINSON in the analytical work involved.

Voir la discussion à page 503

TABLE I — *Average abundance of trace elements in the crust of the earth (*)*

	In ppm									
Ti	4400	Ni	100	Th	12	Yb	2.7	I	0.3	
P	1200	Zn	80	B	10	Er	2.5	Bi	0.2	
Mn	1000	Cu	70	Ge	7	Br	2.5	Tm	0.2	
F	800	Li	65	Sm	6.5	Mo	2.3	Cd	0.2	
S	520	Ce	42	Gd	6.4	Ta	2.1	In	0.1	
Cl	480	Sn	40	Be	6	Ho	1.2	Se	0.09	
Ba	430	Co	40	Pr	5.5	Eu	1.1	Ag	0.02	
C	320	Y	28	Sc	5	W	1	Pd	0.01	
Rb	280	Nd	24	As	5	Sb	(1)	Pt	0.005	
Zr	220	Nb	20	Hf	4.5	Tb	0.9	Au	0.001	
Cr	200	La	18	Dy	4.5	Lu	0.8	Ir	0.001	
Sr	150	Pb	16	U	4	Hg	0.5	Rh	0.001	
V	150	Ga	15	Cs	3.2	Tl	0.3	Re	0.001	

(*) After Goldschmidt (ed. Muir) 1954.

TABLE 2 — *Ionic radii (r) and ionic potentials (z/r) of some Constituents of minerals (*)*

In Å where z is the ionic charge

	r	z/r		r	z/r
Cs ⁺	1.65	0.61	Fe ²⁺	0.83	2.4
Rb ⁺	1.49	0.67	Cu ²⁺	0.83	2.4
Tl ⁺	1.47	0.68	Co ²⁺	0.82	2.4
Ba ²⁺	1.43	1.4	Ni ²⁺	0.78	2.6
K ⁺	1.33	0.75	Mg ²⁺	0.78	2.6
Sr ²⁺	1.27	1.6	Li ⁺	0.78	1.3
La ²⁺	1.22	1.6	Mo ⁴⁺	0.68	5.9
Hg ²⁺	1.12	1.8	Fe ³⁺	0.67	4.5
Y ²⁺	1.06	1.9	V ³⁺	0.65	4.6
Ca ²⁺	1.06	1.9	Cr ³⁺	0.64	4.7
Na ⁺	0.98	1.0	Ti ⁴⁺	0.64	6.3
Cu ⁺	0.96	1.0	Ga ³⁺	0.62	4.8
Mn ²⁺	0.91	2.2	Al ³⁺	0.57	5.3
Te ⁴⁺	0.89	4.5	Si ⁴⁺	0.39	10
Zr ⁴⁺	0.87	4.6	P ⁵⁺	0.35	15
Hf ⁴⁺	0.86	4.7	B ³⁺	0.20	15

(*) Throughout the discussion, these values of r and z/r based on Goldschmidt's initial determinations are employed: more recent studies, for example by Ahrens, have suggested that more precise values are now available, but these do not alter the general trend of the argument.

TABLE 3 — Distribution of trace elements in igneous rocks, illustrated from the Skærgaard intrusion of E. Greenland

	Original Magma	Gabbro-pierite	Olivine Gabbro	Hypersthene Olivine Gabbro	Olivine-Free Gabbro	Ferro-hornblende Ferrogabbro	Hedenbergite Granophyre	Basic Granophyre	Acid Granophyre
SiO ₂ %	47.9	41.3	46.2	46.4	48.2	44.6	52.1	58.8	75.0
MgO %	7.8	27.1	10.0	9.6	5.3	1.7	1.1	0.72	0.15
K ₂ O %	0.19	0.13	0.12	0.20	0.14	0.35	1.38	2.39	3.85
Ga ppm	17	10	15	23	20	20	30	50	20
Cr ppm	170	2000	300	175	11	1	1	1	5
V ppm	140	150	200	225	250	5	5	5	20
Mo ppm	< 1	3	< 1	< 1	< 1	< 1	3	3	3
Li ppm	2	1	3	2	3	2	10	30	5
Ni ppm	170	1000	400	135	50	2	5	8	5
Co ppm	53	80	70	55	30	20	8	4	3
Cu ppm	130	200	50	80	150	600	300	300	20
Sc ppm	12	< 10	10	20	30	15	10	< 10	< 10
Zr ppm	50	30	50	35	50	20	200	2000	1000
Mn ppm	800	1240	1160	700	920	1620	1500	1500	80
Y ppm	< 30	< 30	< 30	< 30	< 30	< 30	200	200	200
La ppm	< 30	< 30	< 30	< 30	< 30	< 30	40	50	200
Sr ppm	350	100	300	700	600	500	300	500	150
Ba ppm	43	20	10	25	60	50	500	600	1500
Rb ppm	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	30	40	300

[2] Mitchell - pag. 20

TABLE 4 — *Distribution of trace elements in the constituent minerals of an igneous rock, illustrated by a hypersthene olivine gabbro from E. GREENLAND*

	In ppm			Total from Minerals	Found in Rock
	Constituent Minerals				
	Plagioclase	Pyroxene	Olivine		
Ga	55	3	3	28	23
Cr	<1	350	<1	100	175
V	10	250	<5	75	225
Mo	<1	2	10	2	<1
Li	4	2	3	3	2
Ni	<2	150	350	120	135
Co	<2	50	125	40	55
Cu	40	35	20	35	80
Sc	<10	30	<10	8	20
Zr	<10	50	<10	14	35
Mn	<10	2100	1700	940	700
Sr	2000	<10	10	950	700
Ba	110	5	5	60	25

TABLE 5 — *Relative stability of the commoner minerals of igneous rocks and the trace elements with which they are associated*

Stability	Mineral	Major Constituents	Trace Constituents
Easily Weathered	Olivine	Mg, Fe, Si	Ni, Co, Mn, Li, Zn, Cu, Mo
	Hornblende	Mg, Fe, Ca, Al, Si	Ni, Co, Mn, Sc, Li, V, Zn, Cu, Ga
	Augite	Ca, Mg, Al, Si	Ni, Co, Mn, Sc, Li, V, Zn, Pb, Cu, Ga
	Biotite	K, Mg, Fe, Al, Si	Rb, Ba, Ni, Co, Sc, Li, Mn, V, Zn, Cu, Ga
	Apatite	Ca, P, F	Rare earths, Pb, Sr
	Anorthite	Ca, Al, Si	Sr, Cu, Ga, Mn
	Andesine	Ca, Na, Al, Si	Sr, Cu, Ga, Mn
	Oligoclase	Na, Ca, Al, Si	Cu, Ga
	Albite	Na, Al, Si	Cu, Ga
	Garnet	Ca, Mg, Fe, Al, Si	Mn, Cr, Ga
Moderately Stable	Orthoclase	K, Al, Si	Rb, Ba, Sr, Cu, Ga
	Muscovite	K, Al, Si	F, Rb, Ba, Sr, Ga, V
	Titanite	Ca, Ti, Si	Rare earths, V, Sn
	Ilmenite	Fe, Ti	Co, Ni, Cr, V
	Magnetite	Fe	Zn, Co, Ni, Cr, V
	Tourmaline	Ca, Mg, Fe, B, Al, Si	Li, F, Ga
	Zircon	Zr, Si	Hf
Very Stable	Quartz		

TABLE 6 — *Deposition of sedimentary rocks with their associated trace elements*

Process of Sedimentation	Major Constituents	Type of Product	Main Rock Types	Associated Trace Constituents
Si	Si	Resistates	Sandstones	Zr, Ti, Sn Rare earths, Th Au, Pt, etc.
Al		Hydrolizates	Shales and bituminous shales	V, U, As, Sb, Mo, Cu, Ni, Co Cd, Ag, Au, Pt, B, Se
Si			Bauxites	Be, Ga, Nb, Ti
K				
Fe	Mn	Oxidates	Iron ores	V, P, As, Sb, Se
			Manganese ores	Li, K, Ba, B, Ti, W, Co, Ni, Cu, Zn, Pb
Ca		Carbonates	Limestones dolomites	Ba, Sr, Pb, Mn
Mg				
Fe				
K		Evaporates		
Na				B, I
Ca				
Mg				
Na	Mag	Sea		B, I, Al, F, Ba, Rb, Li

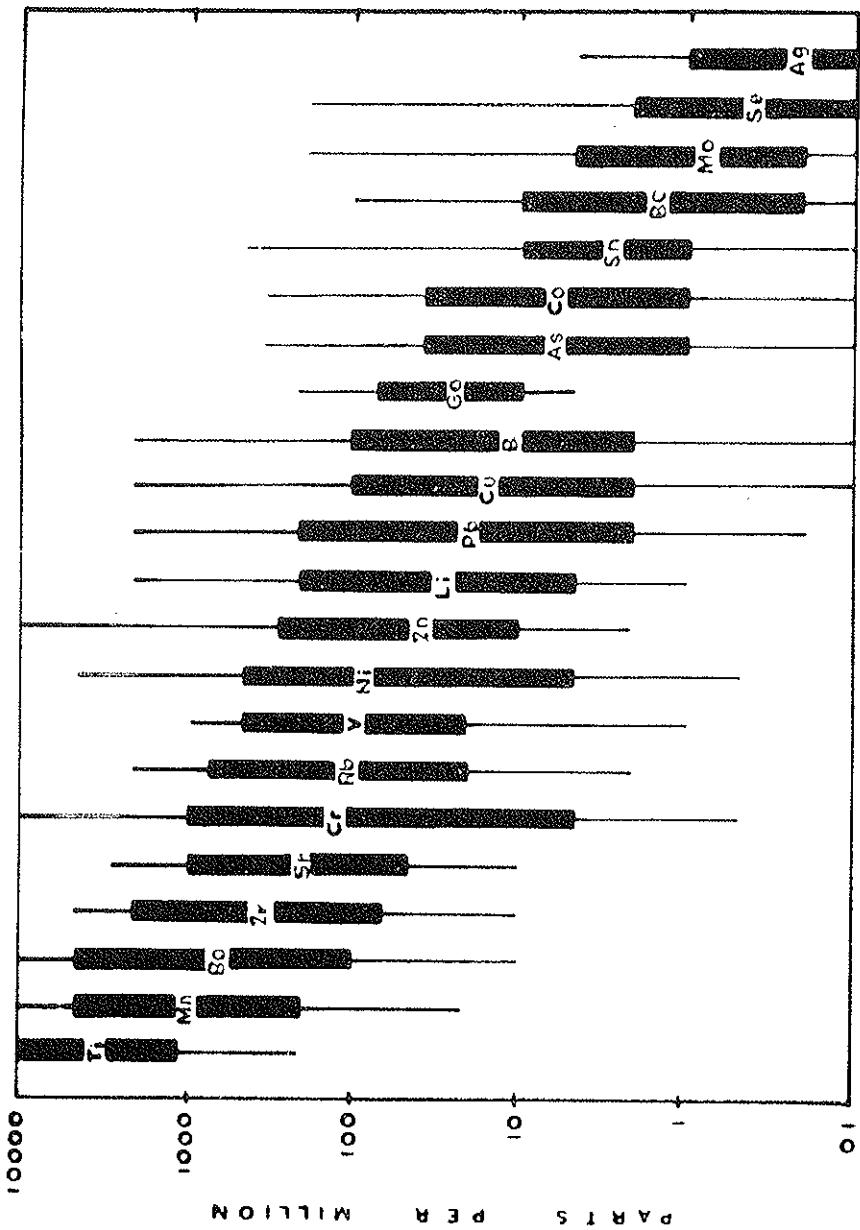


FIG. 1 — The range of contents of some trace elements commonly found in mineral soils. Thin lines indicate more unusual values; certain extremely high contents reported from abnormal localities influenced, for instance, by ore deposits have been ignored.

TABLE 7 — Total contents of trace elements in some scottish soils

	In ppm						Silurian Shale	Sandstone Old Red
	Serpentine	Olivine Gabbro	Andesite	Granite	Granitic Gneiss	Quartz Mica Schist		
Ag	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Ba	1000	2000	600	2000	3000	1500	500	1000
Be	<5	<5	<5	<5	5	5	<5	<5
Co	80	40	8	<2	10	25	20	2
Cr	3000	300	60	5	200	150	200	60
Cu	20	40	10	<10	25	100	10	<5
Ga	30	50	30	25	70	40	20	15
La	<30	<30	25	30	200	100	50	100
Li	30	30	50	7	70	200	60	20
Mn	3000	5000	800	700	1000	3000	1000	500
Mo	1	2	<1	<1	<1	5	<1	<1
Ni	800	50	10	10	40	80	40	15
Pb	20	20	40	20	70	80	20	40
Rb	60	70	30	600	500	200	250	100
Sc	<10	10	<10	<10	<10	10	15	<10
Sn	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
Sr	300	700	60	300	700	150	70	100
V	100	200	100	20	250	200	200	60
Y	50	30	30	30	80	100	70	60
Zr	1000	300	250	>1000	800	>1000	300	1000

TABLE 8 — *Effect of liming on the uptake of trace constituents by red clover*
ppm even-dry matter

Soil pH	Co	Ni	Mo	Pb	Sn	Zn	Ti	V	Cr	Cu	Ba	Sr	Fe	Mn
5.4	0.26	2.02	0.31	2.4	0.2	61	1.5	0.10	0.12	12.5	64	92	68	56
6.1	0.20	1.40	1.60	2.0	0.1	44	1.6	0.09	0.12	14.0	42	74	71	42
6.4	0.16	1.04	1.78	2.6	0.2	51	1.7	0.12	0.17	13.0	46	85	65	25

TABLE 9 — *Trace elements in a mixed pasture herbage and three of its constituent species*

ppm oven-dry matter

	Co	Ni	Mo	Pb	Sn	Ti	V	Cr	Cu	Ba	Sr	Fe	Mn	
Mixed . . .	0.16	1.74	0.49	2.1	0.4	38	3.1	0.14	0.17	9.9	24	19	91	95
Cocksfoot . .	0.14	0.93	0.53	1.9	0.3	25	1.1	0.07	0.12	5.8	6	6	45	101
Rye Grass . .	0.20	1.38	0.32	1.8	0.3	33	2.3	0.11	0.12	6.0	24	12	50	59
Red Clover . .	0.26	2.82	0.35	2.3	0.4	92	2.2	0.12	0.14	17.5	50	66	88	56

Cocksfoot — Dactylis glomerata

Rye Grass — Lolium perenne

Red Clover — Trifolium pratense

TABLE IO — *Trace elements extracted by 2.5% acetic acid from a podzol profile developed on rhyolitic lava parent material*

	ppm oven-dry matter								
	Co	Ni	Fe	Al	Cr	V	Mo	Ti	Pb
A ₀ F	0.16	0.43	15	285	0.04	0.04	<0.02	<0.04	1.3
A ₀ H	0.30	0.86	20	390	0.06	0.05	<0.03	<0.06	1.2
A ₁ -A ₂	0.07	0.30	30	1785	0.53	0.72	<0.05	3.5	<0.2
B ₁	<0.09	0.14	940	2250	0.83	0.05	<0.09	0.51	<0.2
B ₂	0.31	0.09	60	3060	0.68	0.07	<0.06	0.22	<0.2
B ₃	0.28	0.29	55	4120	0.34	0.18	<0.08	1.3	<0.2

TABLE II — Trace Elements Extracted by 2.5% Acetic Acid and Neutral Normal Ammonium Acetate from Profiles Developed on Basic Igneous (Olivine Gabbro) Parent Material

In ppm oven-dry matter									
Depth, in	Co	Ni	Fe	Al	Cr	V	P	Mn	Mn
WELL-DRAINED PROFILE									
0-8	HAc	1.3	20	2500	0.24	0.15	3	<0.05	0.13
	NH ₄ Ac	0.04	<5		0.03	0.01		0.02	0.84
12-15	HAc	0.36	20	4600	0.43	<0.09	10	<0.09	0.21
	NH ₄ Ac	0.02	<5		<0.01	<0.01		<0.01	0.10
16-20	HAc	0.31	15	3600	0.25	<0.07	41	<0.07	0.28
	NH ₄ Ac	0.01	<5		<0.01	<0.01		<0.01	0.10
20-30	HAc	0.14	15	3300	0.25	<0.06	162	<0.06	0.17
	NH ₄ Ac	0.01	<5		<0.01	<0.01		<0.01	0.21
36-40	HAc	0.15	15	1500	0.05	0.03	218	<0.03	0.16
	NH ₄ Ac	0.02	5		<0.01	<0.01		<0.01	0.16
VERY POORLY DRAINED PROFILE									
0-6	HAc	1.5	4.1	25	550	0.18	1.2	3	<0.02
	NH ₄ Ac	0.08	0.22	<5		<0.01	0.02		0.63
9-12	HAc	2.5	4.2	500	840	0.14	3.8	51	<0.02
	NH ₄ Ac	0.37	0.44	5		<0.01	0.03		3.3
14-18	HAc	2.2	6.7	20	475	0.25	1.1	4	<0.05
	NH ₄ Ac	0.37	0.59	<5		<0.01	0.04		1.4
24-29	HAc	2.1	3.9	75	410	0.14	1.7	203	<0.05
	NH ₄ Ac	0.76	1.1	<5		<0.01	0.04		0.05
36-40	HAc	18	22	2500	765	0.32	1.7	58	<0.02
	NH ₄ Ac	13	15	<5		<0.01	0.02		<0.01
Total		40	70	(5%) (10%)	200	200	2000	1-2	40
									6000

[2] Mitchell - pag. 29

TABLE I2 — *Total contents of trace elements in three horizons of a deep peat*

Dry-matter basis											
Depth in. in.	Ash %	Co ppm	Ni ppm	Mo ppm	Fe ppm	Pb ppm	Sn ppm	Zn ppm	V ppm	Ti ppm	Cr ppm
6-18	2.3	0.3	2.3	0.6	580	4	<1	10	1.6	95	0.5
42-54	2.9	2.1	5.8	13.5	1400	9	<1	105	21.1	160	8.1
102-114	4.9	1.9	8.2	1.4	5210	<10	<1	<50	5.3	204	1.9
									<0.1	<0.1	<0.1
									6.3	2.5	9
									11.2	10	12
									7.8	11.5	11
									46	5	
										Ba ppm	Sr ppm

SELECTED BIBLIOGRAPHY

- GOLDSCHMIDT V. M. (edited by A. MUIR), *Geochemistry*, pp. 730. Oxford, Clarendon Press, 1954.
- JACKSON M. L. and SHERMAN G. D., *Chemical Weathering of Minerals in Soils*. « Advances in Agron. », 5, 219-318 (1953).
- MASON B., *Principles of Geochemistry*, pp. 276. New York, John Wiley & Sons Inc., 1952.
- MITCHELL R. L., *Trace Elements in A.C.S. Monograph No. 126. Chemistry of the Soil*, pp. 253-285. New York, Reinhold Publishing Corp., 1955.
- RANKAMA K. and SAHAMA T. G., *Geochemistry*, pp. 912. Chicago, University of Chicago Press, 1950.
- SWAINE D. J., *The Trace Element Content of Soils*. « Commonwealth Bur. Soil Sci. Tech. Commun. », 48, in press.
- SWAINE D. J. and MITCHELL R. L., *Trace Element Distribution in Soil Profiles*. « J. Soil Science », in preparation.
- WAGER L. R. and MITCHELL R. L., *The distribution of trace elements during strong fractionation of basic magma - a further study of the Skærgaard Intrusion, East Greenland*. « Geochim. et cosmoch Acta », 1, 129-208 (1951).
- WINOGRADOW A. P., *Geognomie seltener und nur in Spuren vorhandener chemischer Elemente im Boden*, pp. 250. Berlin, Akademie-Verlag, 1954.

DIE UMFORMUNG DES MANGANS IM BODEN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER WITTERUNG

W. LAATSCH

1.) DIE MANGANVERSORGUNG DES HAFERS UND DES WEIDEFUTTERS IN SCHLESWIG-HOLSTEIN

In den letzten Jahren haben meine Mitarbeiter E. KOSEGARTEN [1], J. WEHRMANN [2] und A. FINCK [3-4], im Institut für Pflanzernährung und Bodenkunde der Universität Kiel Untersuchungen über das Mangan in Böden Schleswig-Holsteins ange stellt. Über ihre Ergebnisse soll im folgenden berichtet werden.

Wir interessierten uns in Kiel für die Manganernährung der Weidepflanzen und des Hafers in Abhängigkeit von den Bodeneigenschaften und von der Witterung. Untersucht wurden vor allem die lehmigen Braunerden der Jungmoränen, die sandigen Podsole des Mittelrückens und einige Niedermoorböden.

Die Mangangehalte des Weidefutters auf Podsolböden sind um so höher, je grösser der Mangangehalt, die Wasserstoffionenkon zentration und der Humusgehalt des Bodens sind. Auf stark sauren, humusreichen Podsolböden wurden in der Trockensubstanz des Weidefutters häufig über 400 ppm Mangan gefunden. Demgegen über liegt der Mangangehalt des Weidefutters auf den lehmigen Braunerden viel niedriger — im Durchschnitt bei 60 ppm —, obschon die Braunerden viel mehr Gesamt mangan als die Podsole besitzen. Ausschlaggebend für dieses schwache Manganangebot sind der niedrige Humusgehalt (2-3%) und die niedrige Wasserstoffionenkonzen-

tration (pH in KCl: 5-6) der Braunerde-Weideböden. Die vorliegenden Messungen sprechen jedoch dafür, dass selbst im gleichen pH-Bereich von 5-6 das Weidefutter der sandigen Podsole oft manganeseicher als dasjenige der lehmigen Braunerden ist. Diese Tendenz ist erstaunlich, weil im pH-Bereich von 6-7 auf den Podsoläckern häufig Manganmangel des Hafers beobachtet werden kann, auf den lehmigen Braunerden jedoch nicht.

Wir müssen uns deshalb fragen, wie die stets ausreichende Manganversorgung des Hafers im schwach sauren bis neutralen Reaktionsbereich der lehmigen Braunerde zu erklären ist, und warum die Podsoläcker trotz durchschnittlich höheren Humusgehaltes im gleichen Reaktionsbereich häufig versagen.

Die Mangangehalte des Hafers sind auch auf der Braunerde stark vom pH-Wert des Bodens abhängig. In den Mittelblättern mass A. FINCK [3] nach dem Schossen

bei pH 6,9 des Bodens (*)	20	ppm Mn
» » 5,7 » 	65	» »
» » 5,0 » 	180	» »

Als Grenzwert, der die 45 cm hohen gesunden Haferpflanzen von den ebenso hohen kranken Manganiangelpflanzen trennt, ergab sich jedoch ein Mangangehalt vor nur 17,5 ppm. Er wird zwar auf den schwach sauren Podsolen erreicht und bisweilen sogar stark unterschritten, nicht aber auf den lehmigen Braunerden. Trotz mässiger Manganversorgung des Hafers, die sich mitunter nur wenig über dem Grenzwert für Manganmangel-Symptome bewegt, konnte eine sehr gleichmässige, stetige Manganernährung auf der Braunerde festgestellt werden. Auf den sandigen Podsolen und auch auf den Niedermooren schwankt die Mangananlieferung nach den Untersuchungen von E. KOSEGARTEN dagegen sehr stark mit der Witterung. Dieses Ergebnis erklärt auch das sehr ungleichmässige Auftreten der Dörrfleckenkrankheit (grey speck disease) im Podsol- und Niedermoorgebiet.

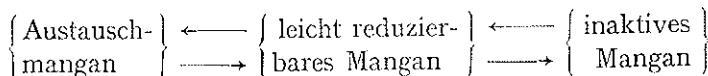
(*) Sämtliche pH-Messungen der Bodensuspensionen wurden in 1n KCl-Lösung durchgeführt.

Die untersuchten Manganfraktionen. Um die Unterschiede in der Mangananlieferung zwischen Braunerde und Podsol näher zu klären, mussten wir uns ein möglichst genaues Bild von den pflanzenverfügbaren Manganmengen im Laufe der Vegetationszeit machen. Leider lässt sich die jeweilig im Boden befindliche, pflanzenaufnehmbare (=verfügbare) Manganmenge nicht messen. Verfügbar sind sicherlich zu einem grossen Teil die *austauschbar* gebundenen Mangan (II)-ionen. EPSTEIN und STOUT [5] konnten durch Modellversuche mit Bentonit zeigen, dass der Mangangehalt der Pflanzen mit der Zunahme des *Austauschmangans* ansteigt. Marie LÖHNIS [6] und HEINTZE [7] wiesen auf Manganvergiftungen empfindlicher Kulturpflanzen auf Böden mit viel Austauschmangan hin.

Aber auch die mit Hydrochinon nach JONES und LEEPER [8] reduzierbaren Manganoxyde, das sogenannte *leicht reduzierbare Mangan*, sind nach den Untersuchungen dieser Autoren bis zu einem gewissen Grade pflanzenverfügbar.

Wir haben deshalb die jeweiligen Gehalte des Bodens an Austauschmangan und an leicht reduzierbarem Mangan als relative Maßstäbe für die Verfügbarkeit angesehen. Die Summe beider Fraktionen wird *aktives Mangan* genannt. Tatsächlich ermittelt man im Labor nach der Methode von JONES und LEEPER das aktive Mangan und durch eine weitere Untersuchung das Austauschmangan durch Ausschüttelung mit Calciumnitrat nach HEINTZE [7]. Die Differenz zwischen der gefundenen Menge an aktivem Mangan einerseits und derjenigen an Austauschmangan andererseits ist das leicht reduzierbare Mangan.

In verschiedenen Weideböden hat E. KOSEGARTEN [1] den Gehalt an diesen Manganfraktionen während der Vegetationszeit des Jahres 1953 immer wieder gemessen, um auf diese Weise sowohl von den Schwankungen der Gehalte als auch vom Ausmass der Umformung



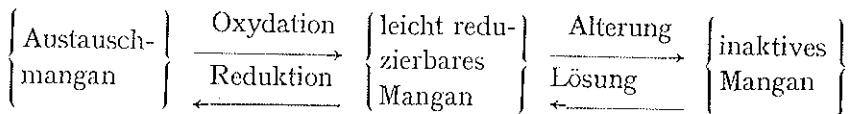
eine Vorstellung zu bekommen. Die Ergebnisse dieser Messungen sollen im folgenden beschrieben werden.

2.) DIE ÄNDERUNGEN DES MANGANZUSTANDES AUF HUMÜSREICHEM PODSOL

Der untersuchte Podsol-Sandboden besass in der Krume bei einem pH-Wert von 4,5 16% Humus und 166 ppm Gesamt-Mangan. Sein Gehalt an aktivem Mangan sank vom Ende des Winters bis zum Schluss der Messperiode (Ende Oktober) von 125 ppm auf 50 ppm. Im November oder Dezember haben wir wieder einen Anstieg zu erwarten weil der Boden dann bis zur Wasserkapazität mit Wasser gesättigt ist und den Winter hindurch gesättigt bleibt. Durch Bodenkälte und die Winterfeuchtigkeit kann in diesem Boden also der Gehalt an aktivem Mangan so stark ansteigen, dass er rund 3/4 des Gesamt-mangangehaltes ausmacht.

Der Rückgang des Gehaltes an aktivem Mangan während der Vegetationszeit vollzieht sich nicht gleichmäßig. Vielmehr erzeugt jede regenfreie bzw. regenarme Periode eine starke Senkung, jede ausgeprägte Regenperiode einen erneuten, wenn auch nicht so starken Anstieg der Konzentration an aktivem Mangan. Diese Schwankungen entsprechen gleichsinnigen, jedoch viel ausgeprägteren Änderungen des Gehaltes an Austauschmangan, d.h. jede untersuchte regenarme Periode ruft eine Oxydation des zweiwertigen Austauschmangans zu höherwertigen Oxyden hervor, ein Befund, den auch andere Autoren machen konnten.

Das Verschwinden von Austauschmangan in Schönwetterperioden ist im allgemeinen von einem Anstieg des Gehaltes an leicht reduzierbarem Mangan begleitet, d.h. die durch Oxydation der Mangan(II)-ionen gebildeten drei- und vierwertigen Mangan-oxyde sind zunächst so feindispers, dass sie durch Hydrochinon leicht reduziert werden können. Da aber nicht nur Austauschmangan in jeder kürzeren Trockenzeit verschwindet, sondern auch die Summe aus Austauschmangan und leicht reduzierbarem Mangan (d.h. das aktive Mangan) abnimmt, muss gleichzeitig ein Teil des leicht reduzierbaren Mangans durch Alterung ausfallen und in den inaktiven Zustand übergehen. Die Gleichgewichte:



verschieben sich also nach rechts. Jede starke Bodendurchfeuchtung bewirkt dagegen eine nach links gerichtete Gleichgewichtsverlagerung, d.h. eine Lösung und Reduktion der höheren Manganoxyde.

Bei den Redox-Reaktionen handelt es sich um dynamische Gleichgewichte. Oxydation und Reduktion des Mangans laufen im Boden gleichzeitig nebeneinander ab. Auf Grund von Modelluntersuchungen, die noch beschrieben werden, konnte E. KOSEGARTEN feststellen, dass starke Bodenatmung ein Überwiegen der Oxydation hervorruft. Eine Unterdrückung der Mikroorganismentätigkeit und damit der Atmung durch Teilsterilisation mit Natriumazid ist dagegen von einem Rückgang der Oxydation und einer Förderung der Reduktion begleitet.

Die Oxydation der Mangan(II)ionen scheint nach diesen Ergebnissen im humusreichen Podsol durch Mikroorganismen induziert zu werden, so wie das auch GERRETSEN [9], PRINGSHEIM [10], BROMFIELD und SKERMAN [11], DION und MANN [12] und HEMSTOCK [13] in den von ihnen untersuchten Böden fanden. Der hohe Gehalt des Bodens an Austauschmangan in den Wintermonaten ist dann verständlich; denn die niedrigen Bodentemperaturen ermöglichen keine starke Mikroorganismen-Aktivität. Eine kurze regenfreie Periode ist in der Vegetationszeit häufig mit einer starken Erwärmung des Bodens gekoppelt. Das begünstigt die Mikrobenaktivität und damit die Oxydation des Austauschmangans.

Die Vegetationsperiode des Jahres 1953 brachte keine extremen Trockenperioden, so dass es niemals zu einer *starken* Bodenaustrocknung kam. So erklärt sich das zeitliche Zusammenfallen zwischen kurzer, warmer Trockenzeit und überwiegender Oxydation.

Das *Einsetzen neuer Niederschläge* nach den Trockenperioden bewirkt stets eine Zunahme des Austauschmangans genau so wie eine Anfeuchtung lufttrockener Bodenproben im Laboratorium. Noch während einer Regenzeit kann die Mangan(II)ionen-Konzentration jedoch wieder absinken, wenn es sich um *warme* Regenperioden wie Anfang April und Ende Mai-Anfang Juni des Jahres 1953 handelt. Dass auch bei diesem Phänomen eine Gesetzmässigkeit vorliegt, konnte durch Modellversuche im Laboratorium bestätigt werden.

3.) EINFLUSS DER BODENBESCHAFFENHEIT AUF DAS AUSMASS DER MANGANUMFORMUNGEN

Niedermoorböden, Podsole und Braunerden mit pH-Zahlen über 5,5 enthalten in Schleswig-Holstein während der Vegetationszeit nur 0-5 ppm, also nur verschwindend geringe Mengen an Austauschmangan. Da die pH-Zahlen der Braunerden über 5,0, meistens sogar über 5,5 liegen, sind die Kulturpflanzen auf diesen Standorten in erster Linie auf die Verwertung von leicht reduzierbarem Mangan angewiesen. Nach den relativ geringen Mangangehalten der Pflanzen auf den Braunerden zu urteilen, ist das leicht reduzierbare Mangan bei weitem nicht so verfügbar wie das Austauschmangan. Die auffallend gleichmässige Versorgung der Braunerde-Pflanzen ist erklärlich, weil das leicht reduzierbare Mangan in diesen Böden nur sehr geringen Schwankungen unterliegt. So lag der Gehalt an leicht reduzierbarem Mangan in der obersten, 0-5 cm mächtigen Lage der Braunerde von Probsteierhagen (pH 6,2) in der Messperiode d.J. 1953 zwischen 54 und 72 ppm. Im gleichen Zeitraum wurden in der entsprechenden Lage des Niedermoorbodens Warleberg I Konzentrationen zwischen 35 und 202 ppm beobachtet. Vielleicht haften die leicht reduzierbaren Manganoxyde in der lehmigen Braunerde an der Oberfläche der Tonmineralien und werden dadurch vor schneller Alterung und Inaktivierung weitgehend geschützt.

In der Vegetationszeit ist der Gehalt an leicht reduzierbarem Mangan in den mässig sauren Podsolen und Niedermoorböden grösser als derjenige des Austauschmangans. Bei stark saurer Reaktion (pH 4,5) herrscht dagegen das Austauschmangan vor.

Die Konzentrationsschwankungen sind im Wechsel der Witterung um so grösser, je niedriger die pH-Zahl und je höher der Humusgehalt ist.

4.) DER EINFLUSS DER LUFTTROCKNUNG

Um den Einfluss extremer Austrocknung unter kontrollierten Bedingungen zu studieren, wurden Bodenproben der Versuchsfelder im Laboratorium der Lufttrocknung ausgesetzt. In Übereinstim-

mung mit den Versuchsergebnissen von BOGEN [14] und von FUJIMOTO und SHERMAN [15] konnte E. KOSEGARTEN zeigen, dass das Austauschmangan während der lufttrockenen Lagerung zunimmt und zwar auf Kosten des leicht reduzierbaren Mangans. Auch wir deuten diesen Vorgang als Disproportionierung von aktivem, dreiwertigen Manganoxyd in Mangan(II)ionen und vierwertiges Manganoxyd.

Die Zunahme des Austauschmangans ist um so anhaltender und kräftiger, je saurer und humusreicher die Bodenprobe ist. Während die Zunahme an Austauschmangan während der lufttrockenen Lagerung in einer Braunerde schon nach 8 Tagen zum Stillstande kommt, war sie in einer Niedermoorprobe auch nach 6 Wochen noch nicht beendet. Eine besondere Eigenart zeigen die humusarmen Podsole. In ihnen steigt der Gehalt an Austauschmangan während der lufttrockenen Lagerung zunächst an, um dann wieder zu sinken und zwar auf einen um so kleineren Wert, je niedriger die Wasserstoffionenkonzentration ist. Das wahrscheinlich durch Disproportionierung entstandene Austauschmangan wird also bei längerer Trockenlagerung wieder oxydiert. Die beobachtete Oxydation dürfte ohne den Einfluss mikrobieller Aktivität ausschliesslich durch den Luftsauerstoff hervorgerufen werden.

Diese Feststellung hat sicher auch für den gewachsenen Boden eine Bedeutung, weil gerade die humusarmen Podsole in Trockenzeiten besonders stark austrocknen, so dass Disproportionierung und Autoxydation auch in der Ackerkrume eine Rolle spielen. Die Austrocknung dieser Böden bei relativ hohen pH-Zahlen wirkt sich ja erfahrungsgemäss am ungünstigsten auf die Manganversorgung der Pflanzen aus.

5.) DER EINFLUSS DER WIEDERBEFEUCHTUNG LUFTTROCKENER BODENPROBEN

Werden lufttrockene Proben der im Felde untersuchten Böden befeuchtet und bei 25° im Laboratorium feucht gelagert, so nimmt der Gehalt an Austauschmangan kurzfristig zu und sinkt darauf unter den Gehalt, der in der lufttrockenen Probe gemessen wurde. Das leicht reduzierbare Mangan verhält sich dabei ebenso wie im

gewachsenen Boden invers. Mit dem Austauschmangan steigt bei der Wiederbefeuchtung in allen Bodenproben auch der Gehalt an aktivem Mangan an und zwar länger als das Austauschmangan, um dann ebenfalls abzusinken, trotz gleichbleibenden Wassergehaltes. Eine gewisse, wenn auch sehr geringe Alterung des leicht reduzierbaren Mangans findet also auch bei gleichbleibender Feuchtigkeit statt.

Die Umkehr von der überwiegenden Reduktion zur überwiegenden Oxydation tritt auch noch bei relativ hohen Wassergehalten ein. Wenn jedoch alle Poren der Bodenproben mit Wasser gefüllt sind, so setzt anhaltende, energische Reduktion ein.

E. KOSEGARTEN hat auch Proben aus den B-Horizonten der Lufttrocknung und Wiederbefeuchtung ausgesetzt. Sowohl in den B-Horizonten der untersuchten Braunerden als auch der Podsole war im Verhältnis zum A-Horizont sehr wenig Humus enthalten. Es befand sich in diesen Proben kein Austauschmangau. Nur rund 2% vom Gesamtmanagan lag in leicht reduzierbarer Form vor. Weder die lufttrockene Lagerung noch die Wiederbefeuchtung bewirkten nennenswerte Veränderungen des Manganzustandes. Diese Stabilität ist verständlich, weil weder genug organische, die Reduktion begünstigende Stoffe noch genug Mikroorganismen zur Förderung der Oxydation in den Proben enthalten waren. Schliesslich lag auch nicht genug leicht reduzierbares Mangan für eine merkliche Disproportionierung während der lufttrockenen Lagerung vor.

6.) MODELLVERSUCHE ZUR KLÄRUNG DER URSACHEN DER REDOX-REAKTIONEN

MANN und QUASTEL [16] konnten zeigen, dass die Kinetik der Mangan-Oxydation in neutralen Böden ganz oder fast vollständig durch proliferierende Mikroorganismen hervorgerufen wird; denn sie fanden, dass die optimale $MnSO_4$ -Konzentration für schnelle Oxydation im Boden nur 0,02 molar ist. Oberhalb erfolgt ein schneller Rückgang der Oxydationsgeschwindigkeit, der durch Hemmung der oxydierenden Mikroorganismen verursacht sein dürfte. Eine Hemmung der mikrobiellen Oxydation konnten sie auch durch eine 0,001 molare Natriumazidlösung erzielen. Das NaN_3 hemmt nach

ihren Untersuchungen die biologische Oxydation weit mehr als die biologische Reduktion. Zu entsprechenden Ergebnissen führte auch die Teilsterilisation mit NaN_3 in den von E. KOSEGARTEN angesetzten Versuchen. Er ermittelte nach dem Zusatz von Natriumazid zum feuchten Boden nicht nur den Verlauf der Redox-Reaktionen sondern gleichzeitig die CO_2 -Produktion der Bodenproben als Mass für ihre biologische Aktivität. In A-Horizontproben konnte durch 0,001 mol. NaN_3 nur eine vorübergehende Teilsterilisation erzielt werden. A-Horizontmaterial aus einer Braunerde zeigte bereits 6 Tage nach dem Azidzusatz die gleiche tägliche CO_2 -Produktion, die in der nicht behandelten Parallelprobe gemessen werden konnte.

Während diese Parallelprobe die ganze Untersuchungszeit hindurch nur rund 2 ppm Austauschmangan besass, stieg die Konzentration der Mangan(II)ionen in der mit NaN_3 versetzten Probe in der ersten 4 Tagen auf 18 ppm an, um vom 6. Tage, das heisst nach dem Aufhören der Azidwirkung, wieder zu sinken und am 9. Tage den Wert der nicht behandelten Probe (= 2 ppm) zu erreichen. Während das Azid also die Reduktion begünstigt, verschiebt sich das Gleichgewicht nach dem Aufhören seiner Wirkung zu Gunsten der Oxydation. Entsprechende, aber viel stärkere und anhaltendere Ausschläge erzielt man mit höheren Azidkonzentrationen. Die Manganoxydation steigt und fällt mit der Bodenatmung.

Es wurde auch B-Horizontmaterial der Braunerde den gleichen Bedingungen unterworfen. In diesem Material war am Versuchsbeginn kein Austauschmangan und nur 8 ppm leicht reduzierbares Mangan enthalten. Während der Versuchsdauer liess sich eine völlige Unterbindung der CO_2 -Produktion durch 0,01 mol NaN_3 erzielen, wahrscheinlich wegen des geringen Gehaltes an Mikroorganismen. Nach einer Woche war das gesamte leicht reduzierbare Mangan der sterilisierten Proben zu Austauschmangan reduziert worden. Diese Reduktion wird wohl durch organische Stoffe hervorgerufen, die im B-Horizont in geringen Mengen enthalten sind. MANN und QUASTEL [16] haben gezeigt, dass sowohl reduzierende Bakterien als auch organische Stoffe wie Polyphenole die Manganoxyde reduzieren können.

Zusatz von 60 ppm Mn als Mangansulfat. Wenn Mikroorganismen die Manganoxydation bewirken, so müsste zugesetztes Mangan(II)sulfat in Proben des A-Horizontes schneller als in denjenigen des B-Horizontes oxydiert werden. Das ist nach den Messungen von E. KOSEGARTEN an Bodenproben einer Braunerde auch der Fall. Setzt man noch NaN_3 hinzu, so wird im A-Horizont zunächst bodeneigenes Mangan reduziert, solange die Mikroorganismentätigkeit stark gestört ist. Im B-Horizontmaterial tritt völlige Sterilisation ein. Deshalb bleibt alles zugesetzte Mangan(II)sulfat unverändert erhalten.

Zusatz von leicht reduzierbarem Manganoxyd. Zu A- und B-Horizontproben einer Braunerde wurde ein Manganoxydpräparat hinzugesetzt, das sich zu 1/5 als leicht reduzierbares Mangan erwies. Jedes Gramm Bodentrockensubstanz erhielt 1 mg Mn. Wurden die so mit Mangan angereicherten Bodenproben bei 25° feucht, jedoch nicht wassergesättigt, gelagert, so verschwand ein Teil des zugesetzten leicht reduzierbaren Mangans durch Reduktion, weil ja jede Befeuchtung lufttrockener Bodenproben zunächst reduzierende Kräfte auslöst. Im B-Horizontmaterial hält das Überwiegen der Reduktionskräfte viel länger an als im A-Horizont. Nach 42-tägiger Lagerung der B-Horizontprobe war etwa die Hälfte des zugesetzten, leicht reduzierbaren Mangananteils in die austauschbare Form verwandelt. Während der weiteren Lagerung ging der Austauschmangangehalt langsam wieder zurück.

In den mit NaN_3 sterilisierten B-Horizontproben konnte man nach 70-tägiger Feuchtlagerung nahezu das gesamte zugesetzte leicht reduzierbare Mangan als Austauschmangan wiederfinden. In diesem Versuch erzielte NaN_3 in 0,01 mol Konzentration genau die gleiche Wirkung wie in 0,001 mol Konzentration. Wenn das Azid bzw. seine Zersetzungprodukte die Reduktion des Mangans hervorriefe, müsste die 0,01 mol Konzentration schneller und energischer gewirkt haben. Es müssen also auch wohl in diesem Versuch organische Stoffe des Bodens, eventuell auch die Fermente der geschädigten Mikroorganismen, Urheber der Manganreduktion sein.

ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNGEN

Die Untersuchungen lehren, dass sich die einzelnen Bodentypen im Witterungsablauf verschieden verhalten. Besonders ungünstig reagiert der humusarme Podsol, wenn er durch Kalk oder kalkhaltige Düngemittel zu weit neutralisiert wird oder scharfer Austrocknung ausgesetzt ist. Besonders stabil erwies sich die Braunerde.

Es ist kaum zu erwarten, dass eine einzige Analysenmethode wie etwa diejenige von JONES und LEEPER stets gute Massstäbe für das sog. pflanzenverfügbare Mangan zu liefern vermag. Durch viele Testversuche am Hafer hat A. FINCK [4] diese Vermutung bestätigt. Die Methode JONES und LEEPER versagt auf lehmiger Braunerde vollständig.

Sicherlich muss das Verhalten der Bodenproben unter genormten Bedingungen mit zur Charakterisierung herangezogen werden.

LITERATURE

- [1] KOSEGARTEN E., *Der Manganhaushalt schleswig-holsteinischer Böden in Abhängigkeit von der Witterung*. « Dissertation Kiel », 1954.
- [2] WEHRMANN J., *Mangan, Kupfer und Kobalt in Pflanzen und Böden schleswig-holsteinischer Weidegebiete*. « Plant and Soil », VI, 61-83 (1955).
- [3] FINCK A., *Mangangehalte dörrfleckenkranker und gesunder Haferpflanzen sowie einiger anderer Feldpflanzen*. « Die Phosphorsäure », 14, 91-103 (1954).
- [4] FINCK A., *Methoden zur Bestimmung des für Hafer verfügbaren Mangans*. « Zeitschr. f. Pflanzenernährg., Düng. u. Bodenkdl. », 67 (112), 198-211 (1954).
- [5] EPSTEIN E. and STOUT P. R., *The Micronutrient Cations Iron, Manganese, Zinc and Copper. Their uptake by plants from the absorbed state*. « Soil Science », 72, 47-65 (1951).
- [6] LÖHNIS M., *Manganese Toxicity in field and market garden crops*. « Plant and Soil », III, 193-222 (1951).
- [7] HEINTZE S. G., *Readily soluble Mn of soils and marsh spot of peas*. « J. agr. Sci. », 27, 177-186 (1938).
- [8] JONES L. H. P. and LEEPER G., *Available Manganese in neutral and alkaline soils*. « Plant and Soil », III, 154-159 (1951).
- [9] GERRETSEN F. C., *Effect of Manganese deficiency in oats in relation to soil bacteria*. « Ann. Bot. », I, 207-230 (1937).
- [10] PRINGSHEIM E. G., *Die Fadenbakterien Sphaerotilus, Leptothrix, Chladothrix und ihre Beziehung zu Eisen und Mangan*. Ref.: « Chemisch. Zentralbl. », 203 (1950) 1, Halbj.
- [11] BROMFIELD S. N. and SKERMAN V. B. D., *Biological oxidation of Manganese in Soils*. « Soil Sci. », 69, 337-348 (1950).
- [12] DION H. A. and MANN P. J. G., *Trivalent Manganese in Soils*. « Journ. Agric. Sci. », 36, 239-245 (1945).
- [13] HEMSTOCK G. A. and LOW P. F., *Mechanisms Responsible for Retention of Manganese in the Colloidal Fraction of Soil*. « Soil Sci. », 76, 331 (1953).
- [14] BOKEN E., *On the Effect of Storage and Temperature on the exchangeable Manganese in Soil*. « Plant and Soil », IV, 154-163 (1953).
- [15] FUJIMOTO C. K. and SHERMAN G. D., *The Effect of Drying, Heating and Wetting on the Level of Exchangeable Manganese in Hawaii on Soils*. « Soil Sci. Soc. Am. Proc. », 10, 107-112 (1945) (publ. 1946).
- [16] MANN P. J. G. and QUASTEL J. H., *Manganese Metabolism in Soils. Agricultural Research Council, Unit of Soil Metabolism*. « Nature », 158, 154-156 (August 1946).

[3] Laatsch - pag. 12

IMPORTANCE OF SOME OLIGOELEMENTS IN NITROGEN FIXING ORGANISMS

ARTTURI I. VIRTANEN

*Laboratory of the Foundation for Chemical Research,
Biochemical Institute, Helsinki, Finland*

It has been known for many years that the growth of aerobic *N₂*-fixing *Azotobacter*, and correspondingly *N₂*-fixation, is notably stimulated by molybdenum (BORTELS [1]). Observations of the same kind have also been made with anaerobic *Clostridium* (BORTELS [1], JENSEN [2]). The problem whether this influence concerns nitrogen fixation or some other reaction in the metabolism of the cell has been much discussed. The results with combined nitrogen as nitrogen source are in this connection of interest. When ammonium-nitrogen is the source of nitrogen no, or a very weak, influence of molybdenum has been detected. When *Azotobacter* grows with nitrate nitrogen some investigators have observed a growth promoting effect of molybdenum, but the effect has not been as strong, and the optimum concentration not the same, as when *N₂* is the source of nitrogen. These results have been regarded to prove that the mode of the action of molybdenum is different with combined and molecular nitrogen, and that molybdenum specifically influences *N₂*-fixation. The effect of molybdenum on leguminous plants with and without root nodules have also led to the conclusion that molybdenum specifically stimulates *N₂*-fixation in nodules, because the molybdenum requirement for optimum symbiotic nitrogen fixation is appreciably greater than the requirement for optimum utilization of nitrate nitrogen (ANDERSON [3]).

The experimental results found in literature elucidating the effect of molybdenum are very discrepant. This discrepancy appa-

rently depends on [1] the fact that the molybdenum concentration of the basal nutrient solution has not been determined, only the added amount of molybdenum being given, and [2] on the fact that the organism used in the experiments has not been impoverished in regard to molybdenum, and [3] that the organism has not been adopted to use nitrate. This circumstance will be dealt with in connection with symbiotic N₂-fixation.

Since information is contradictory about the effect of molybdenum, and also vanadium, on the growth of nitrogen fixing organisms with different nitrogen nutrition, and some pieces of information are even lacking, I have with Mrs. LUNDBOM and Miss ETTALA recently reinvestigated this problem with aerobic and anaerobic N₂-fixers using N₂, NO₃-N, and NH₄-N as nitrogen sources.

The strain of *Azotobacter* used was *A. vinelandii* K obtained from Dr. L. H. JENSEN (Copenhagen) in January 1953. *Clostridium butyricum* was a not nearer characterized strain isolated in our laboratory from garden soil.

Before the experiment both *Azotobacter* and *Clostridium* were cultivated 6-8 times in a basal nutrient solution without addition of molybdenum to lower the molybdenum content of the cells to a minimum. An adaption to nitrate was also performed by cultivating the bacteria many times in nitrate nutrient solution. *Clostridium* could also be cultivated in a mineral nutrient solution without any indefinite additions, as for instance potato extract, when it was found that folic acid is indispensable for the growth of these bacteria [4] (Table 1).

Azotobacter grew in Erlenmayer flasks aerobically in mannitol-mineral nutrient solution, once also with ethanol as energy source, *Clostridium* anaerobically in glucose-mineral-vitamin nutrient solution in flasks placed in vacuum desiccators. These were evacuated, filled with nitrogen gas, and alkaline pyrogallol solution was placed on the bottom of the desiccator. Evacuation and filling with N₂ was repeated twice. Mannitol, resp. glucose were sterilized separately in water solution, and then added to the sterilized mineral solution. Growth temperature for *Azotobacter* was 26° C and for *Clostridium* 30° C. The results appear from the curves in Figs. 1-4.

TABLE I. — Vitamin requirements of *Clostridium pasteurianum*.

Vitamins added to the basal nutrient solution	1. inoculation	2. inoculation	3. inoculation	4. inoculation	5. inoculation	6. inoculation	7. inoculation
1. Folic acid	64	111	156	161	121	122	104
2. Ca-pantothenate	101	100	116	58	0	0	0
3. Pyridoxin	66	79	150	125	107	69	0
4. <i>p</i> -Aminobenzoic acid	72	0	0	0	0	0	0
5. Riboflavine	132	74	0	0	0	0	0
6. Thiamine	110	51	122	104	111	finished	
7. Niacin	62	0	0	0	0	0	0
8. Biotin	61	0	0	0	0	0	0
<i>Combinations:</i>							
1 + 2	110	135	181	187	121	finished	
3 + 4	80	68	72	0	0	0	0
5 + 6	119	0	0	0	0	0	0
7 + 8	68	0	0	0	0	0	0
1 + 2 + 3 + 4	102	130	163	144	124	135	115
5 + 6 + 7 + 8	112	102	115	0	0	0	0
1 + 2 + 3 + 4 + 5 + 6 + 7 + 8	108	116	118	118	118	148	131

4 mg of each of the vitamins 1, 2, 3 and 4, and 20 mg of each of the vitamins 5, 6, and 7, and 10 µg of vitamin 8, were weighed in volumetric flasks and diluted to 100 ml, 20 ml of this solution were put in 1 l nutrient solution.

Molybdenum was determined according to PERRIN [4] in the basal nutrient solution, in CaCO_3 used, in mannitol, in glucose, in nitrate and ammonium sulfate, and in the inoculum. Without addition of molybdenum there was 0.000003% or 0.03 p.p.m., of molybdenum in the nutrient solution of *Azotobacter* (inoculation included), and in that of *Clostridium* correspondingly 0.00002%, or 0.2 p.p.m. Molybdenum was added as Na_2VO_4 . The concentration in our results always denote Mo-, resp. V-concentration.

The dependence of *Azotobacter* with N_2 and nitrate nitrogen on the concentration of molybdenum has in both cases been noticeably similar (Figs. 1 & 2). The optimal molybdenum concentration was very wide, from 0.1 to 10 p.p.m., the maximum possibly at 1 p.p.m. In my opinion we have not to pay any greater attention to slight differences in the optimum since the real uptake of molybde-

num was not determined, and many factors such as e.g. small changes in the pH may cause differences like these.

In corresponding experiments with *Clostridium butyricum* the optimum molybdenum concentration was found to be about the

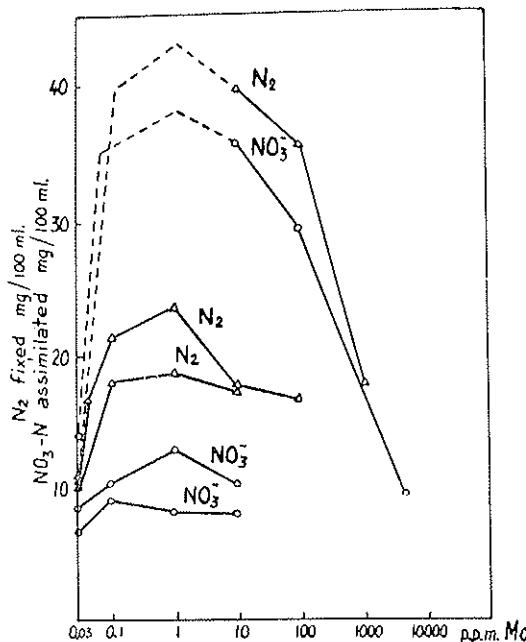


FIG. 1 — Dependence of *Azotobacter vinelandii* on molybdenum concentration. Comparative experiments with N₂ and NO₃-N.

same as with *Azotobacter*, i.e. from 1 to 10 p.p.m., or 0.0001-0.001% both in experiments with N₂ and nitrate (Fig. 2).

The influence of molybdenum on the growth of *Azotobacter* with ammonium nitrogen was weak in such molybdenum concentrations (from 1 to 10 p.p.m.) which in experiments with N₂ and nitrate nitrogen proved to be optimal. This is in accordance with the results obtained by other investigators. When the molybdenum concentration becomes still greater the activating effect increases, and only in such a high molybdenum concentration as 0.1%, or 1000 p.p.m., we found an optimum (Fig. 3). These results sug-

gest that the effect of molybdenum with ammonium nitrogen concerns quite different reactions than with N_2 and nitrate nitrogen. It is, however, uncertain if our experiments with ammonium nitrogen give a correct picture of the real situation, because we have not determined how much molybdenum bacteria have taken from the

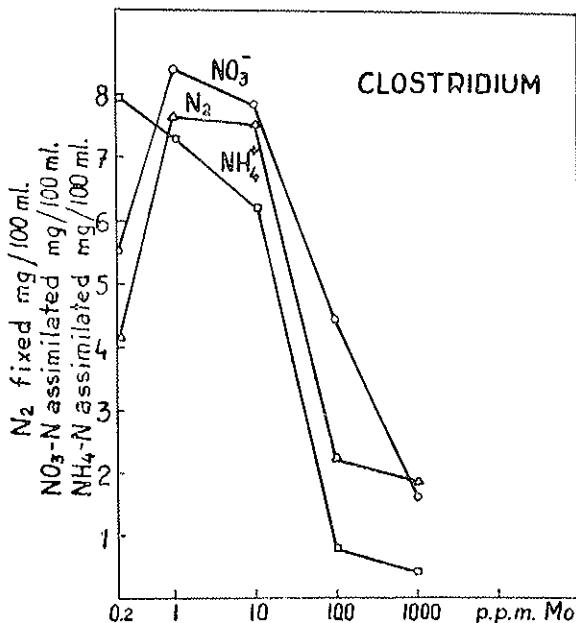


FIG. 2 — Dependence of *Clostridium butyricum* on molybdenum concentration. Comparative experiments with N_2 , NO_3 -N and NH_4 -N.

nutrient solution. Different nitrogen nutrition as well as other differences in the composition of the nutrient solution (NH_4 -N was given as $(NH_4)_2SO_4$, NO_3 -N again as KNO_3) may influence the uptake of molybdenum. Of greatest influence is, however, the acidity of the solution, which tends to rise in experiments with ammonium sulfate. It is necessary in future experiments to estimate not only the molybdenum content of the nutrient solution but also

that of the cells. It is possible that the poor uptake of molybdenum can be the reason for the greater need of it in our experiments with $\text{NH}_4\text{-N}$.

In NH_4 experiments with *Clostridium butyricum* no promoting effect of molybdenum was found in any concentration investigated.

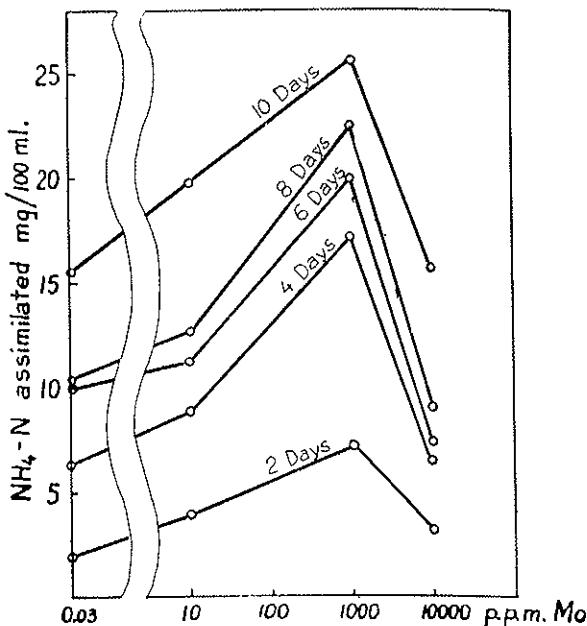


FIG. 3 — Dependence of *Azotobacter vinelandii* on molybdenum concentration. Experiments with $\text{NH}_4\text{-N}$.

Growth decreased continually while molybdenum concentration increased from 0.2 p.p.m. (lowest concentration used) upward (cf. Fig. 3). The doubts I mentioned earlier as to the significance of the results also apply to anaerobic N_2 -fixation.

The influence of vanadium on *A. vinelandii* with N_2 was about 70% of the influence of molybdenum, and with nitrate about 90% in the optimal concentration which was about 0.001% vanadium. With nitrate the optimum was wide, with N_2 narrow (Fig. 4). On the basis of these results it seems possible that vanadium replaces

molybdenum even if the activity of the enzyme is then somewhat lower.

BORTELS [5] and JENSEN [6] have earlier found that vanadium stimulates the growth for *Azotobacter* with molecular nitrogen. BORTELS also studied the influence of vanadium in nitrate nutrient solution but could find no stimulation.

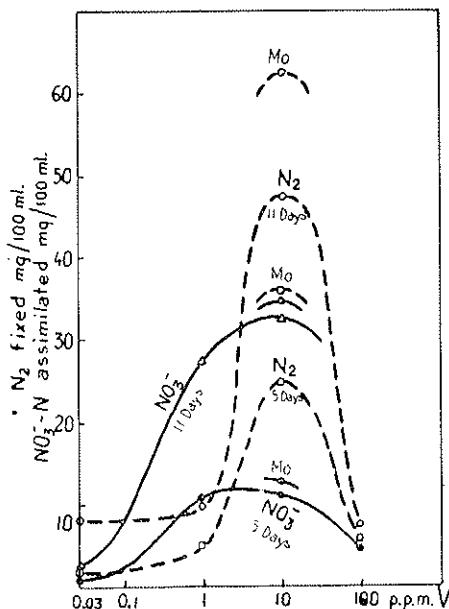


FIG. 4 — Influence of vanadium on *Azotobacter vinelandii*. Comparative experiments with N_2 and NO_3 -N. At the optimal V-concentration (10 p.p.m.) also parallel experiments with Mo.

The results obtained do not give any proof of the specific influence of molybdenum (or vanadium) in N_2 -fixation, and of the different function of it in nitrate assimilation. They do not, however, refute this concept either. As the concentration curves with molybdenum (and vanadium) are noticeably similar both in N_2 and NO_3 -N experiments *molybdo-proteins could be expected to act as well in N_2 -fixation as in the utilization of NO_3 -N*. Several enzymes

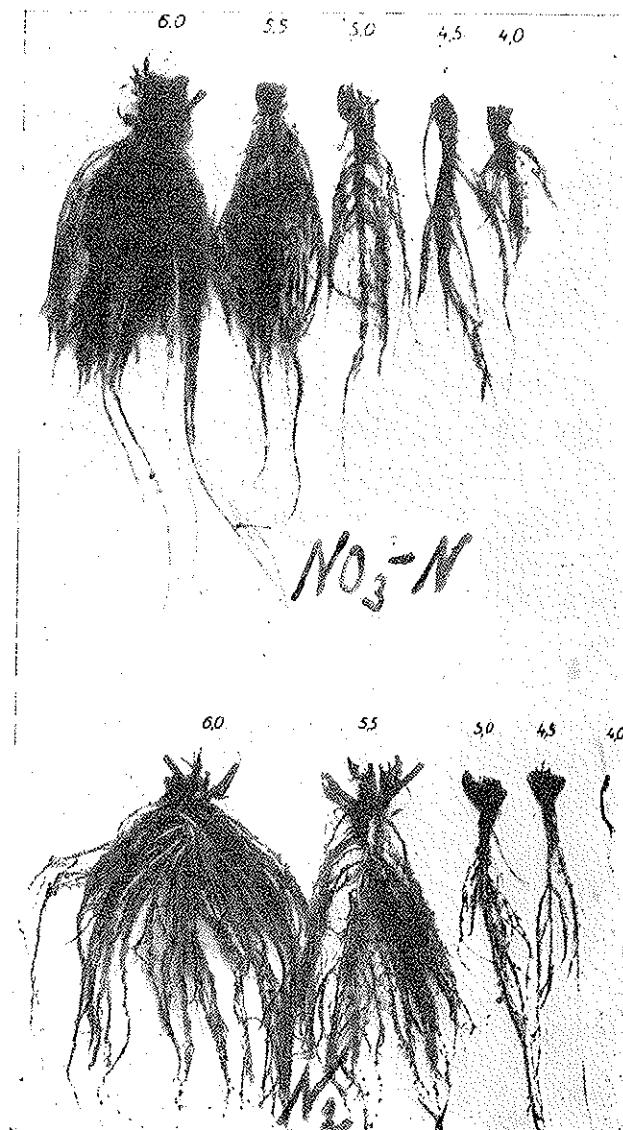


FIG. 5 — Roots of *Trifolium hybridum* grown in pot cultures with quartz sand (pH 6, 5.5, 5.45, and 4). Comparative experiments with $\text{NO}_3\text{-N}$, and with root nodules without combined nitrogen.

have recently been found to be molybdo-flavoproteins (nitrate reductase, xanthin oxidase, liver aldehyde oxidase, hydrogenase). The nature of the nitrate reducing enzyme of *Azotobacter* is unknown, but it may be a molybdo-flavoprotein. If the N₂-fixing enzyme should also be a molybdo-flavoprotein a noticeable similarity in the dependence of nitrogen fixing organisms on molybdenum, both with N₂ and nitrate nutrition, were in no way astonishing, even if the action of the enzymes concerns different reactions: activation of N₂ and reduction of NO₃.

As mentioned above molybdenum is regarded to be connected with symbiotic N₂-fixation in leguminous root nodules also. The proofs for this concept are not, however, conclusive. The enrichment of molybdenum into the root nodules is a fact which speaks for the special significance of this element in the root nodules. It is, however, to be taken into consideration that the cellular tissue of the nodule differs greatly from that of the root and this could be the reason for accumulation of molybdenum in nodules. Especially ANDERSON [3] has investigated the molybdenum requirement of clover and blue lucerne and come to the conclusion that leguminous plants using atmospheric nitrogen fixed in their root nodules need more molybdenum than the corresponding plants growing with nitrate. He therefore emphasized that molybdenum is a specific factor in symbiotic nitrogen fixation. Even this fact *may*, however, depend on the different form of the roots in plants growing with nitrate nitrogen, and in plants fixing nitrogen with their root nodules. In our laboratory we paid attention to this matter some twenty years ago. The following figures illustrate these differences. (Figs. 5-6).

As appears from the figures the nodulated roots of plants grown without combined nitrogen have a coarser structure than the extremely fine and much-branched roots of plants grown with nitrate. The roots of plants grown with ammonium nitrogen have shorter branches and a somewhat coarser root structure than those grown with nitrate. We are quite justified in concluding that the uptake of molybdenum as well as other elements is not the same by these different types of roots. I wish to call attention to this fact in

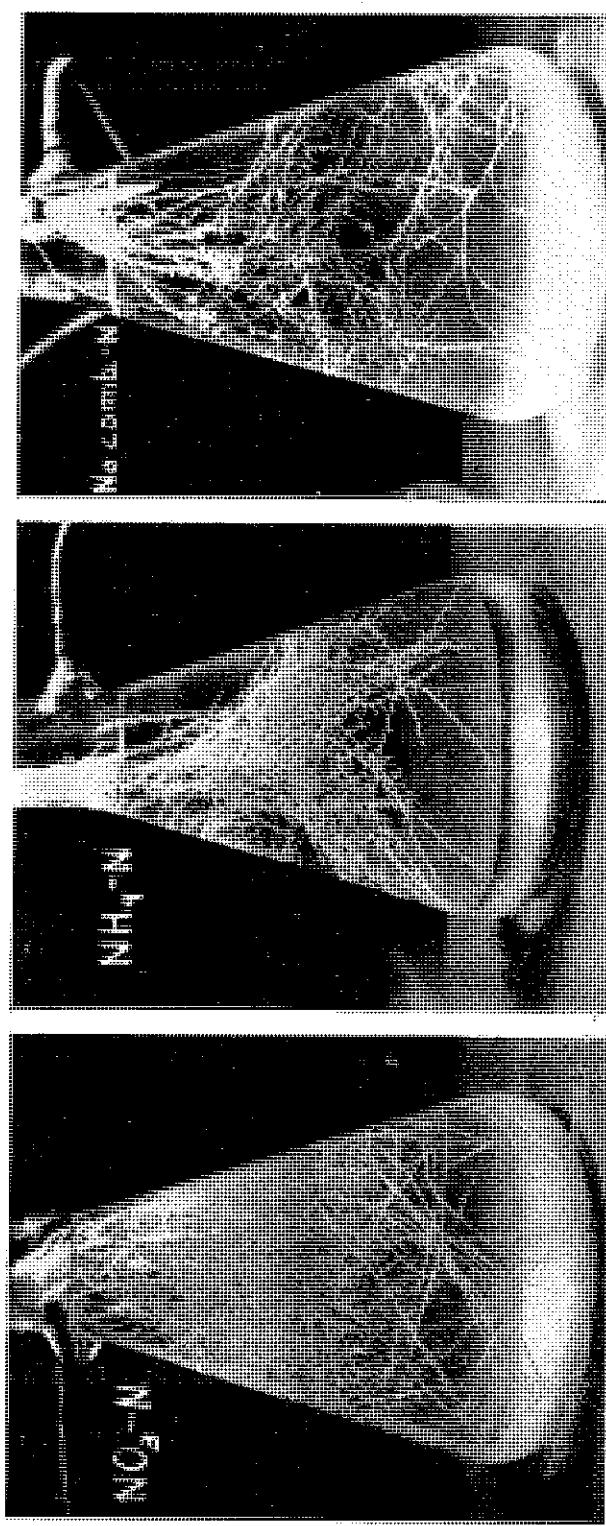


FIG. 6 — Roots of pea in sterile nutrient solution. Comparative experiments with $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NH}_4\text{-N}$ and N_2 (inoculated with pure culture of pea-*Rhizobium*, without combined N).

order to show that the quantitatively different requirement of molybdenum (and possibly other trace elements) of plants growing on different nitrogen nutrition *may* depend on many circumstances and is therefore no *proof* for a different function of the trace element in plants. On the basis of the importance of molybdenum in N₂-fixation by *Azotobacter* and *Clostridium* we are, however, *justified to assume that it is also an important factor in symbiotic N₂-fixation*. Irrespective of how the effect of molybdenum on legumes is explained, the observations made in Australia by ANDERSON *et al.* [3] about the significance of molybdenum are of extremely great practical importance. He found that in Australia the lack of molybdenum inhibits the growth of blue lucerne and clover on large areas. Here 1 lb. of molybdenum per acre works wonders.

Another element which in small amounts is possibly of greatest importance in N₂-fixation is iron. The significance of iron in N₂-fixation is difficult to demonstrate because iron belongs to many of the key enzymes in the metabolism, and the requirement of it is thus remarkable whatever nitrogen nutrition the organism receives. The recent observation of RICHERT and WESTERFIELD [7] that both iron and molybdenum belong to the xanthinoxidase is of special interest in this connection. If this observation is confirmed, the enzyme activating N₂ may also contain both metals. The inhibitory effect of carbon monoxide on N₂-fixation, first observed by WILSON *et al.* [8], could be understood as an inactivation of iron or molybdenum wherefore either, or both, metals could belong to the enzyme activating N₂. The inhibition which is specific for N₂-fixation, and non-competitive, has been established both with *Azotobacter*, blue-green algae, and leguminous root nodules. In our laboratory [9] it was recently observed that anaerobic N₂-fixation by *Clostridium* is also inhibited by approximately the same concentrations of carbon monoxide as N₂-fixation with *Azotobacter*. The carbon monoxide concentration required for complete inhibition is for different organisms the following:

<i>Azotobacter</i>	<i>Clostridium</i>	Leguminous root nodules
ca. 0.5%	0.5-1.0%	ca. 0.05%

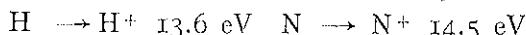
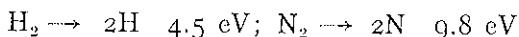
The greater sensitiveness against carbon monoxide of N₂-fixation in the root nodules of legumes probably depends on the leghemoglobin in the nodules (cf. below), which thus should become inactivated by lower concentration of carbon monoxide than the molybdenum containing enzyme which activates N₂.

On the basis of the inhibitory effect of carbon monoxide in N₂-fixation we have reason to presume that N₂ would combine with the heavy metal (iron or molybdenum or both) of the N₂ activating enzyme, and thus become activated



so that the activated oxygen or hydroxyl or hydrogen could combine with it in analogy with the activation of H₂ by hydrogenase. The requirement of energy is, however, much greater in the dissociation of N₂ than in that of H₂.

Dissociation and ionisation potentials for hydrogen and nitrogen



Hydrogenase and nitrogenase are not apparently identical.

In the foregoing I presented the possibility that both iron and molybdenum should belong to the enzyme activating N₂. While iron is still hypothetical in this enzyme its indispensability in symbiotic N₂-fixation in leguminous root nodules is conclusively proved. Iron is not always considered as an oligoelement but in symbiotic N₂-fixation in leguminous root nodules it has in minute amounts so decisive and specific a function that a shorter discussion of it in this conference is in my opinion appropriate. Some fifteen years ago we were in our laboratory [10] able to show that only root nodules with a red pigment fix N₂. This pigment is a hemoglobin, as KUBO [11] first observed. We have isolated it and found that it separates electrophoretically into two components of which the faster component has IP 4.4 and the slower 4.6 (ELLFOLK and VIRTANEN [12]). The molecular weight of the former is about 17,000, and the iron content 0.35, indicating one hem group per mol. We consider this component to be pure leghemoglobin, as I call this pigment. It has the lowest IP of all the known hemoglo-

bins and similar oxygen carriers. The hem group is the same as in blood hemoglobin but the protein component very different. The molecular weight of the slower component is noticeably greater, perhaps ab. 45,000, also containing only one hem group. Its spectrum is qualitatively similar to that of the former component, and

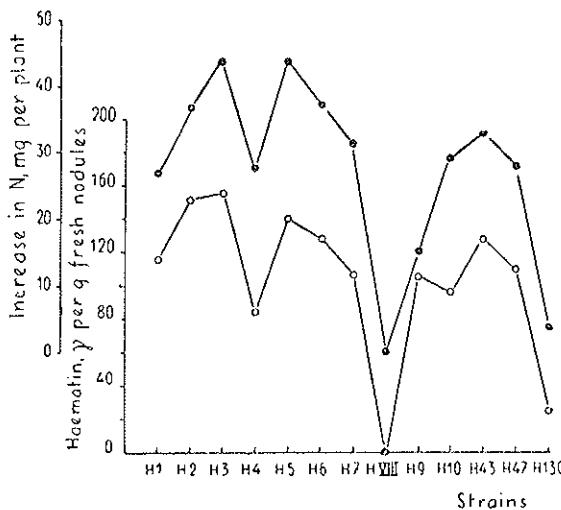


FIG. 7 — Haematin content of the nodules of Torsdag pea inoculated with different bacterial strains.

● Increase in N, mg/plant.
○ Haematin, γ/g fresh nodules.

we therefore assume that it contains leghemoglobin in some way combined with an iron-free protein.

The red pigment is formed in the root nodules in the cytoplasm of root cells outside the bacteria or bacteroids as a result of symbiosis. The pigment is probably in the first place formed by the host plant. What part bacteria play in its formation is still unknown.

As mentioned above only root nodules containing leghemoglobin fix atmospheric nitrogen. There is a parallelism between the leghemoglobin content of the nodules and fixed N₂ [13]. This could be demonstrated in experiments with inoculated pea plants when several strains of pea *Rhizobia* with different efficiency were used for inoculation (Fig. 7). The strain H VIII in our laboratory al-

ways forms totally ineffective nodules without any trace of leghemoglobin, the strain H₂ forms nodules with highest effect and highest leghemoglobin content, and the nodules formed by the strain H 130 fix very little N₂, and contain also very little leghemoglobin. We can thus roughly conclude that the effectiveness of the nodules is the greater the higher the leghemoglobin content of the nodules. Our results have recently been confirmed by JORDAN and GARRAND [14] in Cauada.

In effective root nodules there is more of total iron that in ineffective nodules and roots, the greatest difference being, however, found in hematin iron which in effective nodules is 10-20% of the total iron (Table 2). In the effective root nodules of one pea plant

TABLE 2. — *Total- and hemoglobin iron in pea nodules. Two plants inoculated with different strain were simultaneously taken for determinations from the sterile culture experiments. The figures in parentheses indicate the leghemoglobin iron. Determinations were made on following dates:*

- I. 8. X on appearance of the first buds
- II. 15. X during flowering
- III. 22. X at the end of flowering
- IV. 25. X when pods had developed

	Fe, γ per g dry nodules			Fe, γ per g dry roots (nodules separated)		
	H 7	H 2	H VIII	H 7	H 2	H VIII
I	850	685	—	—	—	—
II	825 (100)	580 (80)	440 (0)	315	270	340
III	680 (108)	580	—	315	310	—
IV	540	—	—	—	—	—

there are only 10-20 γ of iron belonging to leghemoglobin and in the ineffective ones none (Table 3). Iron is in this case a real oligo-element, and on this very small amount of iron depends the enormous N₂-fixation in the root nodules of leguminous plants, a fundamental reaction for life. The bulk of the total iron in nodules is inorganic iron, of which there apparently must be a large excess obtainable for the synthesis of the hem group. As I mentioned before there is a clear parallelism between N₂-fixation and leghemoglobin content, but not between N₂-fixation and the total iron in the root nodules.

TABLE 3. — 1st experiment on different bacterial strains. Test plant: Torsdag pea in full bloom. Period of growth: 23. IV—17. VI. 1947, 55 days.

Strain	Number of plants	Plants (green parts)		Nodules					
				Haematin			N		
		Dry matter g/plant	N mg/plant	Fresh weight mg/plant	Dry matter % mg/plant	Dry weight mg/plant	% fresh weight**	% dry weight**	Fe mg/g dry weight
H 1	9	1.006	32.4	693	10.6	40.3	136 (116)	78	71.1
H 2	9	1.031	42.3	380	9.5	38.0	172 (152)	39	78.8
H 3	9	1.162	49.3	400	10.0	50.3	176 (156)	59	66.2
H 4	9	0.651	33.1	503	9.7	34.0	104 (84)	37	86.5
H 5	9	1.201	49.0	351	9.7	40.0	160 (140)	45	54.2
H 6	9	0.054	42.4	345	9.2	31.8	144 (124)	40	89.5
H 7	9	0.929	36.7	294	10.5	30.8	127 (107)	28	98.6
H VIII	9	0.267	5.5*	430	6.3	27.1	20 (0)	0	592
H 9	9	0.492	20.6	456	10.4	63.0	116 (96)	41	662
H 10	9	0.802	34.6	606	332	7.7	147 (127)	20	482
H 43	9	1.023	38.1	199	9.7	19.4	129 (109)	41	654
H 47	9	0.913	33.1	100	7.5	7.5	44 (24)	2	798
H 130	6	0.349	8.9				(280)	47.1	370
2nd experiment. Torsdag pea in bud. Period of growth: 28. VII—5. VIII. 1947, 39 days.									
H 1	9	0.588	21.4	506	8.3	41.4	108 (83)	43	510
H 2	9	0.579	24.6	316	8.5	26.8	136 (111)	36	568
H 3	9	0.600	25.6	309	9.8	30.3	177 (152)	47	565
H 4	9	0.457	19.9	453	10.6	48.0	142 (117)	52	411
H 5	9	0.557	24.7	346	10.6	36.7	156 (131)	44	512
H 6	9	0.647	29.2	338	10.1	36.2	151 (126)	39	
H 7	9	0.676	30.6	359	9.6	172 (147)	53	551	
H VIII	9	0.214	4.8*	318	9.6	30.6	25 (0)	0	384
H 9	9	0.261	7.3	557	8.9	49.6	73 (48)	27	396
H 43	9	0.891	37.8	445	9.8	43.6	170 (145)	65	602
H 47	9	0.740	29.8	370	9.9	36.6	177 (152)	57	541
H 130	6	0.246	6.1	251	8.3	20.8	38 (13)	4	373

* No N-fixation. N originates from seed. N-content of a seed of Torsdag pea is about 7—8 mg.

** The figures in brackets are after subtraction of haematin in H VIII nodules.

The indispensability of leghemoglobin for N₂-fixation in root nodules is a remarkable fact. It of course arouses the question what function this pigment has in N₂-fixation. No satisfactory answer to this question has been obtained during the time of more than ten years which has passed since the indispensability of the pigment for N₂-fixation was found. Since leghemoglobin, or some other closely related hemoglobin, has not been found in free living N₂-fixing organisms, nor in the root nodules of alder which fix N₂ liberally, the interpretation seemed more natural that leghemoglobin acts as a carrier and storer of oxygen, and should therefore be indispensable in the oxygen deficient conditions prevailing in leguminous root nodules. No experiments have, however, given results which support this view. In Keilin's laboratory SMITH [15] could not find any influence of the red pigment on the oxygen uptake of detached root nodules. Carbon monoxide also had no effect on the oxygen uptake of nodulated roots when these were attached to the plant. In our laboratory [16] no correlation between the leghemoglobin content of the nodules and the oxygen uptake by them could be found. In these experiments nodules with very different leghemoglobin content were used (Table 4).

TABLE 4. — O₂-uptake by excised root nodules of pea.

Rhizobium strain	Age of pea plants, days	Hem. content of nodules mg/g dry substance	Hem. in leghemoglobin	RQ	QO ₂	Rel. value	QO ₂ per 1Hem.	Ret. value
H6 effective . . .	49	0.735	0.560	1.00	2.88	202	3.9	186
H10 effective . . .	43	0.559	0.384	1.05	3.94	275	7.5	357
HVIII ineffective . .	45	0.175	0	1.10	4.30	300	24.5	1167
H130 slightly effective	48	0.253	0.078	1.00	3.81	266	15.1	719
H43 effective . . .	43	0.853	0.678	1.00	3.90	272	4.5	214
H47 effective . . .	50	0.700	0.525	0.92	1.43	100	2.1	100
H301 effective . . .	46	1.014	0.839	0.98	3.73	262	3.8	131
H313 effective . . .	45	0.712	0.537	1.04	3.84	234	4.7	224

I have also discussed the possibility that leghemoglobin may reduce hydroxylamine if it is formed in the nodules. According to COLTER and QUASTEL [17], hemoglobin of blood, and on the basis of results obtained in our laboratory [18] also leghemoglobin,

reduce hydroxylamine quantitatively to ammonia in the presence of ascorbic acid or cysteine. Leghemoglobin seems to be the main, or possibly only, factor which causes the reduction of free hydroxylamine in root nodules.

A question closely connected with the effectivity of different *Rhizobium* strains is the decomposition of leghemoglobin to green pigment in the nodules. In pea plants inoculated with less effective *Rhizobium* strains it can generally be observed that the nodules begin to turn green even under favourable growth conditions before the flowering stage, while very effective nodules under the same conditions remain red for weeks after the start of flowering, and turn green only when the growth of the plant is coming to an end (Fig. 8, 9). Under unfavourable light conditions even very effective nodules may turn green earlier. Since the retention of leghemoglobin in the nodules as long as possible is of decisive importance for the fixation of N_2 , and thus for the growth of leguminous plants, the decomposition of leghemoglobin to green pigment is not only of theoretical but also of great practical importance. The chemical change which takes place in the leghemoglobin when the green pigment is formed from it is the opening of the porphin ring through oxidation. The reaction is thus irreversible. Hydrogen peroxide causes *in vitro* the opening of the porphin ring through oxidation, and forms a green pigment from hemoglobin in the presence of ascorbic acid. Hydrogen peroxide may also be the oxidizing agent in the root nodules, and thus cause the decomposition of leghemoglobin to green pigment. According to our [19] determinations there is much more of ascorbic acid in the root nodules of pea plants than in the roots. The catalase content of the red nodules is many times higher than that of the green ones [20]. Whether this decrease in catalase activity leads to an increase in hydrogen peroxide of the nodules is still unknown because of difficulties in estimating the hydrogen peroxide content of the nodules.

The transformation of the effective nodules of legumes into green when growing plants are subjected to complete darkness also belongs to this category of problems. The red pigment of pea nodules turns into green within a period of 2-3 days, while, for

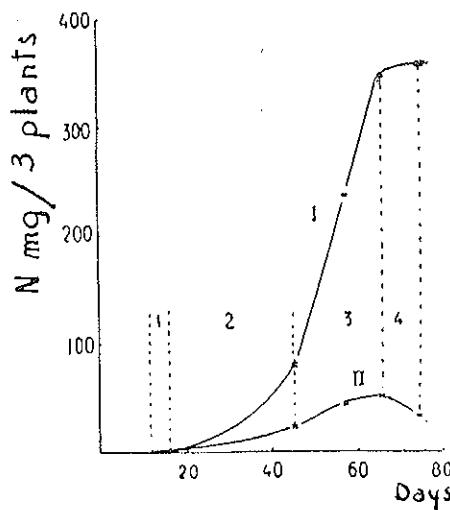


FIG. 8 — Fixation of nitrogen in root nodules of pea and its transfer to host plant. Curve I: N in plants. Curve II: N in nodules.

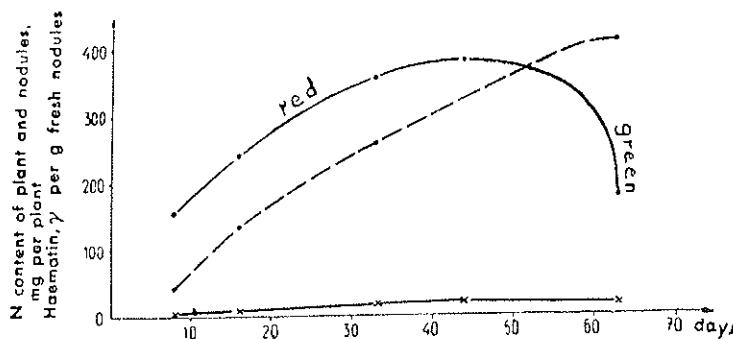


FIG. 9 — Nitrogen content of plant and haematin content of nodules at different stages of growth of soya bean.

- — ● Haematin, γ /g fresh nodules.
- — ● N, mg/plant without nodules.
- × — × N in nodules, mg/plant.

instance, the decomposition of leghemoglobin in soya nodules is very slow, and takes a couple of weeks. The reaction is even in so far different that in the pea nodule the globin combined with the hem group is partly retained undenatured when the porphin ring opens, while in soya nodules the globin becomes denatured so that biliverdin cannot any longer be formed with acetic acid from the green pigment which is slowly developed [21].

Erkama and I have made some preliminary experiments on the influence of copper on the formation of leghemoglobin. Without copper in the nutrient solution the formation of the pigment was poor. Because the nodules are dependent on the carbon compounds formed in the host plants and the deficiency of copper influences the metabolism of plants it is, however, impossible to say if copper is in some way connected with leghemoglobin synthesis or not.

A matter which obviously may influence the results greatly when investigating the quantitative requirements for some oligo-element in higher plants is the content of this element in seeds. As this is a matter of general bearing I would like to deal with it in this connection.

In 1940 v. HAUSEN and I [22] reported on a series of experiments carried out over several years in order to find out how the organic substances present in the soil affect the growth of the pea during several generations. The uninoculated pea plant was grown in an ERLENMEYER flask in sterile culture system in the nutrient solution of HILTNER in tap water with $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ as the nitrogen source. Two parallel series were grown. In series A the above-mentioned nutrient solution was used without any addition; in series B 200 g. of air dried garden soil was added to each flask. During the first experimental period the growth was good in both series. The next period, when seeds from the plants of the first experimental period were used, gave a quite different result. In series A growth of the pea was poor and no seeds developed, whereas in series B the growth was good. Even during the second experimental period a good growth could be induced in the series A when the nutrient solution was supplemented with the ash obtained from the burning of the garden soil used for series B. The growth

remained good throughout six successive experimental periods between 1935-1937; in each case the seeds obtained were used for the following experimental period. The results revealed that the normal seeds produced in agriculture obviously contained mineral substances which made relatively good growth of plants possible in nutrient solutions not containing the necessary trace elements in sufficient quantities to ensure normal growth. Only by growing plants in nutrient solutions deficient of trace elements was it possible to produce seeds which themselves were low in these elements. Such seeds responded sharply to the lack of trace elements in nutrient solutions.

This paper did not state which particular trace element was lacking in the seeds, but my collaborator, ERKAMA [23], dealt with the problem in detail in his doctoral thesis in 1947. He showed that an addition of copper was sufficient to produce seeds on peas grown in the conditions described above (tap water without addition of trace elements). According to him, the copper content of the commercial seeds of the pea used in his experiments (Torsdag II) was 9.6 µg. per g. of dry substance (about 2 µg. per seed), while in the seeds with low trace elements that were produced in tap water without addition of copper he found about 5 µg. of copper per g. (ab. 1 µg. per seed). The seeds produced under a greater copper deficiency contained only 3 µg. of copper per g. (ab. 0.6 µg. per seed), but in general they no longer germinated. On the basis of ERKAMA's results, it was evident that the copper deficiency in the nutrient solution used was one reason for the poor growth of pea in our previous experiments. There may also have been a deficiency of some other trace elements, but apparently the lack of copper was decisive.

MEAGHER, JOHNSON and STOUT [24] reported two years ago that they could not demonstrate molybdenum deficiency symptoms in peas or beans when seed from commercial sources was used. However, by growing a crop on purified culture solutions, and by using the seeds so produced (low molybdenum seeds) for further experiments, it was demonstrated conclusively that molybdenum was essential for the growth of these legumes. Commercial seeds

contained 0.5 to 5 γ molybdenum per seed, and the low molybdenum seeds only 0.05 to 0.1 γ. Severe molybdenum deficiency developed in plants grown from such seeds, but an addition of 40 γ molybdenum in cultures produced normal plants.

From the results related above it appears that, at least when large seeded plants are in question, the trace element content of the seeds cannot be disregarded, and that the seeds to be used in the experiments have to be impoverished at least in regard to some trace elements. The impoverishment of microorganisms in regard to the trace element in question is also important if an even slightly larger inoculation mass is used. If these matters are disregarded quite wrong results may be obtained when the requirements on trace elements of plants, and in some cases also of microorganisms, are estimated.

SELECTED BIBLIOGRAPHY

- [1] BORTELS H., « Arch. Mikrobiol. », 3, 341 (1930).
- [2] JENSEN H. L., « Proc. Linnean Soc. N. S. Wales », 72, 299 (1947); Proc. 4. Int. Congr. Microbiol. 1947, 477.
- [3] ANDERSON A. J. and THOMAS M. P., « Bull. Counc. Sci. Industr. Res. » (Australia), 198 (1946); ANDERSON A. J. and SPENCER D., « Austr. J. Sci. Res. B », 3, 414 (1950).
- [4] VIRTANEN A. I. and LUNDBOM S., « Acta Chem. Scand. », 8, 870 (1954).
- [5] BORTELS H., « Z. Bakt. », II, 95, 193 (1936).
- [6] JENSEN H. L., « Proc. Linnean Soc. N. S. Wales », 72, 73 (1947).
- [7] RICHERT D. A. and WESTERFIELD W. W., « J. Biol. Chem. », 209, 179 (1954).
- [8] cf. WILSON P. W., « The Biochemistry of Symbiotic Nitrogen Fixation ». Univ. of Wisconsin Press, Madison 1940; LIND C. I. and WILSON P. W., « J. Am. Chem. Soc. », 63, 3511 (1941); Arch. Biochem., 1, 59 (1942).
- [9] VIRTANEN A. I., MUSTAKALLIO H. and STRANDSTRÖM H., « Suomen Kemistilehti B », 26, 6 (1953).
- [10] VIRTANEN A. I., « Sitz. Ber. Finn. Akad. Wiss. Comm. », 12 Jan. 1945; « Nature », 155, 747 (1945).
- [11] KUBO H., « Acta Phytochim. » (Japan), 11, 195 (1939).
- [12] VIRTANEN A. I. and ELLFOLK N., « Acta Chem. Scand. », 4, 1014 (1950); *ibid.*, 6, 411 (1952).
- [13] VIRTANEN A. I., « Sitzungsber. Finn. Akad. Wiss. », 12 Jan. 1945; VIRTANEN A. I., JORMA J., LINKOLA H. and LINNASALMI A., « Acta Chem. Scand. », 1, 90 (1947); VIRTANEN A. I., ERKAMA J. and LINKOLA H., *ibid.*, 1, 861 (1947).
- [14] JORDAN J. D. and GARRAND E. H., « Canadian J. Botany », 29, 360 (1951).
- [15] SMITH J. D., « Biochem. J. », 44, 591 (1949).
- [16] VIRTANEN A. I. and TIETÄVÄINEN A., « Suomen Kemistilehti B », 26, 1 (1953).
- [17] COLTER J. S. and QUASTEL J. H., « Arch. Biochem. », 27, 368 (1950).
- [18] VIRTANEN A. I., KEMPI A. and SALMENOJA E. L., « Acta Chem. Scand. », 8, 1729 (1954).
- [19] VIRTANEN A. I. and JORMA J., « Suomen Kemistilehti B », 8, 50 (1945).
- [20] VIRTANEN A. I. and MOISIO T., unpublished results.
- [21] VIRTANEN A. I. and MJETTINEN J. K., « Acta Chem. Scand. », 3, 17 (1949).
- [22] VIRTANEN A. I. and v. HAUSEN S., « Planta », 31, 263 (1940); VIRTANEN A. I., « Plant Physiol. », 28, 323 (1953).
- [23] ERKAMA J., « Ann. Acad. Sci. Fenniae », Ser. A II, 26, 1 (1947).
- [24] MEAGHER W. R., JOHNSON C. M. and STOUT P. R., « Plant Physiol. », 37, 223 (1952).

[4] Virtanen - pag. 22

MANGANESE DEFICIENCY IN RELATION TO SOIL CONDITIONS (*)

F. C. GERRETSEN

The soil conditions which determine the availability of manganese to the plant are rather complicated, especially because they are of pure chemical as well as of microbiological origin. As soon as one starts to determine the available manganese in the soil, one is confronted with the problem: « what part of the manganese in the soil is to be considered to participate in the manganese supply of the plant ». The determination of total manganese by means of strong acids is out of question as the soil contains several manganic oxides, which are entirely inactive, but soluble in these acids.

Determination of the exchangeable manganese by extraction with ammonium acetate is useless too, because the amount changes day by day, dependent on the redox potential as determined by rainfall, temperature and organic-matter content of the soil, which influence microbiological reduction processes. Moreover this exchangeable manganese is only an inferior part of the manganese in the soil, that might become available to the plant under favourable conditions. LEEPER (1935-1947) in Australia was the first to use a combination of a reducing agent (hydroxylamine 0.2%) and ammonium acetate (1 N.) to get an impression of the available manganese in the soil, also in order to distinguish between healthy and deficient soils. As his results did not correlate with the behaviour of the oats and peas in his pot experiments, JONES and LEEPER (1951) tried to improve the method by first treating the soil with hydroxylamine (0.05%), removing this reagent with alcohol and

(*) For an extensive survey of the literature see: Mulder and Gerretsen, 1952.

afterwards extracting the manganese now present as exchangeable ions with a semimolecular calcium nitrate solution at pH 7. Although JONES and LEEPER assert that with this method they get a better correlation with plant response, DE GROOT at the Experiment Station (Groningen), could not confirm this statement (*). He went back to the original method of LEEPER, simultaneous extraction with hydrochinon and ammonium acetate, and showed that correlation between chemical soil analysis and manganese deficiency in the field could be improved by taking into account: *the humus content* of the soil, the *pH* and by considering *clay and sandy* soils separately. On clay- and sandy clay soils with less than 3% organic matter, sugarbeets and oats were diseased when the reducible manganese content of the soil was below 60 p.p.m. With more organic matter the limit went up to about 100 p.p.m.

Sandy soils are always diseased when the pH (KCl) is above 6.2 irrespective of the humus content. Below 5.4 manganese deficiency was never been observed. However de Groot found two exceptions: clay soils of the newly reclaimed Zuiderzee polders and of another reclamation (Biesbosch) were diseased when containing more than 50 p.p.m. manganese and in some cases even 600-700 p.p.m. These soils contained large amounts of recently deposited river sediments; a valid explanation of this anomaly has not yet been found.

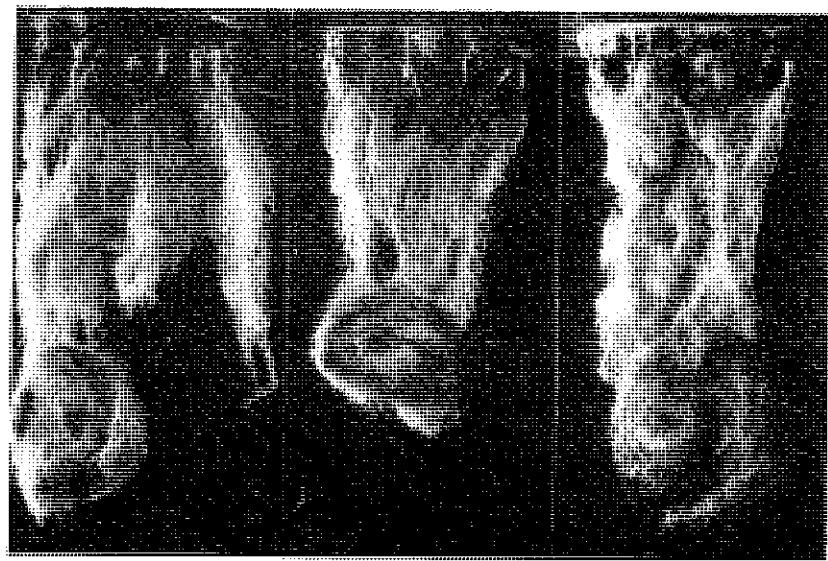
An interesting observation was made by HUDIG (*) in the northern part of Holland; on the borderline between acid sandy peat soil and clay soil, gray speck disease of oats was a common phenomenon whereas on both sides of this line oats were perfectly healthy. The most plausible inference is that in the diseased area the pH of sandy soil had been raised by the clay to a level at which manganese is made insoluble.

I have tried to confirm this observation in a pot experiment, mixing increasing quantities of a healthy acid sandy soil with decreasing quantities of a healthy clay soil.

(*) Private communication.



100% Sand 90% Sand + 10% Clay 75% Sand + 25% Clay



50% Sand 100% Clay 100% Clay + 0.1% CaO

Fig. 1 — Roots of oat plants, grown on mixtures of a healthy acid sandy soil. The plants and especially their root systems on the mixtures of sandy soil with 10 and 20% clay soil were badly diseased, whereas the plants on the original soils and the 50-50% mixtures were perfectly healthy.

Most pronounced was the effect on the root system of the oat plants. On sand mixed with 10 and 20% clay, the plants were badly diseased, the roots poorly developed and for the greater part decayed; with more sand or more clay the plants were perfectly healthy and the roots abundantly developed.

Of particular interest is the role micro-organisms play in transforming manganese compounds. The oxidation of manganous compounds to brown manganic oxides by bacteria and fungi was first shown by Bayerinck in 1913. He observed that manganous carbonate is oxidized to manganic dioxide on plain agar plates inoculated with a soil suspension. SÖNGEN (1914) showed that a great variety of micro-organisms, including *Pseudomonas fluorescens*, *Azotobacter chroococcum*, *Escherichia coli*, *Oidium lactis* etc. were able to transform soluble manganous compounds into insoluble brown manganic oxides, when grown on agar media, containing neutral salts of hydroxy acids (gluconic, malic, tartaric, citric, lactic acids). On the other hand it was shown by this author, that in agar plates containing sugars or cellulose and manganic dioxide, the latter compound is transformed into soluble manganous salts.

In order to get an impression of the situation in the soil I suspended different soils in molten, cooled agar and poured plates with this material. In the centre agar with 1% $MnSO_4$ was placed (GERRETSEN, 1939). The $MnSO_4$ diffused into the surrounding soil agar and after about one week brown rings of MnO_2 were formed, which consisted of numerous small colonies of bacteria and of fungi, in which MnO_2 had been precipitated. Placing these soil-agar plates in a refrigerator or putting some chloroform into it, prevents the formation of the rings, which proves definitely that we had to do with a microbiological process. Inoculating a sterilized soil-agar- $MnSO_4$ plate with a brown colony from one of the plates had the effect that after 10-14 days brown spots appeared in the soil agar, whereas the sterile plates remained unchanged.

When instead of plain agar an acid soil-agar suspension with 1% $MnSO_4$ was placed in the centre, the formation of the MnO_2 -ring took place at some distance from the centre. This was caused

by the fact that the precipitation of manganic oxides only occurs between certain pH-limits and the acid soil in the centre acidified the surroundings to such an extent, that MnO_2 -precipitation is prevented. This experiment illustrates the observation in the field that

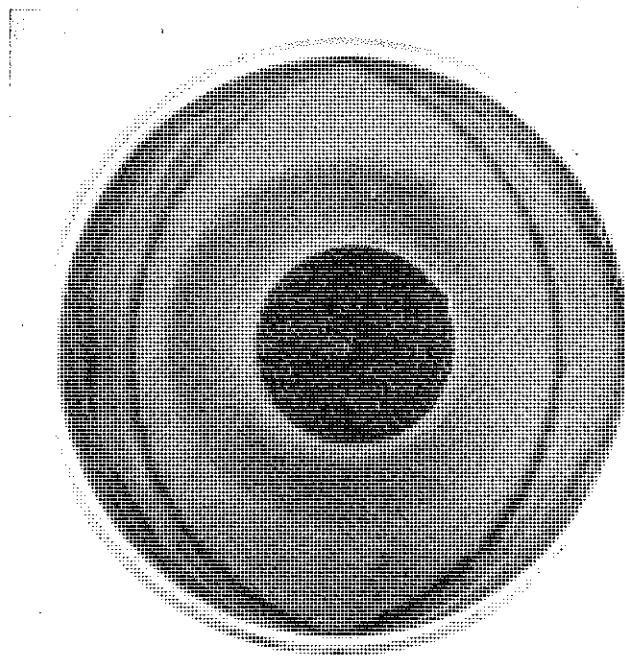


FIG. 2 — Clay-soil-agar plate, with an acid sandy soil + 2% $MnSO_4$ in centre. The microbiological precipitation of MnO_2 takes place at some distance from the central ring due to unfavourable pH

on the borderline between acid sandy soils and alkaline clay soils frequently manganese deficiency is observed.

It is interesting to note in this connection that LUNDEGÅRDH observed about 20 years ago that the manganese content of oat leaves was maximal at low pH's (5.0-5.5) as well as at high pH's (8.0-8.5) and showed a minimum between 6.5 and 7.5. MASCHHAUPT (1934) at GRONINGEN has shown that after dressing Mn-defi-

cient clay soils with calcium oxide (not with calcium carbonate) the gray speck disease of oats was temporarely cured. After a couple of years, however, the disease came back most probably because the calcium oxide had been transformed into calcium carbonate and the pH had dropped to about 7.

In this connection it is necessary to pay attention to the influence of organic material on the transformation of manganese compounds. By addition of organic material to the soil, soluble manganous compounds may be precipitated as manganic oxides or the reverse may take place. What will happen depends on the nature of the organic material, the pH and the redox potential. With glucose or with the salts of fatty acids microbiological oxidation of manganous compounds to manganic oxides does not take place. However when the neutral salts of *hydroxy* acids are used, such as lactic acid, malic acid, citric acid, manganous compounds are oxidized to manganic oxides, but only when the pH is about 7. The agar plate shown in the photograph N. 3 contains calcium gluconate, the other one calcium butyrate. In the centre of both plates some sodium bicarbonate has been placed. The plates are sterile

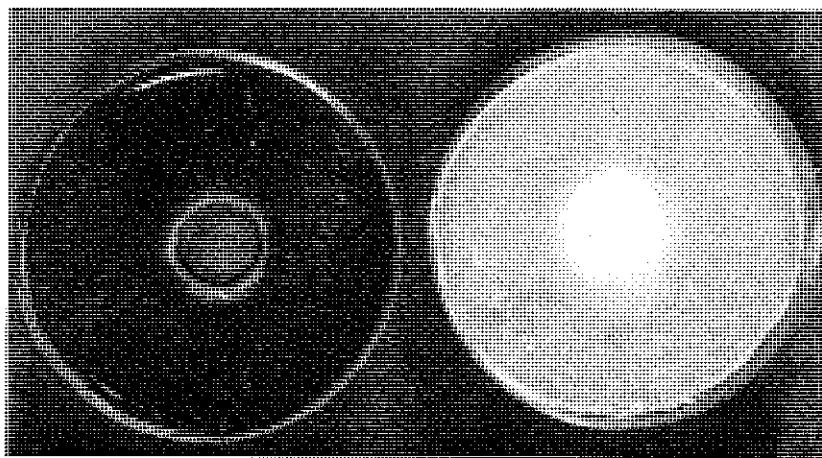


FIG. 3 — Chemical precipitation by hydroxy-acids of MnO_2 in sterile agar with 2% $MnSO_4$. In centre $NaHCO_3$. — Right: Agar + 2% Calcium gluconate — Left: Agar + 2% Calcium butyrate

and both contain 2% $MnSO_4$. It is evident that only in the plate with calcium gluconate manganic dioxide has been precipitated. Only the salts of hydroxy acids are able to oxidize manganous salts to manganic oxides in the absence of micro-organism.

Under *anaerobic* conditions and in the presence of easily decomposing organic material manganic oxides will be solubilized by microbiological activity. Very often the condition of manganese-deficient plants improves after prolonged rainfall. Waterlogging of soils, containing organic material, rapidly increases the exchangeable manganese. This might even lead to manganese toxicity or to iron toxicity, depending on the quantities of oxides of both elements present in the soil.

Incorporation of organic materials such as straw, cellulose under *aerobic* conditions usually results in the appearance of severe manganese deficiency symptoms (TIMONIN, 1946). There is positive evidence that microorganisms of widely divergent origin are able to produce hydroxy acids from cellulose and that the manganous salts of these acids are readily oxidized *chemically* by the oxygen from the air when the pH is above 7. On the other hand the precipitation of MnO_2 may occur inside the fungal mycelium also.

As organic substances play such a prominent rôle in connection with the precipitation and solubilization of manganese in the soil, it is to be expected that also the organic substance excreted by the plants in the rhizosphere participates in these processes. TIMONIN (1946) observed that a susceptible variety of oats harbored in its rhizosphere a denser population of manganese-oxidizing bacteria than did a resistant variety grown under identical conditions.

When soil microorganisms play indeed such a prominent part in the manganese status of the soil, what will be the effect of sterilization on manganese deficiency? In a number of experiments the author has shown that sterilization of manganese-deficient soils often improves the conditions considerably, so that even on severely diseased soils healthy oat plants can develop. I want to emphasize that sterilization by heat is out of question, as in this way the amount of available manganese may increase tenfold. Sterilization with formalin, however, does not change the manganese content of the soil and notwithstanding that the plants are healthy.



FIG. 4 — Oats on Mn-deficient, sandy soil. - *Left*: Original soil. - *Middle*: Sterilized with formalin. - *Right*: MnSO_4 added, but inactivated by Mn- precipitating microorganisms.

I. Sterilization of diseased soil.

	dry wt straw gr.	dry wt grain gr.	number of grains.
1. Original soil: all plants diseased	4.5	1.3	49
2. The same, sterilized with heat. All plants healthy	11.0	7.0	211
3. Sterilized with formalin: all plants healthy, better than 2	19.0	12.7	336
4. Original soil, 75 mg MnSO_4 added. Plants chlorotic, typical leaf spots	6.4	2.1	114

When microorganisms play such an important role in bringing about manganese deficiency, it is to be expected that after reinfection of sterilized deficient soils the symptoms will come back.

II. Reinfection experiment.

	Mean wt of 5 plants p.pot grams	Mn-content of the leaves p. p. m.	total Mn per plant.
1. Original diseased soil	3.8	17.6	0.013 mg.
2. The same sterilized with formalin	19.0	51.5	0.196 mg.
3. Sterilized with formalin and rein- fected with diseased soil	11.2	19.3	0.043 mg.

This experiment shows that sterilization with formalin increased the yield 5-fold and also the manganese content of the leaves and the total manganese per plant. Reinfection of the soil treated with formalin with a small quantity of the original soil decreased the yield by 41% and reduced the manganese content of the leaves to about the same level as that on the unsterilized soil.

The sceptically-minded will be inclined to ascribe the increase of the Mn-content of the leaves to solubilization of the manganese by formalin. As already has been pointed out, this is not the case; formalin does not increase the exchangeable manganese in the soil; sterilization, however, has killed the manganese-precipitating bacteria in the soil as well as those in the rhizosphere.

Moreover the extent of the root system in the sterilized soil is larger than in the unsterilized, consequently the plant has a larger area of soil at its disposal to absorb the scanty manganese ions than in the original soil. Reinfection decreases the manganese content of the leaves and this is a definite proof that microorganisms play a prominent part in the picture.

The results obtained with soil have been confirmed by sterile, Mn-free, watercultures; although the plants remained small, the typical leaf spots were absent, unless the cultures were infected with bacteria, isolated from diseased root tips.

Though these experiments seem to suggest, that manganese deficiency is merely a case of plant pathology, this is not the case. Without manganese, the plants grow poorly and finally die, even when they are kept sterile.

I could prove that the typical leaf spots are caused by alkaline substances, produced by bacteria in the rotting root tips and that one of the beneficial effects of sterility was that these processes were prevented.

The real situation can be resumed as follows.

1. In alkaline soils microbiological activity reduces the availability of the manganese compounds.
2. Manganese deficiency reduces the growth of the plants to such an extent, that the root system cannot resist the attacks of the saprophytic bacteria in its surroundings, which results in the pro-

duction of alkaline substances and in the appearance of typical necrotic spots on the leaves.

3. The pure physiological effect of manganese deficiency on oats in a sterile medium is reduced growth, etiolated slack leaves, necrosis of oblong areas of the leaves, badly developed root system.

Finally I want to draw your attention to an interesting problem, which I am investigating at the present time. There are a number of oat varieties, which are supposed to be resistant to manganese deficiency. In order to verify this assertion I have sown about 200 oat varieties from different parts of the world on manganese-deficient soils. It was shown that there are indeed a small number of varieties, which thrive rather well on the same deficient soils where the susceptible varieties fail completely. The manganese content of the leaves was in both cases about the same, sometimes even



FIG. 5 — Oat varieties, «resistant» and non resistant to Mn-deficiency on a Mn-deficient soil

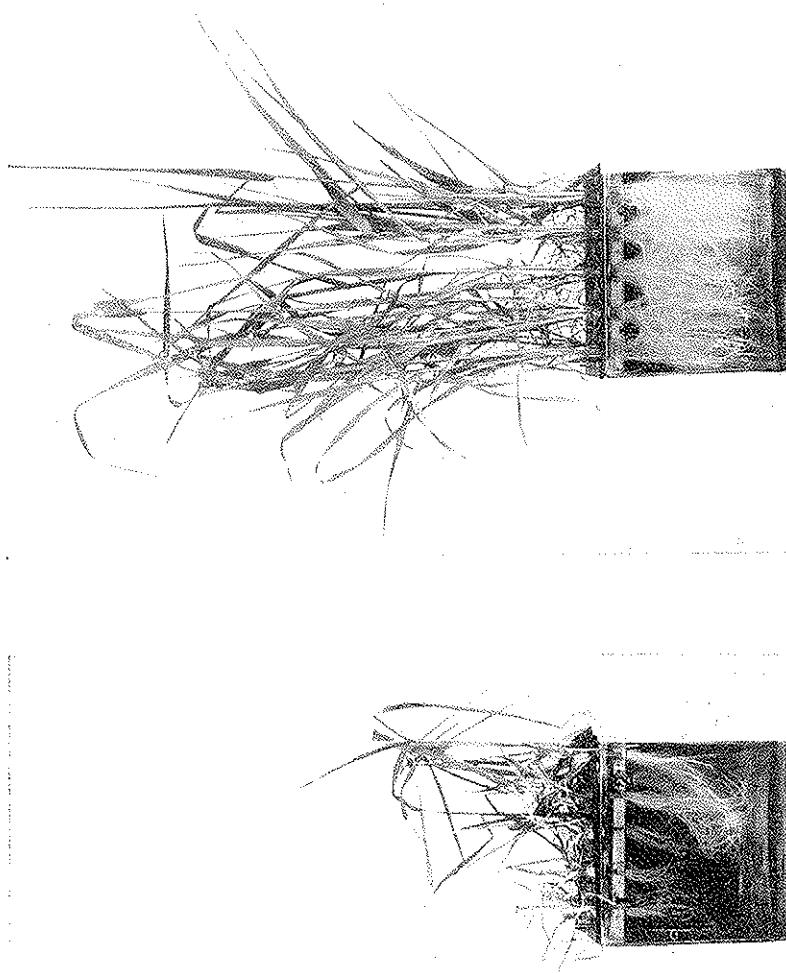
**A.****B.**

FIG. 6 — Water cultures of two varieties - *Left*: not resistant. *Right*: « resistant » to Mn deficiency. - A. Both varieties in one and the same Mn-free waterculture. Note the better development of the roots and the leaves of the resistant variety. - B. The same, in a culture solution with $MnSO_4$. Also here a denser root system of the resistant variety.

slightly lower in the resistant varieties. In order to ascertain how these varieties stand up when faced with a total lack of manganese, I cultivated both varieties in one and the same manganese-free waterculture. This proved that in the absence of manganese also the so-called resistant varieties suffer from manganese deficiency even show the same symptoms and finally die as well. However, they survive longer and the root system of some of these varieties is much better developed than that of the susceptible plants. A very important difference is that at the same low manganese content the leaves of the resistant varieties showed about twice as much carbon dioxide assimilation as the equal areas of the leaves of the susceptible plants.

*CO₂-assimilation of resistant and non resistant oat varieties,
grown on the same plot.*

Non resistant Name	CO ₂ /100 cm ² /h.	Resistant. Name	CO ₂ /100 cm ² /h.
Star	22,6	Ayrline	44,3
H 419	20,5	AA 734	33,6
Roxton	13,0	Borris opes	24,7
556-48	9,0	Onward	32,5
Trio	11,7	Fyris	23,9
H 1767	21,9		
Mean	16,4	Mean	31,8

So there seem to be two relatively independent factors, which characterize these resistant varieties, namely a somewhat better carbon dioxide assimilation at low manganese contents and an increased resistance of the roots towards invading microorganisms. Increased resistance towards phytopathogenic microorganisms is a common aim of plant-breeders and might in these cases just as well have been extended to saprophytes. However, the secondary effect of this property is that the root system is much more extended and consequently has a much larger soil area at its disposal to extract the manganese than is the case with the non resistant varieties.

Though the manganese content of the leaves in p.p.m. per gram of dry material in both cases is about the same, the total quantity of manganese absorbed by some of the resistant varieties amounted to four to five times that of the susceptible ones.

Further research on the problem of resistance to manganese deficiency of oats is in progress, because in the Netherlands, especially on the newly reclaimed polders, manganese deficiency is an evil of frequent occurrence.

Correcting manganese deficiency can take place along two different ways, increasing the manganese content of the soil or applying manganese compounds directly to the leaves. Dressing alcaline manganese-deficient soils with manganous sulfate usually has only a temporary effect. Within the growth period of the plants the added manganese is made insoluble either by microbiological activity or chemically. BOISCHIOT and DURROUX (1949) in France showed that manganese might be fixed on the surface of the calcium carbonate particles.

All measures which lower the pH of the soil, increase the solubility of the manganese compounds. Though I could show that treating the soil with sulfur results in improving the condition, this is no practical proposition. As a matter of fact it is advisable to use ammonium sulfate and superphosphate as fertilizers. After nitrification of the ammonia, 500 kg. ammonium-sulphate per ha. equal the application of 476 kg strong nitric acid and 370 kg strong sulfuric acid, which especially on sandy soils will change the pH and manganese availability in a short time. Flooding the soil may give a much improved manganese supply especially in those soils which contain a certain amount of easily decomposing organic matter. The redox potential of such soils is lowered by intensive microbiological processes, the manganic oxides are reduced and solubilized as manganous hydrocarbonate.

Under circumstances, the nature of which has not yet been sufficiently cleared up, manganese deficiency may come back or aggravate after flooding, which has been observed in the Dutch and Belgian sea polders, which were inundated during the war.

The best method is to spray the plants with a solution of 0.2-0.5% or even 1% manganeseous sulfate; in a few days the plants look better, chlorosis disappears and growth is restored. As there is no interior transport of manganese ions inside the plant, it is advisable to repeat spraying.

Finally I hope that I succeeded in showing you that manganese in connection with soil conditions has a great many fascinating facets and that there are still a number of interesting problems to be solved.

Voir la discussion à page 521

R E F E R E N C E S

- BEIJRINCK M. W., *Oxidation of mangano-carbonate by microbes.* « Proc. Sect. Sci. », Koninkl. Acad. Wetenschap., Amsterdam. 16, 397-401 (1913).
- BOISCHOT P. and DURROUX M., *Fixation du fer et du manganèse dans les sols calcaires.* Compt. Rend. Paris. 229, 380-381 (1949).
- GERRETSEN F. C., *Manganese deficiency of oats and its relation to soil bacteria.* « Ann. of Botany ». 1, 207-230 (1937).
- JONES L. P. H. and LEEPER G. W., *The availability of various manganese oxides to plants.* « Plant and Soil ». 3, 141-153 (1951).
- LEEPER G. W., *Manganese deficiency of cereals: plot experiments and a new hypotheses.* « Proc. Roy. Soc. ». Victoria. 47, 235-261 (1935).
- LEEPER G. W., *The forms and reactions of manganese in the soil.* « Soil Sci. ». 63, 79-94 (1947).
- MASCHHAUPT H., *Das Rätsel der Dörrfleckenkrankheit.* « Z. f. Pflanz. Ern. Düng. ». B. 13, 313-320 (1934).
- MULDER E. G. and GERRETSEN F. C., *Soil manganese in relation to plant growth.* « Advances in Agron. ». 4, 221-277 (1952).
- SÖHNGEN N. L., *Umwandlungen von Manganverbindungen unter dem Einfluss mikrobiologischer Prozesse.* Centr. Bakteriol. Parasitenk. Infektionskrankh. II. 40, 545-554 (1913).
- TIMONIN M. J., *Microflora of the rhizosphere in relation to manganese deficiency disease of oats.* « Soil Sci. », Soc. America Proc. 11, 284-292 (1946).

OLIGOELEMENTOS EN LAS BACTERIAS

LORENZO VILAS

Creo que convendría que precisasemos qué elementos debemos considerar como oligoelementos y cuáles como macroelementos. Me doy cuenta de las dificultades que esto presenta ya que existen evidentemente elementos químicos con función mixa, es decir plástica y catalítica según los casos. Pero insisto en que será útil hacer la distinción correspondiente. Mi idea es que no deben considerarse en general como oligoelementos las once elementos químicos siguientes: C, H, N, O, Cl, S, P, Na, K, Ca y Mg.

Hace ya tiempo que la importancia de los oligoelementos en el metabolismo animal y en el vegetal ha sido reconocida, encontrándose numerosos trabajos acerca de ello. Mas recientemente, se ha visto el efecto que la carencia de algunos oligoelementos produce en el crecimiento de los hongos, y de aquí se han obtenido consecuencias prácticas de tipo bioanalítico (Mn, Zn, Co, en suelos por el *Aspergillus niger*, etc.), por lo que, se han intensificado los estudios acerca de los oligoelementos en los hongos.

Respecto a la acción de estos elementos sobre las bacterias, poco se ha hecho y los datos aislados no han sido todavía sistematizados, pues no son suficientes para establecer un cuerpo de doctrina.

Nuestro propósito, por consiguiente, no va más allá de llamar la atención acerca de la importancia que los oligoelementos puedan tener en la vida bacteriana e inversamente el papel que las bacterias

desempeñan en la circulación de los oligoelementos en la naturaleza, y aun el del importantísimo efecto que sobre la síntesis de la materia orgánica pueden tener las bacterias, valiéndose de los oligoelementos.

En el concepto de oligoelementos influyen las ideas de ARNON, utilizadas por LAVOLLAY (1953):

1) su carencia debe hacer imposible la reproducción y el ciclo vegetativo;

2) la carencia no puede ser evitada más que añadiendo el propio elemento;

3) el elemento debe influir directamente sobre el metabolismo del organismo y no sobre su medio de cultivo.

A nadie se oculta la dificultad de poder demostrar estos tres caracteres en el caso de las bacterias.

La presencia de oligoelementos en las bacterias, acusada por el análisis de sus cenizas puede verse en los datos de CURRAN, BRUNSTETER y MYERS (1943), obtenido por vía espectográfica. Se acusa la presencia de Mg, Fe, Al, Cu, Mn y B, en cantidades variables, según el elemento y la bacteria, como puede apreciarse en el cuadro n. 1.

Estos elementos pueden obtenerlos las bacterias de los medios de cultivo, según puede verse en el cuadro n. 2, debido a STEINBERG (1938).

La importancia de cada uno de estos elementos en la vida de las bacterias, es objeto de estudio su la actualidad, porque no hay constancia clara de su acción. Un resumen de estas acciones puede verse en la obra de PORTER (1946); desde esa fecha no se ha adelantado mucho en el conocimiento de los oligoelementos de las bacterias, aunque hay estimables aportaciones parciales, como son las de WEBB (1949, 1950, 1951) sobre la influencia del Mg en la división celular de las bacterias, las de POTTER y NELSON (1953) sobre el papel del Ca en la proliferación del bacteriófago del Streptococo láctico, las de WARING y col. (1953) sobre el Fe en la Brucella suis, y las de ROCHFORD y MANDLE (1953) sobre la influencia del Mg en la producción de cadenas por el Diplococcus pneumoniae.

TABLA I — Composición inorgánica elemental de células vegetativas y esporas, determinada por análisis espectrográfico

CURRAN, BRUNSTETTER Y MYERS, 1943

Organismo	Partes por millón de peso seco									
	Fe Veg	Fe Esp	Al Veg	Al Esp	Cu Veg	Cu Esp	Mn Veg	Mn Esp	B Veg	B Esp
Bacillus coherens	560	120	90	300	40	480	40	80	5	10
Bacillus cereus	60	170	30	430	20	150	20	30	—	—
Bacillus subtilis	100	120	100	90	80	90	20	60	5	10
Bacillus macerans	140	220	390	230	50	260	30	40	5	20
1503 *	180	80	450	120	40	80	30	60	—	—
1518 *	200	130	240	120	40	110	60	70	7	1
Clostridium sporogenes	470	—	171	15	14	—	8	—	—	—
Medio	117	—	—	—	24	—	85	—	140	—

* 1503 y 1518 son termófilos.

TABLA 2 — Presencia de varios elementos traza en compuestos orgánicos usados para cultivos de microorganismos

STEINBERG, 1938

Substancia

	I										II				III				IV				V				VI			
	Li	Na	K	Cu	Ag	Mg	Ca	Zn	Sr	Ba	B	Al	Si	Ti	Sn	Pb	P	V	V	Mn	Fe	VII	Mn	Fe	VII	Mn	Fe	VII	Mn	Fe
Bactopectona Dílico	+	+	+	—	—	+	—	+	—	+	+	—	—	+	—	—	+	—	—	+	—	—	+	—	—
Peptona W Witte	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Extracto de malta Dílico	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Extracto de lev. Dílico	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
i— Inositol Pfanstiehl	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Caseina Pfanstiehl	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

÷' = Traza fuerte; ÷? = Dudososo; — = Negativo, o no anotado.

= Demostrado con un espectrógrafo de cuarzo de gran tamaño y arco de carbón. Bausch & Lomb

La presencia de estos elementos en las bacterias puede ser permanente o simplemente temporal, y en este segundo caso tener una influencia favorable sobre el curso de la vida bacteriana, o bien oponerse a ella de un modo parcial, con fenómenos de inhibición, o total, causándoles la muerte. Es muy difícil diferenciar la condición de permanente o temporal de un oligoelemento que se encuentra en la bacteria; por esto, creemos que en una acepción amplia, debe admitirse como elemento traza siempre que en el análisis no se acuse su presencia.

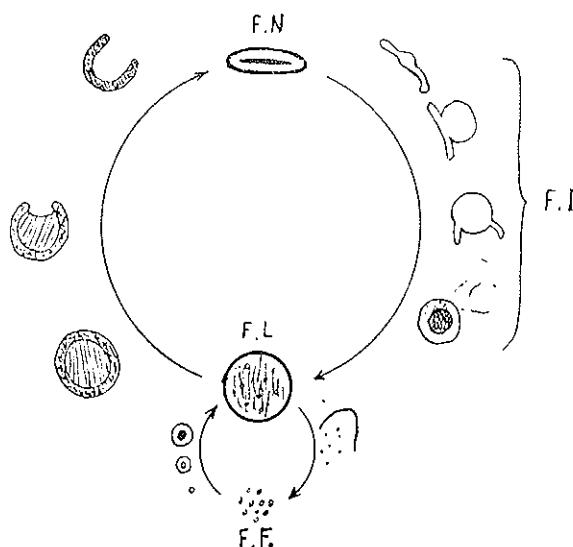
La acción negativa de la presencia temporal de un oligoelemento en la bacteria es bien conocida. Ha dado lugar a la denominación genérica de acción oligodinámica de los metales y se ha utilizado en la práctica para la esterilización parcial o total del agua, de la leche y de otros medios. No insistiremos sobre esta acción, que es de todos conocida y nos limitaremos a exponer una experiencia realizada por GASTON DE IRIARTE (comunicación particular), quien ha hecho resaltar la acción oligodinámica de la plata existente en los hilos metálicos de los billetes de banco españoles. Por el simple contacto del billete de banco con la superficie del medio de cultivo sólido, sin que el alambre de plata se pusiese en contacto directo con éste, se producía una zona de inhibición en el cultivo que se extendía a unos cinco milímetros a cada lado del alambre; es posible que pudiera utilizarse prácticamente esta experiencia para disminuir la flora bacteriana que siempre recubre al papel moneda, valiéndose de un coloide argéntico que pudiera mezclarse con la pasta de papel.

La posible acción tóxica de los oligoelementos, puede deberse a su combinación con los complejos orgánicos y enzimas de las células bacterianas, compitiendo con el H y desplazandole, según permiten suponer los trabajos de LAC LEOD (1954) que estudió el poder tóxico del litio y del zinc a distintos pH.

Pero la acción no es siempre letal o simplemente inhibidora, sino que muchas veces provoca modificaciones en las bacterias o en sus colonias, como puede verse en el trabajo de WEED y LOUNG-FELLOW (1954) que han producido colonias enanas valiéndose de

trazas de Cu, conservándose este enanismo aun después de haber desaparecido el Cu; la influencia se transmite a la descendencia.

Las modificaciones morfológicas pueden ser una manifestación de una transformación más honda, causante de todo un ciclo biológico por el que pueden pasar bajo la influencia de factores externos. La existencia de estos ciclos ha sido reconocida, merced a la



Esquema del ciclo L.—F. N. = forma normal. F. I = formas intermedias. F. L. = forma L gigante. F. F. = forma L enana o forma filtrable.

observación de algunos de sus estadios, representados por las llamadas formas L; la aparición de éstas por la influencia del litio ha sido observada por KLIENEBERGER-NOBEL (1949) y por KNAYSI (1951) trabajando con el Mg. Nosotros hemos podido provocar la aparición del ciclo también por otros medios (VILAS, TEJERINA, RUBIO, 1954), (RUBIO, KÜSTER, FLAIG, 1955) habiendo llegado a la siguiente configuración de dicho ciclo para el *Pseudomonas fluorescens* y *Proteus vulgaris* (ver fig. 1).

La explicación de este ciclo puede achacarse a la defensa de la bacteria frente al agente que se introduce en su metabolismo perturbándolo, de modo que, en las nuevas formas que adopta, debidas a una reagrupación del material nuclear, no son sensibles al ataque del elemento extraño; el cierre del ciclo es posible eliminando del medio dicho agente.

El tercer punto que queremos considerar, se refiere a la influencia de las bacterias en la circulación de los oligoelementos en la naturaleza. Se conoce la actividad importante que las bacterias desarrollan en el suelo, para transformar, en unión de otros microorganismos, la materia orgánica que al mismo llega, en compuestos más sencillos, en otros de naturaleza inorgánica y en el propio plasma de las bacterias. Sólo con esta actividad, ya se presume, que las bacterias impulsan la circulación de los oligoelementos existentes en la materia orgánica original; pero, en el ataque a esta materia orgánica se producen ácidos y anhidrido carbónico que, disueltos en el agua del suelo, atacan a las rocas y minerales de éste, movilizando sus componentes. Una prueba cuantitativa de esta acción puede verse en los clásicos trabajos de STOKLASA.

La acción nitrificante de las bacterias va acompañada de una movilización simultánea de bases metálicas necesarias para neutralizar el ácido formado. La tabla n. 3 nos muestra esta acción observada por HOPKINS y WHITING.

La propia nitrificación es favorecida por los oligoelementos movilizados, según se deduce de la nota publicada por LEES y MEIKLEJOHN (1948) en la Rothamsted Experimental Station; estos investigadores experimentaron con hierro, cobre, zinc, litio, boro, aluminio, estaño, manganeso, níquel, cobalto, titanio, yodo y bromo. Según VERONA (1941) la acción del Mo parece notablemente superior a la ejercida por los otros oligoelementos sobre la nitrificación, demostrando también que el ácido fosfomolítico y el molibdato amónico, en pequeñas dosis, estimulan la nitrificación. Cuando

el litio está presente en cantidades mayores al 5 por mil, deprime la nitrificación.

TABLA 3 — Solución de fosfato y calcio del fosfato tricálcico por nitrificación del sulfato amónico en solución de cultivo.

HOPKINS Y WHITING

Nitrógeno oxidado mgm.	Fósforo hecho soluble mgm.	Calcio hecho soluble mgm.
2.54	4.08	3.87
3.81	5.08	5.60
4.88	10.20	18.40
5.52	9.56	14.80
6.40	12.85	22.00
6.40	10.24	23.52
6.88	16.00	31.04

La necesidad de Fe para la fijación simbiótica del N por el *Rhizobium* fué demostrada por VIRTANEN (1945), quien, junto con ELLFOLK, vieron que el Mg era un componente fundamental de la aspartasa, enzima que se encuentra en los microorganismos bacterianos y que regula la reacción de ácido fumárico a ácido aspártico con fijación de amoniaco, camino muy importante para la biosíntesis de aminoácidos.

También el acetolacter xilinum se sirve del Fe para el proceso de biosíntesis de celulosa.

El caso del Cobalto es muy conocido por la importancia de la vitamina B_{12} en la fisiología de los animales. La deficiencia de Co en los rumiantes produce graves trastornos y probablemente se debe a la no disponibilidad de Co por las bacterias del rumen encargadas de la síntesis de la vitamina B_{12} , que es absorbida después por el animal. Son de gran interés a este respecto los trabajos de TOSIC y MITCHELL (1948).

El autor de esta nota tiene que reconocer que el estudio de los oligoelementos en las bacterias está en su iniciación. Solamente algunos puntos parciales están aclarados, pero, el gran papel que las bacterias desempeñan en la circulación general de los elementos en la naturaleza y la parte que en esta actividad corresponde a los oligoelementos, está sin estudiar. Sería deseable que se comprendiese un estudio en colaboración, por parte de Instituciones dedicadas a la Microbiología y a la Edafología, para que se aclarase este aspecto de la naturaleza y pudiera utilizarse sus conclusiones en la doctrina y práctica de la fertilidad.

Voir la discussion à page 531

B I B L I O G R A F I A

- ARNON D. I., *Trace elements in Plant Physiology.* « Chronica Bot. Cy. », 1950.
- CURRAN, BRUSTETTER y MYERS, *Elementary morganic composition of vegetative and spore cells as determined by spectrographic analysis.* PORTER, op. cit., 1946.
- DUNN G. C., *Effects of some salts on the germicidal action of high voltage cathode rays towards micrococcus pyogenes var. aureus.* « J. Bact. », 66, 421, 1953.
- FARKAS H., *Comparative action of promine and iodine toxic enzymes of staphylococcus aureus and streptococcus pyogenes.* « J. Bact. », 53, 401, 1947.
- KLIENEBERGER-NOBEL E., *Origin, development and significance of L forms in bacterial cultures.* « J. Gen. Microbiol. », 3: 334, 1949.
- KNAYSI, *Elements of bacterial cytology.* Ithaca. N. Y., 1951.
- LAVOLLAY J., *Les oligoéléments dans la nutrition et la croissance des micro-organismes.* Symposium Nutrition. VI Congresso Inter. Microbiol. Roma, 1953.
- LEES H. y MEIKLEJHON J., *Trace elements and nitrification.* « Nature », 161, 398, 1948.
- LILLY Virgil Greene & LEONIAN Leon H., *The interrelationship of iron and certain accessory factors in the growth of Rhizobium trifoli, strain 205.* « J. Bact. », 50, 383, 1945.
- MACLEOD A. R., *Dependence of the toxicity of cations for lactic acid bacteria on pH and inoculation time.* « J. Bact. », 67, 23, 1954.
- MACLEOD R. A. & SNELL F., *The relation of ion antagonism to the inorganic nutrition of acid lactic bacteria.* « J. Bact. », 59, 283, 1950.
- MORTON E. H. y otros, *Selective action of thallium acetate and crystal violet for pleuropneumonialike organisms of humain origin.* « J. Bact. », 66, 646, 1953.
- PERLMAN David, *Some effects of metallic ions on the metabolism of aerobacter aerogenes.* « J. Bact. », 49, 167, 1945.
- PEROTTI R. y VERONA O., *Azione dei sali di arsenico sulla microflora del terreno.* « Annali Facoltà di Agraria Università di Pisa », Vol. II, 32, 1939.
- POTTER N. E. y NELSON F. E., *Role of calcium and related ions in proliferation of lactic Streptococcus bacteriophagus.* « J. Bact. », 66, 508, 1953.
- SNELL Esmond E., *The nutritional requirements of the lactic acid bacteria and their application to biochemical research.* « J. Bact. », 50, 373, 1945.
- STEINBERG, *Presence of several trace elements in organic compounds used culture microorganisms.* POTTER, op. cit., 1946.
- STEPHENSON M., *Bacterial metabolism.* Longmans, Londres, 1950.
- STOKLASA y DOERRELL: *Biophysikalische und biochemische Durchforschung des Bodens.* Paul Parey, Berlin 1926.
- ROCHFORD E. J. & MAUDLÉ R. J., *The production of chains by diplococcus pneumoniae in Mg deficient media.* « J. Bact. », 66, 554, 1953.
- RUBIO HUERTOS M., KUSTER E. y FLAYG W., *Licht- und electronenmikroskopische Untersuchungen an L-Formen bei Pseudomonas fluorescens, B. proteus und Rhizobium.* « Zenbtt. für Bakt. Erst. Abt. », 162, 1955.

D'après PAPPENHEIMER Jr. [65], la vitesse de croissance du bacille diphtérique et la production de sa toxine sont faibles lorsque la teneur en fer du milieu est très basse. Lorsqu'on augmente la concentration de Fe^{++} , la croissance et la production de toxine augmentent et passent par un maximum correspondant à 0,01 mg de Fe pour 100 cm³. Une porphyrine accompagne la toxine et lorsque la teneur en Fe^{++} du milieu est encore augmentée, la croissance du bacille est améliorée, mais la toxine et la porphyrine disparaissent à mesure que le Fe^{++} augmente. L'auteur pense que la toxine est probablement la fraction protéique d'un enzyme porphyrinique du bacille.

Dès 1912, JAVILLIER a montré que la sucrase est synthétisée en quantité restreinte lorsque *Aspergillus niger* est cultivé sur des milieux carencés en zinc. FOSTER et DENISON [66] ont trouvé que le zinc est nécessaire à la synthèse de la carboxylase pyruvique chez *Rhizopus nigricans*; le zinc est peut-être un constituant de cet enzyme.

Chez *Neurospora*, la carence en zinc restreint la synthèse des enzymes synthétisant les enzymes protéiques et, de ce fait, la synthèse des protides. NASON [67] a montré que l'activité d'un enzyme synthétisant le tryptophane à partir de l'indole et de la sérine est supprimée chez *Neurospora* privé de zinc. Les synthèses d'autres enzymes de cet organisme réclament également le zinc: par exemple celle de la déshydrogénase alcoolique; tandis que la carence en zinc conduit à une forte élévation de l'activité de la diphosphopyridine-nucléotidase [68]. La métaphosphatase d'*Aspergillus niger* n'est active que si le zinc est présent à de très basses concentrations et il suffit de 0,65 mg de Zn^{++} par litre pour supprimer son activité (KRISHNAN et BAJAJ) [69].

ELVEHJEM [70] a établi que le cuivre est indispensable à la formation du cytochrome *a* de la levure; la synthèse des cytochromes *b* et *c*, par contre, n'est pas sensible à la carence en Cu^{++} .

Il semble bien que des traces infimes de cobalt permettent à des bactéries comme *Lactobacillus lactis* et *Staphylococcus griseus* de synthétiser un facteur de croissance essentiel ou la vitamine B₁₂ (HENDLIN et RUGER) [71]. En tout cas, sous forme de vitamine B₁₂

nique. L'auteur pense que le B est un oligo-élément essentiel à la formation de l'inositol, lui-même métabolite essentiel.

D'autre part, il semble bien établi que le B active la fixation de l'azote par *Azotobacter chroococcum* et par *Nostoc muscorum*.

EFFETS SUR LES SYSTÈMES ENZYMATIQUES

Les indications les plus précises sur le rôle des oligo-éléments sont obtenues par l'étude des systèmes enzymatiques des micro-organismes cultivés sur des milieux « complets » et, comparativement, sur des milieux carencés en un oligo-élément.

Un certain nombre de systèmes enzymatiques comprennent un métal dans leur constitution. La carence en certains oligo-éléments conduit ainsi à un défaut des enzymes dont ces éléments sont des constituants obligatoires. Ceux qui contiennent du Fe ne peuvent être évidemment édifiés que si le milieu apporte cet élément en concentration suffisante. La cytochrome oxydase, les cytochromes, les peroxydases et la catalase sont dans ce cas. Les beaux travaux de WARING et WERKMAN [63] ont établi que les concentrations en Fe^{++} requises pour la croissance de *Pseudomonas aeruginosa*, qui possède un système au cytochrome perfectionné, sont quatre fois plus importantes que celles qui sont requises par *Aerobacter indologenes*, dont le système au cytochrome est plus primitif. Les besoins sont également faibles pour *E. coli* et *Klebsiella pneumoniae* qui ont un système au cytochrome incomplet ou primitif. Cultivées dans des milieux carencés en fer, les bactéries ne contenaient plus que des traces de cytochrome, de catalase et de peroxydase.

En outre, la déshydrogénase de l'acide formique, ainsi que l'enzyme qui scinde la molécule d'acide formique en CO_2 et H_2 , avaient à peu près complètement disparu.

Depuis, AUBEL, ROSENBERG, SZULMAJSTER [64] ont montré que, dans des milieux pauvres en Fe^{++} ($30 \mu\text{g}$ pour 100 cm^3), *Escherichia coli* (anaérobiose facultatif) se développe bien, alors que *Clostridium saccharobutyricum* (anaérobiose strict) ne donne pas de culture. Pour rétablir la croissance de ce dernier il fallait opérer en atmosphère d'hydrogène activé.

important de la présence de flavine dans le milieu (LAVOLLAY et Mme LABOREY) [55].

Un autre exemple est constitué par la production de la pyocyanine par *Pseudomonas aeruginosa*. BURTON, CAMPBELL et EAGLES [56] ont montré qu'elle dépend de la concentration en Fe^{++} du milieu; le maximum de pyocyanine apparaît pour des teneurs en Fe^{++} comprises entre 5 et 50 p.p.m. de $\text{SO}_4\text{Fe}_7\text{H}_2\text{O}$.

Pour l'assimilation de l'ion glutamique, GALE [57] a montré que *Bacillus subtilis* réclame Mn^{++} ; la carence en Mn^{++} a pour résultat une chute de la teneur en acide glutamique. Mg^{++} peut remplacer Mn^{++} dans cette fonction, mais il en faut beaucoup plus.

GABRIEL BERTRAND avait trouvé (1912) que Mn^{++} est essentiel à la sporulation chez *Aspergillus niger*, les concentrations requises étant plus élevées que pour le maximum de croissance. Ce fait est amplement confirmé. La nécessité de Mn^{++} pour la sporulation de plusieurs espèces du genre *Bacillus* a été récemment établie par CHARNEY, FISHER et HEGARTY [58]; la concentration requise est également plus forte que celle qui conduit à la croissance végétative maxima (*Bacillus subtilis*).

Pour la division cellulaire, Mg^{++} est indispensable. Mn^{++} peut remplacer en partie Mg^{++} pour cette fonction. Les importants travaux de WEBB [59] montrent que la carence en Mg^{++} conduit, chez les bactéries, à des formes filamenteuses.

FINKLE et APPLEMAN (1953) [60] ont retrouvé cette particularité de la carence en Mg^{++} chez *Chlorella*, dont les processus de multiplication cellulaire réclament une plus forte concentration en magnésium que la production des constituants cellulaires. C'est peut-être la séparation des cellules qui, dans le cas de carence magnésienne, ne s'établit pas.

D'autre part, les besoins en Mg^{++} des bactéries Gram+ sont très supérieurs à ceux des bactéries Gram-. Cette dernière découverte est à rapprocher de celle de GEORGE et PANDALAI [61] établissant que la réaction Gram+ est associée à la présence de ribonucléate de Mg dans les corps microbiens.

Suivant ROSENBERG [62], le métabolisme de *Clostridium saccharobutyricum* exige la présence de B, si le milieu ne renferme pas de méso-inositol, lorsque les cultures sont inhibées par l'ion malo-

(NICHOLAS et FIELDING) [48]; (HEWITT et HALLAS) [49] est d'une très grande finesse. Dans leur très belle étude, HEWITT et HALLAS peuvent détecter la présence de 0,00015 µg de Mo (*).

D'après MULDER [47] les besoins en Fe^{++} de la moisissure sont plus élevés lorsque la seule source d'azote est constituée par des nitrates; le fer paraît donc jouer un rôle dans leur réduction.

Le développement d'*Aspergillus niger* étant proportionnellement plus abaissé par les carences en plusieurs oligo-éléments, lorsque l'atmosphère renferme du CO_2 , STEINBERG [50] estime que zinc, cuivre et manganèse ont un rôle dans l'utilisation du CO_2 par cette moisissure.

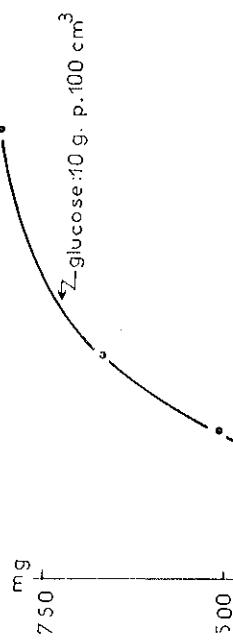
Certains pigments sont formés en quantités très différentes suivant la concentration de plusieurs oligo-éléments. Le fer, le manganèse, le zinc, le cuivre interviennent dans la coloration des conidies d'*Aspergillus niger*. Une interaction, déjà signalée en 1912 par GABRIEL BERTRAND, existe à cet égard entre le fer et le manganèse. L'effet du cuivre sur la pigmentation des conidies — signalé par JAVILLIER (1914) [12] — a été étudié par BORTELS [16], puis par MULDER [53], qui en a déduit une élégante méthode pour le dosage biologique du cuivre.

Un pigment jaune complexe, la chrysogénine, diffuse dans les milieux de culture de *Penicillium chrysogenum* et *Penicillium notatum*; sa quantité est liée à la teneur en Zn^{++} du milieu (FOSTER, WOODRUFF et MAC DANIEL) [54].

Nous avons trouvé que différentes souches d'*Aspergillus niger*, cultivées sur divers milieux, laissent diffuser dans le liquide de culture de la *lactoflavine* à condition que la concentration relative du magnésium soit restreinte. Il y a, à cet égard, une concentration optimale du magnésium qui dépend de la concentration du zinc, ce qui montre encore l'importance du rapport $\text{Mg}^{++}/\text{Zn}^{++}$ pour la physiologie du microorganisme. Le fer joue ici aussi un rôle, comme dans la production de flavines par les *clostridies*. Nous avons trouvé, en outre, que la présence d'azote nitrique est aussi un facteur

(*) Certaines souches sont particulièrement sensibles au molybdène et au cuivre (SADASIVAN et SUBRAMANIAN) [51].

Milieu LL. avec mélange d'oligo-éléments.
Glucose varié.



Milieu LL. sans le mélange d'oligo-éléments. Glucose varié.

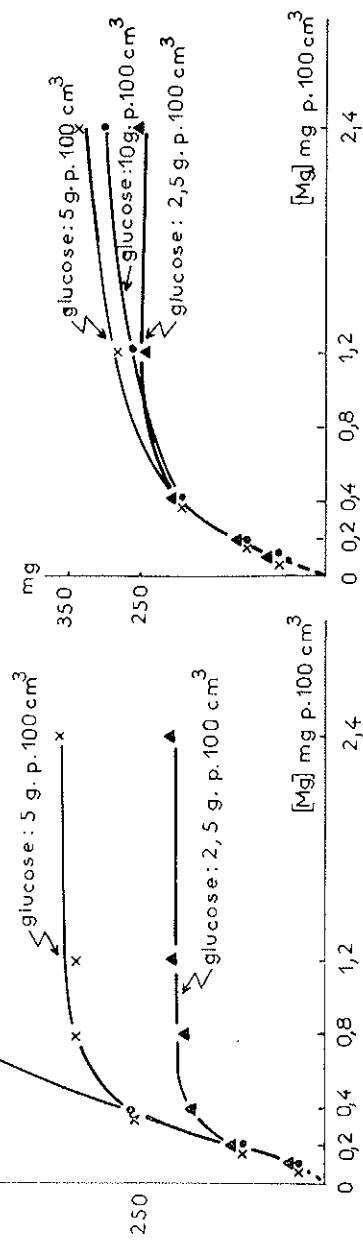


Fig. 1.2

EFFETS SUR LES CARACTÈRES PHYSIOLOGIQUES
DES MICROORGANISMES

D'autres renseignements sont tirés de l'étude des activités physiologiques des microorganismes cultivés en présence de quantités variées de l'élément essentiel.

Chez *Aspergillus niger*, l'utilisation de l'aliment carboné dépend de la présence des oligo-éléments dans le milieu. La figure 12 montre les courbes de récoltes sur des milieux renfermant des quantités différentes de glucose. Si les oligo-éléments ne sont pas ajoutés, les courbes de récolte en fonction de Mg^{++} sont très voisines. Si les oligo-éléments sont ajoutés, le maximum accessible est d'autant plus important que la concentration en sucre est plus grande.

Le rendement économique de cette moisissure (PFEFFER) — rapport de la masse de mycélium sec à la masse de sucre dégradé — est déprimé par la carence en zinc (JAVILLIER, 1912). Le métabolisme est alors dévié vers la production d'acides organiques. Les travaux concernant les oligo-éléments en rapport avec les fermentations acides ont un intérêt industriel qui a motivé de nombreuses recherches. La production d'antibiotiques est une autre activité des microorganismes qui dépend des oligo-éléments présents dans le milieu de culture, notamment du zinc (cf. PERLMAN).

Une activité microbienne d'une importance considérable: la fixation de l'azote atmosphérique dépend, comme l'a découvert BORTELS [44], de la présence de traces de Mo. Cette découverte est amplement confirmée. BURK et ses collaborateurs [45] ont montré que le Mo peut être remplacé, pour cette fonction, par le V chez *Azotobacter chroococcum* et *Clostridium pasteurianum*. Sur cette question de la fixation de l'azote, consulter aussi les publications de MULDER [46] [47]. Au cours de cette Semaine d'Etude MM. ARNON, GERRETSEN et VIRTANEN ont apporté à ce sujet de nouveaux faits très intéressants.

L'utilisation des nitrates par *Aspergillus niger* est sous la dépendance de traces de Mo dans le milieu (STEINBERG, MULDER, etc.). Le dosage biologique de Mo à l'aide d'*Aspergillus* cultivé sur un milieu où l'azote est présent sous forme de nitrate (MULDER) [46];

EFFETS SUR LA COMPOSITION CHIMIQUE DES MICROORGANISMES

Des variations observées dans la composition chimique des organismes qui ont été cultivés en présence de quantités variées d'un oligo-élément, peuvent fournir des renseignements sur le rôle de cet élément. GABRIEL BERTRAND et JAVILLIER avaient ainsi trouvé que Zn^{++} augmente la teneur en cendres du mycélium d'*Aspergillus niger*. C'est par l'analyse également que le rôle de Zn^{++} dans la synthèse des glucides de cette moisissure a été établi (PORGER [41], SCHULZ [42], KAUFFMANN-COSLA et BRÜLL [43]).

La méthode analytique ne permet généralement pas de savoir si les variations observées résultent d'effets directs de l'oligo-élément étudié ou si elles sont la conséquence non spécifique de l'inanition qui résulte de la restriction de l'élément indispensable.

Chez *Aspergillus niger*, NICHOLAS [29] a trouvé que la carence en Zn^{++} conduit à une diminution des teneurs en acide nicotinique libre, en acide pantothénique, en riboflavine et en biotine. Au contraire, la carence en Mn^{++} s'accompagne d'une élévation de la teneur en acide pantothénique.

Lorsque Zn^{++} fait défaut, *Aspergillus niger* renferme des acides aminés libres: leucine, acide aminobutyrique, arginine, lysine, cystéine; dans la carence en Mo aucun acide aminé libre n'a été trouvé, sauf l'acide glutamique en traces; quand le cuivre faisait défaut il y avait une élévation marquée des taux de tyrosine, de phénylalanine, de proline et d'éthanolamine.

Le cas de Co^{++} est intéressant. Sa nécessité pour *Aspergillus niger* n'a pas été démontrée. NICHOLAS a cherché si le mycélium renferme plus de vitamine B_{12} lorsque Co^{++} est offert à la moisissure. Il y en avait 10 fois plus en présence de 2 µg de Co^{++} pour 100 cm³, que chez le témoin cultivé sur le milieu très purifié; mais le développement de l'organisme n'en était pas modifié et l'on peut penser que B_{12} est « peut-être un sous-produit du métabolisme ».

plus renfermer une quantité « *insuffisante* » d'un autre ion indispensable. Les besoins demandent à être étudiés à l'aide de *milieux simples*, ne renfermant que les éléments strictement indispensables, puisque les faits qui viennent d'être évoqués montrent que d'autres éléments qui ne sont pas *nécessaires*, peuvent cependant être *utiles*. Dans les conditions de milieu assez complexes qui sont réalisées dans la nature, certains oligo-éléments non indispensables *stricto sensu* interviennent certainement comme *régulateurs* du développement. Certains ions non indispensables peuvent remplir, en partie, certaines des fonctions des ions strictement indispensables et peuvent ainsi diminuer l'importance du *besoin*, telle qu'elle est déterminée par des expériences en milieux simples et purifiés. Mais il peut se faire aussi, dans les conditions naturelles, que des éléments indispensables ou non, mais relativement trop abondants, augmentent par compétition avec des ions indispensables, les besoins en ces derniers.

RÔLE DES OLIGO-ÉLÉMENTS INDISPENSABLES

Les oligo-éléments indispensables doivent leur nécessité au fait qu'ils ont des propriétés de catalyseurs biochimiques. L'étude des enzymes a permis de mieux comprendre leur rôle dans le métabolisme: ces éléments sont indispensables à la production d'enzymes, ou bien ils sont les activateurs de systèmes enzymatiques, ou eux-mêmes sont des co-enzymes. Ainsi les conceptions de RAULIN, de GABRIEL BERTRAND et de JAVILLIER se sont-elles vérifiées en se précisant.

Plusieurs excellentes revues ont été récemment consacrées à leur rôle. Il faut citer le grand travail de FOSTER [38], l'article de SCHOPFER [28], la revue de HEWITT [39], qui concerne les plantes chlorophylliennes et les microorganismes: la revue de PERLMAN [40], etc.

Les acquisitions étant, dans ce domaine, nombreuses et très disparates, on se bornera à indiquer ici les grandes voies de la recherche et à citer quelques exemples.

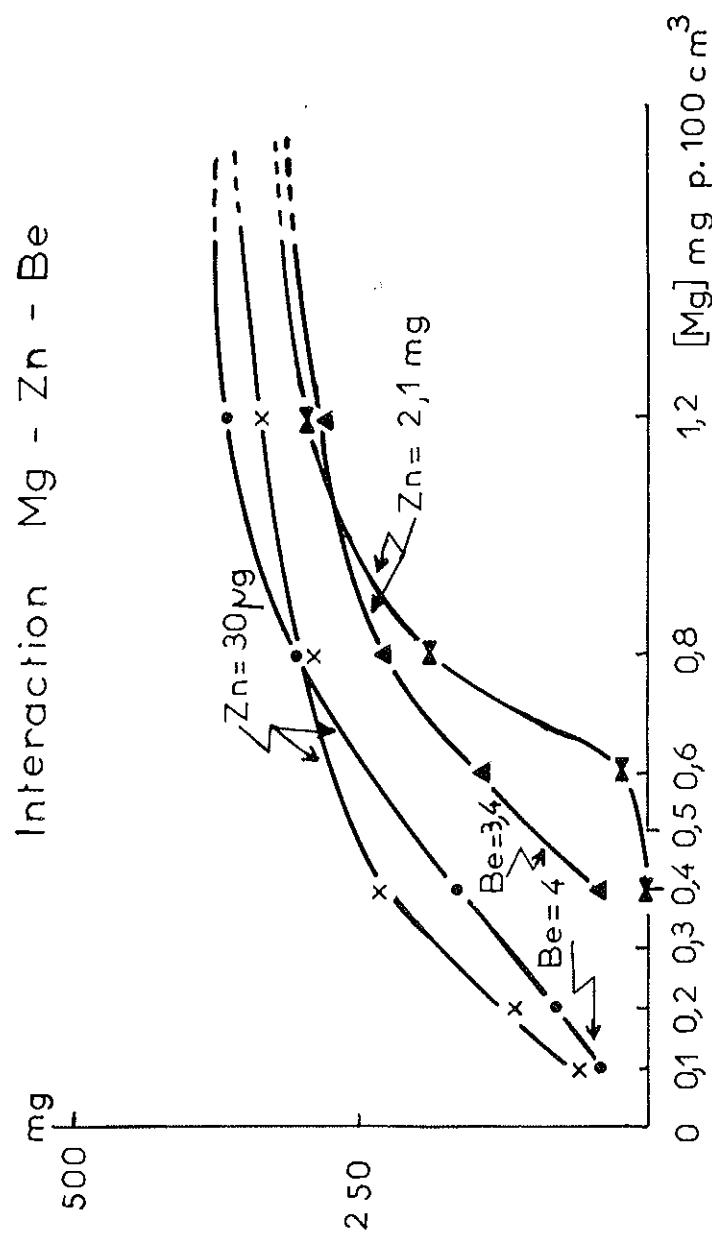
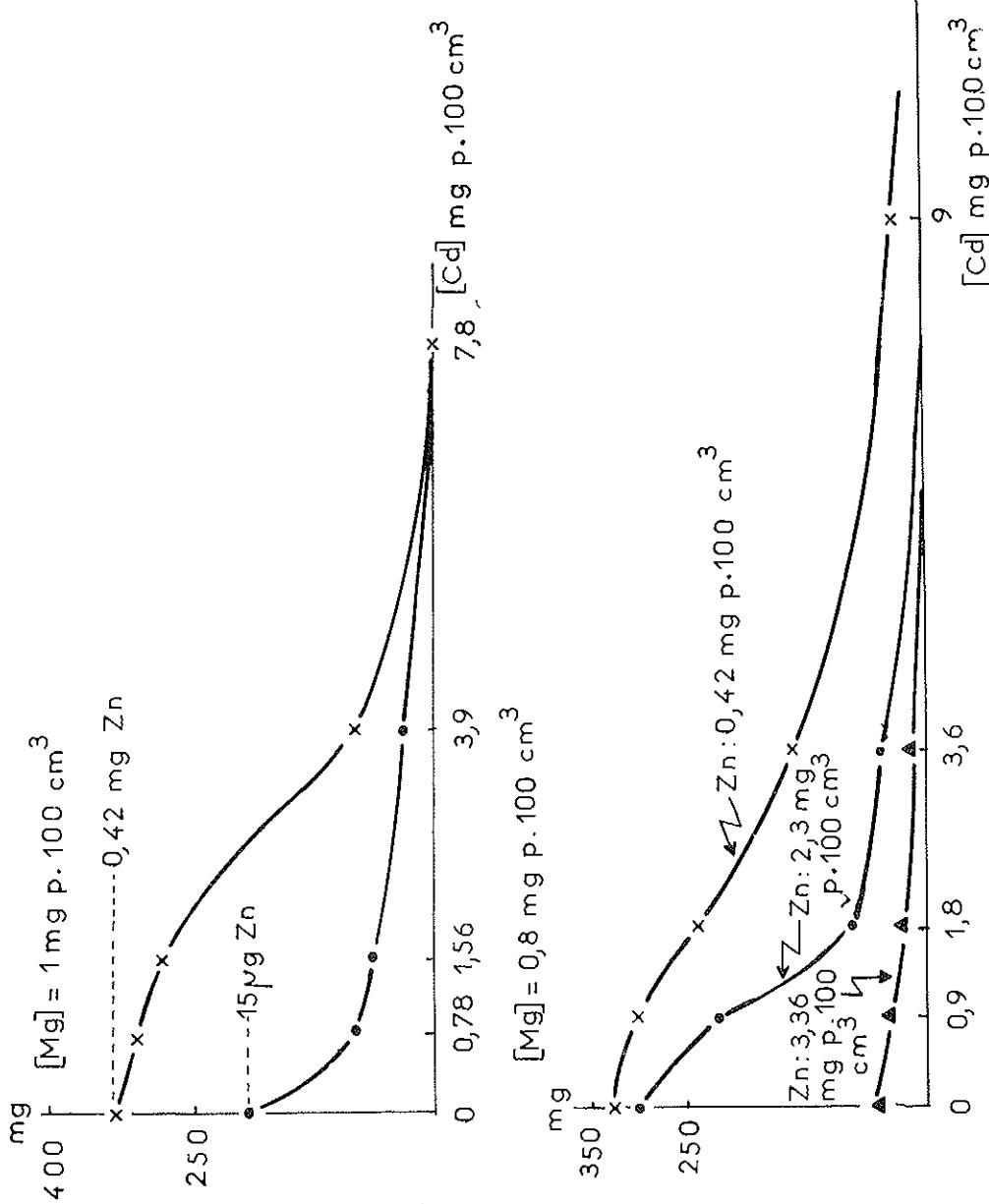


FIG. XI

Interaction Mg - Zn - Cd.



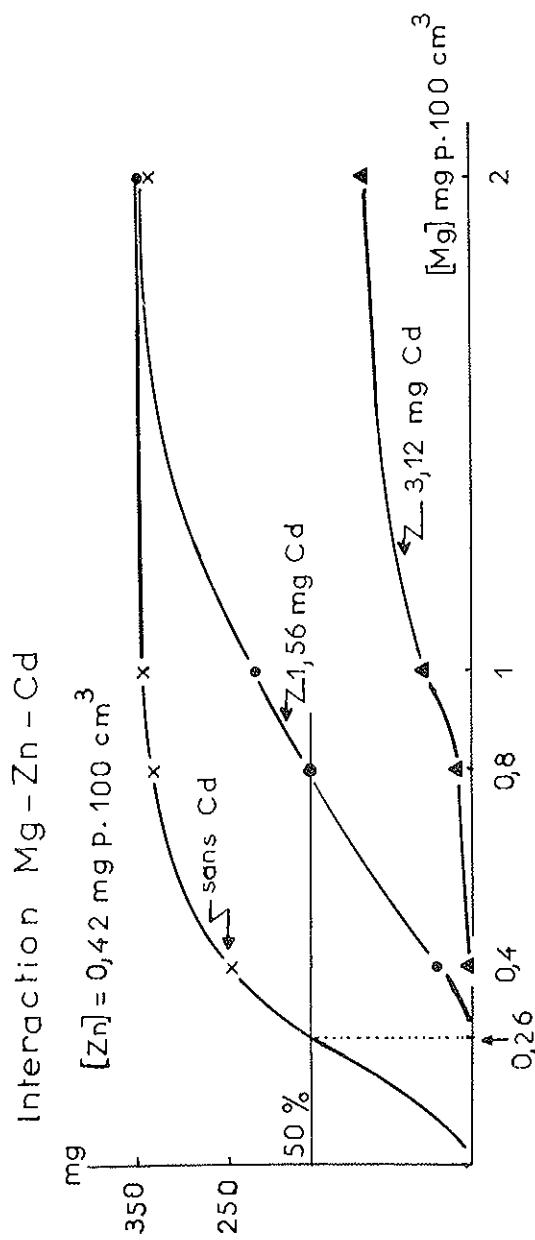


FIG. 9

tré MAC LEOD augmentent les besoins en Mn^{++} de *Lactobacillus arabinosus*, l'antagonisme observé résulterait du fait que l'élément ajouté vient occuper dans les cellules, et sans profit pour elles, la place de l'élément essentiel. La même interprétation a été invoquée par ABELSON et ALDOUS [37] qui ont trouvé chez *Escherichia coli*, notamment, une interférence entre le magnésium et une série d'éléments bivalents: Ni^{++} , Co^{++} , Cd^{++} , Zn^{++} et Mn^{++} .

Dans notre milieu de culture l'antagonisme Zn^{++}/Mg^{++} chez *Aspergillus niger*, déjà évoqué plus haut, se traduit par une toxicité complète de Zn^{++} à certaines concentrations, toxicité qui peut être totalement supprimée par Mg^{++} à concentration suffisante [30] (Figure 2).

Nous avons trouvé également que la toxicité de Cd^{++} , à certaines concentrations, ne se manifeste qu'au-dessous de certaines concentrations en Mg^{++} (Figure 9). Le Cd^{++} se comporte comme Zn^{++} dans son effet antagoniste de Mg^{++} (Figure 10).

A l'inverse des exemples précédents, on connaît des cas où la présence d'un ion non indispensable exerce une *action d'épargne* sur les besoins en un ion déterminé. Les exemples concernent surtout les éléments fondamentaux [32-bis]. (Actions d'épargne de K^+ , par Na^+ , Rb^+ , etc.).

Cependant MAC LEOD a montré que les besoins en Mn^{++} de *Leuconostoc mesenteroides* sont diminués par les ions Mg^{++} .

Nous avons trouvé (Figure 11) que le glucinium, dans un milieu relativement riche en zinc, exerce une action d'épargne sur les besoins en Mg^{++} . L'effet favorable du glucinium ne s'exerce que si le Zn^{++} est présent à une concentration suffisamment élevée et si la concentration de Mg^{++} est suboptimale. Son action est, en réalité, une action anti-zinc et son effet se ramène à la suppression de l'effet dépressif exercé par Zn^{++} quand Mg^{++} est insuffisant.

* * *

Les besoins en un oligo-élément doivent donc être étudiés en utilisant un milieu de culture déjà bien équilibré, ne comprenant pas un excès d'un autre ion ou de plusieurs ions capables d'entrer en interaction avec celui qu'on étudie. Ce milieu ne doit pas non

vité de Mg^{++} et de Mn^{++} sur la croissance de *Lactobacillus*. MAC LEOD a bien étudié le phénomène sur *Streptococcus faecalis* (1951). L'effet sur Mg^{++} a été confirmé par LWORFF et IONESCO (1948) [21] travaillant avec *Moraxella lwoffi* (mutant S).

D'après HUTNER [35], l'apport de citrate au milieu de culture réalise, en ce qui concerne certaines matières minérales, des conditions analogues à celles qui sont obtenues pour l'acide p.aminobenzoïque par l'introduction de sulfauides; il pense que la méthode peut être utile pour la découverte de nouveaux oligo-éléments indispensables, s'il en reste à découvrir.

La présence d'un complexeur, ou d'une quantité relativement importante d'un ion antagoniste, réalise des conditions de milieu qui peuvent faciliter ou compliquer les recherches par *augmentation artificielle des besoins*. La plus grande prudence s'impose pour l'interprétation des résultats obtenus dans des conditions semblables; les courbes d'action d'un ion essentiel peuvent être, en effet, complètement déformées par la présence d'un excès d'un autre ion (LAVOLLAY et LABOREY, loc. cit.) ou par la présence d'un complexeur (MAC LEOD, loc. cit.).

De plus, si le besoin en un ion essentiel a été accru par l'introduction d'un complexeur ou d'un ion antagoniste, toute substance capable d'entrer en liaison avec le complexeur ou de se combiner avec l'ion antagoniste doit être capable d'agir sur le développement comme l'ion essentiel lui-même: les ions essentiels antérieurement bloqués étant alors *libérés* ou *redevenant actifs* parce que leur antagoniste est déplacé. La spécificité disparaît alors. La 8-hydroxyquinoléine complexe un certain nombre d'ions métalliques et son action fongicide peut être supprimée par Zn^{++} (ZENTMEYER) [22]. Mais cela ne veut pas dire que l'effet toxique de la drogue consiste spécifiquement en l'immobilisation de Zn^{++} (*).

Pour MAC LEOD et SNELL, lorsqu'un élément apparenté à celui qu'on étudie est introduit dans le milieu, par exemple, les ions Mn^{++} par rapport aux ions Mg^{++} ou les ions Zn^{++} qui, comme l'a mon-

(*) Chez les bactéries Gram-, la toxicité de la 8-hydroxyquinoléine peut être supprimée, soit par Zn^{++} , soit par Fe^{++} soit par Cu^{++} , (ALBERT, RUBBO, GOLDACRE et BALFOUR) [36].

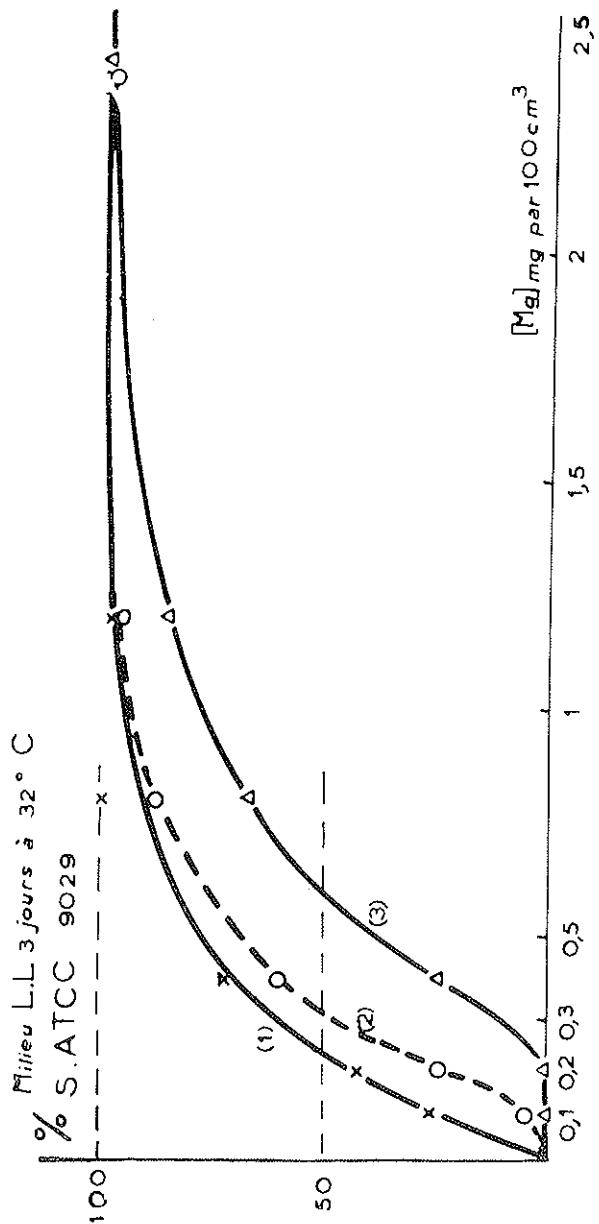


FIG. 8. — Courbes de récoltes d'*Aspergillus niger* en fonction de la concentration en magnésium. Chacun des maxima a été égalé à 100. — (1) Milieu de culture, non purifié, sans addition d'oligo-éléments. $P = 100 (1 - e^{-3x})$. — (2) Milieu de culture, non purifié, avec addition d'oligo-éléments. ($Zn = 0,45 \text{ mg } P, 100 \text{ cm}^3$). — (3) Milieu de culture, non purifié, avec oligo-éléments et excès de zinc. ($Zn = 1,35 \text{ mg } P, 100 \text{ cm}^3$).

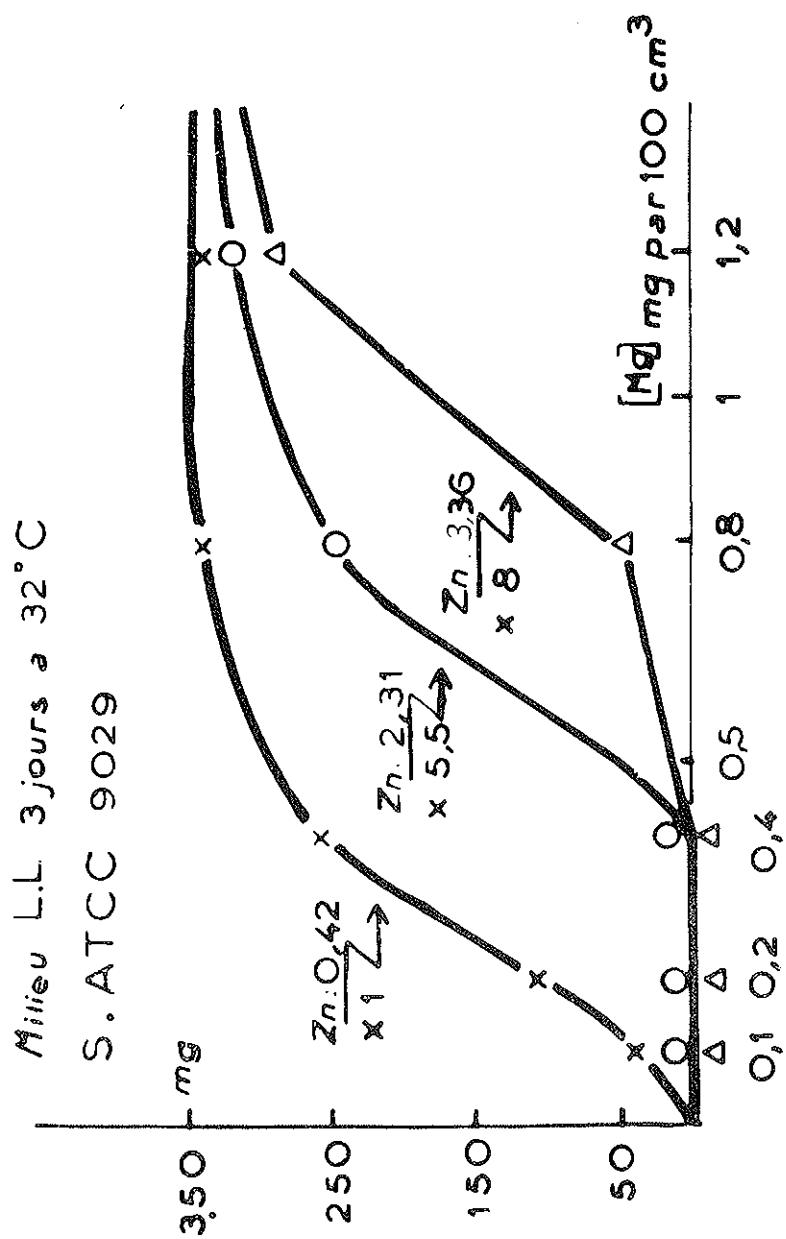


FIG. 7

Courbes d'action du Mg suivant la concentration du milieu

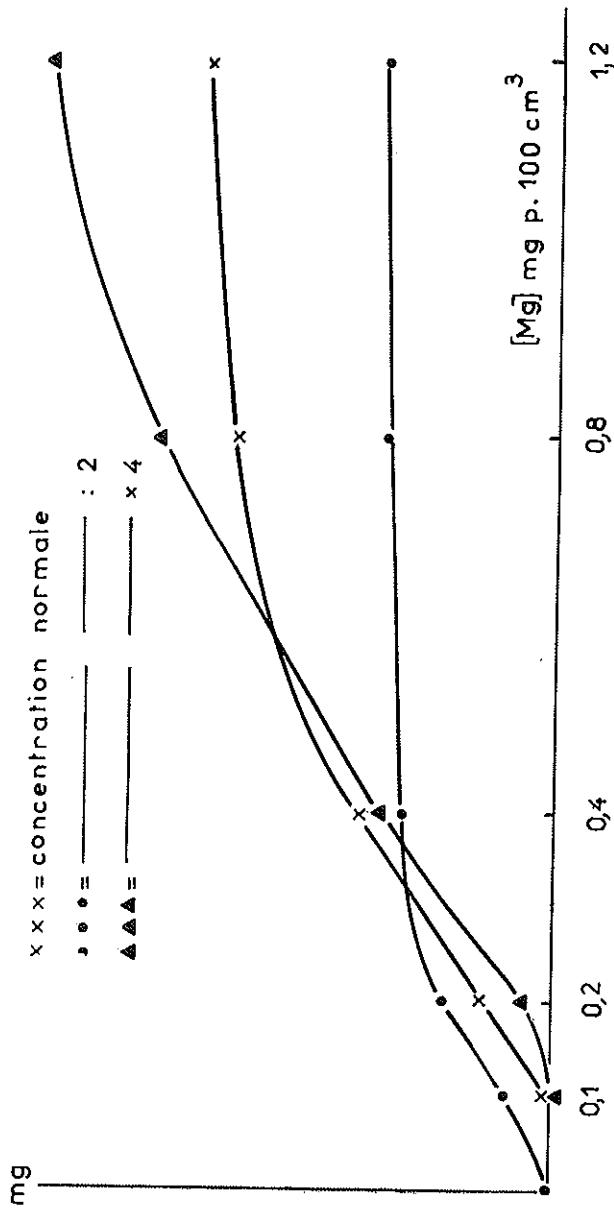


FIG. 6

Dans le même ordre d'idées, MAC LEOD a montré que le Mn⁺⁺ épargne les besoins en Mg⁺⁺ de *Streptococcus faecalis*.

La forme même des courbes d'action d'un élément indispensable peut être profondément modifiée si les concentrations des autres aliments ont varié. Ainsi, en élevant la concentration globale du milieu, on constate, d'une part, une augmentation des besoins en Mg⁺⁺ et, d'autre part, une *dépression* de la courbe d'action dans la région correspondant aux faibles concentrations en Mg⁺⁺ (Figure 6). Ce type de courbes en S est généralement considéré comme caractéristique d'antagonismes ioniques. Nous l'avons trouvé particulièrement révélateur d'une interaction Zn⁺⁺/Mg⁺⁺. (Figures 7 et 8).

Les résultats obtenus par MAC LEOD et SNELL chez les bactéries lactiques montrent également que l'activité d'un ion sur la croissance d'un microorganisme peut être modifiée suivant la concentration d'autres constituants du milieu. En effet, les besoins en Mn⁺⁺ sont accrus en présence de concentrations plus élevées de Zn⁺⁺, phénomène que MAC LEOD et SNELL interprètent comme la manifestation d'un antagonisme s'exerçant par concurrence entre les ions Mn⁺⁺ et Zn⁺⁺ pour leur liaison avec des récepteurs communs (Zn⁺⁺ antimétabolite de Mn⁺⁺). (SHU et JOHNSON [17-bis] ont mis en évidence une interaction Fe⁺⁺/Zn⁺⁺ dans la fermentation citrique.

Dans les milieux de culture des microorganismes, l'activité des ions, notamment celle des oligo-éléments métalliques, peut se trouver modifiée aussi par la présence de substances organiques qui complexent ces ions. Les anions tartrique et citrique, le glycérol et les sucres peuvent intervenir. Les éléments ne paraissent actifs que le développement que dans la mesure où ils sont *ionisés* et la présence d'un complexeur, qui ne laisse libre qu'une partie des ions, est équivalente à une restriction de la concentration de l'élément. C'est l'interprétation qui a été donnée, dès 1924-1925 par USPENSKI et USPENSKAJA [33] dans le cas de *Volvox minor* et de *Volvox globator* dont les besoins en fer sont augmentés par la présence de l'ion citrique; puis par HOPKINS et WANN (1927) [34] observant le même fait avec *Chlorella*. L'acide citrique diminue aussi l'acti-

Milieu LL 3 jours à 32°C
S. ATCC 9029

mg

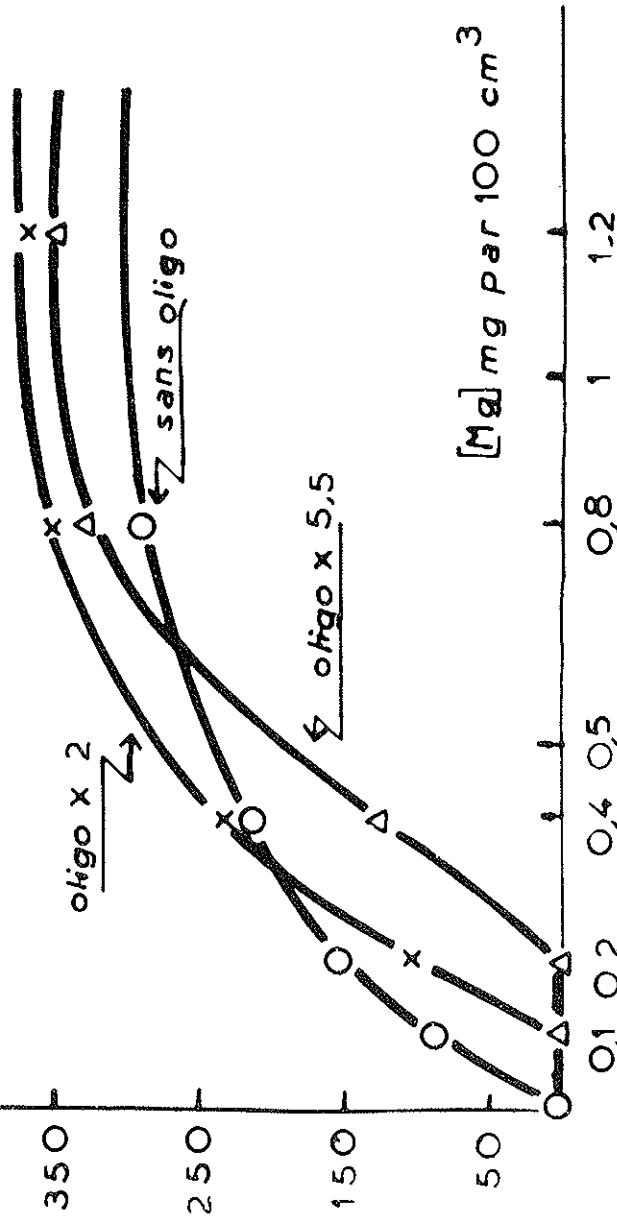


Fig. 5 — *Aspergillus niger*. Courbes de récoltes en fonction de la concentration en magnésium du milieu, correspondant à des teneurs variées en oligo-éléments. (Mélange de Fe, Mn, Zn, Cu, Mo).

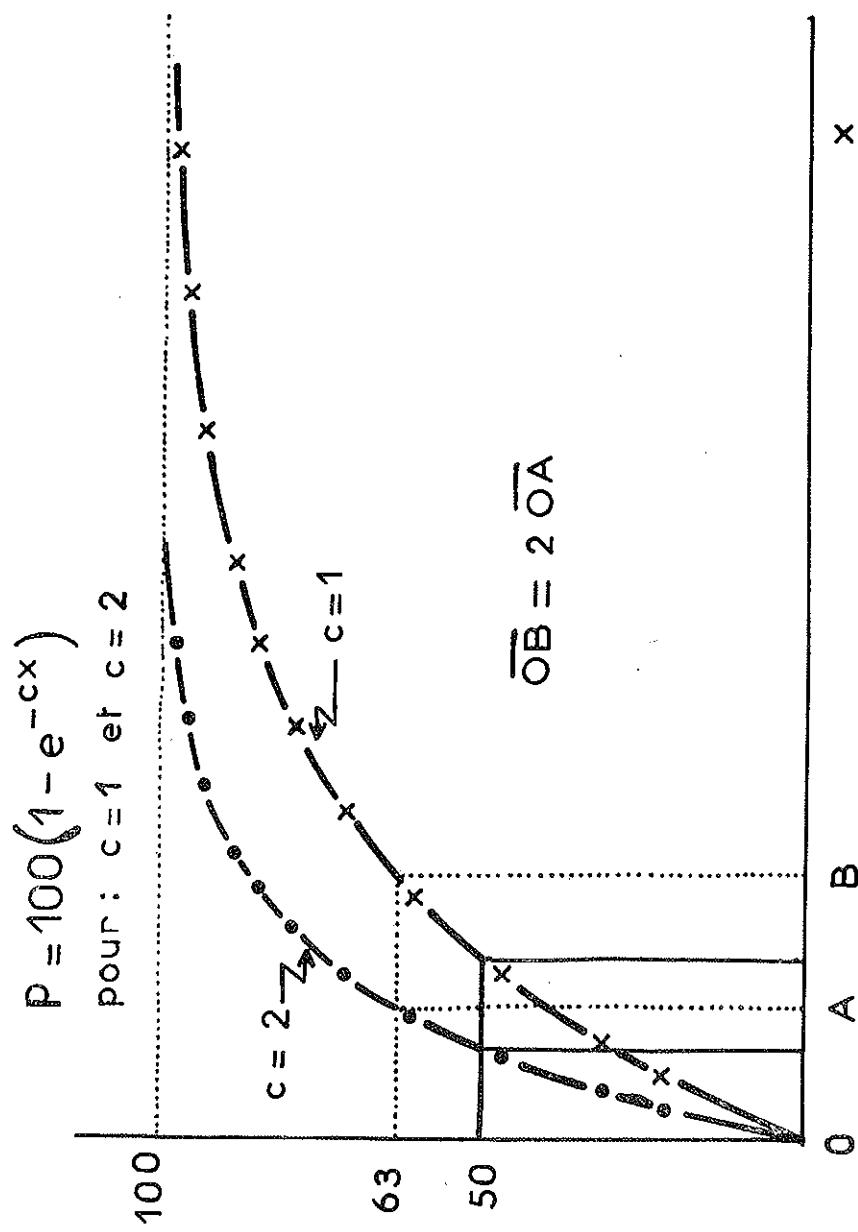


FIG. 4 — Courbes théoriques correspondant à deux activités différentes du facteur de croissance. Chacun des maxima a été égalé à 100.

tion qui est le facteur limitant et non pas la *quantité* (Figure 3), puisque les ressources utilisables dans ces conditions sont pratiquement illimitées. Le poids de la récolte est lié à la *concentration* de Mg^{++} dans le milieu suivant la loi $P = A (1 - e^{-2.5x})$ où x est la concentration de Mg^{++} , loi qui sous sa forme différentielle montre que l'accroissement de récolte résultant d'un petit accroissement de la concentration de l'élément est proportionnel à cet accroissement de concentration, affecté du coefficient 2,5: ($dP = 2,5 dx (A - P)$).

Si tous les constituants du milieu sont dilués à 50% avec de l'eau distillée, ce qui diminue de moitié toutes les concentrations, la loi d'action de Mg^{++} est de même forme, mais la valeur du coefficient c est pratiquement doublée. L'activité de l'élément comme facteur de croissance est devenue deux fois plus grande: les 50% du maximum accessible sont obtenus pour une concentration moitié moindre que précédemment [32]. (Figure 4).

On conçoit l'intérêt pratique de la détermination d'un *besoin optimum* correspondant aux concentrations permettant d'atteindre le maximum accessible. Malheureusement, ce *besoin* ne peut être déterminé qu'avec une très grande *imprécision* en raison de la forme des courbes qui représentent les poids de récolte en fonction de la concentration. Ainsi, dans les exemples cités, les besoins optima en Mg^{++} paraissent faussement du même ordre de grandeur dans le milieu type et dans le milieu dilué de moitié, alors que les concentrations conduisant à 50% du maximum accessible ont *varié du simple au double*. L'activité de l'élément doit être mesurée par la concentration qui conduit à 50% ou, par exemple, 63% du maximum.

Or l'expérience montre que l'activité dépend de la composition globale du milieu. (Par exemple, dans le cas de Mg^{++} , de la concentration de l'acide phosphorique, ainsi que nous l'avions montré en 1938). Il n'existe donc pas de *besoin absolu*, mais des *besoins relatifs* qui, *exprimés en concentration de l'élément* peuvent varier suivant la teneur du milieu en certains autres constituants.

Ainsi, si l'on ajoute en quantités variées le mélange des oligo-éléments à un milieu non purifié, on trouve que les courbes d'action du magnésium sont assez différentes. (Figure 5).

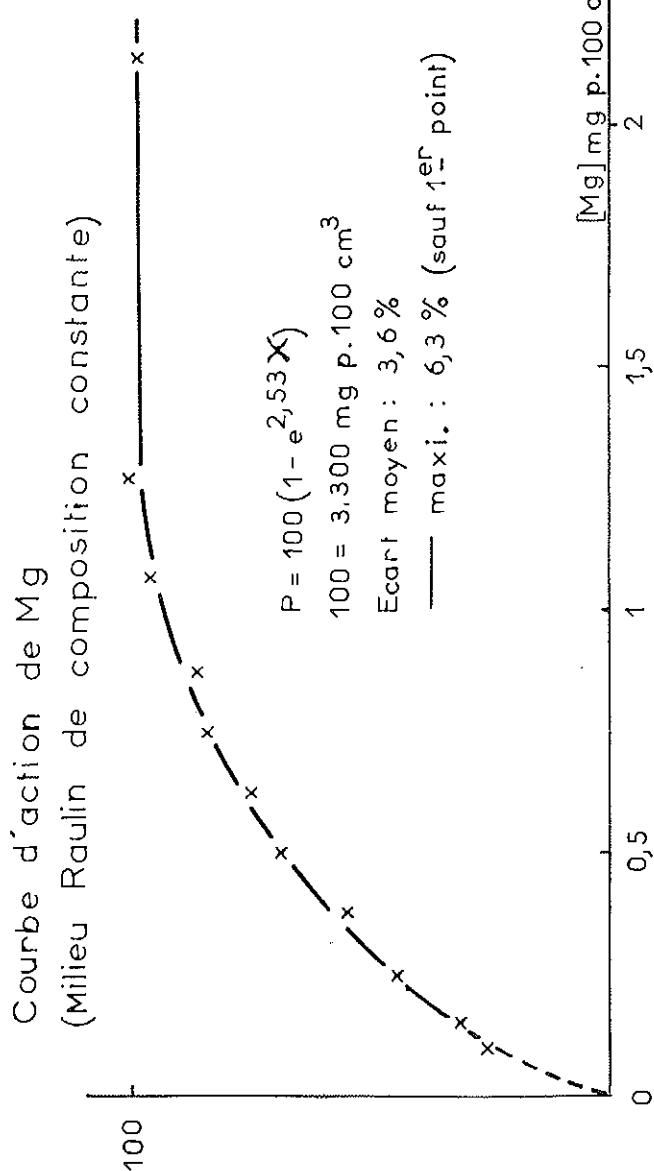
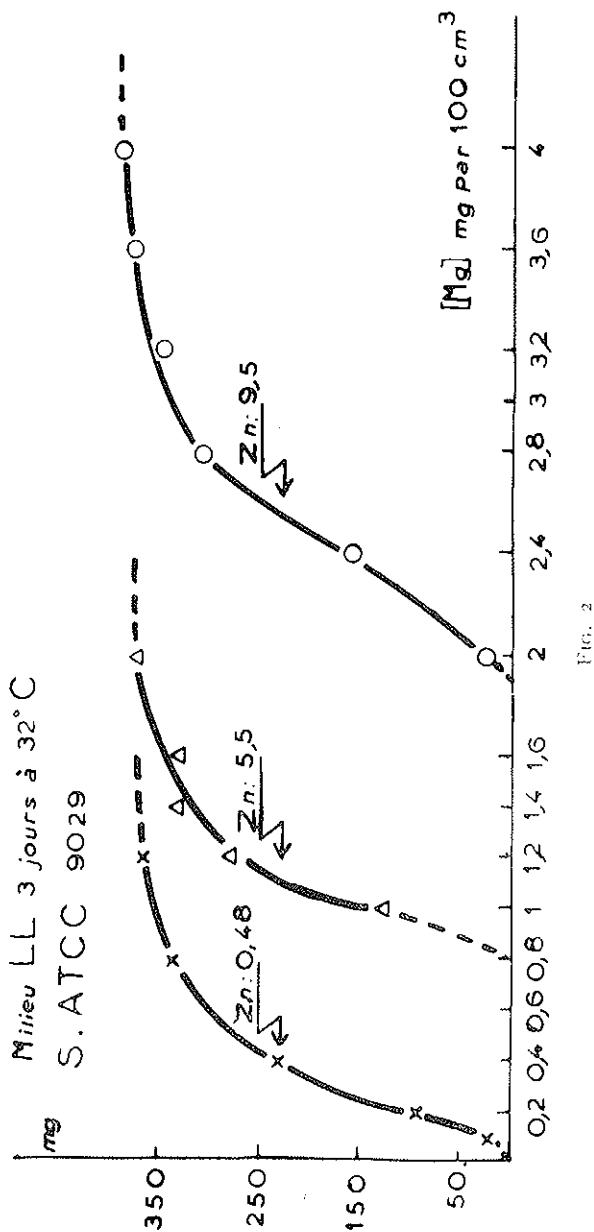


FIG. 3



l'origine; au contraire lorsque les impuretés sont encore notables par rapport aux besoins, la récolte peut être déjà importante. Pour *Aspergillus niger*, dans les expériences de NICHOLAS [29] comme dans les nôtres, la courbe d'action de Mg^{++} passe par l'origine; tandis que le milieu purifié en zinc permet une récolte égale à 13% du maximum accessible. « Sans » cuivre, la récolte atteint 25% du maximum. L'« absence » de Mn^{++} ne se traduit pas par une chute très importante de la récolte, mais la sporulation et les caractères du mycélium sont suffisamment modifiés pour que cet élément soit considéré comme indispensable. Dans la majorité des cas le caractère indispensable d'un oligo-élément ne peut être admis avec certitude que si le progrès des méthodes de purification permet d'atteindre la quasi nullité du développement.

Il serait pourtant faux de considérer comme une preuve suffisante de purification complète le fait que le milieu ne permet plus le développement d'un microorganisme.

La croissance peut être en effet arrêtée alors que le milieu renferme encore des quantités appréciables de l'élément. Tout dépend de la composition du milieu [30]. Voici, par exemple, les résultats que nous avons obtenus dans l'étude des courbes d'action du magnésium en présence de quantités variées de zinc.

Si le Zn^{++} est en quantité exagérée le développement *nul* est déjà obtenu avec des concentrations en Mg^{++} qui suffisent, en présence d'une moindre quantité de zinc à assurer le maximum. (Figure 2).

Plusieurs auteurs paraissent avoir admis, au moins implicitement, que toute la masse de l'élément qui est présente dans le milieu est absorbable et utilisable pour la croissance. Il est bien exact qu'avec un milieu de composition donnée où l'on fait varier un seul élément la récolte ne dépend, entre certaines limites, que de la quantité présente de cet élément. Mais nous avons trouvé en 1937 [31], dans le cas du magnésium, en cultivant *Aspergillus niger* sur une faible surface d'un volume assez grand de liquide nutritif, que *la masse de la récolte obtenue en un temps donné (*) ne dépend que de la concentration de l'élément*. C'est la concentra-

(*) Trois jours, en général.

Courbe d'action de Zn - Milieu LL.

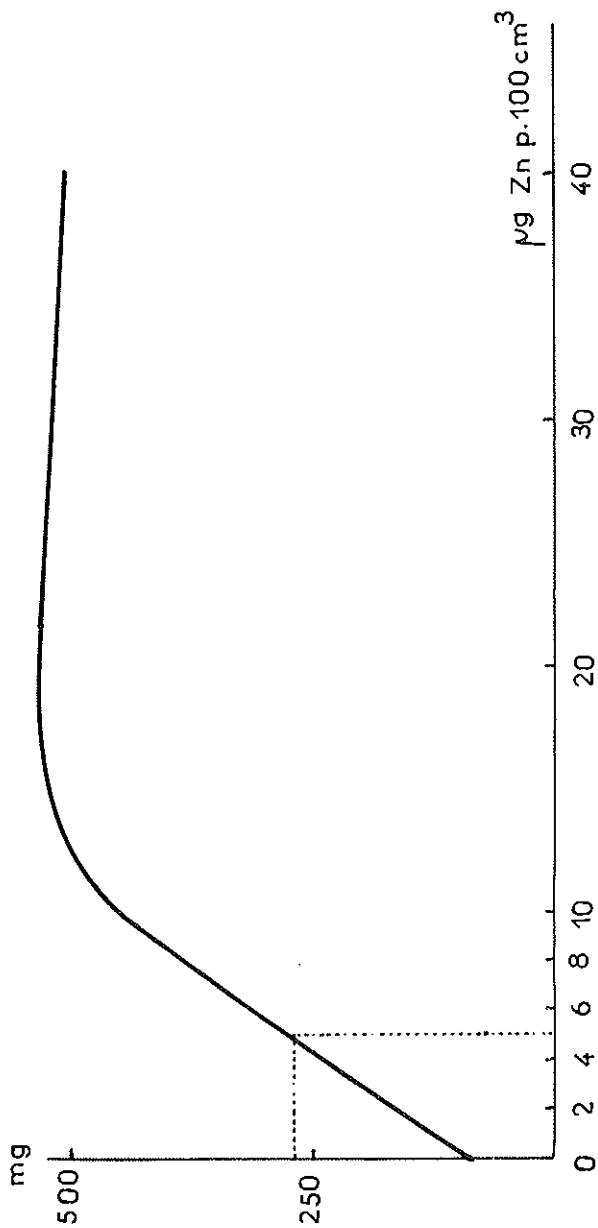


FIG. I

faire absorber les traces de l'ion présent à l'état d'impureté par une ou plusieurs cultures préalables du microorganisme sur ou dans le milieu nutritif où l'ion n'a pas été ajouté. Bien qu'elle soit aussi très largement critiquable parce que la culture préalable modifie la composition générale du milieu et parce que des facteurs organiques de croissance (SCHOPFER) [28], ou des substances toxiques ont pu y diffuser, cette méthode paraît cependant valable, moyennant certaines précautions. Elle a été récemment utilisée avec succès par MAC LEOD et SNELL [20] pour la purification du milieu de culture des bactéries lactiques. Le milieu, de concentration doublée, estensemencé de bactéries et les cellules qui s'y sont développées sont centrifugées après 24 heures; le liquide, dont le magnésium est, semble-t-il, épuisé, est alors dilué et utilisable pour les expériences. C'est en opérant de cette manière que la nécessité de Mg^{++} a été établie dans le cas de *Streptococcus faecalis* par MAC LEOD [3]. Pour cet organisme, Mg^{++} est un oligo-élément indispensable dont la concentration optimale est déjà atteinte à 40 ou 50 μg pour 100 cm^3 , soit environ 3% des besoins d'*Aspergillus niger*.

ACTIVITÉ DES IONS COMME FACTEURS DE CROISSANCE

Lorsque la concentration d'un ion indispensable est abaissée par rapport aux besoins de l'organisme étudié, la croissance est en général ralentie. Suivant le degré de purification et suivant les besoins du microorganisme, la densité de la culture ou la masse de la récolte est, à temps égal et avec un milieu donné, plus ou moins réduite par rapport aux valeurs obtenues avec le milieu non purifié.

Des apports croissants de l'oligo-élément permettront de vérifier l'un des critères de nécessité: la vitesse de croissance, le développement atteint en un temps donné, sont augmentés progressivement jusqu'à une certaine limite qui représente le *maximum accessible avec le milieu considéré*.

Lorsque les traces de l'élément subsistant dans le milieu purifié sont très faibles par rapport aux besoins de l'organisme, le développement est nul si l'on n'ajoute pas l'élément et la courbe passe par

[7] *Lavollay* - pag. 6

Suivant un autre procédé, l'élément à exclure de la nutrition du microorganisme peut être *immobilisé* dans le milieu en ajoutant à celui-ci un complexeur *spécifique*. Ce procédé n'est guère utilisable, jusqu'à présent, que pour Fe^{++} dont il existe des complexeurs spécifiques, l' α , α' dipyridyle et l'o.phénanthroline (ALBERT et GLEDHILL) [18]; les autres complexeurs ne sont généralement pas spécifiques. Les méthodes dérivant de ce principe ont été très critiquées parce que le complexeur, même spécifique, peut exercer sur le microorganisme une toxicité indépendante de son affinité pour l'ion métallique qu'il immobilise. C'est ce que NEUMANN a trouvé, dans mon laboratoire, dans le cas de la phénanthroline chez *Aspergillus niger* et ce que MAC LEOD [19] a également trouvé chez les bactéries lactiques avec la même o.phénanthroline. Si il pénètre à l'intérieur des cellules, le complexeur peut agir en immobilisant le métal non seulement dans le milieu, mais dans les cellules elles-mêmes. L'anion citrique complexe partiellement les ions Mg^{++} dans le milieu de culture des bactéries lactiques (MAC LEOD et SNELL) [20] mais LWOFF et IONESCO [21] ont montré que le citrate inhibe la croissance de *Moraxella lwoffii* en bloquant le Mg^{++} à l'intérieur des cellules.

Les effets des complexeurs sont trop multiples et, sans doute trop différents, même suivant l'espèce du microorganisme pour que leur usage soit licite sans étude préliminaire. C'est ainsi que ZENTMEYER [22] suggère que l'action toxique de la 8-hydroxyquinoléine pour les moisissures provient de l'immobilisation de métaux indispensables et établit l'action antitoxique du Zn^{++} . Mais RUBBO, cité par ALBERT [23] trouve que la 8-hydroxyquinoléine, qui complexe le fer, transporte ce métal en grand excès à travers la membrane protoplasmique de *Staphylococcus aureus* et attribue l'action toxique de l'oxine à l'excès de fer intracellulaire. (Voir aussi RUBBO, ALBERT et GIBSON [24]).

La purification du milieu de culture par la méthode biologique, utilisée par MOLISCH (1892) [25] dans ses travaux sur le fer, et plus récemment par MOLLIARD (1929) [26] a été inventée par RAU LIN [27]; elle a permis à JAVILLIER [13] d'établir la nécessité du Zn^{++} pour *Aspergillus niger* (1908-1914). La méthode consiste à

Il est probable que de telles différences dans la teneur en oligo-éléments des conidies entraînent des variations de la vitesse du développement, surtout au début de celui-ci. Dans le cas de Mn⁺⁺, la fermentation citrique est, elle-même, modifiée par la teneur en Mn⁺⁺ des conidies ensemencées. Il est donc souhaitable que la composition exacte du milieu où ont été prélevées les cellules ensemencées soit toujours précisée de façon aussi complète que possible: les résultats ne pouvant être exactement reproductibles que si ce milieu antérieur reste le même. Cette précision paraît aussi importante que celle de l'identité de la souche. Il n'est pas absurde de supposer qu'une quantité suffisante d'un oligo-élément nécessaire puisse se trouver déjà présente dans les cellules ensemencées, masquant ainsi un besoin essentiel en cet élément dans un milieu très purifié.

La purification du milieu de culture, opération fondamentale, peut être réalisée par différents types de méthodes.

D'excellentes méthodes chimiques ou physico-chimiques ont été mises au point. L'un des premiers principes utilisés consistait à faire entrer l'élément à exclure à l'état de combinaison colloïdale et à l'éliminer par adsorption. GABRIEL BERTRAND [15] (1912) éliminait ainsi le Mn⁺⁺ par adsorption de Mn O₂ sur PO₄MgNH₄, 6 H₂O. BORTELS (1927) [16] éliminait les métaux lourds par adsorption de leurs sulfures sur le carbone actif. La méthode de STEINBERG (1919) consistait à autoclaver le milieu avec un excès de CO₃Ca; les métaux lourds précipités et adsorbés étaient ensuite séparés par filtration.

On utilise parfois les échangeurs d'ions, ou l'adsorption sur alumine qui peut être réalisée par autoclavage du milieu avec de l'alumine pour chromatographie (d'après DONALD, PASSEY et SWABY) [17] ou par formation d'un précipité d'alumine au sein du liquide à purifier (SHU et JOHNSON [17-bis]).

Les réactifs organiques tels que la 8-hydroxyquinoléine, la dithizone et d'autres formateurs de complexes sont maintenant très souvent utilisés pour éliminer les éléments lourds, leurs complexes ou combinaisons étant facilement extractibles par des solvants organiques.

lieu de culture. Il en résulte que des réponses positives à l'apport d'un élément pourraient provenir d'un *effet indirect* tel que la modification du potentiel d'oxydo-réduction, la dissimulation d'une substance toxique, ou même d'un effet antagoniste vis-à-vis d'un autre élément présent en trop grande quantité. C'est la raison pour laquelle il est indispensable de démontrer que l'introduction de l'élément dans le milieu de culture se traduit par un changement spécifique et important dans la physiologie du microorganisme, notamment dans son équipement enzymatique ou dans l'activité des systèmes enzymatiques présents.

Mais la carence complète en un oligo-élément donné est souvent très difficile à réaliser chez les microorganismes hétérotrophes. Elle implique en effet une *purification préalable* du milieu de culture qui, souvent, ne peut être poussée aussi loin que la purification des milieux destinés aux végétaux supérieurs en raison de la présence obligatoire de substances organiques, capables de complexer ou de chélater l'élément (sucres, protides, etc.). D'autre part, les besoins des microorganismes en certains ions sont souvent satisfaits par des concentrations beaucoup plus faibles que celles qui sont requises par les plantes. La *concentration restante* de l'oligo-élément, bien que minime et *échappant à la purification*, peut donc suffire encore à assurer un certain développement du microorganisme. Dans les cas où l'oligo-élément est chélaté par un constituant organique du milieu, les traitements de purification peuvent être inefficaces, et si le microorganisme est capable d'absorber l'ion à l'état chélaté il est évident que la purification est illusoire. C'est pourquoi il est très difficile de préparer un milieu de culture qui, en raison de l'*absence* d'un certain oligo-élément, soit devenu impropre au développement d'un microorganisme.

L'oligo-élément étudié peut d'ailleurs être apporté en quantité appréciable au cours de l'inoculation du milieu. Par exemple, les conidies d'*Aspergillus niger* sont relativement riches en fer, manganèse et cuivre et leurs teneurs en ces oligo-éléments sont très variables suivant la composition du milieu sur lequel elles ont été obtenues. SHU et JOHNSON [14] ont trouvé des variations de 1 à 800 dans leur teneur en Mn^{++} lorsque le milieu de sporulation renfermait 0,0 ou 93 mg de Mn^{++} par litre.

saires seulement à de très faibles concentrations. Par exemple, le sodium, le calcium et le magnésium, peuvent être rangés parmi les oligo-éléments: le magnésium pour les bactéries lactiques (MAC LEOD) [3]; le calcium pour *Rhizoctonia solani* (STEINBERG, 1948) [4], pour une Saprolegniacée: *Achlya Klebsiana* (REISCHER, 1951) [5]; le sodium pour certaines algues [6]. Le bore qui, jusqu'à présent, n'avait pas été reconnu comme indispensable aux moisissures, l'est cependant pour *Azotobacter chroococcum* (GERRETSEN, 1953) [7] et pour *Nostoc muscorum* (EXSTER, 1952) [8].

D'autres éléments se révèlent parfois *utiles* en quantités faibles, en accélérant le développement ou en élevant la masse de substances cellulaires produites dans des conditions de milieu déterminées. C'est ainsi que le gallium serait *utile* à *Aspergillus niger* (STEINBERG) [9]; le scandium, au moins lorsque le glycérol constitue la source de carbone (STEINBERG) [10]; enfin le vanadium (D. BERTRAND) [11].

Bien que l'*utilité* d'un élément soit un indice de sa *nécessité* probable, il est évident que les deux notions ne peuvent pas être confondues. *La nécessité d'un oligo-élément ne peut être considérée comme démontrée que si un faisceau de preuves convergentes ont été réunies.* Les critères de *nécessité* sont généralement bien connus:

- 1) l'exclusion de l'élément, par purification du milieu de culture, doit rendre impossible l'accomplissement du cycle végétatif ou la reproduction de l'organisme considéré;
- 2) l'apport de l'élément au milieu purifié doit rétablir le développement normal;
- 3) l'élément doit exercer une action directe sur la physiologie du microorganisme.

Ce sont là les critères qui ont été formulés par ARNON [12] au sujet des végétaux supérieurs et que l'on trouvait déjà mis en oeuvre dans les recherches de JAVILLIER [13] concernant la nécessité du Zn^{++} pour *Aspergillus niger*.

Chez les microorganismes les traitements curatifs d'une carence éventuelle ne peuvent être appliqués que par l'intermédiaire du mi-

LES OLIGO-ÉLÉMENTS EN RELATION AVEC LA NUTRITION ET LA CROISSANCE DES MICROORGANISMES, SPÉCIALEMENT DES MOISISSURES

J. LAVOLLAY

Les microorganismes dont les besoins nutritifs en oligo-éléments ont été le mieux et le plus anciennement étudiés sont les moisissures, mais, d'une façon générale et malgré des travaux déjà nombreux, pour beaucoup d'espèces microbiennes les connaissances sont encore très fragmentaires.

Le fer, le zinc, le manganèse, le cuivre sont essentiels au développement d'*Aspergillus niger* cultivé sur des milieux artificiels purifiés et le molybdène est indispensable si l'azote est apporté sous la forme nitrique. On peut penser que ces cinq oligo-éléments sont probablement indispensables à tous les microorganismes en raison des fonctions qui leur ont été reconnues dans des processus métaboliques fondamentaux.

Le molybdène apparaît comme essentiel à la croissance et au métabolisme de *Chlorella* et de *Scenedesmus obliquus* [1]. Le molybdène est également nécessaire à la fixation de l'azote libre par les organismes fixateurs d'azote. Le vanadium, qui peut remplacer le molybdène pour cette fonction est indispensable comme facteur de croissance de l'algue *Scenedesmus obliquus* [1-bis]. Le cobalt, au moins sous la forme de vitamine B₁₂ est indispensable à des Flagellés et à un certain nombre de bactéries [2].

D'autres éléments, généralement classés parmi les éléments majeurs apparaissent pour certains microorganismes comme néces-

- TOSIC J. & MITCHELL R. L., *Concentration of cobalt by micro-organisms and its relation to cobalt deficiency in sheep.* « Nature », 162, 502, 1948.
- VERONA O., *Influenza di alcuni elementi oligodinamici sopra il processo di nitrificazione.* « Annali Facoltà di Agraria Università Pisa ». Vol. IV, 266, 1941.
- VILAS L., TEJERINA G. y RUBIO M., *Présence de bactéries du sol sous leur forme L et leur forme filtrable.* « Actes et Com. Rend. V Congrès Inter. Science sur Sol », Léopoldville, 1954.
- VIRTANEN A. I., *Assimilation of molecular and combined nitrogen by microorganisms.* « Symp. Microbiol. methabolism. », VI Congresso Inter. Microbiol., Roma, 1953.
- WARING W. S. y otros, *The role of iron in the biology of Brucella suis.* « J. Bact. », 66, 82, 1953.
- WEBB M., *The influence of magnesium on cell division. 2.* « J. Gen. Microbiol. », 1949, 3: 410.
- *The influence of magnesium on cell division. 3.* « J. Gen. Microbiol. », 1949, 3: 418.
- *The influence of magnesium on cell division. 4.* « J. Gen. Microbiol. », 1951, 5: 480.
- *The influence of magnesium on cell division. 5.* « J. Gen. Microbiol. », 1951, 5: 485.
- *The influence of magnesium on cell division. 6.* « J. Gen. Microbiol. », 1951, 5: 496.
- WEED L. L. y otros, *Morphological and biochemical changes induced by copper in a population of Escherichia coli.* « J. Bact. », 1954, 67: 27.
- YOUNMANS G. P. & DELVES E., *The effect of inorganic salts on the production of small colony variants by Staphylococcus aureus.* « J. Bact. », 1942, 44: 127.

cet oligo-élément est indispensable à *Euglena gracilis* comme à certains bacilles lactiques.

Plusieurs oligo-éléments sont des coenzymes ou des activateurs d'enzymes: en leur absence la fraction organique de l'enzyme peut être synthétisée, mais elle manquera d'activité.

L'activation des phosphatasées par Mg^{++} ou par Mn^{++} , celle de l'arginase par Mn^{++} , etc. sont des faits bien connus.

Cet aspect de la question des oligo-éléments a fait l'objet de plusieurs revues récentes.

D'après NICHOLAS, NASON et MAC ELROY [72] la nitratase d'*Aspergillus niger* et celle de *Neurospora* sont des enzymes flavoprotéïdiques comprenant du molybdène. Chez *Bacterium coli*, le molybdène active la déshydrogénase formique en présence de nitrates mais pas en leur absence (PINSENT) [73].

La déshydrogénase pyruvique de *Bacillus coli* est activée par Mn^{++} ou par Mg^{++} et, de façon moins efficace, par Co^{++} (STILL) [74]; (KALNITSKY et WERKMAN) [75].

Le fait que l'ion Mg^{++} active de nombreux enzymes présentant des groupements actifs -SH, explique l'importance de cet ion comme oligo-élément, notamment dans les processus de division cellulaire.

Dans de nombreux cas, plusieurs oligo-éléments sont des activateurs du même enzyme. C'est à ce fait que peut être attribuée la possibilité assez souvent vérifiée de substituer, *en partie*, un ion non indispensable à un ion essentiel dans la nutrition des micro-organismes.

Le magnésium, le manganèse ou le zinc sont efficaces comme activateurs de la phosphoglucomutase qui catalyse la conversion de l'ester 1-phosphorique en ester 6-phosphorique du glucose; ainsi que de l'énoïlase qui catalyse la formation de l'acide phosphopyruvique à partir de l'acide phospho-2-glycérique. La déshydrogénase isocitrique qui catalyse la formation de l'acide α -cétoglutarique à partir de l'acide isocitrique est activée soit par Mn^{++} , soit par Mg^{++} (VON EULER) [76]; (ADLER et coll.) [77]; (OCHOA) [78]. La décarboxylase de l'acide oxalacétique qui scinde cet acide en acide pyruvique et CO_2 est activée par Mn^{++} mais peut l'être aussi par Ca^{++} , Co^{++} , Cd^{++} , Zn^{++} (SPECK) [79].

D'après SADASIVAN [80] la phosphatase de *Penicillium chrysogenum* Q-176 est fortement activée par Mg^{++} en milieu neutre ou acide, mais en milieu alcalin elle est activée par Zn^{++} . Dans un milieu qui renferme les deux éléments, l'activité de l'enzyme dépend dans une large mesure du rapport entre les deux ions (Figure 13). Ce fait est de nature à rendre compte, au moins partiellement, de l'interaction [30] entre zinc et magnésium dans le développement des moisissures.

D'après MAC LEOD l'inhibition de croissance exercée par certains ions minéraux s'expliquerait par le fait que ces ions inactifs viennent occuper dans un ou plusieurs systèmes enzymatiques la place des ions minéraux actifs. L'exemple de la phosphatase de *Penicillium chrysogenum* montre que l'inhibition de croissance exercée par de trop fortes concentrations d'un ion indispensable peut résulter d'un phénomène analogue.

Activité de la phosphatase de
P. Chrysogenum Q -176 en fonction du pH

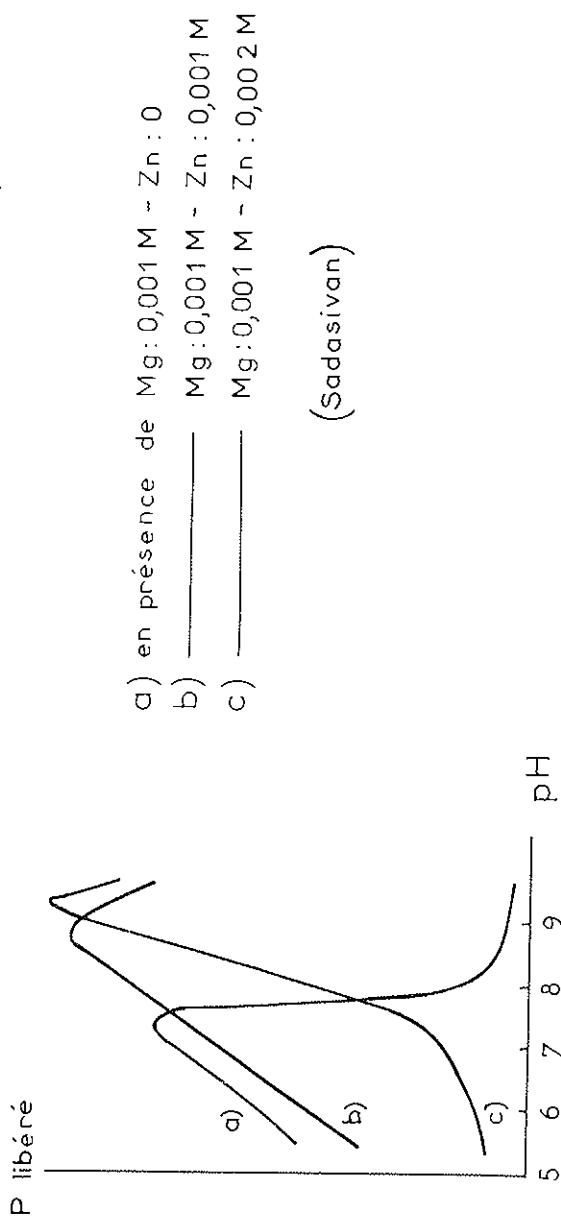


Fig. 13

COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE

R. J (*)		L. L	
	gr.		gr.
Glucose	50	Glucose	50
NO ₃ NH ₄	2,66	NO ₃ NH ₄	5
PO ₄ H ₂ NH ₄	0,40	PO ₄ H ₂ K	2,5
SO ₄ (NH ₄) ₂	0,17	SO ₄ Na ₂ ,10 H ₂ O	1
SO ₄ Mg ,7 H ₂ O	variabile	SO ₄ Mg ,7 H ₂ O	variabile
Acide tartrique	2,66		
SO ₄ Fe ,7 H ₂ O	0,047	FeCl ₃	0,020
SO ₄ Mn ,4 H ₂ O	0,008	SO ₄ Mn ,H ₂ O	0,002
SO ₄ Zn ,7 H ₂ O	0,005	SO ₄ Zn ,7 H ₂ O	0,020
Cu	impuretés	SO ₄ Cu ,5 H ₂ O	0,001
Mo	impuretés	MoO ₄ Na ₂ ,H ₂ O	0,001

Eau bidistillée pour 1 L

(*) Formula de RAULIN, modifiée par JAVILLIER.

Voir la discussion à page 537

B I B L I O G R A P H I E

- [1] WALKER J. B., « Arch. Biochem. and Biophys. », 1953, 46, 1.
- ARNON D. I., FUJIWARA A., WESSEL G., WOOLLEY J. T., « American Soc. Plant Physiologists Program », Madison, Wis. 1953.
- [1-bis] ARNON D. I., WESSEL G., « Nature », 1953, 172, 1039-40.
- [2] HUTNER S. H., PROVASOLI L., SCHATZ A., HASKINS C. P., « Proc. Am. Philos. Soc. », 1950, 94, 152-70.
- [3] MAC LEOD R. A., « J. Bacter. », 1951, 62, 337-45.
- [4] STEINBERG R. A., « Science », 1948, 107, 423.
- [5] REISCHER H. S., « Mycologia », 1951, 43, 142-145.
- [6] ARNON D. I. dans la présente Semaine d'Etude.
- [7] GERRETSSEN F. C., « VI^e Congrès Int. Microbiologie », Rome, 1953.
- [8] EYSTER C., « Nature », 1952, 170, 755.
- [9] STEINBERG R. A., « J. Agric. Res. », 1938, 57, 569-74.
- [10] STEINBERG R. A., « J. Agric. Res. », 1939, 59, 749-63.
- [11] BERTRAND D., « C. R. », 1941, 213, 245; « Bull. Soc. Chim. Biol. », 1942, 23, 467-71; « Ann. Inst. Pasteur », 1942, 68, 226-44.
- [12] ARNON D. I. in « Trace Elements in Plant Physiology, Chronica Botanica », 1950.
- [13] JAVILLIER M., « C. R. », 1907, 145, 1212; 1908, 146, 365; 1912, 154, 383; 1912, 155, 190; 1912, 155, 1551; 1913, 156, 406; 1913, 157, 1173; 1914, 158, 140; 1914, 158, 1216; « Thèse Doctorat ès Sciences », Paris, 1908.
- [14] SHU P. et JOHNSON M. J., « J. Bacter. », 1947, 54, 161-7.
- [15] BERTRAND G., « Bull. Soc. Chim. », 1912, 4^e Série, 11, 400 et 494.
- [16] BORTELS H., « Biochem. Z. », 1927, 182, 301-58.
- [17] DONALD C., PASSEY B. et SWABY R. J., « J. Gen. Microbiol. », 1952, 7 211-20 et « Austral. J. Agric. Res. », 1952, 3, 305-25.
- [17-bis] SHU P. et JOHNSON M. J., « J. Bacter. », 1948, 56, 577-85.
- [18] ALBERT A., GLEDHILL W. S., « Biochem. J. », 1947, 41, 529-33.
- [19] MAC LEOD R. A., « J. Biol. Chem. », 1952, 197, 751-61.
- [20] MAC LEOD R. A., SNELL E. E., « J. Biol. Chem. », 1947, 170, 351-64.
- [21] LWOFF A. et IONESCO H., « Ann. Inst. Pasteur », 1948, 74, 433.
- [22] ZENTMEYER G., « Phytopathology », 1943, 33, 1121; « Science », 1944 100, 294.
- [23] ALBERT A., « Proc. Roy. Soc. », B. 1948, 136, 177.
- [24] RUBBO S. D., ALBERT A. et GIBSON I. N., « Brit. J. Ex. Path. », 1950, 31, 425.
- [25] MOLISCH H., « Die Pflanze in ihren Beziehungen zum Eisen », Iéna, 1892.
- [26] MOLLARD M., « C. R. », 1929, 189, 417.

- [27] RAULIN J., « Ann. Sci. Nat. », 5^e Série, Botanique, 11, 93-299. Thèse Doctorat ès Sciences, Paris 1870; rééditée en 1905 (Masson) (Paris).
- [28] SCHOPFER W. H., « Journée Raulin ». Ann. Univ. Lyon. Fasc. spécial, nov. 1952.
- [29] NICHOLAS D. J. D., « The Analyst », 1952, 77, 629-42.
- [30] LAVOLLAY J. et Mine LABOREY F., Congrès Int. Botanique, Paris, 1954.
- [31] LAVOLLAY J. et Mine LABOREY F., « C. R. », 1937, 204, 1686; 1939, 208, 1357.
- [32] LAVOLLAY J. dans « Trace Elements in Plant Physiology », Chronica Botanica, 1950.
- [32-bis] LAVOLLAY J., VI^e Congrès Int. Microbiologie, Symposium Nutrition et Facteurs de Croissance, Rome 1953; et « Rev. Gén. des Sciences », 1955, 62, 102-26.
- [33] USPENSKI E. E., « U.S.S.R. Trans. Inst. Fertilizers », n. 23. Moscow, 1924. USPENSKI E. E. et USPENSKAJA W. J., « Z. Bot. », 1925, 17, 273-308.
- [34] HOPKINS E. F. et WANN F. B., « Botanical Gaz. », 1927, 84, 407-27.
- [35] HUTNER E. H., « Trans. N. Y. Ac. Sci. », 1948, Ser. II, 10, 136-41.
- [36] ALBERT A., RUBBO S. D., GOLDACRE R. J. et BALFOUR B. G., « Brit. J. Exp. Path. », 1947, 28, 70-87.
- [37] ABELSON P. H. et ALDOUS E., « J. Bacter. », 1950, 60, 401-13.
- [38] FOSTER J. W., « Chemical activities of fungi », Acad. Press, 1949.
- [39] HEWITT E. J., « Ann. Rev. Plant Physiology », 1951.
- [40] PERLMAN D., « The Botanic. Rev. », 1949, 15, 195-220.
- [41] PORGES N., « Botan. Gaz. », 1932, 94, 197-207.
- [42] SCHULZ G., « Planta », 1937, 27, 196-218.
- [43] KAUFFMANN-COSLA D. et BRÜLL M., « Bull. Soc. Chim. Biol. », 1935, 17, 1828-35.
- [44] BORTELS H., « Arch. Mikrobiol. », 1930, 1, 333-42.
- [45] HORNER C. K., BURK D., ALLISON F. E. et SHERMAN M. S., « J. Agric. Sci. », 1942, 65, 173.
- [46] MULDER E. G., « Anal. Chim. Acta », 1948, 2, 793.
- [47] MULDER E. G., Congrès Int. Microbiologie, Rome 1953.
- [48] NICHOLAS D. J. D. et FIELDING A. H., « Ann. Rep. Long Ashton », 1948, 126; « Nature », 1950, 166, 342.
- [49] HEWITT E. J. et HALLAS D. G., « Plant and Soil », 1951, 3, 366-405.
- [50] STEINBERG R. A., « Plant Physiol. », 1942, 17, 129-32.
- [51] SADASIVAN V. et SUBRAMANIAN V., Congrès Int. Botanique, Paris, 1954.
- [52] JAVILLIER M., « Bull. Soc. Chim. Biol. », 1914, 1, 55; « Bull. Sci. Pharmacol. », 1914, 21, 452.
- [53] MULDER E. G. voir: « Ann. Rev. Plant Physiol. », 1950, 1, 1; « Plant and Soil », 1948, 1, 94-119.
- [54] FOSTER J. W., WOODRUFF H. B. et McDANIEL L. E., « J. Bacter. », 1943, 46, 421-33.
- [55] LAVOLLAY J. et Mine LABORET F., « C. R. », 1937, 205, 179; ibid., 1938, 206, 1055; ibid., 1939, 208, 1056; « Ann. des Fermentations », 1941, 6, 129-42.

- [56] BURTON M. O., CAMPBELL J. J. R. et EAGLES B. A., « Canad. J. of Res. », 1948 c, 26, 15-22.
- [57] GALE E. F., « J. Gen. Microbiol. », 1949, 3, 369.
- [58] CHARNEY J., FISHER W. P. et HEGARTY C. P., « J. Bacter. », 1951, 62, 145-8.
- [59] WEBB M., « J. Gen. Microbiol. », 1948, 2, 275; 1949, 3, 410; 1949, 3, 418; 1951, 5, 480-4; 1951, 6, 496-501.
- [60] FINKLE B. J. et APPLEMAN D., « Plant Physiology », 1953, 28, 664-73.
- [61] GEORGE M. et PANDALAI R. M., « Brit. Med. J. », I, 1948, 1028-9.
- [62] ROSENBERG A. J., « C. R. », 1946, 222, 1310; « C. R. Soc. Bio. », 1948, 142, 443.
- [63] WARING W. S. et WERKMAN C. H., « Arch. of Biochem. », 1944, 4, 75-87.
- [64] AUBEL E., ROSENBERG A. J. et SZULMAJSTER J., « C. R. », 1946, 222, 1141.
- [65] PAPPENHEIMER Jr. A. M., « J. Biol. Chem. », 1947, 167, 251; 1937, 120, 543; 1938, 125, 201; 1947, 171, 703-13.
- [66] FOSTER J. W. et DENISON F. W., « Nature », 1950, 166, 833.
- [67] NASON A., « Science », 1950, 112, 111.
- [68] NASON A., KAPLAN N. O. et COLOWICK S. P., « J. Biol. Chem. », 1951, 188, 397-406.
- [69] KRISHNAN P. S. et BAJAJ V., « Arch. of Biochem. Biophys. », 1953, 42, 174-83.
- [70] ELVEHJEM C. A., « J. Biol. Chem. », 1931, 90, 111.
- [71] HENDLIN D. et RUGER M. L., « Science », 1950, 111, 541.
- [72] NICHOLAS D. J. D., NASON A. et McELROY, « Nature », 1953, 172, 34.
- [73] PINSENT J., « J. Gen. Microbiol. », 1949, 3, Proc. XII.
- [74] STILL J. L., « Biochem. J. », 1941, 35, 380.
- [75] KALNITSKY G. et WERKMAN C. H., « Arch. of Biochem. », 1943, 2, 113.
- [76] v. EULER H., ADLER E., GÜNTHER G. et ELLIOT L., « Enzymologia », 1939, 6, 337-41.
- [77] ADLER E., v. EULER H., GÜNTHER G. et PLASS M., « Biochem. J. », 1939, 33, 1028-45.
- [78] OCIOA S., « J. Biol. Chem. », 1948, 174, 133-157.
- [79] SPECK J. F., « J. Biol. Chem. », 1949, 178, 315-24.
- [80] SADASIVAN V., « Arch. Biochem. », 1952, 37, 172-85.

PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL ASPECTS ON MICROELEMENTS

H. LUNDEGÅRDH

Observations on positive or negative oligodynamic effects of elements, which did not fit in with the old conception of ten essential elements (C,H,O,N,S,P,K,Ca,Mg,Fe), were made at an early date (1). Attention was called to fact that a large number of other elements than the classical ten ones are beneficial to the growth of plants by the simple fact that cultivation experiments were performed with more and more purified salts. The modern term « microelements » means that the additional elements are needed only in very low concentrations. Unfortunately most investigators have restricted themselves to the minimum concentration needed in the medium. Characteristic for a microelement is the fact that it is needed only in a very low concentration inside of the cell membrane. This distinction is important because a number of true microelements are absorbed and stored in quantities far exceeding the really needed amounts, whereas on the other hand a number of macroelements may be absorbed in sufficient quantities from rather dilute solutions.

Typical nutrients belonging to the group of macroelements are those participating as building stones of the plant body, viz. the few elements composing proteins, nucleotides, and carbohydrates, together with the few elements acting as cations needed for the general ion balance of the cell and for the creation of osmotic qualities. In higher plants large quantities of potassium are required for the building up of a suitable osmotic power of growing cells, but potassium must almost universally be balanced by suitable concentrations of calcium, and

to a minor degree, magnesium. This is the well-known ion balance, exerted in the ion antagonism. In animals sodium takes over part of this balancing effect of calcium against potassium, but this element is seldom beneficial for higher plants. The balancing effects of calcium and magnesium on the metabolism of a number of acidoidic substances is particularly important in regard of pectin in the primary cell wall, nucleotides in the surface of the protoplasm, and the linkage of certain prosthetic groups to the protein carrier.

We are here touching on the general bearing of the distinction between macroelements and microelements. It has been shown by experiments on the growth of wheat roots that already very small quantities of calcium are heavily affecting the growth intensity. In this and some other respects calcium is undoubtedly acting as a microelement, which is further illustrated by its similar effects on certain lower organisms which do not require this element for more common balancing purposes. A further example of such « facultative micro-effects » is the participation of magnesium in the synthesis of chlorophyll and as a co-enzyme in certain stages of the glycolysis and similar effects of potassium on processes linked to the carbohydrate metabolism. All other metallic elements, including iron, may be headed under the term « obligate microelements », because they are normally participating neither in the common colloidal salt balance nor in creation of osmotic power. That iron and manganese frequently are absorbed and stored in considerable quantities is more dependant on their common distribution in soils in combination with high adsorptive qualities than on physiological needs. The varying solubility of these heavy elements in the surroundings of the roots and the transport resistance inside of the plant, in which the interference with other cations and anions is included, can under circumstances retard the absorption to the level of rare microelements.

Of true or obligate microelements may be mentioned the anionic boron and the cationic copper, zinc, molybdenum, vanadium, cobalt, to which perhaps may be added chromium and gallium and a few others, the effects of which are still too uncertain to be discussed here. Physiological effects of microelements have primarily been observed concerning growth intensity and development of meristems, but a

number of observations refer to protein metabolism, the balance between proteins and carbohydrates, the intensity of photosynthesis, the formation of special compounds, e.g. hemin enzymes, or the intensity of special enzyme processes. With the exception of copper, zinc and to some extent boron the biochemical background of the physiological effects is practically unknown land. This is also the case concerning scattered observations on the positive effect of copper on the photosynthesis, ground respiration and nitrate assimilation, etc. Solid knowledge of the biochemical linkage of a microelement is indeed so far restricted to iron. A number of less fundamental observations on effects of microelements is, however, of considerable interest for the general problem of actual or possible pathways, along which microelements may be utilized in the living organism.

The basic problem of all investigations as to the response of the organism to elements which are dissolved in the aqueous medium is the process of uptake. As far as higher plants are concerned the uptake of dissolved elements is a property of the epidermis of the lower few centimeters of the roots. From extensive investigations on the process of salt uptake we can now distinguish between a non-metabolic absorption and an active absorption regulated by the aerobic respiration. The non-metabolic absorption may to a minor degree be pure diffusion but most of it occurs by means of ion exchange. Studies of the surface potential of the root protoplasm, first introduced by the author and later on pursued also by others, conveyed the conclusion that the surface of living protoplasm behaves as an amphoteric colloid with dominating acid dissociation. Carriers of the electro-kinetic properties of the protoplasmic membrane are large non-diffusible molecules H.R., dissociating hydrogen ions, and R.OH, dissociating hydroxyl ions. Because the former ones are normally dominating, either in number or in degree of dissociation, the root exerts an intensive power of cation adsorption, but it must be assumed that also anions from the medium are non-metabolically adsorbed by the root surface, to a considerably smaller extension, however.

Observations on the velocity and capacity of the cation exchange power of the root surface indicated a much larger number of carrier molecules than those displayed just in the surface. It was concluded

that each cell and each tissue is provided with a considerable non-metabolic exchange capacity and that carriers of cations and anions are distributed in the bulk of the protoplasm. The ions caught from the medium by the carrier molecules situated in the surface layer are by means of molecular rotations taken over by other carriers inside of the membrane and so until the adsorbed ions are distributed all over the living substance. The total volume of adsorption is sometimes called « free space ».

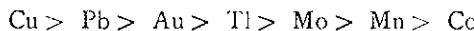
The exchange processes going on in the surface of the protoplasm are, of course, reflected in the electro-kinetic potential, the electro-negative charge of the root surface as a rule sinking at increasing absorption of metallic cations, according to the principle of membrane equilibrium. The existence of active groups in the surface of the protoplasm, which are partly also combined with special enzyme systems, e.g. phosphorylation mechanisms (hexokinase, etc.) has been observed also from a more biochemical point of view. These active groups may be blocked e.g. by uranylchloride.

The negative surface potential of roots, in wheat normally amounting to c. 60 mv, in flax and tomatoes higher, in rye somewhat lower (probably a species character) creates an extremely high efficiency in absorbing cations of microelements. It has been shown that cupri-ions are rapidly adsorbed from solutions 10^{-7} m. and that half of the cation carriers are charged with cupri-ions after 60 minutes in a 10^{-5} m. solution. Studies in this laboratory showed that this adsorption of copper obeys common rules of ion exchange. They display, as expected, ion antagonism in relation to hydrogen ions. These observations teach us that the pH of the medium is a factor of influence in the absorption of cationic microelements. The general mechanism of non-metabolic absorption of cationic microelements does not, of course, permit any sharp selection between beneficial and poisonous elements or concentration of elements. But a comparison between the velocities of absorption of different metal cations clearly shows that some ions are absorbed much more rapidly than others without any obvious relation to the power of primary adsorption. Experiments on the absorption of the elements copper, lead, cobalt, and thallium from

about 10^{-7} m. solutions showed the following series of absorption:



Observations of the decrease of the negative surface potential (see above) rendered the following series:



The order of the elements is about the same in both cases, a circumstance supporting the idea of specific carriers, viz. carriers H.R which are preferably combining with cations of distinct qualities. To these carriers is then added the accumulating power of metabolic systems incorporating beneficial microelements in special compounds, e.g. enzymes.

Besides of the non-metabolic ion absorption, which is a result of the exchange processes of ion carriers H.R and R.OH, and to some extent plain diffusion, most living plant cells are provided with mechanisms for active ion absorption conducted by metabolic processes. Attention is here called only to the best known of these phenomena, namely the « anion respiration », which is conducted by the cytochrome system. The anion respiration transfers movable anions (inorganic and organic ones) from the low concentration of the medium to a high concentration in the sap space of the cells. The required energy is delivered from the oxidation of glucose. Because anions, owing to the predominant acid dissociation of the root surface, are non-metabolically absorbed in much smaller quantities than cations, the active anion respiration is important for the maintaining of an appropriate balance between anions and cations of nutrient salts. Because anions and cations are never moving independently of each other an active absorption of anions will indirectly act as a pump also on cations and many of the observations of specific selection of cationic microelements will have to be considered with due attention called to the interference with anion respiration. It has been experimentally shown that the transport of the microelement Fe through tissues is positively influenced by the active transport of nitrate ions.

From this view-point some observations made in the author's laboratory twenty years ago may be worth mentioning. It was observ-

ed that some metallic elements in particular affected the anion respiration mechanism, viz. the cytochrome system, whereas the activity of others was more focussed on the ground respiration, viz. that fraction of the total aerobic respiration which is not inhibited by cyanide and carbon monoxide. A specific poison to the anion respiration is mercury. This element slowed down this process to 50% in a concentration of 10^{-7} m. HgCl_2 . No wonder that mercury is no microelement for higher plants. As a curiosity it may be mentioned, however, that addition of mercury chloride cures injuries on certain fungi caused by too high dressings of magnesium.

The ground respiration is specifically inhibited by thallium, an element also devoid of nutritional qualities. It is interesting that lead is considerably less poisonous than mercury. Still better tolerated are small concentrations of copper chloride. This essential microelement induces in concentrations up to c. 10^{-6} m. a stimulation of the ground respiration above the value attained in common nutrient solutions. A tremendous increase — up to 470% — of the ground respiration is observed after treatment of roots cultivated without manganese with $5 \cdot 10^{-5}$ m. MnCl_2 . Manganese is a common essential microelement, too, and it is from this view-point of interest to know that the mangano-ion does not alter the surface potential even in concentrations of 10^{-4} m. Another heavy microelement, which is tolerated in very high concentrations, is cobalt. Also this element does not alter the surface potential in concentrations up to 10^{-4} m. and solutions of this ionic strength do not either alter the ground respiration or the anion respiration. The observations mentioned here support our conclusion as to specific carriers and moreover point to a far going differentiation of the carriers inasmuch as cobalt and manganese are not irreversibly bound and do not, as a consequence of that, inactivate the carriers. With copper the margin is much more narrow, because higher concentrations of this element obviously irreversibly inactivate the ion carriers.

Because the maintaining of an appropriate concentration of ion carriers capable of reversible ion exchange is obviously an ultimate condition for normal life of the cell, the phenomenon of ion antagonism exerts a dominating influence. It is an old observation that

impurities of heavy metals in distilled water are considerably more deleterious than the same trace quantities mixed in a normal nutrient solution. Only in a balanced solution the ion carriers are binding an assortment of cations (and anions) in which by virtue of the mass law the ions of K, Ca, und Mg are dominating, besides of H-ions. The majority of the carriers are thus saved from inactivation by heavy metal ions, especially those which, like cobalt and manganese, have a pronounced low inactivating tendency.

From this survey of the interrelations between microelements and the living cells and organs appears the fact that some of these show a very narrow amplitude as to tolerable concentrations, whereas others are far less poisonous in higher concentrations and may consequently be stored in the tissues in quantities considerably above the limit set by their essentiality. To the latter elements belong iron, manganese, and cobalt. A number of non-essential elements behave similarly, e.g. aluminium. There is no sharp limit between the tolerance for super-optimal quantities and concentrations among microelements, because it is a well-known fact that too high concentrations of potassium, calcium, and magnesium may cause disturbances in the metabolism and inhibit growth. Not only the blocking of ion carriers is here deciding but also the danger of salting out of protoplasmic colloids or an inappropriate hydration, e.g. under the influence of alkali ions.

In the introductory remarks it was emphasized that the main reason why a number of essential elements are needed only in minute quantities is the fact that they are only participating in the synthesis of single enzymes and/or carrier substances. This circumstance also explains the difficulties in the experimental demonstration of the essentiality of microelements. Modern methods of chemical purification of salts and cultivation e.g. in vessels of plastics, have, however, contributed to the elucidation of many intricate questions. The analytical methods of determination of microquantities, among which the quantitative spectral analysis may be particularly mentioned, are unfortunately still insufficient for the measuring of the really absorbed quantities of elements which are needed only in a comparatively low number of atoms per living cell. Approximate calculations have here to be made from the absolute quantities offered in the outer medium. The isotope technique may in some cases be of good help.

Having discussed the physico-chemical questions related to the absorption of microelements and the ranges of positive and negative effects, we are now going over to the biochemical side of our problem. The attention has here for the most been focussed on microelements as components of prosthetic groups of enzymes. But before scrutinizing our actual knowledge in this field, a few more words may be devoted to observed effects of cations on the acid dissociation of the protoplasmic colloids. It was observed that calcium, manganese, and boron raise the level of acid dissociation, as reflected in the negative surface potential. In respect of calcium the antagonism against potassium, which lowers the acid dissociation, is easily demonstrated on the surface potential. The calcium effect is not a simple ion exchange but includes processes within the cell, too, as can be seen from the time course of the process. Obviously calcium in some way promotes the acid dissociation, hence accelerates the formation of cation carriers. Similar effects were observed with manganese and borate. The positive effects of boron on the calcium absorption are consistent with these observations. Boron shows interrelations with pyridoxin and an acidifying effect of boric acid is the formation of boromannitic acid, which may interfere with the formation of calcium pectate in the growing cell wall. Of special interest is the combination of boron with flavonoles, a fact explaining the appearance of boron deficiency in organs rich in these pigments. As an illustration to the complexity of microeffects observations on *Chlamydomonas* may be mentioned that which shows beneficial effects of boron on the copulation of female gametes, because even 10^{-10} m. borate inactivates kvercitin methyl ether, an inhibitor of copulation. Only a few molecules of borate are here needed and the said forms an example of quite special effects of microelements, as a parallel to the extremely low quantities of molybdenum or vanadium needed for certain lower algae.

A more precise knowledge of microelements incorporated in enzymes or similar substances is restricted to iron and copper, primarily Fe. The parallel effect of magnesium on the chlorophyll formation is quite clear, too. More diffuse is our knowledge of manganese and a few more microelements as constituents or co-enzymes of regular enzyme systems.

Iron is the active component of the large and important group of hemin enzymes of which in the plants hydroperoxidases (peroxidase and catalase) and cytochromes (*c*, *b*, *dh*, and cytochrome oxidase) are widely distributed. The porphyrin derivatives of hemin and chlorophyll are closely related with protoporphyrin as the common basis, and it has been shown that certain algae may, according to the growth conditions, turn over protoporphyrins into the iron or magnesium series of pigments. The chemical pathway of the synthesis of protoporphyrin from links of the tricarboxylic cycle is partly elucidated and physiological-biochemical observations support the idea that the synthesis of cytochromes and peroxidase starts from a pool of protohematin, and that, according to the nutritional conditions, more or less is turned over either into cytochrome or into peroxidase. There is furthermore experimental evidence of transformations of enzymes within groups of « families », involving the recombination of the prosthetic group (with the Fe atom) with different proteins (apoenzymes).

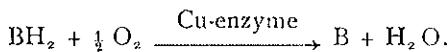
The biochemical activity of the cytochrome system, which may carry on 50-75% of the total aerobic respiration in plant tissues and up to 100% in animal tissues, is focussed on the shift of valency of the iron atom which is situated in the centre of the porphyrin group. The shift of valency maintains a polar transport of electrons from the dehydrogenase systems to molecular oxygen thereby oxidizing the hydrogen derived from glucose. According to the rapid turnover of the system a few iron atoms are able to maintain a fairly high intensity of respiration. 10 g fresh root substance, corresponding to the growing root mass of one plant, contains about 0.05 micromol Fe (= about 0.0025 mg), bound in cytochromes. This small quantity oxidizes about 2 mg glucose in one hour or about 1.5 g in one month at a temperature of 18° C.

No external supply of iron is needed for the germination of cereals and for the development of the seedlings during the first weeks. The small quantities of Fe needed are stored in the seed. This is equally the case concerning other trace elements. Experiments in the author's laboratory showed no positive influence of a number of additional microelements (Cu, Mn, Co, etc.) on the formation of cytochrome by wheat seedlings.

The nearly universal essentiality of Fe for all kinds of organisms, with the possible exception of obligate anaerobic microorganisms, is explained by the universal occurrence of some kind of a cytochrome system, forming a most powerful mechanism of aerobic respiration. Peroxidase is frequently present in higher quantities than cytochromes and they lay hold of a corresponding quantity of Fe. According to recent observations hemoglobin-like pigments occur in yeast and some other microorganisms. Leghemoglobin is abundantly present in root nodules of leguminosae. Hemoglobin is not an enzyme, only a carrier of oxygen. Its iron is maintained in the reduced state. In the hydroperoxidases, which are enzymes catalyzing the dehydrogenation of hydrogen peroxide, the iron is maintained in the oxidized (ferri) state. It is still an undecided question whether or not valency changes are accompanying the activity of the hydroperoxidases.

Oxidation-reduction mechanisms maintained by valency changes of metallic atoms are powerful tools of the end-oxidation of organic compounds, but only those steered by iron are more extensively studied, probably simply because of the fact that the involved enzymes display brilliant absorption spectra which also reveal the percentual state of oxidation or reduction. Of other elements capable of valency changes and electron transference may be mentioned Mn, Co, Ni, Cu, and Zn. Of these only Mn and Cu are tolerably well known as oxidation-reduction agents in living organisms, but only with regard to Cu special enzymes have been isolated.

All enzymes containing copper have in common the property of catalyzing the direct oxidation of a substrate (BH_2) by atmospheric oxygen, according to the following scheme.



The copper enzyme tyrosinase (polyphenol oxidase) brings about the darkening of certain varieties of mushrooms but has later been discovered in a large number of plant organs, e.g. white potato, and also in animals. Laccase, which causes the darkening and hardening of the latex of the Japanese lacquer tree, is also a copper enzyme. It has been shown that the enzymatic activity of tyrosinase and laccase varies linearly with the copper content, but it is not decided how many copper atoms (up to four have been proposed) are held by each

molecule of the enzyme. Contrary to iron in the hemin enzymes the copper is probably directly attached to the protein and serves as prosthetic group. Of other copper oxidases a particular interest is linked to ascorbic acid oxidase, because it is seemingly most widely distributed.

It is still an open question if, and to what extent, copper oxidases are participating in the aerobic respiration. As mentioned above the total aerobic respiration of most plant organs is made up by two groups of processes, the ground respiration and the anion respiration. The anion respiration is conducted by the microelement iron, in its linkage to the cytochrome system, and is, in particular, dependent upon the activity of the cytochrome oxidase. In the ground respiration the other cytochromes, *c*, *b* and *dh*, are participating together with flavoprotein. All these enzymes are fairly resistant to cyanide, in contrast to the cytochrome oxidase. It has been suggested by a few investigators that copper enzymes might be conducting the ground respiration. The fact that these enzymes, too, are inhibited by cyanide and carbon monoxide, however, speaks against the participation of copper in the normal ground respiration. Recent biochemical evidence does not support the idea of ascorbic acid (and its copper oxidase) participating in the normal respiration. The wide distribution of ascorbic acid in plants may, however, well point in direction of copper enzymes participating in intermediate processes which are in a more direct way linked to the aerobic respiration. Attention is here again called to the old observations from the author's laboratory of higher concentrations of copper (10^{-6} m.) stimulating the ground respiration above the normal level (up to 60%). The copper atom may here accelerate processes which are normally not dependent upon this ion.

An enzymatic activity of zinc is only known in connection with carbonic anhydrase, but recent studies point in direction of zinc not so much regulating the plant variety of this enzyme as interfering with the protein synthesis. Because the same is said from a number of other microelements this observation is of little significance, however. Zinc no doubt belongs to the essential elements and it has been shown in the author's laboratory that oats excellently respond to additions of this element. Further studies will have to show if the

suggested interference of zinc in the synthesis of auxin is specific or not.

The effects of manganese are somewhat better known than those of cobalt and nickel. As mentioned above, this element, besides of copper, has a pronounced stimulating effect on the ground respiration, whereas the anion respiration is left intact. The stimulation may rise to more than 400%. Manganese is claimed as microelement and coenzyme for a number of metabolic processes. As coenzyme it may replace magnesium, but it is still an open question if the effect is that of an enzyme cement or simply depends upon the cationic balancing activity. The action of manganese on the activity of arginase and the scattered reports on positive effects of manganese on protein metabolism, nitrate reduction, and photosynthesis do not speak in favour of manganese as prosthetic group. As a matter of fact no manganese enzyme has yet been isolated, but this, on the other hand, does not exclude the possibility of mangano-proteins endowed with special qualities. It has often been suggested that the electron transference between Mn^{++} and Mn^{+++} is utilized in oxidation-reduction processes in the soil colloids, and in the protoplasm; manganese here, contrary to iron, acting preferably as inorganic ion. Similar oxidation-reduction effects have also been claimed for copper and a few other cations. It has recently been suggested that such intermediate electron transferences to and from manganese cations participate in the oxidatic power of peroxidase with hydrogen peroxide as hydrogen acceptor. Measurements of the possible intensity of a peroxidase respiration in plants show, however, that it must run with a very moderate speed, the turnover number only attaining a few per cent of that of the cytochrome system or flavoprotein. The observed stimulation of the ground respiration by mangano-chloride may thus be a supernormal phenomenon and does not contribute to an understanding of the normally proceeding ground respiration. The ground respiration is conducted by flavoproteins and some of the cytochromes, in particular cytochrome *b*, and there is apparently no space for manganese in the main pathway of electrons and protons. But manganese, as copper and certain other microelements, may induce additional pathways of electron transference, which may speed up the processes.

The old question is here always: what is « normal ». Experience shows that life is maintained by only the ground respiration, but that a superimposed anion respiration is needed for « full speed », viz. salt accumulation and growth. The observed fact that a deficiency of many microelements is primarily observed as failure of growing points or organs of reproduction to fulfill their task, illustrates the idea of some of these elements forming or activating key substances which either remove inhibitors to enzyme processes or act as intermediate accelerators. Regarding the elements capable of valency changes and reversible electron transference it may be emphasized that the oxidation-reduction potentials observed in simple inorganic systems are by no means significant for the actual potential stages in the cell, or in the soil. Combination of metal ions with proteins may considerably raise or lower the potentials and it may be assumed that metalloproteins display similar wide ranges of actual potential states as e.g. the cytochromes. The cytochrome system is the prototype of a « multi-enzyme » built on the principle of an electron ladder facilitating the transition between a low and a high potential state.

In summary it may be concluded that of all microelements only iron is biochemically identified as a stoichiometrical component of an enzyme. Next to iron comes copper, and it is justified to speak of copper enzymes, even if their participation in indispensable metabolic systems is not thoroughly elucidated. Regarding manganese its essentiality is physiologically fairly well known but precise biochemical knowledge, comparable to that of iron, is lacking. The physiological experience is displaying an exceedingly wide field of phenomenons related to manganese. This element illustrates ion antagonisms of several kinds, among them those induced by factors regulating the transport velocity of Mn-ions through the plant, co-enzymatic effects comparable to those of magnesium and calcium, and finally effects related to the oxidation-reduction balance between different valency stages. Of the other microelements only boron and molybdenum have been shown to cooperate in biochemically defined processes. Our discussion as to possible pathways of regulating metabolic processes by means of specifically fixed microelements calls attention to a number of tentative mechanisms of action, the real nature of which, however, is still an object of future research work.

Elements	N	K	P	Mg	Na	Ca	Fe	Cu	Mn
mg Atom %	125	10	10	4	0.8	0.6	0.1	0.02	0.02
relative . .	6.250	500	500	200	40	30	5	1	1

FIG. 1 — Absolute and relative content of a number of mineral constituents of seeds of barley. Average figures from a large material. First line: values in milligram-atom percent of the dry weight. Second line: relative values, calculated from the content of Cu and Mn

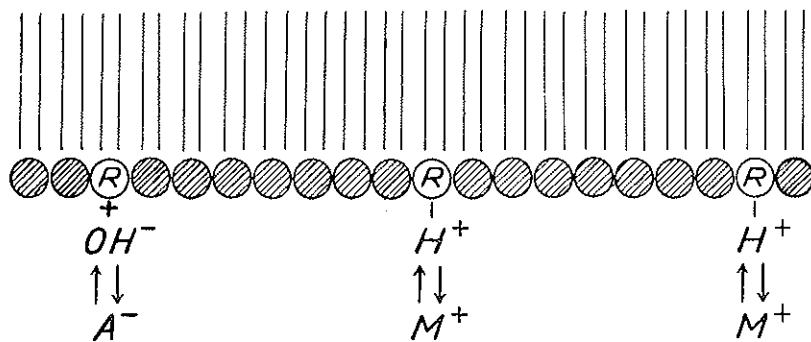


FIG. 2 — Scheme of the protoplasmic surface. The hatched circles are the non-dissociated molecules. R are the positive, or negative «heads» of the dissociated carriers which participate in the absorption of anions (A^-) or cations (M^+) of neutral salts

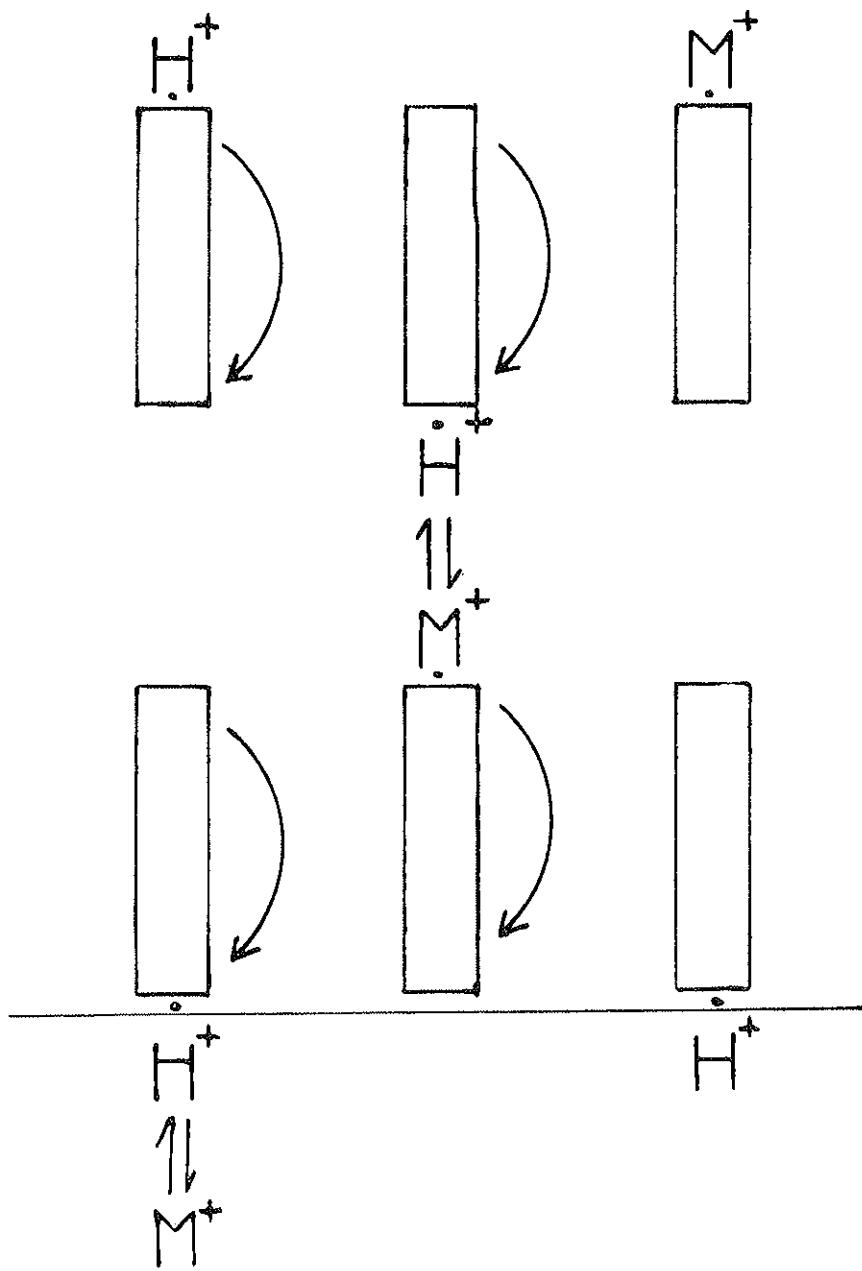


FIG. 3 — Scheme of the transportation by successive exchange of metallic cations with the H^+ -ions of dissociated carrier molecules

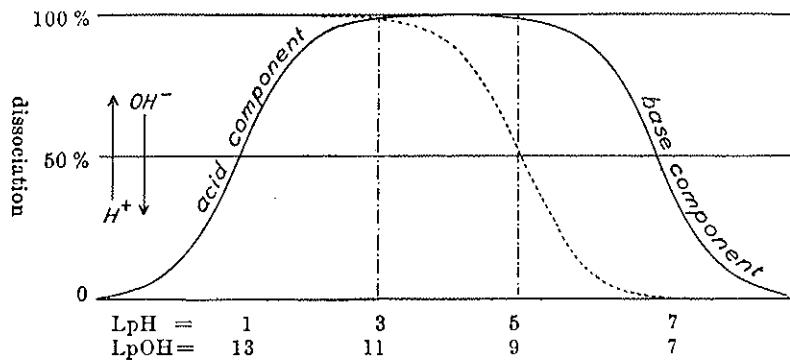


FIG. 4 — Scheme of the acid and basic dissociation in the surface of the protoplasm of root cells. The total surface behaves as an amphoteric colloid, with dominating acid dissociation and an intermediate region of complete dissociation at about pH 3-5

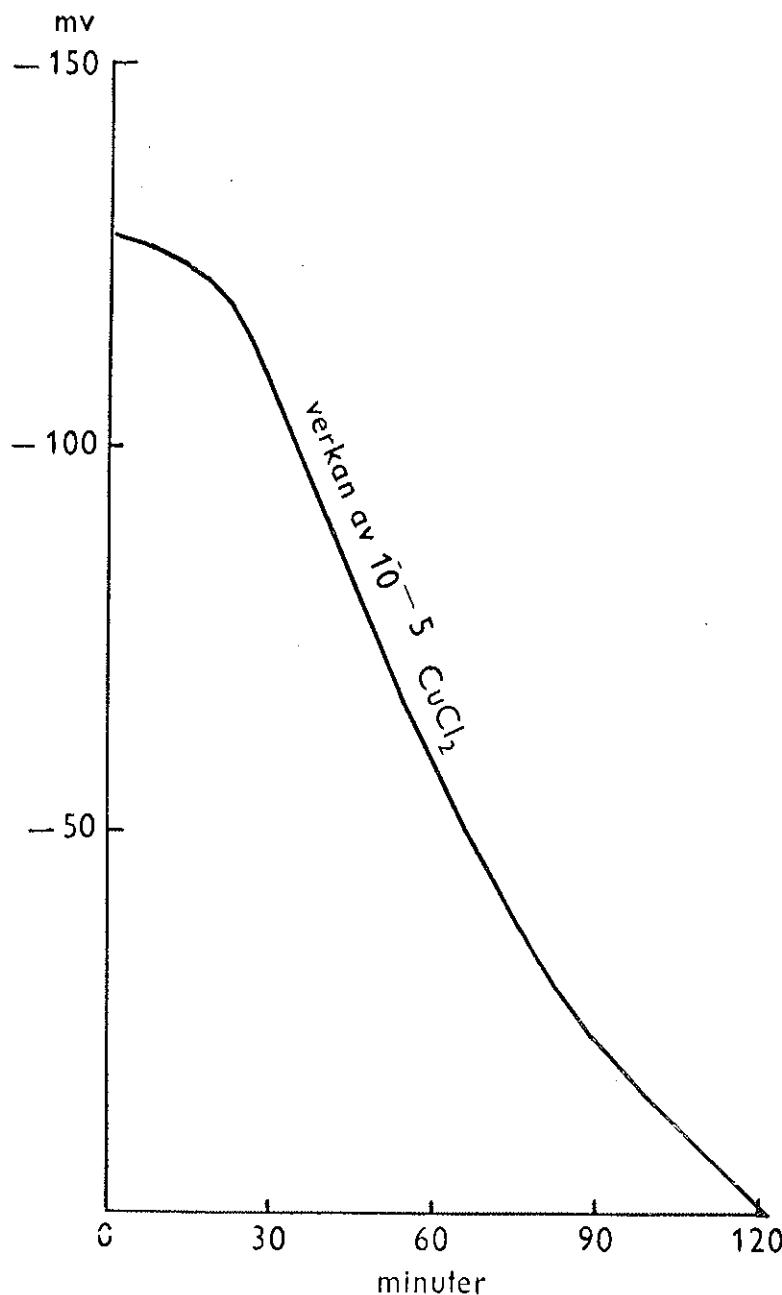


FIG. 5 — The decrease of the surface potential of wheat roots at an increasing absorption of copper ions

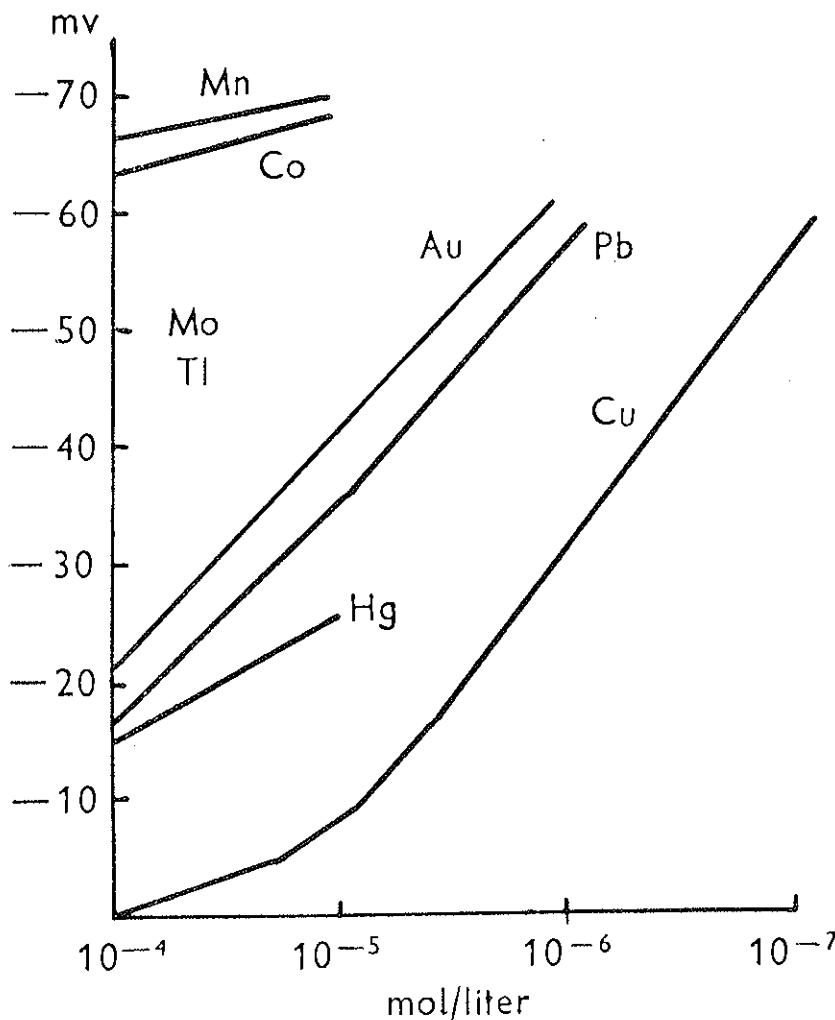


FIG. 6 — The influence of a number of heavy metals (as chloride or nitrate) on the surface potential of wheat roots. With Cu, Hg, Pb and Au the poisonous effect — which is noticed from the sinking potential — rises with rising concentration. The oligoelement copper must accordingly be applied in concentrations below 10^{-7} m. if the surface potential shall remain at normal height (=c. -60 mv). The oligoelements manganese, cobalt, and molybdenum may be applied in concentrations as high as 10^{-4} m. Traces of manganese are needed for the maintenance of the normal surface potential

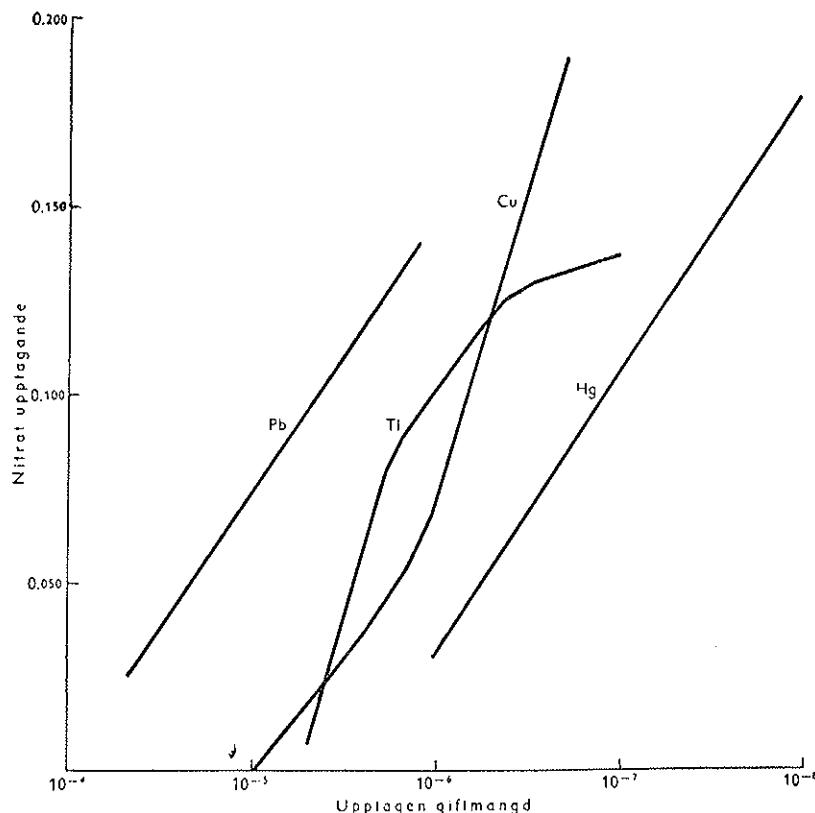


FIG. 7 — The influence of heavy metals on the active absorption of nitrate by roots of wheat. On the abscissa the quantities of metals absorbed by the roots, on the ordinate the quantity of absorbed nitrate

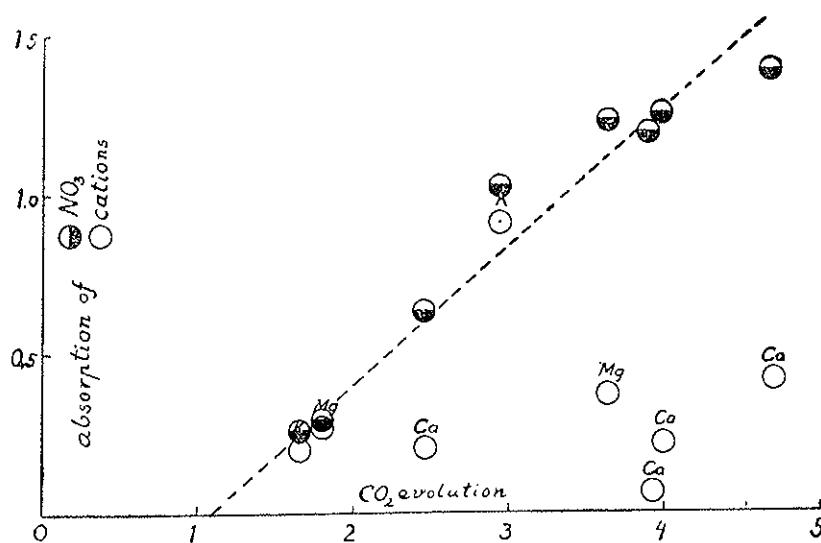


FIG. 8 — The relation between the respiration and the absorption of nitrate and cations from solutions of single salts. From the original experiments on anion respiration performed by Lundegårdh and Burström in 1933

Voir la discussion à page 537

REFERENCES

- [1] STILES W., *Trace elements in plants and animals*. Cambridge 1946.
 BRENCLEY W. E., *The essential nature of certain minor elements for plant nutrition*. « The Botanical Review », 13, 1947, 169.
- ARNON D. I., *Copper Metabolism*. (McElroy & Glass). 1950, p. 89.
- [2] LUNDEGÅRDH H., *Die Permeabilität der Wurzelspitzen von Vicia faba*. « Kungl. Svenska Vet. Akad. Handl. », 47, p. 49, 1911.
 — *Theorie der Ionenaufnahme in lebenden Zellen* « Die Naturwissenschaften », 23, 1935, p. 313.
 — *Ionenkonzentration und Ionenaustausch in der Grenzfläche Protoplasma: Lösung*. « Biochem. Zeitschr. », 298, 1938, p. 51.
 — *Mangan als Katalysator der Pflanzenatmung*. « Planta », 29, 1939, p. 419.
 — *An electro-chemical theory of salt absorption and respiration*. « Nature », 143, 1939, p. 203.
 — *Investigations as to the absorption and accumulation of inorganic ions*. « Annals Agric. Coll. Sweden », 8, 1940, p. 233.
 — *Die Nährstoffaufnahme der Pflanze*. Jena 1932.
 — *Die quantitative Spektralanalyse der Elemente*. Bd. 1 u. 3, Jena 1929-1934.
 — *Klima und Boden in ihrer Wirkung auf das Pflanzenleben*, 1^{er} Aufl. 1925, 4th Aufl. 1954 (editions in English, Russian, and Japanese). Jena.
 — *Lärobok i växtfysiologi med växtanatomii* (Plant physiology with anatomy). Stockholm 1950. English edition under preparation.
 — *Die Blattanalyse*. Jena 1945 (Leaf analysis, London, 1951).
 — *Untersuchungen über das chemisch-physikalische Verhalten der Oberfläche lebender Zellen*. « Protoplasma », 35, 1941, pp. 548.
 — *Mineral Nutrition of Plants*. « Ann. Review of Biochemistry », 3, 1934, p. 485, 16, 1947, p. 503.
 — *Spectroscopic evidence of the participation of the cytochrome-cytochrome-oxidase system in the active transport of salts*. « Arkiv f. Kemi », Stockholm, 3, 1951, 69.
 — *Properties of the cytochrome system of living wheat roots*. « Nature », 169, 1952, p. 1088.
 — *Properties of the cytochrome system in wheat roots*. « Arkiv f. Kemi », Stockholm, 5, 1952, p. 97.
 — *Reaction kinetics of the cytochrome system*. « Nature », 171, 1953, p. 521.
 — *Controlling effects of salts on the activity of the cytochrome oxidase*. « Nature », 171, 1953, p. 477.
 — *A new cytochrome in living roots*. « Nature », 173, 1954, p. 939.

- *Enzyme systems conducting the aerobic respiration of roots of wheat and rye.* « Arkiv. f. Kemi », Stockholm, 7, 1954, p. 451.
- *On the oxidation of cytochrome f by light.* « Physiologia Plantarum », 7, 1954, p. 375.
- *Anion respiration: the experimental basis of a theory of absorption, transport and exudation of electrolytes by living cells and tissues.* « Symposia of the Society for Experimental Biology », 8, 1955, p. 262.
- *Spectrophotometrical determinations of peroxidase in living roots.* « Physiologia Plantarum », 8, 1955, p. 84.
- *On partial oxidation of the cytochrome system in the presence of cyanide.* « Physiologia Plantarum », 8, 1955, p. 95.
- *On the cytochromes b and dh in the roots of cereals.* « Physiologia Plantarum », 8, 1955, p. 142.

LUNDEGÅRDH H. & BURSTRÖM H., *Untersuchungen über die Atmungsvorgänge in Pflanzenwurzeln.* « Biochem. Zeitschr. », 277, 1935, p. 223.

LUNDEGÅRDH H., BURSTRÖM H. & RENNERFELT E., *Die Aufnahme von Alkali- und Erdalkalichloriden.* « Svensk Bot. Tidskr. », 26, 1932, p. 271.

LUNDEGÅRDH H. and BERGSTRAND H., *Spectral-analytical investigations in to the content of mineral substances in the liver.* « Nova Acta Regiae Soc. Scient. Upsal. », ser. IV, vol. 12, n. 3, 1940.

LUNDEGÅRDH H., SANDEGREN E. and LUNDIN H., *Über den Gehalt der Maisgerste an Amylase, Aneurin und Mineralstoffe.* « Ann. Landwirtsch. Hochschule Schwedens », vol. 12, 1944, p. 172.

[3] BURSTRÖM H., *Die Rolle des Mangans bei der Nitratassimilation.* « Planta », 30, 1939, p. 129.
— *Mineralstoffwechsel.* « Fortschritte d. Botanik », 15, 1954, 290.

[4] LEMBERG R. & LEGGE J. W., *Hematin compounds and bile pigments.* New York, 1949.

[5] DAWSON C. R. & TARPLEY W. B., *Copper oxidases. The enzymes.* (Sumner, Myrbäck), 2, part. 1, 1951.

ALGUNOS CASOS DE DEFICIENCIAS DE OLIGOELEMENTOS EN RELACION CON LOS FACTORES DE FORMACION DEL SUELO

JOSÉ M. ALBAREDA HERRERA

Si el suelo es una resultante de la acción de los agentes físicos y biológicos sobre el material geológico y los restos orgánicos, será importante situar los oligoelementos en relación con cada factor formador del suelo.

Hay una distribución geológica de los oligoelementos y una distinta fijación o movilización de estos elementos, dependientes de la constitución del suelo y de la intensidad de los factores climáticos; varía también la asimilación biológica que determina la participación de estos elementos en la materia orgánica del suelo. Para llegar a establecer esta distribución de los oligoelementos en el suelo, en función de sus factores formadores, hay que multiplicar los análisis de las distintas regiones geológicas y climáticas y hay que considerar el contenido en oligoelementos de los distintos tipos de humus.

Hemos comenzado esta tarea en España en el Instituto de Edafología y Fisiología Vegetal y voy a limitarme a presentar algunos casos de ese contraste que presenta la Península Ibérica entre una región granítica, húmeda, atlántica, ejemplo Galicia, en el Noroeste, y otra caliza, árida, mediterránea, ejemplo cuenca del Ebro y Levante.

F. BURRIEL y R. GALLEGU [1] en un trabajo sobre cobalto en suelos españoles, hacen un estudio de los distintos factores que intervienen en la determinación colorimétrica del cobalto con la «ní-

troso-R salt » y establecen un método haciendo una separación previa del cobalto con ditizona, destrucción del ditizonato con la mezcla sulfonítrica, formación del complejo de cobalto con el reactivo, destrucción del exceso de reactivo con bromo y medida colorimétrica final; con este método determinan el cobalto en una serie de perfiles, haciendo la extracción por ebullición de la muestra con los ácidos sulfúrico y nítrico. Los resultados que obtienen se expresan en la tabla siguiente:

TABLA I

Localidad ■	Horizonte	p. p. m. de Co.	Naturaleza de la roca
Almendralejo (Badajoz)	Ao	9,1	Gneis
	A/Ca	7,1	
	Ca	4,8	
	C ₁	12,5	
	C ₂	14,9	
Cornellana (Asturias)	A ₁	14,4	Pizarra
	B ₁	12,5	
	B ₂	14	
	C ₁	15,2	
	C ₂	13,6	
Trinchespe (Guipúzcoa)	A	10,9	Caliza-marga
	B	10,2	
	C	11,4	
Bagur (Gerona)	A ₁	6,9	Pizarra
	A ₂	7,2	
	C ₁	5,0	
	C ₂	10,1	
Alburrea Alta (Navarra)	Ao	0,3	Pizarra
	A ₁	3,5	
	B	9,6	
Barranco de Cotatuero (Pirineo-Huesca)	Ao	2,9	Caliza-arenosa
	A ₁	3,2	
	C	7,8	
Puertas (Santander)	Ao	15,2	Caliza
	A ₁	20,0	
	C	7,4	

(segue) TABLA I

Localidad	Horizonte	p. p. m. de Co.	Naturaleza de la roca
Covadonga (Asturias)	A ₀	15,4	Silicea
	A ₁	15,0	
	A ₂	15,0	
	A ₃	16,2	
	C	7,1	
Alto del Paraño (Orense)	A ₁	1,3	Pizarra
	C ₁	4,6	
	C ₂	5,4	
Alcolea del Pinar (Guadalajara)	A	6,5	Marga-caliza
	B ₁	5,7	
	B ₂	5,7	
	C	5,3	
Villaviciosa (Asturias)	A ₁	8,1	Marga
	B	11,7	
	Ca	5,1	
	C	5,2	
Castejón (Huesca)	A ₀	1,4	Caliza-arenosa
	A ₁	0,9	
	B	4,5	
	C	3,8	
Sierra de Oroel (Huesca)	A	1,5	Pudingas arenosas
	B	1,8	
	C	3,7	
Alcalá de Henares (Madrid) Muestras superficiales	I	3,6	
		5,3	
		4,3	
Calatayud (Zaragoza)	A ₀	2,1	Margas-caliza
	A ₁	6,4	
	B	3,9	
	C	2,8	
Sierra de Andía (Navarra)	A	2,1	Margas miocenas
	B	1,3	
	C	2,2	
Oviedo	A ₀	3,1	Arcillas
	C ₁	5,6	
	C	1,2	

(segue) TABLA I

Localidad	Horizonte	p. p' m. de Co.	Naturaleza de la roca
Soto del Barco (Asturias)	A ₁	1,1	Arenisca
	A ₂	0,3	
	B ₁	1,8	
	B ₂	1,1	
	C	1,0	
Liedo (Santander)	A ₀	7,7	Caliza
	A ₁	9,8	
	C	0,5	
Santander	A ₀	1,2	Arenisca
	A ₁	1,7	
	A ₂	3,7	
	A ₃	14,2	
	C	0,5	
La Felguera (Asturias)	A	0,85	Arenisca
	B ₁	0,50	
	B ₂	0,38	
La Curiscana (Asturias)	A ₁	0,17	Arenisca
	A ₂	0,16	
	B _a	0,13	
	B ₂	0,92	
	B _a /C	0,29	
Alto de Pajares (Asturias)	A ₁	0,42	Arenisca
	A ₂ /C	0,18	
	C	0,21	
La Coruña	A ₁	0,7	Cuarcitas pizarras
	A ₂	0,5	
	B ₁	0,8	
	B ₂	0,7	
	B ₃	0,2	
	C ₁	0,2	
	C ₂	0,1	

En general se observa que las rocas calizas y las pizarras contienen más cobalto que las areniscas. Dentro del perfil el cobalto sigue una marcha paralela a la del hierro; en los podsoles se ve claramente un horizonte de lavado y un horizonte de acumulación.

En Galicia se está llevando a cabo un estudio solidario de los

suelos, los prados y las enfermedades del ganado. Indicaré algo de lo hecho en estos estudios. G. GONZÁLEZ [2] ha estudiado los suelos; las muestras fueron analizadas por MITCHELL con técnica espectrográfrica y en extracto de ácido acético al 2,5 por ciento y por G. GONZÁLEZ con técnica colorimétrica y extracción con ácido clorhídrico concentrado según la técnica de MITCHELL y DAVIDSON.

TABLA 2

Muestra	Localidad	Cobalto soluble en ácido acético 2,5 % p. p. m. suelo desecado al aire	Total (extracto ClH concentrado), p.p.m. suelo desecado al aire
1	Parroquia de Atios Porriño (positiva) . . .	0,16	3,9
2	Parroquia Budriño-Gándaras (positiva) . . .	0,26	4,5
5	Redondela (sospechosa)	0,12	6,5
7	Parroquia de Negros Redondela (positiva) . .	0,55	14,1
18	Porriño (sospechosa)	0,40	12,4
19	Porriño (sospechosa)	0,32	13,0

Los forrajes de Galicia han sido estudiados por G. GONZÁLEZ y R. GALLEGOS [3] en un estudio sobre el contenido de hierro, manganeso, cobre y cobalto. Analizan un total de sesenta y dos muestras.

Los resultados pueden verse en la tabla 3, expresados en p.p.m. sobre materia seca. En las gráficas I y II las muestras están ordenadas según su contenido creciente de hierro. No se observa una regularidad inmediata en cuanto a los contenidos relativos de estos elementos.

Todas estas muestras corresponden a zonas en las que se han observado enfermedades del ganado, atribuidas a deficiencias de oligoelementos, especialmente cobalto, en los pastos.

Las gráficas III, IV y V representan la frecuencia con que se han encontrado los resultados correspondientes. En las de cobre y cobalto, la zona rayada corresponde a la zona dudosa: es decir que los contenidos a la derecha pueden considerarse como buenos, mientras que los contenidos a la izquierda son frecuentemente deficientes. En la gráfica del manganeso, la zona rayada es zona de transición hacia la toxicidad; así pues los resultados que se hallan a la derecha significan un contenido en manganeso tóxico.

TABLA 3

Num.	LOCALIDAD	Fecha	Fe	Mn	Cu	Co
1	Caldas de Reyes	13-7-51	6	169	8,7	0,06
2	Arcas-Dorrón		6	146	10,9	0,12
3	Santa María de Sacos	16-7-51	7	182	6,0	0,08
4	Loureiro	29-6-51	8	105	9,4	0,06
5	Hortos el Grove		9	42	10,5	0,08
6	San Salvador-Moraña		10	150	7,5	0,14
7	Puente Sampayo		12	70	7,4	0,06
8	Cruceiro Portas	14-7-51	13	529	6,4	0,16
9	Rellas Silleda	29-6-51	21	86	41	0,06
10	Forcarey	16-7-51	28	126	1,1	0,17
11	Arcas		29	111	6,9	0,11
12	Campaño	10-7-51	37	5	11,2	0,04
13	Casal-Poyo		38	54	16,4	0,08
14	Pedre	16-7-51	45	316	20,8	0,26
15	Ceredo	16-7-51	55	12,4	9,0	0,01
16	Casal		56	654	16,4	0,21
17	Cernadas Valga	13-7-51	58	216	2,8	0,05
18	Fórján-Dádina		66	74	14,9	0,36
19	Cuntis		74	3	10,1	0,06
20	Arcas-Dorrón		78	146	50	0,01
21	Curro		79	3	13,6	0,03
22	Arcas-Dorrón		81	62	8,8	0,07
23	Horto el Grove		85	2	7,9	0,03
24	San Cayetano	10-7-51	88	218	15,5	0,03
25	La Estrada	29-6-51	92	3,2	28	0,20
26	Valga	10-7-51	99	132	6,8	
27	Figueirido		102	141	15,1	0,06
28	Villalonga		112	22	12,5	0,14
29	Barro		117	621	0,78	0,04
30	Carracedo	16-7-51	121	17	4,0	0,10
31	La Portola	12-7-51	135	233	10,2	0,09
32	Pereiro-Dádina		138	3	14,1	0,01
33	San Vicente	13-7-51	141	242	10,4	0,14
34	La Estrada		160	3,7	9,5	0,15
35	San Jorge	16-7-51	166	93	6,7	0,06
36	Matalobos		177	5,3	9,4	0,07
37	Caldas	10-7-51	207	260	1,3	0,04
38	El Espino (Lalin)	29-6-51	400	10	37,0	0,06
39	Lalin	29-6-51	408	114	16,7	0,12
40	Laño		443	405	12,6	0,32
41	Arcas Bordones		595	21	10,6	0,02
42	Doma	16-7-51	623	10,0	7,6	
43	Prado Lalin	29-6-51				0,11
44	Carracedo	10-7-51				0,05
45	Forcarey	16-7-51				0,10
46	Tenorio	16-7-51				0,09
47	Silleda	29-6-51				0,11
48	Silleda					0,17

(segue) TABLA 3

Num.	LOCALIDAD	Fecha	Fe	Mn	Cu	Co
49	Forcarey					0,26
50	Prado					0,07
51	Tenorio					0,33
52	Carracedo					0,34
53	Chancelas					0,28
54	La Estrada					0,50
55	Horto					0,27
56	Casal-Noalla					0,06
57	Moraña					0,28
58	Luneda					0,29
59	Luneda					0,29
60	Cañiza					0,25
61	Lebóriz					0,33
62	Lebóriz					0,29

De los resultados obtenidos se deduce:

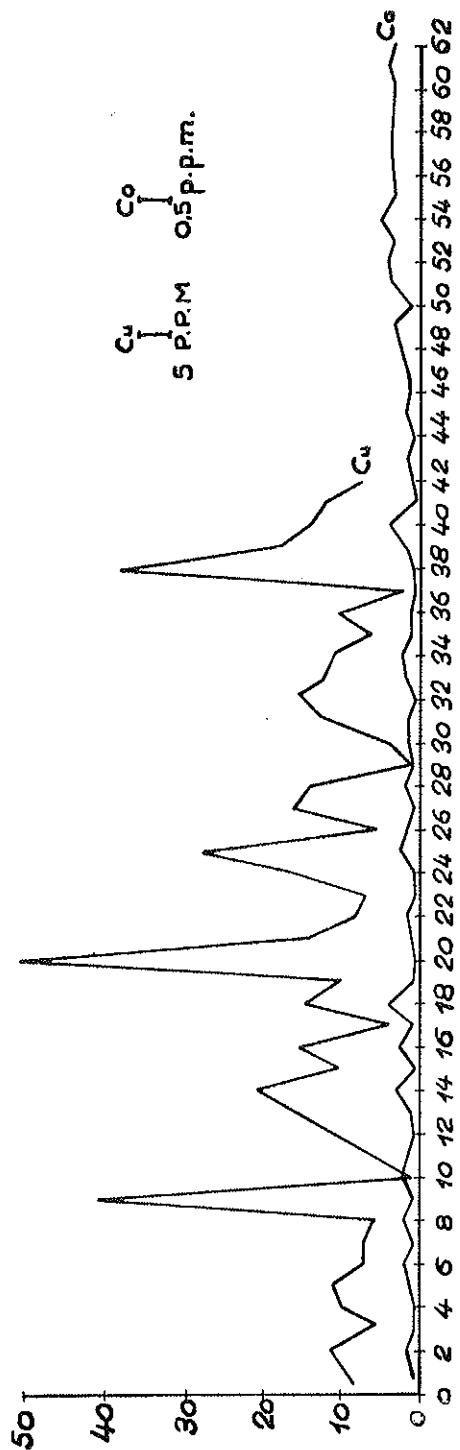
- 1) Que algunas muestras (7%) alcanzan valores tóxicos de manganeso, dato que debe tenerse en cuenta por tratarse de suelos ácidos.
- 2) El 12% de las muestras pueden considerarse como deficientes en cobre.
- 3) En cuanto al cobalto el 39% de las muestras deben considerarse deficientes y solamente el 50% son netamente normales.

Las deficiencias de cobalto explican una anemia carencial del ganado vacuno gallego.

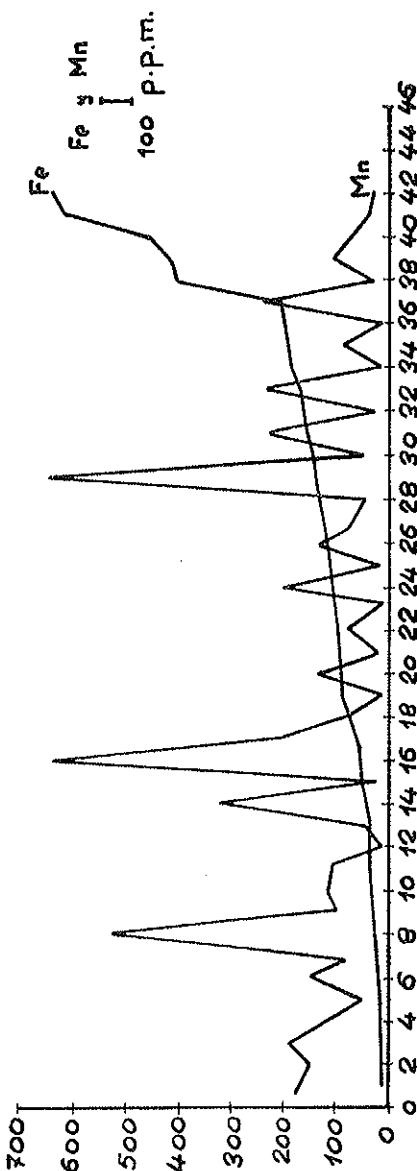
Se conoce desde muy antiguo en muchas comarcas gallegas, una enfermedad del ganado vacuno por la que los terneros, después del destete, caen en un estado marasmático.

Esta enfermedad ha sido estudiada por P. CARDAL APARISI y N. OCAMPO OTERO [4]. Su presentación es diseminada, en forma de focos enzoóticos locales muy circunscritos, con preferencia en los terrenos montañosos sobre los valles. Aumenta en primavera y otoño

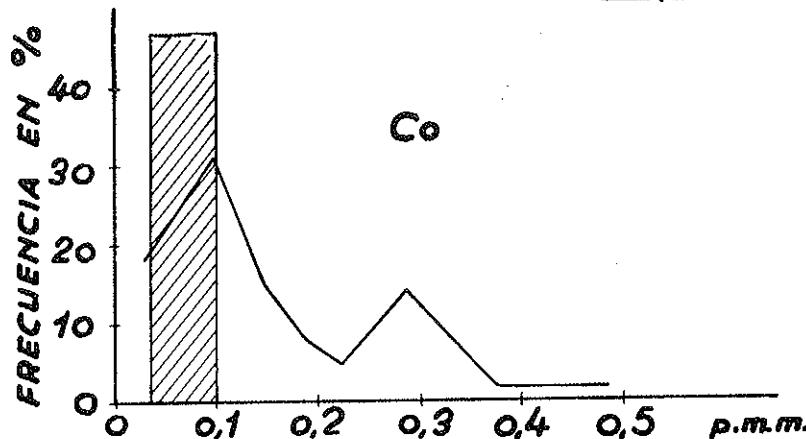
Gráfica I



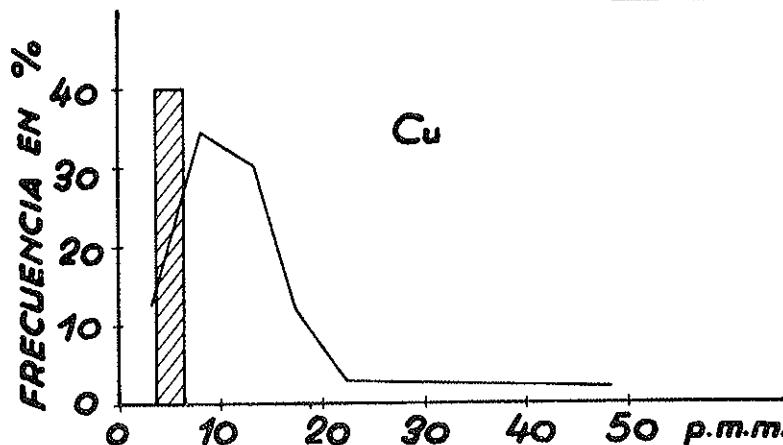
Gráfica II



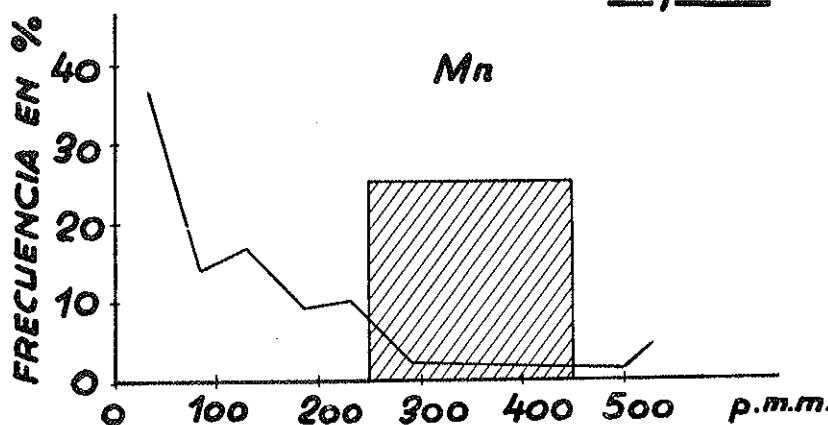
Grafica III



Grafica IV



Grafica V



coincidiendo con épocas de pastoreo integral. Esta enfermedad se confundía con la distomatosis hepática frecuente en dicha región.

M. MEDINA y F. NIÑO [5] realizan un estudio del contenido en molibdeno y hierro de dos grupos de muestras de plantas forrajeras de la provincia de Córdoba; el primer grupo está constituido por lotes recogidos en sitios señalados tradicionalmente como predisponentes a procesos diarreicos en el ganado en pastoreo, y el segundo grupo corresponde a muestras de especies o mezclas recogidas en sitios en donde nunca se señalan tales accidentes; en ambos grupos se encuentran niveles normales de molibdeno que oscilan entre 0 y 10 p.p.m. y de hierro que oscilan entre 16 y 480 p.p.m. no apreciándose diferencias significativas. Los suelos correspondientes tienen reacción ácida, pH entre 6 y 7.

CRUZ RODRIGUEZ y sus colaboradores, en la Estación Experimental de Aula Dei, Zaragoza, han estudiado la clorosis producida en cultivos de zonas semi-áridas. En el Noreste de España, en la vega del Ebro y en las proximidades de Barcelona, se aprecian clorosis y marchitamiento progresivo descendentes en los árboles frutales, especialmente en los melocotoneros que tienen hojas amarillas, ramitas muertas y grandes ramas ya secas, mostrando las distintas etapas intermedias entre los árboles dañados y los aparentemente sanos.

El método de las inyecciones mostró que los melocotoneros estaban afectados por un complejo de deficiencias de oligoelementos. En Zaragoza los melocotoneros han mostrado deficiencias en hierro y en cobalto y, donde no han sido abonados con estiercol, en zinc. En Barcelona ha sido clara la carencia con respecto al hierro y no muy marcada en los otros elementos (manganese, zinc, boro, cobalto).

A. ABADIA [6] ha aplicado el método del diagnóstico biológico, como complemento del visual, en frutales, inyectando una sal del elemento que se juzga deficiente para comparar esta zona con otra no tratada.

Los resultados obtenidos en estas experiencias han sido:

TABLA 4

	Fe		Mn		Cu		Zn		B	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
Melocotonero (peach-tree)	14	13	22	8	18	12	22	6	13	6
Membrillero (quince-tree)	10	10	7	1	7	0	2	0	2	0
Peral (pear-tree)	8	8	8	0	8	0	8	0	7	0
Cerezo (cherry-tree)	16	15	15	0	2	0	2	0	2	0
Manzano (apple-tree)	6	6	6	0	—	—	—	—	—	—

- a) inyecciones colocadas;
- b) inyecciones que han dado respuesta positiva.

En relación con los métodos curativos señala ABADIA que los mejores resultados conseguidos para corregir la deficiencia inducida de hierro corresponden a los obtenidos por medio de inyecciones sólidas o pulverización de órganos aéreos con soluciones adecuadas.

Las cifras que se presentan a continuación muestran los resultados registrados en estas experiencias.

TABLA 5

	Antes de inyectar		Después de inyectar	
	Verdes	Cloróticas	Verdes	Cloróticas
Peso en verde de una hoja (g)	0,28	0,33	0,707	0,522
Peso en seco de una hoja (g)	0,1	0,1	0,302	0,166
Longitud media de una hoja (cm.)	7,5	9,9	14,8	11,7
Anchura media de una hoja (cm.)	2,8	3,3	3,95	3,48

Las deficiencias en hierro en el área de Zaragoza han sido estudiadas en relación con el enraizamiento de membrilleros [7], con objeto de seleccionar aquellas variedades más en armonía con la naturaleza de los suelos, llegando a consecuencias que establecen una estrecha dependencia entre la manifestación de la clorosis y la capacidad de enraizamiento de las estaquillas [7].

Se han estudiado los efectos, muy acusados, de la clorosis en un vivero de membrilleros, así como los efectos positivos de pulverizaciones regulares con sulfato ferroso que se han llevado a cabo con objeto de precisar las concentraciones exigidas para que desaparezcan los síntomas de la carencia. La respuesta positiva a las pulverizaciones han confirmado al mismo tiempo el diagnóstico visual y biológico (por inyección) de la deficiencia del hierro, realizados previamente. De las concentraciones de sulfato ferroso ensayadas, la más eficaz es la de 0,10% sin que se pueda precisar todavía el tratamiento exacto para obtener una recuperación eficiente y prolongada de los membrilleros de vivero en esta zona, cuyas condiciones climáticas están caracterizadas por un régimen de vientos fuertes, bajas precipitaciones e intensa acción solar.

También se han estudiado las variedades de perales en relación con las deficiencias de hierro, buscando cuales son resistentes y cuales cloróticas [8]. Ya en los perales aparece la influencia del factor luz en la acentuación causada por las condiciones edáficas, y se ha comprobado que el sombreado artificial de ramas de perales evita la destrucción de la clorofila, modificando al mismo tiempo el contenido de las hojas en polifenoles, ácido ascórbico, etc.

La enfermedad no es propia solo de los árboles frutales, se dá igualmente en los cereales y se aprecia en las hojas maduras de patata en la zona de Barcelona y en las de Murcia, Málaga y Sevilla.

La clorosis se aprecia también en especies de los géneros *Rubus*, *Crataegus*, *Rosa*, *Spiraea*, *Vitis*, etc., que se muestran igualmente sensibles a esta deficiencia, así como algunas especies de *Fragaria*, *Viola*, *Convolvulus*, *Chelidonium* y *Parietaria*, que muestran síntomas fuertemente acusados en varias localidades de esta zona (Monasterio de Piedra, Zaragoza) [9].

La carencia de hierro está caracterizada por la típica pérdida de clorofila en los espacios intervenales de las hojas jóvenes y, en los casos más acentuados, la clorosis se extiende a todas las hojas de la planta con pérdida de color casi total.

Los cultivos de cacahuetes, *Arachis hypogea*, en esta zona son también extremadamente sensibles a la clorosis por deficiencia indu-

cida de hierro. En una pequeña parcela de la Estación Experimental de Aula Dei (Zaragoza) se han sembrado cinco líneas de cada una de las variedades siguientes: *Local*, *Virginia jumbo*, *Tennessee red* y *White spanish*, pudiéndose comprobar que las líneas que corresponden a la variedad *Local* son cloróticas, así como las *Tennessee red* y *White spanish*, todas ellas variedades erguidas, mientras que la variedad *Virginia jumbo*, rastrera, es más resistente a la clorosis que las anteriores.

Las deficiencias estudiadas en estas zonas pueden considerarse entre las más intensas. Son muy numerosos los árboles frutales cuya afección clorótica avanzada se manifiesta por una destrucción casi completa de la clorofila. Sin embargo, en los cultivos anuales de leguminosas y cereales, no se han encontrado síntomas graves de deficiencia inducida de hierro. En relación con la sensibilidad a la carencia inducida de hierro, se pueden disponer los principales cultivos en el orden siguiente: árboles frutales, leguminosas y cereales, teniendo en cuenta las condiciones dominantes en esta zona.

Más de la mitad de España tiene suelos calizos y aguas de regadío alcalino calizas, condiciones que tienden a producir deficiencias en microelementos.

La influencia del suelo y de la luz en los cultivos de las zonas semi-áridas, ha sido estudiada por C. RODRIGUEZ y CARMEN DIEZ ALTARES [9].

En los suelos de estas características, los árboles frutales, tales como los membrilleros y melocotoneros, muestran los síntomas más graves de clorosis por deficiencia de hierro.

Los suelos de esta zona están caracterizados por un bajo contenido en materia orgánica, comprendido entre 1,5 y 2,1%, un pH alcalino comprendido entre 8,20 y 8,55%, y una elevada proporción de carbonatos comprendida entre 32 y 39%, pero aparte de estas condiciones del suelo hay que considerar el factor luz que determina también la pérdida de clorofila y la acentuación de los síntomas. Basta sombrear las hojas para corregir síntomas de clorosis producidos por deficiencia inducida de hierro. El efecto es general y patente,

basta proteger las hojas con bolsas de tela, sin que se llegue a un oscurecimiento total, para que disminuyan los síntomas, excepto en las hojas de melocotonero. El contenido en clorofila en las hojas de peral de diferentes clones varía en las hojas cubiertas y en las inyectadas con sulfato ferroso, según se muestra en la siguiente tabla:

TABLA 6

Muestra	Tanto por ciento de clorofila			Tiempo de sombreado (días)
	Cloróticas	Cubiertas	Inyectadas	
1	38,50	56	68,40	8
2	31,50	58	91	8
3	20,55	30,85	50,25	8
4	25,80	42	65	8
5	21,80	38,70	45	8
6	30,0	45	41	8
7	21,0	49,50	74,50	12

Las deficiencias de hierro aparecen como factor limitante en la formación de las moléculas de clorofila y los tratamientos con soluciones de sulfato ferroso dan lugar a una síntesis de esa clorofila no formada en las hojas cloróticas.

CRUZ RODRIGUEZ y ABADIA [10] han seguido mediante análisis periódicos la formación de catalasa y clorofila para establecer su relación. Los valores de clorofila no son absolutos y se determinan interpolando las lecturas fotocolorimétricas de los extractos con alcohol etílico en una curva patrón, asignando el valor 100 a la solución de hojas que no tienen síntomas de deficiencias de hierro. La actividad catalásica se mide por el volumen de oxígeno desprendido en la descomposición de una cantidad determinada de agua oxigenada.

En el melocotonero y membrillero el aumento de clorofila por la inyección de sulfato ferroso se observa a las ciento veinte horas de efectuado el tratamiento.

TABLA 7

Horas transcurridas desde el tratamiento	Melocotonero (peach-tree)		Membrillero (quince-tree)	
	Inyectados	Sin inyectar	Inyectados	Sin inyectar
24	39,9	42,4	32,8	34,5
48	42,0	40,4	35,2	35,0
72	46,1	41,3	37,8	34,7
96	48,3	33,8	42,6	38,2
120	61,0	45,8	52,6	35,8
144	60,5	38,0	60,0	33,0
168	70,0	50,5	66,0	32,5
192	67,3	47,3	59,0	30,0

Los valores indicados en esta tabla son contenidos en clorofila referidos a tanto por ciento de material fresco.

TABLA 8

Horas transcurridas desde el tratamiento	Melocotonero (peach-tree)		Membrillero (quince-tree)	
	Tratados	Sin tratar	Tratados	Sin tratar
24	10,0	8,3	7,8	5,8
48	10,3	7,4	8,8	6,7
72	11,3	7,6	9,1	6,2
96	10,4	6,9	9,8	6,5
120	9,3	7,4	8,9	6,4
144	12,0	7,6	10,8	5,9
168	13,2	10,4	11,4	6,2
192	10,8	8,7	9,8	5,4

Las cifras indicadas en la tabla representan valores absolutos de la actividad catalásica expresados en centímetros cúbicos de O₂ desprendidos al descomponerse una cantidad determinada de agua oxigenada.

Un conocimiento más exacto del curso de la actividad catalásica se obtiene mediante el estudio de la actividad catalásica relacionada con la unidad por ciento de clorofila; es el valor llamado R que puede expresarse por la relación:

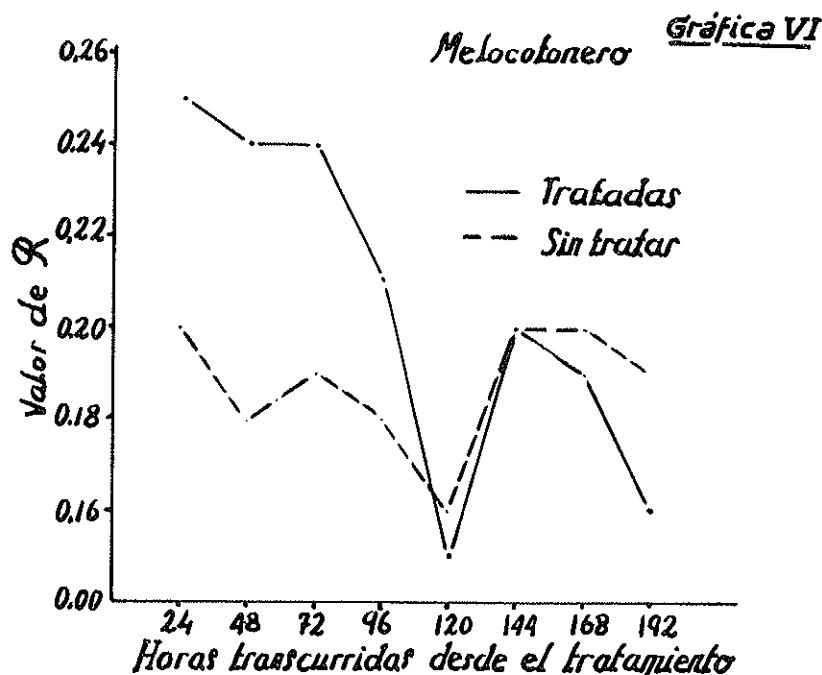
$$R = \frac{\text{cc. de oxígeno desprendidos}}{\% \text{ de clorofila}}$$

En la tabla siguiente se presentan los valores de R obtenidos para el melocotonero y membrillero.

TABLA 9

Horas transcurridas desde el tratamiento	Melocotonero (peach-tree)		Membrillero (quince-tree)	
	Tratadas	Sin tratar	Tratadas	Sin tratar
24	0,25	0,20	0,24	0,17
48	0,24	0,18	0,25	0,19
72	0,24	0,19	0,24	0,18
96	0,21	0,18	0,23	0,17
120	0,15	0,16	0,17	0,18
144	0,20	0,20	0,18	0,18
168	0,19	0,20	0,17	0,19
192	0,16	0,19	0,16	0,18

La gráfica VI muestra la representación de los valores de R indicados en la tabla 9.



El contraste geológico y climático que presentan los factores formadores de los suelos en el Noreste de España y en el Noreste y Levante, se revela también en los oligoelementos que dan lugar a problemas agrícolas muy distintos en cada una de dichas regiones.

R E S U M E N

Los factores geológicos y climáticos de formación del suelo determinan regiones edáficas y en España existe el contraste entre la región granítica, húmeda, atlántica, de Galicia, y la caliza, árida, mediterránea, de la cuenca del Ebro y Levante. Este contraste trasciende a los problemas agrícolas derivados de las deficiencias de oligoelementos y se presenta en los suelos de ambas regiones.

El Instituto de Edafología y Fisiología Vegetal, de Madrid, ha comenzado estos estudios. La distribución del cobalto en los suelos españoles estudiados por F. BURRIEL y R. GALLEGOS muestra la relación entre la naturaleza de la roca madre y el contenido en cobalto de los suelos. En la tabla 1 aparecen estos ordenados por contenidos decrecientes de cobalto en la roca madre (Horizonte C). En general se observa que las rocas calizas y las pizarras contienen más cobalto que las areniscas y que en el perfil el cobalto sigue una marcha paralela a la del hierro.

En Galicia se han estudiado los suelos por G. GONZALEZ y R. GALLEGOS (tablas 2 y 3; gráficas I a V). Existen zonas con enfermedades del ganado atribuibles a deficiencias de oligoelementos, especialmente cobalto, en los pastos. Se han determinado las cantidades de hierro, manganeso, cobre y cobalto. Los suelos son ácidos y algunas muestras (7%) alcanzan valores tóxicos de manganeso; otras (12%) pueden considerarse como deficientes en cobre y hay un 39% deficiente en cobalto, elemento del que se considera solamente el 50% de los suelos como netamente normales.

P. CARDAS APARISI y N. OCAMPO OTERO han estudiado la enfermedad del ganado vacuno por la que los terneros, después del destete, caen en un estado marasmático.

En la región mediterránea, CRUZ RODRIGUEZ y sus colaboradores, en la Estación Experimental de Aula Dei, han estudiado la clorosis pro-

ducida en cultivos de zonas semiáridas y han aplicado el método del diagnóstico biológico como complemento del visual en árboles frutales, encontrando deficiencias graves de hierro, y también de manganeso, cobre, zinc y boro en melocotoneros (tablas 4 y 5). La enfermedad se presenta también en los cereales y patata en la zona de Barcelona y en las de Murcia, Málaga y Sevilla.

Con arreglo a la sensibilidad, a la carencia inducida de hierro, se pueden disponer los principales cultivos en este orden: árboles frutales, leguminosas y cereales; la clorosis se aprecia también en distintos géneros de plantas espontáneas.

Se encuentra distinta resistencia a la deficiencia inducida de hierro en distintas variedades de *Arachis hypogea* y se señala la variedad *Virginia jumbo*, rastrera, como la más resistente de las consideradas. También existen relaciones entre la distinta sensibilidad a la clorosis que manifiestan diferentes variedades de membrilleros y la capacidad de enraizamiento de sus estaquillas.

Los suelos de esta zona tienen bajo contenido en materia orgánica comprendido entre 1,5 y 2,1%, pH entre 8,20 y 8,55 y carbonatos entre 32 y 29%, pero además de estas condiciones del suelo hay que considerar el factor luz, que determina también una pérdida de clorofila; el sombreado de las hojas corrige los síntomas de deficiencia inducida de hierro (tabla 6).

CRUZ RODRIGUEZ y A. ABADIA han seguido la formación de catalasa y clorofila para establecer su relación (tablas 7, 8 y 9; gráfica VI). Distintos problemas agrícolas ocasionados por las distintas deficiencias en oligoelementos añaden un nuevo contraste al que presentan los factores formadores de los suelos en el Noroeste de España y en el Noreste y Levante.

S U M M A R Y

The geological and climatic factors of formation of soils determine the edafic regions, and there exists in Spain the contrast between the granite, humid, atlantic region of Galicia and the chalky, arid, mediterranean one of the Valley of the Ebro and Levante. This contrast trans-

cends the agricultural problems derived from the deficiency of oligo-elements and is present in the soils of both regions.

The *Instituto de Edafología y Fisiología Vegetal*, in Madrid, has begun these studies. The distribution of cobalt in the soils of Spain studied by F. BURRIEL and R. GALLEGOS shows the relation between the nature of the mother rock and the cobalt contents of the soils. These appear (in table 1) arranged by decreasing order of cobalt contents in the mother rock. In general it is to be observed that chalky rocks and slates contain more cobalt than the sandstone, and that in profile the cobalt follows a course parallel to that of iron.

In Galicia the soils have been studied by G. GONZALEZ and the pasture by G. GONZALEZ and R. GALLEGOS (tables 2-3; I-V). There exist zones with cattle disease attributed to the deficiencies of oligoelements, especially cobalt, in the pasture. The quantities of iron, manganese, copper and cobalt have been determined. The soils are acid and some samples (7%) reach toxic values of manganese; others (12%) can be considered as deficient in copper and there is a deficiency of 39% in cobalt. Only 50% of the soils containing cobalt are considered as completely normals.

P. CARDAS APARISI and N. OCAMPO OTERO have studied the diseases of cattle because the calves after weaning fall into a marasmatic state.

In the mediterranean region, CRUZ RODRIGUEZ and his collaborators, in the Experimental Station of Aula Dei, have studied the chlorosis produced in crops of semi-arid zones and they have applied the method of biological diagnosis in addition to the visual one in fruit trees, finding important deficiencies of iron, as well as deficiencies of manganese, copper, zinc and boron in peach-trees (tables 4 and 5). The disease is present also in cereals and the potato in the zone of Barcelona and in those of Murcia, Málaga and Sevilla.

According to the induced lack of iron the principal crops can be placed in this order: fruit trees, leguminous plants and cereals; chlorosis appears also in plants of kinds distinct from spontaneous plants.

A different resistance to the deficiency due to the lack of iron is found in different varieties of *Arachis hypogaea* and the variety *Virginia jumbo* is supposed to be the most resistant of those under consideration. There is also a relation among the different states of sensibility for chlo-

rosis which is shown by different varieties of quince-trees and the capacity of racination of its spikes.

The soils of this region have a low content of organic material understood between 1.5 and 2.1%, pH between 8.20 and 8.55 and carbonates between 32 and 29%, but besides these conditions of the soil the light factor has to be considered, which also determines a loss of chlorophyl; the shade of the leaves corrects the symptoms of induced iron deficiency (table 6).

CRUZ RODRIGUEZ and A. ABADIA have followed the formation of catalasa and chlorophyl to establish its relation (tables 7, 8 and 9 and graph. 6).

Several agricultural problems occasioned by the various deficiencies in oligoelements add a new feature to those presented by the formation factors of the soils in the North-west of Spain and in the North-east and Levante.

Voir la discussion à page 543

B I B L I O G R A F I A

- [1] BURRIEL F. y GALLEGU R., *Cobalto en suelos españoles*. « An. Edaf. Fisiol. Veg. », 1952, 11: 569-600.
- [2] GONZALEZ G. Citado por P. CARDÁ APARICI y N. OCAMPO en *Sobre la anemia carencial del ganado vacuno gallego (« sequeira »)*. « Ciencia Vet. », 1951, vol. 12, n. 8r.
- [3] GONZALEZ G. y GALLEGU R., *Contribución al estudio de la composición mineral de algunos forrajes de Galicia*. « An. Edaf. Fisiol. Veg. », 1953, 12: 767-780.
- [4] CARDÁ APARICI P. y OCAMPO N., *Sobre la anemia carencial del ganado vacuno gallego («sequeira »)*. « Ciencia Vet. », 1951. Vol. 12, n. 8r.
- [5] MEDINA M. y NIÑO F., *Contenido en molibdeno y hierro de algunas plantas forrajeras de la provincia de Córdoba*. « Arch. Zootecnica », 1955. 4: 3-13.
- [6] ABADIA A., *Deficiencia inducida de hierro en frutales*. VI Congreso Internacional de Patología Comparada. Madrid, 1952.
- [7] RODRIGUEZ CRUZ y ABADIA A., *Enraizamiento de membrilleros en relación con el fenómeno de deficiencia inducida de hierro*. « An. Edaf. Fisiol. Veg. » (en publicación).
- [8] RODRIGUEZ CRUZ y HERAS L., *Aportación al estudio de la deficiencia de hierro en perales*. Comunicación personal de los autores.
- [9] RODRIGUEZ CRUZ y DIEZ ALTARES M. del Carmen, *Chlorose dans les cultures des zones semi-arides: influence du sol et de la lumière*. Colloque sur l'écologie Végétale de la Zone Aride. U.N.E.S.C.O. Montpellier, Francia, 1953.
- [10] ABADIA A., *Variation du contenu en catalases des feuilles d'arbres fruitiers chlorotiques injectées de sulfate ferreux*. Congr. Intern. Botan. Paris, raps. et communs. sect. 11 and 12, 1954; 23-24.

TRACE-ELEMENT DEFICIENCIES IN RELATION TO SOIL CONDITIONS (*)

E. G. MULDER

The reason for the occurrence of pronounced symptoms of trace-element deficiencies in crop plants growing on certain soils has mostly to be sought in particular soil conditions as a result of which the micronutrient elements are rendered unavailable to the plants. In some cases the elements may be lost as a result of leaching by the winter rains. Presence of large amounts of other elements interfering with the uptake of a certain trace element may also occur.

COPPER

Copper deficiency as it occurs under western European conditions is mostly confined to peaty soils and to sandy soils containing a certain amount of black-coloured organic matter. On reclaimed heathy soils for instance, severe deficiency symptoms will be found particularly on those areas where a thin layer of black peat which generally is present below the turf has been mixed through the top soil.

When a comparison is made between the copper requirement of copper-deficient peaty and sandy soils and that of purified quartz sand, pronounced differences may be found. In the latter case the sand and the nutrient salts have to be carefully purified for obtaining copper-deficient plants. With soil, however, pronounced deficiency symptoms will be obtained without many precautions. The

(*) Presented by F. C. GERRETSSEN, GRONINGEN.

amounts of copper required for a normal plant growth are much larger in natural soil than in sand or in culture solutions. This was shown in pot experiments with different soils. 12.5 mg of copper per 2 kg of soil was found to be not quite sufficient for giving healthy plants. In contrast to this relatively large amount, 0.05 mg of copper sufficed for producing approximately similar amounts of healthy plant material under nutrient-solution conditions. In purified quartz sand 0.2 mg of added copper per 2 kg of sand gave optimal plant growth [1, 2].

The much higher copper requirement in the case of soils of the above-mentioned type is due to a reduced availability of the added copper and not to a higher copper requirement of plants growing in soil as compared with those growing in nutrient solution. This was shown by cultivating oat and barley plants in such a way that part of their roots grew in copper-deficient soil and the other part of the roots in a nutrient solution or in purified quartz sand. The amounts of copper required for normal plant growth in the latter case were similar to those required by plants growing in nutrient solution only, which shows that the copper requirement of cereal plants growing in soil is equal to that in nutrient solution.

TABLE I — *Effect of added copper on yield of oat and barley plants growing with their roots partly in copper-deficient soil partly in nutrient solution.*

Cu in nutrient-solution, μg	B A R L E Y		O A T S	
	Grain, g	Straw, g	Grain, g	Straw, g
0	0	4,93	0	8,03
5	0,87	9,61	0	12,77
10	2,03	7,87	0,20	13,13
20	3,43	8,13	4,36	18,34
0 (*)	0	10,86	0	11,55
200 (*)	0	12,53	0	16,35

(*) Soil only.

In addition to adsorption of copper ions by the organic matter, chemical fixation may be the cause of reduced availability of soil copper. This was shown in percolation experiments as well as in experiments with *Aspergillus niger*. In the percolation experiments

40-g portions of a copper-deficient and a normal sandy soil respectively were transferred to percolation tubes through which a solution of copper sulphate was percolated. Subsequently the soils were washed with distilled water and then with a 1% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ solution until the leachings were practically free from copper. Hereafter the soils were ashed and the copper retained in it was determined. As will be seen from Table 2 the copper-deficient soil retained nearly 5 times as much copper in a non-exchangeable form as the normal soil did.

TABLE 2 — *Retention of copper by copper-deficient and normal soils (calculated as mg/g of organic matter).*

Soil	Total copper retained	Exchangeable Cu (by $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$)	Non-exchangeable Cu
Cu-deficient	71,0	46,7	24,3
Normal	42,9	37,8	5,1

In the experiments with *Aspergillus niger* 2-g portions of a black humus from a copper-deficient heathy soil were treated with different amounts of a dilute solution of CuSO_4 , incubated for 24 h at room temperature and sterilized at 110°C . Hereafter available copper was determined by the *Aspergillus* technique. The results of this experiments are given in Table 3. It will be seen that a strong fixation of copper occurred in this soil.

TABLE 3 — *Copper fixation by black organic matter.*

Cu added to 2 g humus (*) (μg)	Available copper (<i>A. niger</i> , μg)
0	0,2
3	0,6
5	0,8
10	1,0
20	2,0

(*) Total Cu: 2.6 μg per 2 g of humus.

EFFECT OF HYDROGEN-SULPHIDE FORMING BACTERIA

Copper may be rendered unavailable to the plants by hydrogen-sulphide forming bacteria. This was found in nutrient-solution experiments with barley and oats and with *Aspergillus niger*. In the experiments with cereals, barley and oat plants which had grown for three weeks in nutrient solutions without added copper and which showed slight symptoms of copper deficiency, were provided with a copper-containing nutrient solution for hydrogen-sulphide forming bacteria. These solutions had been inoculated with *Vibrio desuljuricans* and with *Bacterium coli* respectively and incubated for 5 days before being added to the culture solutions with cereals. In the case of *Bact. coli* the medium was supplied with a small amount of cystine. The cereal plants which had been provided with the sterile nutrient solution of the above-mentioned bacteria made normal growth within a few days owing to the copper present in the added solution. In the case of solutions inoculated with the byhydrogen-sulphide forming bacteria pronounced symptoms of copper deficiency occurred. To show that these symptoms were due to copper deficiency only and not to injury by the bacteria or the hydrogen-sulphide produced, a small amount of copper was supplied on the leaves of one plant out of four of each vessel. These plants recovered within a few days. A similar result was obtained by adding an excess of copper to the inoculated nutrient medium.

It is highly probable that in badly aerated, water-logged soils, hydrogen-sulphide producing bacteria may be responsible for reducing the availability of soil copper.

INTERACTIONS OF COPPER AND OTHER ELEMENTS

Nitrogen-copper. In pot and field experiments with wheat plants it was found that with increasing amounts of added nitrogen increasing amounts of copper were required for giving normal plants (cf. Figures 1 and 2). This was not due to a higher copper requirement as a result of increased formation of plant material since with optimum doses of nitrogen the plants required considerably more

copper than with optimum doses of nitrogen. The effect was more pronounced with ammonium salts than with nitrates. *Aspergillus niger* reacted similarly to wheat plants in this respect.

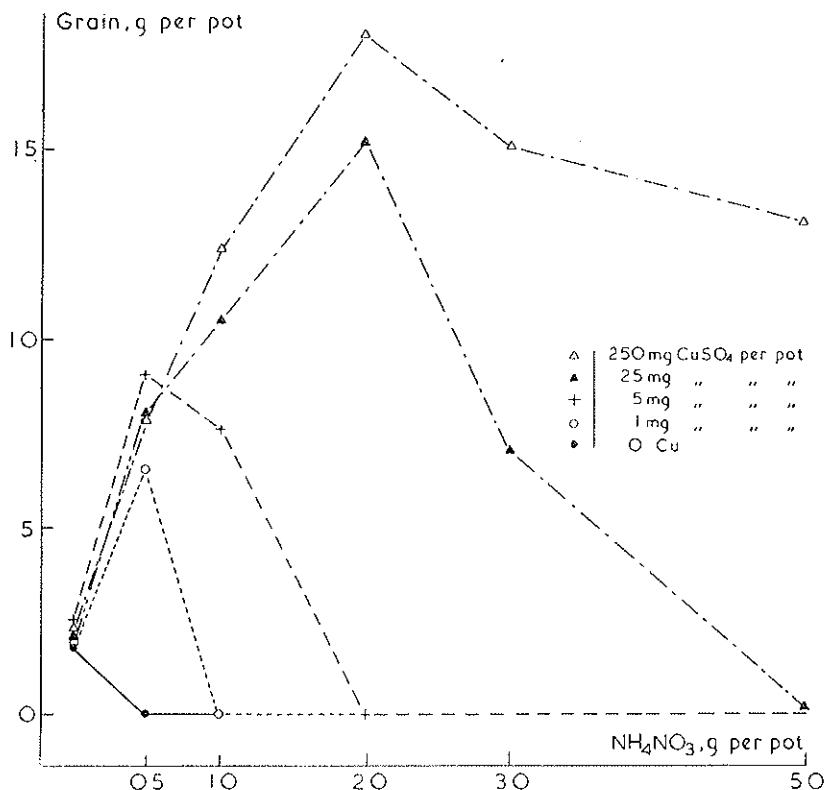


FIG. 1 — Effect of different amounts of ammonium nitrate on response of wheat to added copper sulphate (pot experiment)

Cadmium-copper. Cadmium may interfere with the activity of copper in the case of *Aspergillus niger* but not in the case of cereal plants. This will be seen from the data of Table 4 in which the results of an experiment with increasing amounts of cadmium sulphate at different copper levels are recorded.

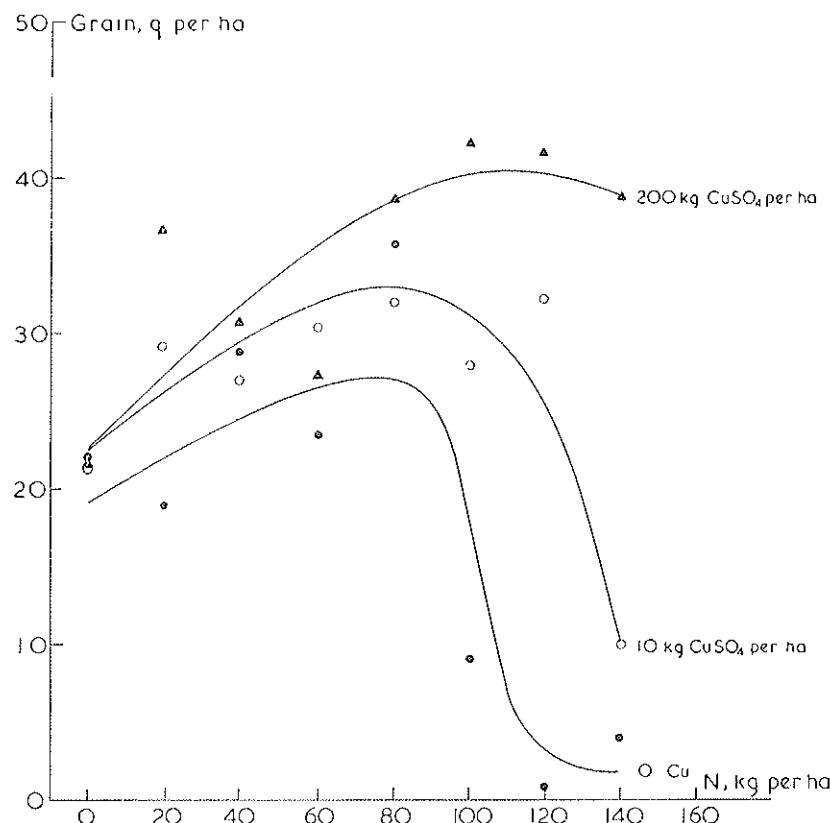


FIG. 2 — Effect of different amounts of ammonium nitrate limestone on response of wheat to added copper (field experiment)

TABLE 4 — Spore colour of *Aspergillus niger* at different amounts of cadmium and copper.

3 CdSO ₄ · 8H ₂ O (μg)	0 Cu	2 μg Cu	6 μg Cu	20 μg Cu
0	light-yellow	black	black	black
25	"	"	"	"
50	"	brown-black	"	"
100	"	"	"	"
200	no spores	brown-grey-yellow	brown-black	"
500	"	"	"	brown-black
1000	"	brown-yellow (*)	brown	"
2000	"	" (*)	yellow-brown	brown

(*) Number of spores reduced.

Copper-manganese. Under certain conditions application of copper sulphate may promote the appearance of manganese-deficiency symptoms in green plants. This was shown in experiments with rye plants in culture solutions with increasing amounts of copper. Symptoms of manganese deficiency were observed in plants provided with low manganese and moderate copper but not in those with low manganese and low copper.

In the case of high manganese the roots showed brown discolourations, due to MnO_2 , in the presence of moderate amounts of added copper but not in its absence. This indicates that manganese may be oxidized by root cells to manganic oxides when copper is present. Similar results have been obtained with a manganese-oxidizing fungus cultivated on a nutrient medium of the following composition:

Na-acetate	5 g	$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	50 mg
$MnCO_3$	10 g	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	10 mg
NH_4NO_3	1 g	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	2 mg
K_2HPO_4	0,5 g	H_2O	1 l
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g	Agar	20 g

In the presence of 5 µg of added copper per 20 ml of nutrient medium the formation of MnO_2 was much more pronounced than in its absence (cf. also 1).

MOLYBDENUM

The occurrence of molybdenum deficiency in crop plants in the Netherlands is mostly confined to certain soil types or to certain soil conditions. Soils with a high content of ironstone are mostly very low in plant-available molybdenum. In the Netherlands such soils are found along brooklets, which have their origin in heathy regions. Although soils of this type sometimes may be found to be strongly acid, in general they have pH-values between 5.3 and 6.0. On such soils molybdenum-deficiency symptoms may be found in many plant species. Cauliflower, cabbage, spinach, lettuce, tomato and lucerne were found to be very sensitive to molybdenum

deficiency [4]. In the case of lucerne and other leguminous plants reduced nitrogen fixation is the main cause of the poor plant growth on molybdenum-deficient soils (Fig. 3).

In addition to these rather clearly defined ironstone soils, molybdenum deficiency may be found, particularly in cauliflower plants, on strongly acid sandy and peaty soils. Although available molybdenum of these soils as determined by the *Aspergillus niger* technique may be relatively high (cf. Table 5), cauliflower plants

TABLE 5 — Available molybdenum (*Asp. niger*) of various soils in relation to response of higher plants to added molybdenum.

Soil type	pH	Available Mo (<i>Asp. niger</i>), ppm ^{a)}	White clover, mg N in crop per pot		Cauliflower, response to added Mo
			— Mo	+ Mo	
Low moor peat (Fe) (*)	5.5	0.003	43.9	110.8	—
Sandy (Fe)	6.1	0.005	44.0	92.4	strong
Low moor peat (Fe) . .	6.0	0.006	6.6	40.4	—
Sandy (Fe)	5.5	0.007	29.0	114.0	—
Sandy (Fe)	4.6	0.007	—	—	—
Sandy (Fe)	5.7	0.035	40.0	109.9	—
Sandy	5.3	0.044	18.0	58.3	—
Sandy (Fe)	5.4	0.044	14.5	68.8	strong
Sandy	5.6	0.052	50.8	76.9	slight
Sandy (Fe)	5.8	0.063	63.0	126.4	strong
Sandy loam	—	0.100	no response	no response	no response
Sandy normal arable soil	5.6	0.125	—	—	—
Low moor peat (Fe) . .	5.8	0.153	51.6	158.7	strong
Sandy loam, fertile garden soil	7.0	>0.4	—	—	—
Sandy (Fe), Tasmania (Kinburn)	6.2	0.017	110.5 (***)	382.0 (***)	—
Sandy (Fe), South Australia (Blouhton) . .	5.4	0.002	93.4 (***)	170.0 (***)	—
Peaty, Exp. field 119 . .	4.1	0.008	no response	no response	strong
Sandy, Exp. field 10 . .	4.0	0.046	“	“	slight
Peaty, Exp. field 24 . .	4.0	0.093	“	“	no response
Peaty, Exp. field 13 . .	3.9	0.112	“	“	moderate
Peaty, Exp. field 836 . .	3.5	>0.2	“	“	strong
Sandy, Exp. field 263 . .	3.7	>0.2	“	“	no symptoms
Sandy, Exp. field 837 . .	3.7	>0.2	“	“	no symptoms
Low moor peat, Exp. field 200	4.0	>0.2	“	“	strong

(*) (Fe)= rich in ironstone.

(**) Averages of triplicate values.

(***) Large vessels used.

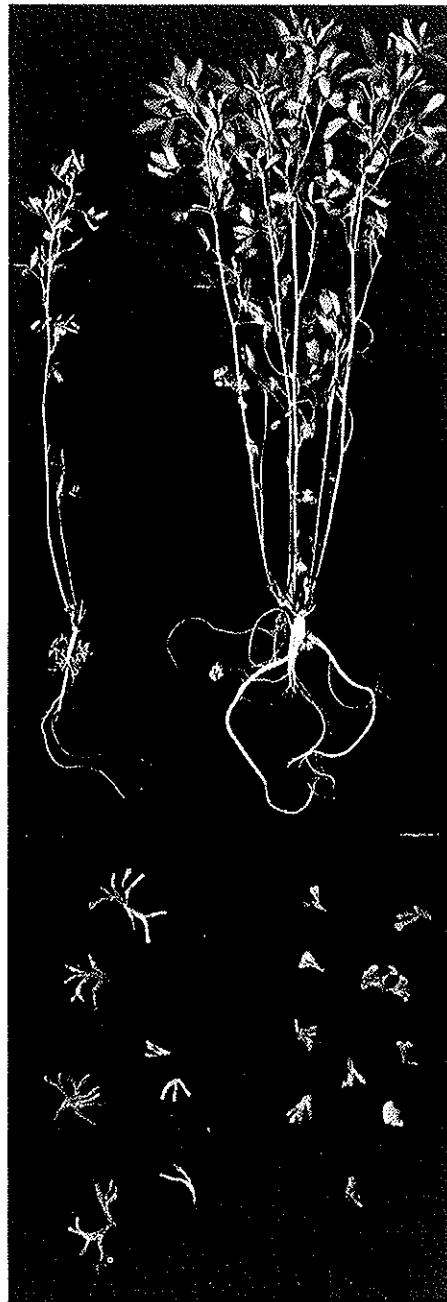


FIG. 3 — Effect of molybdenum on growth of lucerne (above) and development of nodules (below). Left: without added molybdenum; right: dressed with 4 kg Na₂MoO₄. 2H₂O per ha.

were found to respond clearly to added molybdenum. Presumably this is due to the high content of plant-available manganese in such soils. In separate experiments with cauliflower plants manganese was found to interfere with molybdenum uptake by these plants but not by *Aspergillus niger*. In these experiments increasing amounts of manganese sulphate were added to a molybdenum-deficient soil supplied with different amounts of molybdenum. The higher the dose of manganese sulphate applied, the higher the amount of molybdate required for healthy plant growth (cf. Table 6).

TABLE 6 — Effect of various concentrations of manganese sulphate on response of cauliflower to molybdenum (dry weight of young plants, g) (*)

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Mg per pot	MnSO ₄ , 4H ₂ O, mg per pot			
	0	100	250	500
0	0.45	0.40	0.25	0.35
25	1.85	0.60	0.50	0.45
50	2.75	0.50	0.65	0.35
100	3.45	2.75	0.50	0.45
500	3.85	3.70	3.10	2.35
2500	3.80	2.95	3.10	3.60

(*) Single values, no-Mn in triplicate.

The antagonistic effect of manganese sulphate on molybdenum activity is partly due to the SO₄-ions, partly to the Mn-ions. This may be concluded from pot experiments with molybdenum-deficient soil in which the effect of MnSO₄, K₂SO₄, Mn(NO₃)₂ and KNO₃ was compared. The strongest effect was obtained with MnSO₄ but K₂SO₄ as well as Mn(NO₃)₂ also reduced the activity of added molybdenum, while KNO₃ had no effect (Fig. 4). The unfavourable effect of manganese ions and sulphates was found to be due to a reduced uptake of molybdenum by the cauliflower plants [4].

In contrast to the experiments with soil, no antagonistic effect of manganese sulphate on molybdenum uptake was observed in cauliflower plants growing in nutrient solution.

Phosphate-molybdenum. A close relationship was found to exist between phosphorus and molybdenum nutrition of certain plant species [4]. Soils on which the plants respond to added molybdenum were often found to be poor in available phosphate. This is presumably due to the high content of iron which immobilizes

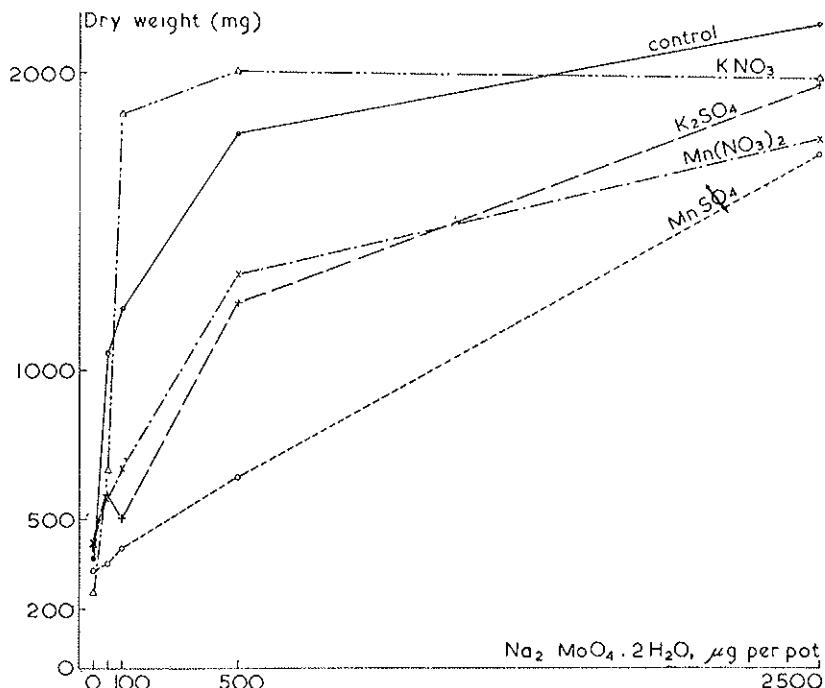


FIG. 4 — Effect of MnSO_4 , $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$, KNO_3 and K_2SO_4 on response of cauliflower to molybdenum

both phosphate and molybdenum. Phosphate dressings of such soils may sometimes improve molybdenum supply to the plants. This is partly due to the fact that phosphate may increase available molybdenum of certain soils, partly to the fact that phosphate has a beneficial effect on uptake and translocation of molybdenum within certain plants.

In pot experiments with light phosphorus-deficient soils from various regions a pronounced response to added molybdenum was often found in cauliflower [4].

Copper-molybdenum. Although a copper-molybdenum antagonism has been found to occur in animals and in *Azotobacter chroococcum*, such a relationship was not observed in white clover [4].

Nitrogen-molybdenum. In the absence of added nitrogen, molybdenum-deficiency symptoms of cauliflower, tomato and sugar-beet plants were found to be less pronounced than in the presence of high concentrations of nitrate. The relationship between molybdenum supply and nitrogen metabolism is rather complicated and is different for green plants and micro-organisms. In *Aspergillus niger* much higher yields were obtained in molybdenum-deficient culture solutions supplied with ammonium nitrogen than in those with nitrate [3]. This shows that molybdenum plays an important part in nitrate reduction, a conclusion which is in agreement with the fact that this element has been found by NICHOLAS and NASON [5] to be a constituent of a nitrate-reducing enzyme in *Aspergillus niger*.

In cauliflower, spinach and tomato plants growing on molybdenum-deficient soil, however, practically no difference in response to added molybdenum was observed between plants supplied with ammonium nitrate and those with nitrate only [4]. This indicates that retardation of functions other than those concerned with nitrate reduction were responsible for the poor growth and the typical deficiency symptoms of these plants. That the nitrate-reducing capacity of green plants is adversely affected by molybdenum deficiency, however, may be concluded from the fact that these plants are high in nitrate and low in organic nitrogen, whilst upon addition of molybdenum a ready disappearance of nitrate and formation of organic nitrogen takes place [3]. In experiments with leaf tissues of cauliflower and tomato plants the importance of molybdenum in nitrate reduction was demonstrated [4].

MAGNESIUM

Although magnesium does not belong to the micro-nutrient elements, it will be discussed in this paper because its behaviour resembles that of the real trace-elements [6]. In the Netherlands magnesium deficiency occurs frequently on acid sandy and peaty soils. Table 7 gives the values for available magnesium determined by the *Aspergillus niger* technique of a number of soils on which

TABLE 7 — Available magnesium in soil samples taken from different areas of oat fields

Soil	State of crop in the field	pH of soil	Available magnesium per 3g of air-dried soil (μg)
1	magnesium-deficient	4.10	< 25
	slightly-deficient	4.63	< 25
	normal	5.45	200
2	magnesium-deficient	4.22	25
	slightly-deficient	4.51	25
	normal	5.81	75-100
3	magnesium-deficient	4.51	25
	slightly-deficient	4.80	25-50
	normal	5.17	150
4	magnesium-deficient	5.20	50
	slightly-deficient	5.64	100
	normal	5.78	150-200
5	magnesium-deficient	4.62	25-50
	slightly-deficient	4.83	25-50
	normal	4.87	100
6	magnesium-deficient	4.40	50-100
	slightly-deficient	4.80	100
	normal	4.76	200
7	magnesium-deficient	4.43	25
	slightly-deficient	4.79	50
	normal	4.93	100
8	magnesium-deficient	4.16	25
	slightly-deficient	4.29	75
	normal	4.68	150-200
9	magnesium-deficient	4.38	25-50
	slightly-deficient	4.43	100
	normal	5.00	150-200
10	magnesium-deficient	5.04	< 25
	slightly-deficient	5.73	50-100
	normal	6.08	150

the cereal plants showed symptoms of magnesium deficiency. Of each field a comparison was made between samples from diseased and normal plants. It will be seen that a close connection exists between condition of the crop, available magnesium and the pH of the soil. Areas of the field on which the plants showed severe symptoms of magnesium deficiency were considerably lower in available magnesium than areas with normal plant growth, whilst the pH was consistently lower. The effect of low pH on available magnesium is due to an enhanced leaching during the wet winters and not to a fixation of magnesium. This was shown by an experiment in which increasing amounts of H_2SO_4 were added to a sandy soil with an adequate content of available magnesium. The soil samples were left moist during 2½ months before available magnesium was determined by the *Aspergillus niger* method. No decrease in available magnesium was observed during this period. When the acid soil samples were leached with distilled water until no further SO_4^{2-} -ions occurred in the filtrate, nearly all of the available magnesium appeared to be lost.

Available magnesium of acid sandy and peaty soils in the Netherlands generally is only a fraction of total magnesium. This was shown by comparison of available magnesium before and after ashing of the soils [6].

When magnesium-deficient acid soils are neutralized their content of plant-available magnesium is not increased. Growth of cereals was found to be improved, however. Presumably this is due to a better developed root system which causes an improved uptake of Mg-ions.

INTERACTION BETWEEN MAGNESIUM AND OTHER ELEMENTS

Plants dressed with ammonium compounds require a considerably higher magnesium supply than those dressed with nitrates. This was found in experiments with cereals and potatoes growing in soil (Fig. 5). Apparently it is due to an antagonistic effect of ammonium ions on magnesium uptake. Acidification may also play a part. As contrasted to ammonium compounds, nitrates promote the

uptake of magnesium by cereals and potatoes. This effect was observed many times on experimental plots. In the absence of nitrate, uptake of magnesium supplied as sulphate is slow. In the presence of added nitrate, however, magnesium uptake is much enhanced. This beneficial effect of nitrates on magnesium uptake

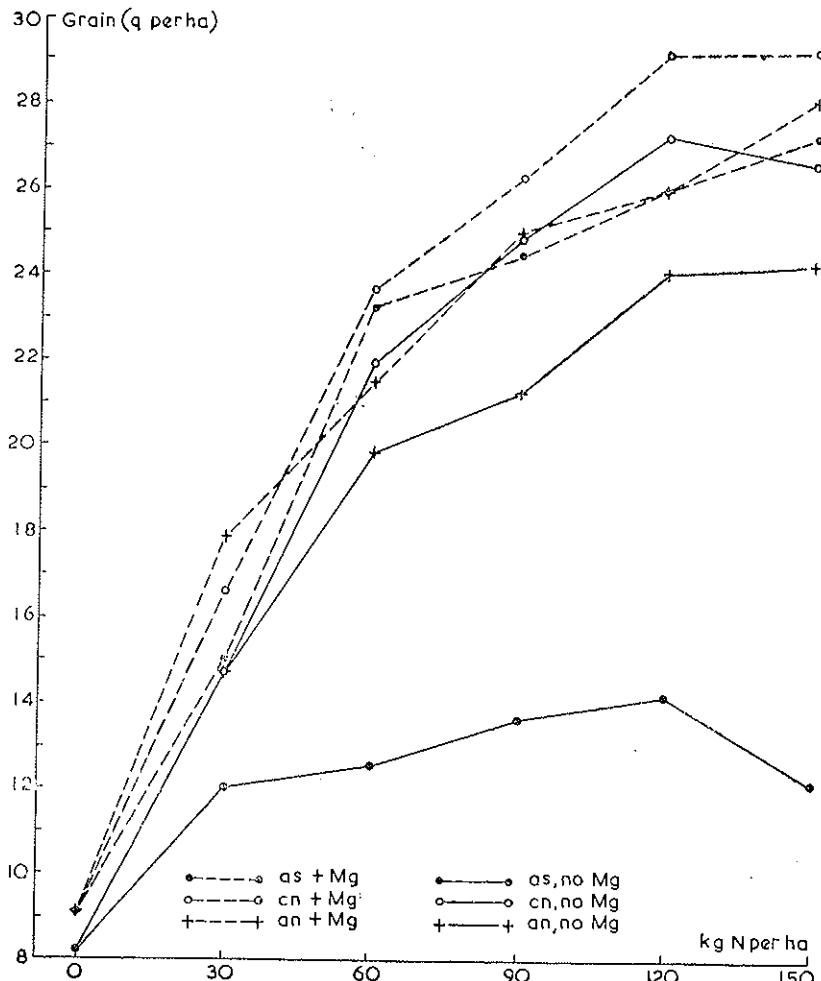


FIG. 5 — Effect of different nitrogen compounds on response of wheat to magnesium (as = ammonium sulphate, cn = calcium nitrate, an = ammonium nitrate limestone)

was shown clearly in a pot experiment in which the pots were halved by a glass plate.

One half of the pots was filled with an acid soil relatively poor in available magnesium, the other half with a mixture of quartz sand and peat which had been freed from magnesium. Wheat plants were planted on the glass plate in such a way that part of the roots grew in the sand-peat mixture and the others in the soil. Nitrogen was added as nitrate and as ammonium sulphate respectively. When the nitrate was added to the sand-peat mixture and not to the soil, severe magnesium deficiency occurred. When it was added to the soil half only, however, the plants were practically normal as may be seen from the yield data (Table 8). With ammonium sulphate as the nitrogen source severe magnesium deficiency occurred in both cases.

TABLE 8 — *Effect of calcium nitrate and ammonium sulphate on yield of wheat plants grown with part of their roots in soil moderately poor in magnesium and with the others in a sand-peat mixture, free from magnesium*

Soil treatment	Nitrogen compound	Half of pot supplied with N	Yield, g per pot	
			Grain	Straw
no Mg	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	sand-peat	3,96	13,13
+		sand-peat	10,40	17,93
no Mg	"	soil	11,96	20,15
+		soil	13,67	21,52
no Mg	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	sand-peat	4,55	12,27
+		sand-peat	8,71	13,49
no Mg	"	soil	5,00	11,81
+		soil	7,57	11,49

The beneficial effect of nitrate on magnesium nutrition may also be seen from Fig. 6 in which the results of field experiments with potatoes are recorded. In the absence of added magnesium the yield curve obtains its optimum value at a much higher nitrogen dressing than in the case of adequate magnesium. Apparently this is due to the fact that part of the nitrate effect is a magnesium effect.

In contrast to the different effect of nitrate and ammonium salts on magnesium nutrition of higher plants, no difference was observed in the case of *Aspergillus niger*. Potassium ions which may depress uptake of magnesium by higher plants likewise have no effect on *Aspergillus* (Fig. 7).

POTATO

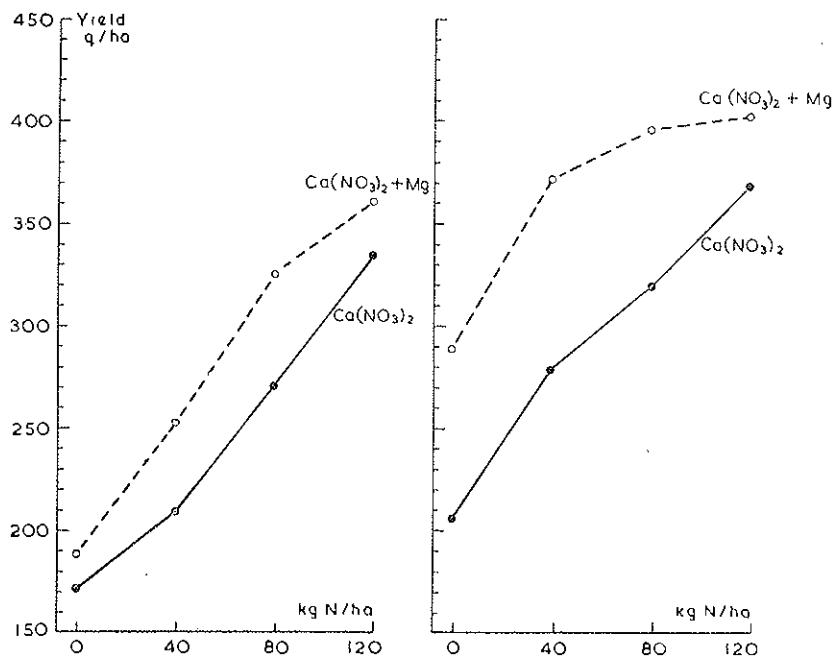


FIG. 6 — Effect of calcium nitrate on magnesium supply of potato plants

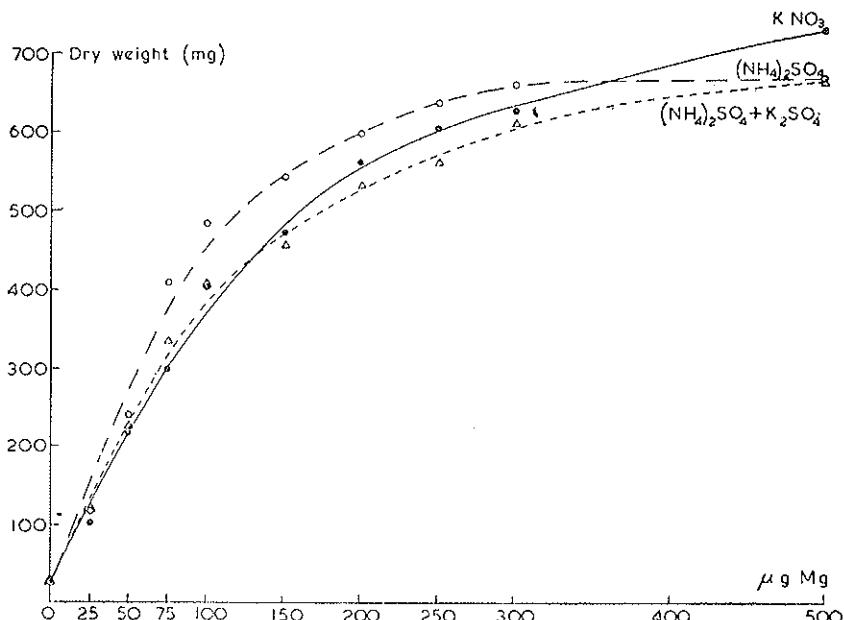


FIG. 7 — Effect of potassium nitrate, ammonium sulphate and ammonium sulphate + potassium sulphate on response to increasing amounts of magnesium by *Aspergillus niger*

R E F E R E N C E S

- [1] MULDER E. G., *Over de beteekenis van koper voor de groei van planten en microorganismen.* Thesis, Wageningen (1938).
- [2] MULDER E. G., *Über den Kupfermangel als Ursache der Urbarmachungskrankheit.* « Z. Pflanzenkrankh. », 50, 230-272 (1940).
- [3] MULDER E. G., *Importance of molybdenum in the nitrogen metabolism of micro-organisms and higher plants.* « Plant and Soil », 1, 94-119 (1948).
- [4] MULDER E. G., *Molybdenum in relation to growth of higher plants and micro-organisms.* « Plant and Soil », 5, 368-415 (1954).
- [5] NICHOLAS D. J. D., and NASON A., *Molybdenum and nitrate reductase.* « J. Biol. Chem. », 207, 353-360 (1954).
- [6] SMIT J., and MULDER E. G., *Magnesium deficiency as the cause of injury in cereals.* « Mededeel. Landbouwhoogesch. », 46 (1942).

Voir la discussion à page 545

BORON, AN ESSENTIAL ELEMENT FOR AZOTOBACTER AND SOME OTHER MICROORGANISMS

F. C. GERRETSEN

Our investigations on the necessity of boron for the growth of microorganisms were originally started with the object to find a simple method for the microbiological determination of boron in soils and plant material. (GERRETSEN, 1954).

In our first experiment with a boron-deficient soil, where sugar beets showed severe symptoms of heartrot, the addition of 5 p.p.m. boron seemed to increase the CO₂-production from mannite somewhat. In the next experiment we used purified sterile quartz sand as a culture medium, inoculated with a culture of *Azotobacter chroococcum* and observed an increase of 69% in the average CO₂ production from calcium gluconate after addition of 5 p.p.m. B.

Though we had used the purest chemicals which were obtainable, it seemed necessary to purify rigorously sand and chemicals by treating them repeatedly with methylalcohol and a trace of acetic acid, which transforms the boron into the volatile methylborate. This experiment was very convincing, the quantity of CO₂ produced at 3 p.p.m. being 6 times that without boron added.

As our ultimate aim was to find a method for the determination of boron in soils, it seemed advisable to use a carbon source which was more selective for *Azotobacter* and difficultly accessible to other microorganisms.

In this respect calcium benzoate seemed promising; although the total quantity of CO₂ produced was smaller than when glucose or gluconate were used, the curves with increasing quantities of boron follow each other in regular sequence.

Moreover it was observed that the color of the sand was more black the more boron had been added. Whether this was due to the greater number of *Azotobacter* cells or to a stimulation of pigment production was not yet clear at that moment.

As a secondary effect of the addition of only 5 p.p.m. boron it was observed that the sand had taken on a crump structure; the *Azotobacter* cells are surrounded by a gelatinous envelope, which cements the sand particles into more or less stable conglomerates.

It seemed worthwhile to repeat the experiments in liquid cultures. The first result is to be seen on the next photograph. The culture at the left received no boron and had a creamy yellow colour, that at the right had received 0.4 p.p.m. boron and was black (Fig. 1).

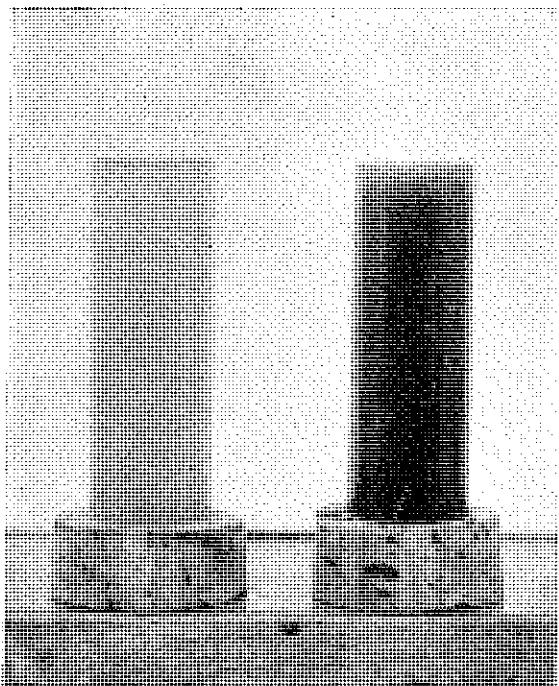


FIG. 1 — 2 cultures of *Azotobacter chroococcum*.
Left. No boron added, colour creamy white.
Right. 0.4 p.p.m. boron added, colour brown black.

However the number of *Azotobacter* cells, the quantity of nitrogen fixed and the quantity of CO_2 produced were the same in both cases. This observation might indicate that the production of dark coloured substances by *Azotobacter* not only depends on the presence of minute quantities of copper, as had been shown by MULDER, but also on the presence of boron.

It seems even that when only a limited quantity of boron is available as was the case here this colour producing capacity is

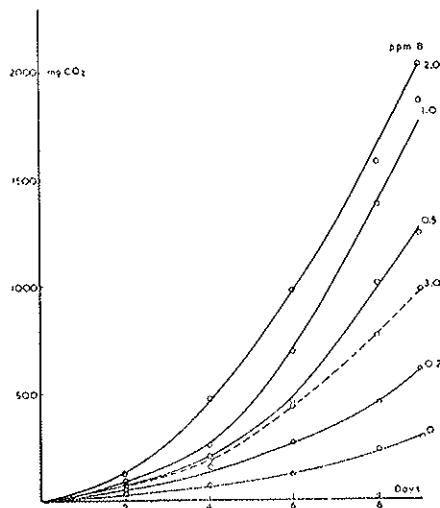


FIG. 2 — CO_2 -production of *Azotobacter chroococcum* in culture solutions at different boron levels. With no B hardly any growth; optimum at 2 p.p.m.; 3 p.p.m. is decidedly toxic

influenced first, whereas multiplication and nitrogen fixation still remain unaltered.

The experiment had been carried out in quartz vessels which seemed to contain boron; so for our next experiment we used ordinary aluminium water kettles, while the water was redistilled with an aluminium cooler. The result of this experiment is shown in fig. 2; we also notice here a regular sequence of the curves at increasing quantities of boron, with the difference however that in

these liquid cultures the optimum lays at 2 p.p.m. B, and an increase of the quantity of boron to 3 p.p.m. has decidedly a toxic effect.

The reason that in the sand cultures a higher concentration of boron is tolerated is most probably due to the fact that to these cultures calcium carbonate had been added. It could be shown that under these circumstances only 51% of the boron added could be extracted from the sand and that this absorption might easily account for the apparent higher concentration of boron, which *Azotobacter* can stand in sand cultures as compared with liquid cultures. In fig. 3 the influence of boron on nitrogen fixation by *Azotobacter* is shown at different pH levels.

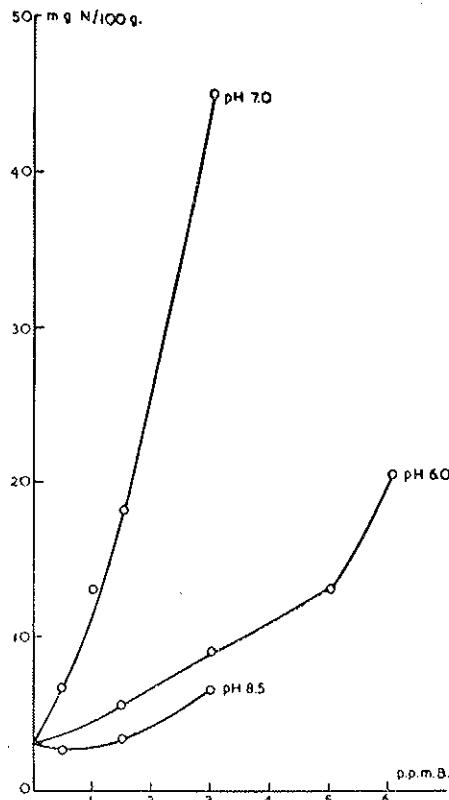


FIG. 3 — The influence of boron on nitrogen fixation by *Azotobacter chroococcum* at different pH levels

These experiments prove that boron is an essential trace element for *Azotobacter chroococcum*. However, what is the role boron plays in the metabolism of these bacteria?

During these investigations we got a few hints as to its possible function. The pigment production seemed to be the first faculty to be set back at reduced boron contents.

In sand cultures as well as in liquid cultures the increase of the number of the bacteria lags behind the increase of the quantities of nitrogen fixed at increasing boron content of the culture solution.

THE INFLUENCE OF BORON ON BACTERIAL NUMBERS AND NITROGEN FIXATION

1. Sand culture

Boron p.p.m.	number of <i>Azotobacter</i> cells per gr. of sand $\times 10^5$	ratio	total N fixed in 500 gr. sand (mg)	ratio
0	5	1	2,6	1
0,5	6,6	1,3	6,6	2,5
1,5	15,0	3,0	18,6	7,2
3,0	25,0	5,0	42,6	16,4

2. Water culture

Boron p.p.m.	number of <i>Azotobacter</i> cells $\times 10^5/\text{ml}$	ratio	total N fixed in 500 ml. (mg)	ratio
0	8	1	1,7	1
0,25	16	2	3,5	2,3
0,5	32	4	12,0	7,1
1,0	36	4,5	17,0	10,0
2,0	40	5,0	20,0	11,8
3,0	30	3,7	8,4	4,9

In the sand culture at optimal B-concentration, multiplication increased 5 times, against nitrogen fixation 16 times. In the liquid culture the number of the bacteria increased 5 times and nitrogen fixation 12 times.

This means that boron has a much greater influence on nitrogen fixation than on multiplication. In plant metabolism boron is intimately related to protein formation, according to different authors; so the pronounced effect of boron on the transformation of nitrogen into proteins is not surprising.

In this connection it might be mentioned that in the absence of boron no nitrogen is fixed in the root nodules of leguminous plants, although we have not been able to show that boron is an essential element for the growth of root nodule bacteria *in vitro*. More experimental work will be necessary to get a more definite idea of the fundamental role boron plays in these bacteriological processes.

Aspergillus niger

The next microorganism we investigated was *Aspergillus niger*. It was grown on a culture medium of the following composition: glucose 100 gr. - amm. nitrate 4 gr. - Ca citrate 1 gr. - citric acid 10 gr. - Fe.Mn.Cu.Zn.Mo. traces

KH_2PO_4	2,5 gr.	ph 4,3	75 ml./erl.
MgSO_4	1 gr.	H_2O	1000 ml.
K_2SO_4	1 gr.		

In ordinary laboratory glass ware the influence of the addition of boron was negligible because the glass contains too much boron. In plastic dishes the addition of 0.26 p.p.m. boron as boric acid doubled the weight of the mycelium. After treating the plastic dishes with methylalcohol and acetic acid at 80° C the result was much better, as can be seen in fig. 4 and 5. It is evident, that at higher concentrations boron becomes toxic.

Although these results seemed quite hopefull, they were very difficultly to reproduce. We have made a great number of experiments to discover the cause of the inconstancies. We have purified the chemicals to the utmost, but we were finally forced to give up.

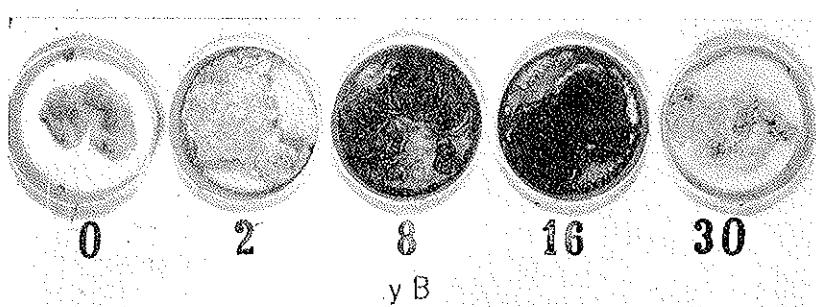


FIG. 4 — The influence of increasing quantities of boron on the growth of *Aspergillus niger*. 30γ B is toxic

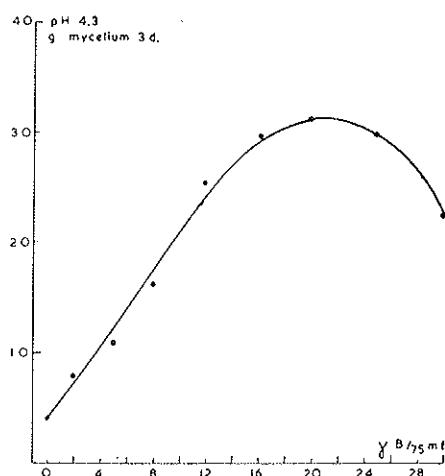


FIG. 5 — The relation between the boron content of the culture solution and the mycelium weight of *Aspergillus niger*

Bacillus megatherium

Fortunately in one of our cultures we got an infection with a spore-forming bacteria, which seemed to be influenced by the boron content of the culture medium. It was determined as *Bacillus megatherium*. In a culture solution which contained per liter:

30 gr saccharose	10 mg FeCl ₃
10 gr amm. tartrate	4 mg ZnSO ₄
4 gr mono potassium citrate	3 mg MnSO ₄
5 gr KH ₂ PO ₄	1 mg CuSO ₄
1 gr MgSO ₄	1 mg Na molybdate
0.2 gr NaCl	
0.2 gr CaCl ₂	pH 4.3.
5 ml yeast extract	

the bacteria were cultivated in test tubes with 15 ml culture solution and increasing quantities of boron (36 hours at 30° C). As is shown in the next photograph (Fig. 6), turbidity increases up to 5 γ B in 15 ml and decreases when more boron is added. Although the pH of the culture solution remained fairly constant, the buffer capacity diminished proportional to the growth of the bacteria.

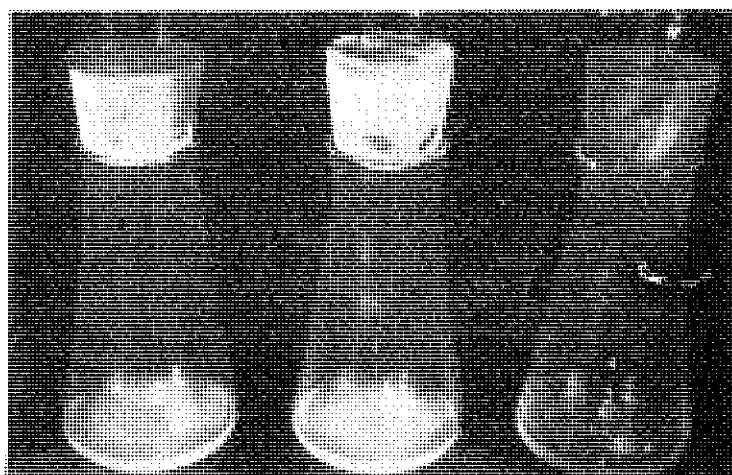
This decrease of the buffer capacity is caused by the fact that the bacteria consume different substances such as ammonium tartrate, potassium citrate and phosphate, which are responsible for the buffer capacity. In the next graph it is to be seen that there is a straight correlation between the quantity of alkali necessary to neutralize the culture solution in which the bacteria have grown to pH 7 and the quantity of boron added (Fig. 7).

In another experiment the number of bacteria were counted as well as the decrease of the buffer capacity at different boron levels. It is evident that both are closely related to the boron content of the culture solution.

As the disappearance of the nutrients will be more complete under aerobic conditions, our recent experiments not are any more made in test tubes but in 30° ml erlenmeyer flasks, containing 50 ml culture solution and under constant aeration. This enables us to de-



0 5 $10 \mu \text{ gr B}$



15 20 $40 \mu \text{ gr B}$

FIG. 6 — An aerated culture of *Bacillus megatherium* with increasing quantities of boron. Note the increasing turbidity. $40 \mu \text{ gr B}$ is decidedly toxic.

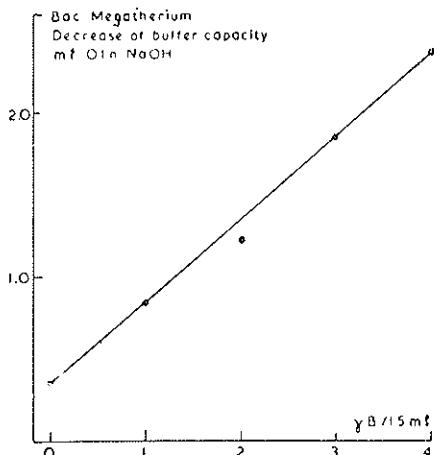


FIG. 7 — The correlation between the decrease of the buffer capacity of the culture solution in which *Bac. megatherium* has grown and the quantity of boron added

termine also the quantity of carbon dioxide produced. As the availability of boron in the soil is closely related to the pH, it was necessary to investigate the influence of the pH on the growth of the *Bacillus megatherium*. In this case we took CO₂-evolution as a measure for the microbial activity, keeping the pH as constant as possible by adding more buffering substances.

In fig. 8 it can be seen that the pH has a very great influence on the process; the optimal quantity of CO₂ produced at pH 6,5 being nearly 7 times as high as that at pH 4,5. It is obvious that at all pH's the optimal concentration of boron amounts to 20 γ in 50 ml or 0,4 p.p.m.

At the moment we are busy to apply the method for the determination of boron in soils and plant material. From the forgoing it is clear that the determination must be done at the pH of the soil and that the buffer capacity of the culture solution must be such, that even at an optimal concentration of boron no appreciable change of the pH will take place. Finally I want to remark that

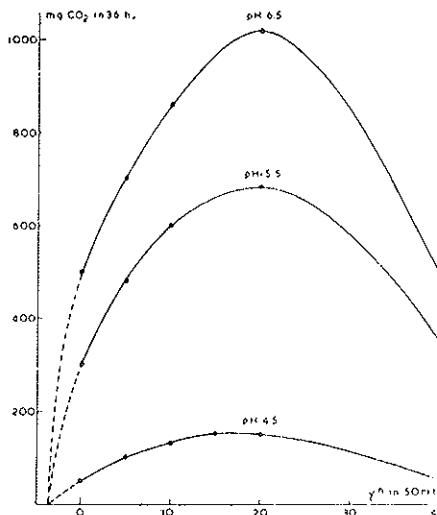


FIG. 8 — The influence of boron on the CO_2 -production by *Bac. megatherium* at different pH-levels

these investigations have been carried out in close cooperation with my laboratory assistant Mr. DE HOOP.

As the work is still in full swing, I am not able to present you a complete survey of the different aspects of the role, boron plays in microbiological processes. I hope however that I succeeded in convincing you that in a number of cases boron is an essential micro-nutrient for bacteria and fungi.

Voir la discussion à page 545

R E F E R E N C E S

GERRETSSEN F. C. and DE HOOP H.: *Boron, an essential element for Azotobacter chroococcum.* « Plant and Soil », V. 349-367, 1954.

MOLYBDENUM IN THE NUTRITION OF ALGAE WITH SPECIAL REFERENCE TO NITROGEN METABOLISM

DANIEL I. ARNON

Molybdenum occupies a position of special interest in the nitrogen metabolism of diverse organisms. STEINBERG [1] first reported a marked requirement for molybdenum for *Aspergillus niger* but only when nitrate and not ammonia was the sole source of nitrogen. He concluded « that molybdenum is essential for activation of nitrate reductase » — a prediction recently verified by NICHOLAS and NASON [2, 3] who demonstrated that molybdenum is the specific metal component of the enzyme nitrate reductase in the bread-mould *Neurospora crassa*.

Despite the specific association of molybdenum with nitrate reduction, there is ample evidence that the role of this element is not confined to this phase of nitrogen metabolism. BORTELS [4] and later workers cited by MULDER [5] have shown that molybdenum is essential for nitrogen fixation by *Azotobacter*, *Clostridium* and the symbiotic nitrogen fixer, *Rhizobium*. Although the detailed mechanism of assimilation of molecular nitrogen is still unknown there is no evidence for supposing that it involves a nitrate reduction step (WILSON and BURRIS, [6]).

The dual role of molybdenum in the nitrogen metabolism of non-green cells, in nitrate reduction and in fixation of molecular nitrogen, is also encountered in green cells. BORTELS [4] first found that molybdenum increases the fixation of atmospheric ni-

trogen by certain blue-green algae (Myxophyceae). It has also been widely observed with higher plants, that in cases of molybdenum deficiency nitrate accumulates but disappears quickly upon the addition of molybdenum (MULDER [5], HIEWITT and JONES [7], MEAGHER [8], SPENCER and WOOD [9]).

This communication reports some recent work in the writer's laboratory [10, 11, 12, 13] on the role of molybdenum in the nitrogen metabolism of two organisms: *Scenedesmus obliquus*, a representative of the green algae (Chlorophyceae), and *Anabaena cylindrica*, a filamentous, nitrogen-fixing blue-green alga. In *Scenedesmus* the role of molybdenum was found to be limited to nitrate reduction. When a reduced form of combined nitrogen, ammonia or urea, was substituted for nitrate, the requirement for molybdenum was abolished. This represents the first instance of a requirement for a seemingly essential plant inorganic micronutrient being abolished through bypassing the specific « metabolic block » caused by its deficiency. In *Anabaena* molybdenum was found to be essential both for nitrate reduction and for growth at the expense of molecular nitrogen.

The experimental methods and techniques used for growing algae in purified nutrient media are described in detail elsewhere [10, 13].

EFFECTS OF MOLYBDENUM ON *SCENEDESMUS OBLIQUUS*

Effect of molybdenum on growth

Although the status of molybdenum as an essential micronutrient for higher plants is well established, its role in the nutrition of green algae is less well documented. Recent reviews of mineral requirements of green algae could adduce no evidence for the essentiality of molybdenum (MYERS [14], KETCHUM [15]). More recently, however, evidence was presented for a molybdenum requirement of *Chlorella pyrenoidosa* (WALKER [16], LONERAGAN and ARNON [17]) and *Scenedesmus obliquus* (ARNON et al. [18]).

With the use of more effective procedures for removing traces of molybdenum impurities from nutrient media containing nitrate as the sole source of nitrogen there was almost complete failure of growth of *Scenedesmus* without added molybdenum [10]. This is illustrated in Fig. 1. 10^{-9} g. Mo per liter of nutrient solution (0.001 ppb Mo) was clearly insufficient throughout the entire growth period. 10^{-8} g. Mo per liter was sufficient almost up to the third day but began limiting growth when production of dry cell matter exceeded 2 g/liter. 10^{-7} g. Mo per liter was fully adequate to sustain vigorous growth. No increase in growth was obtained by a ten-fold increase in concentration (10^{-6} g. Mo/l). A further ten-fold increase in concentration (10^{-5} g/l) appeared to be only slightly inhibitory.

These and the previous results (ARNON [19]) confirm the remarkably great spread, characteristic for molybdenum, between the adequate and toxic levels of supply, as noted in the first experiments on the essentiality of this element for green plants (ARNON and STOUT [20]). The results obtained in these and many other similar experiments in which the same purification methods of the nutrient medium were used leave little doubt that when nitrate is the sole source of nitrogen molybdenum is indispensable for the growth of *Scenedesmus*. As reported earlier (ARNON [19]), the requirement for molybdenum was found to be specific. Molybdenum deficiency was corrected by the addition of this element but not by that of 22 others, including vanadium - the remaining elements in the B₇ and Cr₃ solutions (ARNON [21]).

The molybdenum requirement of a single cell

The unicellular character of *Scenedesmus* has made it possible to determine the molybdenum requirement in terms of atoms per single cell. The relation between the concentration of molybdenum in the nutrient medium and the number of algal cells is shown in Fig. 2. The number of cells in the minus-molybdenum culture served as a blank, since it represented growth at the expense of the molybdenum contained in the inoculum and in the residual impurities of the nutrient medium. By subtracting this blank from the

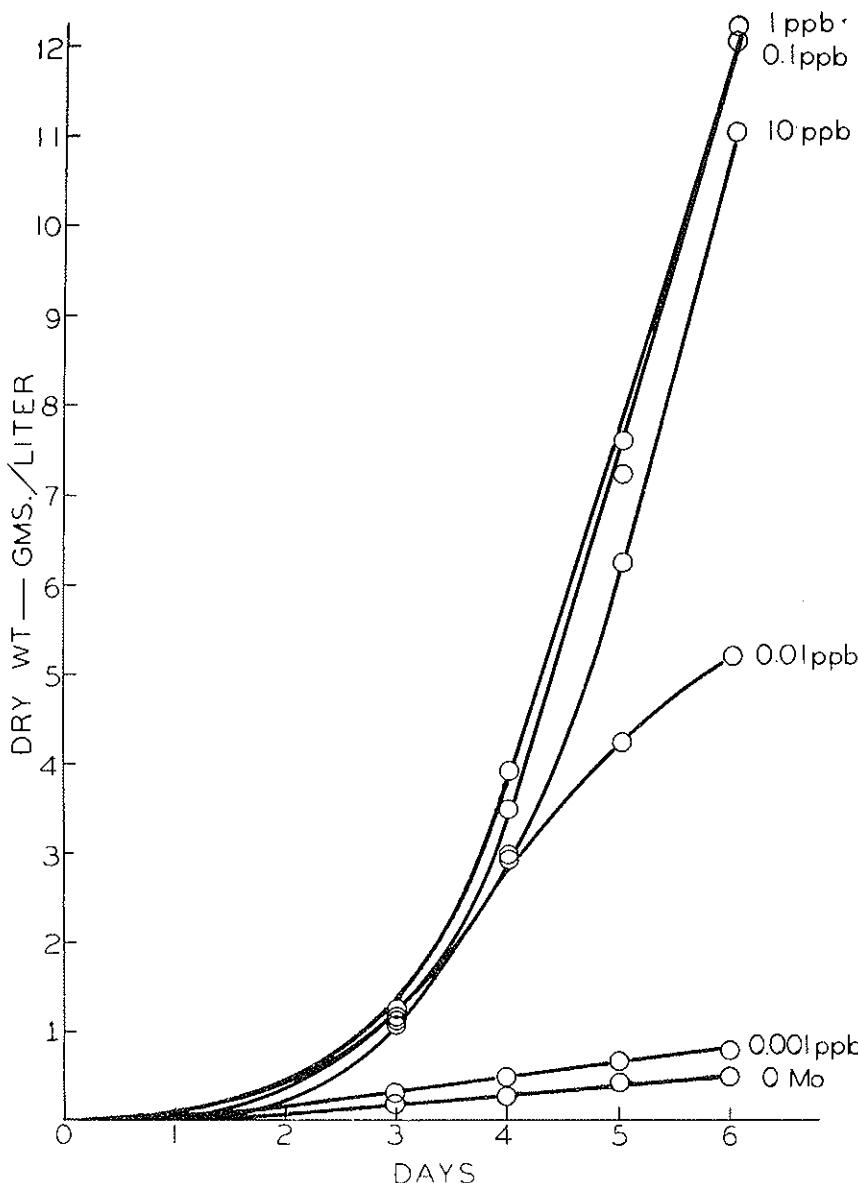


FIG. 1 -- Effect of molybdenum on the dry weight (gms. dry weight of cells per liter of nutrient solution) of *Scenedesmus*. (10^{-6} g. Mo per liter of nutrient solution = ppb.)

number of cells in the cultures to which molybdenum was added, net cell counts representing growth as a function of molybdenum concentration were obtained.

The values for the molybdenum requirement per cell, given in Table 1, represent maximum figures, since it was assumed that all

TABLE I — Number of Mo atoms per cell in *Scenedesmus*

Age of culture (days)	RESTRICTED MO SUPPLY		ADEQUATE MO SUPPLY	
	10^{-9} g/l		10^{-8} g/l	
	Net* cell count $\times 10^{-8}/l$	Atoms Mo per cell**	Net* cell count $\times 10^{-8}/l$	Atoms Mo per cell**
0	0.1	630,000	0.1	6,300,000
3	23	2,700	290	2,200
4	23	1,600	340	1,800
5	37	1,700	430	1,500
6	37	1,700	420	1,500

(*) Obtained by subtracting the number of cells in the minus Mo culture.

(**) Computed by the formula:

$$\frac{\text{gram-atoms Mo}}{\text{net-cell count}} \times \text{Avogadro's No.}$$

the molybdenum added to the nutrient solution was used by the algae. The molybdenum requirement per cell was computed at three different levels of molybdenum concentration in the nutrient solution: two representing a restricted, and one an adequate level of supply (Fig. 2). At all three levels the most rapid cell division occurred when the molybdenum supply was above 3000 atoms per cell. In the molybdenum-restricted cultures no cell division occurred when the molybdenum supply dropped to 1500-1700 atoms per cell.

Considering the large errors inherent in this type of computation, the quantitative agreement between the molybdenum requirement per cell reported earlier (ARNON [19]) and that found in the different cultures used in the present investigation is considered excellent. The molybdenum requirements of *Scenedesmus* invite

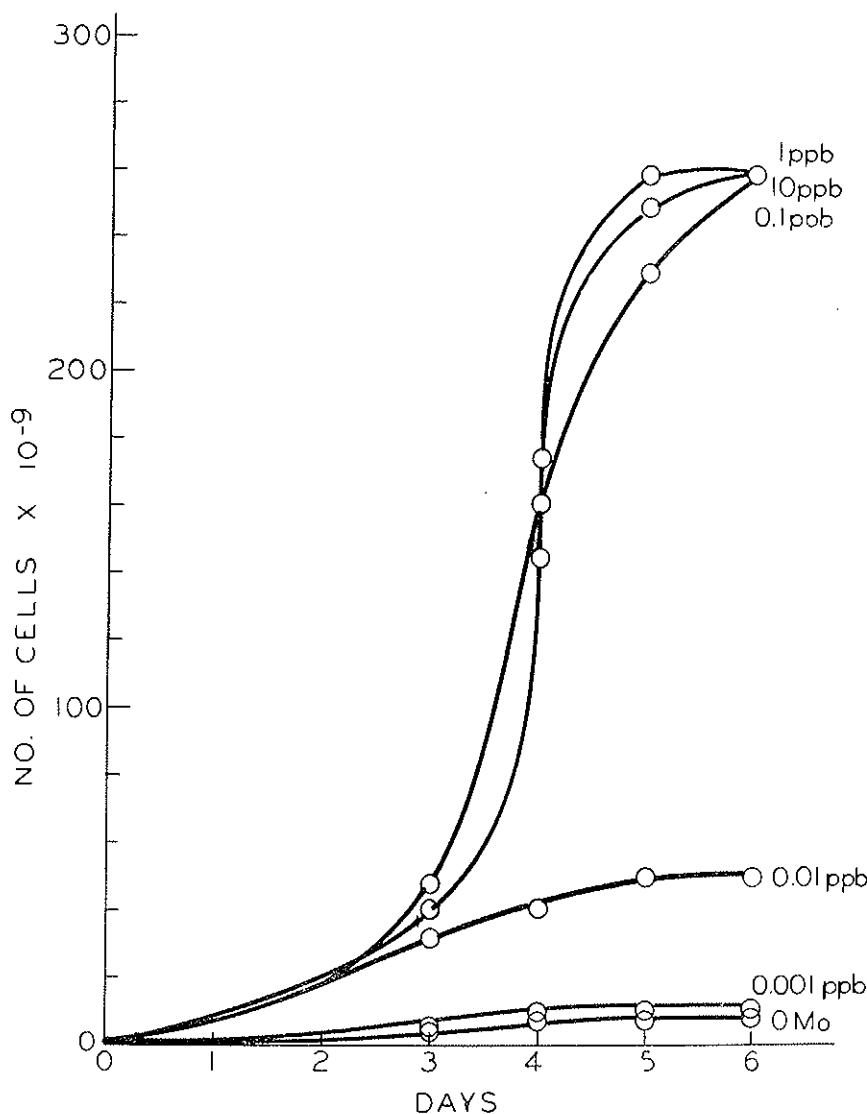


FIG. 2 — Effect of molybdenum on the number of *Scenedesmus* cells (number of cells $\times 10^{-9}$ per liter of nutrient solution). (10^{-6} g. Mo per liter of nutrient solution = 1 ppb.)

comparison with those reported by BURK for *Azotobacter* [22]. He found that an *Azotobacter* cell required 10,000 atoms of Mo for optimum nitrogen fixation. Taking the average diameter of a *Scenedesmus* cell at 12 and that of *Azotobacter* as 2 microns [22] one arrives at the ratio of the cell volumes of *Scenedesmus* to *Azotobacter* as 216 to 1 (ratio of the diameters cubed). This suggests that on a unit cell volume basis, the concentration of molybdenum needed by *Azotobacter* is approximately 700 times as great as in *Scenedesmus*.

If the quantitative requirement for molybdenum by *Scenedesmus* is expressed in terms of concentration of this element in the nutrient solution, remarkably good agreement is found with the low values reported by AGARWALA and HEWITT [23] for cauliflower. The supply levels at which molybdenum deficiency could be shown were 10^{-9} to 10^{-8} g. Mo per liter for *Scenedesmus* as against 5×10^{-9} to 5×10^{-8} g. Mo per liter of nutrient solution for cauliflower [23].

The extremely low quantitative requirement for molybdenum argues strongly for the catalytic function of this element in the metabolism of the cell. The failure of molybdenum-deficient cells to assimilate nitrate nitrogen supports the view that in *Scenedesmus*, as in *Neurospora* [2, 3], molybdenum acts as the specific metal component of nitrate reductase.

Symptoms of molybdenum deficiency in Scenedesmus

Suspensions of cells from normal and molybdenum-deficient cultures were stained on glass slides with a dilute iodine solution and photographed. The microphotographs are shown in Fig. 3a and 3b.

The molybdenum-deficient cells, by contrast with normal cells, were stained blue indicating the presence of appreciable quantities of starch. The molybdenum-deficient cells also showed no evidence of cell division. In both these respects the molybdenum-deficient cells were similar in appearance to the nitrogen-deficient *Scenedesmus* cells grown in parallel cultures to which molybdenum was added.

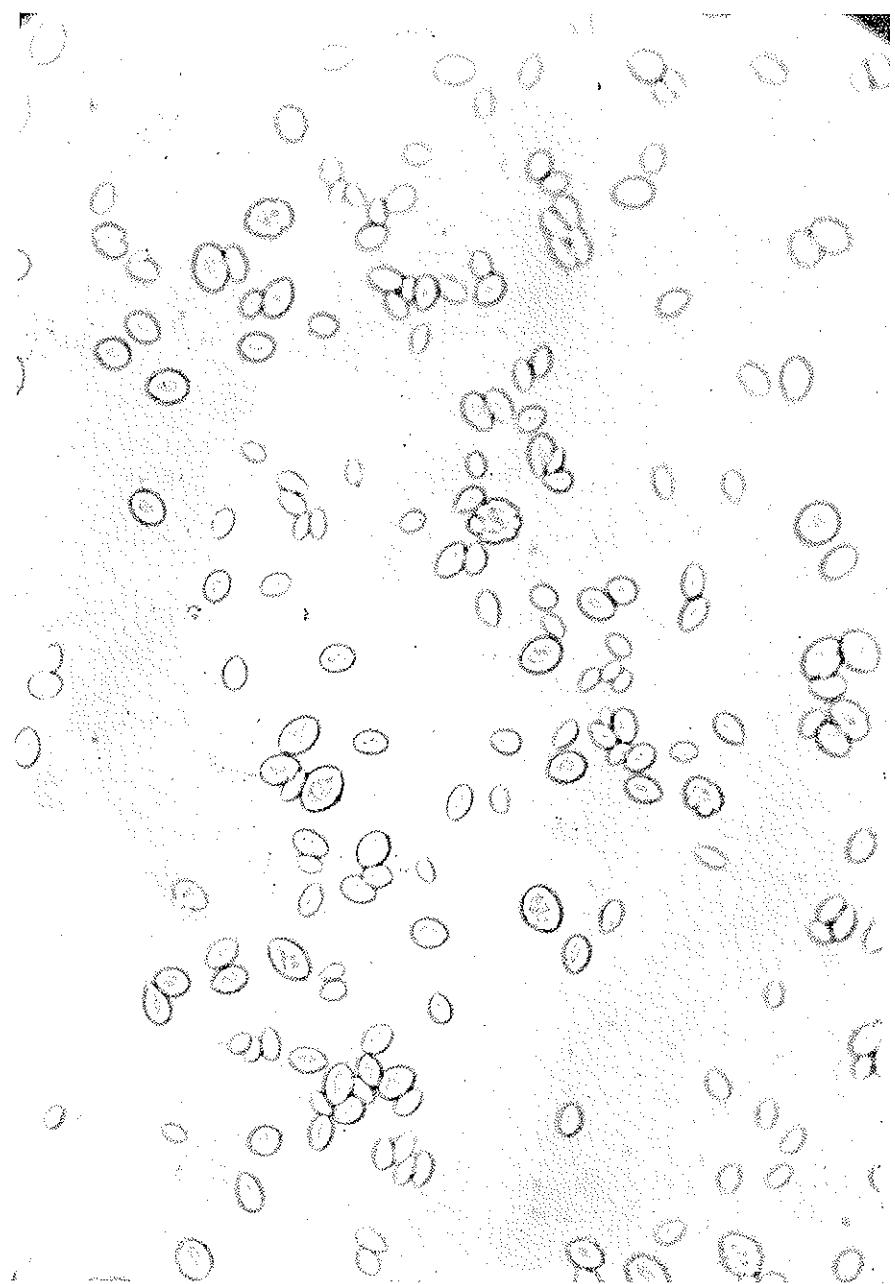


FIG. 3a — Microphotograph of *Scenedesmus* cells stained with iodine. Normal.



FIG. 3b — Microphotograph of *Scenedesmus* cells stained with iodine. Molybdenum - deficient.

Nitrogen assimilation

The nitrogen starvation suggested by the appearance of the molybdenum-deficient cells was borne out by chemical determination of their nitrogen assimilation. As illustrated in Fig. 4 the molybdenum-deficient cells assimilated only a minute amount of the nitrogen supplied as nitrate in the nutrient solution. Nitrogen assimilation in the normal cells proceeded vigorously up to the fourth day, when almost all of the nitrogen added to the medium was used up.

Molybdenum in relation to chlorophyll formation

A striking feature previously observed in molybdenum-deficient cells was their low chlorophyll content (LONERAGAN and ARNON [17], ARNON [19]). Fig. 5 shows that this was also the case in the present investigation. The relation between molybdenum and chlorophyll is evident whether it is expressed as per cent dry weight of the cells or as milligrams of chlorophyll formed per liter of culture medium.

Chlorophyll content increased with increasing molybdenum supply within the range investigated. This is especially interesting at the highest concentration of molybdenum (10^{-5} g/l) which, though associated with the highest chlorophyll synthesis, produced no increase in growth (Fig. 1). For any one level of molybdenum supply the chlorophyll content of cells progressively decreased as growth increased after the fourth day.

The addition of molybdenum to molybdenum-deficient cells resulted in a prompt and sharp increase in chlorophyll synthesis (Fig. 6). It was previously shown (ARNON [19]) that this increase in chlorophyll coincided with an increase in growth (cf. Figs. 2 and 3 in [19]).

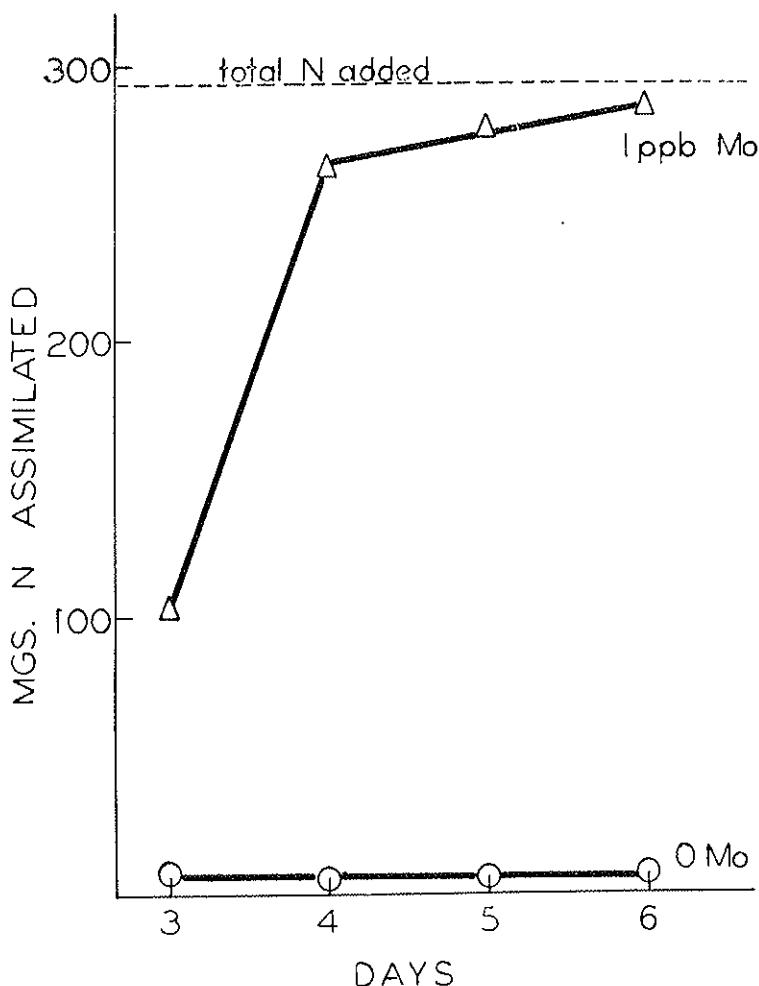


FIG. 4. — Effect of molybdenum on nitrate nitrogen assimilation by *Scenedesmus*. Ordinate represents mgs. N assimilated by cells contained in one liter of nutrient solution

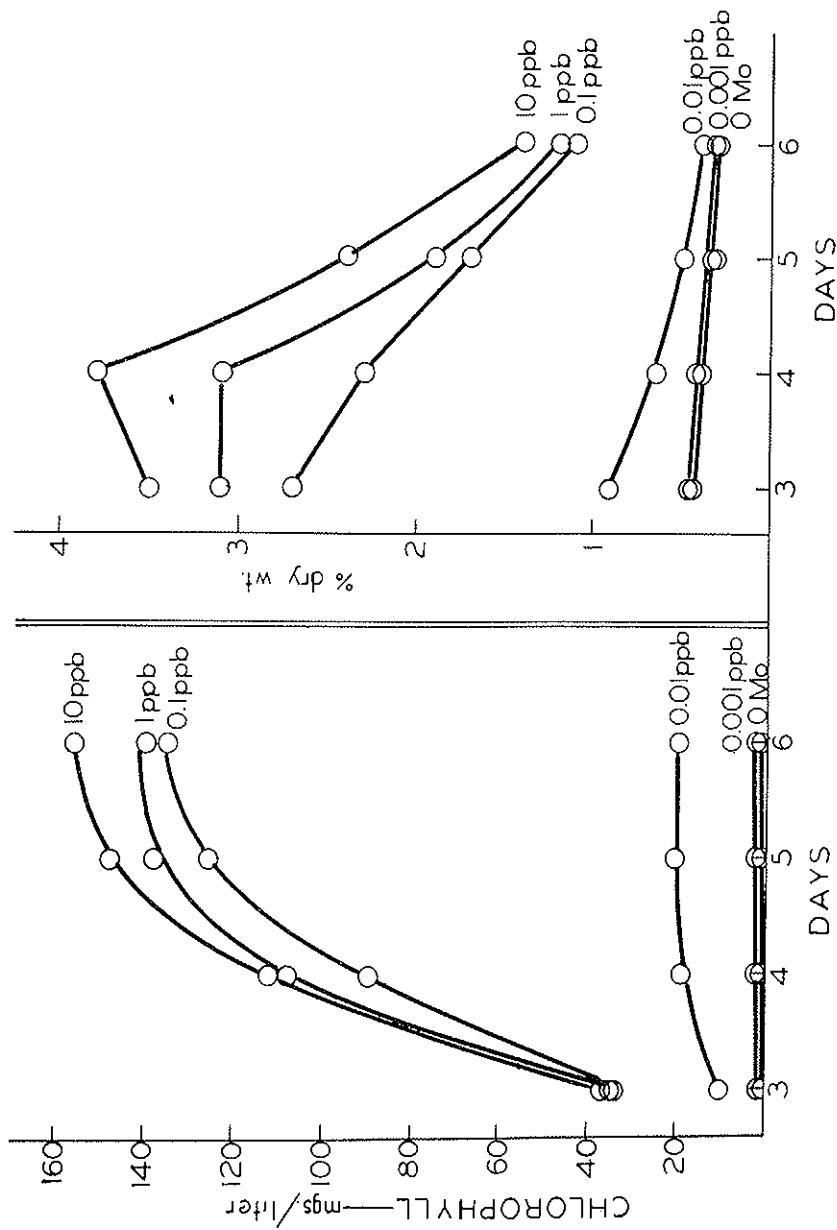


Fig. 5 — Effect of molybdenum on chlorophyll in nitrate cultures.
 Left-effect of molybdenum expressed as mgs. of chlorophyll synthesized by cells contained in one liter
 of nutrient solution; right-effect of molybdenum expressed as per cent of dry weight of *Scenedesmus*
 cells (10^{-6} g. Mo per liter of nutrient solution = 1 ppb).

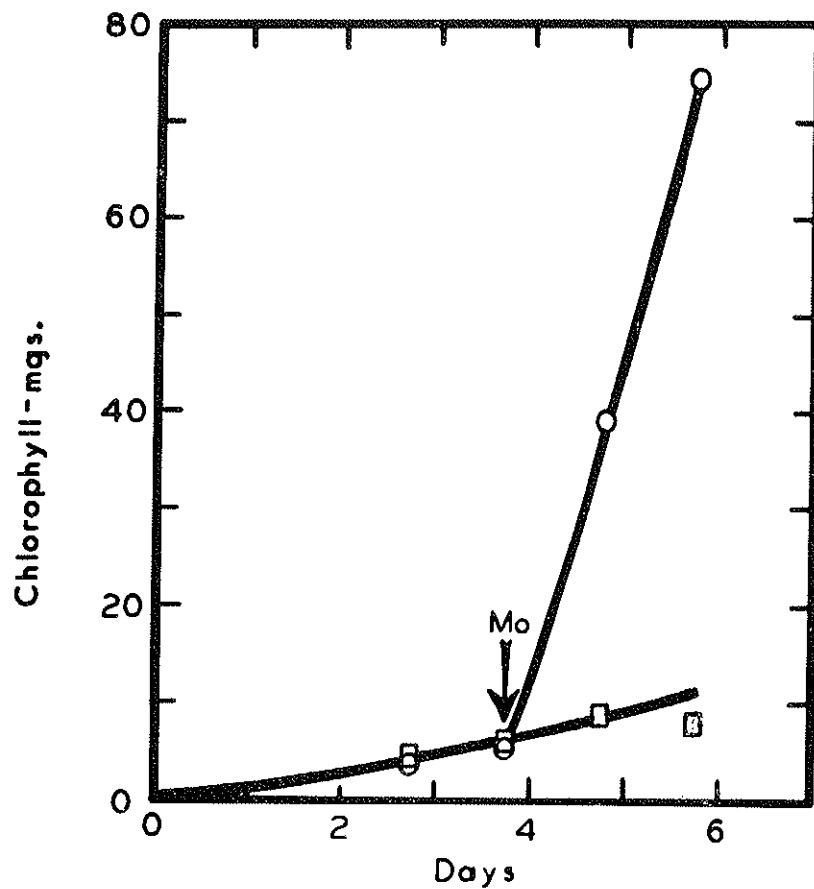


FIG 6 — Resumption of chlorophyll synthesis (expressed as mgs. chlorophyll synthesized by cells contained in one liter of nutrient solution) upon the addition of 1.3×10^{-5} g. Mo per liter of nutrient solution

ASSIMILATION OF AMMONIA AND UREA WITHOUT MOLYBDENUM BY *Scenedesmus*

In this group of experiments *Scenedesmus* was grown with and without added molybdenum in purified nutrient solutions to which nitrogen was supplied by one of three sources: potassium nitrate, urea or ammonium carbonate. The nitrogen was supplied at two levels: « normal » and restricted. To avoid possible molybdenum contamination the ammonium carbonate was prepared from distilled ammonia and CO₂ gas. Urea was purified by two recrystallizations from H₂O [11]. In addition to these purification measures the general design of the experiments afforded additional safeguards against molybdenum contamination.

Normal N Supply - Effect of Mo and N source on growth and chlorophyll

The cultures in these experiments were divided into three series, each supplied at the start with 20 milliequivalents of nitrogen per liter from potassium nitrate, urea or ammonium carbonate. Within each series molybdenum was added to half of the cultures.

Fig. 7 shows that in the nitrate series no growth occurred without added molybdenum [11]. By contrast, the omission of molybdenum had no effect on growth with either urea or ammonia nitrogen. The effect of molybdenum on chlorophyll formation (Fig. 8) paralleled the effect of this element on growth. Without added molybdenum, chlorophyll synthesis was completely arrested in the nitrate series but not in the urea or ammonia series.

The tentative conclusion was drawn from these experiments that in *Scenedesmus* molybdenum is required solely for nitrate reduction. The effect of molybdenum on chlorophyll was observed only in the nitrate cultures and could be explained by its effect on nitrogen metabolism.

The conclusion about the dispensability of molybdenum when either ammonia or urea were used as sources of nitrogen was tested further as described in the following section.

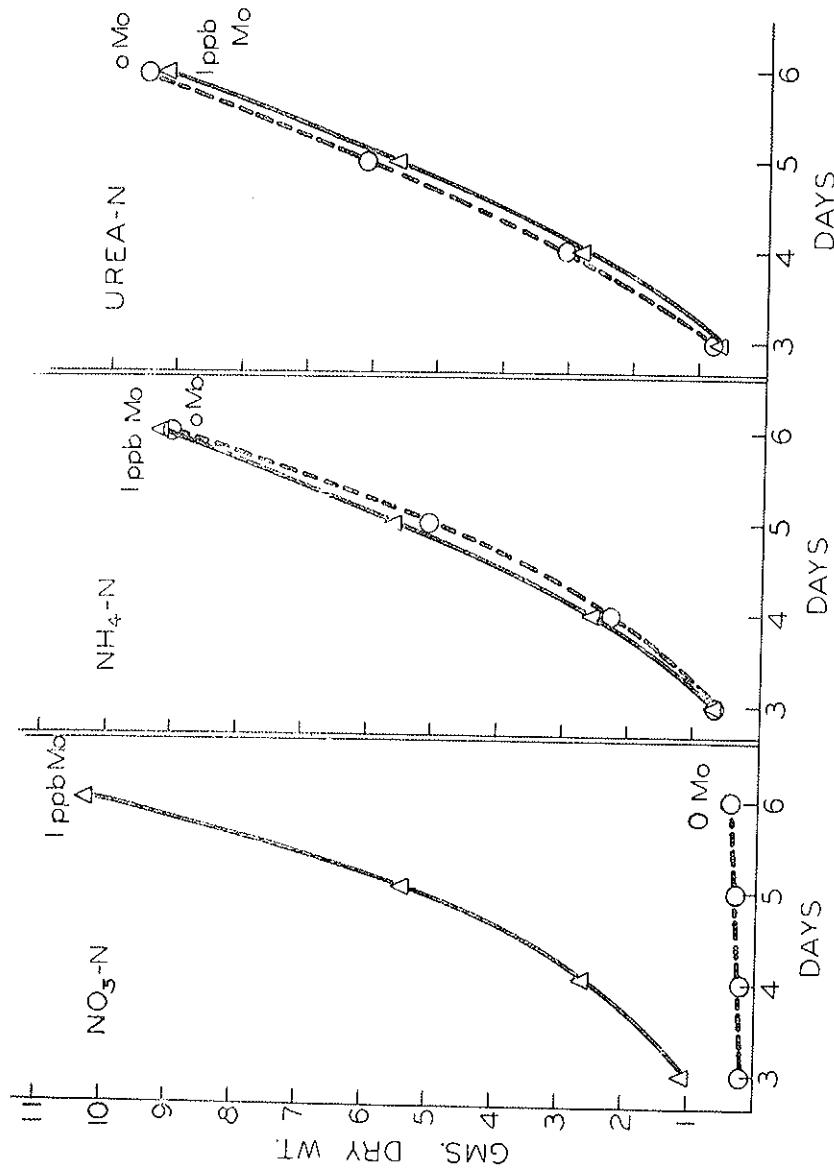


FIG. 7 — Effect of molybdenum on growth of *Scenedesmus* supplied with nitrate, ammonia, or urea nitrogen. (Ordinate represents grams dry weight of cells per liter of nutrient solution).

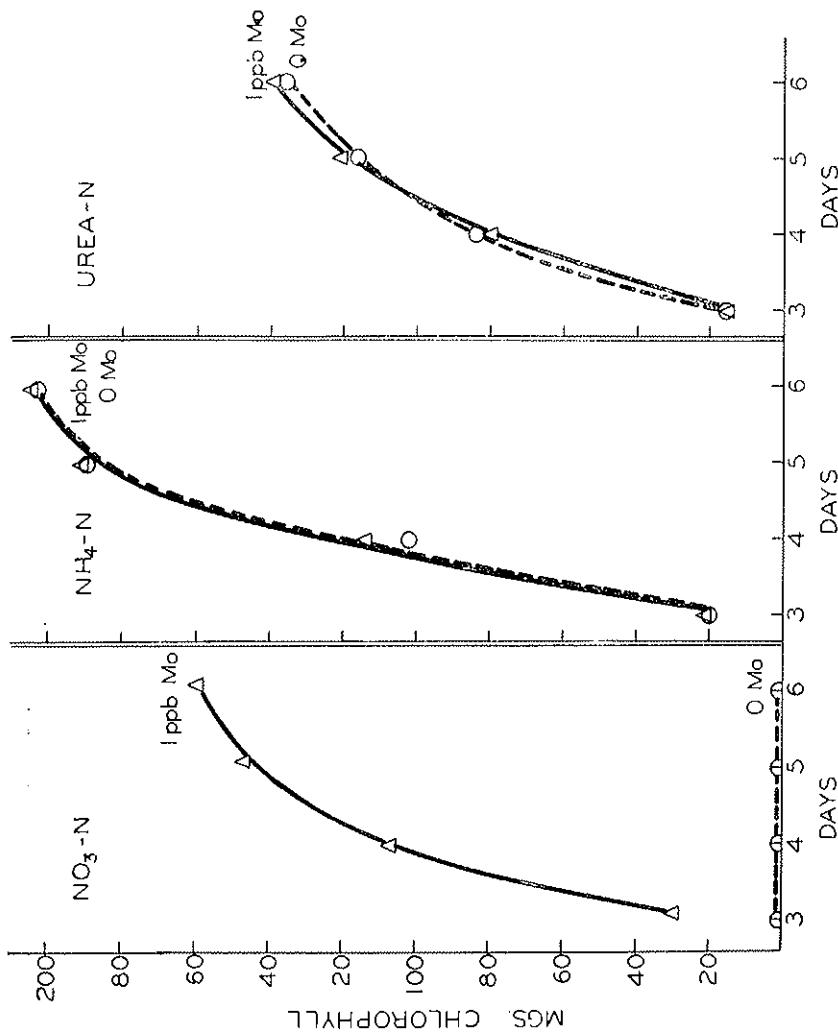


FIG. 8 — Effect of molybdenum on chlorophyll formation by *Scenedesmus* supplied with nitrate, ammonia, or urea nitrogen. (Ordinate represents milligrams of chlorophyll synthesized by cells contained in 1 liter of nutrient solution).

Restricted N supply - Effect of Mo and N source on N assimilation

The cultures in these experiments were divided into two series, one supplied with urea and the other with ammonium carbonate. The general design of the experiments was to supply a restricted amount of ammonia or urea (7 milliequivalents N per liter) to plus and minus molybdenum cultures in each series. On the fourth day, when the nitrogen supply was exhausted, each series was subdivided into 3 groups. One group served as a control and received no further addition of nitrogen; the second group received an addition of KNO_3 . If molybdenum were present as a contaminant in either the urea or ammonia media it would have permitted the assimilation of the added nitrate in the cultures with no further addition of molybdenum. No such effect was observed, indicating the purity of the urea or ammonia used. The third group of cultures received an addition of either urea or ammonium carbonate. The supplementary nitrogen added on the fourth day from any one of these sources consisted of 20 milliequivalents of N per liter of nutrient solution.

Figs 9 and 10 illustrate the effect of molybdenum on the assimilation of different sources of nitrogen. When either urea or ammonia was used as the initial nitrogen source, molybdenum had no effect on nitrogen assimilation. On the fourth day, when the then limiting nitrogen supply was augmented by additions of the various nitrogen salts, molybdenum exerted a differential effect on their utilization. Potassium nitrate was utilized almost at once but only in the presence of molybdenum, whereas urea and ammonia were assimilated with or without molybdenum.

The absence of any measurable molybdenum requirement when urea or ammonia were used as sources of nitrogen for *Scenedesmus*, supports the conclusion that the function of molybdenum in this organism is confined to nitrate reduction (cf. WALKER [16]). The relation of molybdenum to nitrite assimilation in *Scenedesmus* is currently under investigation.

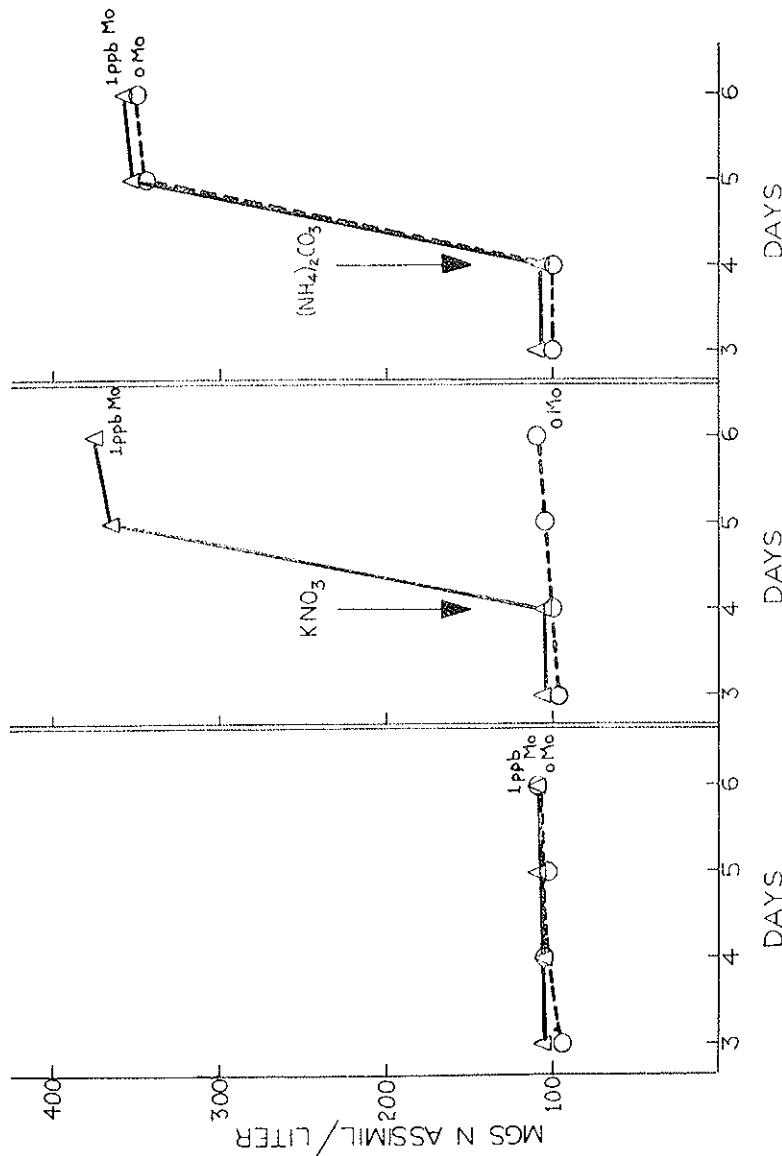


FIG. 9 — Effect of molybdenum on assimilation of supplementary nitrogen by *Scenedesmus* grown with a restricted supply of ammonium carbonate. At times indicated by arrow 20-milliequivalents of nitrogen were added. Left-control; center-potassium nitrate; right-ammonium carbonate. (Ordinate represents mgs. nitrogen assimilated by cells contained in one liter of nutrient solution).

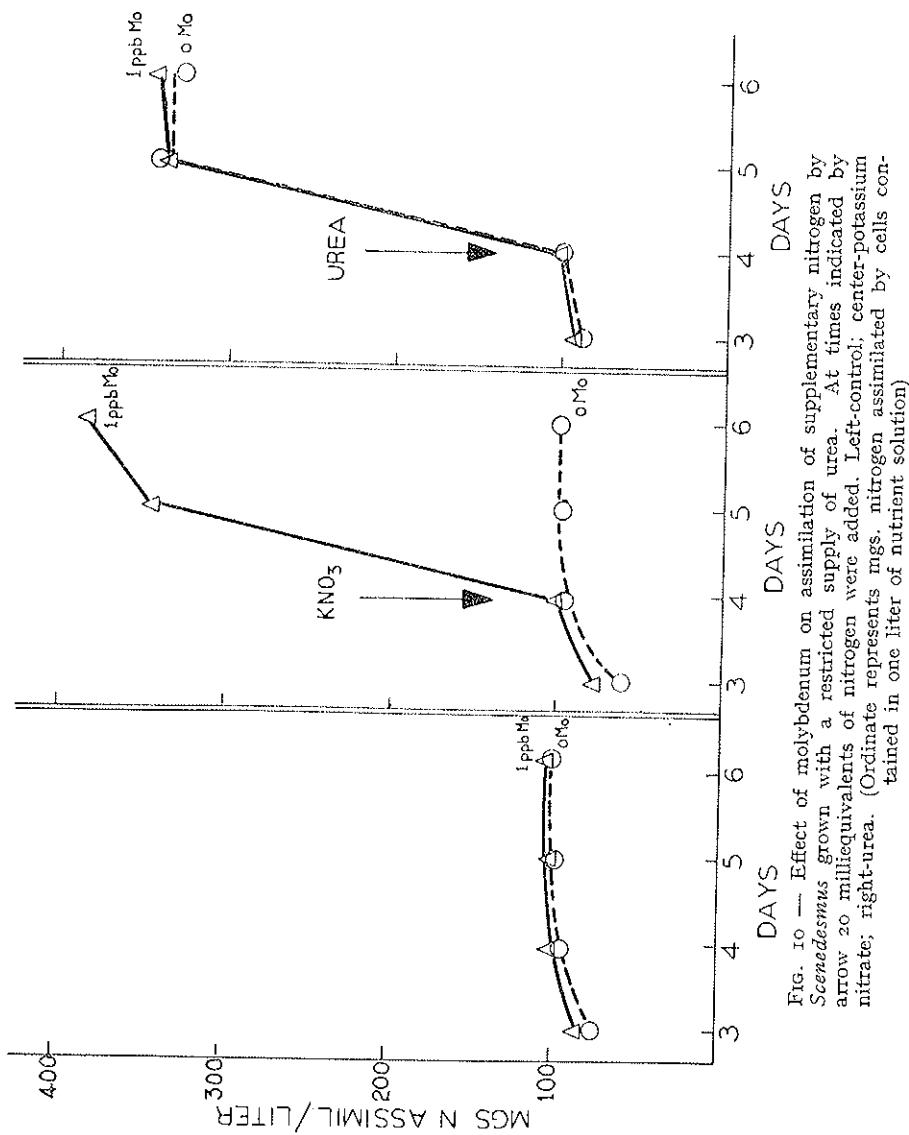


FIG. 10 — Effect of molybdenum on assimilation of supplementary nitrogen by *Scenedesmus* grown with a restricted supply of urea. At times indicated by arrow 20 miliequivalents of nitrogen were added. Left-control: center-potassium nitrate; right-urea. (Ordinate represents mgs. nitrogen assimilated by cells contained in one liter of nutrient solution)

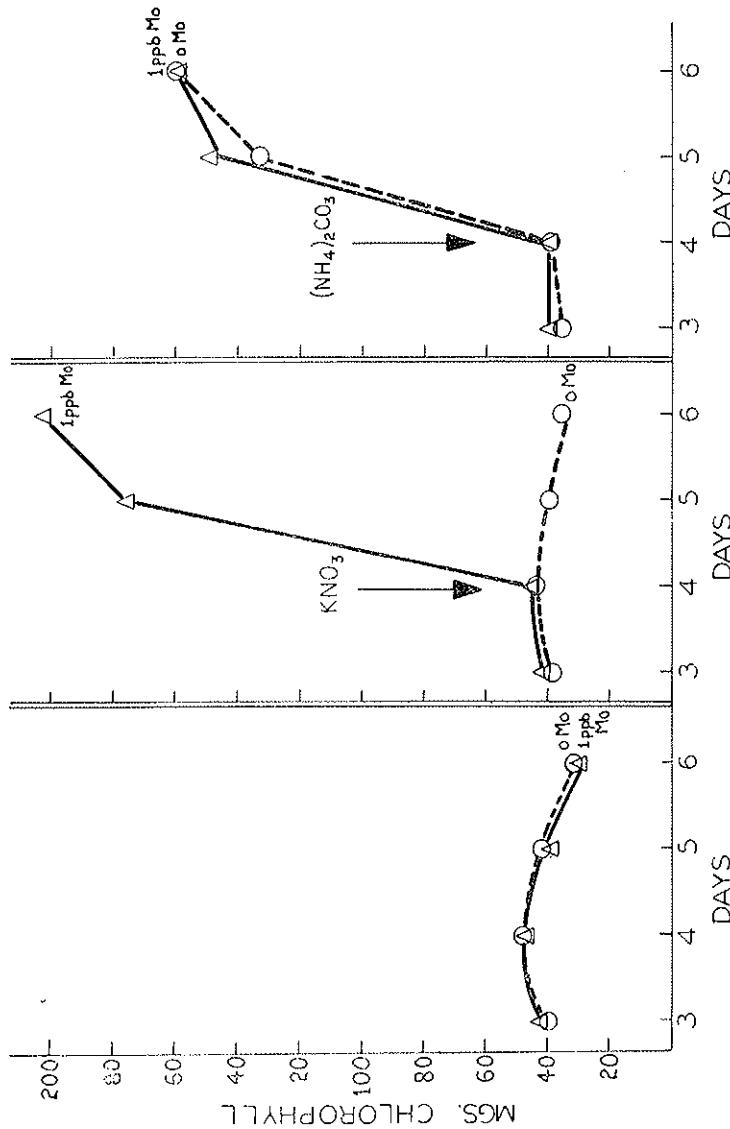


FIG. XI.—Effect of molybdenum on chlorophyll formation by *Scenedesmus* grown with a restricted supply of ammonium carbonate. At times indicated by arrow 20 milliequivalents of nitrogen were added. Left-control; center-potassium nitrate; right-ammonium carbonate. (Ordinate represents mgs. chlorophyll synthesized by cells contained in one liter of nutrient solution)

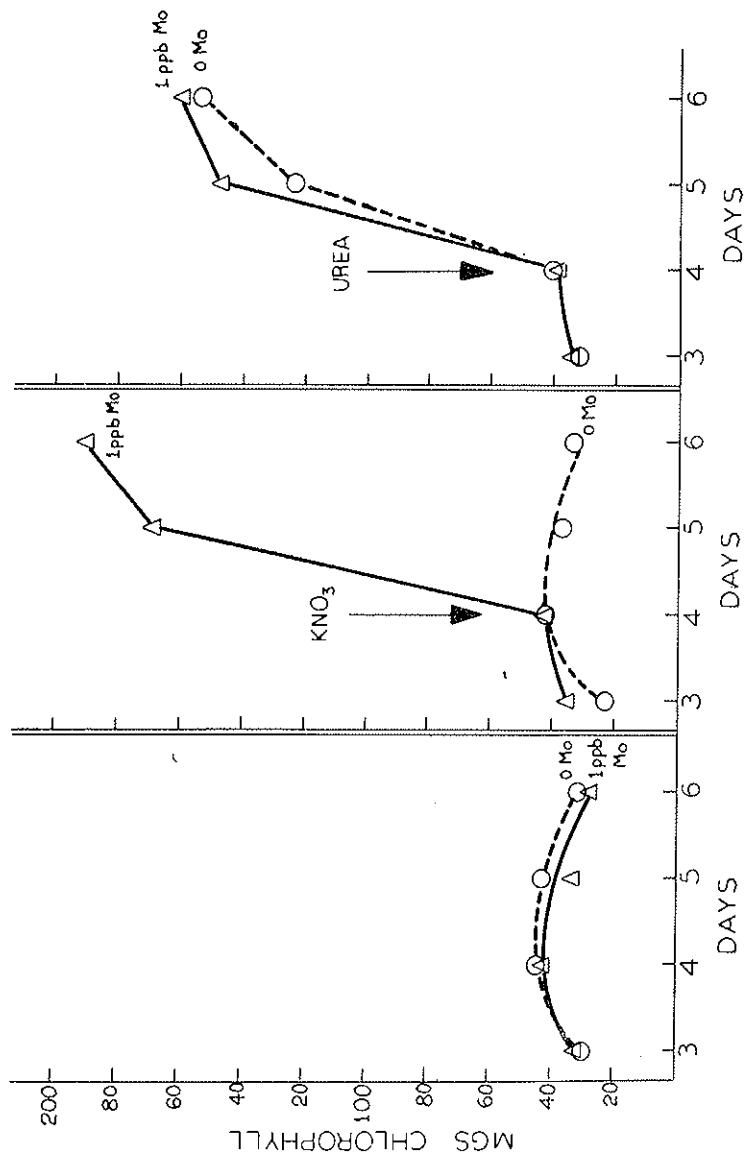


FIG. 12 — Effect of molybdenum on chlorophyll formation by *Scenedesmus* grown with a restricted supply of urea. At times indicated by arrow 20 milliequivalents of nitrogen were added. Left-control; center-potassium nitrate; right-urea. (Ordinate represents mgs. chlorophyll synthesized by cells contained in one liter of nutrient solution)

Effect of molybdenum and nitrogen source on chlorophyll

The effect of molybdenum and different sources of nitrogen on chlorophyll formation is shown in Figs. 11 and 12. The data show a parallelism between the effects of molybdenum on nitrogen assimilation and chlorophyll synthesis. Molybdenum had no significant effect on chlorophyll formation when ammonia or urea served as a source of nitrogen. Molybdenum deficiency resulted in suppression of chlorophyll synthesis when nitrate was the source of nitrogen.

The striking correlation between molybdenum deficiency and failure of chlorophyll synthesis (Fig. 5) has also disappeared when nitrate was replaced by ammonia or urea nitrogen. This suggests that the observed effect of molybdenum on chlorophyll synthesis is indirect, and operates only when nitrate reduction is blocked. Using tomato as a test plant, HEWITT and McCREADY [24] found, as we did with *Scenedesmus*, a marked reduction in the chlorophyll content of the Mo-deficient plants when nitrate was the source of nitrogen. With ammonium nitrogen, however, they found the chlorophyll content of the Mo-deficient plants to be actually higher than in the controls.

The sensitive relation between nitrogen metabolism and chlorophyll formation needs not be related to the nitrogen content (6% of the molecular weight), of the pigment itself. More likely, the sensitive relation between nitrogen assimilation and chlorophyll formation stems from the dependence of chlorophyll synthesis and function on association with specific proteins. When supplied with nitrate nitrogen molybdenum-deficient cells are unable to assimilate it and thus become, physiologically speaking, nitrogen-starved cells without any capacity for protein synthesis.

MOLYBDENUM IN RELATION TO NITROGEN FIXATION AND NITRATE REDUCTION BY ANABAENA

Many members of the blue-green algae (Myxophyceae) combine a photosynthetic habit of life with an ability to fix molecular nitrogen. Since these organisms can also assimilate nitrate nitrogen they afford an opportunity for a comparison of the molybdenum requirement under the divergent conditions of nitrogen fixation and nitrate reduction. Figs. 13 and 14 provide such a comparison for *Anabaena cylindrica*.

As shown in Fig. 13, assimilation of nitrate nitrogen by *Anabaena*, measured by the total dry weight produced, was strictly dependent on molybdenum. *Anabaena* was found to differ from *Scenedesmus* in requiring an approximately hundred-fold higher supply of molybdenum for effective utilization of nitrate nitrogen. For *Anabaena* the range from limiting to adequate concentration of molybdenum in the nutrient medium was from 10^{-6} to 10^{-5} g. Mo per liter (Fig. 13) whereas for *Scenedesmus* it was from 10^{-8} to 10^{-7} g. Mo per liter of nutrient solution (Fig. 1).

The molybdenum requirement for fixation of molecular nitrogen by *Anabaena* was found to be approximately the same as that for nitrate reduction i.e. the range from limiting to adequate concentration was from 10^{-6} to 10^{-5} g. Mo per liter of nutrient solution (Fig. 14).

As was mentioned earlier, the molybdenum requirement for nitrate reduction is specific and cannot be replaced by other elements including vanadium. This is in accord with the findings of NICHOLAS and NASON [2, 3] that molybdenum is the specific metal component of nitrate reductase in *Neurospora*. There is ample evidence however, that molybdenum in its catalytic function in nitrogen fixation by bacteria (BURK [22]) is replaceable by vanadium. Following the work of BORTELS [4] this conclusion has also been generally extended to nitrogen fixation by blue-green algae. However, an examination of BORTELS' experimental results shows that the evi-

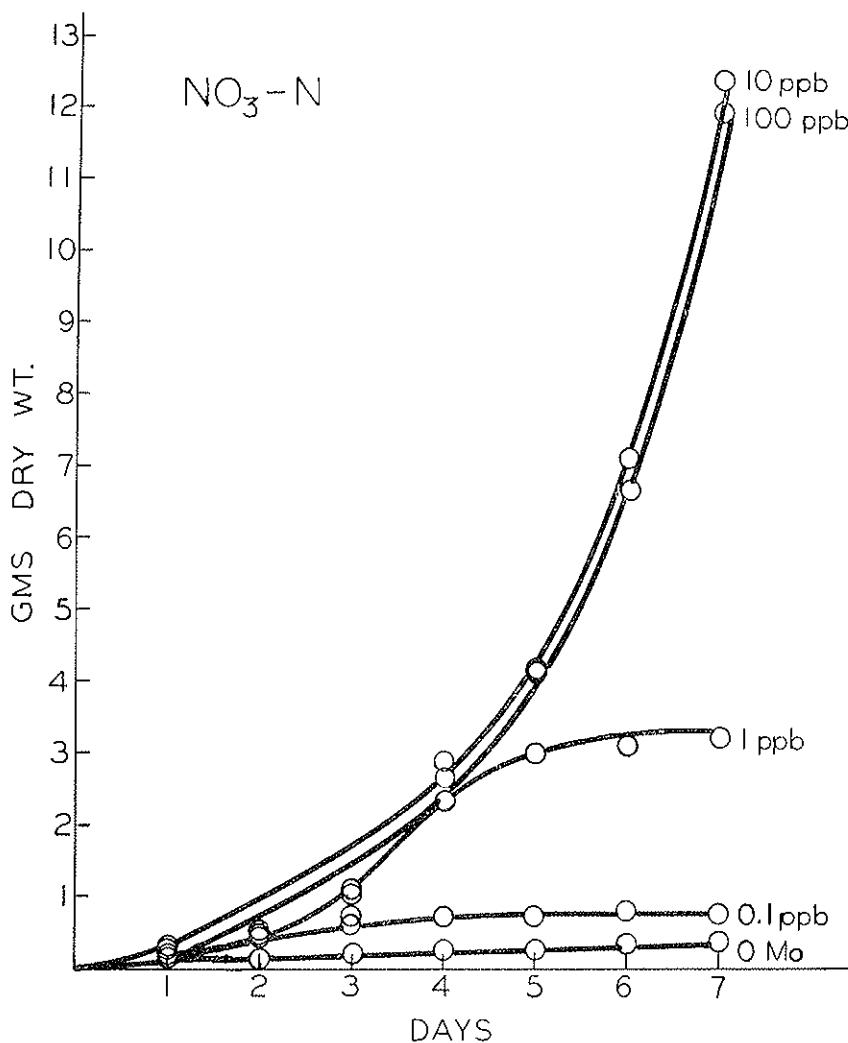


FIG. 13 — Effect of molybdenum on the dry weight (gms. dry weight of cells per liter of nutrient solution) of *Anabaena cylindrica* supplied with nitrate nitrogen. (10^{-6} g. Mo. per liter of nutrient solution = 1 ppb.)

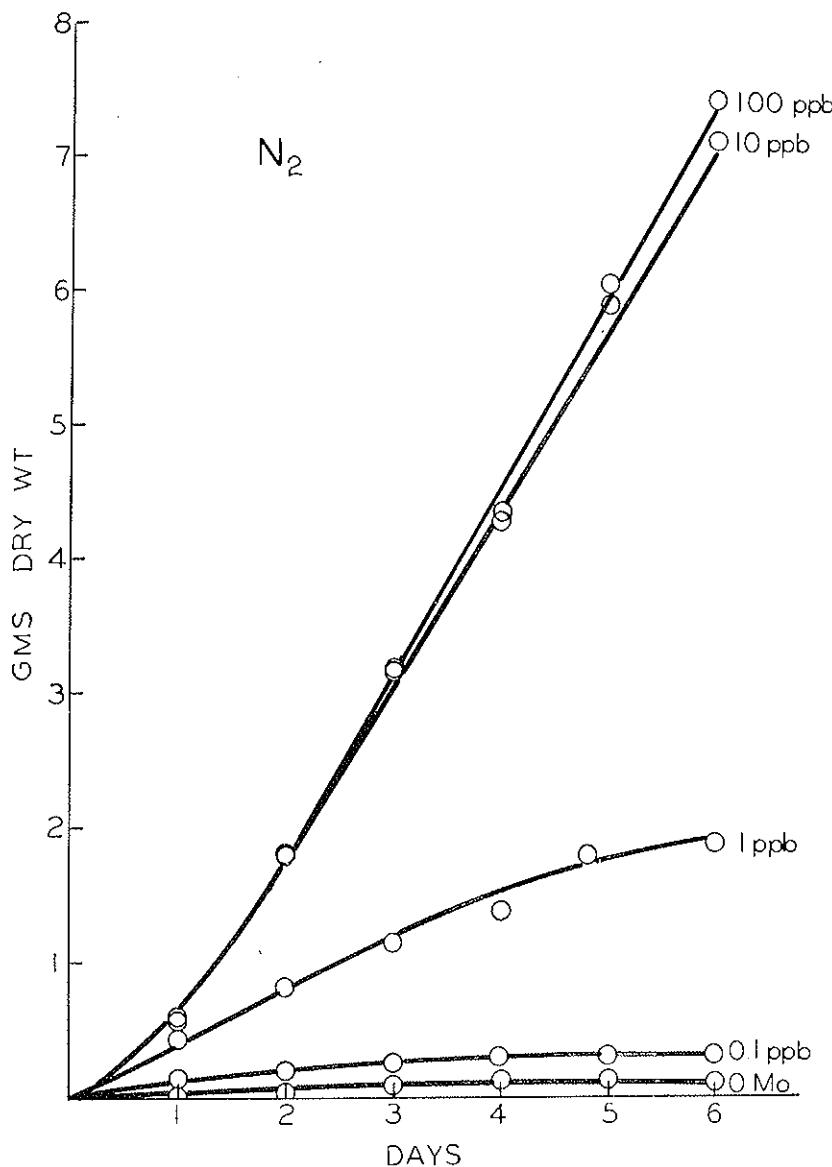


FIG. 14 — Effect of molybdenum on the dry weight (gms. dry weights of cells per liter of nutrient solution) of *Anabaena cylindrica* grown at the expense of atmospheric nitrogen. (10^{-6} g. Mo. per liter of nutrient solution = 1 ppb. Mo)

dence for the replaceability of Mo by V was not as definite as it has been accepted to be. BORTELS studied 18 cultures of various Myxophyceae. The growth of 13 of these was stimulated by Mo, but not by V, two of them were stimulated by either Mo or V, and three did not respond to the addition of either of these elements. In the two cultures which respond to either of the two elements, the increase in dry weight resulting from the addition of V was approximately half of that caused by the addition of Mo.

The results of our investigation [13] of the replaceability of molybdenum by vanadium in nitrogen fixation by *Anabaena* are illustrated in Fig. 15. Growth at the expense of molecular nitrogen could not proceed when molybdenum was replaced by vanadium. The yield of *Anabaena* without the addition of either molybdenum or vanadium was 0.28 g. dry wt. per liter, the addition of vanadium resulted in a yield of 0.36 g. per liter and the addition of molybdenum raised the yield to 5.8 g. per liter.

The reason for the replaceability of molybdenum by vanadium in nitrogen fixation by *Azotobacter* (BURK [22]) and not by *Anabaena* is not clear at the present time. The previously discussed association of molybdenum with chlorophyll synthesis led at first to a hypothesis that vanadium could replace molybdenum in nitrogen fixation but not in chlorophyll synthesis. *Azotobacter*, being free of chlorophyll, could thus grow at the expense of molecular nitrogen when supplied with vanadium instead of molybdenum. Under the same conditions growth of *Anabaena* would be precluded by the failure of chlorophyll synthesis. This hypothesis was rendered untenable however, by the normal chlorophyll formation without added molybdenum, when ammonia or urea replaced nitrate as the sole source of nitrogen for *Scenedesmus* (Figs. 11 and 12).

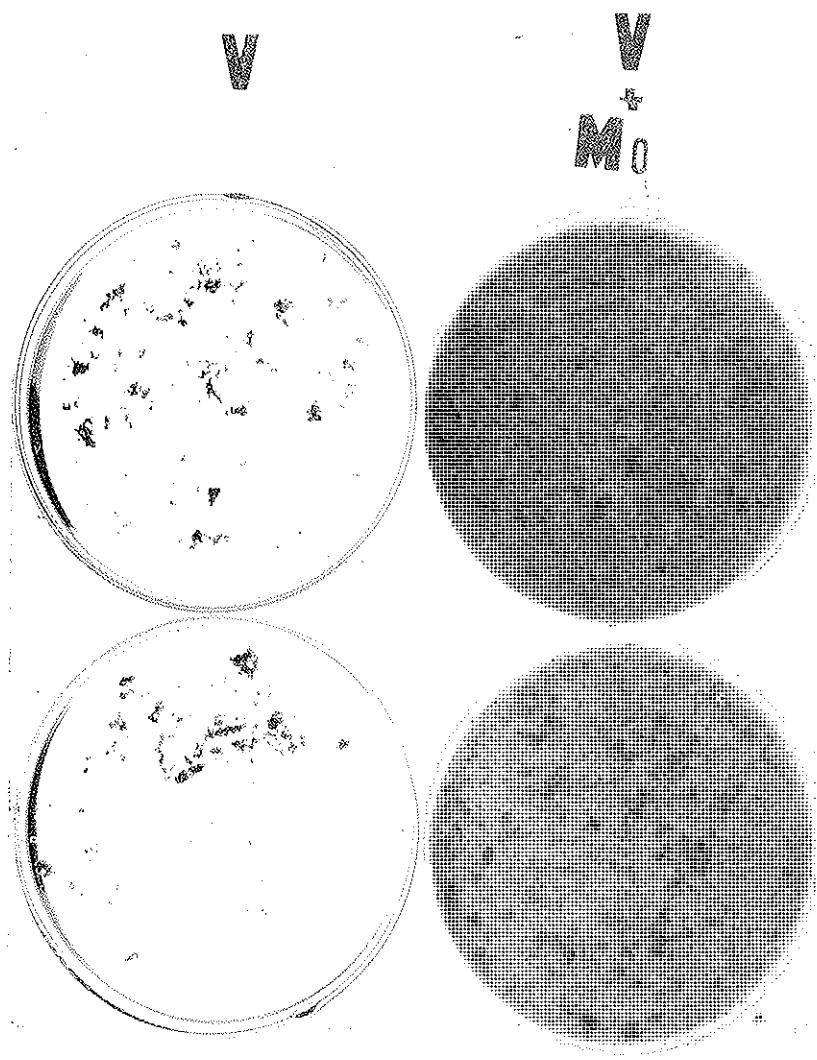


FIG. 15 — Effect of molybdenum and vanadium on growth of *Anabaena*. Cultures on right received 10^{-5} g. Mo and 10^{-5} g. V, those on left received 10^{-5} g. V per liter of nutrient solution.

POTENTIALITIES OF BLUE-GREEN ALGAE FOR NITROGEN FIXATION

At interesting corollary of our experiments with *Anabaena cylindrica* and other blue-green algae [13] was the demonstration of their high capacity for nitrogen fixation. Blue-green algae are commonly regarded as slow-growing forms which are difficult to maintain in culture. Although there are a few reports of algae of this group which grow at a rapid rate with combined nitrogen (EMERSON and LEWIS [25], KRATZ and MYERS [26]), the yields commonly reported for nitrogen-fixing blue-greens vary from 0.3-2.0 g dry weight of cell material per liter of culture medium in periods of time varying from 20 to 60 days. Even in those cases where rapid growth has been reported, it has not been shown that high cell yields can be obtained in a short time. For example, the *Chroococcus* grown by EMERSON and LEWIS [25] produced 60 mg. dry wt. per liter of culture in 5-7 days. By contrast, the cultures of *Chlorella* and *Scenedesmus* commonly used in laboratory studies give yields of 5-10 g dry weight per liter in 5-6 days [18, 27, 10].

In the present experiments the growth of *Anabaena cylindrica* at the expense of atmospheric nitrogen was such that 7-8 g. dry weight of cells per liter of culture medium was obtained in 6 days [13, 28], an increase of approximately 200-fold over the yield previously reported for this and similar organisms [29, 30, 31]. The high yields obtained for *Anabaena cylindrica* (and for other blue-green algae not discussed here) have resulted not from the attainment of higher growth rate constans (K) than those previously reported by other investigators but rather from the maintenance of exponential growth rates at high cell densities.

The high capacity of blue-green algae for growth at the expense of molecular nitrogen is important in evaluating their role as biological agents for nitrogen fixation, especially in tropical soils, under conditions of rice culture (cf. review by FOGG [32]). The potential contribution of blue-green algae to the nitrogen economy of rice and perhaps other crops is illustrated in Fig. 16, which is representative of a series of four recent experiments on the growing of rice plants

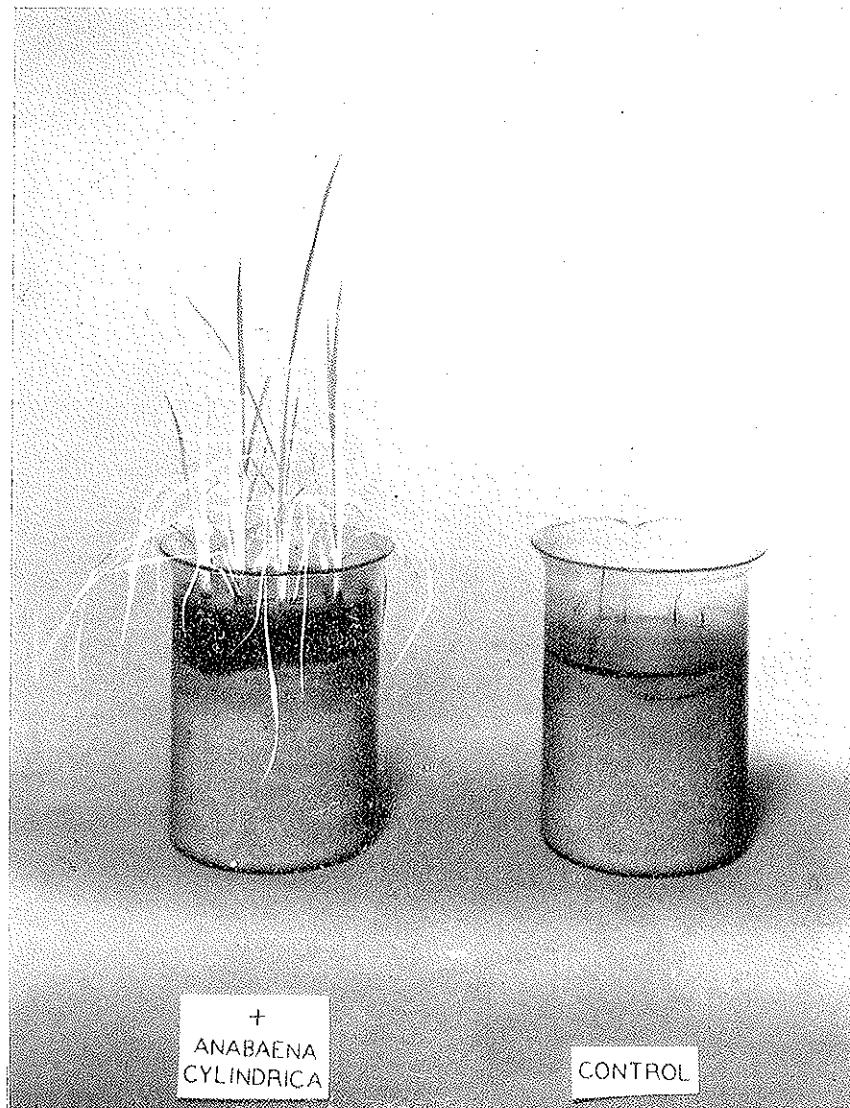


FIG. 16 — Effect of *Anabaena cylindrica* on the growth of rice seedlings in a nutrient solution free of nitrogen compounds. Left: culture inoculated with *Anabaena cylindrica*; right: control.

without added combined nitrogen but solely at the expense of atmospheric nitrogen fixed by *Anabaena*. Rice seedlings were germinated and grown in a greenhouse in sand culture with nutrient solutions not containing combined nitrogen. One series was inoculated with a pure culture of *Anabaena cylindrica*. As shown in Fig. 16 the rice seedlings in the uninoculated cultures failed to grow once the nitrogen reserves in the seed were used up. By contrast, the rice plants in the inoculated cultures made appreciable growth at the expense of the atmospheric nitrogen fixed by *Anabaena*. This pseudo-symbiosis between the rice plants and *Anabaena* differs from the symbiotic nitrogen fixation involving leguminous plants and *Rhizobium* in that both *Anabaena* and rice are independent photoautotrophic plants.

The experiment illustrated in Fig. 16 provides a rather severe test for the nitrogen-fixing power of *Anabaena*. Under field conditions rice plants could draw on the reserves of combined nitrogen previously fixed by the algae whereas under the present laboratory conditions, molecular nitrogen had to be fixed and made available concurrently with the growth of the rice seedlings.

The high capacity of blue-green algae for the fixation of molecular nitrogen under optimal conditions raises the interesting possibility of materially increasing the contribution of these organisms to the nitrogen economy of soils, especially in tropical and subtropical areas favored by high light intensity and elevated temperature conducive to the rapid metabolism of these algae.

Voir la discussion à page 551

REF E R E N C E S

- [1] STEINBERG R. A., « J. Agr. Res. », 55, 891 (1937).
- [2] NICHOLAS D. J. D. and NASON A., « J. Biol. Chem. », 207, 353 (1954).
- [3] NICHOLAS D. J. D. and NASON A., « J. Biol. Chem. », 211, 183 (1954).
- [4] BORTELS H., « Arch. f. Mikrobiol. », 11, 155 (1940).
- [5] MULDER E. G., « Plant and Soil », 1, 94 (1948).
- [6] WILSON P. W. and BURRIS R. H., « Bacter. Rev. », 11, 41 (1947).
- [7] HEWITT E. J. and JONES E. W., « J. Pom. Hort. Sci. », 23, 254 (1947).
- [8] MEAGHER W. R., *Molybdenum nutrition of the higher plant as revealed by nitrogen metabolites*. Doctoral thesis. Univ. of Calif. Berkeley, Calif. (1952).
- [9] SPENCER D. and WOOD J. G., « Aust. J. Biol. Sci. », 7, 425 (1954).
- [10] ARNON D. I., ICHIOKA P. S., WESSEL G., FUJIWARA A. and WOOLLEY J. T., « Physiologia Plantarum », 8, 588 (1955).
- [11] ICHIOKA P. S. and ARNON D. I., *Ibid.*, 8, 552 (1955).
- [12] ICHIOKA P. S., ALLEN M. B. and ARNON D. I., Unpublished data. 1955.
- [13] ALLEN M. B. and ARNON D. I., « Plant Physiol. », 30, 366-371 (1955).
- [14] MYERS J., « Ann. Rev. Microb. », 5, 157 (1951).
- [15] KETCHUM B. H., « Ann. Rev. Plant Physiol. », 5, 55 (1954).
- [16] WALKER J. B., « Arch. Biochem. Biophys. », 46, 1 (1953).
- [17] LONERAGAN J. F. & ARNON D. I., « Nature », 174, 459 (1954).
- [18] ARNON D. I., FUJIWARA A., WESSEL G. & WOOLLEY J. T., *Paper presented before Amer. Soc. Plant Physiol.*, Madison, Wisconsin. September 1953.
- [19] ARNON D. I., 8^e Congrès Intern. Botan., Paris, Rapports & Communicat. Sect. 11, 73 (1954).
- [20] ARNON D. I. and STOUT P. R., « Plant Physiol. », 14, 599 (1939).
- [21] ARNON D. I., « Amer. J. Bot. », 25, 322 (1938).
- [22] BURK D., « Ergeb. Enzymforsch. », 3, 23 (1934).
- [23] AGARWALA S. C. and HEWITT E. J., « Jour. Hort. Sci. », 29, 278 (1954).
- [24] HEWITT E. J. and MCCREADY C. C., « Nature », 174, 186 (1954).
- [25] EMERSON R. and LEWIS C. M., « J. Gen. Physiol. », 25, 579 (1942).

- [26] KRATZ W. and MYERS J., « Amer. J. Bot. », 42, 282 (1955).
- [27] DAVIS E. A., DEDRICK J., FRENCH C. S., MILNER H. W., MYERS J., SMITH J. H. C., and SPOEHR H. A. In « Algal culture from laboratory to pilot plant », J. S. Burlew, Ed. Carnegie Inst. of Washington Publ., 600. Washington D. C. (1953).
- [28] ALLEN M. B. and ARNON D. I. Paper presented before Amer. Soc. of Plant Physiol., Gainesville, Florida. September 1954.
- [29] ALLISON F. E., HOOVER S. R., and MORRIS H. J., « Bot. Gaz. », 98, 433 (1937).
- [30] FOGG G. E., « New Phytol. », 43, 164 (1944).
- [31] WILLIAMS A. E. and BURRIS R. H., « Amer. J. Bot. », 39, 340 (1952).
- [32] FOGG G. E., « Endeavour », 6, 172 (1947).

SOME EFFECTS OF DEFICIENCIES, EXCESSES AND INTERACTIONS OF OLIGOELEMENTS ON CROP PLANTS

T. WALLACE

At the present time twelve mineral elements have been shown to be essential for the growth of higher plants, namely nitrogen, phosphorus, calcium, magnesium, potassium, sulphur, iron, manganese, boron, copper, zinc and molybdenum. The first six of these, N, P, Ca, Mg, K and S, are usually referred to as major or macro-nutrient elements, and the other six, Fe, Mn, B, Cu, Zn and Mo, as minor, trace or micro-nutrient elements (also as oligoelements and spuren-elemente).

It is generally agreed that this list is not a final one and that future research may establish the essential nature of many other mineral elements.

In this connection evidence has already been produced of the essential nature of vanadium [1] and chlorine [2] for green plants.

Work on crop plants has shown that all six oligoelements are essential for their growth, and that deficiencies and excesses of each of them may seriously affect the yield and quality of crops in the field. Moreover, these problems have been shown to be widely distributed in crops throughout the world.

Two separate effects in crops must be considered:

a) effects on yields, so that effects may be measured in terms of increased or decreased yields;

b) the occurrence of so-called « deficiency diseases », which occur when the levels of the respective elements in the plants are too

low (in excesses too high) to allow of the proper functioning of the growth processes.

In terms of yield a plant may be said to be deficient in any nutrient element when an addition of the element to the nutrient solution produces an increase in yield [3].

Similarly, when the further addition of the element produces either no further increase in yield or a decrease, the element may be said to be present in an optimal amount or in excess.

At levels too low or too high to allow of the proper functioning of the growth process, specific symptoms of the deranged metabolism are often evident, some of which can be used to indicate the status of the elements present in deficient or excessive amounts [4].

In the examination of the status of mineral nutrients — both major and minor nutrients — in plants, it has been shown that this may be affected by interactions between nutrients and also between nutrients and other elements (antagonistic and synergistic effects) and that these effects may increase or decrease specific deficiency conditions within the plants.

In the present paper some important effects produced on a wide range of crop plants by deficiencies, excesses and interactions of the oligoelements iron, manganese, boron, copper, zinc and molybdenum are summarized and illustrated.

In addition, two special problems of practical importance concerning deficiencies and excesses of oligoelements are discussed viz:

a) soil acidity in relation to the occurrence of deficiencies and excesses;

b) the content of copper, zinc and molybdenum in seeds in relation to the development of deficiencies of these elements.

DEFICIENCIES, EXCESSES AND INTERACTIONS

The following summaries list some of the more important effects that have been noted in studies of the oligoelements. Many of the effects referred to are shown in the illustrations given with this paper. For a fuller account of the effects and for a more extensive list of illustrations the author's guide and colour atlas should be consulted [4].

DEFICIENCIES

Iron — A characteristic effect is the development of chlorotic leaves near the growing points of shoots; the chlorotic patterns of the leaves are distinctive in the earlier stages, taking the forms of fine interveinal mottling in di-cotyledons and interveinal striping in monocotyledons; the leaves usually develop brown necrotic areas, often near the margins, at later stages, and shoots die back from the tips. Iron deficiency is much more common in horticultural crops (particularly fruit trees) than in the usual agricultural crops.

Manganese — Leaf symptoms of this deficiency are very varied for different plants, though many comprise chlorotic patterns and necrotic spotting. The chlorotic patterns are often distinctive from those of iron deficiency, though on some plants they are very similar, e.g. many Brassicae. Examples of crop plants showing chlorotic patterns are oats (Grey Speck disease), Brassica crops (chlorotic mottles), sugar beet (Speckled Yellows) and many fruit crops (interveinal V-shaped patterns); necrotic spots are developed characteristically on the leaves of potatoes and tomatoes (preceded by chlorotic mottling on the latter), and on the cotyledons of the seeds of many legumes (e.g. Marsh Spot of peas). Yields of many crops may be seriously decreased by this deficiency, including cereals, peas and beans, various beet crops, potatoes and tomatoes.

Boron — The salient feature of boron deficiency is the failure of the meristematic tissues to differentiate, and this results in the development of deformed growths, cork formation and the death of growing points. Severely affected crops are usually of little value, and the effects produced on various crops are so characteristic that they have been given special descriptive names, e.g. « Heart Rot » of sugar beet, « Canker » of table beet, « Brown Heart » of swedes and turnips, « Hollow Stem » of cauliflower, « Cracked Steam » of celery, alfalfa « Yellows » and « Drought Spot », « Cork », « Corky Core » and « Corky Pit » of apples, « Hard Fruit » of Citrus and « Top Sickness » of tobacco.

Copper — Copper deficiency effects are characterized by die-back of growing points, which may be accompanied by deformed growths,

burning of leaf margins, chlorosis and rosetting and multiple bud formation. Characteristic symptoms in cereals are withering and marginal chlorosis of the tips of young leaves, which may fail to unroll, excessive tillering and failure to form grain. In cereals the names « Reclamation Disease », « Yellow Tip » and « Withertip » have been given to the copper deficient condition, and among tree fruits it is referred to as « Exanthema » in pears and as « Summer Die-back » in apples.

Zinc — This deficiency has been described for a wide range of plants. Characteristic effects in broad-leaved crops are interveinal chlorosis, often with necrosis and pigmentation, reduced leaf size (« Little Leaf »), of malformed and narrow leaves (« Sickle Leaf »), shortened internodes resulting in rosette formation at shoot tips, with bare shoots below; cereals and some other plants, such as tomato, show purpling and death of the older leaves, resembling in appearance phosphorus deficiency; clovers and flax develop typical dwarfed rosetted growths. Other names describing the special effects are « Mottle Leaf » of Citrus, « Bronzing » of tung and « White Tip » of maize.

Molybdenum — Important effects of this deficiency are chlorotic mottling of leaves, and forward curling and browning of leaf margins; in instances of acute deficiency the laminae of some Brassicaceae become necrotic and may fail to develop (« Whiptail » condition in cauliflower), and growing points may die out. In legumes, the main symptom in the field may be nitrogen deficiency, resulting from the failure of the nodule organisms to fix nitrogen, but in sand culture the usual leaf browning effects are shown.

EXCESSES

Iron — May produce deficiency of phosphorus or manganese.

Manganese — Various necrotic and spotty effects on leaves and stems may be developed (tomato and potato); may also induce iron deficiency chlorosis.

Boron — A usual effect is a marginal browning of the older leaves; gum pockets may be produced in the leaves of Citrus.

Copper and Zinc — Both elements may induce iron deficiency and produce interveinal necrotic areas.

Molybdenum — Plants appear to tolerate high contents of molybdenum; at high levels leaves may develop pigmentation.

INTERACTIONS

Oligoelements may show interactions with each other or with major elements. The effects may be either antagonistic or synergistic, as shown below:

Antagonisms — P/Fe; P/Zn; Ca/Mn; Mn, Cu, Zn/Fe; Fe/P; Fe/Mn.

Synergism — K/Fe.

In these examples the first element of each pair (or above and below the line) has been observed to exercise an antagonistic or synergistic effect on the second.

SOIL ACIDITY EFFECTS

Soil acidity is a frequent cause of crop failures and of seriously reduced yields on many soils in various countries of the world where the rainfall is high. Whilst failures are generally related to soil pH, in examining particular instances in the field, it is of interest to analyse the possible causes of such failures in terms of mineral nutrition and in particular in relation to supplies of the oligoelements.

In general, on acid soils the supplies of the nutrient bases calcium, magnesium and potassium will usually be low, whilst nitrogen and phosphorus are also likely to be limiting to growth, the former as a result of the decreased activity of the bacteria that produce nitrates in the soil and the latter because of its reactions with iron and aluminium.

With regard to the oligoelements, supplies of iron, manganese, boron, copper and zinc all tend to become more soluble but molybdenum availability is decreased.

In addition, the element aluminium becomes more soluble, and together with manganese, may accumulate in soluble form in amounts toxic to many crops.

Finally, hydrogen ions are increased in the soil solution.

At Long Ashton we have attempted to make a « biological analysis » of these soil acidity effects [5 *a, b, c, d*] particularly in relation to deficiency effects of the elements calcium and molybdenum and toxic effects of manganese, aluminium and the hydrogen ion.

Using a number of crop plants, it has been shown that crops are differently affected by the various factors, some being particularly sensitive to calcium deficiency (e.g. potato), and others to excesses of manganese (e.g. Brassica species) and aluminium (e.g. celery, sugar beet) and deficiency of molybdenum (Brassicace and lettuce). Moreover, the various factors may interact; thus aluminium and hydrogen ions may intensify the effects of manganese toxicity in Brassicace.

The determination in this way of the specific factors causing the failures of the individual crops may in future lead to more efficient methods of treating susceptible crops on acid soils. Already molybdenum deficiency in cauliflower and legumes, which is a common cause of failure of these crops on acid soils, is often corrected by applying a few ounces of sodium molybdate per acre in preference to the more cumbersome practice of liming.

OLIGOELEMENTS IN SEEDS

Seeds are a rich source of oligoelements, and particularly when the seeds are large, such as peas and beans, or when tubers are used for propagation (e.g. potatoes), the contents of some of the oligoelements may be sufficient to prevent a serious deficiency during the first generation, when grown on soils deficient in these oligoelements. This question has been investigated for tomato, lettuce, Brassica crops (small seeds), peas and beans (large seeds) and potato (tubers) and the results clearly show the importance of the reserves in the large seeds and the tubers [6].

This point is not only of importance in determining satisfactory sources of seed for field crops, but must be given due attention in carrying out investigations designed to determine the essential nature of oligoelements for certain crops.

Voir la discussion à page 559

R E F E R E N C E S

- [1] ARNON D. I. and WESSEL GUNILLA (1953): *Vanadium as an essential element for green plants.* « Nature », 172, 1039.
- [2] BROWER T. C., CARLTON A. B., JOINSON C. M. and STOUT P. R. (1954): *Chlorine, a micronutrient for higher plants.* « Plant Physiol. », 29, 6, 256.
- [3] GOODALL D. W. and GREGORY F. F. (1947): *Chemical composition of plants as an index of their nutritional status.* Imper. Bureau of Hort. and Plantation Crops, East Malling; « Tech. Communication » No. 17.
- [4] WALLACE T. (1951): *The diagnosis of mineral deficiencies in plants by visual symptoms - a colour atlas and guide.* Her Majesty's Stationery Office, London.
- [5a] WALLACE T., HEWITT E. J. and NICHOLAS D. J. D. (1945): *Determination of factors injurious to plants in acid soils.* « Nature », 156, 778.
- [b] HEWITT E. J. (1946, 1947, 1948):
- [c] *The resolution of the factors in soil acidity I, II, III.*
- [d] « Ann. Report Long Ashton Research Station » for 1945, 51; 1946, 50; 1947, 82.
- [6] HEWITT E. J. and MILES P. (1953): *The effects of seed reserves on the production of deficiencies of copper, zinc and molybdenum in some large-seeded leguminous crops.* Ibid., 1952, 199.

IRON DEFICIENCY



FIG. 1 — Maize plants showing interveinal chlorosis.

Iron deficiency (contd.)



FIG. 2 — Sugar beet leaves - chlorotic mottling, most severe in young leaves.



FIG. 3 — Tomato leaflets - chlorotic mottling, most severe near base of leaflet.

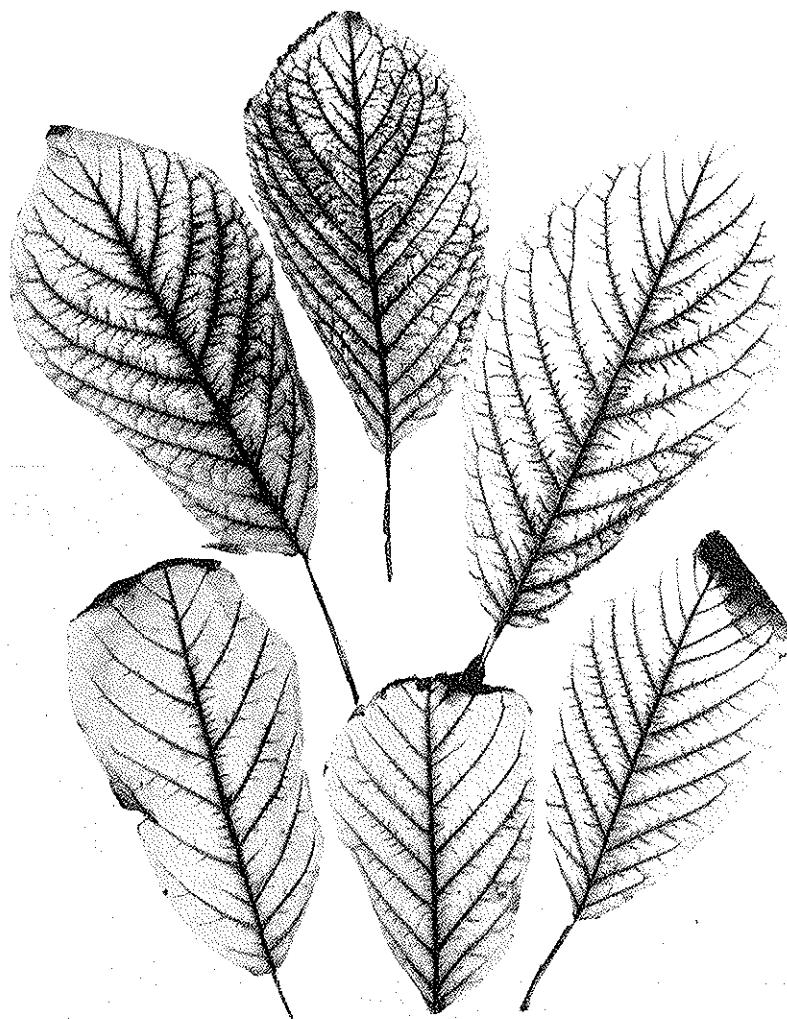


FIG. 4 — Sweet cherry leaves - severe chlorosis, fine sub-veins remain green in early stages; brown necrotic areas develop at margins.



FIG. 5 — Apple shoot - chlorosis severe in young leaves; vein pattern clearly outlined; older leaves may remain green.

MANGANESE DEFICIENCY

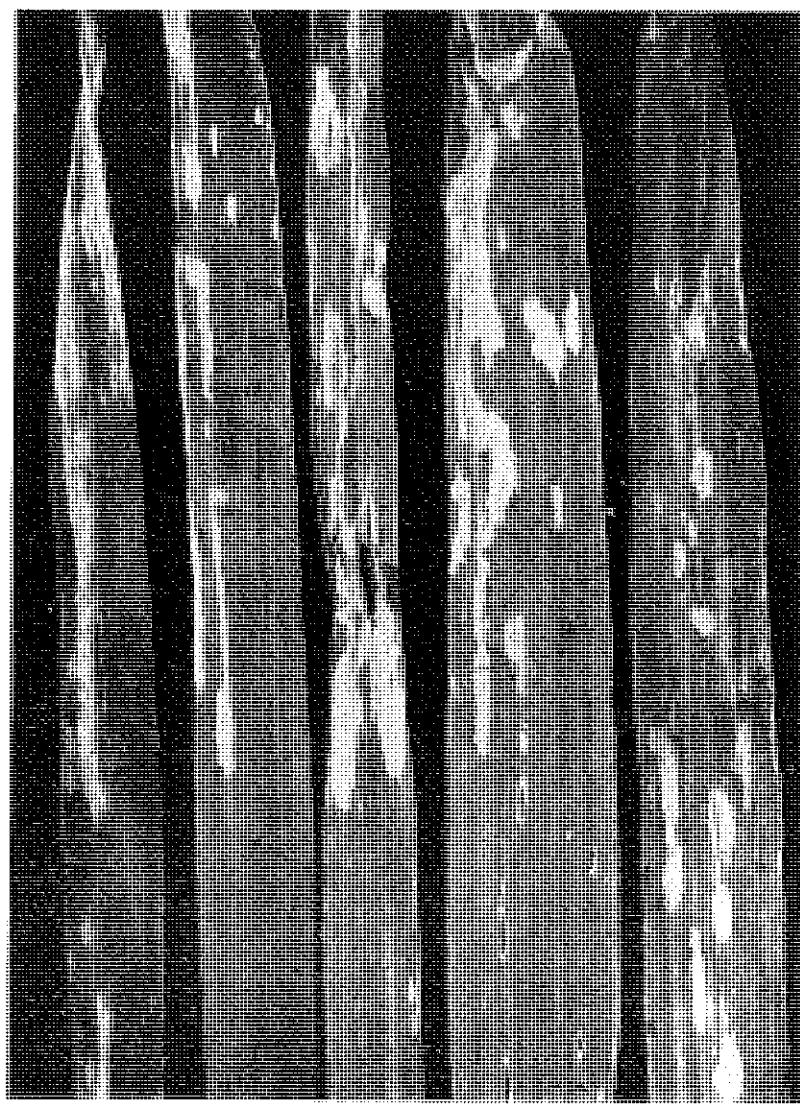


FIG. 6 — Oat leaves - chlorotic and necrotic blotches (« Grey Speck » condition).

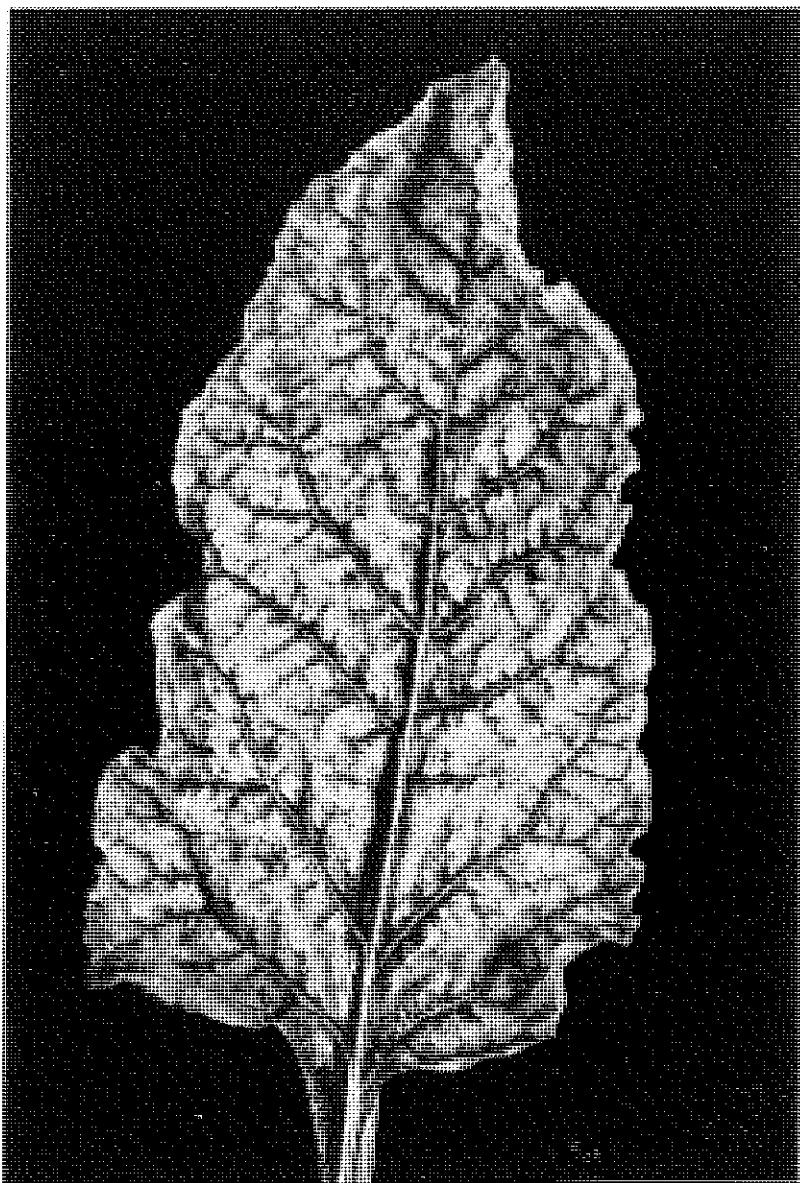


FIG. 7 — Sugar beet leaf - interveinal chlorosis followed by necrosis ("Speckled Yellows").

Manganese deficiency (contd.)

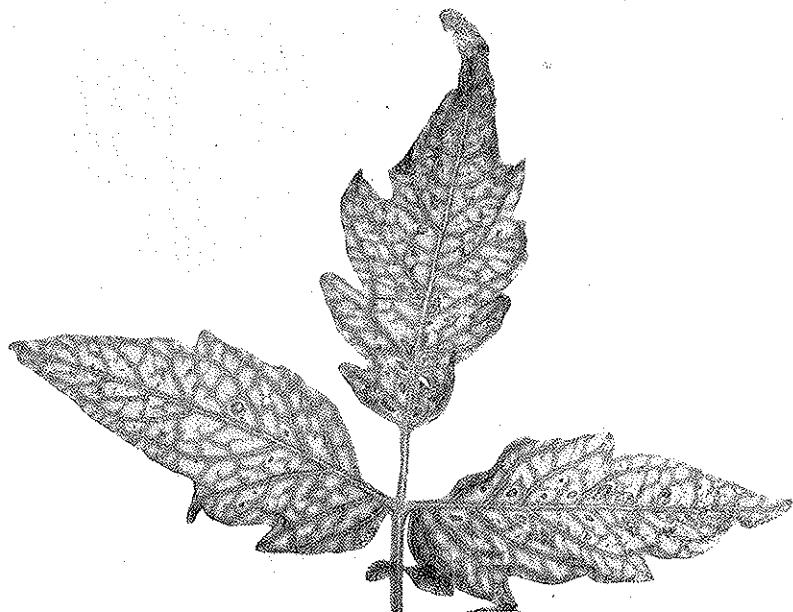


FIG. 8 — Tomato leaflets - interveinal chlorotic and necrotic speckles.



FIG. 9 — Legume seeds - Top, runner bean; middle, broad bean; bottom, pea.
Necrosis of cotyledons (« Marsh Spot » of pea).



FIG. 10 — Potato leaves - brown necrotic spots along veins.

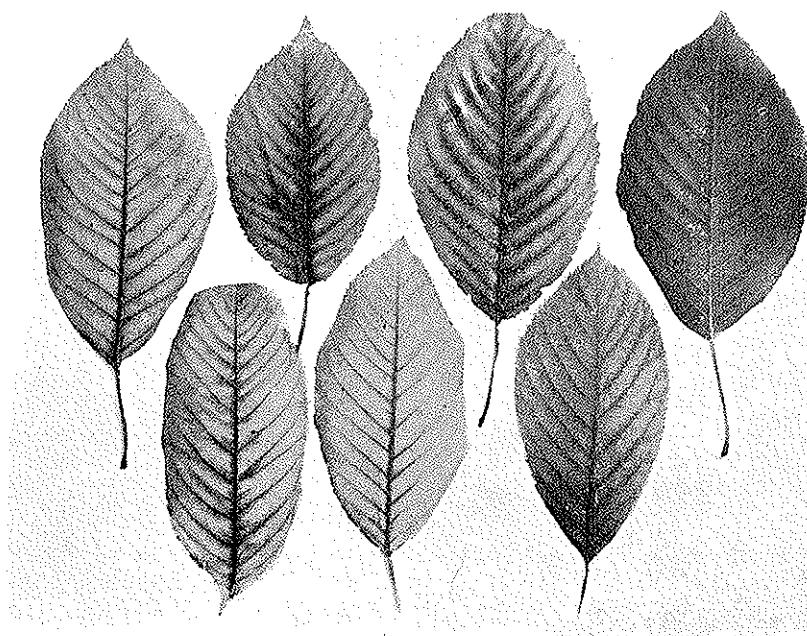


FIG. 11 — Sweet cherry leaves - interveinal chlorosis - Compare chlorotic pattern with that of iron deficiency in No. 4.

BORON DEFICIENCY



FIG. 12 — Barley plants - shoots are swollen and growing points die.



FIG. 13 — Broad bean - chlorosis of young leaves and death of growing points of shoots.



FIG. 14 — White clover plants - leaves highly tinted, reds and purples, and margins die; death of growing points.

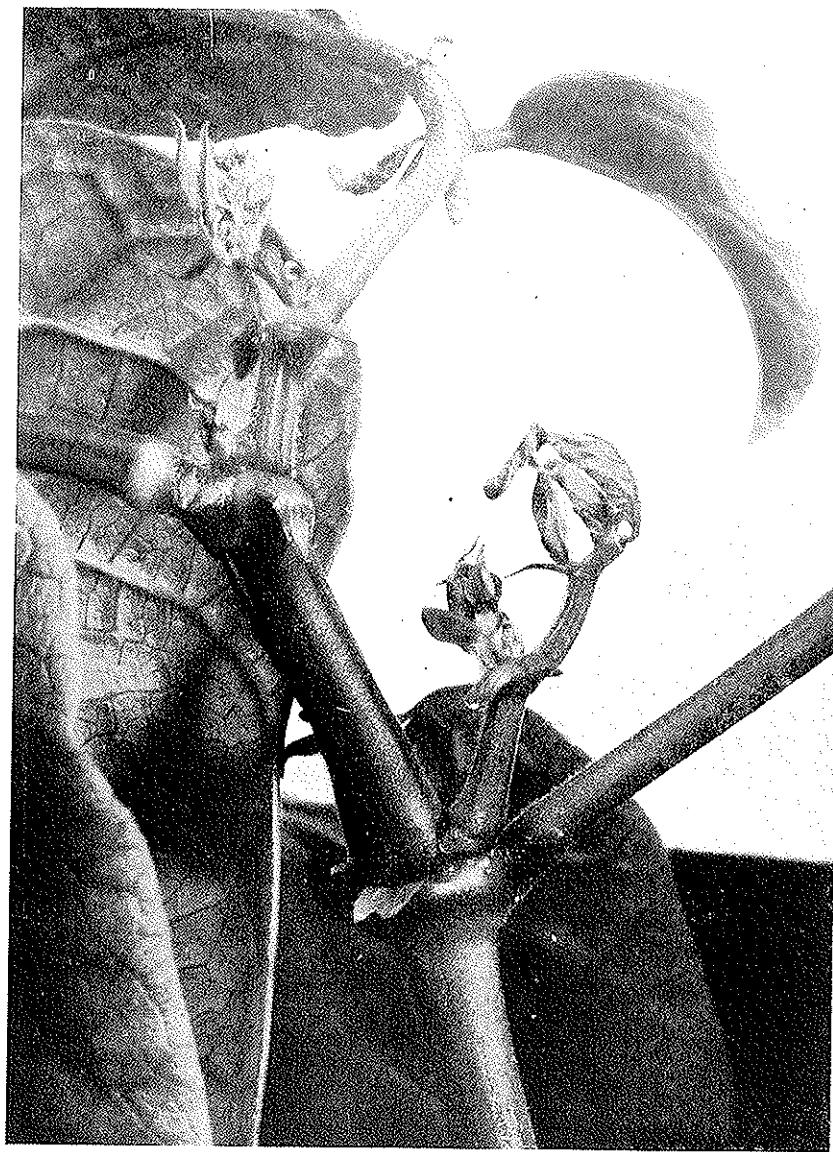


FIG. 15 — Runner bean plant - death of growing point of shoot.

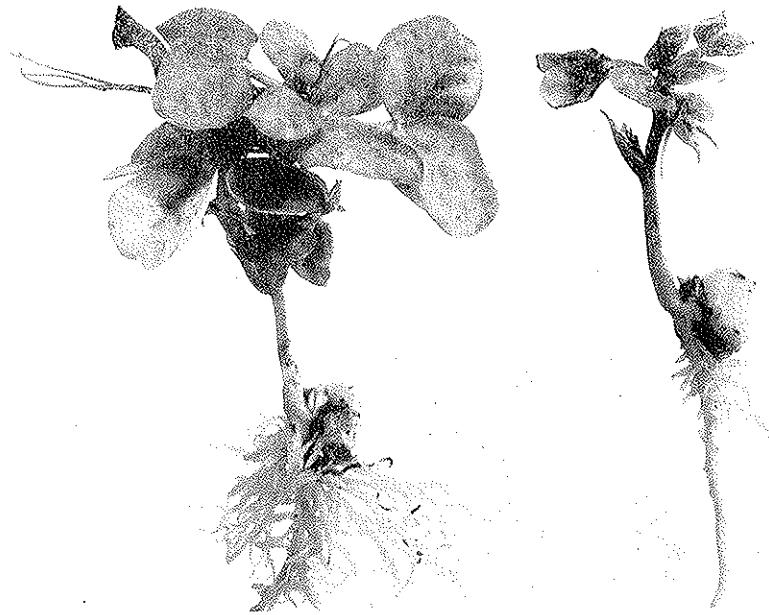


FIG. 16 --- Pea plants - plants remain squat and bushy due to death of growing points of shoots.



FIG. 17 — Parsnip leaves - laminae develop interveinal chlorotic mottling and petioles show "Cracked Stem" condition.

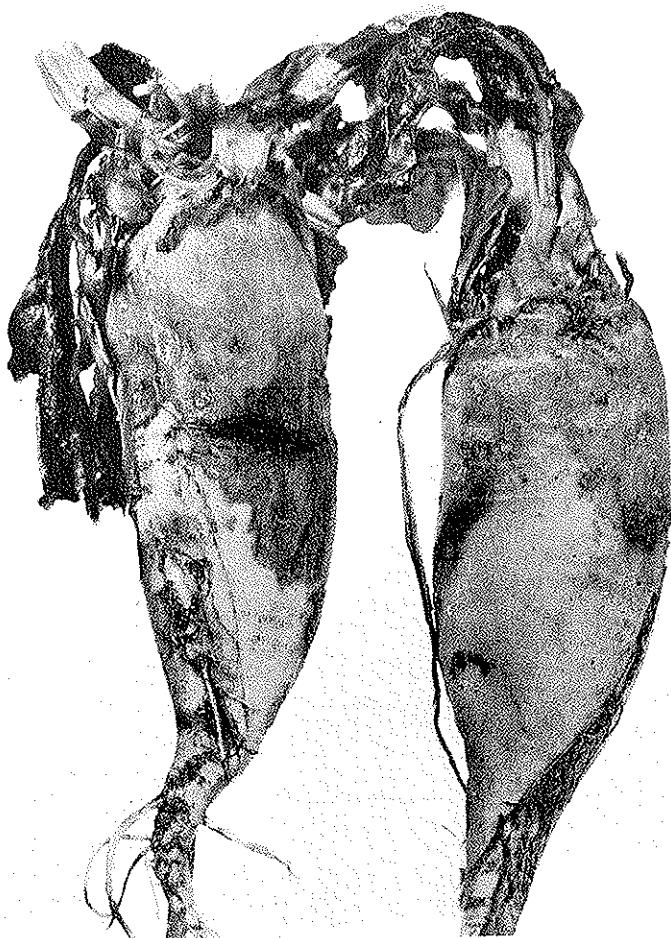


FIG. 18 — Mangold roots - older leaves die and young leaves eventually fail to develop; the roots develop «rots» at crowns and on sides.



FIG. 19 — Garden beet - leaves and growing point at crown die; roots develop black roots in external and internal tissues (condition known as "Canker").

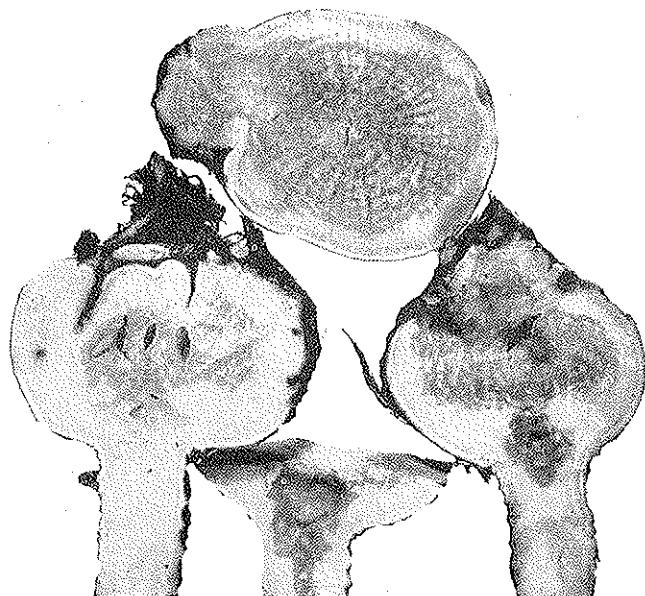


FIG. 20 — Turnip roots, cross sections - brown necrotic areas develop in the roots, often showing as concentric rings (condition known as « Raan »).

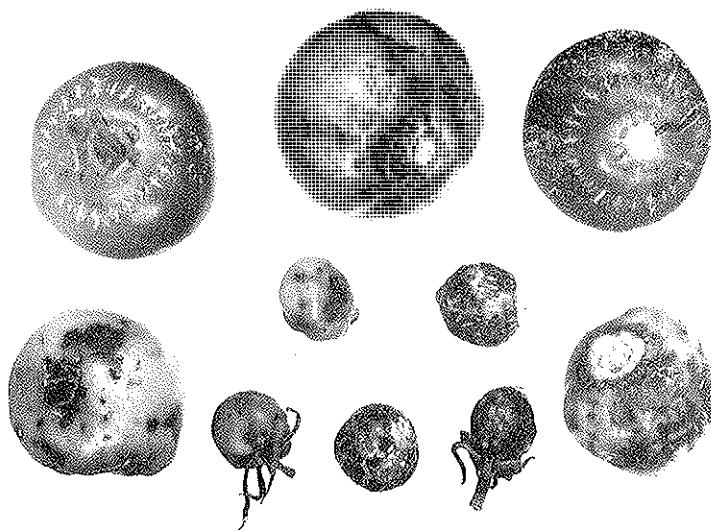


FIG. 21 — Tomato fruits - fruits are dwarfed and misshapen and show extensive cracking of the external tissues.



FIG. 22 — Apple fruits - fruits are misshapen and may show external « pitting » and skin russetting and cracking.

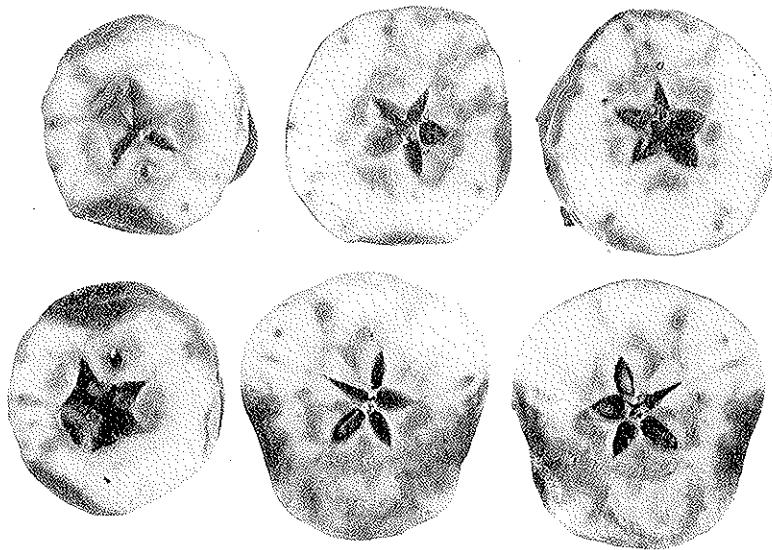


FIG. 23 — Apple fruits, cross sections - brown, corky areas develop in the cortex and core region (« Corky Core »).

COPPER DEFICIENCY



FIG. 24 — Wheat plants - deformed heads and chlorotic tips (Withertip of cereals); heads may fail to form.



FIG. 25 — Oat plants - excessive tiller formation, death of leaf tips and failure to form grain.

Copper deficiency (condt.)



FIG. 26 — Tomato plants - *Left*: with copper; *Right*: copper omitted. Deficient plants are squat in habit and growing points die.



FIG. 27 — Apple shoots - Tip defoliation, followed by die-back of shoots
(Summer Die-back).



FIG. 28 — Young pear tree - Tip defoliation and die-back of shoots.

ZINC DEFICIENCY



FIG. 29 — Flax plants - Progressive shortening of internodes leading to « rosetting » at tips; small leaves.

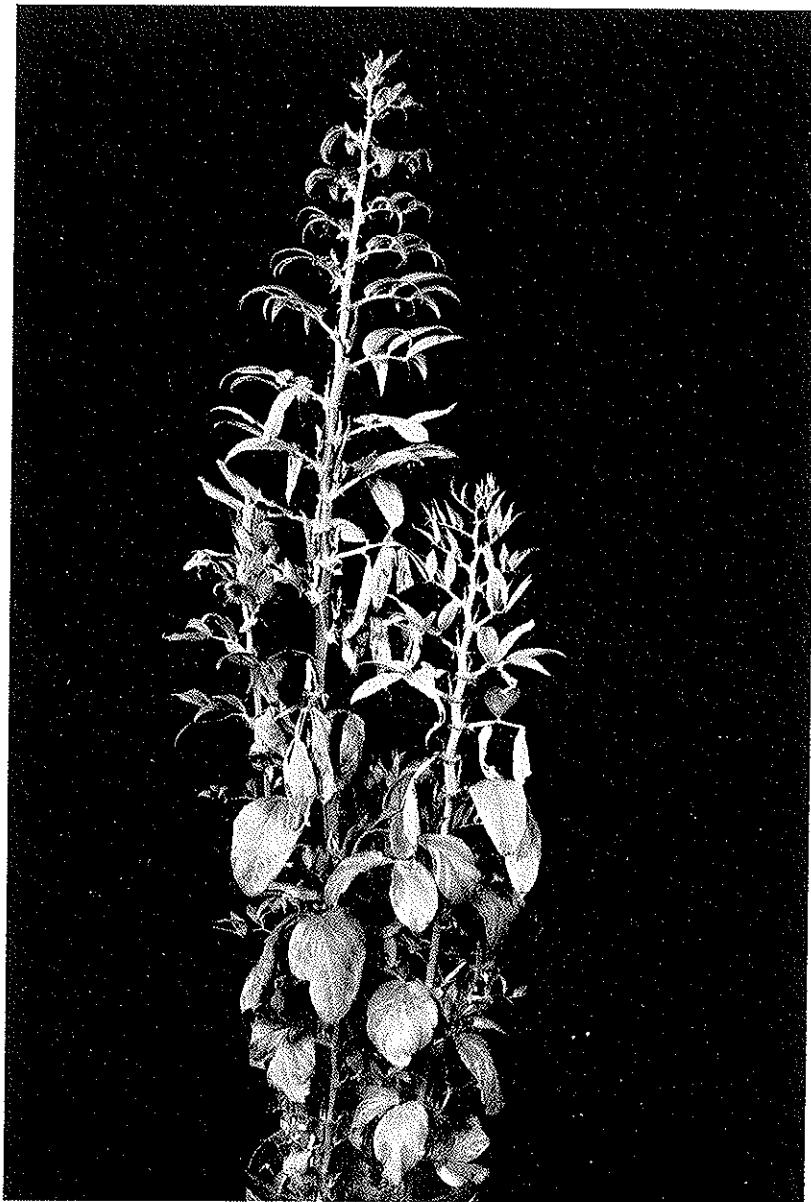


FIG. 30 — Broad bean plants - progressive shortening of internodes and decrease in leaf size.



FIG. 31 — Tomato plants - *Left*: with zinc; *Right*: zinc omitted. Deficient plants, spindly growth; purpling of leaves and necrotic areas.



FIG. 32 — Apple shoot - showing « rosetting » of spur leaves which are small and narrow (Little Leaf condition).



FIG. 33 — Apple tree - typical « Little Leaf » and « Rosette » condition. Branch on left with larger leaves has responded to a stem injection with zinc sulphate.

Zinc deficiency (condt.)



FIG. 34 — Apple fruits - *Left*: normal fruitlet; *Right*: dwarfed fruitlet due to zinc deficiency .



FIG. 35 — Pear foliage - small leaves show interveinal chlorosis.

MOLYBDENUM DEFICIENCY



FIG. 36 — Cauliflower - showing development of « Whiptail » condition at a late stage of growth.

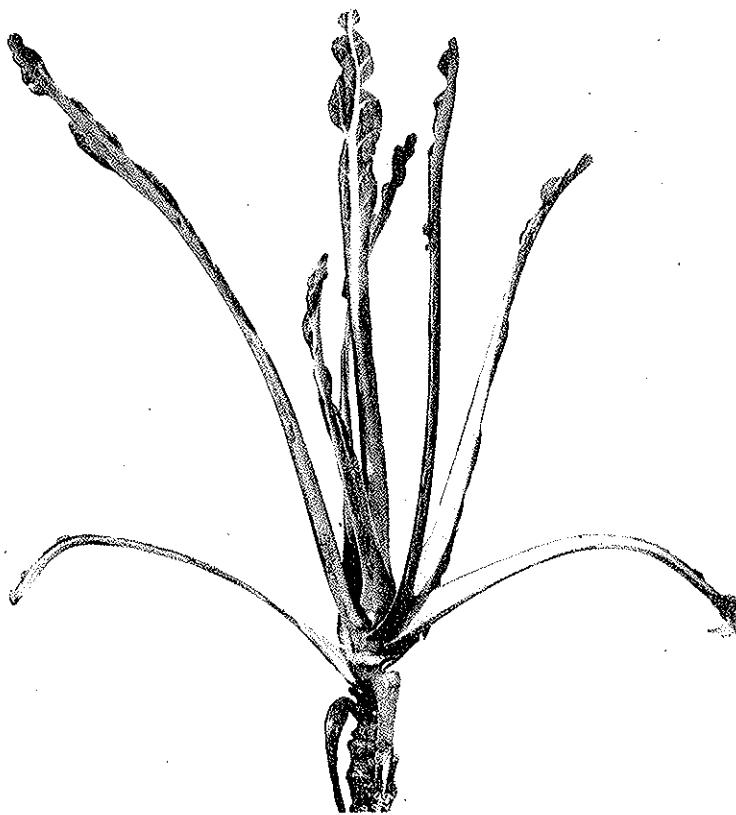


FIG. 37 — Cauliflower - severe deficiency, laminæ suppressed.



FIG. 38 — Brussels Sprout plant - terminal leaves show suppressed laminae.

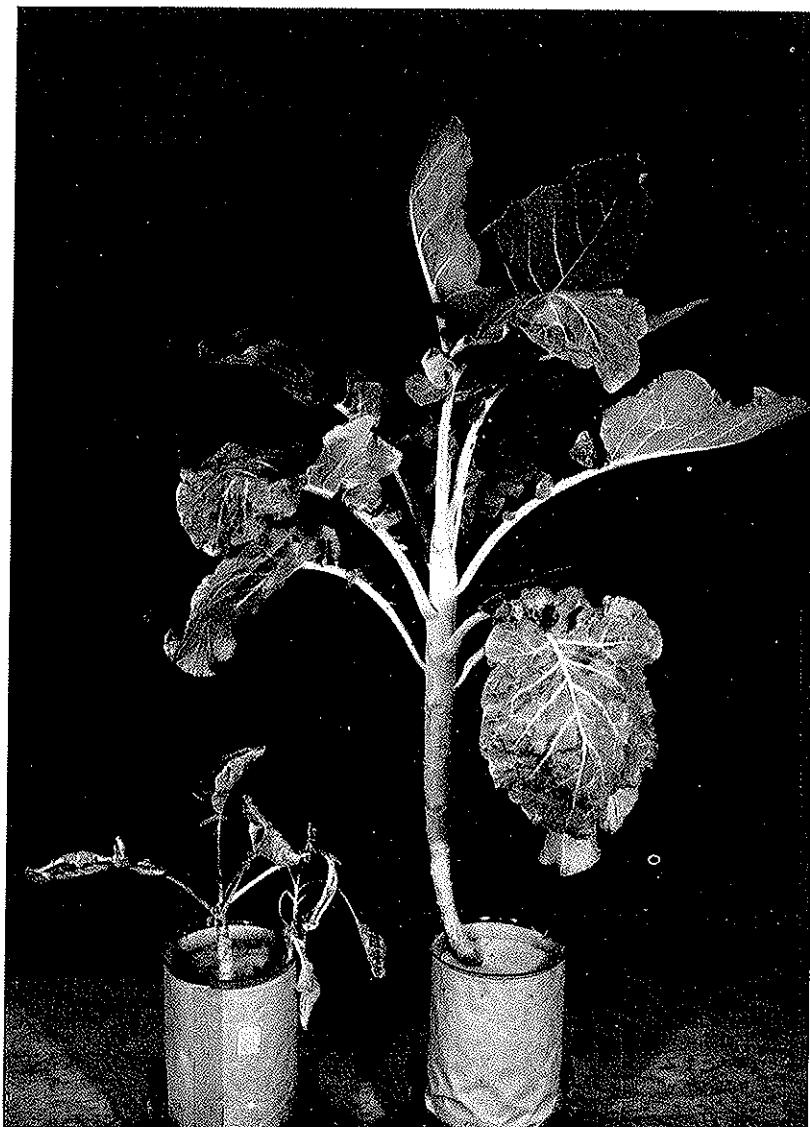


FIG. 39 — Marrow Steam Kale - *Left*: molybdenum omitted; *Right*: plant receiving molybdenum.

Molybdenum deficiency (condt.)



FIG. 40 — *Swede plants*: plants show chlorotic mottling and death of laminae.

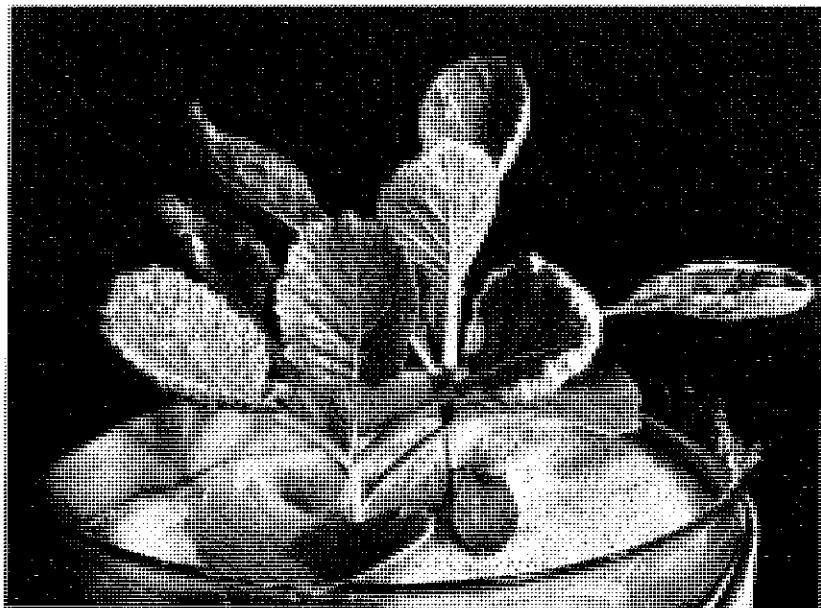


FIG. 41 — *Savoy plants* - plants show chlorotic mottling of leaves in early stages of the deficiency.

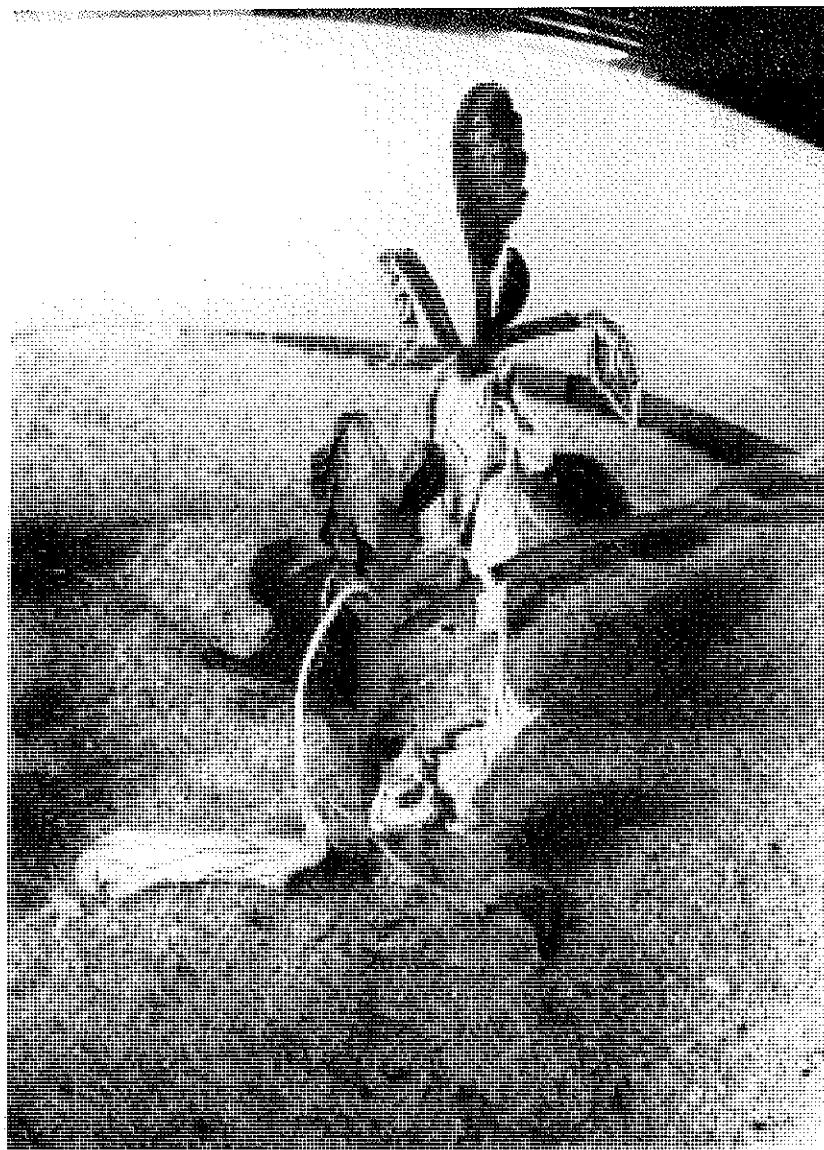


FIG. 42 — Young cauliflower plant, showing death of leaves.



FIG. 43 — Sugar beet, drying out of leaf laminae.

Molybdenum deficiency (condt.)



FIG. 44 — Lettuce. Field specimens: large plant given molybdenum; small plant, molybdenum omitted.



FIG. 45 — Tomato plants. Plant on right, severe molybdenum deficiency; plant on left, healthy growth following stem injection of a molybdenum salt.



FIG. 46 — Pea, dying of leaves.



FIG. 47 — Red clover: reduction in leaf size and dying of leaf tissue: healthy leaf on left.



FIG. 48 — White clover: reduction in leaf size and dying of leaf tissues: healthy leaf on left.



FIG. 49 — Lucerne: dying of leaf tissues.

DIE BEDEUTUNG DER MIKRONÄHRSTOFFE (OLIGO-ELEMENTE) FÜR DIE TIERERNÄHRUNG

K. SCHARRER

Auf Grund einer Vereinbarung des Verbandes Deutscher landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten ist man in Deutschland übereingekommen, jene Oligo-Elemente (Spuren-elemente), die für die tierische bzw. pflanzliche Ernährung nach unserem heutigen Wissen lebensnotwendig sind, jeweiliig mit dem Ausdruck « Mikronährstoffe » zu bezeichnen.

Für die Pflanze ist nach dem heutigen Stand der Forschung die Anwesenheit von Bor, Kupfer, Mangan, Zink und Molybdän im Nährsubstrat lebensnotwendig und die genannten Elemente sind daher für die pflanzliche Ernährung « Mikronährstoffe ». Soweit wir heute wissen, sind für den tierischen Organismus Kobalt, Kupfer, Mangan, Zink, Eisen, Brom, Fluor und Jod Bioelemente. Die Anwesenheit von Kobalt, Jod, Fluor und Brom in den Pflanzen ist somit für die tierische Ernährung lebenswichtig, für die pflanzliche Ernährung jedoch gegenstandslos; der Gehalt der Pflanzen an den genannten Elementen ist aber deshalb nötig, weil diese dadurch aus dem Boden der tierischen und menschlichen Ernährung zugeführt werden können.

Kobalt. Im australischen Schrifttum sind zuerst Beobachtungen über eine eigenartige Weidekrankheit bei Rindern und Schafen erschienen und ähnliche Erkrankungen sind auch in Neuseeland beobachtet worden, worüber vor allem ASKEW und DIXON des Cawthron-Institutes in Nelson auf Neuseeland berichteten. Schon im Jahre 1933 ist in Denmark, einem Landstrich in der Nähe der

Südwestküste Australiens, eine bis zu diesem Zeitpunkt unbekannte Weidekrankheit aufgetreten, die man « Denmark Wasting disease » bzw. « Enzooting Marasmus » nannte. Um dieser Krankheit zu entkommen, begann man weiteres Neuland zu kultivieren; bald aber trat auf den neugewonnenen Flächen die gleiche Krankheit auf, und zwar in einem derartigen Umfang, dass die Milchwirtschaft in den betreffenden Gebieten schwer darunter litt. Die Erkrankung äussert sich im raschen Abmagern des Viehs, starker Beschleunigung der Herz- und Atemtätigkeit, Rückgang der Milchleistung, Ausbleiben des Rinderns, Frühgeburten und Todesfällen. Im allgemeinen werden die Kühe unmittelbar nach dem Kalben besessen; am häufigsten erkrankten jedoch 6-8 Monate alte Kälber, ferner Schafe in jedem Alter. Das erkrankte Vieh zeigt abnorme Geschmacksgelüste und frisst mit Vorliebe Rinden und Zweige. Als Heilmittel für diese Krankheit wurde Limonit benutzt; doch stellte sich bald heraus, dass das Eisen dabei keine Rolle spielt. Schliesslich zeigte sich, dass die Heilwirkung des Limonits nur auf das darin enthaltene Kobalt zurückzuführen ist. Die Krankheitserscheinungen beruhen somit auf einem Mangel an Kobalt im Futter. In Neuseeland wird kobalthaltiges Lecksalz (2 mg Kobaltschlorid je Tier und Tag) den Tieren gereicht, bzw. den Düngemitteln Kobaltschlorid oder Sulfat zugesetzt, somit die Weiden und Wiesen systematisch mit Kobalt gedüngt. Die Untersuchung der Weideböden, auf denen die Erkrankung aufzutreten pflegt, ergab nur äusserst geringe Mengen an Kobalt im Boden (2 Teile auf 1 Million Bodenteile).

Die geschilderten Krankheitserscheinungen wurden später auch in vielen anderen Teilen Australiens, aber auch in Schottland festgestellt. Ähnliche Erkrankungen der Tiere sind in England beobachtet worden, wobei wiederum gefunden wurde, dass die Böden jener Gebiete, in denen die Tiere gesund blieben, einen höheren Kobaltgehalt aufweisen als jene, auf denen die Tiere erkrankt sind. Auch in Kanada wurden Schafe, die Mängelercheinungen zeigten, durch Kobalt geheilt.

Die physiologische Bedeutung des Kobalts ist weitestgehend dadurch geklärt worden, dass es als ein wesentlicher Bestandteil des Vitamins B_{12} erkannt wurde. Ferner fördert es die Pansengärung

und die Synthese der Vitamine der B-Gruppe. Das Blut weist ständig eine gewisse Konzentration an Kobalt auf.

Die normale Erythropoese hängt von einer entsprechenden Menge Thymonucleinsäure ab, deren Synthese durch Vitamin B₁₂ katalysiert wird. Bei langdauernder Zufuhr von Kobalt treten die Erscheinungen einer Polycythaemie auf. Kobalt scheint ein starker Aktivator der Erythropoese zu sein, wobei jedoch seine Wirkung wohl nicht durch eine verstärkte Bildung von Vitamin B₁₂ und dadurch erhöhte Synthese der Thymonucleinsäure erklärt werden kann; denn sonst würden Leberextrakte und Vitamin B₁₂-Gaben die gleiche Wirkung bei hypochromer Anämie erzeugen. Es scheint sich somit um einen unmittelbaren Reiz auf die cytopoetische Funktion des Knochenmarks zu handeln. Vielfach scheint der Knochenmarkkreis des Kobalts dem des Eisens überlegen zu sein. Auch auf die Hämoglobinsynthese übt das Kobalt einen wesentlichen Einfluss aus. Es dürfte die Ausnützbarkeit des verfügbaren Eisens verbessern.

Der Stoffwechsel des Kobalts im tierischen Organismus wurde bereits weitestgehend studiert. Peroral verabreichtes Kobalt wurde zu 18% in den Fäces, aber nur in sehr geringen Mengen im Harn ausgeschieden. Injiziertes Kobalt erschien zu 62% im Harn, der Rest in den Fäces. Parenteral einverleibtes Kobalt war in allen Organen und Geweben zu finden, besonders aber in den Nebennieren, der Schilddrüse, Leber, im Thymus und Pankreas. Die Konzentration im Pankreas war ungefähr ein Viertel derjenigen in der Leber und doppelt so gross wie in der Milz. Im roten Knochenmark war sie ungefähr die Hälfte wie in der Milz und dreimal so gross wie im weissen Knochenmark.

Der Kobaltgehalt der Mikroorganismen im Pansen der Wiederkäuer wurde als ziemlich hoch gefunden; für die Mikroorganismen scheint dieser Kobaltgehalt in erster Linie wesentlich zu sein und wohl erst mittelbar für den Wiederkäuer selbst. Möglicherweise werden daher die bekannten Kobaltnangelerscheinungen an Haustieren primär auf einen Kobaltnangel der Pansenflora zurückzuführen sein; haben die Mikroorganismen nicht genügend Kobalt, dann werden den Haustieren keine Kobaltmengen zur Verfügung stehen.

Zum Unterschied von den Wiederkäuern benötigen die Nichtwiederkäuer relativ sehr wenig Kobalt im Futter, weil die Mikroorganismen des Pansens nicht mit Kobalt versorgt werden brauchen.

Während normale Milch 0,6 Gamma Kobalt/Liter enthält, wurden in der Milch der mit Kobalt gefütterten Tiere 2,4 Gamma Co/L festgestellt; es wird somit bei Verfütterung von Kobaltverbindungen an Milchkühe eine wesentliche Erhöhung des Kobaltgehaltes der Milch ermöglicht.

Die schon erwähnte, in Australien häufig vorkommende Ernährungsstörung bei Schafen und Kühen, auch « Coast disease » genannt, ist das Ergebnis eines Kobalt- und Kupfermangels. Bei alleiniger Verabreichung des Kobalts tritt auf die Dauer Kupfermangel auf; die Lämmer, die weder Kobalt noch Kupfer bekommen, sterben innerhalb eines Jahres, ebenso die mit alleiniger Kupfergabe ohne Kobalt. Gesund bleiben jene Tiere, die täglich 1 mg Co und 10 mg Cu erhalten. Der Gehalt an Nikotinsäure und Adermin im Blut von Kobaltnangelschafen ist geringer als bei normalen Tieren. Folsäure und Pantothensäure sind in beiden Gruppen in gleicher Menge vorhanden, Riboflavin ist bei den Mangeltieren in geringerem Ausmaße anwesend.

Auch in Dänemark treten Kobaltmanglerscheinungen auf, und zwar in Jütland, nicht aber auf den dänischen Inseln. Die Tiere zeigen Abmagerung und Kachexie. Man führt diese Mängel auf das Fehlen von Ölkuchen während des Krieges zurück. Ebenso wurden in Norwegen und Schweden Kobaltmanglerscheinungen an Tieren beobachtet, hauptsächlich in Küstendistrikten auf leichten sandigen Böden.

Böden von alten geologischen Formationen zeigen weniger oft Kobaltnangel als solche jungen geologischen Ursprungs. In niederschlagsreichen Jahren treten Manglerscheinungen stärker als in trockenen auf. Kobaltmangelböden enthalten 0,1-1,5 mg Co/kg, auf Bodentrockensubstanz bezogen, im Durchschnitt 0,6 mg Co/kg. Genügend Kobalt scheinen die Böden mit etwa 10 mg Co/kg Trockensubstanz zu besitzen. Auch in Gras und Heu von Mangelböden und gesunden Böden sind starke Unterschiede vorhanden. SVANBERG vertritt den Standpunkt, dass 0,06 mg Co im kg Futter, auf Trok-

kensubstanz bezogen, genügen, um die Schafzucht vor Verlusten zu schützen, während für Rinder 0,03 mg Co/kg in der Futtertrockensubstanz das Minimum darstellt. Reich an Kobalt sind Ölküchen, Rüben, Rübenblätter und Klee, arm dagegen Getreidekörner und Getreidestroh, weshalb auch starke Fütterung mit Getreide leicht Kobaltmangel erzeugt. Die Asche von Zweigen und Blättern junger Bäume, sowie Heulaub verschiedener Laubbäume sind gute Kobaltquellen. Durchweg kann beobachtet werden, dass nur Rinder und Schafe an Kobaltmangel leiden, nicht aber Pferde, deren Kobaltbedürfnis sehr gering zu sein scheint. Kühe werden meist nach dem Kalben befallen, wobei die Milchleistung absinkt und das Rindern ausbleibt. Schafe erkranken in jedem Alter; bei Lämmern zeigt sich ungenügende Entwicklung, Appetitlosigkeit und früher Tod. Ältere Tiere haben abnorme Geschmacksgelüste, das Wollkleid ist rauh, das Gesicht eigenartig grau gefärbt. Nach zunehmender Schwäche und Abmagerung tritt vielfach der Tod ein. Ständiger Begleiter des Kobaltmangels ist Anämie mit starker Verminderung der Erythrocyten und des Hämoglobins. Bei Schafen wurde vielfach fettige Leberdegeneration beobachtet. Parenterale Kobaltgaben beeinflussen zum Unterschied von peroralen die Krankheit nicht; diese Tatsache lässt darauf schliessen, dass, wie schon erwähnt, die Pansenbakterien durch Kobalt beeinflusst werden.

Wird der Boden mit Kobalt gedüngt, so zeigt sich vielfach eine deutliche Zunahme im Molybdängehalt des Futters, der schädlich wirken kann. Die Gefahr einer zunehmenden Aufnahme von Molybdän nimmt mit steigender Bodensäure ab. Durch Kupferdüngung kann diese schädliche Wirkung des Molybdäns paralysiert werden.

Neuere Forschungen haben ergeben, dass es sich bei der perniciösen Anämie des Menschen nicht um eine Kobaltmangelkrankheit handelt, da die tägliche Kobaltaufnahme bei einigermassen normaler Ernährung etwa 100 Gamma beträgt. Somit ist die perniciöse Anämie des Menschen, die übrigens beim Tier kaum vorkommt, nicht den Kobaltmanglerkrankungen der Tiere gleichzusetzen.

Die Böden Schwedens sind, wie schon erwähnt, im allgemeinen arm an Kobalt, was zur Folge hat, dass auch das Heu und das Weidefutter sehr wenig Kobalt enthalten, nämlich meist weniger als

0,01-0,03 p.p.m. Auch das Grünfutter des Feldfutterbaues zeigt sehr niedrige Kobaltwerte. Wegen der im allgemeinen geringen Aufnahme des Bodenkobalts durch die Pflanze und bei der langen Zeit der Winterfütterung in Schweden ist man dort dazu übergegangen, das Kobalt nicht über den Weg der Düngung den Tieren zu verabreichen, sondern mineralischen Futtermitteln beizugeben; meist verwendet man zu 100 kg phosphorsaurem Futterkalk 20 g Kobalsulfat und verabreicht von dieser Mischung 100-200 g, also 5-10 mg Co je Tier.

Auch in Deutschland ist Kobalmangel in jüngster Zeit festgestellt worden, und zwar sowohl in Schleswig-Holstein wie auch im Schwarzwald. Besonders RIEHM und Mitarbeiter haben eine Art Lecksucht, die in manchen Gegenden des Schwarzwaldes auftritt und als Semper- bzw. Hinschkrankheit bezeichnet wird, als Kobalmangelerkrankung erkannt. Die Hinschhöfe liegen meist auf Granit, dessen Kobaltgehalt bedeutend niedriger als der von Buntsandstein und Porphyrr ist. Der nach der Laktatmethode festgestellte pflanzenaufnehmbare Kobaltgehalt der Böden der Hinschhöfe betrug kaum ein Drittel des normalen Gehaltes und auch der Kobaltgehalt des Heues in den kranken Betrieben war nur etwa ein Drittel des Gehaltes im Heu der gesunden Höfe. Beim Kobaltgehalt des Grünfutters ergaben sich ähnliche Unterschiede. Durch Kobaltbeifütterung gesundeten die Tiere der kranken Betriebe. Der genannte Forsscher fand, dass Kobalt ein Bestandteil der Rübenmelasse ist. Da der tägliche Bedarf eines erwachsenen Tieres 1 mg Co beträgt und in der Melasse Kobaltgehalte von 0,6 mg Co/kg gefunden wurden, genügt somit eine tägliche Beifütterung von 1-2 kg Melasse zur Kobaltversorgung der Tiere.

Das Studium der sogenannten « Semper-Krankheit » an Rindern im Hochschwarzwald durch HÄFELE ergab, dass diese Ernährungsstörung ebenfalls auf einen Mangel an Kupfer und Kobalt und ein Übermass an Molybdän zurückzuführen ist. Starker Mangan- und Molybdängehalt des Futters erzeugt Darmkatarrhe, Mangel an Kobalt Anämie. Die Semperkrankheit ist somit im Wesentlichen identisch mit der Hinschkrankheit.

Wie LAATSCH feststellte, kann die Kobaltnährung der Weidepflanzen in Schleswig-Holstein durch Thomasphosphat auf normaler Höhe gehalten werden. Dieses Düngemittel enthält etwa 4 p.p.m. Co, so dass in 3 dz Thomasphosphat etwa 1,2 g Co enthalten sind. Allerdings wird diese Massnahme nur dort ein kobaltreiches Futter hervorbringen, wo bereits der Kobaltvorrat der Weiden als normal bezeichnet werden kann, so dass durch Thomasphosphat nur der jährliche Kobaltentzug ersetzt wird.

SVANBERG berichtet über Erfolge in Schweden in der Bekämpfung der Acetonämie bei Milchkühen durch Verfütterung eines Gemisches von Kobalt, Kupfer und Mangan. In einer Dissertation der Veterinärmedizinischen Fakultät Giessen wurde gezeigt, dass bei Kühen eine akute Vaginitis durch gleichzeitige Gaben von Calcium und eines Gemisches von Kobalt, Kupfer, Mangan, Jod und Zink per os geheilt werden konnte. Unfruchtbarkeit bei Kühen wurde durch ein Gemisch von Kobalt, Kupfer, Mangan, Jod und Zink per os teilweise oder völlig behoben.

Kupfer. Während, wie schon NÄGELI zeigte, Kupfer eines der heftigsten Gifte für Bakterien, Algen und Pilze darstellt (oligodynamische Wirkung), wirkt dieses Element im tierischen Organismus erst in relativ hoher Konzentration giftig.

Bei Krebstieren und Mollusken enthält das schwach bläuliche Blut einen kupferhaltigen Farbstoff, das Hämocyanin, in dem das Kupfer die gleiche Rolle wie das Eisen im Blut der Wirbeltiere spielt. Auch der Flügelfarbstoff der tropischen Bananenfresser (Turacovögel), das Turacin, ist ein kupferhaltiges Porphyrin. Neben dem roten eisenhaltigen Hämoglobin enthält das menschliche Blut in ganz geringen Mengen eine Kupfer-Eiweissverbindung, das Hämodcuprein, das sich in blau-grünen Kristallen gewinnen lässt.

Kupfer ist ein Bestandteil verschiedener Oxydasen, z.B. der Tyrosinase und der Kartoffeloxydase, die ein Kupferprotein darstellt. Das Hauptspeicher- und Stoffwechselorgan für das Kupfer scheint die Leber zu sein und auch die Galle ist als Sekret der Leber stets kupferhaltig. Im Hühnerei und in der Milch kommt regelmässig Kupfer vor, unabhängig vom Kupfergehalt der Nahrung.

Einen bedeutsamen Fortschritt unserer Kenntnisse über die Biochemie des Kupfers haben die Arbeiten von HEILMEYER gebracht, der bewies, dass dem Kupfer im Blutplasma eine wesentliche Bedeutung zukommt; er zeigte, dass es ständig in einer ganz bestimmten Konzentration darin enthalten ist, die gegenüber äusseren Einflüssen konstant bleibt. Im Rahmen der Abwehrvorgänge des Organismus tritt eine Zunahme des Serum-Kupfers bei Infektion oder Giftabwehr ein. Der genannte Forscher bezeichnet Kupfer und Eisen neben Hormonen, Vitaminen und Antikörpern als körpereigene Wirkstoffe. Die Konzentration des Kupfers im Blutplasma liegt beim Menschen und beim Pferd etwa bei 10^{-6} g/ccm. Für die Erythrocytenbildung und Hämoglobinsynthese scheint es eine katalytische Funktion auszuüben. Bei Geisteskrankheiten, insbesondere bei der Schizophrenie, tritt eine zum Teil hochgradige Vermehrung des Serum-Kupfers ein. Den Mittelpunkt des Kupfer-Stoffwechsels des Organismus bildet die Leber, die für Kupfer ein Hauptspeicherungsorgan ist und die Abgabe an das Blut regelt. Daher tritt bei Schädigung der Leber eine Vermehrung des Serum-Kupfers ein. Neben diesem Organ besitzt die Schilddrüse einen Einfluss auf das Plasma-Kupfer und Steigerung von deren Funktion führt als Folge der Zunahme des Gesamtstoffwechsels zu einer Erhöhung der Kupferkonzentration im Blut.

Vielfach treten Mangelerscheinungen an Kupfer in der tierischen Ernährung dort auf, wo ähnliche Anzeichen bei der pflanzlichen Ernährung zu beobachten sind. Bekanntlich wird Kupfer in der Praxis der Landwirtschaft zur Bekämpfung der Urbarmachungs-krankheit oder Heidemoorkrankheit angewandt; das Hauptverbreitungsgebiet dieser Mangelerscheinungen ist auf stark podsolierten Böden zu finden. Die Heidemoorkrankheit ist besonders in Nord- und Nordwestdeutschland, Dänemark und Holland, aber auch in anderen Ländern Europas und in Übersee ausserordentlich stark verbreitet und wird durch Kupfermangel hervorgerufen. Auf solchen heidemoorkranken Böden pflegt das Vieh an eigenartigen leck-suchähnlichen Mangelerscheinungen zu erkranken. Besonders in den Niederlanden wurden diese Mangelerscheinungen von SJOLLEMA studiert und durch Verfütterung von Kupfer in Form von Kupfersulfat geheilt ($1/3$ bis $1/2$ g Kupfersulfat per os je Tier und Tag).

Heute werden meist solche Kupfermangelerscheinungen der Pflanzen durch Düngung der betreffenden Böden mit 50-150 kg Kupfersulfat/ha oder kupferhaltigen Schlacken bzw. Abfällen der Metalle verarbeitenden Industrien geheilt; meist verschwinden dann auch die leksuchtartigen Kupfermangelerscheinungen bei den Tieren. Während in leksuchtkranken Betrieben der Kupfergehalt des Heues etwa 2-3 mg Cu/kg beträgt, zeigt das Heu von gesunden Wirtschaften einen Gehalt von 6-12 mg Cu/kg. Es zeigte sich, dass die Heideböden in Schleswig-Holstein, in der Umgebung von Bremen und in Oldenburg besonders arm an Kupfer sind. Die Leksucht des Rindes ist in diesen Gebieten, besonders auf den leichten Böden des Mittelrückens von Schleswig-Holstein, weit verbreitet. Bei Erkrankung geht ein grosser Teil der Tiere ein. Die erkrankten Tiere magern stark ab und verweigern die Futteraufnahme. Vornehmlich werden Kälber und Jungvieh, aber auch Milchkühe betroffen. Selbstverständlich muss mit Nachdruck betont werden, dass die Krankheiterscheinungen, die man mit Leksucht bezeichnet, ein komplexer Begriff sind und daher die Ursachen der Leksucht in den verschiedenen Gebieten nicht die gleichen zu sein brauchen. Nicht bei jeder Form der Leksucht sind daher Kupferverbindungen unbedingt ein Heilmittel.

Über den Kupferstoffwechsel wurde an der John Hopkins Universität Baltimore im Juni 1950 ein Symposium abgehalten, dessen wesentliche Diskussionsthemen im folgenden kurz erläutert werden. Um die Bedeutung der Mikroelemente im Stoffwechsel zu studieren, muss man entweder die Erscheinungen beobachten, die beim Mangel der betreffenden Elemente auftreten, oder die Enzyme auf die jeweiligen Elemente untersuchen. Von den Enzymen, die Kupfer enthalten, sind besonders Ascorbinsäure-Oxydase, p-Phenylendiamin-Oxydase, Polyphenol-Oxydase und Tyrosinase zu erwähnen; falls das Kupfer aus diesen Proteiden entfernt wird, geht ihre enzymatische Kraft verloren. Am eingehendsten sind bisher von den kupferhaltigen Enzymen die Polyphenol-Oxydasen untersucht worden; alle diese Enzyme übertragen molekularen Sauerstoff. Das Pro-Keratin der Schafwolle scheint durch Kupfer in das eigentliche Keratin verwandelt zu werden, indem die Sulfhydryl-Gruppe in das

Sulfid umgewandelt wird. CARTWRIGHT zeigte, dass die Leber für Kupfer das Hauptspeicherorgan darstellt, hierauf folgt die Niere. Er stellte fest, dass der Organismus des ausgewachsenen Menschen 100-150 mg Gesamtkupfer enthält; die Hauptmenge ist in den Muskeln, im Knochensystem und der Leber gestapelt. Er isolierte ein neues blaugefärbtes Kupferprotein, das Caeruloplasmin, das 90% des Serum-Kupfers enthält. Zur Erreichung des Kupfergleichgewichts ist eine Aufnahme von 2 mg Kupfer/Tag nötig. Bei akuten und chronischen Infektionen wird Kupfer bei Menschen im Blut und in den Zellen angereichert, ebenso bei Leukämie; bei Gravidität oder Krebs-erkrankung nimmt es nur im Plasma zu. In den Speicherorganen, vor allem in der Leber, nimmt Kupfer bei malignen Krankheiten, Tuberkulose und Lebercirrhose zu, bei gewöhnlichen Anämien ab. Die Ursache dieser Veränderungen ist bisher unbekannt.

Gegenüber zu geringer Zufuhr von Kupfer sind besonders Schafe sehr empfindlich. Erhalten sie weniger als 2-4 mg Cu im Tag, so ist Senkung des Blutspiegels auf 1/3 des normalen festzustellen und bei noch geringerer Zufuhr zeigt sich schlechte Keratinausbildung der Wolle. Kälber enthalten 4-8 mal mehr Kupfer in der Leber als erwachsene Schafe; während der Saugperiode sinkt dieser Kupfergehalt infolge des geringen Kupfergehaltes der Milch erheblich ab, obwohl junge Kälber noch eine stärkere Fähigkeit besitzen, Kupfer in der Leber festzuhalten als ältere Tiere. Falls die Konzentration des Kupfers in der Leber der Mutterschafe unter 10 Gamma je 10 g Trockengewicht absinkt, zeigen die neugeborenen Lämmer nervöse Krämpfe, manchmal auch rachitische Erscheinungen und Anämie.

Sehr interessant sind die Beziehungen zwischen Kupfer und Molybdän. Dort wo die Tiere grössere Mengen Molybdän im Futter aufnehmen müssen (tear land), leiden sie wesentlichen Schaden, der aber durch Fütterung der Rinder mit Kupfer behoben werden kann. Neuere Beobachtungen haben ergeben, dass Molybdän die Kupferkonzentration der Gewebe ersetzen und dadurch den Kupferstoffwechsel wesentlich stören kann. Es scheint, dass Molybdän das Kupfer in einer Form festlegt, dass dieses von dem Gewebe nicht

mehr ausgenutzt wird oder die kupferhaltigen Enzyme in ihrer Wirkung aufhebt.

Von CUNNINGHAM wurde eine Erscheinung von Kupfermangel bei Kühen in Neuseeland beschrieben, die mit Verdauungsstörungen verbunden ist und als « peat scours » bezeichnet wird. Sie ist nur auf Weiden mit hohem Molybdängehalt zu beobachten. Eine niedere Konzentration an Kobalt und ein hoher Gehalt an Molybdän in der Leber ist hierfür charakteristisch; zugeführtes Kupfer heilt nicht nur die Krankheitsscheinungen, sondern regelt die Konzentration von Kupfer und Molybdän in der Leber. Durch Fütterung von 60 p.p.m. Mo an Kälber wurden bei diesen Tieren Verdauungsstörungen, niederer Kupfergehalt in der Leber und Sprödigkeit der Knochen erzeugt, was zur Knochenbrüchigkeit führte. Auch in Florida wurde gefunden, dass bei Kupfermangel und normaler Zufuhr von Phosphorsäure die Kühe an Knochenerkrankungen leiden, falls zusätzliche Molybdänzufuhr erfolgt. Durch Kupferzufuhr wurden die Krankheitssymptome relativ rasch geheilt, besonders bei jungen Tieren. Solange genügende Mengen Kupfer in der Nahrung zugeführt werden, stören auch grössere Mengen an Molybdän nicht. Schweine sind verhältnismässig widerstandsfähig gegenüber Molybdän. In Neuseeland wurde beobachtet, dass auf den gleichen Weiden, auf denen Kühe und Schafe an Kupfermangel litten, die Pferde gesund blieben. Durch Versuche mit Radio-Isotopen wurde gefunden, dass die gleichzeitige Verabreichung von Kupfer und Molybdän die Aufnahme von Phosphorsäure herabsetzt. Zweifellos wird die Giftigkeit von Molybdän durch Kupfer vermindert, wohl infolge der Bildung des nichtgiftigen Kupfermolybdates.

In Neu-Süd-Wales und auch in gewissen Teilen Australiens zeigt vielfach die Schafwolle abnorme Eigenschaften; man spricht von « steely wool ». Durch Verabreichung geringer Mengen Kupfer, entweder direkt an die Tiere oder durch Düngung über die Pflanze, kann wiederum normale Wolle erhalten werden.

Bei neugeborenen und jungen Lämmern wird öfters eine Erkrankung festgestellt, die als « swayback » bezeichnet und durch Verabreichung von Kupfer verhindert wird. Diese Krankheit äussert sich in Krämpfen, vor allem der hinteren Extremitäten, schw-

ren Koordinationsstörungen und Blindheit. In Australien tritt sie in jenen Weidegegenden auf, die einen niedrigen Kupfergehalt zeigen.

Mangan. Mangan ist von grosser Bedeutung für die endokrinen Drüsen, insbesondere für die Fortpflanzung und den Geschlechtszyklus. Ausserdem stellt das System Mn^{++}/Mn^{+++} ein wichtiges Redox-Potential dar. Die bei Hühnern auftretende Peroxis ist auf Manganmangel zurückzuführen. Mangan ist ein wesentlicher Bestandteil vieler Enzymsysteme, z.B. der Arginase und (gemeinsam mit Magnesium) der Phosphatasen. Es ist daher verständlich, dass sein Fehlen schwere Mangelerscheinungen auslöst. Besonders in USA wird die Bang'sche Krankheit (Brucellose) prophylaktisch durch Fütterung eines Gemisches von Mangan-, Kupfer-, Kobalt- und Jod-Verbindungen bekämpft. Für die Blutbildung besitzt es jedoch keine Bedeutung. Vitaminreiche Organe sind besonders manganreich; es werden daher Beziehungen zwischen der Vitamin B-Bildung und dem Gehalt an Mangan vermutet.

In vielen landwirtschaftlichen Betrieben der Niederlande, vor allem mit pH-Zahlen der Böden über 6,3, wurden Manganmangelerscheinungen bei jungen Kühen beobachtet, die sich besonders in Unfruchtbarkeit und Fehlgeburten äusserten. Bei Analyse der Ernteprodukte und Böden solcher Betriebe zeigte es sich, dass in der Mehrzahl der Fälle der Mangangehalt der Böden und Ernteprodukte unterhalb der normalen Werte lag, z.B. der Gehalt der Gräser kleiner als 100 p.p.m. Mn war. Die meisten dieser Mangelerscheinungen verschwinden nach Beifütterung von 2 mg Mangansulfat je Tier und Tag.

Bei Untersuchungen über den Mangangehalt von Wiesenheu, die besonders von KURMIES durchgeführt wurden, waren im Mittel Werte von 9 mg/100 g Heu gefunden worden. Der Manganentzug schwankt zwischen einigen Gramm und 3 kg Mn/ha. Im Durchschnitt des Bundesgebietes errechnete er für einen Heuertrag von 50 dz/ha einen Manganentzug von etwa 435 g/ha. Er nimmt an, dass der Mangangehalt mindestens 10 mg Mn/100 g Heu sein muss, damit die Tiere mit diesem Element ausreichend versorgt sind. Kei-

ne Beziehungen ergaben sich zwischen dem Gesamt-Mangan im Boden und dem Mangangehalt des Heues, da sich die Menge des aufgenommenen Mangans nach dem Reaktionszustand des Bodens richtet. Den höchsten Mangangehalt zeigten die Pflanzen auf sauren Böden, den niedrigsten auf neutralen und alkalischen.

Interessante Beobachtungen über die Manganernährung der Weidepflanzen in Hinsicht auf die tierische Ernährung hat LAATSCH in Schleswig-Holstein angestellt. Mit Rücksicht auf die Tierernährung empfiehlt er eine Einstellung der pH-Zahl (KCl) des Grünlandes der nordwestdeutschen Podsole, Braunerden und Niederungs-moorböden auf 5,8. Jede Düngung mit konzentrierten Mangandüngemitteln betrachtet der genannte Forscher auf nordwestdeutschem Grünland als Verschwendungen, da die Manganvorräte der meisten Böden sehr hoch sind. Er empfiehlt den ärmsten Böden das Mangan in Form von Thomasphosphat oder Hüttenkalk zuzuführen.

Auf einer grossen Anzahl von Betrieben in den Niederlanden, vor allem bei solchen mit Sand- und Moorböden mit einer pH-Stufe über 6,3, wurden bei Färsemen Krankheiten beobachtet, die auf Manganmangel zurückzuführen sind. Analysen des Weidegrases ergaben, dass in 57% der untersuchten Proben der Mangangehalt unter 100 p.p.m. lag. Durch Beifügung von 2 g Mangansulfat je Tier und Tag verschwanden die Krankheitsscheinungen.

DEMETER zeigte, dass durch Spuren von Mangan das Wachstum des für die Emmentaler Käsereifung so wichtigen Streptobakterium *casei* in Molkenkultur ungemein stark gefährdet wird, welche Tatsache bereits käsereitechnisch ausgenutzt wurde. Auf die mögliche Bedeutung des Mangels an Mangan im Futter bzw. in der Milch für das Auftreten regelmässiger Betriebsstörungen in der Emmentaler Käserei wird hingewiesen.

Bekanntlich äussert sich Manganmangel des Bodens im Auftreten der sog. Dörrfleckenkrankheit oder moorkolonialen Krankheit bei verschiedenen Kulturpflanzen, insbesondere beim Hafer. Die beste Methode der Bekämpfung ist die Zufuhr von Mangan in Form von Mangansulfat in einer Menge von 50-150 kg/ha. Es hat sich gezeigt, dass dort, wo Manganmangel bei Böden und Pflanzen auftritt, auch vielfach bei den Tieren Mangelerscheinungen, wie insbe-

sondere Störungen des Sexualzyklus, zu beobachten sind. Bei Heilung der Dörrfleckenkrankheit der Kulturpflanzen verschwinden meist auch Mangelerscheinungen bei den Tieren, weil diese dann genügend Mangan im Futter zugeführt erhalten.

Beim Mangan wird die Höhe der austauschbaren Ionen nicht nur durch den pH-Wert des Bodens, sondern auch durch dessen jeweiliges Redox-Potential bestimmt. Je geringer das Redox-Potential, desto stärker sind die reduzierbaren Eigenschaften des Bodens ausgeprägt, was zur Folge hat, dass das drei- und vierwertige Mangan in die pflanzenaufnehmbare zweiwertige Form umgewandelt wird. Es ist dabei zu bedenken, dass die reduzierenden Eigenschaften des Bodens mit dessen Wassersättigung, den reduzierenden Mikroorganismen und deren Stoffwechselprodukten und den reduzierenden Abbauprodukten der organischen Substanz zunehmen. Die Beziehungen zwischen der Manganolöslichkeit und dem Redox-Potential lassen auch erkennen, warum dieses Element in schweren Böden leichter pflanzenverfügbar ist als in leichten. Der höhere Wassergehalt der schweren Böden und deren geringere Durchlüftung erzeugen stärker reduzierende Eigenschaften und damit eine gleichmässigere und bessere Manganernährung der Pflanzen. Eine einwandfreie Methode zur Bestimmung des pflanzenaufnehmbaren Mangans im Boden muss daher das Redox-Potential der Böden entsprechend berücksichtigen. Nach SCHACHTSCHABEL ist eine Aufkalkung über pH 6 nur dann zu empfehlen, wenn durch eine Blattspritzung in Trockenperioden einem Manganmangel vorgebeugt werden kann. Liegt der Gehalt des Bodens an leichtaufnehmbarem Mangan über 7 mg in 100 g Boden, so kann man ihn im Hinblick auf Mangan als ausgezeichnet versorgt ansprechen; bei der Düngung braucht man dann keine Rücksicht mehr auf das Mangan zu nehmen. Alle manganhaltigen Düngemittel, vor allem das Thomasphosphat, sind geeignet, den Mangangehalt der Böden genügend zu erhöhen. Auch durch entsprechende Einstellung des pH-Wertes der Böden kann man die Manganreserven des Bodens mobilisieren, wobei zu bedenken ist, dass die Auswaschungsverluste an Mangan bei pH 6,0 und höher am geringsten sind. Auch durch teilweise Anwendung physiologisch saurer Düngemittel, ferner durch orga-

nische Düngung kann das Bodenmangan pflanzenverfügbar werden. Da der Bedarf der Pflanzen an Mikronährstoffen meist sehr gering ist und die Hydroxyde der Mikronährstoffe selbst im isoelektrischen Punkt nicht vollkommen unlöslich sind, ferner ihre Löslichkeit durch die von den Pflanzenwurzeln ausgeschiedenen H-Ionen noch verstärkt wird, können die Pflanzen ihren Bedarf an Mikronährstoffen dann noch vollkommen decken, wenn die absolute Menge leicht umsetzbarer Oxyde und Hydroxyde über einem bestimmten Schwellenwert liegt. Dadurch vermögen die Pflanzen selbst noch bei schwach alkalischer Reaktion günstig zu gedeihen, sofern der absolute Gehalt des Bodens an den Hydroxyden der Mikronährstoffe hoch genug ist, wie das am Beispiel der sehr fruchtbaren Marschböden, Kalkverwitterungsböden und Lössböden zu erkennen ist. Falls bei einer Erhöhung der Bodenreaktion ins alkalische Gebiet eine Ertragsdepression auftritt, kann mit ziemlicher Sicherheit darauf geschlossen werden, dass ein Nährstoff zu stark im Minimum ist. Bei Feststellung der optimalen Reaktion des Bodens müssen daher nicht nur die Makro- sondern auch die Mikronährstoffe optimal gestaltet werden. Diese für die Pflanzenernährung so wichtigen Erkenntnisse sind aber auch für die Tierernährung insofern wichtig, als nur bei einem günstigen Gehalt der Pflanzen an Mikronährstoffen die Tiere einwandfrei mit den nötigen Mikronährstoffen versorgt werden, was wegen der starken pH-Abhängigkeit der Manganernährung der Pflanzen besonders für diesen Nährstoff gilt. Die geringste Aufnehmbarkeit des Mangans des Bodens für die Pflanzen liegt beim Neutralpunkt und bei schwacher Alkalität des Bodens, wie sich überhaupt steigende pH-Werte auf die Abnahme der Löslichkeit der Mikronährstoffe am stärksten auswirken, mit Ausnahme von Molybdän, das bei saurer Reaktion das Minimum seiner Verfügbarkeit aufweist.

Zink. Zink ist ein regelmässiger Bestandteil des tierischen Organismus. Besonders jene Organe sind reich an Zink, die grössere Mengen Phosphatide und Nukleoproteide enthalten. Zinkarm sind die Haare, reicher an Zink Knochen und Muskeln und besonders viel Zink enthält die Leber (bis 100 mg/kg.). Beim Menschen ist

der gesamte Zinkgehalt ungefähr der Menge des Gewebs-Eisens gleich. Der Zinkgehalt der Frauenmilch steigt während der Laktationsperiode um ein Mehrfaches an. Obwohl Zink im Organismus nur wenig gespeichert und leicht ausgeschieden wird, ist die Konstanz im Zinkgehalt verschiedener Organe und des Blutspiegels sehr gross. Sehr viel Zink enthält das Schlangengift; bei der spezifischen Lecithinasewirkung des Schlangengiftes scheint das Zink als Katalysator zu wirken, womit seine Anreicherung in den Giftdrüsen der Schlangen erklärt werden kann. Sehr reich an Zink sind die Austern; im Blut von Octopus ist das Zink, ähnlich wie das Kupfer im Hämocyanin, an Eiweiss gebunden. Auch im Dorschlebertran ist viel Zink enthalten, weshalb Beziehungen zu den Vitaminen angenommen werden. Beim Schwein und Schaf sind die Samenbläschen, beim Stier die Prostata sehr zinkreich und im Sperma wurden bis 2000 mg je kg Trockensubstanz beobachtet. Ebenso sind in der Befruchtungszeit die Hoden des Herings mit 200-345 mg Zink/kg Trockensubstanz zinkreicher als der übrige Organismus. Aus diesen Befunden kann man auf eine Funktion des Zinks beim Befruchtungsvorgang schliessen. Auch im menschlichen Blut wird Zink regelmässig gefunden. Im allgemeinen enthalten die tierischen Organe 5-6 mal soviel Zink wie Kupfer. Der Zinkgehalt ist im Körper der Säugetiere bei der Geburt am höchsten, während der Laktationszeit nimmt er ab und steigt dann wieder an. Eine gewisse Zinkspeicherung findet bei jungen Tieren statt. Der Zinkgehalt der Kuh- und Schafmilch ist ungefähr so hoch wie derjenige der Frauenmilch. Meistens wird der Zinkgehalt bei Beginn der Weide niedriger und steigt dann im Laufe des Weideganges an. Besonders zinkreich ist das Kolostrum.

Ausser den Sexualorganen enthält die Pankreasdrüse viel Zink; ebenso weist die Kohlensäure-Anhydratase als prosthetische Gruppe Zink auf. LEINER untersuchte, ob die Zinkmenge und der Kohlensäure-Anhydratase-Gehalt in den einzelnen Geweben des Körpers miteinander in einer Beziehung stehen. Er fand, dass die Aderhaut des Knochenfischauge das verhältnismässig zinkreichste Gewebe im Körper der Fische und Wirbeltiere ist. Auch Regenboogenhaut und Netzhaut des Knochenfischauge sind relativ zinkreich.

Stark von Art zu Art schwanken die relativen Zinkmengen in den inneren Augenhäuten. Von allen übrigen Organen des Knochenfisches besitzt das Ovarium den höchsten Zinkgehalt. Im allgemeinen wurde festgestellt, dass sich Zinkgehalt und Gehalt an Kohlensäure-Anhydratase nicht entsprechen. Auch WEITZEL und Mitarbeiter haben über den Zinkgehalt der Augen gearbeitet, wobei sie im wesentlichen die erwähnten Befunde von LEINER bestätigen konnten. WEITZEL beschäftigte sich auch mit den Beziehungen zwischen Zink und Insulin im Pankreas von Knochenfischen. Schon früher wurde von japanischen Forschern festgestellt, dass in den Langerhans'schen Inseln verschiedener Wirbeltiere, auch des Menschen, Zink vorkommt, das in Beziehung zum Kohlenhydratstoffwechsel steht. Dieses Zink der Langerhans'schen Inseln nimmt beim hungernden Tier zu, verändert sich kaum bei Fett- und Eiweißfütterung, verschwindet jedoch bei kohlenhydratreicher Nahrung. Der genannte Forscher stellte auch Untersuchungen über die Blutzuckerwirkung von Zinkverbindungen an. Die meisten der geprüften Zinksalze riefen geringe Blutzuckersteigerungen hervor.

Bisher wurden nur äusserst selten Zinkmangelscheinungen bei landwirtschaftlichen Nutztieren festgestellt. Es scheint somit, als ob der Zinkgehalt von Boden und Pflanze im allgemeinen für die Versorgung der höheren Tiere an diesem Nährstoff genügt. In der Pflanzenernährung ist heute bekannt, dass Zink ein lebensnotwendiges Element für die Kulturpflanzen darstellt und viele Zinkmangelscheinungen sind bereits beobachtet worden, insbesondere bei tropischen und subtropischen Kulturpflanzen und Obstbäumen.

Eisen. Wichtig für die Bildung des roten Blutfarbstoffes ist die Eisenzufuhr. Auch für die Bildung der Zellhämme ist Eisen notwendig. Besonders hoch liegt der Eisengehalt in der Leber und der Milz. Vor allem bei der Ferkelaufzucht treten Erkrankungen auf, die durch Eisenmangel bedingt sind. Die Tiere werden träge, die Haut intensiv weiss und schwanig, die Atmung wird erschwert; vielfach gehen die Tiere ein. Die Zahl der Erythrocyten im Blut geht dabei auf einen Bruchteil des Normalgehaltes zurück. Durch Verfütterung von Eisensalzen in Form von Mineralstoffgemischen

können die Krankheitserscheinungen zum Verschwinden gebracht werden. Verabreichung von Eisen an die Mutterschweine vor der Geburt verhindert überhaupt das Auftreten der Krankheit. Da Eisenverbindungen in allen grünen Pflanzen, vor allem in den Blättern vorhanden sind, wird bei Weidegang der Schweine die Krankheit nicht auftreten, die bei Herbivoren sehr selten zu beobachten ist.

Jod. Während für die Pflanze Jod nicht lebensnotwendig ist, benötigen die Tiere und der Mensch unbedingt dieses Element, dessen Kreislauf vom Boden über Pflanze und Tier zum Menschen von allen Mikronährstoffen weitaus am gründlichsten erforscht ist. Seine Lebensnotwendigkeit ist darauf zurückzuführen, dass es in Form des Thyroxins und der Jodgorgosäure einen wesentlichen Bestandteil der Schilddrüse darstellt, und auch das Blut und fast alle Organe ständig Jod enthalten, wobei der Jodspiegel des Blutes im Sommer etwas höher als im Winter ist. Eine zusätzliche Zufuhr von Jod kommt nur dort in Frage, wo es sich um Gegenden handelt, die unter starkem Jodmangel leiden und in denen daher endemischer Kropf und andere Jodmangelerscheinungen auftreten, wie Umrindern, Krankheiten myxödemähnlicher Natur bei Schafen, Haarlosigkeit bei Ferkeln.

Auch die Milch enthält normalerweise Jod, wobei die bei Weidegang oder Grünfutterung gewonnene Milch unter sonst gleichen Bedingungen einen höheren Jodspiegel zeigt. Während des Rinderns der Kühe tritt eine Erhöhung des Jodspiegels der Milch auf. Der Milchjodspiegel der während der Kolostralperiode gebildeten Milch zeigt bei anfänglich normalem Jodgehalt nach Ablauf von etwa 18 Stunden ein Emporschneilen von 32 auf 272 Gamma Jod je Liter Milch, während 30 Stunden nach erfolgter Geburt der Milchjodspiegel nahezu wieder normal ist. Durch perorale Zufuhr von anorganischem Jod tritt eine bedeutende Steigerung des Milchjodgehaltes ein. Der Jodgehalt der Milch von Tieren auf Marschweiden bzw. bei Fütterung mit dort gewonnenem Heu ist um etwa 50% höher als beispielweise in Süddeutschland. Bei den Milchproben von Kühen und Schafen der Halligweiden, die wiederholten Meeresüberschwemmungen ausgesetzt sind, ist der Milchjodgehalt gegen-

über der Milch in Oberbayern um 300-800% erhöht. Bei peroraler Zufuhr von jodiertem Eiweiss (Jodtropfen) und jodierter Fettsäure (Stearolsäuredijodid) tritt bei Milchkühen eine beträchtliche Anreicherung von Jod in der Versuchsmilch gegenüber der Normalmilch ein. Mit Jodeiweiss wird etwa die gleiche Milchjodierung wie mit den Jodiden der Alkalien erzeugt, während mit jodierter Fettsäure ein erheblich höherer Jodgehalt der Milch festzustellen ist.

Untersuchungen über die Bindung des Jods in der Milch ergaben, dass das in der Milch regelmässig vorkommende Jod nur zum kleinen Teil anorganisch gebunden ist. Meist findet sich der grösste Teil an die organischen Substanzen des Serums gebunden; eine kleinere Menge enthalten die Proteine. Das Milchfett enthält meist kein Jod oder nur ganz geringe Mengen. Bei Verfütterung von Jodeiweiss fand sich in der Milch das an Eiweiss gebundene Jod ebenso erhöht wie der anorganische Milchjodspiegel; es ist deshalb anzunehmen, dass jodierte Bausteine des Jodeiweisses in die Milch übergehen können. Bei Verabreichung von anorganisch gebundenem Jod tritt eine wesentliche Erhöhung des anorganischen Jodanteils ein. Bei Verfütterung von Jodfettsäuren (Stearolsäuredijodid) erscheint der überwiegende Teil des übergegangenen Jods als Jodfettsäure bzw. als Glycerid in der Milch. Für etwaige kropfprophylaktische Zwecke ist die Feststellung bedeutsam, dass durch Zugabe entsprechender Jodmengen zum Futter milchender Tiere eine Jodierung der Milch erzielt werden kann, die sowohl hinsichtlich ihrer Konstanz wie auch der absoluten Höhe des Milchjodspiegels die Grenze der physiologisch noch einwandfreien Jodzufuhr nicht überschreitet.

Die Milchdrüse zeigt bei Jodzufuhr ein erhebliches Speicherungsvermögen, während nach längerer peroraler Zufuhr von anorganischem Jod sonst nur Leber, Niere und Milz einen etwas erhöhten Jodgehalt aufweisen.

Es wurde von uns weiterhin untersucht, inwieweit der Milchertrag und der Milchjodspiegel von Milchkühen durch Joddüngung der Weiden beeinflusst werden. Er ergab sich als Resultat dreijähriger Versuche, dass durch Joddüngung eine ungemein starke Anreicherung der Weiden an Jod erzielt werden konnte (es wurden bis zu

2½ kg J als KJ/ha im Jahre verabreicht). Unmittelbar nach der Jodverabreichung war der Jodgehalt am höchsten, um bereits nach kurzer Zeit stark zu fallen. Während der gesamten Dauer der Beweidung wurden Unterschiede in der Futteraufnahme zwischen den Weidetieren, die auf den Jodweiden bzw. auf den normal gedüngten Weiden ihr Futter suchten, nicht beobachtet. Die Tiere beider Gruppen befanden sich während der ganzen Versuchsdauer in gutem gesundheitlichen Zustand; jedoch war bei den Tieren der jodgedüngten Weiden ein stärkeres Auftreten der Brunst zu bemerken. Trächtigkeit wurde bei ihnen im Durchschnitt bereits durch eine geringere Anzahl von Deckungen erzielt als bei den Kontrolltieren; ein günstiger Einfluss des Jods auf die Geschlechtstätigkeit war somit deutlich zu erkennen. Die Tiere der Jodweiden erbrachten im allgemeinen einen höheren Milchertrag als die Kontrolltiere; das Jod zeigte eine laktationsverlängernde Wirkung. Der Einfluss des Jods auf den Fettgehalt und das spezifische Gewicht der Milch war nur gering. Der Milchjodspiegel der Kontrolltiere wies meist den für die Münchener Gegend normalen Wert von 6 Gamma-% auf und war geringen Schwankungen ausgesetzt. Dagegen war der Milchjodspiegel der Tiere der jodgedüngten Weiden gegenüber denen der Kontrolltiere beträchtlich erhöht, aber grossen Schwankungen unterworfen; er stieg kurze Zeit nach Beweidung der jodhaltigen Koppeln stark an und zeigte 2 Maxima, die deutlich mit der Zeit der Verabreichung der Jodgaben auf die Koppeln und mit den Maxima des Jodgehalts der Gräser dieser Weiden parallel gingen.

Auch von uns durchgeföhrte Fütterungsversuche mit Jod an Hühnern lieferten bemerkenswerte Ergebnisse. Die Jodgabe belief sich in der Versuchsgruppe je Tier und Tag auf etwa 2 mg J in Form von KJ. Das Futter der Kontrollgruppe war auf Grund der durchgeföhrten Analysen als praktisch jodfrei anzusehen. Ein nachteiliger Einfluss des Jods auf den Gesundheitszustand der Tiere war nicht festzustellen. Brutlust und Mauser traten bei den jodgefütterten Tieren früher ein als bei den Kontrolltieren. Die Mauser verlief bei den Kontrolltieren rascher und übte eine geringere nachteilige Beeinflussung auf die Legeleistung aus. Die Wirkung des Jods auf die Legetätigkeit war eine günstige. Die Eizahl der Jodgruppe war

insgesamt um 3½ % höher als jene der Kontrollgruppe. Unterschiede im Eigengewicht waren zwischen den beiden Gruppen nicht festzustellen. In der Nachperiode machte sich bei der Kontrollgruppe der Einfluss der Mauser in wesentlich stärkerem Ausmass durch den Rückgang der Legeleistung geltend als bei der Jodgruppe. In zwei Brutversuchen wurden bei der Kontrollgruppe Schlüpfergebnisse von 84% und 76% bei der Jodgruppe von 92% und 88% erzielt. Der Jodgehalt der Normaleier ohne Schale schwankte zwischen 3 und 10 Gamma, lag aber meistens zwischen 4 und 7 Gamma. Der Jodgehalt der Eier der mit Jod gefütterten Hühner erreichte bereits nach dreiwöchiger Dauer der Jodzufuhr Höchstwerte der Jodanreicherung, die zwischen 300 und 400 Gamma lagen, somit das 50-100-fache des Jodgehalts der Normaleier betrugen. Wenn auch von einer Konstanz der Jodanreicherung in den Eiern nicht gesprochen werden konnte, so wurde dennoch während der gesamten Dauer der Jodfütterung (321 Tage) ein gewisser, bereits bald nach Beginn der Jodzufuhr erreichter Jodgehalt nicht überschritten. Nach Beendigung der Jodzufuhr sank der Jodgehalt der Eier zuerst langsam, dann aber rasch bis zu den Normalwerten. Bei den Normaleiern fand sich der Hauptanteil des Jods im Dotter vor; nur eine sehr geringe Menge war im Eiklar enthalten, während der Jodgehalt der Schalen sich weit höher als der des Eiklars zeigte und grossen Schwankungen unterlag. Die Eier der unter Jodfütterung stehenden Tiere wiesen die überwiegende Menge des Jods im Dotter auf; hier erfolgte somit die Hauptspeicherung des Jods. Auch im Eiklar war eine Anreicherung von Jod festzustellen, jedoch in viel geringerem Ausmasse. Der Gehalt der Schalen war absolut und relativ gering. Die Jodanreicherung vollzieht sich mithin in der Hauptsache im Dotter, viel weniger im Eiklar und am geringsten in der Schale.

Wenn auch in der letzten Zeit auf dem Gebiete der Biochemie des Jods ein gewisser Stillstand in der Forschung zu verzeichnen ist, so wird nach wie vor dieses Element unter den Mikronährstoffen ein besonderes Interesse dadurch erregen, dass es in hygienischer und kropfsprophylaktischer Hinsicht eine wesentliche Bedeutung besitzt.

Brom. Brom kommt als Dibromindigo (antiker Purpur) in der Purpurschnecke vor. Es findet sich auch regelmässig im Organismus des höheren Tieres und Menschen, vor allem im Blut. Manche For-scher neigen zu der Annahme, dass die Hypophyse im Schlaf eine bromhaltige Verbindung abscheidet. Im Skelett von Anthozoen kommt Dibromtyrosin vor. Verschiedene Beobachtungen haben gezeigt, dass durch Zufuhr von Bromiden eine Verdrängung von Chloriden aus dem Körper bewirkt wird.

Tiefere Einblicke in die physiologische Bedeutung des Broms sind wohl erst zu erwarten, wenn die Methode der Bestimmung kleinster Brommengen entsprechend verbessert werden wird.

Fluor. Fluor ist in allen Geweben enthalten und findet sich auch im menschlichen Blut. Die Ausscheidung des Fluors erfolgt durch Harn und Kot. Ein Teil des Fluors scheint im tierischen Organismus organisch gebunden zu sein, wie z.B. in den Geweben, Muskeln, Drüsen und Nerven, ein anderer Teil in anorganischer Bindung in solchen Substanzen, die keine Lebenstätigkeit aufweisen, wie in Klauen, Haaren und Federn.

In Nordafrika und USA wurde bei Mensch und Tier eine Zahnerkrankung festgestellt, die unter den verschiedensten Namen in der Literatur erscheint z.B. « gesprenkelte Zähne », « gefleckter Schmelz », « mottled teeth », Erscheinungen, wie sie durch die ständige Aufnahme von stark fluorhaltigem Wasser beobachtet werden können. Die Erkrankung äussert sich darin, dass der Zahnschmelz seinen normalen Glanz verliert, trübe wird und Flecken, Streifen oder Bänder bekommt. Dabei ist beim Menschen die Zufuhr bis zum 12. Lebensjahr entscheidend, somit in jener Zeit, in der die zweiten Zähne verkalken. Erwachsene, die erst später in Landschaften mit fluorreichen Wässern übersiedeln, zeigen keine Zahncfluorose. Als Folge dieser Zahnerkrankung wird das Gebiss dauernd verunstaltet, es zeigen sich aber sonst keine Schädigungen der Gesundheit. Auch das Auftreten gesprenkelter Nägel an Händen und Füssen wurde festgestellt und « mottled nails » genannt. Die Zahncfluorose wird durch Genuss von fluorreichen Trinkwässern in Nord- und Südamerika, aber auch im Orient, in Afrika und manchen euro-

päischen Ländern festgestellt. Die Fluorgehalte, die die Zahnsfluorose hervorrufen, sind noch nicht einheitlich erforscht worden; doch scheinen Werte von 3-5 mg/Liter eine ernsthafte, von 1-2 mg/Liter eine leichte bis mässige, von 0,9-1 mg/Liter eine geringe Erkrankung zu verursachen. Besonders schädlich wirkt auf den Organismus die fortgesetzte Aufnahme stark fluorhaltiger Nahrung oder fluorhaltigen Flugstaubes bzw. vulkanischer Exhalationen, wobei auch Knochenveränderungen bei Mensch und Tier festzustellen sind.

Es wäre aber verfehlt zu glauben, dass der Organismus überhaupt kein Fluor braucht. Auch eine Hypofluorose ist schädlich, d.h. Mensch und Tier benötigen geringe Mengen Fluor. Hypofluorose begünstigt nämlich die Entstehung der Zahncaries, weshalb heute die prophylaktische Zufuhr von Fluor in Form von Natriumfluorid zum Trinkwasser (1 mg NaF/Liter) empfohlen wird. Interessant ist die Feststellung, dass für den Fluorhaushalt des Organismus die ersten zehn Lebensjahre für das gesamte spätere Leben massgebend sind.

Im Meerwasser wurde ein Fluorgehalt zwischen 1 und 1,4 mg/Liter festgestellt. Meerestiere weisen mehr Fluor auf als Landtiere. Neuere Untersuchungen zeigen, dass der Fluorgehalt innerer Organe und der Muskulatur von Mensch und Tier etwa 0,5-2 mg/100 g Trockensubstanz beträgt. Da man glaubte, Beziehungen zwischen manchen Erkrankungen (Hämophilie, Basedow) und dem Fluorgehalt gefunden zu haben, wurde auch der Fluorgehalt des menschlichen Blutes genauer untersucht, wobei man Werte von 0,1-0,12 mg = % beim gesunden Menschen, dagegen bei Hyperthyreoidismus 0,05-0,08 mg = % fand.

Die Einwirkungsarten des Fluors auf den tierischen Organismus sind mannigfaltiger Natur. Das Fluor wirkt calcicopriv, da es Calcium dem Organismus entzieht, was Calciummangel bzw. Entkalkung der Knochen zur Folge hat, verbunden mit tetanischen Erscheinungen. Der Kohlenhydratstoffwechsel wird durch Verhinderung der Abspaltung der Hexosemono- und Hexosediphosphorsäure gehemmt, wodurch die Bildung von Milchsäure unterbleibt. Die Tätigkeit der Cholinesterase wird aufgehoben, was eine starke Anreicherung der Gewebe mit Acetylcholin und damit einen starken

Reiz auf den Parasympathicus bedingt. Inwiefern Zusammenhänge zwischen Kropfhäufigkeit und Fluor in der Weise bestehen, dass endemischer Kropf und Kretinismus nicht durch Jodmangel, sondern durch Fluorüberschuss in Luft, Nahrung und Trinkwasser hervorgerufen werden, ist noch nicht restlos geklärt, obwohl man schon versucht hat, Jodüberschuss durch Fluorbehandlung zu bekämpfen. Der Organismus ist gegenüber Fluor umso empfindlicher, je höher sein Calciumbedarf ist, wie etwa bei Gravidität, Laktation und Wachstum, und umso widerstandsfähiger, je mehr Calcium, Phosphor und Vitamin D in der Nahrung enthalten sind. Im allgemeinen ist die Empfindlichkeit des Menschen gegenüber Fluor grösser als beim Tier, wohl deshalb, weil er gegenüber Calciummangel sehr anfällig ist.

Die Mehrzahl der Nahrungsmittel enthält 0,2-0,3 p.p.m. oder noch weniger Fluor. Eine Ausnahme machen Tee und essbare Meeresprodukte. Tee weist einen Gehalt von 75-100 p.p.m., bezogen auf Trockensubstanz, auf; essbare Meeresprodukte etwa 5-15 p.p.m. Die Durchschnittsnahrung führt, mit Ausnahme des Trinkwassers, 0,2-0,3 mg F täglich dem Organismus zu. Es hat sich, wie schon erwähnt, gezeigt, dass eine Fluorzufuhr über das Trinkwasser von täglich 1 p.p.m. F eine deutlich günstige Wirkung auf die Gesundheit der Zähne hat.

Vanadium. Das Blut der Ascidien und Tunikaten weist einen hohen Vanadiumgehalt auf. Dieses Element dürfte in den Blutkörperchen als an Eiweiss gebundenes Chromogen vorkommen. Da diese organische Vanadiumverbindung den Sauerstoff nicht in dissoziierbarer Form bindet und damit keinen respiratorischen Farbstoff wie Hämoglobin oder Hämocyanin darstellt, nehmen manche Forscher an, dass dieses Chromogen eine Reduktion von Kohlendioxyd und damit den Aufbau von Kohlenhydraten analog dem pflanzlichen Chlorophyll ermöglicht.

Wirbellose weisen einen höheren Gehalt an Vanadium auf als Wirbeltiere. Bei diesen kommt es in äusserst geringen Mengen vor und zwar hauptsächlich in der Leber.

Strontium. Strontium ist bei niederen Tieren als Bestandteil des Skeletts festgestellt worden; dagegen fand man es normalerweise nicht in den Knochen höherer Tiere; hier war es nur dann nachzuweisen, falls Strontiumsalze verfüttert wurden.

Kleine Mengen von Strontium scheinen für die Ratte unentbehrlich zu sein. Dieses Element begünstigt die Ablagerung von Calcium in den Knochen und Zähnen von Ratten und auch Schweinen. Neben Calcium kann man in allen Organen des menschlichen Organismus sehr geringe Mengen von Strontium nachweisen. Das Meerwasser weist zwar nur Spuren von Strontium auf; trotzdem besteht das Skelett der Acanthariden, einer Radiolarien-Gruppe, zum grössten Teil aus kristallisiertem Strontiumsulfat.

Während die meisten der besprochenen Oligoelemente lebensnotwendig und bis zu einem gewissen Grad von günstigem Einfluss auf den Organismus von Tier und Mensch sind, wirken andere Spurenelemente durchweg ungünstig auf den tierischen Organismus ein. Hierzu zählt vor allem Molybdän und Selen.

Molybdän. Molybdän hat sich, wie bereits bei Kupfer erwähnt, als ausserordentlich giftig für den tierischen Organismus erwiesen. In England wurde festgestellt, dass Molybdänschäden gewissen Vieruserkrankungen ähnlich sind. Es scheint, dass einige Pflanzen von Natur aus schon so viel Molybdän enthalten, dass damit gefütterte Tiere geschädigt werden. Seit langem wurden schon bei Milchvieh und Schafen auf Weiden in gewissen Bezirken Englands Gesundheitsstörungen beobachtet. Diese Weiden sind daher ziemlich wertlos und werden als « teart land » bezeichnet, wie ebenfalls schon beim Kupferstoffwechsel besprochen worden ist. Analysen der Weidepflanzen zeigten nun, dass die Böden dieser schädlichen Weiden Molybdän enthalten, während bei gesunder Weide dies nicht der Fall ist. Wurde den Tieren die gleiche Menge Molybdän in anorganischer Form gereicht, entsprechend derjenigen Menge, die sie beim Abweiden der Gräser auf dem « teart land » aufzunehmen pflegen, so zeigen sie die gleichen Krankheitserscheinungen wie auf den schlechten Weiden.

Über den Antagonismus zwischen Kupfer und Molybdän wurde schon berichtet, ebenso über die Tatsache, dass bei Düngung der Böden mit Kobalt, das Molybdän des Bodens löslich wird und erheblichen Schaden anrichten kann, was wiederum durch Kupferzufuhr zum Boden verhindert wird.

Neueste Forschungen haben ergeben, dass der in Leberrückständen vorkommende sogenannte Xanthinoxidase-Faktor anorganischer Natur ist und grösstenteils durch Molybdän in Form von Natriummolybdat ersetzt werden kann. Der genannte Faktor erzeugt bei jungen Ratten eine erhebliche Aktivitätssteigerung der Xanthinoxidase in Leber und Darm. Dieser Befund ist deshalb wichtig, weil dadurch eine physiologische Bedeutung des Molybdäns für höhere Tiere erwiesen wird. Möglicherweise sind kleinste Mengen Molybdän doch für den tierischen Organismus lebensnotwendig; es würde sich dann bei den erwähnten Molybdänvergiftungen um eine zu grosse Zufuhr von Molybdän handeln. Bekanntlich ist bereits seit 1939 durch die Forschung amerikanischer Wissenschaftler bewiesen worden, dass kleinste Mengen Molybdän in der Grössenordnung von 1:100 Millionen im Nährsubstrat für das Pflanzenwachstum lebensnotwendig sind. In der Zwischenzeit hat man auch in der praktischen Landwirtschaft und vor allem im Gartenbau Molybdänmangelerscheinungen festgestellt, vor allem in Deutschland in Form von « whiptail » bei Blumenkohl.

Selen. Die Wirkung des Selens auf den tierischen Organismus wurde in Amerika im Hinblick auf Erkrankungen bei Tieren studiert, die zuerst als « alkali disease » angesehen und dann als Selenvergiftungen erkannt wurden; diese werden durch Verzehr von selenhaltigem Futter ausgelöst. « Selenweizen » wurde an Ratten verfüttert und die auftretenden Krankheitserscheinungen studiert; das Selen scheint grösstenteils in der Eiweissfraktion der Körner gebunden zu sein.

Die « alkali disease » ist eine Stoffwechselstörung, die hauptsächlich in den Rocky Mountains auftritt. Zum erstenmal wurde sie im Jahr 1856 beschrieben, während der Jahre 1890-1910 auch in Kansas, Nebraska, Wyoming und Süd-Dakota beobachtet. Lange

Zeit führte man ihre Ursache auf den hohen Alkaligehalt des verwendeten Wassers zurück. Erst im Jahr 1929 studierte man die Krankheit genauer und fand die wahre Ursache der Krankheitsscheinungen im Selen, das aus dem Boden in den Weizen und von diesem in den tierischen Organismus gelangt. Diese Selenerkrankungen treten in zwei Formen auf, nämlich chronisch und akut. Die chronische Form ist vor allem in Süd-Dakota zu finden und ist als Alkali-Krankheit bekannt. Das Hauptverbreitungsgebiet der akuten Form, die mit dem Ausdruck « blind staggers » bezeichnet wird, ist Wyoming. Die Symptome der « alkali disease » sind Stnmppheit und Mangel an Vitalität, Abzehrung, rauhes Fell, Anämie, Störungen der Leber- und Herzfunktionen, Steifheit der Beine, Zerstörung der Gelenkknochen, Haarausfall und Schmerhaftigkeit der Hufe. Das Selen gelangte auch in die Milch kranker Tiere, wodurch saugende Junge ebenfalls erkrankten. Aus den Eiern erkrankter Hennen schlüpfen Kücken aus, die schwächlich und kränklich sind. Ausserdem zeigen die Eier kranker Tiere vielfach abnorme Ausbildung; solche Deformationen können sowohl durch Fütterung von anorganischem Selen wie auch durch Fütterung von « Selengetreide » bzw. Injektion von Selensalzen erzeugt werden.

Ausgedehnte Fütterungsversuche bei Ratten wurden mit « Selengetreide » durchgeführt, wobei es sich ergab, dass die auftretenden Krankheitsscheinungen eine grosse Ähnlichkeit mit den geschilderten hatten. Je nachdem die Nahrung mehr oder weniger grosse Selenmengen enthielt, waren die jeweiligen Schädigungen stärker oder schwächer. Durch Erhitzen des « Selengetreides » verringert sich seine Giftigkeit, was auf die Flüchtigkeit der Selenverbindungen zurückzuführen ist. Der toxische Faktor des « Selengetreides » ist in der Eiweissfraktion enthalten. Die Ratten besitzen die Fähigkeit, unter Weizenproben mit verschiedenem Selengehalt jene mit dem niedersten Selengehalt herauszusuchen. « Selenweizen » zeigte sich giftiger als « Selenroggen » und dieser wieder giftiger als « Selengerste »; Selenatverbindungen sind giftiger als Selenitverbindungen. Ein Futter mit mehr als 10 p.p.m. Selen bewirkt eine Behinderung des Wachstums, eines mit 5 p.p.m. verhindert noch immer die normale Entwicklung. Anorganische Selenverbindungen

erwiesen sich giftiger als Arsen und Tellur und nur Selen erzeugte Anämie. Bei Fütterungsversuchen mit Hunden zeigte sich eine Selenanreicherung in Leber, Niere, Herz und Milz, in geringem Umfange auch in anderen Körperteilen. Die Böden in Süd-Dakota haben von Natur einen gewissen Selengehalt, der vermutlich auf vulkanischen Ursprung zurückzuführen ist. Der Selengehalt der auf selenhaltigen Böden gewachsenen Pflanzen hängt vom Selengehalt des Bodens, von der Verteilung des Selen in den verschiedenen Bodenschichten und der Art der jeweiligen Selenverbindung ab; in nassen Jahren wird mehr Selen als in trockenen aufgenommen. Das Selenproblem ist für USA deshalb so wichtig, weil nicht nur in den genannten Staaten, sondern auch in Nord-Dakota, Kansas, Oklahoma, Texas, Arizona, Neu-Mexiko, Colorado, Utah und Montana die Selenkrankheiten der Tiere auftreten. Interessant ist, dass der Vitamin C-Gehalt von Ratten, die mit Selen gefüttert werden, geringer ist als derjenige normal ernährter Tiere.

Aus den geschilderten Tatsachen ist zu entnehmen, dass die Versorgung von Tier und Mensch mit gewissen lebensnotwendigen Oligoelementen wie Kobalt, Kupfer, Mangan, Zink, Jod und Fluor von grösster Bedeutung sowohl für die Landwirtschaft und praktische Tierzucht wie auch für die tierische und menschliche Gesundheit ist. Eine genügende Versorgung von Mensch und Tier mit den Mikronährstoffen ist aber nur möglich, wenn Böden und Pflanzen damit entsprechend versorgt sind. Hieraus ist der Schluss zu ziehen, dass die tierische und menschliche Ernährung eng mit der Zusammensetzung des Bodens und der Pflanzenernährung zusammenhängen und dass es eine wichtige Aufgabe der Agrikulturchemie und Ernährungslehre ist, die Zusammenhänge zwischen Boden, Pflanze, Tier und Mensch, die deren Gesundheit bedingen, genauer zu erforschen, die vielen noch ungeklärten Fragen auf diesen Gebieten zu ergründen und unser noch sehr lückenhaftes Wissen durch weitere Untersuchungen zu ergänzen und zu vertiefen (¹).

(¹) Bezuglich der angegebenen Literatur vergl. K. SCHARRER, *Biochemie der Spurenelemente*, III. Auflage 1955, Verlag P. Parey, Berlin.

Voir la discussion à page 571

THE BIOCHEMICAL APPROACH TO THE FUNCTION OF MICROELEMENTS IN MAMMALS WITH SPECIAL REFERENCE TO COPPER METABOLISM

L. SEEKLES

INTRODUCTION

In earlier conferences and papers the author has made an attempt to give an outline of the importance and the mode of action of microelements in animal life [1]. Many of the facts mentioned were not original with him. However, by the time he gave his first summary *viz.* on the occasion of a Symposium on Trace Elements held at Utrecht in 1943 under the auspices of the Netherlands Biochemical Society, the author did not know of any treatment where the experimental results of two or three decades had been critically treated and where the conclusions had been drawn which follow from the numerous observations in the fields of biochemistry and human and animal pathology [2]. The end of the second world war allowed a more thorough coverage of the numerous studies which had been conducted abroad during the war and opened new avenues of research on microelements in the Netherlands.

MICRONUTRIENTS

The part played by microelements in animal metabolism is that of micronutrients essential for normal life. Evidence has been obtained that microelements may act on metabolic processes in three ways.

Firstly, they may be taken up in the molecules of enzymes, vitamins and hormones, these three chemical compounds acting as biocatalysts in the processes of intermediate metabolism.

Secondly, they may act as activators of enzymes and in this way exert an influence on metabolic processes.

Finally there seems to be a third mode of action of certain ions *viz.* the ions of copper as direct catalysts in the transference of oxygen *e.g.* in the oxidation of easily oxidable substances such as ascorbic acid.

It is especially the second mode of action which we have focused our attention on in the course of recent fifteen years, in so far as the biochemical aspects and clinical features in large domestic animals are regarded.

ACTIVATION OF ENZYMES BY MICROELEMENTS

The enzyme activity in certain enzymes is strongly enhanced by the presence of metal ions.

This holds for many but not all of the peptidases present in animal and plant tissues which are shown to be activated by Mn, Co, Fe, Zn and Mg.

In arginase which exerts a specific and important action in the last stages of protein breakdown manganese is claimed as an essential component, but this enzyme is also activated by Co, Ni, V and Ca.

In the miscellaneous group of non-oxidative and oxidative enzymes active in carbohydrate and fat metabolism activation by metal ions such as Ca, Mg, Zn, Mn and V is frequently observed, whereas in enzymes which are responsible for the transference of oxygen iron and copper come to the fore.

It is evident that copper plays an important part in the detoxication reactions *e.g.* the oxidation of para-cresol, pyro-catechol, hydro-quinone, and para-phenylenediamine by means of tyrosinase and polyphenoloxidases, whereas diamino-oxidase (histaminase) which brings about the oxidative destruction of highly poisonous substances such as histamine, cadaverine and putrescine is activated by cobalt.

Finally the enzyme cholinesterase which exerts an important action in the transference of nervous stimuli is shown to be activated by Mn, Mg, Ca and Ba.

FIRMLY AND LOOSELY BOUNDED ENZYME COMPLEXES

In some of these enzymes the metals appear to be firmly bound. In many others they are loosely bound and can be readily removed by dialysis. Apparently the combination of the protein with the activating ion is a time reaction which may require some hours for completion. The activation takes place according to the mass law and sometimes a dissociation constant can be calculated [3].

It is the author's impression based on the results obtained by many scientists active in this field that care should be exercised before the existence, if any, of firmly bounded complexes of enzymes with ions.

In their review MANN and LUTWAK-MANN cite as an example that laccase was regarded for many years as a manganese-protein compound, simply because manganese salts stimulate the laccase activity and manganese was present in crude enzyme preparations. However, the purified laccase of KEILIN and MANN was shown to be a manganese-free copper-protein and neither manganese nor copper ions have any effect whatever on the pure enzyme [4].

METAL IONS IN THE FORMATION OF ENZYME COMPLEXES

In their thorough treatment of the kinetics of enzyme activation LU VALLE and GODDARD make valuable assumptions with regard to the mechanism of enzymatic oxidations and reductions [5]. These authors reject the concepts of oxygen activation which would not only be unnecessary but also impossible in view of the high specificity which enzymes show.

The author offers no opinion on this question but it appears to him that the final word in regard of this matter has not yet been spoken.

But apart from this matter of doubt MANN and LUTWAK-MANN postulate that the enzymes of oxido-reduction are conjugated proteins

with a prosthetic group or simple proteins acting with organic co-enzymes. These enzymes have two substrates, an electron donor and an electron acceptor, and in this way a trimolecular complex is formed between the enzyme, the acceptor and the donor. That occasionally an enzyme itself may be a substrate for another enzyme seems to be a side-reflection of great practical importance.

In the light of the general theory on the mode of action of enzymes it is not at all surprising that metal ions may occasionally be active in the formation of enzyme containing complexes. Owing to their places in the periodical system, that is to say their small ionic radii, their relatively high positive charges and their electronic configuration, some metals may act as luting stuff in the formation of complexes of two or more negatively charged molecules and in this way facilitate enzymatic reactions.

DEFICIENCY, INTOXICATION AND THE ACID-BASE BALANCE IN RELATION TO MICROELEMENTS

So far as the practical side of the activation properties of microelements with regard to enzyme action is concerned, two important facts should be mentioned.

1. In many cases an optimal concentration of the microelements is shown to exist for the activation of enzyme action. Evidence has been obtained that both less and more of these elements lowers the speed of the enzyme action.

This holds for one enzyme system separately as well as for the intricate system which is termed « the animal body » in which a great number of enzymatic processes occur at the same time.

Too low a concentration of microelements in the animal tissues may be attended with clinical symptoms of deficiency whereas an excess of microelements involves features of intoxication.

Apparently this seems to be a practical rather than a scientific discrimination for in both cases the effects of intoxication on the processes of intermediary metabolism originating from disturbances in the enzyme systems seem to be prevalent.

2. Furthermore, the indication that microelements act through their implication of enzymatic action indicates that the pH of the body

tissues will have some influence on the action of microelements in the animal organism. Metabolic disorders collectively called acidosis and alcalosis will — in principle — exert an influence on the activity of microelements as bio-catalysts, and *vice-versa*. In this connection MØLLGAARD and THORBECK's assumption that the acidosis after feeding A.I.V. silage in cattle is attended with a shift of the oxidation processes into the direction of heat production should be critically tested [6].

CLINICAL FEATURES OF DISORDERS IN MAMMALS IN WHICH MICRO-ELEMENTS ARE INVOLVED

A critical examination of the rôle played by microelements in the enzymatic processes in the animal body gives rise to the conclusion that four kinds of processes of fundamental importance for normal life are subject to the action of these elements, to wit:

- 1) the synthesis and breakdown of tissue-elements in the first instance proteins;
- 2) energy - processes: oxido-reductions;
- 3) detoxication of poisons of endogenous origin;
- 4) regulation of nervous stimuli.

This opens a new outlook on the genesis and therapy of several diseases in man and animals. Besides disorders originating from a deficiency or an excess of microelements in a narrower sense, also syndromes such as ketosis in cattle, hypovitaminosis B₁ and C, auto-intoxication of gastro-intestinal origin and perhaps even the problem of formation and breakdown of malignant tumours should be mentioned in this connection.

Evidence has been obtained that in cases of a real deficiency or excess of microelements in the animal tissues, the four groups of processes mentioned above which dominate intermediary metabolism may be blocked to a greater or less extent. The clinician meets a variety of diseases which are to be considered as a reflection of a number of partial enzymatic effects caused by a deficiency or excess of micro-elements in the normal course of intermediary metabolism.

It is easily understood that as a result of these effects some general symptoms, like delayed growth and interference with other vital functions will be observed. But it goes without saying that this *final* effect may not be regarded as inherent to a special deficiency or excess. It should be borne in mind that disorders of quite a different nature may cause similar symptoms.

For instance, a deficiency of copper in bovines gives partly the same features e.g. scouring, discolouration of the coat, a rough coat, etc. as gastro-intestinal strongylosis and JOHNE's disease.

In many cases it is indeed extremely difficult, if not impossible, to determine whether a certain result should be called primary or secondary.

It is especially two conclusions which are thought to be of fundamental importance with regard to the great variety observed in the part played by microelements in the development of diseases in different species of mammals.

The first conclusion is based on the observation that in most species, including man, microelements' metabolism seems to be regulated quite economically. Apparently these species make the most of a limited quantity of microelements and symptoms of deficiency will only develop under extremely poor conditions as far as the intake of microelements is regarded. On the other hand, other species of animals behave quite differently. Obviously their metabolic processes with respect to microelements are based on waste. This holds for instance for ruminants — bovines and sheep — as far as copper is concerned.

The second conclusion follows from the observation that the action of microelements on enzyme systems is not restricted to the enzymes in the animal tissues. The action may be extended to the enzymes active in microorganisms living in symbiosis with mammals. In herbivora, and especially in ruminants, the action of microelements on the metabolic processes of microbes seems to rank foremost, as compared with man and most other species of mammals.

Evidence has been obtained that a causal relation exists between these two conclusions.

Apparently in ruminants with their complicated gastro-intestinal system the regulation of the optimal concentrations of certain micro-elements essential for normal metabolism is more easily disturbed. In agreement with this view, it has been shown that, in contrast with mammals with a more simple gastro-intestinal tract, in ruminants shortages of minerals *e.g.* copper occur, although a real deficiency in the food is often absent. This might be termed a « conditioned deficiency » and it suggests a mutual influence of the absorption and the metabolism of copper and other components of the food.

In the approach to the function of microelements dealt with in this paper copper was selected as a special topic because in recent fifteen years this element has been holding the centre of research activities in the Utrecht Laboratory of Veterinary Biochemistry. Furthermore this element clearly demonstrates the difference existing between animals with a simple and with a more complicated gastro-intestinal system.

BLOOD COPPER

According to CARTWRIGHT and others the fluctuation of plasma copper in human subjects is less than \pm 30% [7]. In the same individual the copper values for whole blood as well as for plasma remain remarkably constant from day to day and week to week. The mean values for plasma or serum copper stated by different investigators range from 92 to 123 μg per cent. CARTWRIGHT mentions a mean value for males of 114 and for females of 123 (no significant difference). The range is 86-161 and 87-161 respectively. The copper in blood is distributed approximately equally between cells and plasma.

The copper content of plasma in newborn infants is low, the mean value varying from 53 to 83 μg per cent [8]. CARTWRIGHT found a mean value of $75 \pm 14 \mu\text{g}\%$. During the first ten days of life the copper in the plasma increases. By the second week of life the values reach the adult levels and remain at this level throughout childhood.

As contrasted with human subjects the fluctuation of plasma or serum copper and the copper values of blood cells in cattle is much more considerable. This holds for adult cattle as well as for calves.

In the period from March 1st 1953 to March 1st 1954 my co-worker K. J. KRUYT has estimated plasma copper from week to week in about 900 blood samples originating from 18 normal adult dairy cattle [9]. The animals were kept in groups of three at 6 normal farms. The farmers had never noticed any features of real or conditioned copper deficiency and there were no complaints whatever about milk production and health of the animals.

The farms are situated in a « polder ». The superficial layer of the soil consists of river clay on a layer of peat, and at some places a layer of sand, the thickness of the layer of clay ranging from about 10 to 50 cm.

In the same animal a considerable fluctuation of plasma copper was shown to exist from week to week. The same holds for the copper values of the plasma in different animals at the same farm and at the same time. The highest values were found in winter while in the byre (145 µg per 100 ml). On pasture a gradual decrease occurs, the lowest values being reached in autumn. Values less than 20 µg per 100 ml were not exceptional (Graph 5). It is remarkable that these very low copper figures were neither attended with clinical features nor with a fall in milk yield. The lowest value observed was 5 µg per 100 ml.

We would emphasize, however, that the latter observation has to be taken with a good deal of reservation. For a farmer who for years and years is used to the conditions at his farm will as a rule not distinguish between normal and optimal management. We have good grounds for our belief that administration of copper could have increased the milk yield in the period in which plasma copper was low.

A close examination of the graph for plasma copper in the summer season learns that temperature affects the copper content of blood plasma, a fall in temperature giving rise to an increase of the copper values, and *vice versa* (Graph 5).

Evidence has been obtained that the sudden drop in temperature which always happens at the first days of pasturing may act as a stress giving rise to a mobilisation of copper. On the other hand a more permanent rise of temperature will interfere with the composition of the pasture leading to a high content of protein and « peptides » and a low value of carbohydrate. Unbalanced rations of this kind give

occasion to scouring originating from gastro-intestinal autointoxication and in this way the copper status of the animal gets worse.

The results recently obtained by my co-worker J. VAN DER GRIFF clearly demonstrate the difficulties we meet in The Netherlands regarding what is called « normal management » in dairy farms [10]. As an example we take the observations made in 1952 concerning the copper values of blood serum originating from 346 adult dairy cattle on pasture. The blood samples were taken at random at 90 farms. Scouring was not observed in all cases and there were many complaints concerning the condition of the animals and the milk production at the end of the pasture season. (Table 1).

TABLE 1 — Serum copper μg per 100 ml in 346 samples of blood from dairy cattle taken at random at 90 dairy farms during the pasture season 1952

Percentage of total number	Serum copper	Result of copper sulphate per os 500 mg per diem
12 per cent	< 20	
13 " "	21 - 30	{ favourable
3 " "	31 - 40	
9 " "	41 - 50	{ partly favourable
9 " "	51 - 60	
14 " "	61 - 70	{ sometimes favourable
17.5 " "	71 - 80	
17.5 " "	> 80	no treatment
100.0		

Table 1 shows that on a copper level <40 μg per 100 ml — 33 per cent of the animals — the response to copper administration *per os* was favourable. On a copper level of 41-60 — 18 per cent of the animals — the response was partly favourable but not so striking as it was in the first group. On the sub-clinical level of 61-80 — 31.5 per cent of the animals — sometimes a small result of the copper administration was recorded, e.g. an improvement of the coat and a small increase in milk production but in very many cases no result at all was observed.

Finally my former co-worker S. T. HOFSTRA has estimated the distribution of copper between blood cells and plasma in normal dairy cattle in relation to age. (Table 2).

TABLE 2 — *Distribution of copper between blood cells and plasma in normal dairy cattle in relation to age*

Number of animals	Blood plasma µg per 100 ml		Blood cells µg per 100 ml		
	Range	Mean	Range	Mean	
Newborn calves	15	40 - 98	61	22 - 152	92
Six months to one year	10	44 - 115	85	70 - 136	93
One to two years	11	35 - 97	53	32 - 100	55
Adult	18	30 - 163	75	26 - 91	60

By the time of the first gestation, at an age of one to two years, the copper content of the blood is shown to be low. Unlike in human subjects no increase of copper in the blood is recorded in cattle during pregnancy, infectious, homopoietic and malignant diseases.

On the other hand hypocupremia in human subjects is extremely rare. In the many hundreds of serum or plasma copper determinations which have been performed by CARTWRIGHT and co-workers, only twice has hypocupremia been encountered [7]. One patient had severe renal disease and marked hypoproteinemia, hypoalbuminemia, and oedema. The other instance was a patient with homochromatosis and adequate copper in the tissues. AXTRUP has stated that he has only occasionally observed a low blood copper level in children with nutritional anemia [8].

In many cases of hypocupremia in cattle scouring is a prevalent clinical feature. Increased movement of the intestine gives rise to a decreased absorption of copper and in this way may be essential to the origin of low values of copper in the blood and the liver. Increased intestinal movement may originate from different chemical and micro-biological factors affecting the intestine, e.g. nutritional imbalance — « protein intoxication » — worm infestation, JOHNE's disease, etc.

STORAGE OF COPPER

CARTWRIGHT gives the concentration of copper — p.p.m. dry matter basis — in the various tissues in human subjects as follows: liver 24 to 60 (according to BIJKERK 32 to 87 [12]); kidney 17 to 48; heart 10 to 13; brain 23 to 50; pancreas 4 to 28; spleen 5 to 20; lungs 17; hair 15, bone 6. (Data from literature) [7]. The copper concentration in fetal liver is 5 to 10 times that of the adult liver. During fetal life the concentration increases to a maximum at term and then during the first year of life decreases steadily, but at one year it is still higher than in adult liver. It is not until the age of 5 to 15 years that values equal those of adults are obtained.

The copper concentration in the liver of human subjects is higher than in other organs but apparently this does not always hold for other species *e.g.* cattle. (Table 4).

In our laboratory much attention has been payed to liver copper of normal mammals. (Table 3).

TABLE 3 — Copper content - P.P.M. dry matter basis - of the liver in normal mammals

	Number		lowest	mean	highest	ratio lowest : highest
Bijkerk . . .	6	man	32	50	87	1 : 3
" . . .	3	dog	58	101	156	1 : 3
" . . .	37	horse	13	18	32	1 : 2.5
" . . .	10	guinea pig	59	97	183	1 : 3
" . . .	10	rat	14	24	55	1 : 4
Cunningham . . .	12	pig	12	19	48	1 : 4
<i>cattle</i>						
Hofstra . . .	15	newborn calf . . .	70	174	298	1 : 4
Cunningham . . .	41	" " . . .	143	381	655	1 : 4.5
Hofstra . . .	10	yearling	8	86	226	1 : 28
Cunningham . . .	6	"	16	67	137	1 : 8.5
Hofstra . . .	10	two years	6	14	56	1 : 9
Hofstra . . .	18	adult > two years .	3	17	58	1 : 19
Bijkerk . . .	55	" " "	5	27	194	1 : 39(1:19)x)
Cunningham . . .	23	" " "	23	200	409	1 : 18

(*) 1:19 is the ratio for cows, 1:39 when a figure originating from a bull is included.

Whereas the ratio between the lowest and the highest copper figures of the liver in mammals with a simple gastro-intestinal system does not exceed 1:4, this ratio shows to be much wider — ca. 1:20 to 1:30 — in cattle. Newborn calves show an exception to this rule. The distribution of the copper values in newborn calves is shown to obey the GAUSS law whereas in older cattle this law does not hold at all. This suggests a great variety of factors of internal and external origin which interfere with the process of copper storage in the liver in young stock and adult cattle, as contrasted with intra-uterine life.

About 50 per cent of the livers of adult dairy cattle in The Netherlands have a copper content varying from 3 to 10 p.p.m. that is to say the copper figures are very low [12] [13]. Although the ratio between the lowest and the highest copper values of the liver in young stock and adult cattle in New Zealand, as recorded by CUNNINGHAM, equals the ratio stated in The Netherlands, the absolute copper concentrations in New Zealand are much higher. The same holds for the copper content of the liver in newborn calves. This means that on the whole the copper status of cattle in New Zealand is much more favourable than it is in The Netherlands.

In his review on copper metabolism CARTWRIGHT gives a summary of the copper storage of the liver in diseased conditions in human subjects [7].

The copper content of the liver has been noted to decrease in nutritional anemia and is increased in Mediterranean anemia, hemochromatosis, cirrhosis of the liver, acute yellow atrophy of the liver, tuberculosis, carcinoma, and severe chronic diseases accompanied by anemia. The increase in copper in the depot organs is marked in patients with malignant disease and is highest in those with metastasis.

In our laboratory the storage of copper in the liver in diseased conditions has been systematically investigated in cattle and horses [12].

In cattle the copper content of the liver was found to be decreased in gastro-intestinal disorders including scouring disease on pasture, worm infestation (strongylosis) and JOHNE's disease. Furthermore a decrease of liver copper was noted in disorders of the liver and the

lungs, and in infectious diseases including tuberculosis. Pregnancy was not shown to affect the copper content of the liver in cattle when given groups of pregnant and non-pregnant animals were compared. Apparently the considerable range of variation in both groups interferes with the establishment of a significant difference. However, by taking liver samples by biopsy in individual cows in the last five months of pregnancy it was shown recently in my laboratory that an increasing exhaustion of the liver in the dam occurred as far as copper is concerned.

In horses a decrease of liver copper was only noted in pregnancy whereas in lameness, gastro-intestinal disorders, infectious diseases, and disorders of the lungs including emphysema and edema an increase of copper in the liver was noted. In liver disorders and paralytic hemoglobinuria the copper storage in the liver was not shown to be affected.

From this summary follows that, unlike human subjects and horses, in cattle a depletion of the liver as far as copper is concerned occurs in all diseased conditions hitherto examined. On the other hand, an accumulation of copper in the liver has not been recorded in diseased cattle as it was in human subjects and horses.

Apparently in cattle as contrasted with human subjects and horses copper metabolism, as far as the storage of this element in the liver is concerned, seems to be regulated quite uneconomically. The same conclusion may be drawn from the fluctuations of blood copper mentioned before. Any stimulus of internal and external origin *e.g.* an imbalanced ration giving rise to gastro-intestinal autointoxication, and infectious diseases, is shown to make the copper reserve in cattle worse. We consider the intensive animal production from grass practised in The Netherlands which gives rise to microbiological disturbances in the gastro-intestinal tract as one of the main causes of the high incidence of metabolic disorders in ruminants in which microelements including copper are involved.

THE RELATION BETWEEN LIVER COPPER AND BLOOD COPPER

For many years the existence, if any, of a relation between blood and liver copper has been really confusing. It is my co-worker J. VAN DER GRIFT who has tackled this problem in recent years [10].

1. Liver biopsy

First of all VAN DER GRIFT has shown that liver biopsy gives reliable results as far as the estimation of copper is regarded. (Table 4).

TABLE 4 — *Copper values — P.P.M. dry matter basis — of samples obtained by liver biopsy in non-pregnant and non-lactating bovines compared with samples of liver and other tissues of the same animals after slaughtering*

	Liver biopsy	Liver samples after slaughtering				Other tissues after slaughtering			
		right	middle	left	average	spleen	heart- muscle	back muscle	muscle of the rumen wall
No. 2 . . .	269	287	270	257	271	3.8	21.2	4.2	5.0
3 months									
No. 54 . . .	92	118	113	154	128	4.1	17.3	3.1	4.4
10 months									
No. 89A . . .	181	159	195	180	178	4.8	18.0	2.5	4.9
16 months									
No. 33A . . .	5.8	5.8	6.0	6.0	5.9	3.5	16.3	2.3	4.2
20 months									
No. 87B . . .	6.9	5.8	5.6	5.6	5.7	4.2	17.0	2.4	3.8
21 months									
No. 99 . . .	—	10.2	10.4	11.3	10.6	—	—	—	—
4.5 years									
No. 73 . . .	5.7	5.8	6.1	5.0	5.6	4.3	17.0	2.9	4.7
5 years									
No. 74 . . .	5.2	5.0	6.5	7.8	6.4	3.7	15.9	1.8	—
6 years									
No. 78 . . .	8.4	7.1	7.0	7.6	7.2	4.4	18.9	3.3	5.1
7 years						4.1	17.7	2.8	4.6
						±	±	±	±
						0.42	1.66	0.73	0.48

Furthermore Table 4 shows that the copper content of various muscles and the spleen is remarkably constant as compared with the copper values of the liver. From these data we arrive at the impres-

sion that, as contrasted with the liver, the copper content of other tissues may be regarded as figures for intrinsic copper rather than for copper reserve.

2. Liver copper and blood copper in calves during the first 5 months of life.

In 8 normal calves samples of blood and liver were taken at monthly intervals starting 24 hours after birth. Graph 1 shows the variation of average copper values and body weight. Table 5 gives the average range of the copper figures in a group of animals kept under the same conditions.

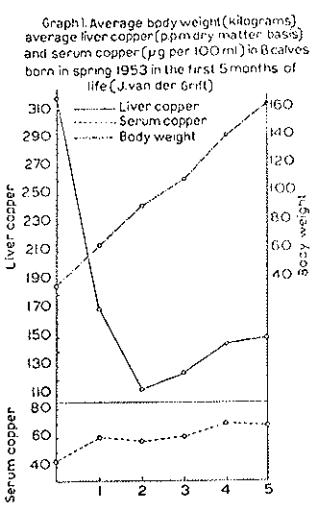
TABLE 5 — *Mean values and range for copper in liver and blood serum in calves during the first five months of life*

Age	Liver copper p. p. m.			Serum copper µg per 100 ml	
	Mean	Range	Ratio	Mean	Range
24 hours . . .	318	166 - 473	1 : 2.8	44	34 - 56
1 month . . .	171	90 - 260	1 : 2.9	62	47 - 81
2 months . . .	114	74 - 185	1 : 2.5	58	44 - 71
3 months . . .	126	55 - 203	1 : 3.7	62	46 - 82
4 months . . .	146	70 - 211	1 : 3.0	71	56 - 81
5 months . . .	150	62 - 322	1 : 5.2	69	59 - 79

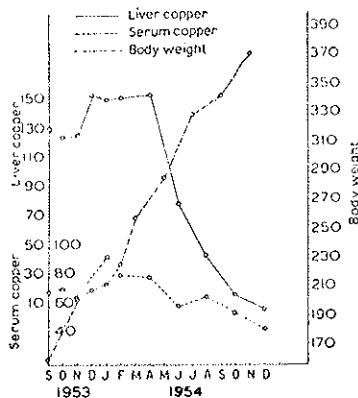
The steady drop in the copper content of the liver in the first two months is due to the ingestion of milk which is poor in copper. Part of the copper given off by the liver in this period appears in the blood serum. At an age of about 2½ months normally growing calves start absorption of copper from the feed administered together with the milk. This gives rise to a slight increase of liver copper. During the first five months of life the average increase of body weight amounted to 853 grams per day, the normal increase being 800 grams for the Friesian breed. Obviously liver biopsy regularly performed is not injurious to health. For four months the ratio between the lowest and the highest copper values remains within the limits recorded at birth. Then the ratio increases which points to a growing instability of copper metabolism in older cattle. (See also table 3).

3. Liver copper and blood copper in calves from 5 to 20 months of age.

With four calves out of the group mentioned *sub 2* the experiment was continued for a period of 15 months. Up to one year of age liver biopsy and blood sampling were performed at monthly intervals, thereafter every two months. The whole period of 15 months includes the time in which the gastro-intestinal tract is fully developed and the sexual organs are developing.



Graph 2. Average body weight(kilograms), average liver copper(p.p.m dry matter basis) and serum copper(μg per 100 ml) in 4 calves born in spring 1953 in the period September 1953 - December 1954 (J.van der Grint)



Graph 2 shows the results. Growth amounted to 470 grams per day, without special care. This is quite normal and it shows again the harmlessness of liver biopsy.

Liver copper showed a small drop in September and October when on pasture. In the hyre, however, there was a slight increase. When turned out on pasture in April a sharp fall of liver copper was recorded, a minimum of 9 p.p.m. being reached in December.

During the whole period of 15 months the copper content of the blood serum was shown to be a reflection of the liver copper. This holds especially for the last two months.

The results prove again that the pasture season is very detrimental to the copper status of growing cattle.

4. Liver copper in five adult cows before and after parturition.

In five adult dairy cows — 3 years of age — liver copper was determined at monthly intervals in the period from 4 months *ante partum* until 2 months *post partum*. The animals were kept in the byre on the same feed (Graph 3).

In agreement with expectation the copper content of the liver decreases considerably in the last 4 months of pregnancy. In this period the fetal organs including the liver which is extremely rich in copper are growing rapidly.

Table 6 shows the relation between the copper content of the liver in newborn calves and the liver copper in the dams estimated at the same time *viz.* 24 hours after parturition.

TABLE 6 — Liver copper — P.P.M. dry matter basis — in the dam and in the newborn calf 24 hours after parturition

Nr.	Liver copper	
	Dam	Newborn calf
64	3	239
89	18	316
33	210	447

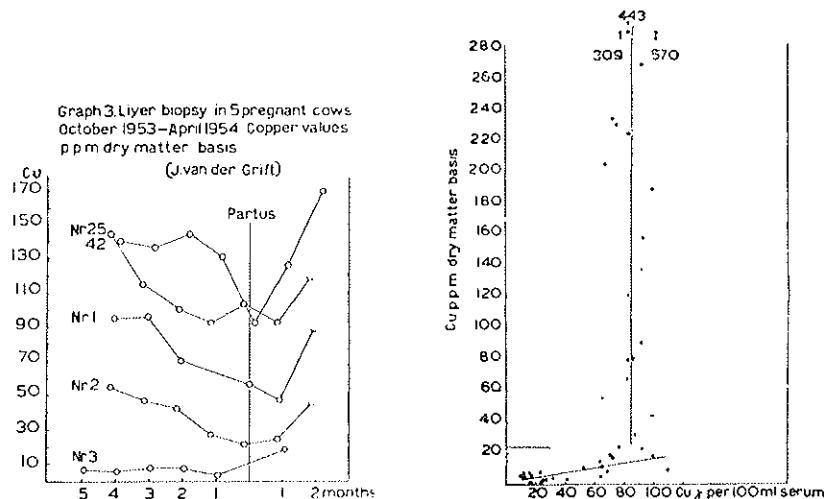
In the first two months after parturition liver copper in the dams increases to about the same level which existed four months before calving time. Although Nr. 5 in which the copper content of the liver was very low shows a somewhat different picture the general trend remains the same.

5. The relation between liver copper and serum copper in Friesian cows in lactation.

In 42 Friesian cows in lactation originating from normal dairy farms the copper values of the liver and the blood serum were estimated at the same time (Graph 4). A mathematical treatment of the data obtained leads to a striking conclusion.

A correlation between liver copper and serum copper exists only at low levels of copper in the liver and in the blood serum. The limits are 10 to 15 p.p.m., dry matter basis, for the liver and about 60 µg per 100 ml for the blood serum. At higher levels no correlation whatever is shown to exist between liver copper and serum copper.

Graph 4. The relation between liver copper and serum copper in Friesian cows in lactation



For practical purposes the conclusion may be drawn that in all probability dairy cattle of the Friesian breed showing serum values below 60 µg per 100 ml have an insufficient copper reserve in the liver.

In this connection I would recall the fact stated by BIJKERK [12] and born out by HOFSTRA [13] that about 50 per cent of the dairy cattle in The Netherlands have copper values in the liver below 10 p.p.m., dry matter basis, whereas in another 10 or 22 per cent copper figures between 10 and 15 p.p.m. are shown to occur.

THE BIOLOGICAL FUNCTION OF COPPER

Our knowledge concerning the biological functions of copper in the animal body is limited and interpretations of the alterations of the copper content in blood and tissues are hardly possible at this time.

However, strong evidence has been obtained that in the first instance copper plays an important part in the oxidative processes of detoxication.

The enzymes « tyrosinase » — a collective noun for a number of copper containing enzymes — and poly-phenoloxidase catalyse the transference of oxygen in the oxidation of substances like tyrosine, para-cresol, pyro-catechol, hydro-quinone, pyro-gallol and para-phenylenediamine. (Literature: [1], [2], [14]). In this way the element copper may play a part in the oxidative destruction of normally occurring products of autointoxication in the animal body.

According to HOLMBERG and LAURELL 90 per cent, if not all, of the copper is present in the blood serum as a blue copper protein called *caeruloplasmin* [15]. The authors have identified it as an α_2 globulin with a molecular weight of about 151 000 containing 8 atoms of copper. It can be reduced to a colourless compound and this reaction is completely reversible in the presence of oxygen.

The same authors observed that when a purified preparation of *caeruloplasmin* is added to human blood plasma an increase in the histaminolytic activity of the plasma takes place [16].

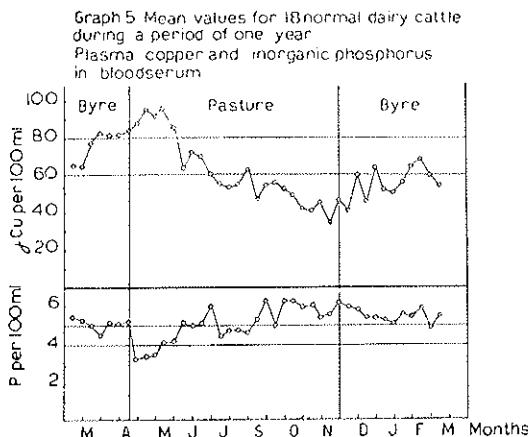
The possible import of this observation should not be underestimated. For histamine, although a normally occurring « tissue hormone », is one of the most poisonous compounds when its concentration in the animal body increases. It plays an important part in syndromes like autointoxication and shock [17].

The breakdown of histamine in the organism is known to be based on oxidation under the influence of a complicated oxydase-system called histaminase or diamino-oxidase. HOLMBERG and LAURELL's observation concerning increased histaminolytic activity of blood plasma after the addition of *caeruloplasmin* gives rise to the suggestion that this copper globuline interferes with the oxidation of histamine. This suggestion needs confirmation. Anyway, experiments made by SEEKLES and VAN ASPEREN have shown that the addition of copper ions alone to bovine serum does not increase the histaminase activity [18]. Cobalt appears to be the one and only ion which increases the histaminase activity of bovine blood serum [19].

HEILMEYER and co-workers mention the detoxicative and oligodynamic action of copper on tetanus and diphtheria toxins, and on *Spirogyra*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Paratyphys A*, etc.

In our laboratory the observation has been made that as soon as the condition of health of an animal gets worse, an increase of inorganic phosphate in the blood takes place [20]. This observation may be understood in the light of the fact that serum inorganic phosphate may increase considerably during shock and that at the same time there is a general decrease of the content of high energy phosphate compounds like A T P (adenosine-triphosphate), A D P (adenosine-diphosphate) and creatine phosphate in the tissues. (Literature cited by ENGEL [21]). In conditions of prae-shock a moderate increase of inorganic phosphorous is shown to exist.

In severe copper pining in cattle the condition of the animals is very bad and the clinical and chemical features of shock are evident. It is a remarkable fact that in hypocupremia which is a normal symptom in dairy cattle on pasture in The Netherlands, the fall in plasma copper is attended with a moderate rise in inorganic phosphorus (Graph 5). This gives rise to the suggestion that in conditioned copper deficiency which is shown to be a normal phenomenon in at least 50 per cent of the dairy cattle in The Netherlands in the late summer and



autumn, the oxidative phosphorylation giving rise to energy rich phosphates is kept in check by the sub-normal levels of copper in the blood and the liver. This suggestion needs confirmation.

It is common knowledge that copper plays a part in the synthesis of hemoglobin, cytochromes and oxidases in various species of animals [22] although the correlation between copper and hemoglobin values in cattle blood is poor [2].

It is our opinion, based on the results of biochemical and clinical investigation, that copper protects the animal body against intoxication by stimulating the activity of oxidative enzyme systems and the transference of oxygen. In our experiments we pay full attention to the question whether hypoxia of certain vital organs and tissues, together with a low oxidation-reduction potential and a conditioned copper deficiency in cattle might play a part in the pathogenesis of certain forms of shock.

On the basis of our present knowledge concerning the biological functions of copper we would endeavour to explain why cattle are at a disadvantage as compared with non-ruminants, as far as copper metabolism is regarded. In this connection two items seem to be of great importance: the action of copper in the rumen and the tendency of the blood and the liver of ruminants to be depleted as far as copper is concerned.

In our laboratory HOFSTRA has focused attention on the striking similarity existing between clinical features of copper deficiency and certain symptom which originate from a shortage of various vitamins B [13]. This holds, for instance, for the clinical symptoms of diarrhoea, poor appetite, loss of condition, a rough coat, shedding of the hairs, achromotrichia, anemia, disorders in the nervous system and heart lesions. We meet these symptoms occasionally in copper deficiency as well as in deficiency of pantothenic acid, thiamine, riboflavine, niacin, pyridoxine, biotin, folic acid and para-aminobenzoic acid. Various vitamins B seem to have the property of stimulating both the development and the function of several microorganisms including those occurring in the digestive tract of various animals. On the other hand SINGER and DAVIS have noted the efficacy of an application of either copper sulphate or calcium pantothenate in cop-

per deficient rats [23]. According to HOFSTRA copper would possibly, in cattle suffering from conditioned copper deficiency — « scouring disease » — stimulate the microbes in the rumen to the production of various vitamins B.

The second item — the tendency of the blood and the liver of ruminants to be depleted as far as copper is concerned — is associated with the great difference existing between ruminants (cattle) and other mammals, as far as the influence of various stimuli on blood and liver copper is concerned. As has been pointed out already, serum copper increases in pregnancy as well as in chronic infectious diseases in mammals except cattle. The rise takes place soon after the onset of the infection as well as in the first stage of immunisation in general [22]. HEILMEYER, in experiments in man, has found that agents which activate the reticulo-endothelial system, such as injections of milk, typhoid vaccine and diphtheria antitoxin, cause a rise in serum copper.

The striking difference noted in cattle as compared with other mammals regarding the alterations of copper in the blood serum after infections and similar stimuli, in connection with the antitoxic action of copper, leads to the suggestion that, unlike other mammals, cattle are deprived of one of the means of defence against noxious stimuli. Experiments are going on to confirm this assumption.

One of the advantages of a purposeful biochemical approach to animal diseases, as far as microelements are concerned, is that in this way light may be brought into what would otherwise be a dry enumeration of disconnected, and hence confusing, facts.

SUMMARY

1. Microelements act as bio-catalysts of enzyme action in two ways, *viz.* [1] as essential constituents of enzymes, vitamins and hormones, and [2] as activators of enzymes. Certain ions (Cu) may act as direct catalysts in oxidation processes.

2. Four kinds of processes of fundamental importance for normal life are subject to the action of microelements, *viz.* [1] the synthesis and breakdown of tissue elements (mainly protein);

[2] energy processes (oxido-reductions); [3] detoxication of poisons of endogenous origin; [4] the regulation of nervous stimuli.

3. The combination of the enzyme protein with the activating ion is a time reaction; the activation takes place according to the mass law.

4. Owing to their places in the periodical system certain metal ions seem to be fated to act as luting stuff in the formation of complexes of two or more negatively charged molecules and in this way facilitate enzyme reactions.

5. Both deficiency and excess of microelements give rise to disturbances of enzyme action originating from non-optimal activation of enzyme systems by microelements.

6. Metabolic disorders collectively called acidosis and alcalosis will — in principle — exert an influence on the activity of microelements as bio-catalyzers.

7. In cases of deficiency or excess of microelements in the animal body the four groups of processes mentioned *sub 2* which dominate intermediary metabolism may be blocked to a greater or less extent. This is shown by a variety of clinical features which are to be considered as a reflection of a number of abnormal enzymatic processes in the course of intermediary metabolism.

8. In most species of mammals microelements' metabolism seems to be regulated quite economically. In other species the metabolic processes in which microelements are involved seem to be based on waste. This holds especially for animals with a complicated gastro-intestinal system like ruminants.

9. The element copper clearly demonstrates the great difference concerning the regulation of its metabolism in animals with a simple as compared with a more complicated gastro-intestinal system.

10. In bovines and sheep a conditioned copper deficiency occurs frequently, whereas it never occurs in man and other animals.

11. The fluctuation of the copper values in the blood in normal bovines is extraordinarily great in comparison with man. A seasonal drop occurs during summer time while the animals are on pasture.

12. The copper values of the liver of normal bovines also show a great variation and extremely low figures as compared with other mammals.

13. In bovines the copper reserve of the liver is easily exhausted under the influence of various diseases, whereas in man and horses an accumulation of copper occurs under the same circumstances.

14. Evidence has been obtained that the liver is the most important dépôt organ for exchangeable copper. Muscles seem to be of secondary importance in this connection.

15. Liver biopsy was shown to be a harmless technique for routine estimations of the copper reserve in bovines at regular intervals.

16. In this way the variation of liver copper during pregnancy in dairy cattle and the relation between liver and blood copper in the first $1\frac{1}{2}$ years of life in young stock could be determined.

17. A correlation between liver copper and blood copper in lactating cows exists only when the level of copper in the liver and in the blood serum does not exceed 10 to 15 p.p.m. and 60 μ g per 100 ml respectively. In all probability dairy cattle of the Friesian breed showing serum values below 60 μ g per 100 ml have an insufficient copper reserve in the liver.

18. Although our knowledge of the biological function of copper is limited, strong evidence has been obtained that it plays an important part in oxidative detoxication processes including the condition of shock and prae-shock.

19. A striking difference is noted in cattle as compared with mammals with a simple gastro-intestinal system. Whereas in human subjects and horses infections and other stimuli which interfere with the reticulo-endothelial system give rise to an increase in serum copper, this rise of the copper level in the blood is not found in cattle.

20. This remarkable difference, in connection with the antitoxic effect of copper, gives rise to the suggestion that unlike other mammals, cattle are deprived of one of the important means of defence against noxious stimuli.

L I T E R A T U R E

- [1] SEEKLES L., *The Fison Lectures*, London (1948); *The Veterinary Journal*, 104, 279 (1948); *Proceedings 14th International Veterinary Congress*, London (1949); *Unesco Symposium*, Harpenden (1947) Lotsya 3, 119 (1950); *Mnografías de Ciencia Moderna*, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid (1950); *Proceedings, 6th International Congress of Comparative Pathology*, Madrid (1952).
- [2] — *Proceedings, Symposium on Trace Elements*, Netherlands Biochemical Society, Utrecht, November 23rd 1943, p. 130.
- [3] SMITH E. L., *Journ. biol. Chem.*, 163, 15 (1946).
- [4] MANN T., LUTAWAK C.-MANN, *Ann. Rev. of Biochemistry*, 13, 25 (1944).
- [5] LU VALLE J. E., GODDARD D. R., *Quart. Rev. of Biol.*, 23, 197 (1948).
- [6] MOLLAARD H., THORBECK G., *Tierernährung B.*, 10, 105 (1938).
- [7] CARTWRIGHT G. E., *Copper Metabolism in Human Subjects. (A Symposium on Copper Metabolism)*, Edited by W. D. Mc Elroy & B. Glass, Baltimore, The Johns Hopkins Press, 1950.
- [8] AXTRUP S., *The blood Copper in Anaemias of Children with Special Reference to Premature Cases*, 146 p.p., Lund (1946), cited by CARTWRIGHT [7].
- [9] KRUYT K. J., *Thesis*, University of Utrecht (in press).
- [10] VAN DER GRIFT J., *Thesis*, University of Utrecht (1955).
- [11] SEEKLES L., *Proceedings II*, 6th International Congress of Comparative Pathology (Madrid, 1952), p. 19.
- [12] BIJKERK R., *Thesis*, University of Utrecht (1949).
- [13] HOFSTRA S. T., *Thesis*, University of Utrecht (1952).
- [14] BRAKMAN W., *Thesis*, University of Leyden (1953).
- [15] HOLMBERG C. G., *Acta chem. scand.* 1, 744 (1947).
HOLMBERG C. G., LAURELL C. B., *Ibid.*, 2, 550 (1948).
- [16] HOLMBERG C. G., LAURELL C. B., *Nature*, 161, 236 (1948).
- [17] SEEKLES L., STRENGERS TH., *Proceedings I*, 6th International Congress of Comparative Pathology (Madrid, 1952), p. 331.
- [18] SEEKLES L., VAN ASPEREN K., Not published.
- [19] SEEKLES L., *The Veterinary Journal*, 104, 279 (1948) (see Table 1 on p. 283).
- [20] SEEKLES L., *Proceedings 15th International Veterinary Congress* (Stockholm 1953), p. 59.
- [21] ENGEL F. L., *Annals of the New York Academy of Sciences*, 55, 381 (1952).
- [22] The older literature is cited by HEILMEYER L., KEIDERLING W. and STRÜVE G. in their monography « Kupfer und Eisen als körpereigene Wirkstoffe und ihre Bedeutung beim Krankheitsgeschehen ». Gustav Fischer, Jena, Editors (1941).
- [23] SINGER L., DAVIS G. K., *Science*, 111, 472 (1950).

REPARTO DE ALGUNOS OLIGOELEMENTOS EN ALIMENTOS Y EN TEJIDOS HUMANOS

A. SANTOS - RUIZ

La importancia extraordinaria que han adquirido los oligoelementos y la multitud de facetas que su estudio presenta ha movido a la Academia Pontificia de Ciencias a la organización de esta semana de estudios.

El problema de los oligoelementos en su relación con la vida, intuido y demostrado por RAULIN en el « *Aspergillus niger* » y perfeccionado en nuestros tiempos por BERTRAND, han estimulado ulteriormente a una pléyade de investigadores distinguidos muchos de los cuales se encuentran ahora entre nosotros.

Hace ya algunos años, que unidos a DEAN GUELLENZU, LOPEZ AZCONA y SAMPEDRO PIÑEIRO principalmente, hemos trabajado en temas relacionados con los elementos catalíticos. Hasta ahora nuestros experimentos, realizados en la extinguida Sección de Bioquímica del Instituto Cajal y en el hoy Departamento de Bioquímica del Instituto Español de Fisiología y Bioquímica, se han dirigido preferentemente en el sentido de obtener una idea general acerca del contenido y distribución de dichos oligoelementos en los materiales analizados.

Los oligoelementos son esencialmente agentes catalíticos, pero su actuación en los procesos biológicos en que intervienen presenta una gran variedad de posibilidades. Buena muestra de ésta son los efectos oligodinámicos de algunos metales, los frecuentes fenómenos de oligosinergia, que pueden ser de carácter más o menos específico, así como la actuación en catálisis de tipo negativo o inhibitorio, y,

sobre todo, la complejidad de sus relaciones con las enzimas, vitaminas y hormonas.

La expresión oligoelementos biocatalizadores sería la más correcta y completa para designar, en español al menos, a los elementos químicos que se hallan en los organismos vegetales y animales en pequeñas cantidades y que desempeñan funciones biológicas de tipo catalítico con arreglo a las modalidades señaladas por distintos autores. No obstante, puesto que el uso que se ha hecho del vocablo oligoelementos hace ya presuponer en éste un significado de carácter biocatalítico, en el lenguaje corriente será suficiente utilizar, simplemente, la palabra oligoelemento, sin necesidad de adjetivaciones [8].

No insistiremos en reproducir información, más o menos detallada, sobre la significación biológica de los oligoelementos pues son muchas las obras de conjunto sobre este tema [1, 3, 5, 7, 16, 17, 21, 22, 23, 33, 34, 36, 39, 40, 42, 43, 58, 59, 60, 62, 63, 66, 68 y 69]. Sería alargar innecesariamente esta introducción.

Numerosas son las investigaciones analíticas con técnicas físicas y químicas que se han realizado sobre los oligoelementos [34, 39, 43, 68]. Nosotros hemos tenido ocasión de estudiarlos con nuestros colaboradores en asociaciones vegetales [44], suelos españoles [12 y 25], tejidos de plantas y animales [9, 10, 26, 27, 28, 32, 41, 47, 48, 52 y 53], tejidos humanos [11, 30, 31, 50 y 51] y aisladamente en algunos otros materiales biológicos [54, 55, 56, 57 y 70].

Nuestros resultados han sido motivo de comunicaciones y ponencias en varios congresos internacionales [13, 46 y 49]. Sin embargo era y es preciso insistir en el estudio de los elementos catalíticos, especialmente en nuestro país, ya que este transcendental aspecto de las investigaciones bioquímicas comienza a salir ahora de su periodo embrionario.

Por un lado tenemos que en las tablas nacionales e internacionales de alimentos se incluyen datos referentes al valor plástico, energético y de contenido vitamínico, pero no cabe duda que el tema no está agotado en todos sus pormenores, y se nota la falta de información respecto a los microcomponentes elementales, que puede ser en determinados casos de gran valor para dar una pauta en el establecimiento de las dietas.

Indudablemente en la nutrición animal intervienen los principios inmediatos, el agua, las sales minerales, así como los biocatalizadores, vitaminas, las hormonas y las enzimas, pero también otros, nos referimos concretamente a los oligoelementos, desempeñan funciones del mayor interés. No creemos, por tanto, que resulte desplazado de los estudios de química dietética el análisis, en los alimentos, de dichos elementos catalíticos.

Por otro lado la composición elemental de la materia viva está condicionada por una serie de factores y entre los que podemos citar los caracteres taxonómicos, anatómicos e histológicos; el género de vida, alimentación y ambiente; factores hereditarios y otros muchos de orden fisiológico. Todo esto debe ser cierto, aunque no podamos precisar con exactitud el grado y las condiciones en que se deja sentir dicha influencia en cada caso. Puede deducirse de aquí, cuán difícil resultará fijar exactamente la composición tipo de un tejido en cuanto se refiere a sus oligoelementos. Sin embargo, si concretamos bien las condiciones de desarrollo y demás detalles experimentales nos es posible, al menos, observar diferencias de orden cualitativo y cuantitativo y llegar a comprobar si se deben a causas anatómicas, fisiológicas o patológicas.

El conocimiento de la composición aproximada de la célula, tejido u órgano, y de algunas fluctuaciones que podamos comprobar experimentalmente, puede sernos de gran utilidad para el esclarecimiento ulterior de problemas, más concretos, del metabolismo de los oligoelementos en el ser humano normal y patológico.

No olvidemos que indirectamente podemos averiguar si un elemento es necesario para el metabolismo de un ser vivo, al comprobar la constancia de su existencia o su localización persistente en un órgano determinado.

Por todo ello hemos realizado determinaciones sistemáticas, en estos sentidos, mediante el empleo de una sencilla técnica de análisis espectográfico semicuantitativo [24] que simultáneamente, nos proporcionaba datos relativos a unos dieciocho elementos contenidos en mínimas cantidades en alimentos de origen vegetal y animal y en tejidos humanos normales y patológicos. Con ella --- hemos logrado algunas conclusiones que quizás pueden ser interesantes a los efectos

de esta Semana de Estudio y, además, numerosos datos que, si no son exactos, poseen, en cambio, un apreciable valor de orientación.

Este trabajo, por tanto, es el conjunto de una serie que tiene por objeto estudiar el contenido en oligoelementos de los alimentos españoles de origen vegetal y animal y en tejidos humanos normales y patológicos. Incluimos y comentamos someramente los resultados del análisis oligoelemental en muestras de cereales, hortalizas, frutas, condimentos y estimulantes, tubérculos, semillas y frutos secos, carnes de diversos mamíferos, peces, crustáceos y moluscos, embutidos varios, leche y derivados, miel y huevos, matriz, ovario y vagina, estómago, otros varios tejidos humanos.

RESULTADOS OBTENIDOS

Solamente hacemos mención, en los cuadros, de los elementos que se han encontrado sin ningún género de duda, puesto que de algunos, por ser impureza de los electrodos o por otras causas, no creemos oportuno apuntar conclusiones, aunque diversos autores los citan como elementos constantes.

Alimentos de origen vegetal

Hemos estudiado un total de doscientos catorce alimentos vegetales, distribuidos en los grupos bromatológicos siguientes: diez muestras de cereales, veinte de legumbres, cuarenta y siete de hortalizas, ocheta y cuatro de frutas, treinta y dos de condimentos y estimulantes y veintiuna de tubérculos, semillas y frutos secos (¹). En la tabla I se resumen los resultados y en ella se indica el límite de sensibilidad del elemento, número de muestras y de veces hallado, frecuencia por ciento, cantidades aproximadas en un gramo de cenizas y las observaciones pertinentes.

(¹) Para la obtención de las muestras de alimentos vegetales objeto de estudio, recurrimos a dos procedimientos distintos: unas se adquirieron en el mercado de Madrid, y otras directamente del sitio de producción preferentemente en Cáscale (Navarra); de las segundas se conoce incluso el término municipal y la parcela de terreno donde fueron cultivadas. De las primeras no fué posible localizar exactamente la procedencia, y para evitar errores, preferimos hacer mención de lo que positivamente nos consta, que es su adquisición en dicho mercado. De algunas especies botánicas se consiguieron varias muestras, de diferentes orígenes o de distintas variedades de huerta.

TABLA I.

Elementos y límite de sensibilidad	MATERIAL	Número de mue- stras	Número de veces hallado	Fre- cuencia %	Cantidades aproximadas en 1 g. de cenizas	OBSERVACIONES
Ag 10^{-6}	Cereales . . .	10	9	90	10^{-4} a 10^{-6}	En todas las semillas de gramináceas.
	Legumbres . . .	20	0	0	—	Sólo en agaricáceos.
	Hortalizas . . .	47	1	2	10^{-4}	Sólo en plátanos (« Musa sap. »).
	Frutas . . .	84	2	3	10^{-5} a 10^{-6}	En alcacarras (« Caparis esp. »), ajos « Allium »), etc.
	Condimentos . .	32	4	13	10^{-5} a 10^{-6}	
Al 10^{-4} Ba 10^{-4}	Todos . . .	214	214	100	+ $\leq 10^{-4}$	En el límite de sensibilidad.
	Todos . . .	214	214	100		
Co 10^{-5}	Cereales . . .	10	0	0		
	Legumbres . . .	20	20	100	$\leq 10^{-5}$	Frutos y semillas de papilionáceas.
	Hortalizas . . .	47	5	10	$\leq 10^{-5}$	Esporádico.
	Frutas . . .	84	12	14	$\leq 10^{-5}$	Sólo en algunos frutos (con semillas) de aurancíaceas, pomáceas y rosáceas y en vino y vinagre.
	Condimentos . .	32	8	25	$\leq 10^{-5}$	En frutos de piperáceas y umbelíferas y esporádico en otros tres materiales.
Cr 10^{-4} Cu $< 10^{-4}$ Fe 10^{-5} Li 10^{-4} Mn 10^{-4} Mo 10^{-5}	T. S. y F. sec.	21	11	52	$\leq 10^{-5}$	En semillas y frutos.
	Legumbres . . .	20	1	5		En las lentejas.
	Todos . . .	214	214	100	$> 10^{-3}$ a 10^{-4}	
	Todos . . .	214	214	100	10^{-2} a 10^{-4}	
	Todos . . .	214	214	100	10^{-3} a 10^{-4}	
Ni 10^{-5} Pb $< 10^{-5}$	Todos . . .	214	214	100	10^{-2} a 10^{-4}	En todas las semillas; en la tapioca falta.
	Cereales . . .	10	9	90	10^{-3} a 10^{-5}	En mayor cantidad en las semillas que en los frutos con semillas.
	Legumbres . . .	20	20	100		
	Hortalizas . . .	47	8	17	$\leq 10^{-5}$	En los frutos de crucíferas.
	Frutas . . .	84	22	26	10^{-4} a $< 10^{-5}$	En todos los frutos (con semillas) de artocarpáceas, aurancíaceas, solanáceas y en semillas de cucurbitáceas y lauráceas.
	Condimentos . .	32	16	50	10^{-4} a 10^{-5}	En todas las semillas, frutos e infrutescencias; esporádico en hojas y raíces.
	T. S. y F. sec.	21	13	62	10^{-3} a 10^{-5}	En todas las semillas y en ciertos tubérculos.
	Todos . . .	214	214	100	10^{-3} a 10^{-5}	
	Cereales . . .	10	9	90	$< 10^{-2}$ a $< 10^{-5}$	Mucho en la tapioca.
	Legumbres . . .	20	9	45	10^{-4} a $< 10^{-5}$	
	Hortalizas . . .	42	17	36	10^{-3} a 10^{-5}	En conservas mayor cantidad.

Segue: TABLA I

Elementos y límite de sensibilidad	MATERIAL	Número de mae- stros	Número de veces hallado	Fre- cuencia %	Cantidades aproximadas en 1 g. de cenizas	OBSERVACIONES
Si $< 10^{-5}$	Frutas	84	32	37	10^{-3} a 10^{-5}	Distribución irregular.
Sn 10^{-5}	Condimentos . .	32	22	64	$< 10^{-3}$ a $< 10^{-5}$	Distribución irregular.
Ti 10^{-5}	T. S. y F. sec.	21	4	19	$\leq 10^{-5}$	
V 10^{-6}	Todos	214	214	100	10^{-1} a $> 10^{-4}$	
W $< 10^{-3}$	Todos	214	4	2	+	Sólo en las conservas, y procede del envase.
Ag 10^{-6}	Cereales	10	5	50	10^{-5} a 10^{-6}	
	Legumbres	20	0	0	—	
	Hortalizas	47	7	15	10^{-5} a 10^{-6}	Esporádico.
	Frutas	84	4	1	10^{-6}	Sólo en frutos de moráceas y musáceas.
	Condimentos . .	32	8	25	10^{-5} a 10^{-6}	
	T. S. y F. sec.	21	0	0	—	Distribución irregular.
	Frutas	84	9	11	$\leq 10^{-3}$	Sólo en algunos vinos de Oporto.
	Carnes	85	13	15	10^{-1} a $< 10^{-6}$	
	Peces	38	2	5	10^{-4}	
	Crustáceos y m.	8	6	75	10^{-3} a 10^{-4}	Trucha y congrio (cola).
	Embutidos	17	1	6	10^{-3}	
	Leche y derivs.	24	1	4	10^{-4}	En el lomo embuchado.
	Aves	23	7	30	10^{-3} a 10^{-5}	En la mantequilla.
	Varios	6	0	0	—	Esportación.
Al 10^{-4}	Todos	201	201	100	+	
Ba 10^{-4}	Todos	201	201	100	$\geq 10^{-4}$	Límite de sensibilidad, sobre todo en embutidos, leche y aves.
Co 10^{-5}	Carnes	85	1	1	10^{-4}	Lengua de liebre.
	Peces	38	3	8	10^{-4}	En tres peces con piel.
	Crustáceos y m.	8	7	88	10^{-4}	
	Embutidos	17	0	0	—	
	Leche y derivs.	24	0	0	—	
	Aves	23	3	13	10^{-4}	Esporádico en viscera.
	Varios	6	4	67	10^{-4}	Constante en mieles, y en los demás esporádico.
Cu $< 10^{-4}$	Todos	201	201	100	10^{-3} a 10^{-4}	Caracoles = 10 ; los otros, menos.
Fe 10^{-5}	Todos	201	201	100	$> 10^{-1}$ a 10^{-5}	Sangre > 10 ; en los demás, de 10 a 10
Li 10^{-4}	Todos	201	138	69	$> 10^{-3}$ a 10^{-4}	
Mn 10^{-4}	Todos	201	201	100	10^{-3} a $< 10^{-4}$	
Mo 10^{-5}	Carnes	85	24	28	10^{-3} a 10^{-5}	En viscera y músculos de animales que comen pastos sin cultivar.
	Peces	38	7	18	10^{-3} a 10^{-5}	Esporádico.
	Crustáceos y m.	8	6	75	10^{-3} a 10^{-5}	Frecuencia grande.
	Embutidos	17	2	12	10^{-3}	Sólo en « fore-grass » (proceden de viscera).
	Leche y derivs.	24	15	63	10^{-3} a 10^{-5}	Bastante difundido.
	Aves	23	15	65	10^{-3} a 10^{-5}	Idem.
	Varios	6	4	67	10^{-3} a 10^{-5}	Constante en la miel.
Ni 10^{-5}	Carnes	82	25	29	10^{-4} a 10^{-5}	Esporádico, excepto en el conejo, en el que se halla muy difundido.

Segue: TABLA I

Elementos y límite de sensibilidad	MATERIAL	Número de veces hallado	Número de mue- stras	Fre- cuencia %	Cantidades aproximadas en μ g. de cenizas	OBSERVACIONES
Pb $< 10^{-5}$	Peces . . .	38	10	26	10^{-4} a 10^{-5}	Esporádico.
	Crustáceos y m.	8	6	75	10^{-3} a 10^{-5}	
	Embutidos . . .	17	5	29	10^{-3} a 10^{-4}	
	Leche y derivs.	24	4	17	10^{-4} a 10^{-5}	
	Aves . . .	23	7	30	10^{-4} a 10^{-5}	
	Varios . . .	6	5	83	10^{-4} a 10^{-5}	Falta en cecina.
	Todos . . .	201	201	100	10^{-3} a 10^{-5}	
	Si $< 10^{-5}$	Todos . . .	201	201	10^{-1} a 10^{-5}	
	Sn $< 10^{-5}$	Todos . . .	201	71	10^{-1} a 10^{-5}	En cantidad mayor en las conservas.
	Ti 10^{-5}	Carnes . . .	85	3	4	En sangre, jamón y callos de cerdo.
Ag 10^{-6}	Peces . . .	38	0	0	—	
	Crustáccos y m.	8	3	38	10^{-4} a 10^{-5}	Calamares y mejillones.
	Embutidos . . .	17	3	18	10^{-4} a 10^{-5}	
	Leche y derivs.	24	0	0	—	
	Aves . . .	23	4	17	10^{-3} a 10^{-4}	
	Varios . . .	6	3	50	10^{-3}	Sólo en mieles.
	Matriz . . .	16	0	0		
	Ovario . . .	8	0	0		
	Estómago . . .	14	1	7	$< 10^{-6}$	Ulceras.
	Varios . . .	8	1	12	10^{-5}	Membrana de placenta.
Al 10^{-4}	Todos . . .	46	46	100	—	—
Ba 10^{-4}	Todos . . .	46	46	100	—	—
Co 10^{-5}	Matriz . . .	16	11	69	$\approx 10^{-5}$	
	Ovario . . .	6	5	62	$\approx 10^{-5}$	
	Estómago . . .	14	12	86	$\approx 10^{-5}$	
	Varios . . .	8	5	62	$\approx 10^{-5}$	
Cu $< 10^{-4}$	Todos . . .	46	46	100	$> 10^{-3}$ a 10^{-4}	
Fe 10^{-5}	Todos . . .	46	46	100	10^{-1} a 10^{-4}	
Li 10^{-4}	Todos . . .	46	44	95	$> 10^{-3}$ a 10^{-4}	
Mn 10^{-4}	Todos . . .	46	46	100	10^{-3} a 10^{-4}	
Mo 10^{-5}	Matriz . . .	16	5	31	$< 10^{-5}$	Mioma, carcinoma y otros.
	Ovario . . .	8	5	62	$\approx 10^{-5}$	
	Estómago . . .	14	10	71	$\approx 10^{-5}$	
	Varios . . .	8	5	62	$\approx 10^{-5}$	
Ni 10^{-5}	Todos . . .	46	46	100	$> 10^{-3}$ a 10^{-5}	
Pb $< 10^{-5}$	Todos . . .	46	43	93	$> 10^{-4}$ a $< 10^{-5}$	
Si $< 10^{-5}$	Todos . . .	46	46	100	$> 10^{-2}$	
Ti 10^{-5}	Todos . . .	46	46	100	10^{-3} a 10^{-5}	
V 10^{-6}	Todos . . .	46	19	41	10^{-5} a $< 10^{-6}$	

Vemos que presentan frecuencias del 100% los oligoelementos: aluminio, bario, cobre, hierro, litio, manganeso, níquel, silicio y titanio; del boro y cinc no hacemos mención por las causas que oportunamente señalaramos. Observamos que, en general, el cobre aparece en cantidades menores al hierro; las proporciones de manganeso oscilan bastante; hemos reconocido el molibdeno y el plomo con el 50% de frecuencia aproximadamente.

Solamente tienen plata un 10% de las muestras sometidas al análisis espectroquímico. Aparece de modo esporádico en algunos materiales, como los plátanos, ajos, alcacarras, regaliz, champiñón, etc. Es curioso que en los agaricáceos una muestra le contenga en cantidad considerable y otra no; este hecho ha sido ya citado por otros autores. Pero lo más notable a nuestro juicio, es que existe en pequeña cantidad en todas las semillas de gramináceas.

El cobalto lo hallamos con una frecuencia del orden del 25% en los materiales objeto de estudio. Este oligoelemento está citado como ampliamente repartido en el reino vegetal, pero en cantidades pequeñísimas (de 5×10^{-9} a 3×10^{-7} en sustancia seca), que es fácil escapen a nuestra técnica, que solo llega al 10^{-5} en las cenizas, por lo cual, en la mayor parte de los casos, lo vemos en proporciones cercanas al límite de sensibilidad; esto puede explicar las irregularidades de su distribución. Sin embargo, los datos que obtenemos, aún con los efectos ya apuntados, nos permiten interesantes deducciones, pues casi todos los materiales que tienen cobalto son frutos y semillas, lo cual quiere decir que éstos le contienen en cantidades mayores que otros órganos vegetales.

El molibdeno lo observamos en todas las semillas; en los frutos no aparece, a no ser que sus cenizas procedan del fruto y semillas que éste incluye; también está contenido en las infrutescencias y esporádicamente en otros materiales.

Comprobamos una irregularidad grande en la distribución del plomo, que se presenta de un modo arbitrario en algunas especies, faltando en otras afines o idénticas; dada la sensibilidad de este elemento, según nuestra técnica, que llega a descubrir cantidades de 5×10^{-8} g., nos explicamos las oscilaciones, porque se trata de un elemento accidental en las plantas.

El estaño, solo está contenido en las conservas, por lo que es lógico suponer procede del envase.

Finalmente el vanadio está contenido en el 12% de los vegetales analizados, por nosotros. Su sensibilidad en la zona de trabajo es de 10^{-5} a 10^{-6} , y aún es mayor en la zona visible con la línea 4379 Å; pudiera ser, por lo tanto, que algunas otras muestras diesen líneas de vanadio en esta zona más sensible, lo cual explicaría las irregularidades que se observan en el reparto de este oligoelemento.

En estos análisis de alimentos de origen vegetal se ha procurado reunir el mayor número posible de especies botánicas diferentes y todos los datos anteriores se consignan desde un punto de vista general, sin que se deban establecer deducciones para cada grupo y familia dado el pequeño número de muestras de cada una; para ello sería necesario estudiar detenidamente cada grupo, familia, especie y variedad, sobre gran número de muestras de distintas procedencias, considerando en cada uno de ellas terreno de cultivo, agua de riego, abonos, insecticidación, etc. labor para la cual se requiere una larga tarea de investigación.

Alimentos de origen animal

Hemos estudiado un total de docientos uno alimentos animales distribuidos en los grupos bromatológicos siguientes: ochenta y cinco muestras de carnes de diversos mamíferos, treinta y ocho de pescados, ocho de crustáceos y moluscos, diecisiete de embutidos varios, veinticuatro de leche y productos lácteos, veintitrés de aves y seis de cecina, miel y huevos⁽¹⁾). En la tabla II se resumen los resultados y en ella se indica el límite de sensibilidad del elemento, número de muestras, número de veces hallado, frecuencia por ciento, cantidades aproximadas en un gramo de cenizas y ciertas observaciones.

La plata aparece en todos los moluscos y con mucha frecuencia en aves y mamíferos. En las aves es constante en una determinada parte del animal; en los mamíferos puede observarse dicha constancia

(1) Respecto a los alimentos de origen animal se procuró que las muestras fuesen de regiones varias de España, para así tener una mayor amplitud en la procedencia y fuese más general el análisis. De cada muestra se conoce el lugar donde ha sido conseguida y, siempre que es posible, se completa; con los peces, por lo menos se señala el puerto de donde proceden, ya que en el mercado es difícil averiguar el mar donde fueron capturados.

TABLA II

Elementos y límite de sensibilidad	Concentración media en los materiales analizados			Frecuencia %		
	Vegetales	Animales	Tejidos humanos	Vegetales	Animales	Tejidos humanos
Ag	10 ⁻⁶	10 ⁻⁴ a 10 ⁻⁶	10 ⁻³ a 10 ⁻⁶	10 ⁻⁵ a 10 ⁻⁶	19	18,5
Al	10 ⁻⁴	+	+	+	100	100
Ba	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	100	100
Co	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴ a 10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	19	16,5
Cr	10 ⁻⁴	+	—	—	0,5	0
Cu	10 ⁻⁴	10 ⁻³ a 10 ⁻⁴	10 ⁻³ a 10 ⁻⁴	10 ⁻³ a 10 ⁻⁴	100	100
Fe	10 ⁻⁵	10 ⁻³ a 10 ⁻⁴	10 ⁻¹ a 10 ⁻⁵	10 ⁻¹ a 10 ⁻⁴	100	100
Li	10 ⁻⁴	10 ⁻³ a 10 ⁻⁴	10 ⁻³ a 10 ⁻⁴	10 ⁻³ a 10 ⁻⁴	100	95,7
Mn	10 ⁻⁴	10 ⁻² a 10 ⁻⁴	10 ⁻³ a 10 ⁻⁴	10 ⁻³ a 10 ⁻⁴	100	100
Mo	10 ⁻⁵	10 ⁻³ a 10 ⁻⁵	10 ⁻³ a 10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	56	41,5
Ni	10 ⁻⁵	10 ⁻³ a 10 ⁻⁵	10 ⁻³ a 10 ⁻⁵	10 ⁻³ a 10 ⁻⁵	100	42
Pb	10 ⁻⁵	10 ⁻³ a 10 ⁻⁵	10 ⁻³ a 10 ⁻⁵	10 ⁻¹ a 10 ⁻⁵	40	95
Si	10 ⁻⁵	10 ⁻¹ a 10 ⁻⁴	10 ⁻¹ a 10 ⁻⁵	10 ⁻¹ a 10 ⁻²	100	100
Sn	10 ⁻⁵	+	10 ⁻³ a 10 ⁻⁵	—	2	29
Ti	10 ⁻⁵	10 ⁻³ a 10 ⁻⁵	10 ⁻³ a 10 ⁻⁵	10 ⁻³ a 10 ⁻⁵	100	19
V	10 ⁻⁶	10 ⁻⁴ ca 10 ⁻⁶	10 ⁻⁴ a 10 ⁻⁶	10 ⁻⁵ a 10 ⁻⁴	19	8
W	10 ⁻³	10 ⁻³	—	—	11	0
Zr	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	—	—	0,3	0

en ciertas partes como son: lomo, redondo y patas y otras. En quesos y leches no la encontramos. En peces aparece en la trucha y cola de congrio. En embutidos sólo se reconoció en el lomo, lo que ratifica su persistencia, ya indicada, en esta parte del animal.

Vemos que el aluminio se encuentra en todas las muestras, si bien varía la concentración bastante de unas a otras.

El bario también aparece en todas en proporciones cercanas al límite de sensibilidad.

El berilio no se acusa en ninguna muestra. Para este elemento tuvimos que correr la zona del espectrógrafo, a fin de ver la línea 2348,6 Å que es la más sensible y sin embargo no pudimos detectarle.

El cobalto se halla en todos los moluscos que se analizaron, y en la miel. En aves en las vísceras. No se reconoce en ninguna muestra de quesos y leches; en mamíferos solo existe en la lengua de liebre. En peces exclusivamente en algunos de río.

El cromo solamente se acusa en el « foie-grás », envasado en lata; como no se observa en el mismo alimento embutido, ni en ninguna otra muestra, es probable que sea debido al envase.

El cobre es elemento constante en todas las muestras.

El hierro se encuentra en todas las muestras, correspondiendo la mayor concentración a los mamíferos; oscila en éstos, según el tejido, entre 10^{-2} y 10^{-4} , y en aves, peces, leches y quesos entre 10^{-3} y 10^{-5} .

El litio está muy repartido en todas las muestras. En total con una frecuencia del 68%; predominando en los mamíferos y aves, y la proporción oscila entre 10^{-3} y 10^{-4} .

La presencia del manganeso es fija en todas las muestras, variando entre cantidades de 10^{-4} y 10^{-5} , excepto para los peces en cuyas muestras hay algunas que alcanzan a 10^{-3} .

El molibdeno lo detectamos en los moluscos y en las vísceras de mamíferos, principalmente en hígado, riñones y en patas de ternera. En la leche, en todas las muestras analizadas, y en quesos con bastante frecuencia. En conservas solo el « foie-grás ».

El níquel se encuentra ampliamente repartido. Existe en miel y huevos. En mamíferos está muy extendido, excepto en el cerdo, donde sólo aparece en las cenizas de callos; es curioso notar que en el conejo se encuentra uniformemente distribuido en todo él.

El plomo se halla en todas las muestras, variando a proporción entre 10^{-4} y 10^{-5} , excepto algunos que alcanzan hasta 10^{-3} .

El silicio está también en todas las muestras en una concentración de 10^{-2} a 10^{-4} .

El estaño existe irregularmente repartido; en sangre cruda de ternera y en las aves existe en buena proporción y aparece principalmente en el muslo, y en los huevos de estas últimas, y también en otras zonas. En la leche no se presenta y sí en quesos y en yoghourt, seguramente debido a los preparados enzimáticos. En los moluscos el resultado es siempre positivo y en los embutidos hallamos mayor proporción, acaso debido a la envoltura o a los ingredientes de su preparación.

El titanio existe en todas las muestras de miel analizadas y podemos considerarlo como componente constante de la misma; en la chocha se distribuye ampliamente y en la gallina se acumula en el hígado. En los demás materiales analizados se le puede considerar accidental, ya que las muestras que lo acusan están salazonadas. Tam-

bien aparece en mejillones y calamares. Se encuentra en sangre cruda de ternera, pero no en la cocida tanto de ternera como de cerdo.

El vanadio no aparece en ninguna muestra.

Tejidos humanos

Son pocos los trabajos realizados sobre contenido en oligoelementos de tejidos humanos normales o patológicos. El más reciente, posterior a los nuestros, se debe a OLSON, HEGGEN, EDWARDS y GORHAM [38] quienes realizan el estudio espectroquímico de los elementos químicos catalíticos en tejidos hepático canceroso y no canceroso. Estudian doce oligoelementos (Ag, Al, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Pb, Sn y Zn). El cinc aumenta en los casos de metástasis maligna, el cobre en la cirrosis portal y el hierro, cinc, cromo y cobalto en la leucemia linfática.

Nosotros hemos estudiado un total de 46 muestras de tejidos humanos normales y patológicos que corresponden a diecisésis de matriz, nueve de ovario y vagina, catorce de estómago y siete de otros varios tejidos humanos (una de glándula mamaria cancerosa, otra de membrana de quiste hidatídico hepático, dos de tiroides con bocio y tres de placenta normal lavada) ⁽¹⁾.

La tabla III expresa la distribución general de los elementos encontrados en las 46 muestras estudiadas. En ella se detalla para cada elemento, junto con el límite de sensibilidad de la técnica, el número de veces y la frecuencia por ciento con que se halla, así como las proporciones límites entre las que oscila el contenido de cada uno, en las cenizas analizadas.

El examen de los datos conseguidos no nos sugiere, realmente, muchas consideraciones que puedan tener interés bioquímico. El aluminio, bario, cobre, hierro, manganeso, silicio y titanio son constantes y prácticamente también el litio y el plomo. No ocurre lo mismo con la plata, cobalto, molibdeno y vanadio cuyas cifras oscilan más irregularmente.

Entre otros muchos autores DUTOIT y ZBINDEN [15] han hallado plata acumulada en órganos humanos normales como útero, ovarios,

(1) Los tejidos humanos normales y patológicos procedían de la Maternidad de Mesón de Paredes, del Hospital Militar de Maudes y del Servicio Médico Quirúrgico del aparato digestivo de S.O.E. de Madrid.

tiroides y en pequeñas cantidades en otros. SELDON y RAMAGE [61] indican mediante ensayos espectrográficos, que parece ser constituyente normal del tiroides; sin embargo, comprueban luego que de tres personas distintas una tenía indicios del metal en todos los órganos y las otras dos en ninguno. OKAJIMI [37] la encuentran en mioma, cáncer y papiloma y BOID y DE [2] en cerebro humano, entre otros materiales. Nosotros no hemos encontrado plata en ningún órgano normal ni patológico de los examinados excepto en muestras de estómago y de membrana de placenta. Todo esto nos confirma en la idea de su accidentalidad en el organismo humano.

Han habido distintas opiniones sobre el posible papel del cobre en los tumores y otros tejidos anormales. WHITE [67] lo encuentra en mayor cantidad en los tumores no degenerados que en los degenerados; GUERITHAULT [18] no indica diferencias en el contenido de cobre de órganos normales y patológicos y más recientemente CARRUTTERS y SUNTZEFF [4] observan que la epidermis hiperplástica contiene un 45% menos de cobre y un 30% menos de cinc, que la normal. De nuestros resultados, los únicos datos quizás aprovechables en este sentido, son el aumento de su cantidad en la parte interna de un fibromioma de útero, pero no en otras muestras de matrices normales o miomatosas, ni tampoco se observan diferencias en las muestras de carcinoma uterino. En cambio, son superiores las proporciones de cobre en el tejido tumoral de un bocio que en la cápsula fibrosa del mismo tiroides; sería necesario repetir los análisis en varias muestras para poder ratificar la constancia y verdad de esta última circunstancia anotada. En las membranas de quiste hidatídico y de placenta a cantidad de cobre está claramente aumentada en relación con las de otras muestras.

Las cantidades de manganeso son, en general, análogas a las de cobre e inferiores a las de hierro.

El hecho de hallar el molibdeno, en proporciones lindantes con el límite de sensibilidad, da cierta irregularidad a los resultados obtenidos lo cual no permite formarse un juicio exacto sobre su reparto en las muestras estudiadas. DINGWALE y DEANS [14] han encontrado dicho oligoelemento en carcinoma de mama y relacionan su

contenido con el desarrollo del tumor; nosotros también lo vemos en cantidad ligeramente mayor que en las demás muestras, precisamente en carcinoma de mama, y asímismo lo detectamos en carcinoma de útero aunque no se aprecia, en éste, aumento con relación a la parte normal del mismo órgano. En el bocio, tejido tumoral, aparece también y no en la cápsula fibrosa del mismo tiroides. En los miomas de útero existe pero no con constancia. Parece, pues, confirmarse, aunque no de modo tajante, las citadas observaciones de otros autores que establecen relación entre el contenido en molibdeno y el desarrollo de ciertos tumores.

El molibdeno y más claramente el cobalto, que son relativamente frecuentes en las cenizas, faltan precisamente en epiplón y en la capa seromuscular de estómago que llevaba adherida cierta cantidad de epiplón que no se separó debidamente. También se observa en el epiplón una baja, en relación con las demás muestras, de las cantidades de hierro y titanio.

Siempre aparece el hierro en proporciones superiores al cobre, pero se observa disminución del primero cuando se eleva el segundo. Dicho antagonismo puede tener relación con el que existe entre cupremia y sidcremia en algunos procesos infecciosos, estados carenciales, etc. hecho observado y comentado por diversos autores y que nosotros apuntábamos en un trabajo de revisión sobre los oligoelementos respiratorios [45].

CONSIDERACIONES GENERALES

Recogemos a continuación algunas consideraciones de tipo genérico referentes a la eficacia de la técnica analítica empleada en estas investigaciones, así como unos breves comentarios sobre los elementos químicos detectados en los diversos materiales biológicos en relación con su posición en el sistema periódico de los elementos y su distribución comparativa en los reinos vegetales y animal.

Eficacia del procedimiento espectroquímico

Además de los elementos químicos incluídos en nuestras tablas se han citado, entre otros, como constituyentes posibles del organismo:

arsénico, boro, berilio, cadmio, galio, germanio, rubidio, estroncio, talio y cinc. Nosotros solamente aportamos datos referentes a los dieciocho ya señalados.

Muchos autores emplean el procedimiento de combustión húmeda de los materiales a analizar con combinaciones de ácidos nítrico, sulfúrico y perclórico [39]. Nosotros hemos seleccionado la combustión seca si bien se hayan señalado defectos para ella tales como dar bajos resultados debidos a las entrainement mecánico del material en ignición o a la volatilización de complejos metálicos. Sin embargo lo preferimos ya que es más asequible, a nuestro modo de ver, y evitar la posible interferencia de los indicios de otros elementos que pueden aportar los reactivos.

Como dijimos la técnica espectroquímica que aplicamos a nuestros estudios bioquímicos es la semicuantitativa, por ser suficiente, en la mayoría de los casos, el conocimiento de la existencia de un elemento y de qué orden es su contenido. Desde luego tiene fallos y entre los que destacan la imposibilidad de llegar a un análisis riguroso de cierto oligoelementos importantes.

Así por ejemplo las líneas 2634,78 y 3071,59 Å del bario, aparecen en los espectrogramas como una sombra lo que indica que este elemento alcalinotérreo está contenido en todas las muestras analizadas en proporciones cercanas al límite de sensibilidad.

Del aluminio no se verifica el análisis cuantitativo y solamente se señala su presencia o no, por prestarse mal a la evaluación, de este elemento químico la técnica utilizada a causa de la frecuente caída de glóbulos de metal fundido, del cráter del electrodo inferior, lo cual es un gran inconveniente para la preparación de las escalas de persistencia.

Del boro no se puede aportar cifras ya que está presente en los electrodos como impureza.

Tampoco cabe incluir datos sobre el cinc, tan interesante como sabemos [19] porque su línea 3302,588 Å, se superpone a las del sodio 3302,323 y 3302,988 Å, que aparecen en todos los espectrogramas empastándose las tres, por el elevado contenido de sodio, y las 3345,02-3345,57 Å están enmarcadas por líneas de calcio o titanio.

La línea 3075,9 Å, de menos sensibilidad absoluta que las dos anteriores citadas, no aparece en los espectrogramas, aunque la zona correspondiente a esa longitud de onda, se encuentra libre de líneas de otros elementos.

Creemos a pesar de todo, que el análisis espectroquímico semicuantitativo es una técnica útil con la que se puede tener conocimiento de la carencia o exceso de un elemento que sea indispensable o nocivo para la vida y poner de manifiesto las anomalías en las concentraciones elementales.

Las valoraciones semicuantitativas se efectúan como hemos descrito por apreciación visual comparando el espectrograma con otro que contenga los elementos que se valoran en cantidades sucesivamente crecientes obtenidos con una muestra similar, y en caso de duda se comparan las intensidades con las correspondientes a líneas del elemento base o de alguno que esté en cantidad fija formando un par de líneas homólogas. De esta manera se llega, con un par de años de práctica en la interpretación, a valoraciones bastante aceptables.

Con la utilización de otros métodos de mayor sensibilidad, encontraríamos algunos elementos más, a la par que una mayor frecuencia de los que en nuestras tablas no llegan al 100%. Por ejemplo, sin variar la metódica, un simple cambio de zona nos permite ver con mayor facilidad los elementos alcalinos y alcalinotérreos, el vanadio cuyas líneas mejor 2348,610 Å, es de menor longitud de onda, etc.; el boro podremos reconocerlo bien utilizando otro tipo de electrodos soporte, etc.; en otros casos, para aumentar la sensibilidad sería preciso recurrir a los métodos de concentración por vía química.

A este respecto HEGGEN y STROCK [20] señalan que las determinaciones de oligoelementos por métodos espectrográficos requieren usualmente un enriquecimiento de los elementos y conversión de las muestras a una forma adecuada al análisis y a las diferentes calibraciones espectroquímicas. En su procedimiento emplean reactivos orgánicos para la separación y enriquecimiento de la plata, aluminio, bismuto, cobalto, cromo, cobre, hierro, molibdeno, níquel, plomo, estaño, titanio, vanadio y cinc. Este método lo han aplicado para analizar ampliamente diferentes muestras tales como agua, nieve, ro-

cas, minerales, suelos, carbones, petróleo, plantas y tejidos y líquidos biológicos.

El cupferron lo han utilizado STROCK y DREXLER [64] como precipitante en la determinación espectroquímica del titanio, vanadio y circonio en guas minerales. Por este tiempo MITCHELL y SCOTT [34 y 35] propugnaron también el uso de mezclas de reactivos orgánicos y desarrollaron un procedimiento espectrográfico para el análisis de precipitados combinando 8-quinolinol, ácido tánico y tionalida como agentes precipitantes.

En el artículo publicado por DEAN GUELLENZU [6] pueden verse bosquejadas las posibilidades que ofrece la técnica espectroquímica en la investigación, cuali y cuantitativa, de materiales biológicos y allí se establece la necesidad de elegir y seleccionar perfectamente todos los detalles de la marcha a seguir en cada problema concreto que tratamos de resolver.

Oligoelementos encontrados y sistema periódico

De los cien elementos que se incluyen actualmente en el sistema periódico, un gran número de ellos, han sido relacionados con los procesos vitales, tanto en el reino vegetal como en el animal.

Fearon fué el primero que hizo notar el hecho de que todos los elementos que hasta ahora han sido encontrados en el organismo, pueden ser separados de los restantes, mediante una sola línea límite.

En el sistema periódico los cuerpos simples pueden ser divididos en tres grandes grupos. En el medio se encuentra el grupo de las tierras raras. Por encima se encuentran los elementos radioactivos (en los que a masa se refiere), y según refiere CRISTOL, es digno de señalarse que los elementos bioquímicos están en su mayor proporción en la primera parte del sistema periódico; por debajo de las tierras raras desde el punto de vista de la masa de los elementos.

FREY-WYSSLING ha demostrado que la posición de los elementos indispensables, para la alimentación de las plantas, se puede fijar por una línea que va del carbono al argón y a la que denomina « línea de sustancias alimenticias ». Todos los más importantes oligoelementos para los vegetales, desde el punto de vista nutritivo, están en vecin-

dad inmediata con ella, excepto el hidrógeno, el galio y el molibdeno; estos dos últimos han sido reconocidos recientemente como imprescindibles. Para la alimentación animal pudiera servir también dicha línea, aunque algunos oligoelementos tan importantes como el yodo quedan algo desplazados de ella.

Adjunta reproducimos la tabla del sistema periódico de los elementos en la que encerramos en un doble círculo los elementos químicos que aparecen tanto en materiales vegetales como en animales. Los circundados una sola vez corresponden a los elementos encontrados solamente en plantas y los que aparecen dentro de un cuadrado son aquellos que consideramos como eminentemente accidentales.

Del somero exámen de dicha tabla se deduce lo siguiente:

De los cuatro elementos que podríamos reconocer del segundo periodo aparecen solamente el litio contenido en las muestras en el 100% (vegetales), 74% (animales) y 95,7% (tejidos humanos). El berilio no aparece en ninguno.

Del tercer periodo se pueden investigar por nuestra técnica el aluminio y silicio y cada uno de ellos se ha encontrado en todas las muestras.

En el cuarto periodo se pone un predominio de los elementos correspondientes a las columnas con respecto a las *b*. En todas las muestras se halla manganeso, hierro y cobre; el níquel en el 100% (vegetales), 42% (animales) y 93,5% (tejido humano). Aparecen en los grupos IV^a, V^a respectivamente el titanio (100% en vegetales, 19% en animales y 100% en tejidos humanos) y el vanadio (19% en vegetales, 8% en animales y 41,3% en tejidos humanos). El cobalto en el 19% (vegetales), 16,5% (animales) y 71,7% (tejidos humanos). El cromo se presenta solamente en pocas muestras principalmente vegetales 3,5% y en animales 0,5% y debe acogerse su presencia con reservas, ya que otras muestras de la misma naturaleza no le acusan.

En el quinto período encontramos molibdeno en el 56% (vegetales), 41,5% (animales) y 54,4% (tejidos humanos) de las muestras; plata en el 19% (vegetales), 18,5% (animales) y 4,3% (tejidos humanos); estaño en vegetales (2%) y animales (29%) y el circonio solamente en vegetales con frecuencia del 0,3%. No predominan aquí los de los grupos *a* con respecto a los de los *b*.

En el sexto período hallamos el bario y plomo en las muestras con las frecuencias respectivamente de 100% y 40% (vegetales), 93% y 95% (animales) y 100% y 93,5% (tejidos humanos). El wolframio es exclusivo de alguna muestra vegetal con un 11% de frecuencia.

Del séptimo período no aparece ningún elemento químico en los materiales examinados.

Exámen comparativo de los resultados

En la tabla IV, de conjunto, se incluye la concentración media y la frecuencia por ciento de los oligoelementos encontrados en los materiales analizados, tanto en vegetales (277 muestras) como en animales (244 muestras) y tejidos humanos (46 muestras). Los resultados del análisis que van incluidos en este trabajo corresponden como ya hemos visto a doscientas catorce muestras de vegetales y doscientas una muestras de animales; la tabla por tanto recoge también otras determinaciones nuestras complementarias realizadas en otras ocasiones. Se señalan los límites de sensibilidad para cada elemento químico y puede observarse que el bario, circonio y wolframio está en dicho límite. Para el aluminio no se indican cifras solamente se expresa su presencia con una cruz.

Del exámen de dicha tabla se deduce que el aluminio, el cobre, el hierro, manganeso y silicio son constantes, ya que aparecen en el 100% de las muestras cualesquiera que sea su origen. Del bario podríamos decir lo mismo si bien en animales falta en un 7% de las muestras, pero ninguna de ellas corresponde a alimentos que dan el 100%. El titanio es constante en los tejidos humanos analizados y en los alimentos vegetales, pero muchos alimentos animales carecen de él y en algunos es accidental ya que las muestras que lo acusan está salazonadas.

El litio, níquel, y plomo también se encuentran en gran número de muestras de todo tipo en algunas en proporciones del 100%.

Con distribución más reducida en los dos reinos puede considerarse a la plata, el cobalto, el molibdeno y el vanadio.

El circonio solamente aparece en un 0,3% de vegetales y el wolframio en un 11%, concretamente en vinos de Oporto.

Como vemos todos los elementos químicos encontrados en tejidos humanos aparecen en los alimentos tanto vegetales como animales.

Desde luego no podemos aclarar, como es lógico, operando con cenizas, si los oligoelementos investigados existen combinados o en estado libre pero en la mayor parte de los casos hay que suponer que están unidos a moléculas proteicas y que influirán en la actividad de las enzimas o sistemas enzimáticos. Recordemos que el aluminio activa el sistema succinodeshidrogenasa-citocromoxidasa; el cobalto forma parte de las cobalaminas y activa juntamente con el cinc y el níquel la insulina; el cinc forma parte de la carboanhidrasa y posiblemente de la uricasa, carnosinasa y ciertas peptidasas. El cobre existe en las polifenolas y el molibdeno es un componente no dializable de la xantinoxidasa [65]. El Fe es constituyente de hemoglobinas, citocromos, catalasas y peroxidases, y el manganeso está contenido en la arginasa y enolasa y contribuye a la acción de las coenzimas, fosfatas, colinesterasas y fosforilasas.

Respecto a la existencia en animales, seres humanos y vegetales de los elementos químicos detectados observamos que en animales aparece más veces el estaño que en los vegetales, debido probablemente al mayor número de muestras correspondientes a productos en conserva. No existe este elemento químico en los tejidos humanos, como esperábamos dado su carácter más bien contaminante en los alimentos, y lo mismo ocurre con el cromo.

Todos los oligoelementos buscados aparecen en ambos reinos como hemos dicho, las únicas excepciones son las ya indicadas del circonio y del wolframio que son exclusivos de ciertos alimentos vegetales.

La plata tiene una frecuencia menor en tejidos humanos que en tejidos animales y vegetales; el cobalto en tejidos humanos y en vegetales aparece en concentraciones menores en general que en tejidos animales pero con mayor frecuencia en los primeros; el molibdeno existe en tejidos humanos en concentraciones en general menores y con frecuencia casi análoga a los tejidos vegetales y también próximos a la de los animales.

El níquel es más frecuente en tejidos humanos y vegetales que en animales y sus concentraciones semejantes.

El titanio presenta una frecuencia máxima en tejidos humanos y en vegetales y grandemente menor en animales.

El vanadio posee una frecuencia sensiblemente mayor en tejidos humanos que en tejidos vegetales o animales.

En los vegetales e igualmente, de modo muy frecuente, en los animales, las cantidades de hierro en las cenizas son en general mayores que las de manganeso, y estas que las de cobre, níquel y cobalto. Sin que podamos aceptarlo con carácter absoluto se puede, para los oligoelementos respiratorios, establecer la relación siguiente:



Excepto plata, estaño, wolframio, circomio y cromo hallamos los demás oligoelementos con más constancia en general en tejidos humanos que en animales y en muchos casos también que en los vegetales.

Per.	0	I _a	II _a	III _a
1	H			
2	He		Be	B
3	Ne	Na	Mg 	Al 
4	A	K	Ca 	Sc 
5	Kr	Rb	Sr 	Y 
6	Xe	Cs 	La 	Hf 
7	Rn	Fr	Ra 	Ac 
			Th	Pa 

Sistema Periódico

	IV _b	V _b	VI _b	VII _b	0
					H He
	C	N	O	F	Ne
	P	S	Cl	A	
	Zn 	Ga 	As 	Se 	
	In 	T _b 	I 	Xe	
	Ag 	Cd 	Bi 	At 	
	Ge 	Tl 			

	Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Er	Tm	Yb	Lu
	Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Ae Cr

RESUMEN

Del estudio de los resultados del análisis oligoelemental, mediante técnica espectroquímica, de cereales, legumbres, hortalizas, frutas, condimentos, estimulantes, tubérculos, semillas y frutos secos, carnes de mamíferos, pescados, mariscos, embutidos, leche, huevos, aves, cecina y piel, de uso corriente de la alimentación del pueblo español, así como de algunas muestras de tejidos humanos normales y patológicos, se deducen las siguientes consideraciones generales :

Alimentos de origen vegetal. — Se encuentran como elementos catalíticos constantes y por tanto como posiblemente indispensables, en todas las muestras, aluminio, bario, cobre, hierro, litio, manganeso, níquel, silicio y titanio.

Las frecuencias del 41% el molibdeno y plomo, del 25% el cobalto, del 12% el vanadio y del 8% la plata, permiten clasificar estos elementos químicos como inconstantes.

Se intuye, por los resultados analíticos obtenidos, la localización preferente del molibdeno en las semillas.

Respecto al cobalto se observa en general algo análogo a lo indicado para el molibdeno en la conclusión anterior, y de un modo particular en las legumbres.

Las irregularidades comprobadas en la distribución del plomo ratifican la creencia de que, este elemento químico, sea accidental en las plantas.

Los productos en conserva tienen estaño, elemento que debemos considerar como accidental puesto que no aparece en ningún otro material analizado. Se percibe además en dichas muestras un ligero enriquecimiento en hierro y plomo.

Alimentos de origen animal. — Se encuentran como elementos catalíticos constante en todas las muestras aluminio, bario, cobre, hierro, manganeso, silicio y plomo.

Aparecen como elementos químicos inconstantes el litio, molibdeno, níquel, estaño, plata, cobalto y titanio con frecuencias del 68%, 36%, 31%, 14%, 9% y 8% respectivamente.

Cualquiera de los alimentos de origen animal que ha sido objeto de nuestras investigaciones puede asegurar el aporte al organismo de aluminio, bario, cobre, hierro, manganeso, silicio y plomo, y esta constancia lleva a considerar que estos cuerpos simples sean indispensables y desempeñen una misión fisiológica determinada.

La plata la consideramos como elemento accidental, ya que su distribución, preferentemente en el lomo de los mamíferos, no hace pensar que intervenga en procesos metabólicos importantes lo que ratifica las investigaciones de numerosos autores.

El cobalto es constante en moluscos y miel y existe en otros alimentos de origen animal.

El silicio, a pesar de su elevado tanto porcentual, tiene una distribución irregular que no permite clasificarlo netamente como oligoelemento.

Del níquel puede admitirse su existencia como elemento accidental aunque hay autores que le asignan acciones activadoras de fermentos y sinérgicas del efecto del cobalto.

La existencia constante del molibdeno en órganos metabólicamente activos (vísceras de mamíferos y aves) inclinan a considerarle como oligoelemento.

El estaño debe ser aceptado genéricamente como elemento accidental, especialmente en algunas muestras tales como las conservas en envases metálicos.

Del titanio se indica que activa las deshidrogenasas de los ácidos grasos en el hígado y en este aspecto por su localización se le puede atribuir función oligoelemental.

Una serie de elementos como bario, cobre, hierro, litio y manganeso están en las cenizas de los alimentos de origen animal en proporciones análogas a las que figuran en la corteza; otro cierto número tiene en cambio menor concentración, tales como el cobalto, níquel, plomo, estaño y titanio.

Tejidos humanos normales y patológicos. — Se hallan en la totalidad de las cenizas analizadas, los oligoelementos aluminio, bario, cobre, hierro, manganeso, silicio y titanio.

Con menos frecuencia que los anteriores, encontramos los siguientes:

litio en el 95,7% de las muestras, níquel y plomo en el 93,5%, cobalto en el 71,7%, molibdeno en el 54,4%, vanadio en el 43,3% y plata en el 4,3%.

Todos los oligoelementos citados en la conclusión anterior, excepto la plata, aparecen con mayor constancia en tejidos humanos que en tejidos animales, lo que da idea de la accidentalidad de este elemento químico en los tejidos humanos.

De los oligoelementos respiratorios es el hierro el que corrientemente se halla en proporción mayor, siguen después cobre y manganeso, según los materiales, y las menores cantidades corresponden al cobalto. Las de níquel son muy variables, pudiendo igualarse con las de hierro, o las de cobalto según el caso.

Se observa un aumento de la proporción de cobre en las muestras en que disminuye la de hierro, lo cual puede ser una prueba más del posible antagonismo existente entre estos oligoelementos.

La cifra de cenizas de una serosa examinada (epiplón gastrocólico) son inferiores a las de los demás tejidos analizados y son, además, más pobres en oligoelementos que las capas mucosa y seromuscular del estómago; especialmente disminuyen cobalto, hierro, molibdeno y titanio.

No se comprueba la disminución de la proporción de cobre en tejidos tumorales en relación con los normales señalada por algunos investigadores y más bien no existe variación en el tanto per ciento de dicho oligoelemento. A veces existe un aumento más o menos marcado en tejidos anormales, como ocurre, por ejemplo, en el bocio.

Parece confirmarse la relación entre el contenido de molibdeno y el desarrollo de ciertos tumores, si bien las limitaciones de la técnica nos impiden sentar afirmaciones concluyentes.

R E S U M E

La distribution de certains oligoéléments dans les aliments et dans les tissus humains

Nous avons fait des déterminations systématiques de certains oligoéléments contenus dans les aliments et dans les tissus de l'organisme humain, en employant une simple technique d'analyse spectrographique semi quantitative, qui nous a permis d'obtenir des données sur dix-huit éléments contenus en quantité infinitésimale, dans des matières alimentaires d'origine végétale et animale et dans des tissus normaux et pathologiques humains. Nous sommes arrivés à certaines conclusions qui pourraient être utiles aux buts poursuivis par la Semaine d'Etude et nous avons obtenu, en outre, de nombreuses données qui, même si elles ne sont pas très précises, possèdent, par contre, une valeur appréciable au point de vue de l'orientation de nos recherches.

Ce travail fait partie d'une série de recherches conduites pour déterminer la teneur en oligoéléments des aliments d'origine végétale et animale, et des tissus normaux et pathologiques de l'homme. Nous y donnons aussi un sommaire des résultats d'analyses d'oligoéléments contenus dans des échantillons de céréales, de légumes, de fruits, de condiments et d'épices, de tubercules, de graines, de fruits secs, de viande de différents mammifères, poissons, crustacés et mollusques, de produits de charcuterie, de lait et de ses dérivés, de miel et d'oeufs, ainsi que de différents tissus humains, tels que la matrice, les ovaires et le vagin, l'estomac, etc.

Nous ne mentionnons que les éléments que nous avons pu déterminer d'une façon très précise, exception faite pour les substances exerçant un effet plastique. (C.N.H.O.Cl.S.P.Na.E.Ca.Mg) étant donné que certaines représentent des impuretés provenant des électrodes ou sont dues à d'aut-

tres causes. C'est pourquoi nous n'avons pas cru opportun de nous en occuper, bien que différents auteurs les considèrent comme des éléments constants. Les résultats sont exprimés en grammes de cendres.

Aliments d'origine végétale

Nous avons étudié un ensemble de deux cent matières végétales, distribuées parmi les groupes bromatologiques suivants: 10 échantillons de céréales, 29 de légumes, 47 de plantes horticoles, 72 de fruits, 32 de condiments et épices, 21 de tubercules, de graines et de fruits secs.

Nous donnons dans le Tableau I les résultats obtenus, en y indiquant la limite de sensibilité, le nombre des échantillons et des prélèvements, le pourcentage des fréquences, les quantités approximatives dans un gramme de cendre et autres remarques.

Nous avons pu constater une fréquence de 100% des oligoéléments suivants: aluminium, baryum, cuivre, fer, lithium, manganèse, nickel, silicium et titane. Nous ne faisons pas mention du bore et du zinc pour les causes déjà indiquées auparavant. Nous avons pu observer qu'en général le cuivre est présent en quantités inférieures par rapport au fer; les proportions du manganèse varient assez considérablement; nous avons détecté le molybdène et le plomb à une fréquence de 50% environ.

10% seulement des échantillons soumis à l'analyse spectrochimique contenaient de l'argent. Nous avons pu établir la présence du cobalt à une fréquence de l'ordre de 25% des substances étudiées. L'étain n'a été détecté que dans les conserves et, par conséquent, il est logique de supposer qu'il provient des boîtes. Enfin, on a constaté la présence du vanadium dans 12% des végétaux analysés.

Aliments d'origine animale

Nous avons étudié un ensemble de 201 aliments d'origine animale, appartenant aux groupes bromatologiques suivants: 85 échantillons de viande de différents mammifères; 38 de poissons; 8 de crustacés et de mollusques; 17 de différents produits de charcuterie; 24 de lait et de ses dérivés; 23 de gibier et d'oiseaux de basse-cour; 6 de viande fumée, de miel et d'oeufs. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le Tableau II, dans lequel nous indiquons, comme dans le précédent, la limite de sensibilité,

le nombre des échantillons et des prélèvements, le pourcentage de fréquence, les quantités approximatives dans un gramme de cendres et autres observations pertinentes.

Tissus d'organes du corps humain

Nous avons analysé 47 échantillons de tissus physiologiques et pathologiques de l'homme, à savoir: 16 échantillons de matrice, 9 d'ovaires et de vagin, 14 d'estomac et 7 d'autres tissus différents (un échantillon de glande mammaire cancéreuse, un de la membrane d'un kyste hydatique du foie, un échantillon de glande thyroïde goitreuse, et 3 échantillons de placenta normal lavé).

Le Tableau III illustre la distribution générale des éléments détectés dans les 46 échantillons analysés. Nous y indiquons pour chaque élément avec la précision consentie par la technique employée, combien de fois et avec quel pourcentage de fréquence la présence de chaque élément a été constatée, ainsi que les limites des proportions entre lesquelles varie la teneur en chacun de ces éléments dans les cendres analysées.

L'examen des données ne nous autorise vraiment pas à tirer des conclusions importantes au point de vue biochimique. La présence de l'aluminium, du baryum, du cuivre, du fer, du manganèse, du silicium et du titane est constante et pratiquement aussi celle du lithium et du plomb. Il n'en est pas de même pour l'argent, le cobalt, le molybdène et le vanadium, dont les quantités varient d'une façon très irrégulière.

Les oligoéléments répertoriés dans le système périodique

Nous donnons en annexe le Tableau du système périodique des éléments, dans lequel nous avons entouré d'un cercle double les éléments chimiques qui se trouvent tant dans les matières végétales que dans les tissus animaux. Les symboles des éléments entourés d'un seul cercle, correspondent aux éléments que l'on trouve seulement dans les plantes, tandis que les éléments inclus dans un carré sont ceux dont la présence est, selon nous, purement accidentelle.

Examen comparé des résultats

Le Tableau IV contient des indications concernant la concentration moyenne et le pourcentage des fréquences des oligoéléments détectés dans

les matières analysées, à savoir dans les matières végétales (277 échantillons), animales (244 échantillons) et dans les tissus de l'homme (46 échantillons). Les résultats des analyses rapportées dans ce travail concernent, comme nous l'avons déjà dit, 200 échantillons de matière végétale et 200 échantillons de matière animale; le tableau contient aussi les résultats d'autres déterminations supplémentaires faites dans d'autres occasions. Il donne aussi les limites de sensibilité pour chaque élément. On peut constater que les taux du baryum, du zirconium et du tungstène sont à la limite. Aucun chiffre n'est donné pour l'aluminium, dont la présence est indiquée seulement par une croix.

On peut déduire de l'examen de ce tableau que l'aluminium, le cuivre, le fer, le manganèse et le silicium sont toujours présents, étant donné qu'ils ont été détectés dans 100% des échantillons, quelle que fût leur origine. Nous pouvons affirmer la même chose pour le baryum, bien qu'il soit absent dans 7% des échantillons de matière animale.

La présence du titane est constante dans les tissus de l'homme et les aliments d'origine végétale analysés, tandis que dans beaucoup de substances animales il est absent, que dans certaines sa présence est accidentelle et que les échantillons dans lesquels il est contenu, sont des échantillons de produits de charcuterie.

Le lithium, le nickel et le plomb se rencontrent très souvent dans ces échantillons de tous les types d'aliments et dans certains ils se rencontrent avec une fréquence de 100%.

L'argent, le cobalt, le molybdène et la vanadium se rencontrent beaucoup plus rarement dans le deux règnes, végétal et animal.

Le zirconium se trouve seulement dans 0,3% des végétaux et le tungstène dans 1%; ce dernier est contenu, en particulier, dans les vins de Porto.

Nous pouvons donc constater que tous les éléments chimiques qui se trouvent dans les tissus organiques de l'homme, se rencontrent aussi dans les aliments d'origine végétale et animale.

Cependant, il est clair que nous ne sommes pas en état de déterminer, vu que nous faisons l'analyse des cendres, si les oligoéléments étudiés forment des composés ou se trouvent à l'état libre; toutefois nous pouvons pré-

sumer que dans la plupart des cas, ils se trouvent liés à des molécules protéïques qui influencent l'activité des enzymes ou des systèmes enzymatiques.

Nous rappelons que l'alluminium active le système succinodéhydrogénase-cytochromoxydase; le cobalt fait partie des cobalamines et active, ensemble avec le zinc et le nickel, l'insuline; le zinc fait partie de la carbonanhydrase et probablement de l'uricase, de la carnosinase et de certaines pepsidases. Le cuivre est contenu dans les polyphénolases, et le molybdène est un composant non dialysable de la xanthinoxydase.

Le fer est un composant des hémoglobines, des cytochromes, des catalases et des peroxydases; le manganèse est contenu dans l'arginase et l'énoïlase et participe à l'action des cozymases, des phosphatases, des cholinestérases et des phosphorylases.

En ce qui concerne la présence dans les tissus des animaux, de l'homme et des végétaux des éléments chimiques détectés, nous pouvons faire observer que l'étain se trouve plus fréquemment dans les tissus animaux que végétaux; ce fait doit être probablement attribué au plus grand nombre d'échantillons de produits en conserve.

Cet élément n'est pas présent dans les tissus humains; dans les aliments, nous pensons, qu'il provient d'une contamination. On peut en dire autant du chrome. Tous les oligoéléments étudiés sont présents dans les deux règnes, végétal et animal, sauf les deux exceptions déjà signalées, concernant le zirconium et le wolfram qui se trouvent exclusivement dans certains aliments d'origine végétale.

L'argent se rencontre moins fréquemment dans les tissus du corps humain, que dans les tissus animaux et végétaux; le cobalt a, en général, une moindre concentration dans les tissus organiques de l'homme et des végétaux que dans les tissus animaux; toutefois, on le rencontre plus fréquemment dans les premiers; le molybdène se trouve dans les tissus organiques de l'homme à des concentrations généralement inférieures, mais avec une fréquence à peu près pareille que dans les tissus végétaux et à peu près égale à la fréquence avec laquelle on le détecte dans les tissus animaux.

Le nickel se trouve plus fréquemment dans les tissus du corps humain et dans les végétaux que dans les tissus animaux, mais à des concentrations à peu près semblables.

Le titane se rencontre plus fréquemment dans les tissus de l'homme et des végétaux et beaucoup plus rarement dans les tissus d'origine animale. Le vanadium se rencontre beaucoup plus fréquemment dans les tissus du corps humain, que dans les matières animales ou végétales. Dans les tissus végétaux, et encore plus fréquemment dans les tissus d'origine animale, le fer dans les cendres se trouve généralement en quantité supérieure à celle du manganèse, du cuivre, du nickel et du cobalt. C'est pourquoi nous pouvons établir comme caractéristique des oligoéléments respiratoires, la séquence suivante :

Fe Mn Cu Ni Co

A l'exception de l'argent, de l'étain, du tungstène, du zirconium et du chrome, nous avons pu constater plus fréquemment la présence d'oligoéléments dans les tissus de l'homme, que dans les tissus d'origine animale, ainsi que dans beaucoup de matières végétales.

Voir la discussion à page 571

BIBLIOGRAFIA

- [1] ALBAREDA HERRERA, *Los oligoelementos en Geología y Biología*. Madrid 1952.
- [2] BOID Y DE, « Indian. J. Med. Research. », 20, 789, 1933 y « Chem. Abstr. » 2190, 1933.
- [3] CARDÀ APARICCI, *Recientes avances en Veterinaria. V. Metabolismo mineral*. Madrid 1949.
- [4] CARRUTTERS Y SUNTZEFF, « J. Biol. Chem. », 159, 647, 1945.
- [5] DANIEL, *Mineral needs of man trace elements*. U.S. Dept. Agr. Year book. 1939.
- [6] DEAN GUELLENZU, « Información Química Analítica », 5, 172, 1951.
- [7] — « Anal. R. Ac. Farm. », 17, 237, 1951.
- [8] — « Anal. R. Ac. Farm. », n. 1, 57, 1953.
- [9] DEAN GUELLENZU, LÓPEZ AZCONA y SANTOS RUIZ, « Anal. Fis. Quím. », 42, 508, 1946.
- [10] — « R. Esp. Fisiol. », 7, 63, 1951.
- [11] — « R. Esp. Fisiol. », 8, 117, 1952.
- [12] — « Anal. Inst. Esp. Edaf. Ecol. y Fisiol. Veg. », 3, 1, 1944.
- [13] DEAN GUELLENZU, SANTOS RUIZ, LÓPEZ AZCONA, COMENGE GERPE y SAMPEDRO PIÑERO, *Application de l'analyse spectrographique semi quantitative à l'investigation biochimique des oligoéléments*. Comunicación presentada al II Congreso Internacional de Bioquímica. París, 21-27 Julio 1952.
- [14] DINGWALE y BEANS, « Proc. Natur. Acad. Sci. U.S.A. », 20, 416, 1934.
- [15] DUTOIT y ZBINDEN, « Comp. Rend. Acad. Sci. », 188, 1628, 1929 y 190, 172, 1930.
- [16] ECHAVE, *El metal cobre en biología*. El Ateneo. Buenos Aires.
- [17] GILBERT, *Universal nutrition of plants and animals*. London, 1950.
- [18] GUERITHAULT, « Bull. Soc. Hyg. Aliment. », 15, 386, 1927 y « Chem. Abstr. » 809, 1928.
- [19] HEATH, « Nature », 164, 1055, 1949.
- [20] HEGGEN y STROCK, « Anal. Chem. », 25, 859, 1953.
- [21] HEILMEYER, KEIDERLING y STUWE, *Kupfer und Eisen als Körpereigene Wirkstoffe*. Jena, 1941.
- [22] HEILMEYER y PLATNER, *Das Serum-eisen und die Eisenmangelkrankheit*. Jena, 1937.
- [23] KIJNKE, *Mineralstoffwechsel*. Viena, 1931.
- [24] LÓPEZ AZCONA, *Análisis espectroquímico cuantitativo por emisión*. Madrid 1944.
- [25] LÓPEZ AZCONA, DEAN GUELLENZU y SANTOS RUIZ, « Rev. Inst. Geol. v Min. », 43, 7, 1945.
- [16] Santos-Ruiz - pag. 32

- [26] LÓPEZ AZCONA, SANTOS RUIZ y DEAN GUELLENZU, « Anal. Fis. Quím. », 41, 1358, 1945.
- [27] — « Anal. Fis. Quím. », 42, 825, 1946.
- [28] — « Anal. Fis. Quím. », 42, 833, 1946.
- [29] — « Anal. Fis. Quím. », 45, 919, 1949.
- [30] — « R. Esp. Fisiol. », 8, 13, 1952.
- [31] — « R. Esp. Biol. Fisiol. », 8, 149, 1952.
- [32] LÓPEZ AZCONA, SANTOS RUIZ y SAMPEDRO PIÑEIRO, « R. Esp. Fisiol. », 4, 229, 1949.
- [33] LUNDEGARDH, *Die Nahrstoffaufnahme der Pflanzen*. Jena, 1932.
- [34] MITCHELL, *The spectrographic analysis of soils plants and related materials*. « Aberdeen Analyst », 71, 361, 1946 y « Tech. Commun. », 44, 1948.
- [35] MITCHELL y SCOTT, « J. Soc. Chem. Ind. », 66, 330, 1947 y « Spectrochimica Acta », 3, 367, 1948.
- [36] MÖRNIER-WILLIAMS, *Trace Elements in Food*. New York, 1950.
- [37] OKAJIMI, « Acta Schol. Med. Univ. Imp. Kioto », 14, 88 y 93, 1931 y « Chem. Abstr. », 201, 1932.
- [38] OLSON, HEGGEN, EDWARDS y GORHAM, « Science », 119, 772, 1954.
- [39] PIPER, *Soil and Plant Analysis*. University of Adelaide. Australia, 1942.
- [40] ROHOLM, *Flourine intoxication*. London, 1937.
- [41] SAMPEDRO PIÑEIRO, LÓPEZ AZCONA y SANTOS RUIZ, « R. Esp. Fisiol. », 4, 233, 1949.
- [42] SANGUINETTI, *Aplicación clínica y dietética del metabolismo mineral*. Buenos Aires.
- [43] SANTOS RUIZ, *Bioquímica de los elementos*. Madrid, 1945.
- [44] SANTOS RUIZ, COMENGE GERPE y LÓPEZ AZCONA, « Anal. R. Ac. Farm. », 1, 89, 1944.
- [45] SANTOS RUIZ y DEAN GUELLENZU, « Ion », 8, 930, 1948.
- [46] — *Recherches séries des oligoéléments par la méthode spectrochimique*. Ponencia presentada al XXIII Congreso Internacional de Química Industrial. Milán, Septiembre 1950; « Chim. Ind. », n. 2 bis, 186, 1952.
- [47] SANTOS RUIZ, DEAN GUELLENZU y LÓPEZ AZCONA, « Anal. Fis. Quím. », 42, 657, 1946.
- [48] — « Anal. R. Ac. Farm. », 13, 269, 1947.
- [49] — *La investigación bioquímica de los oligoelementos mediante técnica espectrográfica*. Ponencia presentada al VI Congreso Internacional de Patología Comparada. Madrid, 4 a 11 de Mayo de 1952.
- [50] — « R. Esp. Fisiol. », 8, 49, 1952.
- [51] — « R. Esp. Fisiol. », 8, 207, 1952.
- [52] SANTOS RUIZ, LÓPEZ AZCONA y SAMPEDRO PIÑEIRO, « R. Esp. Fisiol. », 4, 163, 1948.
- [53] — « R. Esp. Fisiol. », 4, 237, 1949.
- [54] SANTOS RUIZ y PORTÚS SERRANO, « Rev. R. Ac. Ciencias », 41, 1945.
- [55] SANTOS RUIZ y SANTOS MERINO, « Anal. Fis. Quím. », 42, 1147, 1946.
- [56] SANTOS RUIZ y SANZ MUÑOZ, « Anal. Fis. Quím. », 43, 426, 1947.
- [57] SANTOS RUIZ, VILLAR PALASÍ, PORTÚS SERRANO y SANZ MUÑOZ, « R. Esp. Fisiol. », 5, 213, 1949.

- [58] SCHARRER, *Chemie und Biochemie des Jods*. Stuttgart, 1929.
- [59] — *Biochemie der Spurenelemente*. Berlin, 1941.
- [60] SEEKLES, *Algunos problemas de bioquímica veterinaria*. Madrid, 1950.
- [61] SELDON y RAMAGE, *Biochem. J.*, 201, 608, 1931.
- [62] SHOHL, *Mineral Metabolism*. New York, 1939.
- [63] STILES, *Trace elements in plants and animals*. New York, 1946.
- [64] STROCK y DREXLER, *J. Opt. Soc. Amer.*, 31, 167, 1941.
- [65] TOTTER, BURNETT, MONROE y WHITNEY, « *Science* », 118, 555, 1953.
- [66] WALLACE, *The Diagnosis of mineral deficiencies in plants*. London, 1943.
- [67] WHITE, « *Lancet* », 2, 701, 1921 y « *Chem. Abstr.* », 119, 1922.
- [68] WILLS, *Bibliography of references to the literature on the minor elements and their relation to the Science of plant nutrition*. « Chilean nitrate Educ. Bar ». New York, 1939, y suplementos.
- [69] WIRSHAFTER, *Mineral in nutrition*. New York, 1942.
- [70] YUSTA ALMARZA y SANTOS RUIZ, « *Anal. Fís. Quím.* », 50, 95, 1954.

SOME CLINICAL ASPECTS OF THE TRACE ELEMENTS

R. A. McCANCE

One animal is very like another and the basic biochemistry of all the mammals is very much the same. This generalisation does not necessarily apply to the lower orders, or even to the birds, and among the invertebrates, for instance, the transport of oxygen is effected by several quite different physicochemical methods. We may feel fairly certain, however, that molybdenum will turn out to be an important part of the xanthine oxidase system in man just as it has been shown to be of that in rats (MAHLER, et al., 1954; MACKLER, et al., 1954). All the mammalia require copper, cobalt and zinc, they probably combine them into very similar compounds, and utilise them on the same enzymic systems — carbonic anhydrase for example (BERFENSTAM, 1952) or butyryl coenzyme A dehydrogenase (MAHLER, 1954). Nevertheless, the ruminants introduce puzzling but important practical and theoretical problems of their own, and there are certain features of human physiology which tend to set man a little apart from the lower animals. Furthermore, the diseases to which man is heir, and their alleviation, have been and are being so intensively studied that many problems have been discovered and devices used for their solution (ROBINSON, 1950) which are so far almost specific for man.

I propose to discuss a few of these problems — it would be impossible to discuss them all — and I have selected 4 which have all got a clinical, or at any rate, a medical interest. The first concerns copper, a metal with recognised physiological functions in the body. The second concerns cobalt, which is also a physiological metal in its organic and inorganic states, and which is now being used therapeut-

ically in both forms. The third problem concerns mercury, an old therapeutic agent, which has recently been held to be the cause of a serious and sometimes fatal disease of young children. The fourth problem concerns fluorine, which may or may not be a physiological element, according to the view one takes, but which is certainly an element with potential dangers but great therapeutic possibilities. In each case I shall make the approach from the clinical rather than the chemical point of view.

WILSON'S DISEASE (HEPATO-LENTICULAR DEGENERATION)

In 1911-12 KINNIER WILSON wrote a masterly paper in « Brain » in which he described in great clinical and pathological detail the disease which has subsequently been coupled with his name. He made no claim that he was the first person to recognise the syndrome and he gave the fullest credit to GOWERS, OMEROD and HOMÉN for their work on the subject. The importance of his paper lays in the fact that it was a very complete description covering both the acute and chronic forms and that no instance of the disease had been recorded for the previous 20 years. In other words, the disease, if not new in the technical sense, was new to the generation practising medicine in 1912, and no one who had read WILSON's paper was likely thereafter to forget it.

I was fortunate enough to be one of KINNIER WILSON's students after the first world war when he was on the staff at King's College Hospital, and I have always been interested in this disease which remained one of the unsolved problems of neurology for many years. It is, as many of you know, a familial disease, and its genetic aspects have recently been studied and described by BEARN (1953). It has an acute and a chronic form and tends to attack young persons, who begin to suffer from anorexia, pain, hypertonia, contractures, intention tremor, emotionalism, slurring speech and emaciation. At post mortem they are found to have extensive degenerations in the basal ganglia and cirrhosis of the liver. The latter seldom gives any clinical indication of its presence during life. Many cases have been added to the medical literature since 1912, some of them quite recently (DIAZ et al., 1952).

The aetiology of this disease remained quite obscure till the late forties, but between the end of the second world war and 1950 two important discoveries were made about it. The demyelinating diseases of sheep which had been found to be coupled in some way with a copper deficiency led various investigators to study the metabolism of copper in human demyelinating diseases, such as disseminated sclerosis, and MANDELBROTE et al. (1948) included among their cases one of WILSON's disease. They found a great excess of copper in the urine, which has been amply confirmed since that time (PORTER, 1951), and in 1948 CUMINGS found a considerable retention of copper in the liver, caudate nucleus, thalamus, and putamen, and also in the cortical grey and white matter of three cases of WILSON's disease which were all verified by histological examination after death. This work confirmed some pioneer investigations by HAUROWITZ (1930) and GLAZEBROOK (1945). There was nothing very remarkable in the findings of excess copper in the liver, for this had been found before in cirrhosis from other causes, but the findings in the brain were highly suggestive.

1948 witnessed another interesting discovery about this disease, for in that year UZMAN and DENNY-BROWN found that one of two brothers suffering from a chronic pseudosclerotic form of hepatolenticular degeneration constantly excreted excessive and abnormal amounts of amino acids in the urine. There was no evidence, apart from this, of any renal trouble. With the aid of chromatography this aspect of the disease has subsequently been further explored. COOPER et al. (1950) for example, found the daily excretion of amino nitrogen to be of the order of 390 mg. in cases of WILSON's disease, as against 164 in normal persons and about the same amount (158 mg.) in cirrhosis from other causes. They found no excess of amino acids in the plasma and attributed the abnormality to a lowered renal threshold. They also found renal glycosuria in three of their patients and pointed out that persons with FANCONI's disease, which is characterised among other things by renal glycosuria and amino aciduria, sometimes also had cirrhosis.

Over 90% of the copper in the serum is normally bound firmly to a specific protein termed ceruloplasmin and an important contribution to the aetiology of WILSON's disease was made by the discovery that

in it there was very much too little of this protein in the serum. The total serum copper may be normal but is usually a little below normal. Its distribution among the protein fractions is, however, abnormal owing to the deficiency of coeruloplasmin and an excess is being carried by the albumins. This excess reacts with diethyl-dithiocarbamate and can be made the subject of a direct estimation whereas the coeruloplasmin copper will not react.

The disease therefore, as we see it today, may be described as follows: There is a deficiency of coeruloplasmin, which may be the hereditary lesion, and owing to it or for some reason connected with it (EARL et al., 1954) excessive amounts of copper are absorbed. This has been checked by the use of radio active copper (MATTHEWS, 1954). The metal does not remain in the plasma, however. Much of it is excreted in the urine and the rest seems to pass into the cerebrospinal fluid and tissues where it is deposited in progressive and ultimately destructive amounts. The brain and liver are the first to suffer, whereas the heart, lungs, erythrocytes and skeletal muscle remain relatively clear. The separation of the metal in the eye tissue is the cause of the KAYSER-FLEISCHER rings. The deposition of copper in the kidney may interfere with the reabsorptive mechanism for amino acids, or possibly the amino acids pass through the glomerulus combined with copper in a chelated form, and these compounds are not susceptible to reabsorption. Copper is also excreted in combination with peptides (UZMAN, 1953). In keeping with all this is the fact that the administration of amino acids by mouth increases the excretion of copper in patients with hepato-lenticular degeneration, but not it seems in normal people — or not to any extent at any rate (MATTHEWS et al., 1952). There are, however, many puzzling features about the metabolism and excretion of amino acids by these patients. Their pattern and concentrations in the plasma seem to be normal whereas the excretion is high and very variable. Histidine, serine, tyrosine, and threonine may predominate, but proline and citrulline have been emphasised by other investigators. The amounts excreted seem to depend upon the dietary proteins and the state of the disease rather than on the liver lesion (CARTWRIGHT et al., 1954). It is very difficult to

understand the observations of COOPER et al. that unlimited protein food and even the infusion of amino acids did not increase the loss.

We know so little about the metabolism of copper in healthy people that it is gratifying how much we have been able to piece together about WILSON's disease. The whole subject is now opening up and there are many obvious lines of investigation. One would like very much, for example, to know whether the disease obliterates the daily rhythm which has been demonstrated in the serum of normal people (MUNCH-PETERSEN, 1950), and, if not, to what extent the rate of excretion of copper and also of amino acids may be affected by such a rhythm. As might have been expected B.A.L. has been shown to increase the rate of excretion of copper in the urine (MANDELBROTE et al., 1948), but whether there is any real future in this line of treatment remains to be seen. The work of DENNY-BROWN and PORTER (1951) suggests that there is. From the clinical point of view there are striking differences between the acute and chronic forms of the disease and it will be interesting to see if these can be correlated with the biochemical picture. The metabolism of copper and amino acids in relatives of the patients may open up a new chapter in genetics, but these and many other problems may safely be left to future investigators.

A COBALT PROBLEM

The story of pernicious anaemia and of the appreciation of the physiological importance of cobalt, first in sheep and then in all animals, makes one of the most fascinating chapters of modern medicine. I have not come here today, however, to discuss the chemistry or indeed the physiology of vitamin B₁₂ for I am not qualified to do so. The chemistry was reviewed last year by FOLKERS and WOLF (1954) and the vitamin formed the subject of a symposium of the Biochemical Society in February of this year. Since then another interesting paper has appeared indicating that there are specific proteins in whey which combine with the vitamin much as the « intrinsic » factor is thought to do (GREGORY and HOLDSWORTH, 1955). Apart from the vitamin, cobalt is always present in food and in the body in the form of its ions.

The amounts present are small, but FORBES et al. (1954) have recently estimated those to be found in the body of a healthy man who died from a fracture of the skull. The liver contained 0.056 parts per million of fresh tissue and other organs less. The skin for instance contained 0.050 parts per million, the skeleton 0.038, the skeletal muscles 0.006 and the fat 0.008. If we take a rough average of all the figures which the authors give, we may say that the body as a whole probably contained somewhere about 0.015 parts per million, i.e. one seventy millionth part of the body was cobalt. This does not seem very much and the physiological role of these ions must have been small, but even these quantities are enormous in relation to the quantities of cobalt required in the form of cyanocobalamin. If, as I am told, an ampoule containing 50 µg of the vitamin is quite enough to maintain a patient with pernicious anaemia in good health for a month, then the daily requirement is of the order of 2µg of the vitamin or about 0.1 µg as cobalt. This is only one seven hundred thousand millionth part of the body weight. These are small amounts to conjure with and those who find them difficult to visualise may care to reflect that if they embark on the « Queen Mary » or « Queen Elizabeth » they constitute the relatively enormous fraction of about one millionth part of the total weight of the ship. The minute amounts of the vitamin required help to explain why the members of the sect which call themselves Vegans and eat no animal food whatever manage to survive so long without showing any obvious signs of deficiency (WOKES, 1954). Since the vegetable foods which these people eat undoubtedly contain more than enough cobalt to meet their needs, their unwitting experiments have demonstrated quite clearly that the normal man, even if healthy, must have the vitamin provided ready made for him and that even if his intestinal flora are capable of synthesising it they cannot synthesis enough to keep him permanently supplied.

It was shown many years ago that cobalt in the form of its ions was capable of producing a polycythaemia in rats (see SCHULTZE, 1940). This is not due to vitamin B₁₂ (LEVEY and ORTEN, 1951) and it can be prevented by physiological reducing agents such as cysteine and histidine (ORTEN and BUCCIERO, 1948). It was inevitable that sooner or later someone would suggest that the salts be tried as phar-

macological agents in the treatment of anaemia. After some limited pioneer work (SCHULTZE, 1940), WINTROBE et al. (1947) found that the anaemia induced in rats by turpentine injections could be prevented by the administration of cobalt. It was unlikely that any substance which combined with thiol groups (MONIER-WILLIAMS, 1949) and interfered with the normal process of mitosis (HEATH, 1954) would be without side effects, but this has not prevented its trial in man, and a claim has recently been made (COLES and JAMES, 1954; JAMES and COLES, 1955) that cobalt has a real value in the treatment of the anaemia of premature infants. The authors have not encountered any untoward effects, but others have, and GAIRDNER et al. (1954) have unwittingly produced goitres in infants by doses of 9 mg. of cobalt daily and GROSS et al. (1954, 1955) and MCBRYDE (1954) have done the same, accompanied by signs of thyroid insufficiency.

I am bringing forward these facts today, not so much because of their intrinsic interest but because I hope they will provoke some discussion of general principles. I have been a medical investigator all my life and no-one is keener than I am on the advancement of knowledge by experiment. It is the basis of all real progress. But what constitutes a justifiable experiment? This is what I would like to hear discussed. Is it more justifiable to remove samples of blood and even of tissue from tiny infants and to alter their conditions of life in this and other ways in order to investigate their physiology by every means in our power, or to give under the guise of therapy a drug which is thoroughly unphysiological and, even if it produces the desired effects, these in themselves may be unphysiological too. Into quite a different category come the interesting papers by SEAMAN and KOHLER (1953) and FOUNTAIN and DALES (1955). The latter have reported the successful treatment of a case of pure red cell aplasia by the administration of 10 mg. of cobalt chloride daily. Here, the investigators were dealing with a process which was not only frankly pathological but had proved resistant to the accepted forms of therapy. The situation was a desperate one and these therapeutic experiments would have been justified whatever the result. Apart from the gratifying issue for the patients, their successes may have thrown light on the pathology of this rare but interesting disease.

ACRODYNIA (PINK DISEASE)

Although it would appear that this syndrome was first described by SELTER (1903) (see CHEEK, 1953), the credit for its recognition and accurate description must go to Swift and his Australian colleagues just before the first world war. It has since become a well known and relatively common disease of children characterised by misery, fretfulness, anorexia, photophobia, loss of weight, sweating, a cold and clammy skin with pink hands and feet and sometimes a pink nose and ears as well. The skin may desquamate and the children tend to get whitlows. Older children may complain of tingling, irritation and patches of anaesthesia (SHELDON, 1951; SPENCE, 1952). The mortality rate is about 5%. Like so many other diseases it is much more prevalent in some places than in others, and its aetiology has always been somewhat of a mystery. Nutritional deficiencies, particularly of the B vitamins, sodium deficiencies and disorders of the adrenal cortex have all been tried and found wanting.

Between 1945 and 1948 two investigators working quite independently seem to have come to the conclusion that the syndrome was the result of mercury poisoning or mercury sensitivity following the therapeutic use of the metal or its salts (FANCONI and BOTSTEJN, 1948; WARKANY and HUBBARD, 1948, 1953). Since that time the matter has been very fully explored and the evidence for and against mercury may be set out as follows. Many of the recognised manifestations of pink disease have been known for a long time to be caused by mercury, and if a careful history be taken, nearly all cases of pink disease can be shown to have been treated with mercury shortly before the onset of the disease. Mercury may get into the body in so many ways and is used for so many purposes that it may be impossible to prove the association in every case but WARKANY and HUBBARD (1953) have done their best to do so and their article must be a great help to those who desire to try. Some children with pink disease excrete abnormally large amounts of mercury in their urine, but if they have been treated with mercury this is not surprising, and others do not. Unfortunately the excretion of mercury is one of those capricious things which seem

to obey no known laws so that this kind of evidence is never very satisfactory. Mercury, however, is one of the metals which combines with B.A.L. The compound is of course non-toxic and should be excreted freely in the urine. The first reports implicating mercury were followed by others claiming that B.A.L. was a valuable therapeutic agent even if it did not always lead to the excretion of a great deal of mercury (VAN CREVELD and PAULSEN, 1949; HOLZEL and JAMES, 1952). Unfortunately B.A.L. has not fulfilled its earlier promise (SOUTHBURY, 1953) and even WARKANY and HUBBARD (1953), have admitted its limitations and inconsistencies. A neat point in favour of mercury is that children get the disease at an older age in Switzerland (where the drug is usually given as a vermifuge) than they do in England, where the drug is used as a « teething powder ».

The matter remained in this unsatisfactory state till quite a short time ago, for GILLESPIE's paper in 1952 did not attract any attention. It would now appear from his work and from that of PETERSON and LAUGHMILLER (1954) — see Editorial (1955), that some of the symptoms and signs may be due to mercury, but that they are essentially manifestations of a gross overactivity of the sympathetic system, and yield in a most satisfactory way to treatment. Priscoline (2 benzyl-imidazoline hydrochloride) has been the drug employed and 10 mg. by mouth four hourly seems to be a fair starting dose, to be raised as and when it may seem necessary, and maintained till the signs and symptoms no longer return when it is dropped.

Where then does the mercury come in? That, naturally is what we all want to know, but the whole situation bristles with interesting possibilities. If, for example, the symptoms and signs are due to sympathetic overactivity and relieved by drugs which are lytic for this system and stimulate the parasympathetic side, why do the patients stop sweating after the administration of the drug? If mercury is implicated, why was the disease not more common when mercury was much more of a therapeutic standby than it is today? The amount of mercury in the body is normally very small; it is of the same order perhaps as that of cobalt but with a very different distribution (FORBES et al., 1954). There would appear to be much more in the nervous

system, for instance, and less in the liver. Have the patients who get pink disease absorbed more mercury than others who have been treated in a similar way, or deposited it in some abnormal site? Are they suffering from something analogous to WILSON's disease? It has been suggested that these patients have been « sensitised » by the mercury or were peculiarly « sensitive » to mercury (FANCONI and BOTSTEJN, 1948) but these phrases have no exact meaning, and patch tests with calomel or mercury have not proved a help (HOLZER and JAMES, 1952). A suitable experimental animal would be a great assistance but so far one has not been forthcoming. Nevertheless, it looks as though the happy choice of a therapeutic agent may once more have relieved us of an incurable disease and at the same time be the means of teaching a great deal of new and interesting physiology.

A PROBLEM IN DENTAL PROPHYLAXIS

Whether one considers fluorine a physiological element or not depends to some extent upon one's definition of physiology. If you consider that a physiological agent should be one which is essential to life then fluorine is probably not one, but if you allow that anything which improves the function of some part of the body by making it more efficient at the time or by making it deteriorate less rapidly is a physiological substance then fluorine should certainly be so classified. The fact that the ingestion of quantities outside the desirable range may have pathological consequences, is neither here nor there, for this is true of most of the trace elements, such as copper and molybdenum, which are certainly physiological.

Soluble fluorides are extremely toxic in anything but minute concentrations but fluorine is one of the anions with an insoluble calcium salt, and owing to this it tends to accumulate in the bones and teeth, and it is possible for some animals to carry high concentrations of fluorides in their bodies in this insoluble form. *Archidoris britannica* for example, a marine invertebrate, may contain 3% of fluorine per 100 g. of dry matter (McCANCE and MASTERS, 1937). One of the interesting things about the fluoride ion is the way in which it tends

to accumulate by replacement in bones buried in the earth. This has provided a method of dating the antiquity of archeological remains which has had many applications within recent years. The percentage of fluorine found in the bones, for example, was part of the evidence used to establish the fact that the PILTDOWN remains were a deliberate « hoax » (WEINER, 1955; WEINER et al., 1955). It is to its property of combining with calcium in the bones and teeth that fluorine owes most of its physiological and pathological properties, and I must confine my attention to these today.

It would appear that « As long ago as 1892 Sir JAMES CRICHTON-BROWNE suggested that there was some connection between fluoride in the diet and decreased liability to dental caries. Little clinical investigation was made until 1916, when interest was revived by the work of BLACK and MCKAY in the United States of America. Their investigations were concerned primarily with mottling of the enamel of teeth that occurs in certain districts. This effect on enamel was observed also in the MALDON area of ESSEX by AINSWORTH (1928) and has been found in all continents. Eventually it was shown that the mottling was associated with abnormally high amounts of fluoride in the water supply (CHURCHILL, 1931; SMITH and SMITH, 1932; AINSWORTH, 1933; ELVOVE, 1933) ». See Report of the United Kingdom Mission, 1953.

There have been so many excellent reviews of this matter within recent years (ARNOLD, 1948; HARRISON and BELL, 1947; MACKENZIE, 1952; MITCHELL and EDMAN, 1953; Report of the United Kingdom Mission, 1953; WEAVER, 1948) that there is no need to recapitulate the evidence. The facts are clear. If the natural water supply of a district contains about one part per million of fluorine, the incidence of caries among both children and adults who have lived their lives there is considerably less than in neighbouring areas where everything else would appear to be the same save that the water contains much less fluorine. If the concentration of fluorine rises to 3 or 4 parts per million the incidence of caries is equally low but the teeth may be mottled and unsightly and if the concentrations rise to very high levels the teeth become not only unsightly but also brittle and their physio-

logical properties become impaired. There may also under these conditions be pathological changes in the skeleton in later life, although these are exceptional and generally due to industrial contamination of the whole district with volatile fluorine compounds (ROHOLM, 1937; GREENWOOD, 1940).

Although carious teeth do not seem to have been a serious cause of ill health in primitive societies, dental disease is one of the biggest problems in modern medicine, for it is almost universal in highly civilised communities. Why this should be so is not yet clear. The structure and composition of the diet are undoubtedly important, but the noxious agent, if there is one single one, remains to be discovered, and even if it were known it is questionable if the knowledge could be applied.

With all this in mind a number of districts in the United States have boldly tried the experiment of adding fluorine to water supplies, which previously had contained very little, and so bringing the concentration up to about one part per million. The results have been most promising and the question has now been raised as to whether this should not be done in England. The problem will no doubt arise in other countries. This is the matter I wish to discuss.

It might be supposed that if the incidence of caries in ten year old children could be halved by the simple process of adding a little sodium fluoride to the drinking water no administrator or public health officer would hesitate for an instant. This is not, however, how most people react to a proposal of this kind, and it tends to raise all sorts of psychological conflicts in men's minds which make an interesting study (ENDEAN, 1955). There is always a certain amount of risk in doing anything and it is often easier for an administrator to leave things as they are rather than take any chances of making any mistake. Some people find it difficult to appraise the evidence as a whole and tend to allow the reasons for not making a move exclude from their mind the reasons for making it. In England, for instance, the large amount of fluorine in tea and the large amounts of tea which people drink have been held to create a potential hazard (SINCLAIR and WILSON, 1955), and the possibility of creating an iodine deficiency and goitres by raising the fluorine supplies has been invoked as justification for delay. The public are always conservative about preventive me-

dicine unless they are really frightened. With one side of their cortex fathers may be anxious to do the best they can for their children, but with the other they would much prefer to see them bear the ills they have than fly to others that they know not of. In other words, they regard most moves in preventive medicine as being an interference with nature and therefore best not made, although they fail to recognise that every aspect of their lives has got so far from its natural surroundings that there are practically none of them left.

The evidence on this matter would seem to me to be strongly in favour of bringing the concentration of fluorine in all water supplies up to about one part per million and I would particularly like to see it done where modern civilisation and dietary habits are encroaching on primitive societies.

Voir la discussion à page 583

REFERENCES

- ARNOLD F. A., *An evaluation of the effectiveness as caries control measures of ingested fluorides in water, food, bone flour and proprietary preparations.* « J. dent. Res. », 27, 267. (1948).
- BEARN A. G., *Genetic and biochemical aspects of Wilson's disease.* « Amer. J. Med. », 15, 442. (1953).
- BERFENSTAM R., *Studies on carbonic anhydrase activity in children. I. Enzyme activity in the blood of infants and children of different ages, particularly in premature infants.* « Acta paediat. », 41, 32. (1952).
- CARTWRIGHT G. E., HODGES R. E., GUBLER C. J., MAHONEY J. P., DAUM K., WINTROBE M. M. & BEAN W. B., *Studies on copper metabolism. 13. Hepato-lenticular degeneration.* « J. clin. Invest. », 33, 1487. (1954).
- CHEEK D., *Pink Disease (infantile acrodynia). A physiological approach. (An evaluation of adrenal function and the importance of water and electrolyte metabolism).* « J. Pediat. », 42, 239. (1953).
- COLES B. L. & JAMES U., *The effect of cobalt and iron salts on the anaemia of prematurity.* « Arch. Dis. Childh. », 29, 85. (1954).
- COOPER A. M., ECKHARDT R. A., FALCOON W. W. & DAVIDSON C. S., *Investigation of the aminoaciduria in Wilson's Disease (Hepato-lenticular Degeneration): Demonstration of a defect in renal function.* « J. clin. Invest. », 29, 265. (1950).
- VAN CREVELD S. & PAULSEN M. M. P., *Acrodynia and mercury poisoning.* « Acta paediat. », 38, 32. (1949).
- CUMINGS J. N., *The copper and iron content of brain and liver in the normal and in hepato-lenticular degeneration.* « Brain », 71, 410. (1948).
- DENNY-BROWN D. & PORTER H., *The effect of B.A.L. (2, 3-dimercapto propanoic acid) on hepatolenticular degeneration (Wilson's disease).* « New Engl. J. Med. », 245, 917. (1951).
- DIAZ C. J., IBANEZ J. S., RODA E. & PLEGUEZUELO M. M., *A case of acute hepatolenticular degeneration (Wilson's disease): A clinical and pathological study.* « Bull. Inst. med. Res. », 5, 1. (1952).
- EARL C. J., MOULTON M. J. & SELVERSTONE B., *Metabolism of copper in Wilson's disease and in normal subjects.* « Amer. J. Med. », 17, 205. (1954).
- EDITORIAL, *Acrodynia.* « Pediatrics », 15, 202. (1955).
- ENDEAN F. C., *Fluoridation of public water supplies.* « Brit. med. J. », i, 847. (1955).
- FANCONI G. & BOTSTEIN A., *Die Feuersche Krankheit (Akrodyne) und Quecksilbermedikation.* « Helv. paediat. acta », 3, 264. (1948).
- FOLKERS K. & WOLF D. E., *Chemistry of vitamin B₁₂.* « Vitamins and Hormones », 12, 2. (1954).
- FORBES R. M., COOPER A. R. & MITCHELL H. H., *On the occurrence of beryllium, boron, cobalt, and mercury in human tissues.* « J. biol. Chem. », 209, 857. (1954).

- FOUNTAIN J. R. & DALES M., *Pure red cell aplasia successfully treated with cobalt.* « Lancet », 268, 541. (1955).
- GARDNER D., MARKS J., & ROSCOE J. D., *Goitrogenic hazard of cobalt.* « Lancet », 267, 1285. (1954).
- GILLESPIE A. E., *Acrodynia treated with 2 Benzylimidazoline hydrochloride.* « Canad. med. Ass. J. », 67, 418. (1952).
- GLAZEBROOK A. J., *Wilson's disease.* « Edinb. med. J. » (N.S.), 52, 83. (1945).
- GREENWOOD D. A., *Fluorine intoxication.* « Physiol. Rev. », 20, 582. (1940).
- GREGORY M. E. & HOLDWORTH E. S., *The occurrence of a cyanocobalamin-binding protein in milk and the isolation of a cyanocobalamin-protein complex from sow's milk.* « Biochem. J. », 59, 329. (1955).
- GROSS R. T., KRISS J. P. & SPAET T. H., *Hematopoietic and goitrogenic effects of cobaltous chloride in patients with sickle cell anemia.* « Amer. J. Dis. Child. », 88, 503. (1954).
- GROSS R. T., KRISS J. P. & SPAET T. H., *The hematopoietic and goitrogenic effects of cobaltous chloride in patients with sickle cell anaemia.* « Pediatrics », 15, 284. (1955).
- HARRISON M. F. & BELL M. E., *Nutritional factors affecting the teeth.* « N. Z. dent. J. », 43, 5. (1947).
- HAUROWITZ F., *Über eine Anomalie des Kupferstoffwechsels.* « Zeitsch. Physiol. Chem. », 190, 72. (1930).
- HEATH J. C., *The effect of cobalt on mitosis in tissue culture.* « Exp. Cell. Res. », 6, 311. (1954).
- HOLZEL A. & JAMES T., *Mercury and pink disease.* « Lancet », 262, 441. (1952).
- JAMES U. & COLES B. L., *Goitrogenic hazard of cobalt.* « Lancet », 268, 50. (1955).
- LEVEY S. & ORTEN J. M., *Vitamin B₁₂ and the production of polycythemia by cobalt.* « J. Nutr. », 45, 487. (1951).
- MAKENZIE E. F., *The prevention of dental caries by the administration of fluorine in public water-supplies.* « Lancet », 262, 961. (1952).
- MACKLER B., MAHLER H. R. & GREEN D. E., *Studies on metalloflavoproteins. I. Xanthine oxidase, a molybdoflavoprotein.* « J. biol. Chem. », 210, 149. (1954).
- MAHLER H. R., *Studies on the fatty acid oxidising system of animal tissues: 4. The prosthetic group of butyryl coenzyme A-dehydrogenase.* « J. biol. Chem. », 206, 13. (1954).
- MAHLER H. R., MACKLER B., GREEN D. E. & BOCK R. M., *Studies on metalloflavoproteins: 3. Aldehyde oxidase a molybdoflavoprotein.* « J. biol. Chem. », 210, 465. (1954).
- MANDELBROT B. M., STANIER, M. W., THOMPSON R. H. S. & THRUSTON M. N., *Studies on copper metabolism in demyelinating diseases of the central nervous system.* « Brain », 71, 212. (1948).
- MATTHEWS W. B., *The absorption and excretion of radio copper in hepatolenticular degeneration (Wilson's disease).* « J. Neurol., Neurosurg. and Psychiat. », 17, 242. (1954).

- MATTHEWS W. B., MILNE M. D. & BELL M., *The metabolic disorder in hepatolenticular degeneration.* « Quart. J. Med. », 21, 425. (1952).
- MCBRYDE A. G. « Amer. J. Dis. Child. », 88, 503. (1954).
- McCANCE R. A. & MASTERS M., *The chemical composition and the acid balance of Archidoris Britannica.* « J. Marine Biol. Assoc. U.K. », 22, 273. (1937).
- MITCHELL H. H. & EDMAN M., *Fluorine in human nutrition.* « J. Amer. Diet. Assoc. », 29, 24. (1953).
- MONIER-WILLIAMS G. W., *Trace elements in food.* London, Chapman and Hall. (1949).
- MUNCH-PETERSEN S., *Variations in serum copper in course of 24 hours.* « Scand. J. Clin. and Lab. Invest. », 2, 48. (1950).
- ORTEN J. M. & BUCCERO M. C., *The effect of cysteine, and methionine on the production of polycythaemia by cobalt.* « J. biol. Chem. », 176, 961. (1948).
- PETERSON J. C. & LAUGHMILLER R., *Acrodynia. Treatment with adrenolytic drugs.* « Acta paediat. », 43, 517. (1954).
- PORTER H., *Copper excretion in the urine of normal individuals and of patients with hepatolenticular degeneration (Wilson's disease).* « Arch. Biochem. », 31, 262. (1951).
- REPORT OF THE U.K. MISSION, *The fluoridation of domestic water supplies in North America as a means of controlling dental caries.* H.M.S.O., London. (1953).
- ROBINSON J. R., *Urinary excretion of carbonic anhydrase. A simple test for the detection of intravascular haemolysis.* « J. clin. Path. », 3, 142. (1950).
- ROHOLM K., *Fluorine intoxication: A clinical hygienic study, with a review of the literature and some experimental investigations.* London, Lewis & Co. Ltd. (1937).
- SCHULTZE M. O., *Metallic elements and blood formation.* « Physiol. Rev. », 20, 37. (1940).
- SEAMAN A. J. and KOLER R. D., *Acquired erythrocytic hypoplasia: a recovery during cobalt therapy.* « Acta Haematol. », 9, 153. (1953).
- SHELDON W., *Diseases of infancy and childhood, 6th Ed.* London, Churchill. (1951).
- SINCLAIR H. M. & WILSON D. C., *Fluoridation of public water supplies.* « Brit. med. J. », 1, 284. (1953).
- SOUTHBY R., *Pink Disease.* « Med. J. Australia », 2, 420. (1953).
- SPENCE J., *Pink Disease.* « Brit. Encyclopedia Med. Practice », 2nd Ed., vol. 9. London, Butterworths. (1952).
- UZMAN L. L., *On the relationship of urinary copper excretion to the aminoaciduria in Wilson's disease. (Hepato-lenticular Degeneration).* « Amer. J. med. Sci. », 226, 645. (1953).
- UZMAN L. and DENNY-BROWN D., *Amino-Aciduria in hepatolenticular degeneration (Wilson's Disease).* « Amer. J. med. Sci. », 215, 599. (1948).
- WARKANY J. and HUBBARD D. M., *Mercury in the urine of children with acrodynia.* « Lancet », 254, 829. (1948).

- WARKANY J. and HUBEARD D. M., *Acrodynia and mercury*. « *J. Pediat.* », 42, 365. (1953).
- WEAVER R., *The inhibition of dental caries by fluorine*. « *Proc. Roy. Soc. Med.* », 41, 284. (1948).
- WEINER J. S., *The Piltdown Forgery*. Oxford University Press. (1955).
- WEINER J. S., LE GROS CLARK W. E., OAKLEY K. P., CLARINGBULL G. F., HEY M. H., EDMUNDS F. H., BOWIE S. H. U., DAVIDSON C. F., FRVD C. F. M., BAYNES-COPE A. D., WERNER A. E. A. & PLESTERS R. J., *Further contributions to the solution of the Piltdown problem*. « *Bull. Brit. Museum* » (Nat. Hist.) Geology, 2, 225. (1955).
- WILSON S. A. K., *Progressive lenticular degeneration: a familial nervous disease associated with cirrhosis of the liver*. « *Brain* », 34, 295. (1911-12).
- WINTROBE M. M., GRINSTEIN M., DUBASH J. J., HUMPHREYS S. R., ASHENBRUCKER H. and WORTH W., *The anaemia of infection. VI. The influence of cobalt on the anaemia associated with inflammation*. « *Blood* », 2, 323. (1947).
- WOKES F., *Nutrition of vegetarians*. « *Lancet* », 267, 383. (1954).

SOME FUNCTIONAL ASPECTS OF INORGANIC MICRONUTRIENTS IN PLANT METABOLISM

DANIEL I. ARNON

The study of the role of inorganic micronutrients in autotrophic plants has heretofore emphasized the requirements of higher i.e. flowering plants. Since higher plants represent a marked degree of biochemical uniformity in their principal metabolic pathways, it was not surprising to find, on the whole, a remarkably similar pattern in their micronutrient requirements. Allowing for quantitative variations in individual species requirements, there is no well-documented exception to the rule that calcium, magnesium, potassium, nitrogen, phosphorus, and sulfur are required in *macroquantities* whereas iron, manganese, boron, zinc, copper, and molybdenum are required in *microquantities* by all species of higher plants investigated thus far.

By contrast with higher plants, the photoautotrophic microorganisms, such as algae, exhibit a great biochemical diversity as shown, for example, by their differing pigment composition. Their biochemical diversity is accompanied by differences in requirements for inorganic nutrients. The same elements, for example, were found to be required in macroquantities for optimum growth by one species and in microquantities by another.

Algae possess certain distinct advantages for micronutrient research. Their fundamental metabolism is similar to that of higher plants, and they can be grown much more readily with maximum control of environmental variables. Of particular significance is their

lack of specialized cells and organs. Each viable algal daughter cell must therefore contain all of the inorganic constituents essential for metabolism. Rapid reproduction by cell division would, in the absence of an added supply, quickly dilute below a level critical for normal cell function, the concentration of an essential micronutrient initially present in abundance in the mother cell or derived from a residual impurity in a purified nutrient medium.

Table I gives a comparison of the inorganic requirements of higher plants and of the two species of algae investigated in this laboratory: the green alga, *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae), similar in its pigment composition and nitrogen metabolism to higher plants and *Anabaena cylindrica* (Myxophyceae), a nitrogen-fixing filamentous blue-green alga, with a pigment system different from that of green algae and higher plants, notably in the absence of chlorophyll « b » and in the presence of phycocyanin.

TABLE I — INORGANIC ELEMENTS REQUIRED BY GREEN PLANTS IN MACRO- OR MICROQUANTITIES

	Higher Plants	Green algae (<i>Scenedesmus obliquus</i>)	Blue-green algae (<i>Anabaena cylindrica</i>)
C, H, O, N, P, S, K, Mg	Macro	Macro	Macro
Fe, Mn, Cu, Zn	Micro	Micro	Micro
Ca	Macro	Micro	Macro
Mo	Micro	Micro	Micro ($\times 100$)
Na	Micro (?)	Micro (?)	Macro
V	Micro (?)	Micro	Micro (?)
B	Micro	Micro (?)	Micro (?)
Cl	Micro	Micro (?)	Micro (?)
Co	Micro (?)	Micro (?)	Micro

Of the elements listed in Table I, the « structural » elements which are required in macroquantities by all green plants comprise a group of eight: carbon, oxygen, hydrogen, nitrogen, phosphorus, sulfur, potassium, and magnesium. There is also little question about the universal essentiality for all green plants of microquantities of: iron, manganese, copper, and zinc. The other elements in Table I can best be discussed individually.

CALCIUM

The macrorequirement of calcium for higher plants is well established. By contrast, green algae can grow at optimal rates when only micronutrient quantities of this element are supplied [1, 2, 3]. As for blue-green algae, there has been no general agreement on their calcium requirements. The early investigators of the physiology of this group have found that calcium was required [4]. In spite of one report that calcium is not needed [5], based on cultures in which the total growth was small, later work has generally substantiated the early results [cf. 6]. However, ALLISON, et al, [7] claimed that calcium was needed by *Nostoc muscorum* only when this blue-green alga was growing with molecular nitrogen, not when nitrate was the source of nitrogen. These authors have also reported that calcium could be replaced by strontium.

The calcium requirement of *Anabaena cylindrica* was recently investigated in our laboratory (ALLEN and ARNON 8). The results

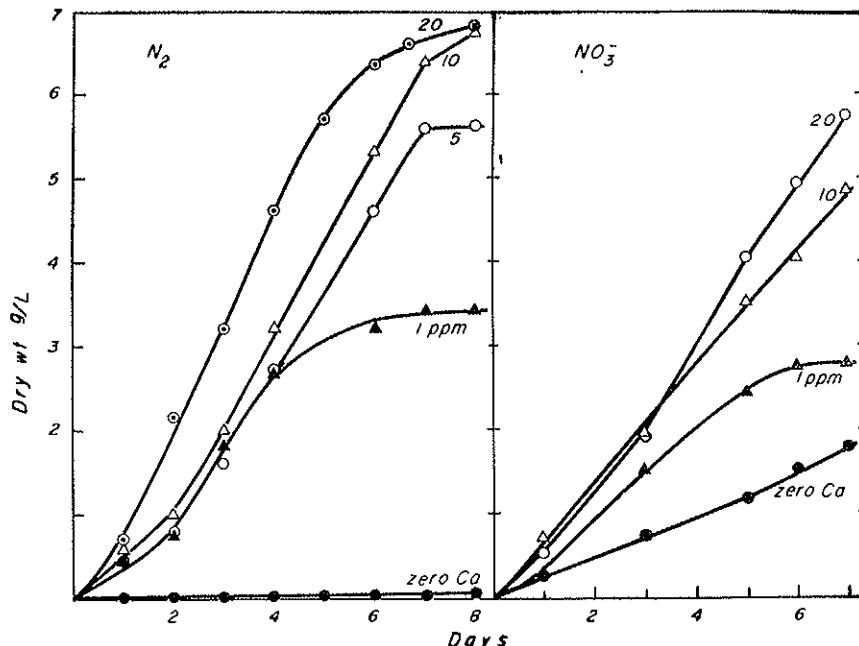


FIG. 1 — The calcium requirement of *Anabaena cylindrica* grown with nitrate or molecular nitrogen. 1 ppm = 1 mg. Ca per liter of nutrient solution.

are shown in Fig. 1. Calcium was found to be essential for the growth of *Anabaena* with either combined or molecular nitrogen. The slight growth without added calcium in the nitrate series may have resulted from a remaining Ca contamination in the recrystallized nitrate salt (KNO_3). The calcium concentration needed for optimum growth was high, approximately 20 mg. per liter of nutrient solution (20 p.p.m.). The large calcium requirement of *Anabaena* is thus similar to that of higher plants rather than to that of green algae.

Fig. 2 shows that for the growth of *Anabaena cylindrica*, calcium cannot be replaced by strontium. The evidence for calcium

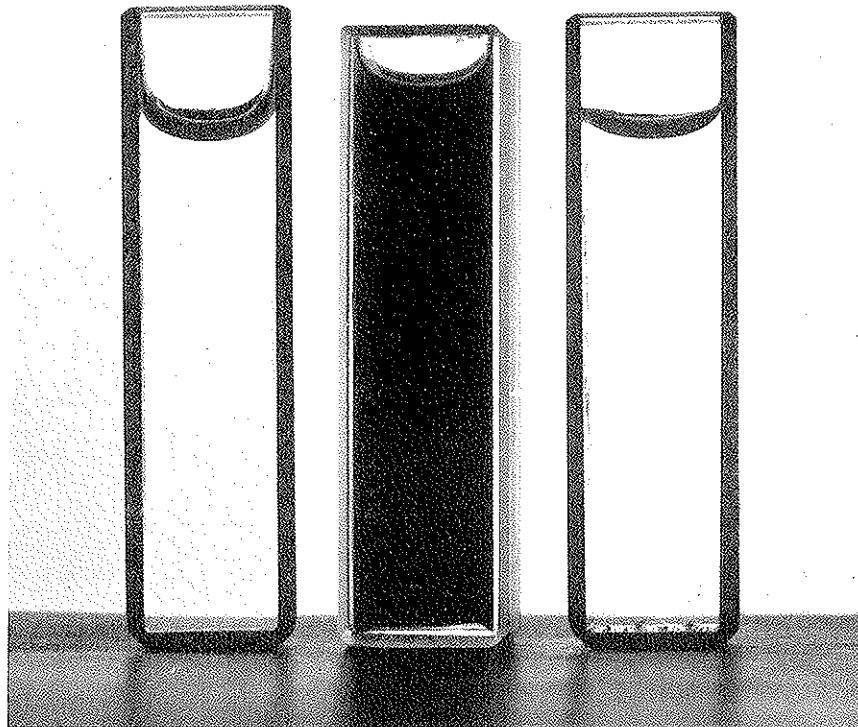


FIG. 2 — Effect of calcium and strontium on the growth of *Anabaena cylindrica*. Left, no Ca or Sr added; center, 20 mgs. Ca per liter; right, 20 mgs. Sr per liter.

as an irreplaceable essential element [9] for the growth of a blue-green alga was obtained with purified nutrient salts under conditions favoring vigorous growth and high cell density. Under the same conditions, molybdenum could not be replaced by vanadium [8, cf. 10]. These two instances of non-replaceability are in accord with the general principle of specificity as a criterion of essentiality of inorganic elements in plant nutrition [9].

MOLYBDENUM

The role of molybdenum in the nitrogen nutrition of algae was discussed in detail in the companion paper [10]. The evidence was presented there for the approximately 100-fold greater molybdenum requirement of *Anabaena* than *Scenedesmus*. The large difference in the quantitative molybdenum requirements suggests some basic difference in the metabolic pattern of this element in the two algal species. This difference is particularly noteworthy, since the molybdenum requirement of *Scenedesmus* is quantitatively remarkably similar to that of higher plants [cf. 10], although in these latter species molybdenum has been considered to perform other functions [HEWITT and McCREADY, 11; SPENCER and WOOD, 12], in addition to its principal one of catalyzing the reduction of nitrate.

SODIUM

Despite many indications of the response of crop to sodium applications [13], a search of the literature has revealed no evidence of the indispensability of sodium for green plants as measured by specific criteria of essentiality [9]. Since many of the beneficial sodium applications to crop plants were in the form of NaCl, the evaluation of many of these experiments has recently assumed a greater complexity with the new evidence, discussed later, of the need for chlorine by higher plants.

There have been various indications that sodium plays an important role in the nutrition of blue-green algae (cf. literature reviewed in [14]). The question has recently been critically examined for *Anabaena cylindrica* [ALLEN and ARNON, 14]. With the use of

proper techniques [14], the role of sodium as an essential element [9] in the nutrition of this organism was established on the basis of the following evidence.

Normal development of the alga did not occur in the absence of sodium; the appearance of cultures with and without added sodium is shown in Fig. 3. The scanty growth obtained in the absence

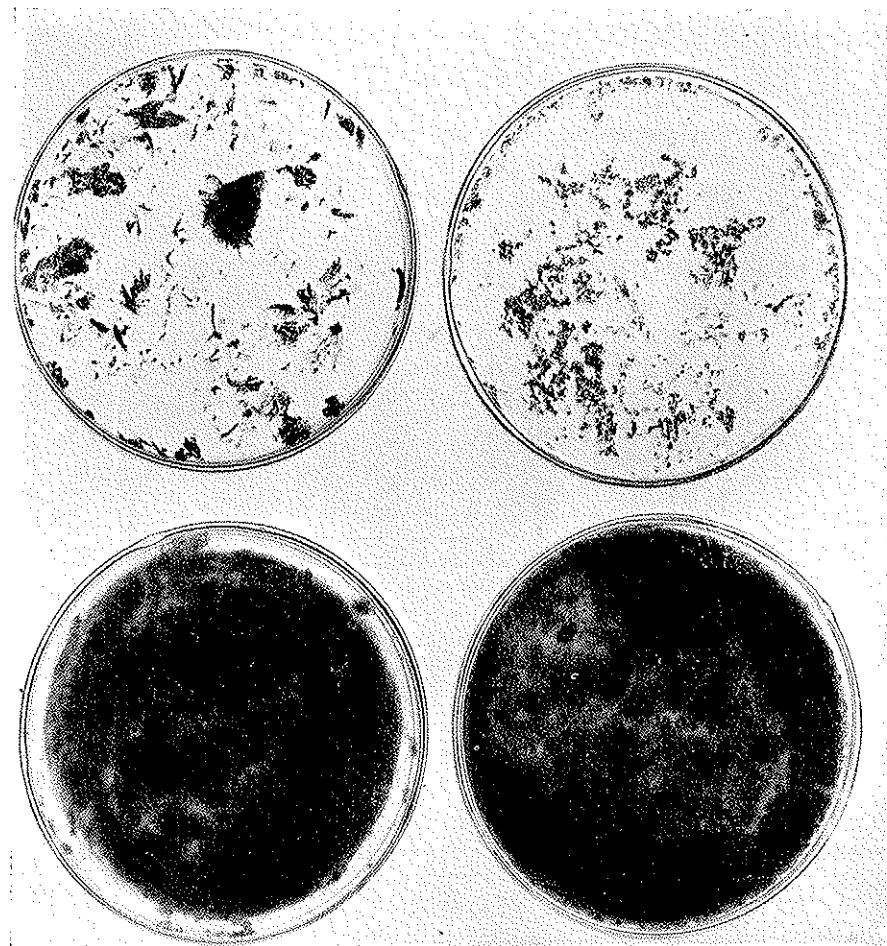


FIG. 3 — Effect of sodium on the growth of *Anabaena cylindrica*. Pale cultures — no sodium added; dark cultures received 92 mg. Na per liter. N₂ was the source of nitrogen.

of sodium was restored to the normal level by addition of this element, as indicated in Fig. 4. The « first transfer » illustrates the results obtained with and without added sodium when inoculum from a plus-sodium parent culture was used. In the succeeding experiment, inoculum from the sodium-deficient culture was used in media with and without added sodium, giving the results shown as « second transfer » (Fig. 4). The alga recovered and grew well

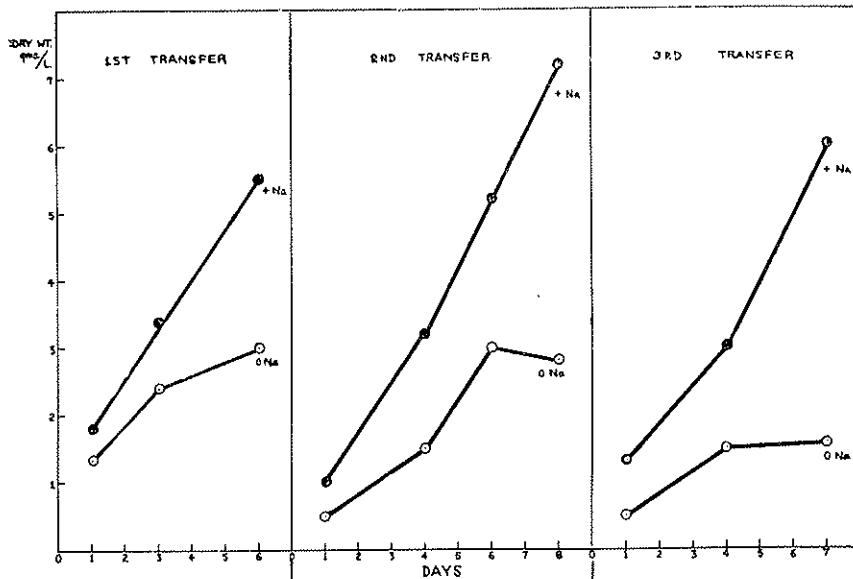


FIG. 4 — Recovery of sodium-deficient cultures of *Anabaena cylindrica* in three successive transfers to a nutrient solution containing 92 mg. Na per liter. N₂ was the source of nitrogen.

when sodium was added, but grew very little in the absence of added sodium. The difference between cultures with and without sodium became even greater when the procedure was repeated, as shown for the « third transfer » (Fig. 4).

The dependence of *Anabaena* growth on the quantity of sodium added is illustrated in Fig. 5. Five parts per million was found to be adequate for optimal development of the alga. There is no indication that larger amounts of sodium are harmful.

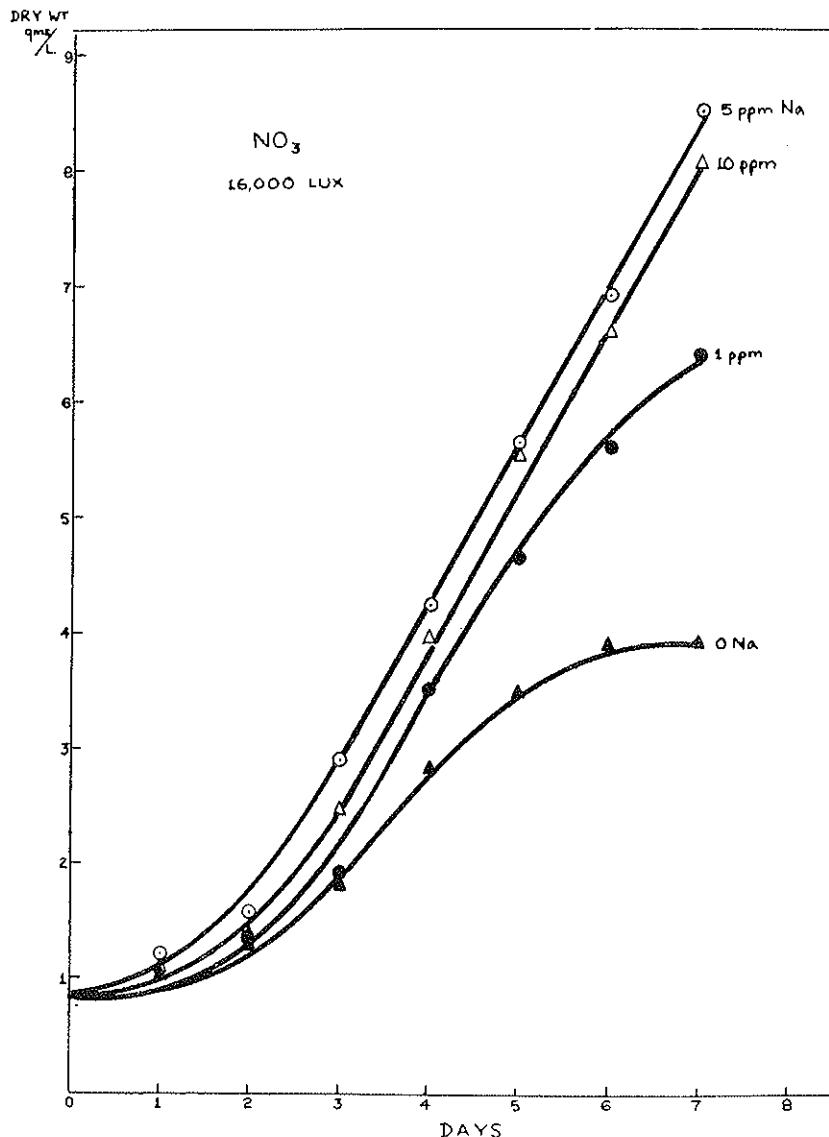


FIG. 5 — Effect of sodium concentration on the growth of *Anabaena cylindrica* in the presence of potassium (860 mgs. K as KNO₃ per liter of nutrient solution). Similar results were obtained with N₂ as nitrogen source.

The requirement for sodium was found to be specific. In the sodium concentration series (Fig. 5), potassium nitrate was used as a source of nitrogen, supplying 20 milliequivalents of potassium to the minus-sodium culture. It is evident, therefore, that sodium was not replaceable by potassium. Lithium, rubidium or cesium were similarly ineffective as a substitute for sodium (Fig. 6). Further

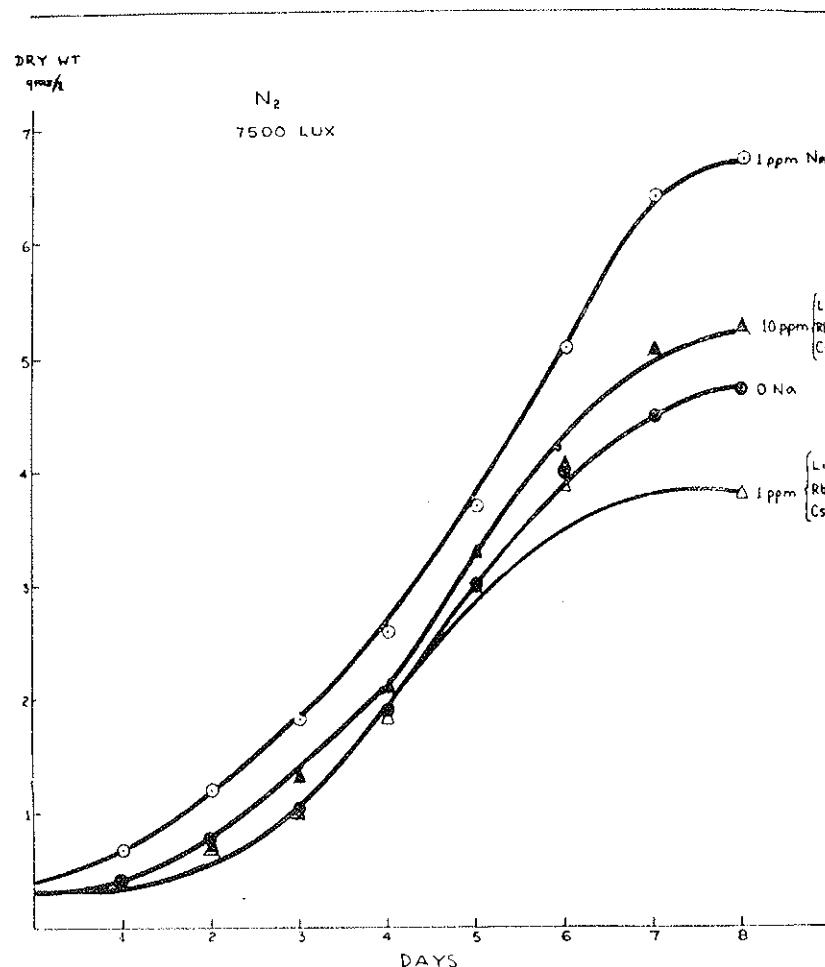


FIG. 6 — Failure of lithium, rubidium and cesium to substitute for sodium in the growth of *Anabaena cylindrica*.

experiments, illustrated in Fig. 7, have shown that just as sodium was required by *Anabaena* in the presence of adequate potassium, so was potassium indispensable in the presence of adequate sodium. The slightly depressed growth in the cultures containing 1 part per million of lithium, rubidium or cesium, might be due to toxicity of these metals but is more likely the result of experimental error,

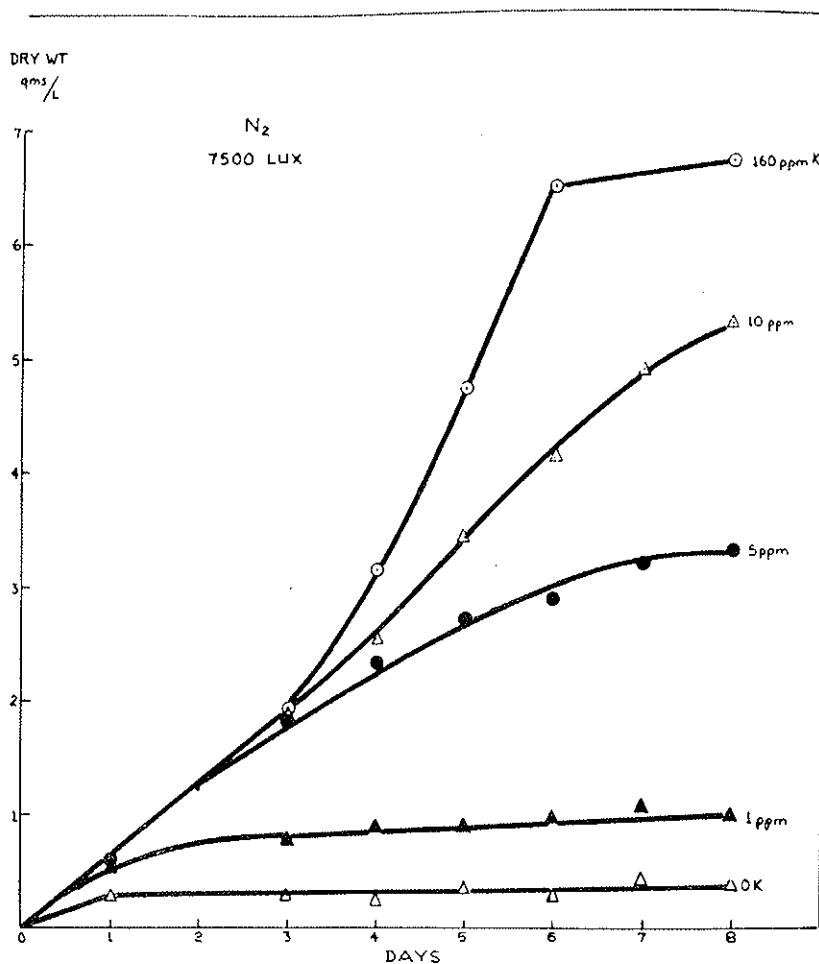


FIG. 7 — Effect of potassium concentration on the growth of *Anabaena cylindrica* in the presence of sodium (92 mg Na per liter).

since raising their concentration to 10 parts per million did not result in a further decrease of growth.

Only limited information is so far available on the function of sodium in the metabolism of *Anabaena*. One noticeable effect of sodium deficiency was that the cultures were yellowish-green, in contrast to the deep blue-green color characteristic of *Anabaena cylindrica* in a healthy condition. As shown in Table 2, this change

TABLE 2 — EFFECT OF SODIUM DEFICIENCY ON PIGMENTATION OF
ANABAENA CYLINDRICA

The concentration of sodium in the + Na cultures was 92 mg. per liter (p.p.m.)
Pigment content expressed as per cent of dry weight of algal cells.

Expt. No.	N Source	Light Intensity (Lux)	Age of Culture (days)	Per cent phycocyanin		Per cent chlorophyll	
				- Na	+ Na	- Na	+ Na
60	NO ₃	7,500	10 d.	0.02	0.45	0.12	0.17
61	N ₂	7,500	8 d.	0.63	1.60	0.15	0.25
68	NO ₃	16,000	9 d.	0.06	0.32	0.20	0.23

in color was due to the lower phycocyanin content of the sodium deficient cultures; chlorophyll was not significantly affected. Although the absolute amount of phycocyanin in the cells varied greatly with the age of the culture and the light intensity used for growth, for each set of conditions the phycocyanin content of cells grown without added sodium was markedly lower.

Despite the fact essentiality of sodium has been established for only one member of the blue-green algae, the various observations of beneficial effects of sodium on other blue-green algae [cf. 14] make it probable that a sodium requirement is a general characteristic of this group of organisms.

VANADIUM AND COBALT

Evidence has recently been obtained that vanadium is an essential element for *Scenedesmus* (ARNON and WESSEL [15]) and for *Chlorella* (WARBURG and KRIPPAHL [16]). The effect of vanadium concentration on the growth of *Scenedesmus* is shown in Fig. 8.

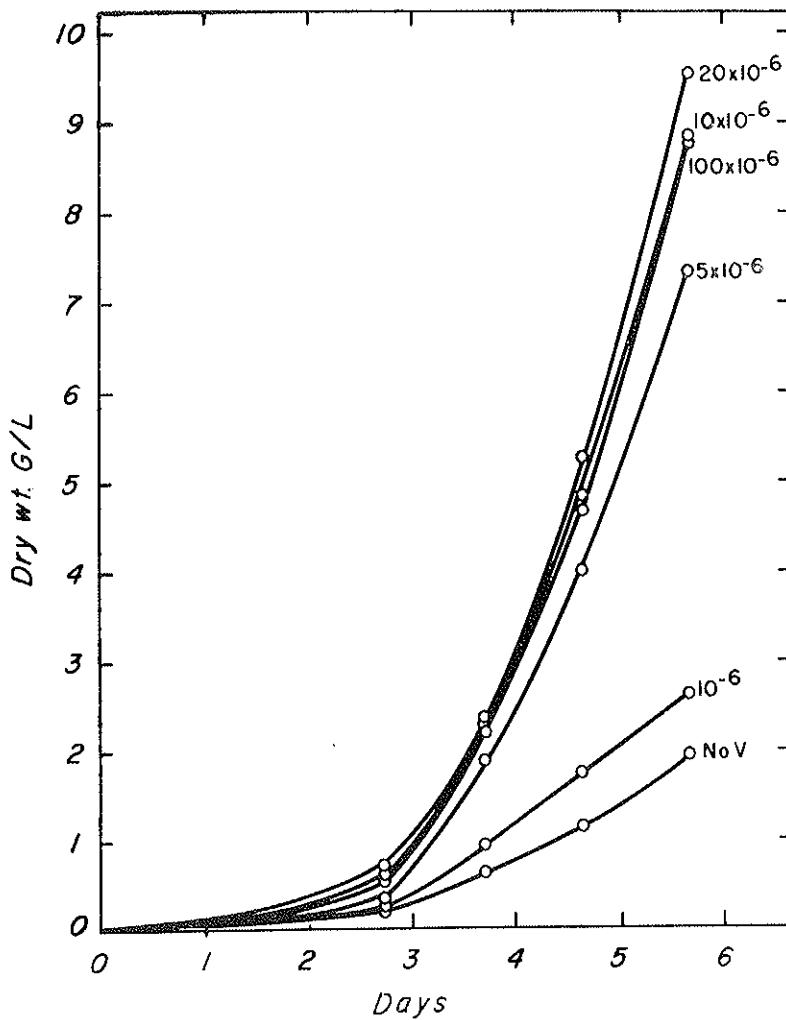


FIG. 8 — Effect of vanadium concentration on the growth (gs. dry weight of cells per liter of nutrient solution) of *Scenedesmus obliquus*. Vanadium concentration (grams per liter) is indicated on the curves.

Although there is as yet no evidence for the indispensability of vanadium for other green plants, it appears likely that this element will be shown to be generally required by plants. The essentiality of molybdenum was also first established for only one species (ARNON and STOUT [17]) by criteria similar to those used for vanadium. BERTRAND [18] has already found that vanadium is widely distributed in plants. Of sixty-two species analyzed by him, all contained this element.

The role of cobalt in animal nutrition endows this element with special interest in plant nutrition. There is as yet no well-documented case of a requirement for cobalt by higher plants or by green algae, but a recent report by HOLM-HANSEN, GERLOFF and SKOOG [19] adduces evidence for the need of cobalt by blue-green algae. Preliminary evidence in the writer's laboratory (BUDDHARI [20]) also indicates that cobalt is essential for *Anabaena cylindrica*.

BORON AND CHLORINE

Although the essentiality of boron is undisputed for higher plants, there is as yet no unequivocal evidence for the requirement of this element by algae. The status of boron remains one of the unsolved problems in algal nutrition.

The recent report of a chlorine requirement by higher plants (BROYER et al. [21]) raises the question of the need for this ubiquitous element by other plant forms. The answer to this question must also await further experiments.

GENERAL CONSIDERATIONS

The diversity of biochemical pathways in algae offers an opportunity for relating, in some cases, a requirement for an element to its specific metabolic pathway in green plants. Thus, sodium deficiency in blue-green algae (sodium not replaceable by potassium) was found to be correlated with a decrease in the characteristic blue pigment phycocyanin. It may be more than a coincidence that the lack of any clear-cut evidence on the indispensability of sodium for other plant groups is associated with their lack of

phycocyanin. Another element, molybdenum, was found to be essential for the green alga *Scenedesmus* only when nitrate, not urea or ammonia, was used as the sole source of nitrogen. In higher plants, molybdenum is reported to be essential whether ammonia or nitrate nitrogen was used. It appears, therefore, that in green algae, but not, on the basis of present evidence, in higher plants, the function of molybdenum is limited to nitrate reduction.

Of special interest are the marked differences between species in the quantitative requirements for certain inorganic elements. Calcium is needed in macroquantities by higher plants and by blue-green algae but only in microquantities by green algae. The molybdenum requirement of *Anabaena* seems to be 100 times greater than that of *Scenedesmus* or of higher plants.

These quantitative differences among different species are of great methodological importance in the study of essentiality of inorganic nutrients. A given experimental technique may be adequate for demonstrating the essentiality of an element only in those species in which its quantitative requirement is high. Thus, a judicious or a fortuitous selection of species may permit an early discovery of a new essential element, whose requirement for other plants will only be demonstrable by additional refinements in experimental procedures. The history of micronutrient research contain a number of instances of this sort [9].

These considerations raise the question whether evidence for the essentiality of an element by one species always indicates a universal requirement for this element by all plants. Is vanadium, for example, to be regarded now as a universally essential micronutrient for green plants? No unequivocal answer can be given to these questions. It is certain that before an element can be considered universally essential, it must be shown to be universally present in diverse species. Since plants are known, however, to absorb non-essential elements as well, evidence of wide distribution can, by itself, not be decisive.

In the absence of direct evidence from growth experiments [9], it seems desirable to base the evidence for a requirement of an inorganic element on its physiological role. Thus, the requirement for molybdenum in *Scenedesmus* was found to be linked with the ni-

trogen source [10]. Molybdenum met the criteria of essentiality when nitrate was the nitrogen source but not with ammonia or urea. Likewise, should it be demonstrated, which on the basis of present evidence is by no means certain, that the role of sodium in *Anabaena* is limited to phycocyanin metabolism, it would be conceivable that sodium is essential only for the blue-green algae which contain this pigment. From this point of view, universal essentiality of an inorganic element would be compatible only with a specific function for the element in a physiological process common to all plants. Species characterized by special metabolic pathways could thus possess special requirements for inorganic elements.

MOLYBDENUM, VANADIUM AND MANGANESE IN PHOTOSYNTHESIS

The use of algae as experimental material offers exceptional opportunities for investigating the function of inorganic nutrients in physiological processes such as photosynthesis and respiration. Their aquatic habit of growth and absence of special structures or organs for gas exchange and absorption of ions and water with the attendant problems of translocation greatly facilitate the study of cellular events in response to variations in the external medium.

Special attention was given to the effects of molybdenum, vanadium and manganese on photosynthesis. Molybdenum deficiency resulted in a marked reduction in chlorophyll content of both *Scenedesmus* [10] and *Chlorella* [22] and, consequently, in the rate of photosynthesis. The depression of photosynthesis in the absence of molybdenum was approximately proportional to the depression in chlorophyll content. However, the rate of photosynthesis per unit chlorophyll remained essentially unaltered. The tentative conclusion was drawn, therefore, that regardless of whether other factors were operative, the observed reduction of the rate of photosynthesis in molybdenum-deficient cells could be accounted for solely by their lower chlorophyll content.

The search for a physiological role of vanadium yielded evidence [23, 24] that this element is involved in photosynthesis. As shown in Table 3, vanadium deficiency resulted in a substantially lower chlorophyll content though not to the same drastic degree as

in the case of molybdenum deficiency [10]. Photosynthesis of plus and minus vanadium *Scenedesmus* cells was studied at a high (20,000 Lux) and a low light intensity (2000 Lux). The rate of photosynthesis, expressed on a unit chlorophyll basis, was twice as high in the plus vanadium cells as in the minus vanadium cells, but only in strong light (Table 3). In the weaker light there was no significant difference between the two cultures in the rate of photosyn-

TABLE 3 — EFFECT OF VANADIUM ON CHLOROPHYLL AND PHOTOSYNTHESIS IN *SCENEDESMUS OBLIQUUS*.

Exp.	CHLOROPHYLL Per cent Dry wt.		PHOTOSYNTHESIS mm ³ O ₂ /mg chl./hr.)			
			2,000 Lux		20,000 Lux	
	- V	+ V	- V	+ V	- V	+ V
A	1.7	2.3	1500	1500	2400	5200
B	1.7	2.3	1600	1600	2900	4600
C	1.7	3.1	1200	1600	1900	4000
D	1.3	2.3	800	1200	1600	4000
E	1.2	2.6	900	1400	1200	3700
F	1.2	2.6	1100	1200	1200	3400
G	1.0	1.8	1400	1700	1500	3200

thesis. The effects of vanadium deficiency at high and low light intensity are graphically represented in Figs. 9 and 10.

The effects of vanadium on photosynthesis invite comparison with those of manganese observed in parallel experiments in this laboratory (TSUJIMOTO, 1954). Manganese deficiency, unlike that of molybdenum, and to a lesser extent vanadium, did not reduce significantly the chlorophyll content of *Scenedesmus*. Total growth as measured by cell-count, packed cell volume, and dry weight was arrested, but the chlorophyll content of the manganese-deficient cells was approximately the same as that of the controls.

The rate of photosynthesis in the manganese deficient cells was also investigated under a high and a low light intensity. The results (Fig. 11) expressed again on a unit chlorophyll basis, differ in one interesting respect from those found in vanadium deficiency (Fig. 9). Manganese deficiency was found to reduce the rate of photosynthesis in both weak and strong light (Fig. 11), suggesting that manganese

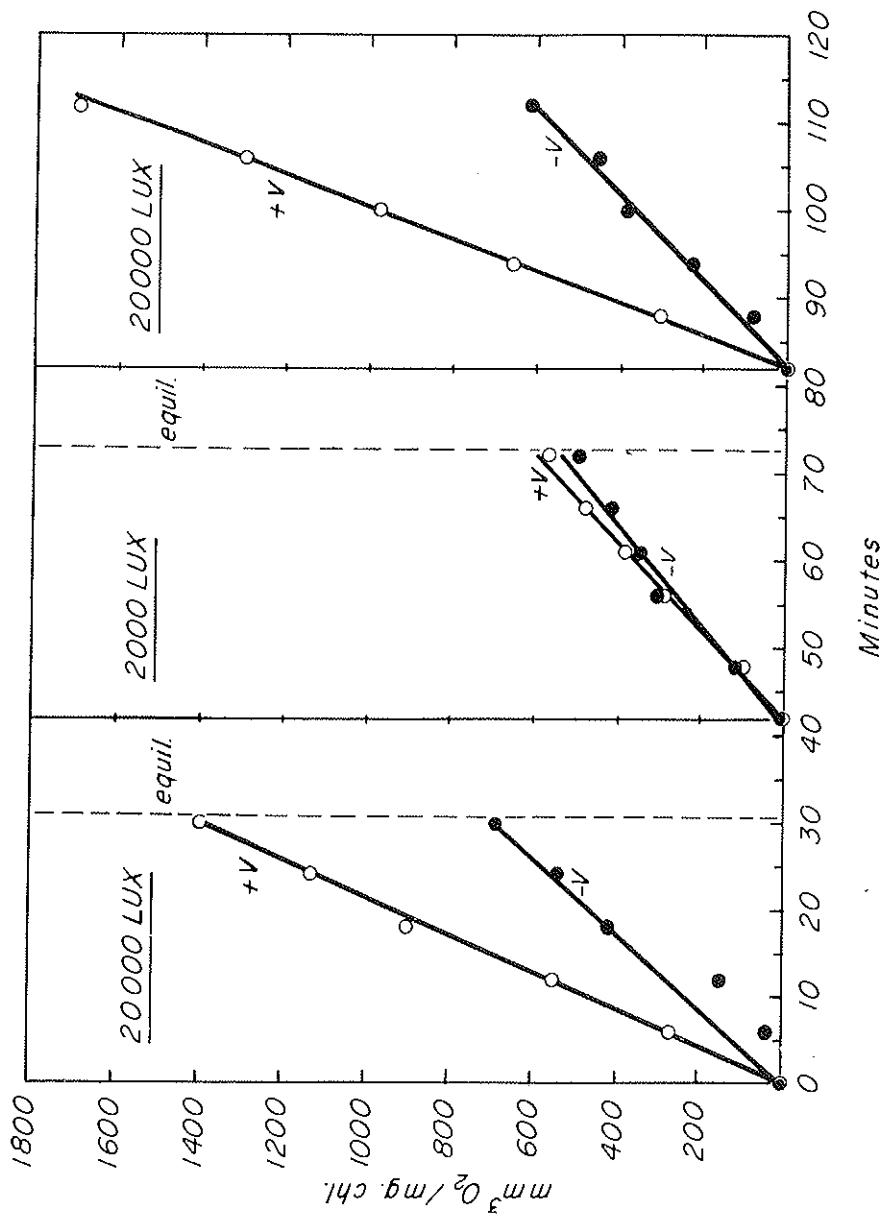


Fig. 9.—Effect of vanadium on the photosynthesis of *Scenedesmus obliquus* at a high and a low light intensity. The same cells were exposed successively to high and to low and again to high light intensity with intervening equilibration periods.

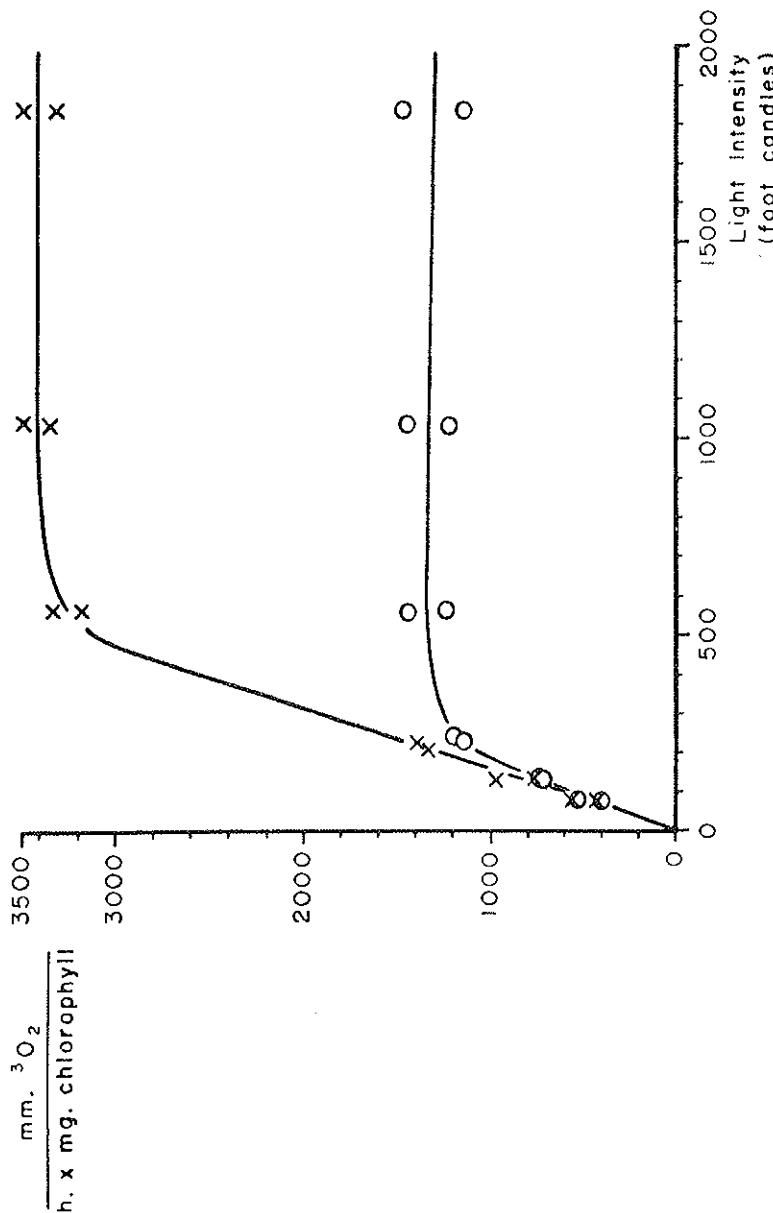


FIG. 10 — The rate of photosynthesis of plus-vanadium (crosses) and minus-vanadium (circles) *Scenedesmus obliquus* cells as a function of light intensity.

may be involved in the photochemical reactions at all light intensities.

This direct participation of manganese-catalyzed reactions in the photochemical events of photosynthesis is also shown in Fig. 12. The lower rate of photosynthesis of cells grown without added manganese was restored to that of the normal cells (+ Mn) by the addition of manganese during the progress of the photosynthesis experiment. The addition of manganese to the minus-manganese cells ($-Mn + Mn$) whether made while the cells were illuminated or kept dark, restored the normal rate of photosynthesis within about 20 minutes. By contrast, the addition of vanadium to the minus vanadium cells restored the normal rate of photosynthesis at high light intensity only after several hours. The prompt restoration of a normal rate of photosynthesis in the minus-Mn cells by the addition of manganese suggests a direct catalytic participation of this micronutrient in photosynthetic reactions. These effects of manganese on photosynthesis in *Scenedesmus* are fundamentally in agreement with the earlier work of PIRSON et al. [26] on *Ankistrodesmus*.

The effects of manganese described so far concern photosynthesis as measured at the cellular level. Evidence was recently obtained from experiments with isolated chloroplasts that manganese may be involved in photosynthetic carbon dioxide fixation [27], as well as in photosynthetic phosphorylation, i.e., the conversion of light energy into the chemical energy of the pyrophosphate bonds of adenosine triphosphate (ATP) independently of carbon dioxide fixation or the reoxidation of partly or wholly reduced products of photosynthetic CO_2 fixation [28]. In these experiments magnesium was found to be essential for photophosphorylation but this element was fully replaceable by either manganese or cobalt, at least up to a concentration where manganese and cobalt phosphates precipitated. Beyond this point, the equivalence of manganese and magnesium could not be experimentally studied. It is possible that *in vivo* manganese is a cofactor of photosynthetic phosphorylation. This possibility is especially interesting in the light of recent reports by LINDBERG and ERNSTER [29] on the role of manganese in oxidative phosphorylation.

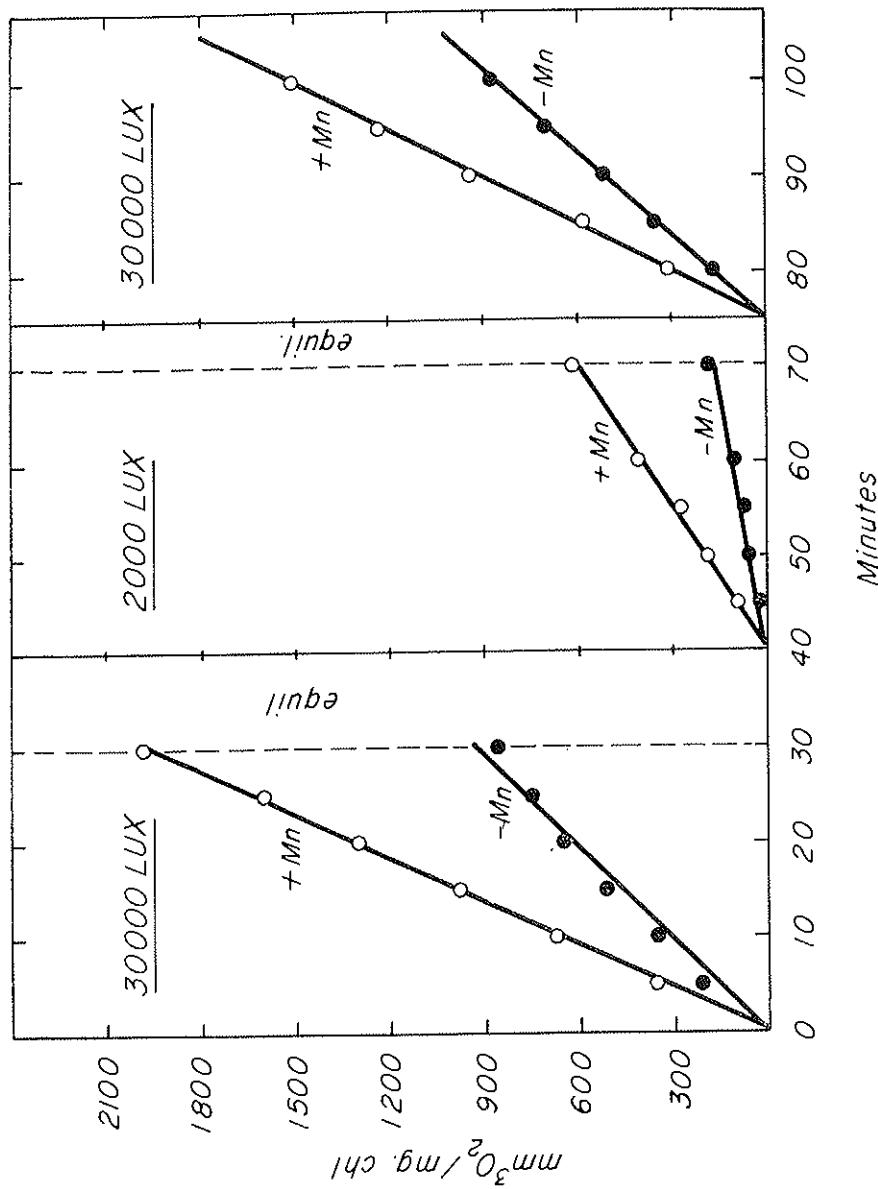


FIG. 11 — Effect of manganese on the photosynthesis of *Scenedesmus obliquus* at a high and a low light intensity. The same cells were exposed successively to high, to low and again to high light intensity with intervening equilibration periods.

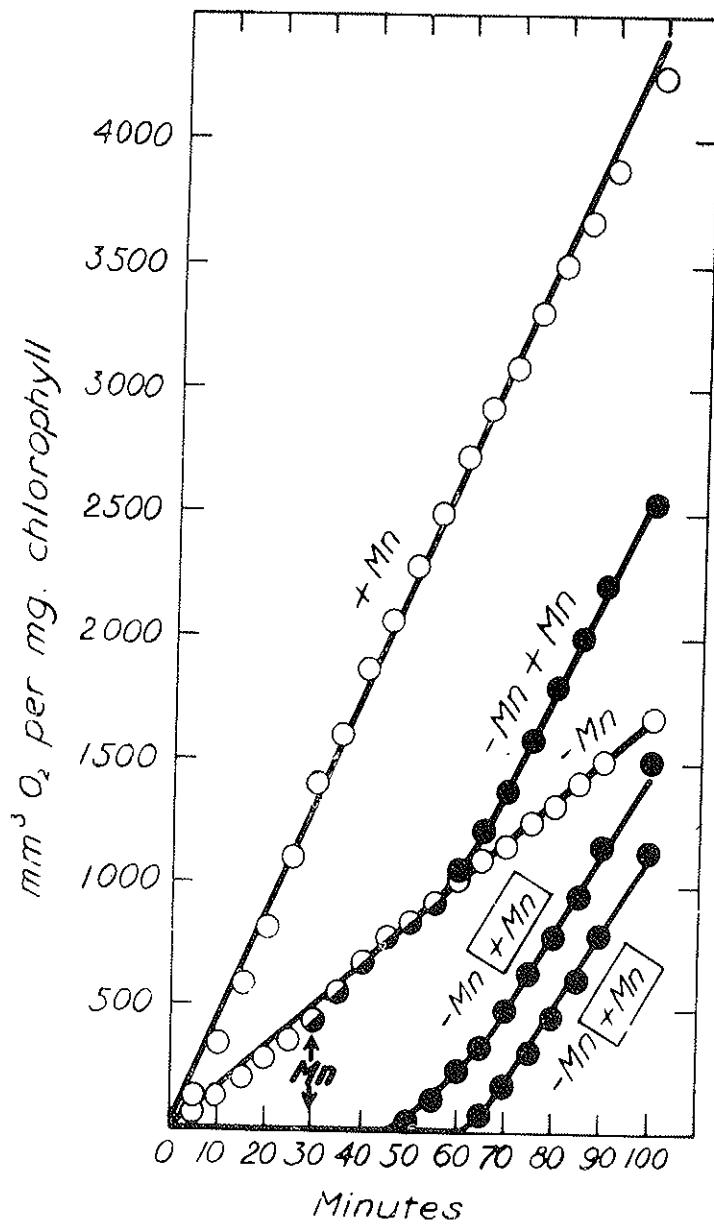


FIG. 12 — Restoration of normal photosynthetic rates on addition of manganese to -Mn cells. At time indicated by arrows Mn was added to -Mn cells exposed to light (-Mn + Mn) or kept in the dark (-Mn + Mn). The two lowermost curves were obtained with cells exposed to light 20 and 30 minutes after the addition of manganese.

REFERENCES

- [1] MYERS J., « Ann. Rev. Microbiol. », 5, 157 (1951).
- [2] STEGMAN G., « Z. f. Bot. », 35, 385 (1940).
- [3] WALKER J. B., « Arch. Biochem. Biophys. », 46, 1 (1953).
- [4] PRINGSHEIM E. G., « Planta », 2, 555 (1926).
- [5] GERLOFF G. C., FITZGERALD G. P. and SKOOG F., « Amer. J. Bot. », 37, 835 (1950).
- [6] ALLEN M. B., « Arch. f. Mikrobiol. », 17, 34 (1952).
- [7] ALLISON F. E., HOOVER S. R. and MORRIS H. J., « Bot. Gaz. », 98, 433 (1937).
- [8] ALLEN M. B. and ARNON D. I., « Plant Physiol. » (In press), 1955.
- [9] ARNON, D. I., in « Mineral Nutrition of Plants », F. Truog, Ed. Univ. Wisconsin Press, Madison, Wis. 313 (1952).
- [10] ARNON D. I. This volume.
- [11] HEWITT E. J. and McCREADY C. C., « Nature », 174, 186 (1954).
- [12] SPENCER D. and WOOD J. G., « Aust. J. Biol. Sci. », 7, 425 (1954).
- [13] BEAR F. E., Edit., « Soil Science », 76, 1 (1953).
- [14] ALLEN M. B. and ARNON D. I., « Physiol. Plantarum » (in press) 1955.
- [15] ARNON D. I. and WESSEL G., « Nature », 172, 1039 (1953).
- [16] WARBURG O. and KRIPPahl G., « Angew. Chem. », 66, 493 (1954).
- [17] ARNON D. I. and STOUT P. R., « Plant Physiol. », 14, 599 (1939).
- [18] BERTRAND D., « Bull. Soc. Chim. Biol. », 23, 390 (1941); C. R. Acad. Sci. (Paris), 213, 254 (1941).
- [19] HOLM-HANSEN O., GERLOFF G. C., and SKOOG F., « Physiol. Plantarum », 7, 665 (1954).
- [20] BUDDHARI W., Unpublished data, 1955.
- [21] BROYER T. C., CARLTON A. B., JOHNSON C. M. and STOUT P. R., « Plant Physiol. », 29, 526 (1954).
- [22] LONERAGAN J. F. and ARNON D. I., « Nature », 174, 459 (1954).
- [23] ARNON D. I., 8^e Congress. Intern. Botan. Paris, Rapports et Communicat. Sect. 11: 73 (1954).
- [24] ARNON D. I., ICHIOKA P. S. and FRENKEL A. W. Unpublished data. (1953).
- [25] TSUJIMOTO H. Unpublished data (1954).
- [26] PIRSON A., TICHY C. and WILHELMI G., « Planta », 40, 199 (1952).
- [27] ALLEN M. B., ARNON D. I., CAPINDALE J. B., WHATLEY F. R. and DURHAM L. J., « J. Amer. Chem. Soc. », 77, 4149 (1955).
- [28] WHATLEY F. R., ALLEN M. B. and ARNON D. I., « Biochim. et Bioph. Acta », 16, 605 (1955).
- [29] LINDBERG O. and ERNSTER L., « Nature », 173, 1038 (1954); « Acta Chem. Scand. », 8, 1096 (1954).

ABSORPTION, TRANSLOCATION AND SECRECTIONS OF IONS APPLIED TO THE THEORY OF SALT ACCUMULATION

H. LUNDEGÅRDH

I am glad to have this opportunity to present a summary of my theory of salt accumulation, because I was asked yesterday by Dr. McCance and Dr. Arnon to point out the possibility of an application of this theory to various problems of absorption, translocation and secretion of ions touched upon in the preceding discussion. I shall try to do it briefly.

As you might remember from my speech the other day, it is now commonly known that ions may be non-metabolically absorbed and kept in the protoplasm by means of carriers, viz. large molecules (proteins, nucleotides etc.) present in the protoplasm. Besides of this general exchange capacity of the protoplasm we have in plants an active absorption which is causally linked to the cytochrome system. The cytochrome system acts as an electron ladder from hydrogen to oxygen, its negative pole facing the dehydrogenases, its positive pole facing the oxygen molecules. The dehydrogenases are removing hydrogen from the carbohydrates and then, in again releasing the hydrogen, splitting it into an electron and a proton, viz. $H \rightarrow H^+ + e$. The electrons are picked up by the negative pole of the cytochrome system, primarily by cytochrome *b* which has the lowest potential. From cytochrome *b* the electrons are running through the steps of the ladder, *c* and *a*, until they are

from α (or the cytochrome oxidase) transferred to oxygen. The ionized oxygen instantaneously combines with protons H^+ forming water. This is the main reaction of the aerobic respiration.

A transference of electrons from one molecule to another now means a considerable change in the electrostatical balance of the near surroundings of the reactants. This can only be compensated by a rearrangement of the movable ions in the field. Thus for each

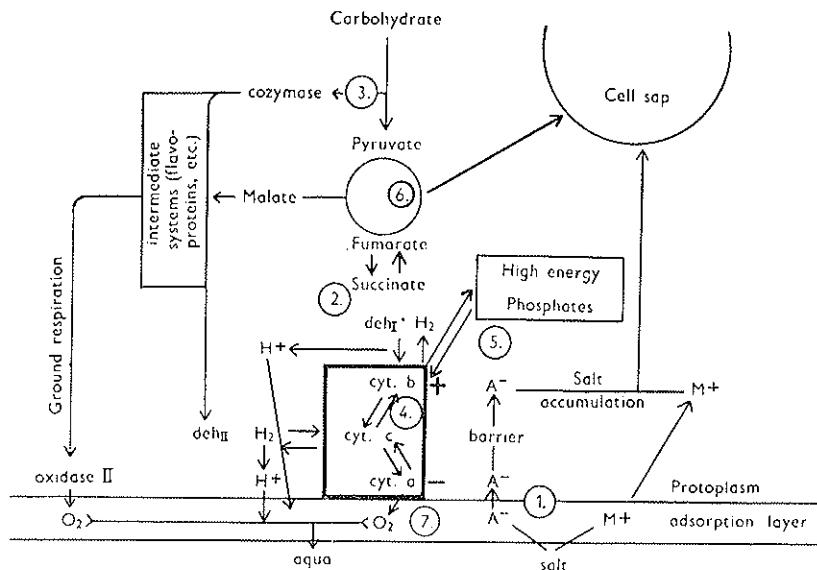


FIG. 1.

Scheme of the enzyme systems conducting the aerobic respiration in higher plants.

electron leaving a cytochrome, one anion is attracted; that means that if the different cytochromes are arranged in a rod-like structure a stream of anions will be moved along the rod in opposite direction to the path of electrons. The complete system may be figured as a submicroelectrical battery, as I mentioned in the introduction of this discussion (see fig. 1). A vast number of experimental facts are supporting the theory, e.g. the quantitative relation between the number of transported anions and the oxidation-reduction balance of the cytochrome system in roots of cereals. All sorts of

anions are caught by the cytochrome system and accumulated in the cell sap, but the efficiency is inversely related to the mobility (size, charge, hydration), thus for the inorganic anions giving the order $\text{NO}_3 > \text{Cl} > \text{SO}_4$. Also anions of organic acids are moved by this mechanism. Owing to osmotical rules, water is moved synchronously with the ions. We know that in higher plants the accumulated salts are given off to the ascending sap stream in the stele. It has been suggested that a similar mechanism is operating in the gastric *mucosae* and possibly in the kidney. Of the very high amount of energy released in the process only a small part is needed for salt accumulation. A 1000-fold accumulation of nutrient salts from the soil into the plant only consumes a few per cent of the total energy. The anions which are actively pushed into the sap space of the cells, are releasing the metallic cations from their carriers, as a result of which inorganic salts may be accumulated.

Because of the predominant acidoidic dissociation of the protoplasm cations are, however, considerably more freely transferred than anions. If the cytochrome system is blocked by cyanide, or in the absence of oxygen, metallic cations may still come in or be exchanged for other cations in the cells. If a root tissue has been charged with a surplus of calcium ions, calcium may go out in exchange for potassium or any other cation supplied from the medium. The oligoelements may thus be absorbed without expenditure of metabolic energy, but the anion respiration may be helpful for the inside translocation. The transport of iron from the roots to the leaves is thus aided by a surplus of nitrate, an anion which rapidly responds to the respiratory system.

Because of their atomic dimension and their charge some of the heavier ions, e.g. Cu^{++} are closely bound to the carriers and then remain partly unexchangeable. That is the reason why we get this drop in the surface potential I was speaking of in my previous communication. These anchoral quantities of oligoelements are then, of course, less accessible for metabolic processes. And this may explain why microelements are needed in larger quantities than those which are really active in the cells. The blocking of the carrier molecules by heavy cations may also explain the difficulties in the secretion of heavy ions through the kidney. Because of the

electrophonetic scheme working around the cytochrome system anions are going in and cations are going out. Because protons (H^+) are continuously produced at the negative pole of the system, these will largely represent the stream of cations moving in the opposite direction of the anions, as to be expected by an electrophoresis. But at high content of metallic cations some of these may be caught by the anion respiration mechanism and thus be actively excreted. The cytochrome system may thus be able to work as a mechanism of secretion of cations, too. This possibility may probably be realized in the animal organism.

Besides of the metabolically steered mechanism of transport of ions, of which the cytochrome system is one of the more important ones (other mechanisms are reversible phosphorylation and reversible production of organic acids) metallic elements may be transported as non-dissociated organic compounds, if these are able to penetrate the protoplasmic membrane (= permeability). Dr. McCance has told us about the poisoning of iron, when the patient is suffering from a disease in which the hemoglobin is decomposed resulting in a high concentration of iron. Iron is then stored in high concentration in the liver or in the kidney, and it cannot come out, because of the blocking of the ion carriers and impermeability to the compounds. The coefficient of permeability of non-dissociating compounds is regulated by a number of factors which determine the hydration and the lipophilic properties of the compounds. It is known that even large molecules, e.g. nucleotides may traverse the protoplasmic membrane. It is a well-known fact that compounds which are easily solvable in fats are going much easier in and out than compounds which are only solvable in water. The penetration of large molecules depends, of course, upon the very intricate interference between and the colloidal net of the protoplasmic membrane. Going back to the problem of secretion of heavy metals through the kidney, it may be concluded that it might be possible to introduce an organic carrier which is easily permeable and which thus may be able to remove the metal by secretion. Suitable carrier compounds must have such an hydration or non-hydration that they can move in and out through the boundary of the protoplasm.

I think this must be an important problem also for the chemotherapeutic medicine. The whole problem in some way reminds of that of toxins and antitoxins. The carriers needed for the catching of heavy metals will thus act similar to antitoxins.

I don't know if it is possible to have some clinical influence upon these problems, but they are certainly fascinating. If the carrier substances are slightly dissociated they may also be caught by the active mechanism and be able to go out that way, too.

What I have given you here is a brief exposure of a theory, but I think it may serve as a basis for the reasonable understanding of how the non-metabolic and metabolic processes are cooperating in moving ions from the medium to the cells and from the cells by means of excretion again to the outside, processes which are fundamentally responsible for the life of cells and organisms.

DISCUSSIONS

DISCUSSION SUR LE RAPPORT MITCHELL

LAVOLLAY

J'ai été aussi très intéressé par les faits qui ont été rapportés par M. Mitchell. Je voudrais lui demander une précision sur un point de détail. Vous avez déterminé les éléments après extraction par l'acide acétique à 2,5%; considérez-vous que ce réactif donne une bonne mesure des éléments « assimilables » et n'y a-t-il pas des différences considérables dans l'activité du réactif suivant la teneur en calcaire de l'échantillon analysé?

MITCHELL

This concentration of acetic acid (2,5%) gives an indication of the extractable content. It is purely an arbitrary concentration but for the exchangeable cations like the sodium, potassium, calcium it gives the same value as ammonium acetate. It gives about ten times as much of trace elements, like cobalt and nickel, as does ammonium acetate. It is I think undoubtedly too strong an extractant to give a direct indication of plant uptake. But if you go to a weaker extractant the amount which is taken out is so small that it is difficult to make determinations unless you employ a large amount of soil, and even this is only an arbitrary figure.

LAVOLLAY

Does the amount extracted by acetic acid not vary with the CaCO_3 content of the soil?

MITCHELL

In Scottish soils CaCO_3 is very uncommon.

LAVOLLAY

That is quite clear, thank you very much indeed.

SEEKLES

I would like to ask two questions.

1st - What is the advantage of using 2.5% to 0.1 normal hydrochloric acid?

2nd - My observations regarding the uptake of molybdenum by red clover as compared with grass are not quite in agreement with Dr. Mitchell's findings. - Table 9 shows that there is only a small difference between red clover and grass in this respect. However, we have found in Holland that at a pH = \pm 6.5 of the soil there is a considerable difference between the Mo content of clover and grass, the clover containing 10 to 15 times as much as the grass, e.g. 28 and 2 p.p.m. respectively (dry matter basis).

MITCHELL

$\frac{N}{10}$ HCl removes so much aluminium and iron that it creates analytical difficulties for trace elements. Acetic and hydrochloric acids, at the same pH, remove roughly equivalent amounts of cobalt. There is one point that, when one works out the amount of trace elements which a plant takes up per unit weight of soil when it is growing and compares that with the amount that is taken out by acetic acid, one finds that this will take out at least 10 times as much. If you consider elements like molybdenum or boron which are generally assessed by water solubility or ammonium acid extraction at pH 7 then you find that the amount which the plant takes up and the amount which is taken out by the extractant are of the same order. They are variable, of course, but the order is the same.

SEEKLES

May I ask what is the pH of your soils?

MITCHELL

About pH 5.7.

SEEKLES

It is lower. It does not matter so much, we see that there is not so much difference between the contents of the mixed pasture as compared with cocks foot, rye grass and red clover. Well, my experience is a bit different; at a pH 6.5 there was an enormous difference in molybdenum content in red clover as compared with the grasses. So I have found about 10 to 15 times as much molybdenum in red clover. For grass it was about 2 to 3 p.p.m. and for red clover 30, or 28 something like that. Could you explain this?

MITCHELL

May I elaborate a little bit on this question of clover and molybdenum. You probably had read the publication on tart pastures. One of the important points there is, that farmers dare not improve their pastures on these particular tart soils in order to get clover, because the clover has a very high content of molybdenum. There is quite a difference between the various grasses too; if I remember, one of the high molybdenum is Yorkshire Fog (*Holcus lanatus*), but the clovers are outstanding, and for that reason farmers cannot improve these pastures by phosphatic fertilizers or they will increase the tarts and the grazing animals may die.

VIRTANEN

I would like to ask Dr. Mitchell what is the boron content of grass and clover in Scotland? There is often deficiency of boron especially in red clover. Also in the case, that red clover grows well without any addition of boron, the seed production can often be raised in Finland a 100% or still more by addition of 20 kg. B per ha. We have estimated boron in 300 samples of red clover from different parts of Finland and found 4-40 p.p.m. B in the samples.

MITCHELL

There do not appear to be any B problems with herbage in Scotland.

WALLACE

There are one or two points on which I should like to draw attention in Dr. Mitchell's paper, and which at the moment I think will come over

and over again in our discussions. There is first the question of boron, for which the main mineral is tourmaline. It seems that the boron which is available must come through sediments and particularly from those sediments which have been laid down by the sea. The sea is important for accumulating available boron.

Then we have the question of molybdenum in the same way. If you look through the tables of Dr. Mitchell you will see that the values for molybdenum are generally low in most rocks, and in fact, available molybdenum seems to be circulated in the organic matter. Shales are an exception, and in particular the oil shales on soils of which you can get molybdenum toxicity in animals.

Again with the very basic rocks particularly serpentine, Dr. Mitchell's data point very clearly to the fact that you may get toxicities of chromium, cobalt and nickel, and of course this is a point which has been recognized in determining the sterility of certain soils formed from serpentine rocks.

Then Dr. Mitchell, in dealing with pH effects, discussed only a very narrow range. I think it was only 5.4 to 6.4. I think we must cover a very wide range to see the whole picture. In the case of molybdenum the picture seems to be quite clear. It is the exceptional among the trace elements, in that the more basic pH the more available is molybdenum. For some of the others it is not so simple. You generally have a higher availability at a low pH, then you get a gradual decrease as the pH rises, but when you get to the high values then again you may begin to find greater availability. This sequence has been shown some years ago for boron and more recently in some Indian soils for manganese.

LAATSCH

Dem Boden zugesetztes Kobalt wird vom Boden sehr stark festgelegt. Die Weidepflanzen können es nur in sehr geringen Mengen aufnehmen. Ist der Mechanismus der Fixierung bekannt? Sind die Mikroorganismen stark beteiligt?

MITCHELL

It is, I think, with a mineral soil, mainly cationic or sometimes anionic exchange on the surfaces of argillaceous clay minerals: if it is a highly

organic soil, one must consider also the organic complex. If we add, say, one part per million of cobalt to a soil and then extract with acetic acid, we cannot recover more than a small proportion of the added cobalt.

I do not know of any indication that the microbes take up the dressed cobalt, I think it is due to a straight colloidal absorption.

LAATSCH

Thank you very much.

SCHARRER

Sind in Schottland Molybdän-Mangelerscheinungen in der Praxis der Pflanzenernährung beobachtet worden?

MITCHELL

We have not observed any.

LUNDEGÅRDH

Yes, but then there must be chemical and physiological factors responsible for the variations in availability. That, I mean, must be explained before we are able to treat the deficiency problems from a scientific point of view.

MITCHELL

That is a problem with herbage we are at present studying. It is difficult to make pot culture experiments, because of the amount of material required to carry out a comprehensive trace element analysis. We like to have something like 20 to 50 grams of dry matter, which is quite a large amount from the point of view of pot-culture of pasture grasses.

LUNDEGÅRDH

I would like to ask Dr. Mitchell to what extent he has used tissue analyses for the examination of the availability of trace elements. Of course, I agree with him that as the basis of the whole problem we must use chemical extraction. But it gives you a very vague idea of the real availability. As an example we may take the relations between pH and

the absorption of manganese. It was shown in my laboratory more than 20 years ago, that the absorption of Mn has a minimum at about pH 7 or 6.5 and goes up both on the acid and alkaline sides.

Tissue analysis thus reflects the real availability, also in respect of pH. And then we have the question of the distribution within the plant. The absorbed element have a long way to go from the roots up to the active parts e.g. the leaves, and we know very well that different elements move in a very different way.

MITCHELL

Most of our trace element problems in Scotland are related through the plant to the animal. We get cobalt problems, we get copper problems and I think there is probably also some molybdenum excess. For these, we analyse both the soil and the pasture herbage, and also individual species of the pasture herbage.

We find that there is quite a variation in the composition of pasture herbage, throughout the year, and this makes it rather difficult to use the plant. It would be better, as we are trying to do, to get a soil method, as this can be sampled at any time of the year. The difficulty of plant tissue analysis is that you must know your conditions of sampling so exactly. Even from one month to another you may get quite different results, because of the different stage of growth.

LAATSCH

Wir haben den Titantest ebenfalls angewandt. Es hat sich gezeigt, dass stärker mit Staub verunreinigte Pflanzen nicht ausreichend gereinigt werden können. Gibt es ein geeignetes Waschverfahren?

MITCHELL

We do not wash grass; we fence off the portion which is going to be sampled if there are animals in the field. In Scotland we seldom get sufficiently long dry periods to cause trouble with dust.

SANTOS RUÍZ

Quería preguntar al Dr. Mitchell si la valorización del boro la verifica por medio espectro-químico, ya que nosotros hemos realizado algunas veces

determinaciones de este tipo, y nos encontramos siempre con el inconveniente de la presencia de este oligoelemento en los electrodos soporte.

MITCHELL

We do not determine boron spectro-chemically at present. That is why we do not have boron figures in the tables presented. Boron, when it is determined, is determined by one of the normal colorimetric methods.

McCANCE

Before we pass to another paper I would like to ask one or two questions. The first concerns ionic size. This must be important in permeability, but where does valency come in? I noticed in some places that sodium seemed to be able to replace calcium in a mineral crystal although it has a different valency.

The second question is this. Are you quite sure that your lime does not contain micro-elements?

Thirdly, am I right in thinking that bad drainage nearly always lowers the pH of a soil?

MITCHELL

You may get lithium for instance replacing ferrous iron or magnesium in a crystal of olivine. It has a suitable radius. At the same time there will be a corresponding valency substitution between, perhaps, aluminium and silicon elsewhere in the lattice.

McCANCE

Thank you.

MITCHELL

Our results are not due to contamination of the lime. Bad drainage need not lower the pH.

McCANCE

Thank you. I understand now. There is a double change.

ARNON

I might say on this point that in California we actually have an area of molybdenum toxicity to the animals through the use of legumes for pasture. There is in these particular plants a very high capacity for accumulation of molybdenum, from species to species.

WALLACE

Do you remember what the pH values of your soil are?

ARNON

I do not remember specifically, but I would guess that it should be neutral to alkaline. Most of our soils in that area are.

LAVOLLAY

Lorsque nous voulons déterminer les oligo-éléments assimilables dans un échantillon de sol, nous commençons toujours par dessécher à l'air l'échantillon, puis nous appliquons la méthode d'extraction choisie.

Dans mon laboratoire, on a étudié l'extraction par des solutions tamponnées; et nous avons constaté qu'il y a des variations considérables dans la solubilité des éléments dans le réactif, *au cours du temps*. C'est un fait bien connu que la déshydratation des échantillons de sol peut changer la solubilité, mais ici il s'agit de changements de solubilité avec le temps et d'échantillons desséchés et conservés au laboratoire pendant des périodes de plusieurs mois.

MITCHELL

We have not considered this question for many elements. We have examined it for cobalt, for which we do not get much variation.

BERTRAND

Je voudrais faire une observation d'un caractère assez général à propos de l'analyse des sols. On considère fréquemment les échantillons de sols comme étant tout simplement des échantillons de matières minérales sans penser qu'il s'agit, au contraire, de milieux dans lesquels il y a, parfois en quantités considérables, non seulement des composés humiques,

mais des espèces vivantes, les unes végétales et les autres animales. Ces espèces sont microscopiques mais elles vivent, les premières, comme les plantes supérieures, directement des éléments minéraux du sol, qu'elles cèdent ensuite aux secondes, formées surtout d'infusoires. On doit donc se souvenir qu'en général une partie des éléments du sol est engagée sous la forme vivante et le reste sous la forme minérale et que chacune de ces formes peut se comporter à sa manière vis-à-vis des dissolvants et des réactifs.

Si on limite son attention à l'assimilabilité des formes minérales par les plantes, on peut déjà avoir à faire, avec certains éléments, à des formes très différentes quant à la solubilité dans les solvants extractifs: par exemple, s'il s'agit du calcium selon qu'il est à l'état de sulfate et de carbonate, du manganèse sous la forme de carbonate et de divers oxydes, etc.

BONINO

Ho ascoltato con grande interesse la comunicazione del prof. Mitchell e non avrei avuto nulla da aggiungere e da chiedere; ma l'osservazione di carattere generale del prof. Bertrand mi consiglia di dire qualche cosa dal punto di vista chimico-fisico teorico: che, cioè, i criteri, direi, e le basi stesse teoriche chimico-fisiche che servono al geochimico per stabilire e studiare la distribuzione degli elementi nei minerali e nei cristalli, effettivamente non sono sufficienti al biologo ed al fisiologo per impostare lo stesso problema chimico-fisico-biologico.

Il prof. Bertrand mi pare abbia toccato questo punto, dicendo: guardate che il terreno non va visto come un ente esclusivamente minerale, ma visto come un ente parzialmente biologico. Ora giustamente, nel campo geochimico, noi abbiamo visto rivelata molto opportunamente l'importanza di due dati chimico-fisici, che sono fondamentali e determinano il dinamismo chimico-fisico dell'ione, e cioè il raggio ionico e il potenziale ionico (che è il rapporto tra la carica e il raggio ionico).

Ora, passando al campo biologico, dobbiamo ricordare che il dinamismo chimico-fisico dell'ione nel substrato biologico non è riferibile al dinamismo dell'ione inorganico puro a sé, ma sempre al dinamismo dello ione idratato, in ambiente acquoso. Tra l'ione semplice e l'ione idratato,

dal punto di vista chimico-fisico, ci sono differenze fondamentali. D'altra parte la idratazione dell'ione, non dipende soltanto, dal punto di vista fisico, dal potenziale dell'ione e cioè dal rapporto tra carica e raggio, in quanto i legami chimici degli ioni idratati, e negli ambienti biologici sono legami covalenti, che non dipendono soltanto dal potenziale elettrostatico, ma anche dalla funzione d'onda dello ione e, quindi, da caratteristiche simmetriche della funzione d'onda stessa dell'ione. Per esempio, si sa che lo ione rame idratato è un tetra-acquocatione; e le quattro molecole di acqua attorno all'ione rame non sono legate tetraidricamente come se il legame dipendesse esclusivamente da forze elettrostatiche, ma sono disposte secondo una simmetria tetragonale piana, con un asse tetragonale in relazione alla simmetria della funzione d'onda dell'ione rame bivalente; nel trattare l'ione idratato e quindi nel dinamismo dell'ione nel campo biologico, intervengono dei fattori che trascendono il semplice raggio ionico e il semplice potenziale ionico, fattori di stretta natura quanto-mecanica che debbono essere tenuti presenti nel meccanismo non solo della idratazione dell'ione, ma anche nel meccanismo della formazione delle forme complesse sotto le quali spesso agiscono i microelementi nelle reazioni biochimiche.

MITCHELL

I agree entirely with what both prof. Bonino and prof. Bertrand say. There is a biological effect, which when you come to the living soil, may be just as important as the chemical one. In my paper I tried to confine myself in the main to the dead, inorganic aspect to make it rather simpler as a geochemical-pedological background. The organic effect will be discussed by others later in this symposium.

SCHARRER

Ich möchte noch sagen, dass Fluor wichtig ist für die Tiere und nicht für die Pflanzen.

ARNON

Yes, I would add fluoride to this group. I might also add sodium and chloride to this group. However, recent evidence indicates that chloride may be essential for higher plants as well, and other evidence demonstrates

that at least certain lower plants require sodium. I shall deal with this in my own communication later.

If I may be forgiven to say a few words though serving as Chairman I will attempt to touch on some of the questions before us.

Dr. Mitchell has posed the problems of distribution of the micro-elements and the macro-elements in the soil. The problem with which we are going to occupy ourselves next, is how do these elements get into living organisms. Here it seems to me we are faced with several problems. Are we to include all living forms in our discussion? Or is there a difference between requirements of fungi, animal requirements, requirements of lower green plants and of higher green plants? I can perhaps best illustrate this on the blackboard, by taking certain elements whose universal requirement is beyond dispute. Starting with the macro-elements we would have, calcium, magnesium, potassium, phosphorus, sulfur and nitrogen. Next let us take iron, copper, boron and zinc, manganese. Here boron is one element whose essentiality for animals is in question. I think there is no doubt that this subject will come up later in the discussion. With the addition of molybdenum to this list we would have no hesitation in including all these elements as essential for higher plants, i.e. for crop plants. If we now add cobalt and iodine the question arises, are these elements essential for plants? I mean essential in the sense that plants cannot complete their life cycle unless these elements are present. There is very little doubt, that cobalt and iodine are essential for animals, so it becomes a matter of great importance for the animal whether the soil contains these elements and whether the plant acts as a transmitting agent between the soil and the animal. However, from the standpoint of the higher plant itself there is as yet no clear-cut evidence for the need of these two elements.

Thus following the path of an element from the soil to the animal we have different problems. The simplest ones are the problems of elements which are essential for the plants themselves. Unless these elements are present, we have obviously crop failure and no problem of transmittal to the animal. But then when we take elements, which plants do not require for their own growth then it becomes purely a matter of chance whether the animal is obtaining the particular element through the

plant or not. This is something, which no doubt will be coming up in the discussion.

BERTRAND

Je n'ai pas bien compris ce qu'on a dit sur le cobalt.

LAVOLLAY

On a dit que la preuve de la nécessité du cobalt et de l'iode est donnée pour les animaux, mais n'est pas encore acquise pour les végétaux, de sorte que les plantes ne peuvent être considérées actuellement que comme des véhicules pour ces éléments.

BERTRAND

Actuellement, c'est presque vrai, mais ce n'est pas tout-à-fait vrai. La vérité c'est que l'on n'a encore que des commencements de démonstration, qu'on n'a pas encore les preuves définitives du rôle du cobalt et de l'iode chez les animaux et chez les plantes, sauf que dans certains cas; mais on n'est qu'au commencement des études. Ce qui est déjà acquis, c'est que le cobalt et l'iode existent chez toutes les plantes et chez tous les animaux que l'on a examinés. C'est déjà considérable, c'est la base même de nos travaux à poursuivre et de nos actuelles considérations. Avant de chercher à établir le rôle physiologique d'un élément il est bon de s'assurer qu'il s'agit bien d'un élément normal. Jusqu'ici on a trouvé du cobalt dans toutes les plantes qu'on a examiné.

WALLACE

The usual method of testing whether an element is essential or not is by omitting it from a nutrient solution containing all the other essential elements. We have been able to purify solutions down to a point necessary to prove that molybdenum is essential. But now we are going on to other elements and at Long Ashton we have tried to see whether cobalt is essential. The results are very erratic. Now in obtaining the necessary purification levels for further work we may be removing some other trace nutrients. We do not know. Again, in adding your test element you

may also add some other element and you cannot be certain of what you are adding. Well, that is the first point.

Now we may ask, have we reached the limit for this method in testing for further trace elements? A second method of attack would be to see whether in the plants any particular element is essential for an enzyme system. But here we come up against another problem: whether there may be more than one path for the enzyme reaction. We may find one path, but we may not know whether there is an alternative and so we shall always be left with some degree of uncertainty until we have obtained a large amount of experience in the particular problem. But the question with which we are confronted at the present time is whether we can get any further with the classical method. I may say here that in using this method to carry out experiments on molybdenum we are not able to estimate chemically the amounts of molybdenum in some of the solutions used, and we have had to use an *Aspergillus niger* assay method. This will illustrate the difficulties likely to be met with in attempting to extend the list of essential trace elements.

VIRTANEN

I would like to point out the content of trace elements in seeds. I will discuss this problem in detail in my lecture.

WALLACE

I have also some pictures here, if you are interested, showing what we have had to do with seeds to produce deficiencies of molybdenum, and we have various sizes ranging from very small seeds to potato tubers. We were able to obtain the deficiency in potato by growing the tubers for about three years in the deficient solutions.

ARNON

I may comment on the last two remarks. I would like to follow this idea for discussion. Perhaps it is quite possible that all living organisms, as prof. Bertrand suggests, have the same requirements for micronutrients but in certain organisms the requirements are exaggerated, or accentuated

so that we can see them more readily. That is why it may be possible to see a cobalt requirement in an animal, but not in a green plant. It may also be possible to see a cobalt requirement in some species of green plants, lower green plants, for example, but not in others. There is another aspect to the same idea. There are differences within different organs of the same species, so that the seeds, as prof. Virtanen suggests, may actually represent a higher accumulation of a certain element, perhaps because they have been adapted to provide the catalytical elements for certain enzyme reactions to take place in the seedling before there is a sufficiently developed absorbing root system to provide these elements from the outside environment. We thus have a problem of different species, having different quantitative requirements, and within one species we may have different quantitative requirements in different organs.

I would like to make one final comment on prof. Wallace's figures on the quantitative requirement of molybdenum for cauliflower. We have recently obtained figures which fully confirm this range for *Scenedesmus obliquus*.

Considering the two different types of organisms involved the agreement is excellent. It does seem therefore that the quantitative requirement for molybdenum, common to very diverse organisms, is indeed very low.

LAVOLLAY

Je voudrais faire une intervention exactement dans le même sens. Je crois qu'on peut dire que certains organismes ont des besoins exagérément élevés en certains éléments, mais aussi que certains organismes ont des besoins exagérément bas. Par exemple, il y a des éléments, comme le magnésium, qui sont des macro-aliments pour beaucoup d'organismes, mais qui deviennent des micro-aliments — ou des oligoéléments — pour certains autres organismes, tels que les bactéries lactiques. Les besoins des bactéries lactiques en magnésium sont certainement des besoins absolus, mais ils sont d'un ordre de grandeur beaucoup plus bas que pour *Aspergillus niger*. Les mêmes éléments sont, peut-être, nécessaires à tous les êtres vivants, mais il y a de très grandes différences dans les besoins.

McCANCE

There is one point which so far has not been discussed and which seems to me to be of importance, with certain elements at any rate. When you get down to these very small amounts and are searching for proof that an element is or is not essential, how possible is it that other elements, present in quite large amounts, may not be replacing it? We know species of uni-cellular animals in which rubidium can replace potassium almost, if not quite, completely. I think this is a matter that should always be before us in dealing with trace elements.

ARNON

I believe this point will come up for discussion later in the programme.

DISCUSSION SUR LE RAPPORT LAATSCH

GERRETSEN

Am Anfang Ihrer Diskussion haben Sie die Grenzen zwischen gesund und krank nach dem Auftreten von Krankheitssymptomen beurteilt. Es kommt aber vielfach vor, dass die Pflanzen an Manganmangel leiden, ohne dass irgendwelche Krankheitssymptome zu beobachten sind. Wie haben Sie diese Tatsache bei Ihren Versuchen in Rechnung gezogen?

LAATSCH

Dr. Finck hat in Kiel den Mangangehalt von etwa 6 Hafersorten in einem bestimmten Entwicklungsstadium gemessen. Er verwandte gesund und krank ausschende Pflanzen und fand als Grenzwert zwischen beiden Gruppen 17,5 ppm Mangan in der Trockensubstanz.

Die Ertragsbildung des Hafers wurde nicht gemessen.

SEEKLES

In Utrecht haben wir einen wesentlichen Unterschied gefunden zwischen dem Mangangehalt der verschiedenen Böden, und zwar:

- a) den niedrigsten Gehalt findet man nächst der Meeresküste (manchmal hohe pH-Werte);
- b) dann folgt der Nieder-Moorboden;
- c) dann folgt der ältere Sandboden (niedrige pH-Werte und hoher Humusgehalt).

Zwischen a und c statistisch wesentliche Differenzen, aber kein Unterschied zwischen b und c bei Heu.

Zu welcher Zeit hat Herr Laatsch die Analyse angestellt?

LAATSCH

Wir haben niemals Heuanalysen durchgeführt, sondern das frische Pflanzenmaterial sofort nach dem Schnitt im Laboratorium getrocknet und analysiert. Wir haben bestimmte Parzellen auf den Wechselweiden eingezäunt. Die Analysen beziehen sich auf den ersten Schnitt dieser Parzellen.

SEEKLES

Hat Herr Laatsch noch neuere Resultate über die Relation zwischen dem Mangangehalt des Futters und der Sterilität?

Wir haben das in Utrecht nicht gefunden.

LAATSCH

Es lassen sich leider nur sehr vage Vermutungen anstellen. Wir haben Fruchtbarkeitsstörungen in Schleswig-Holstein ebenfalls auf allen Bodentypen. Diese Fruchtbarkeitsstörungen, die oft zum vorzeitigen Abgang der Tiere zum Schlachthof führen, lassen sich in vielen Fällen durch Mineralstoff-Futtermischungen beheben. Ob es sich jedoch um Manganmangel handelt, ist nicht erwiesen.

DISCUSSION SUR LES RAPPORTS VIRTANEN ET GERRETSEN (1)

SANTOS-RUIZ

Desearía únicamente decir algunas palabras referentes a un trabajo realizado por nosotros en colaboración con Dean Guelbenzu y Lopez Azcona en 1947: se trata de un estudio sobre la absorción y localización de los oligoelementos en la *Lens aesculenta L.*, una leguminosa. Se sembró la semilla en una tierra de jardín, de composición conocida, y se hicieron periódicamente recolecciones y tomas de muestra de los distintos órganos del vegetal. Establecimos así la proporción de los diferentes oligoelementos en las diversas partes de la planta y nos encontramos con el hecho de que en los nódulos de las raíces estaban no solamente los elementos Mo, Fe, Cu y V citados aquí, sino también cantidades bastante notables de Mn y de Ti. Pensamos entonces que todos estos oligoelementos influirían en los sistemas encimáticos de oxidoreducción encargados de la regulación de las funciones respiratorias de los microorganismos fijadores del nitrógeno.

Me permito pedir al profesor Virtanen y también al profesor Arnon sobre cual es su impresión respecto a la verdadera misión de dichos oligoelementos en estos fenómenos de combustión intraorgánica; ¿actúan en los mecanismos de fijación del N; ¿favorecen solamente la respiración del *Rhizobium*, ó quizá intervienen en ambos sentidos?

De cualquier manera, yo quiero insistir en la presencia en los nódulos de leguminosas de los oligoelementos manganeso y titanio, y quizá el níquel, que también aparece con constancia. Convendría quizá tenerlos en cuenta en las investigaciones futuras.

VIRTANEN

The findings of prof. Santos Ruiz regarding the enrichment of titanium and manganese in the root nodules of *Lens* are very interesting. I think,

however, that the concentration of different elements in the nodules is no proof of their importance in nitrogen fixation or other metabolic processes. As I said in my lecture, the tissue of the root nodules is very different from the root tissue and we can think that it can be the reason for the enrichment of some elements in the nodules. Experiments of other type are needed to show the importance of trace elements for nitrogen fixation.

GERRETSEN

There has been a publication about titanium and leguminous plants, and this publication said that titanium is an indispensable micro-element for leguminous plants. We have repeated the experiments and we couldn't find any influence of titanium on the growth of peas.

ARNON

I have no personal experience with nodules, and nitrogen fixation by nodules from leguminous plants and I am glad Prof. Virtanen answered this aspect of the question. I might comment on the more general problem: first, why are certain elements concentrated in certain tissues; and secondly, whether the concentration of a given element in a certain tissue is in itself evidence of a special requirement. There, I think, we come back to the fundamental question which we have been discussing here already yesterday and which I think we will continue to discuss — and that is what are the criteria for deciding whether a given element is essential. There I think we are forced to formulate some sort of experimental criteria. Now, we are confronted with the fact that all plants will absorb elements from their environment. Now then the question is: when they absorb elements, which of these elements are indispensable, and there, it seems to me, we must fall back on some experimental criteria of leaving a certain element out and then studying the consequences.

Prof. Wallace has already mentioned the difficulties we are facing when we reduce the level of concentration, but still, unless we find another technique, I wonder if that problem can really be studied experimentally without specific criteria of essentiality. Now then, we might take the enzymatic approach and see whether a given enzyme system requires an

element in question. But there we come up against difficulties because once we isolate the enzyme system *in vitro* several elements may substitute in certain cases — not in all cases -- but in certain cases several elements will substitute for each other. Thus, in an isolated enzyme system we find that magnesium can be replaced by manganese, sometimes with cobalt, sometimes with other elements. Now then, how are we going to decide which of these elements performs a particular function *in vivo*?

I am afraid I am not answering this in a very helpful way; but in conclusion I would say that if a given element is concentrated in a tissue, that should be a source of suspicion that the element may — I don't say that it does — but it *may* be in some way involved in a physiological function. Titanium, which you mentioned, is a very interesting element because it can exist in several valence levels.. I think it would warrant study whether its presence there is a mere coincidence, or not. But as for any specific role of titanium in either respiration or nitrogen fixation, I don't know of any evidence along these lines.

GERRETSEN

I would ask Prof. Arnon if he knows about a publication of 1926, I think, from the Colorado Experimental Station about nitrate problem in Colorado. That was quite interesting because there are certain areas in orchards where the apple trees die because of the too high nitrate content of the soil, notwithstanding that no nitrate had been added; the same observation was made in Hungary. I spoke at that time with the Director of the Experimental Station in Hungary and he told me that there are certain areas in Hungary too where the concentration of nitrates in the soil is so high that no plants can possibly grow there. Perhaps when you go back I will give you this literature and you can say that it is possible that *Anabaena* has something to do with it.

ARNON

Thank you very much, I shall enquire.

May I ask a question of Prof. Gerretsen? Did you add any calcium to your boron experiments with *Bacterium mesatherium*?

GERRETSEN

No, I don't think we added any. That was the *Azotobacter* in the soil.

ARNON

But in the *Azotobacter* cultures you always have calcium?

GERRETSEN

Yes, we have calcium.

ARNON

And am I correct in thinking --- I would like to address this both to you and Prof. Virtanen --- that *Azotobacter* requires calcium?

GERRETSEN

Yes.

ARNON

Now the interesting thing is that, so far as I know, there has been as yet no evidence of a boron requirement by an organism which does not require calcium.

The reason for my asking this question is: in higher plants I know of no plant (until your report this morning, which is extremely interesting) in which there is a boron requirement unless there is also a calcium requirement. Now, the symptoms in higher plants are very similar. If you have a calcium deficiency the new meristematic growth fails to form. *Azotobacter* has a calcium requirement and now you report that this organism also requires boron. This is extremely important because this is the first boron requirement as far as I know for non-green plants. It would be very interesting to see whether *Bacillus mesatherium*, which you found requires boron, also requires calcium.

GERRETSEN

I will see about that. Thank you.

VIRTANEN

I would like to ask Prof. Gerretsen if he has investigated the influence of boron on the growth of *Azotobacter* with nitrate or ammonium nitrogen as nitrogen source.

GERRETSEN

No, I have not, and I thank you for the suggestion. We shall investigate this too in the near future.

WALLACE

Might I speak to Prof. Arnon? I wonder whether we're not a bit on dangerous ground in taking this parallel between calcium and boron a little too far. We know they both go to the growing points, but we can distinguish clearly between the different visual effects they produce; and if we are to say that it is only a matter of growing points there are certain other elements which affect the growing point also, for example copper and iron. I thus think we want to be a little cautious in pushing the calcium/boron relation too far. There is another point I would like to raise with Prof. Gerretsen with regard to the containers and purification methods used for boron experiments. Was the plastic you talked of polythene?

GERRETSEN

No, I have not used polythene in this case although I have used it as a trial in some other cases.

WALLACE

Polythene, we find, is an excellent container for sand cultures for experiments with boron. You can get 100% effects with boron using these materials in deficiency experiments.

GERRETSEN

Yes, we have used polythene in a few experiments and also here we got some absorption on the walls of the vessels, which disturbed the picture.

WALLACE

You did?

GERRETSEN

Yes. When you use sand as a culture medium the advantage is that even when the container gives off some boron, or some other micro-element,

it remains at the outside; then in the inside, however you have quite a nice situation, because the boron does not diffuse so quickly to the inside of the vessel, you see. I doubt whether we would have found the necessity of boron for *Azotobacter*, when we had started with liquid cultures.

WALLACE

Have you tried lining the vessels with a good bitumen?

GERRETSEN

No.

WALLACE

Bitumen is the other material we use. We used to use a paraffin lining in the way you have done, but we found that some micro-organisms would attack it.

GERRETSEN

Yes. I know. We had the same trouble. What was the other lining? I did not hear.

WALLACE

Bitumen. But you must be sure that you get a good sample — there are bitumens and bitumens. You can get very good results — with both bitumen and polythene. We also are very interested in this boron requirement of the micro-organisms but so far we haven't gone carefully into it and so far have only used glass containers for the cultures.

ARNON

I would like to comment on Prof. Wallace's remark about the parallelism between boron and calcium. I fully agree that all parallelisms of this sort are apt to be dangerous. However, in the case of calcium and boron, the evidence — the physiological evidence — for their co-relation rests on certain additional supporting evidence. If you take the green algae, for example, *Chorella* or *Scenedesmus*, which have a unicellular character of growth and don't form filaments, we find that their calcium requirement is extremely low; it is a micronutrient. Likewise, their boron

requirement is so small that it has not yet been established at all. Now, if we then go to another alga such as *Anabaena cylindrica*, where we have a filamentous type of growth, there we find a very high calcium requirement; calcium becomes again a micro-element similar to higher plants. Unfortunately I can offer no comment at present about its boron requirement, now under investigation. I will be very interested to find what its boron requirement will be — it is yet not certain. We hope to find again the two elements together. Now this goes back to the hypothesis formulated some time ago that both calcium and boron may be involved in the pectic substances in the cell wall, in the middle lamella in the cell wall. If that will be borne out by bio-chemical studies, it would provide biochemical evidence for this hypothesis.

WALLACE

I quite agree with all the evidence, but I think we need to proceed with caution.

LAVOLLAY

Ne pensez pas (je m'adresse aussi bien à M. Wallace qu'à M. Arnon) que le magnésium devrait être également considéré en même temps que le bore et le calcium? Le magnésium intervient dans les processus fondamentaux de la division cellulaire, ou plus exactement dans les processus de séparation des cellules après la division. Je me réfère surtout aux travaux de Webb qui a montré la formation de formes filamenteuses au cours de la carence en magnésium des bactéries.

Je ne crois pas que l'on ait étudié systématiquement les trois éléments simultanément (bore, calcium et magnésium). Il serait très intéressant de savoir si les besoins en magnésium d'*Anabaena* sont inférieurs à ceux des algues qui se multiplient en donnant des cellules séparées.

WALLACE

May I make one further remark on an observation of Prof. Gerretsen? I am very interested in his finding on the effect of boron in giving a crumb structure to the sand. One of my staff has been working in the tropics on nutritional problems of poor lateritic sands. He has been using the method

we use in sand cultures to determine the likely mineral deficiencies. Thus, instead of laying out the ordinary fertiliser experiment in the field, he has carried out tests on the soil in pots in which the whole of the twelve essential elements have been examined for deficiency effects. In these experiments some of the pots receive a complete nutrient containing the twelve elements and in others each of the elements is omitted one at a time. In that way he has been able to show that it is necessary to add eight of the elements to grow healthy plants and that if any one of these is omitted the plants fail. In these experiments the use of an ordinary N.P.K. fertiliser mixture, such as has been used on field crops in the past, is ineffective. It is of special interest that the omission of molybdenum gave a complete failure; this was also the case for nitrogen and phosphorus and may also occur when either zinc or copper are omitted.

In view of the extreme deficiency of nitrogen shown, tests were made to stimulate bacterial activity in the soil by adding glucose to it. This resulted in the formation of a slime, but when glucose plus the complete mineral mixture were added a good crumb structure was obtained in this naturally structureless soil, thus showing the need for both minerals and a carbohydrate material to achieve this condition.

VIRTANEN

There is in recent literature information on the function of boron in green plants. According to the new findings, boric acid should form esters with monosaccharides, and, because these esters are more readily movable than the free sugars or their esters with phosphoric acid, boron should accelerate the transportation of sugar in plants. Because the synthesis of saccharose is enormous in sugar beets, the rapid transportation of hexoses from the green parts to the beets is necessary and the need for B is great. I would like to ask if some members of this conference have investigated the function of B in plants.

SEEKLES

Well, I think that as soon as boron is present in the form of boric acid at a definite pH which is not too high in the presence of sugar, even at low concentrations of both, you will get the formation of a cyclic form. That

is a very well known and a very quick reaction. So it seems to be highly probable that in the transportation of boric acid and sugar in the plants, these cyclic compounds formed by the interaction of sugar and boric acid will be the special form in which both are transported. This suggestion needs confirmation by measurements at low concentrations.

ARNON

There are reports in the literature on the role of boron in the synthesis of polysaccharides. This has been the basis of the hypothesis that boron may be required in the formation of pectic substances in the cell wall. I don't know, however, of any direct evidence on plant tissues where this has been documented in a physiological sense, but in a chemical sense this is plausible.

GERRETSEN

We have tried to what extent these complex compounds of boron influence the growth of *Aspergillus niger* and we have had a few examples that by adding a small quantity of glycerin to the solution, suddenly the growth of *Aspergillus niger* went down. It is supposed that in that case the boron had formed a complex compound with the glycerin, and the small quantity of spores of the *Aspergillus niger* could not get boron out of this compound. When we add more boron at a certain concentration the complex is saturated and the culture solution contains enough boron to enable *Aspergillus* to start its growth. When a certain amount of mycelium is formed, it seems that this is able to extract boron from the complex. Instead of the ordinary growth curve one gets a curve which jumps from a small quantity of mycelium produced to a much larger quantity. This prevents the use of such complex forming substances to annihilate the presence of small quantities of boron in culture solutions to be used for the microbiological determination of boron in soils and plants.

LAVOLLAY

Que pensez-vous, M. Gerretsen, du travail de M. Rosenberg, du Laboratoire du Prof. Aubel? Il a trouvé que le *Clostridium* a besoin de bore

si le méso-inositol n'est pas présent. Le méso-inositol est un facteur organique de croissance pour *Clostridium* et, en son absence, le bore est indispensable.

GERRETSSEN

Je ne connais pas les indications de M. Rosenberg à cet égard.

LAVOLLAY

Je vous donnerai la référence.

En réalité, c'est un peu plus compliqué que ce que je viens de dire : l'auteur empoisonne les cultures par l'acide malonique; il en résulte une inhibition du développement, qui peut être supprimée par le bore; mais elle est aussi supprimée par le méso-inositol, de sorte que si le milieu de culture renferme le méso-inositol, le bore n'est pas indispensable. Mais le bore est indispensable si le milieu ne contient pas d'inositol.

Peut-être serait-il intéressant de rechercher si l'inositol est un facteur de croissance pour *Azotobacter*.

DISCUSSION SUR LE RAPPORT VILAS

BERTRAND

J'ai le plaisir d'attirer votre attention sur l'intéressante communication de M. Vilas. Je suis d'accord avec lui sur un point que nous avons abordé aussi dans nos laboratoires en France. A savoir, la difficulté qu'il y a à reconnaître et à délimiter l'influence des oligoéléments en opérant avec des microorganismes. Il faut, à un moment donné des expériences, pouvoir séparer les microbes du milieu dans lequel ils ont été formés, sans les altérer par des lavages trop prolongés, sans risquer, par contre, l'extraction d'une partie des substances présentes dans le milieu nutritif.

L'étude du rôle des oligoéléments dans la vie des microbes est pleine de promesses, mais présente des difficultés particulières. Avec M. Vilas, je ne doute pas que ces énigmes soient prochainement surmontées.

VILAS

M. Bertrand a tiré de son expérience la conclusion qu'on doit en tirer, à savoir la difficulté qu'on rencontre à étudier la microbiologie du sol. C'est un des champs de recherches les plus difficiles de la microbiologie, parce qu'on ne peut pas préparer des échantillons qui répondent à toutes les conditions naturelles. Et je peux dire aussi que, pour toutes les choses qu'on fait avec les formes normales des bactéries dans les laboratoires, on ne peut jamais être sûrs que ce sont les mêmes phénomènes qui se déroulent dans la nature. Parce qu'on trouve parfois les hactéries dans les sols dans une forme donnée que nous appelons « normale »; mais nous trouvons aussi que, sous l'influence des oligoéléments et d'autres facteurs, des formes L se développent, dont les phénomènes vitaux ne sont pas les mêmes que celles des formes normales.

Il faut avouer que tous ceux qui travaillent dans les laboratoires sur les bactéries, ne peuvent jamais savoir si les conclusions qu'ils peuvent tirer de leurs travaux sont profitables pour la connaissance des phénomènes naturels, étant donné que les formes bactériennes qu'ils acceptent comme « normales », personne ne peut dire qu'elles le soient en réalité.

LAVOLLAY

Je veux poser une question très courte. Il est bien connu que dans les sols de luzernières fatiguées se trouvent des formes anormales de *Rhizobium*.

M. Vilas pense-t-il que ces formes anormales pourraient résulter de la carence ou de l'excès de certains oligoéléments?

VILAS

Il y a là une autre raison. Vous connaissez déjà l'existence du bactériophage; c'est un facteur qui provoque des formes anormales; et les formes anormales qu'on voit généralement dans les microscopes, ne sont que le chemin à parcourir pour arriver aux formes L et, après, aux formes filtrables. Mais comme on ne cherche jamais cette forme filtrable, jusqu'à présent on dit que l'apparition du bactériophage dépend de l'existence préalable de formes anormales. Alors nous disons que, pour se défendre contre le bactériophage, la bactérie se met sous la forme ultrafiltrable, où elle n'est pas attaquée.

Il y a plusieurs facteurs qui provoquent l'apparition de la forme L et, parmi eux, on trouve les oligoéléments.

LAVOLLAY

Il s'agirait de savoir ce qui est la cause première. Le bactériophage, en effet, n'agit peut-être que secondairement; certaines souches de *Rhizobium* sont particulièrement résistantes, comme l'a montré Demolon.

VILAS

Nous avons travaillé avec le bactériophage, mais sur d'autres bactéries; certainement sur *Salmonella*, dans mes laboratoires et cela pour déceler l'apparition de *Salmonella* dans les grandes villes, pour éviter le

péril d'une épidémie. Nous avons décelé la *Salmonella* avec le bactériophage dans les eaux d'égout.

Maintenant nous sommes de l'opinion que le bactériophage ne s'installe pas seulement sur les formes anormales, mais aussi sur les formes normales et provoque des anomalies variées. Le bactériophage provoque la destruction des bactéries, mais certaines d'elles réussissent à lui échapper, en prenant la forme L.

GERRETSEN

Je voudrait demander au Prof. Vilas quelque chose sur les bactéries qu'on a trouvées sur les billets de banque, car ces expériences présentent pour moi de l'intérêt. Vous avez dit que c'est une action à distance qui se produit?

VILAS

C'est une action oligodynamique de très petites quantités d'argent: je laisse pendant 24 heures les billets de banque humectés sur le terrain de culture, alors peut-être que les fils d'argent qui se trouvent dans le papier des billets de banque peuvent émettre des petites quantités d'ions d'argent qui arrivent jusqu'au milieu de la culture et arrêtent la croissance des bactéries, qui sont sur la surface des billets, en contact avec le terrain de culture. Mais la quantité de ces ions d'argent qui arrive à la surface doit être très petite, parce que le moyen d'attaque contre le fil d'argent est très faible et le temps qui s'écoule est très court pour l'action: c'est une action en doses de l'ordre de grandeur des oligoéléments. Et je dis que la même dose qui, dans certains cas accélère la croissance, dans d'autres cas peut l'arrêter.

Peut-être y aura-t-il une application utile à cet égard, de cette détermination que nous avons faite, parce que, si on mélangeait à la pâte du papier de ces billets de banque une petite quantité d'argent sous forme colloïdale, qui n'est pas chère, on arriverait à empêcher la croissance et la multiplication des bactéries sur la surface des billets de banque, humectée par l'usage. Vous savez bien que la multiplication des bactéries est un des dangers de l'usage des billets de banque. Je ne connais pas quand-même qu'on ait mis en usage jusqu'à présent ce système. On pourrait incorporer

de l'argent dans la pâte du papier des billets de banque, et ensuite on pourrait récupérer cet argent dans les cendres des billets de banque qui, comme vous le savez, sont brûlés — de sorte qu'il n'y aurait pas de dépense avec ce système, parce qu'on arriverait toujours à récupérer l'argent utilisé.

SANTOS-RUIZ

Yo quisiera preguntar algo relativo al ciclo de las bactérias que el prof. Vilas nos ha dado.

Por lo que se refiere á los oligoelementos, parece que hacen pasar desde la forma normal de los micro-organismos a la forma intermedia, y después a la forma filtrable; pero la segunda parte del ciclo pasa desde la forma filtrable a la forma normal, y quisiera que el profesor Vilas me aclare sobre este punto.

VILAS

Pour ce qui concerne le cycle biologique, c'est très facile à expliquer, parce que les bactéries se trouvent dans la forme filtrable et il suffit d'éliminer les facteurs qui ont provoqué la formation des formes L, pour que les bactéries retournent à la forme normale. Et c'est ce que nous faisons. Nous devons ensemencer les formes L dans un nouveau terrain de culture, sans le facteur qui a provoqué la forme anormale, et tout retourne rapidement à la forme normale.

C'est pour cela que dans le sol on trouve toujours les formes L filtrables. En cherchant de préparer un extrait de sol, nous avons trouvé, après filtration, des formes normales de bactéries après 24 h. et nous avons cherché quelle en était la cause; elle n'était pas dans le matériel dont nous nous étions servis, parce que tout était en ordre. Nous avons cherché s'il y avait dans les filtrats des extraits de sol des formes filtrables et nous les avons trouvées. Nous avons réussi, mais pas par recherche directe: cela a été une chance.

SANTOS-RUIZ

Esto es precisamente lo que yo me figuraba, y resulta un tanto desconcertante. Lo digo porque corrientemente concebimos a los oligoelementos como microfactores que contribuyen al crecimiento normal y aquí,

por el contrario, nos encontramos con que determinan la aparición de formas anormales. Este hecho particular es evidentemente curioso y en contraposición con lo aceptado como genérico.

VILAS

C'est une chose un peu étrange. En effet, les oligoéléments — que nous disons pouvoir donner les formes normales — dans ce cas déterminent l'effet contraire: quand on élimine les oligoéléments, alors apparaissent les formes normales. Mais il faut nous rappeler qu'en microbiologie on n'est jamais sûr quelle est la forme normale: c'est un autre monde, le monde de la microbiologie: c'est un monde pour parler duquel, nous avons un vocabulaire conventionnel. Ce sont des choses pareilles à des êtres vivants d'une autre grandeur, mais ils ne sont pas les mêmes.

Pour nous, les formes normales ce sont les formes qui se trouvent le plus souvent dans le milieu de culture dans nos laboratoires; mais ceci ne veut pas dire que ce soit la forme réelle qui doit être trouvée dans la nature. Il faut faire une transformation de toute la pensée du travailleur en microbiologie, car la manière de considérer les choses n'est pas la même, quand on a à faire avec des êtres de grandeur différente. Nous ne savons pas quelle est la forme normale.

DISCUSSION SUR LES RAPPORTS LAVOLLAY-LUNDEGÅRDH

GERRETSSEN

J'aurais beaucoup de questions à poser au professeur Lavollay, mais je me limiterai à deux seulement. La première question, c'est le facteur temps. Je me permets de vous demander si vous n'avez pas observé que pendant la croissance d'*Aspergillus*, dans des milieux de diverse concentration, le facteur temps peut compenser l'effet d'une diminution de la concentration en supposant qu'en ces deux cas les surfaces sont égales.

Quand vous observez la croissance pendant un temps un peu plus long, est-ce que vous observez que les récoltes sont semblables aux récoltes que vous avez obtenues avec des concentrations plus hautes en un temps plus court?

LAVOLLAY

Dans ces cas les volumes sont petits par rapport à la surface. Quand nous avons étudié l'influence des *concentrations*, la surface était petite et le volume de solution très grand; le liquide était renouvelé au contact du mycélium. La *durée de la culture* était toujours de trois jours. C'est dans ces conditions que les *masses* des récoltes ont pu être rapportées aux *concentrations* du magnésium, du phosphore ou du potassium. Je ne sais pas si c'est la même chose dans le cas du cuivre.

VIRTANEN

I would like to ask if you have estimated the magnesium content of the bacteria. It is possible that the uptake (absorption) of Mg is depending on the presence of other elements in the solution and that the greater need for Mg in the solutions with more Zn may depend on lower absorption

of Mg. Do you think that the uptake of Mg can be influenced by other elements?

LAVOLLAY

Je n'ai pas suffisamment de données pour vous répondre, mais je ne crois pas que le magnésium aux très faibles concentrations qui sont suffisantes pour supprimer la toxicité du zinc, puisse modifier sensiblement l'absorption du zinc. D'autre part, l'action du Mg^{++} est spécifique: Ca^{++} et K^{+} sont incapables de rétablir de la même manière le développement d'*A. niger* lorsqu'il est inhibé par Zn^{++} , ce qui devrait être le cas s'il s'agissait d'un simple phénomène de concurrence aux surfaces.

C'est le mécanisme de l'interaction qui est en cause. Est-ce que l'antagonisme se manifeste lors de l'absorption, selon les anciennes conceptions du phénomène; ou est-ce que l'antagonisme résulte d'une concurrence des éléments pour des récepteurs intracellulaires communs? Dans le cas présent c'est le second mécanisme qu'il faut admettre.

VIRTANEN

It is very well possible that it is a question of competition for the same accepter. We have, however, no proof of that since we don't know the amounts of the elements taken up by the plants.

GERRETSEN

Est-il possible si vous utilisez une grande quantité de solution d'une certaine concentration, ou une petite quantité d'une concentration plus élevée en supposant que la surface est la même en ces deux cas, obtenir la même masse de mycélium?

Maintenant nous employons, pour doser le cuivre dans les sols qui sont riches en cuivre, deux méthodes différentes. Nous pouvons doubler la quantité (la surface est la même dans ces deux cas). Dans ces deux cas, nous pouvons augmenter la quantité qui est nécessaire pour les spores, de deux et demi gamma avec la solution originale jusqu'à 15 gamma avec deux autres solutions.

Dans ces cas les volumes sont petits par rapport à la surface. Quand nous avions étudié l'influence des concentrations, la surface était petite et

le volume de solution très grand; le liquide était renouvelé au contact du mycélium. La durée de la culture était toujours de trois jours. C'est dans ces conditions que les masses des récoltes ont pu être rapportées aux concentrations du magnésium, du phosphore ou du potassium. Je ne sais pas si c'est la même chose dans le cas du cuivre.

Afin de pouvoir mieux discuter le rapport du Prof. Lavollay le Président prie le Prof. Lundegårdh de lire son rapport. Après la lecture de ce dernier, la discussion se poursuit sur les deux rapports ensemble.

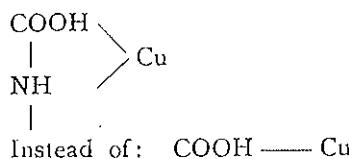
SEEKLES

There is one question Prof. Lundegårdh has pointed out. The relation between the uptake of three metals — Mg, Tl, Cu — and the uptake of nitrogen.

Why does the Tl line cross the copper line?

What might be the explanation?

Could that be a combination of copper in a more complex form — such as for instance:



WALLACE

Would Prof. Lundegårdh expect to find the toxicity of manganese and cobalt to be similar, because we find that cobalt is extremely toxic, whereas you can put in quite a lot of manganese? In fact, there are some plants where you can find several thousand parts of manganese in the leaves and they will stand it, such as sugar beet; also many of these plants you get in the tropics that grow on the acid soils will tolerate high contents of manganese. But in our experience cobalt is very toxic, and so is nickel; nickel is the more toxic, I should say, but they are both very toxic, and much more so than manganese.

LUNDEGÅRDH

Yes, it is a very curious fact that we found that we could measure an active anion respiration when we added cobalt nitrate; the nitrate anion was taken up together with much cobalt. This means that cereals and grasses will be able to function as cobalt collectors, whereas other plants may not.

ARNON

1. Would you please repeat what is the difference between the participation of cytochrome components in « ground respiration » and « total respiration »?

2. Would you care to comment on the sensitivity to outside oxygen tension of « ground respiration » as against « total respiration »?

LUNDEGÅRDH

1. The total respiration of roots is conducted by the complete cytochrome system, in which the cytochromes *dh*, *b*, *c* and *a* (cytochrome oxidase) are cooperating with dehydrogenases (succinic dehydrogenase and flavoprotein). If the cytochrome is blocked by the cyanide or carbon monoxide, cytochrome *b* may act as the terminal oxidase and would thus contribute to the « ground respiration ». Cytochrome *c* is hereby largely put out of action. As far as my present knowledge goes, the « ground respiration » may thus be visualised as a « truncated » cytochrome respiration.

2. The aerobic respiration of the roots is more sensitive to a lowering of the oxygen concentration than was hitherto believed. This is probably due to the low relative concentration of cytochrome oxidase as compared with animal cells or yeast. I am unable to say at the present moment if the response of the ground respiration in this respect deviates from that of the « total respiration ».

SANTOS-RUIZ

Creo que convendría que precisemos lo más posible qué elementos químicos debemos considerar como oligoelementos, y cuales como macro-

componentes. Me doy cuenta de las dificultades que esto presenta, ya que existen evidentemente elementos con función mixta, es decir plástica y catalítica, según los casos. Pero insisto en que sería útil hacer la distinción correspondiente. Mi idea es que no deben considerarse en general como oligoelementos los once elementos químicos siguientes: carbono, hidrógeno, nitrógeno, oxígeno, cloro, azufre, fósforo, sodio, potasio, calcio y magnesio.

BERTRAND

M. le Président m'invite à intervenir au sujet des communications qui ont été présentées cet après-midi, mais je dois avouer que je préfère attendre une séance prochaine. On a déjà parlé de beaucoup de choses que j'avais l'intention d'exposer et de discuter moi-même. En attendant encore un peu, ma communication se trouvera en quelque sorte déjà très avancée; je n'aurai plus à parler que sur des points sur lesquels on n'a rien dit et ce sera du temps gagné pour nous tous.

DISCUSSION SUR LE RAPPORT ALBAREDA-HERRERA

SEEKLES

1º In Galicia there is a granite soil. So we may understand that real deficiencies of Co and Cu will occur in cattle.

But what about the neighbouring provinces Asturias and País Basco?

2º What is the copper and cobalt content of the pasture in Galicia?

ALBAREDA

1º Se han comenzado las determinaciones de Co y Cu en Galicia, por aparecer en esta región la enfermedad del ganado, que podía ser causada por deficiencia de esos elementos. En Asturias y el País Basco, no se han hecho aún estas determinaciones.

2º Determinaciones de cobre no se han realizado. De cobalto, solo tengo aquí cifras de suelos.

SCHARRER

Bei dem hohen Kalkgehalt Ihrer Böden muss doch eigentlich Bormangel vorkommen. Kommt nun dieser Mangel häufig vor und in welchen Pflanzen?

ALBAREDA

In Granada haben wir Bormangel in Zuckerrüben.

SCHARRER

Düngen Sie mit Borax oder mit Borsäure?

ALBAREDA

Mit Borax.

DISCUSSION SUR LES RAPPORTS MULDER ET GERRETSSEN (II)

VIRTANEN

Prof. Gerretsen presented very interesting results of Mulder on the need of copper when different amounts of $\text{NH}_4\text{-N}$ and $\text{NO}_3\text{-N}$ are used as N nutrition of plants. May I ask if copper has been estimated in the plants?

GERRETSSEN

As far as I know, Mulder has not determined the quantity of copper in the plants.

VIRTANEN

As I showed in my lecture, nitrogen nutrition influences the structure of the roots. Because the roots of the plants grown with nitrate have finer structure and correspondingly greater surface than the roots grown with ammonium nitrogen, it is logical to assume that they can take up from the nutrient solution easier different aliments (e.g. copper). This may be the reason, that more copper is needed with $\text{NH}_4\text{-N}$ than with $\text{NO}_3\text{-N}$.

To proof if this idea is correct one should know the copper content of the plants in Mulder's experiments. I have in different connections in this conference pointed out the importance of this knowledge regarding other elements.

SCHARRER

Die Ausführungen von Prof. Gerretsen über Molybdänmangel bei Blumenkohl sind sehr interessant. Auch wir haben in Deutschland Molybdänmangel in grossem Umfang. Zum Beispiel kann in den Gärtnereien in der Umgebung von Frankfurt Blumenkohl (Cauliflower) nur angepflanzt wer-

den, wenn mindestens 2 kg Natrium-Molybdat pro Hektar gegeben werden; sonst sind katastrophale Ernten beim Blumenkohl festzustellen. Und auch in anderen Gegenden Hessens nimmt dieser Molybdänmangel immer mehr zu.

WALLACE

Might I ask either Prof. Scharrer or Prof. Gerretsen. Do you never correct your molybden deficiency by liming the soil?

SCHARRER

Nein, das hilft nicht. Es muss unbedingt Molybdän gegeben werden, da Kalk hilft nicht.

WALLACE

I have here some results, which we have had in our experiments. Another interesting thing has been the intensifying of the deficiency when we use calcium sulphate. I have some figures here that you can see. We have got over most of our troubles with liming although we can also do so by adding molybdenum direct. There is another thing we have done which may be of interest to you: this is that instead of giving them molybdenum over the whole field, we have given it to the plants in the seed bed and this has taken the plants pretty well through their life history.

ARNON

I would like to draw attention to some recent results which were communicated to me, on the application of molybdenum instead of lime to areas where legumes would not grow without added lime. This is a very important agricultural problem, since in many areas the soil must be limed before the legumes will grow in it. As Prof. Wallace suggests, liming effects might be due to making molybdenum more available, and so instead of adding tons of lime one can obtain the same results from adding pounds of molybdenum.

LAATSCH

Wenn das dem Boden zugesetzte Kupfer nicht durch Calcium ausgetauscht werden kann, so ist das kein Beweis für eine Fixierung als Cu S.

Dr. Schlichting fand in Kiel, dass Huminsäuren ihre Wasserstoffionen gegen Kupferionen austauschen. Letztere sind so fest gebunden, dass sie nicht durch Calcium ausgetauscht werden können.

GERRETSSEN

The percolation experiments of Mulder did not concern the fixation of Cu as CuS, but the fixation of Cu by the organic matter of a soil, on which barley and oats showed copper deficiency.

It seems that the results of Dr. Schlichting are in accordance with those of Mulder.

WALLACE

There are two points, Prof. Gerretsen, I would like to discuss with you. I believe you said you could get no correlation between molybdenum results on the soil and whether you got molybdenum deficiency in the plants.

GERRETSSEN

Yes, you are right, Mulder, however, ascribes these decrepiances to the presence of an excess of manganese.

WALLACE

I am sorry. I understood you to say so, but still I may be wrong. We find in the work that we have done, that we have sometimes had to sample the soil under the plant to find the low molybdenum content. A general sampling of the soil in the field would often not show the deficiency but by sampling the soil around the roots of deficient plants, we show the deficient condition of the soil.

GERRETSSEN

No, I don't think that Mulder has done it in this way. I thank you for the suggestion.

WALLACE

The second point was, you have carried out some treatments in connection with the effect of manganese on molybdenum, which were potassium nitrate, potassium sulphate, manganese nitrate and so forth. You

showed increased manganese toxicity with potassium sulphate, not with potassium nitrate. In the latter you have to consider the uptake of the nitrate; in the case of potassium nitrate you might well be left with a higher pH, which would give you less manganese.

LAVOLLAY

Je dirai quelques mots sur un point particulier de la communication du Dr. Mulder.

Il s'agit de l'interaction du magnésium avec l'ammonium et le potassium. M. Mulder dit qu'il n'y a pas d'interaction entre magnésium et potassium. Je crois qu'il faut s'entendre. Pour l'étude de cette question nous considérons les courbes de récolte en fonction de la concentration en magnésium. Lorsque le potassium est en quantité « normale », nous avons une courbe très proche de la loi de Mitscherlich; lorsque le potassium est en concentration élevée, nous obtenons un type différent de courbe d'action pour le magnésium: le maximum est plus élevé, mais la région de la courbe qui correspond aux faibles concentrations du magnésium, est située bien *en dessous de la courbe* qu'on pouvait attendre, si la même loi d'action était valable. *Lorsque la teneur en potassium est élevée, on observe une dépression de la récolte, par rapport à la loi de Mitscherlich, pour les faibles concentrations du magnésium.*

Si le magnésium est en quantité suffisante, le maximum accessible A_2 , correspondant à une forte teneur en potassium, est plus élevé que le magnésium, A_1 correspondant à une faible teneur en potassium. Mais nous devons considérer la courbe d'action dans son ensemble. Si nous avons dans le milieu des concentrations suffisantes en magnésium, alors nous ne pouvons voir aucune interaction entre potassium et magnésium; mais si le magnésium est bas, alors nous voyons la courbe se déformer.

Est-ce que vous êtes d'accord, M. Gerretsen?

GERRETSEN

Je n'ai rien à remarquer sur ce point, parce que je ne sais pas de quelles concentrations M. Mulder s'est servi pour ses expériences. Je crois pourtant qu'il a expérimenté avec des quantités normales de potassium.

WALLACE

I should like to say in connection with the potassium magnesium ratio that magnesium deficiency in fruit trees has become the most serious deficiency of these in Britain to-day, and I think also in many other parts of the world.

What we are having to do to remedy this is to apply the magnesium as sprays to the leaves in the form of Epsom salts using a % solution. Not only have we this deficiency in fruit trees, but it is very important in some other horticultural crops also, and even in potatoes where the use of high potassium may also induce magnesium deficiency. I think the most important ratio of magnesium for these crops is magnesium-potassium. Potassium induces the deficiency whilst nitrogen will help to prevent it. The nitrogen is so effective that at one time some growers were applying nitrogen to their crops, especially tomatoes, when they had magnesium deficiency, thinking it was nitrogen deficiency. But we showed them by using foliage spraying of 2% solution of magnesium sulphate, that the deficiency was magnesium.

GERRETSEN

Don't you think that the application of magnesium in this way would be too expensive on a large scale?

WALLACE

No, it isn't — it is cheaper than to apply magnesium sulphate as a soil dressing. We have carried out experiments comparing soil and foliage treatments; the foliage treatment is most practical. The amount you need for the foliage sprays for fruit trees can be added in to other sprays that are needed and it is thus a very easy method. If you apply Epsom salts to the soil the amount you want is about 5-6 cwt. and also with fruit trees you may have to wait about three years to get the effect. If you apply foliage sprays they are effective during the season of application. The spraying treatment is routine in Britain at the present time.

LAVOLLAY

Lorsque le magnésium est élevé dans le sol, est-ce que vous pouvez aussi provoquer la carence en magnésium en ajoutant une grande quantité de potassium?

WALLACE

Well, I can merely say that in our fruit trees I don't know of any soils that you can't reduce magnesium deficiency if you raise the potassium high enough. Regarding the point raised by Prof. Virtanen: In all our work we estimate the chemicals in the plant as well. In fact I have a table here for potatoes in which you can see the magnesium is low as soon as you raise the potassium.

DISCUSSION SUR LE RAPPORT ARNON

VIRTANEN

The very interesting results of Prof. Arnon show clearly the influence of molybdenum on the synthesis of chlorophyll with *Scenedesmus*. Could it not be the question hereby not only of protein synthesis but also of synthesis of porphin ring, because glycine is needed for the synthesis?

ARNON

Yes, that is a very likely possibility. I think it is particularly interesting in the light of your report on the relation of molybdenum to nitrogen fixation and leghaemoglobin. It may be that the more fundamental way of looking at the effect of molybdenum deficiency would be that it interferes with porphin synthesis. In this case the low chlorophyll content in molybdenum deficiency in *algae* would resemble the low leghaemoglobin content of root nodules.

GERRETSEN

I am deeply impressed by the skillful experiments of Prof. Arnon, as well as by the splendid results he has obtained. However, I am not yet satisfied about the role manganese plays in the picture. At present a rather large number of enzymes is known, in which manganese can act as a cofactor, but in nearly all these cases it can be replaced by magnesium or zinc, or some other bivalent element. However, manganese cannot be replaced as a micro-nutrient for green plants; without manganese they die, even in the presence of the other elements. So it is evident that manganese has at least one unique and fundamental function in plant nutrition, besides its eventual role as a cofactor in the above mentioned enzymes. It has been shown by the author (Gerretsen, 1949) that the carbon dioxide assimila-

lation of oat plants, deficient in manganese, is reduced to 40-25% of the normal assimilation. Moreover all the different apparently incoherent symptoms of Mn-deficiency can be easily accounted for, assuming that CO_2 -assimilation is reduced by manganese deficiency.

On the other hand these symptoms can be diminished or even disappear when CO_2 -assimilation is increased by enriching the air with CO_2 , and they are aggravated when CO_2 -assimilation is reduced by shading. (Hiltner, 1924).

The question is at what stage of the process of photosynthesis manganese comes in.

In an attempt to elucidate this point the redox potential changes of entire oat leaf macerates were observed in the dark and during illumination with light of high intensity, before and after the addition of traces of manganese. (Gerretsen, 1950).

The addition of MnSO_4 in the dark did not alter the potential of the aerobic suspension; at illumination the potential rose in a short time to about 500 mV, which was in the mean 150 mV higher than that of the suspensions without MnSO_4 .

These high potentials were attributed to the photo-hydrogenation of the oxygen, present in the suspension, to H_2O_2 ; as soon as the oxygen was used up, the H_2O_2 itself acted as hydrogen acceptor and being reduced to water, the potential decreased rapidly. Mn-ions greatly enhanced this reaction.

During these experiments it was observed that the capacity to hydrogenate oxygen persisted during a *dark* period following illumination, in some cases even for about one hour.

The experiment of fig. 1 is illustrative for this behaviour. At the beginning of the experiment the suspension had been saturated with oxygen. Addition of 0.1 mg Mn as MnSO_4 in the dark did not cause any notable change of the potential. At illumination (\dagger) the potential rises quickly to about 275 mV. At this point the oxygen is used up, the H_2O_2 formed previously is reduced as quickly as it has been formed and subsequently some constituent of the suspension is hydrogenated as indicated by the decrease of the potential.

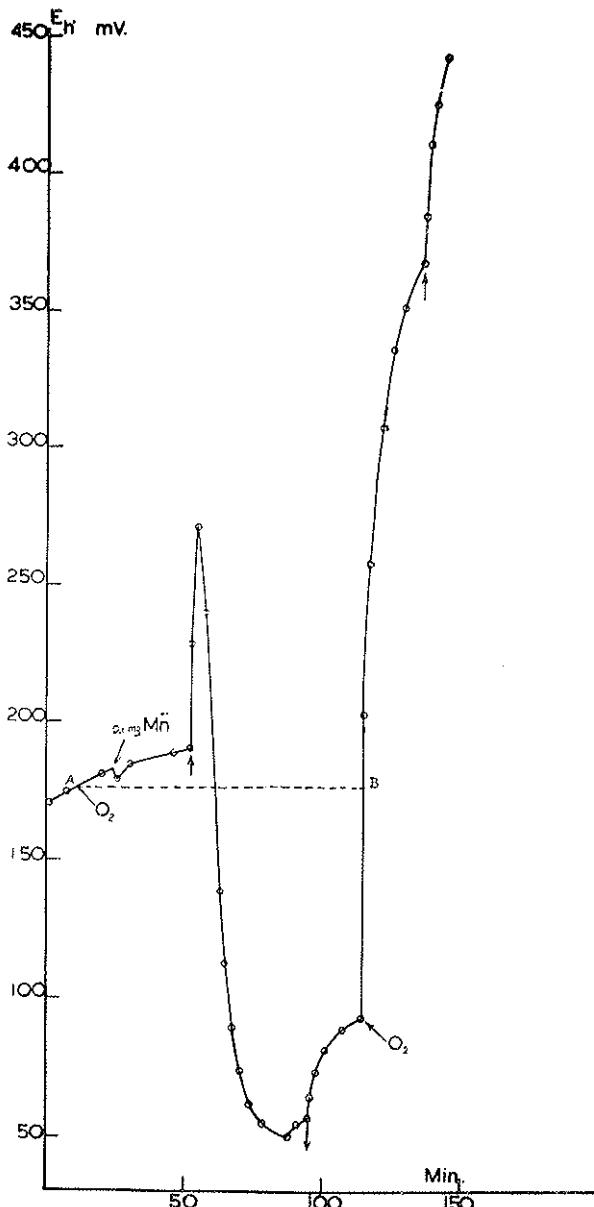


FIG. 1

Redox potential changes of Avena leaf macerates in the dark (↓) and during illumination (↑). Introduction of O_2 in the dark period, following illumination, causes a rapid increase of the potential due to hydrogenation of $\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$. This points to the formation of a permanent reductive compound during the previous illuminations.

When the light is turned off, there is a slight increase of the potential, which is of no importance in this respect. However, when 25 minutes later, during this dark period oxygen is introduced, it is immediately hydrogenated and, due to the H_2O_2 formed, the potential rushes up with more than 250 mV in a few minutes. This indicates that during illumination, as soon as the conditions in the suspension became anaerobic, a stable intermediary reducing compound has been formed, which persists when the light is turned off, and is able to hydrogenate oxygen in the dark, in this case after 25 minutes, in other similar cases even after about one hour. In order to return to our question, what is the role of manganese in photosynthesis the behaviour of a normal oat leaf suspension (fig. 2 left) is compared with that of a plant, which suffered heavily from manganese deficiency (second graph at the right) both under aerobic conditions.

The redox potential changes of the normal oat leaf suspension are in accordance with the facts mentioned above: an increase of the potential to about 400 mV at illumination, a decrease in the dark, a sudden and quick increase of more than 150 mV in a few minutes at the addition of 0.2 mg Mn as $MnSO_4$ in the dark, due to the hydrogenation of the oxygen, a further increase to 500 mV at illumination, followed by a rapid decrease after the light had been turned off. Mn promotes in some way or another the hydrogenation of oxygen, as also in this case a much higher potential is reached than without Mn.

The behaviour of the Mn-deficient leaf suspension shows some interesting differences. At illumination there is only a very slight increase of the potential; *adding 0.2 mg Mn as $MnSO_4$ in the dark period following illumination now does not change the potential at all*. But when illuminated, after a short period of adaptation, the rise of the potential is as quick as in the normal case. From this behaviour one might conclude that in the absence of manganese photoreduction cannot take place and consequently no permanent reducing compound has been built up during illumination. It is self-evident that now the addition of manganese in the subsequent dark period cannot give rise to the formation of H_2O_2 and the potential does not alter, as is the case with the normal leaf macerate. When however the suspension is illuminated reduction sets in and apparently the conditions for active photoreduction are practically immediately restored after

the addition of Mn. According to my opinion, manganese and iron co-operate in the first step of photosynthesis, the photolysis of water. Time and space do not allow me to go more into details, but the reader is referred

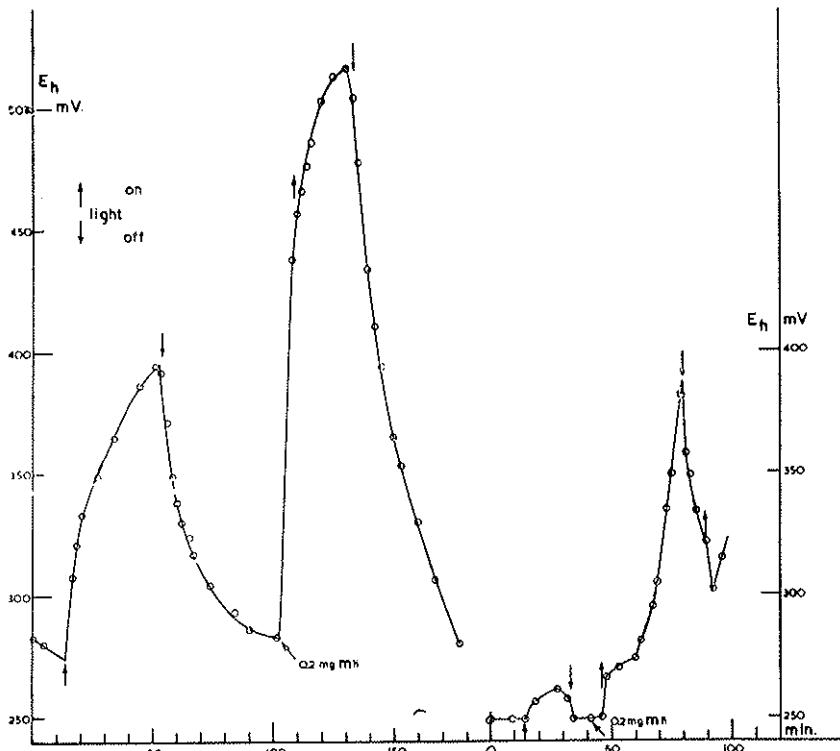


FIG. 2

Redox potential changes of macerates of normal oat leaf (left) and Mn deficient oat leaf (right). In the absence of Mn, no permanent reducing power is built up during illumination in the Mn deficient leaf suspension. At the addition of 0,2 mg Mn the reducing power is instantaneously restored.

to the publications on this matter. (Gerretsen, 1950; Mulder and Gerretsen, 1952).

With regard to the objections of Prof. Arnon expressed during the discussion I want to answer that I do not agree with him that cultivating plants with very little manganese is a dangerous procedure, because chlo-

roplasts from subnormal or abnormal plants might give erroneous results.

Pirson (1937) has shown that the inhibition of photosynthesis in Mn-deficient cultures of *chlorella* was « instantaneously » relieved by the addition of traces of $MnCl_2$ to the medium, without any notable change in chlorophyl content or number of cells. This would not have been possible if the chloroplasts were not quite normal and complete, safe for the presence of Mn-ions. This is also in full agreement with the instantaneous regeneration of the photoreductive power of the Mn free leaf inacerate after the addition of $MnSO_4$, mentioned above. So it seems to me that this objection of Prof. Arnon is not valid.

The second objection of Prof. Arnon was that as he has been unable to show any influence of manganese on the Hill reaction, it is unlikely to attribute an essential role of manganese in the primary process of photosynthesis, e.g. the photolysis of water. However Prof. Arnon told us, that for his experiments he used chloroplasts from *normal* plants and that these chloroplasts definitely contained manganese. I wonder how one could expect any influence of added manganese under these circumstances. It seems to me that for a decisive experiment one has to use chloroplasts of manganese-deficient plants and ascertain whether or not Mn-ions have any influence on O_2 -production in the Hill reaction.

References

- GERRETSEN F. C.: *Manganese in relation to photosynthesis* I. « Plant and Soil » I, 346-358. 1949.
— *Redox potentials of illuminated crude chloroplast suspensions*. « Plant and Soil » II, 159-193. 1950.
— *Studies in Photosynthesis*, « Plant and Soil » III, 1-31. 1951.
HILTNER E.: *Die Dörrfleckenkrankheit des Hufers und ihre Heilung durch Mangan*. *Landw. Jahr.* 60, 689-769, 1924.
MULDER E. G. and GERRETSEN F. C.: *Soil manganese in relation to plant growth*. « Adv. in Agronomy » IV, 221-277. 1952.
PIRSON A.: *Ernährungs-und Stoffwechselphysiol. Unters. an Fontinalis und Chlorella*. « Z. Bot. » 31, 193-267, 1937.

LAVOLLAY

Ma question concerne l'interaction du vanadium dans les conditions de faible intensité lumineuse et de forte intensité lumineuse.

Dans une certaine mesure, la plus grande efficacité du vanadium dans les grandes intensités lumineuses ressemble à la plus grande « efficacité »

du mélange des oligoéléments pour les moisissures lorsque la concentration en sucre est augmentée. Je fais allusion à l'une des images projetées lors de mon exposé d'hier.

Il y a une certaine ressemblance puisqu'une plus forte intensité lumineuse réalise une plus forte teneur en glucides dans les cellules. Dans ces conditions la carence en V est relativement plus grave que dans les conditions de faible intensité lumineuse.

Vous pensez certainement que le vanadium intervient dans la phase obscure de la photosynthèse. Avez-vous une idée concernant l'action du vanadium?

ARNON

Yes, I can only speculate on this because I have no evidence on this point. Now it is generally accepted that we are dealing in photosynthesis basically with two reactions: a light reaction and a dark reaction. There is an effect of vanadium at high light intensity but not at low light intensity. Then the general interpretation is that it is the dark reaction which is limited because at low light intensity dark reaction can keep pace with the light reaction. When the light intensity is increased the dark reaction cannot keep pace any more unless the particular factor which limits the dark reaction has been provided. From this classical point of view, one would suspect that vanadium influences some dark reaction. I must say, however, that another interpretation is equally possible. Vanadium may be directly concerned in the light reaction proper. At low light intensity the light reaction proceeds slowly and the residual amount of vanadium in the low-vanadium cells may be sufficient. At high light intensities however, the residual amount of vanadium may be insufficient for a maximum cover rate of photosyntheses. There is really no basis without further evidence to distinguish between these two possibilities.

VIRTANEN

The new theory on photosynthesis of Prof. Arnon is very interesting and important. I think it is the simplest theory we know and the simplest ones are often the best also. This symposium is not a conference for photosynthesis, so I think it is not appropriate to discuss the photosynthesis problem here in detail. The theory is however so interesting, that I would

like to put to Prof. Arnon one question: how is the energy problem to be explained in your theory? One light quantum does not contain enough energy to split water.

ARNON

The splitting of water into molecular oxygen and some form of « reducing hydrogen » with the energy contained in one quantum of red light is possible if we do not separate the elements of water too far. If I may use an analogy, if we were to define the amount of energy needed to raise 10 kgms a certain distance, it would depend on what the distance was.

The question is essentially what is the nature of the first hydrogen acceptor in the photolysis of water. The substance which has been proposed is either DPN or TPN. Now if DPN were the primary hydrogen acceptor and if, at the other end, molecular oxygen was being given off, then to separate the elements of water we would need about 52 kilocalories. Since the energy of one quantum of red light, which is known to be sufficient for photosynthesis, is only about 43 kilocalories, obviously there isn't enough energy in one quantum of red light to reduce DPN or TPN. But if instead of these pyridine nucleotides we use, for example, FMN as the primary hydrogen acceptor we can accomplish the photolysis of water with the energy contained in one quantum of red light. In this case we would not be separating the elements of water beyond the thermodynamic limit of the energy contained in one quantum of red light.

One might raise the point that we have still to reduce CO_2 , and if the hydrogen acceptor is not sufficiently reducing we could not accomplish the purpose of photosynthesis. The answer to this is that we also produce ATP as a result of the photolysis of water. The initial hydrogen acceptor plus ATP will then provide sufficient energy to reduce CO_2 . What we have in this scheme of photosynthesis is storage of energy in the form of ATP independent of the reoxidation of partly or wholly reduced products of CO_2 fixation. When we have to perform the difficult journey of reducing CO_2 to sugar we can use the photochemically produced reducing substance *plus* the photochemically generated ATP.

DISCUSSION SUR LE RAPPORT WALLACE

SANTOS-RUIZ

There is a point I would like to raise on the problem of the interaction of microelements. I want to inform you, Prof. Wallace, that, with our co-workers Ralha and Comenge, we carried out several experiments in that way. We presented the results at the III^o Spanish-Portuguese Congress of Pharmacy the last year in August. We studied the influence of vanadium, copper, nickel, iron, cobalt and manganese in germination of *Triticum monococcum*. In summary we found that the effect of every one of these elements isolated, was always accelerating the metabolism.

When we used a mixture of these oligoelements we also found a stimulating action but much lower. It seems that there is an interaction or interference between these different oligoelements.

VIRTANEN

The content of trace elements in the seeds is from a practical point of view very important, as also Prof. Wallace's interesting results disclosed. We have made some experiments to raise the content of some trace elements in the seeds of peas and beans by growing the plants in nutrient solutions or sand cultures containing more than normal amounts of trace elements in question; it is really possible to raise in this way the content of these elements in the seeds but not very much over the level in good commercial seeds.

I think it would be very important for practical agriculture if we could produce seeds with a high content of trace elements, for instance molybdenum and copper also, and in that way supply the farmers with seeds that yield normal crops without adding trace elements in the soil needing them. I only mention these experiments because I think that

there is some possibility to raise the content so much that in many cases there is no need to add the elements to the soil.

WALLACE

I do not know the manner in which Prof. Virtanen is achieving this, but in Britain attempts have been made to raise the content by soaking seeds in solutions of trace elements. You can also place the trace elements very near the seeds by dusting them, but you must not add enough to affect the germination. But I don't know just how effective it would be in practice with the different trace elements. Perhaps Prof. Virtanen would tell us the means by which he has attempted to raise the content of trace elements?

VIRTANEN

As I told you, we have always used a higher concentration of the salts of trace elements in our nutrient solution and in that way got the plants also to take more. But there is a limit: if we have too much trace elements, the plants don't grow well and the seeds don't germinate normally. If the seeds used by farmers would always contain as much trace elements as the best commercial seeds, they would raise the yields in many soils where poor crops are obtained without fertilizing the soil with trace the elements in question.

SCHARRER

Auch wir haben durch Beizung ebenso wie durch Wachstum des Saatgutes in einer an Mikronährstoffen angereicherten Wasserkulturlösung eine Erhöhung des Saatgutes an Spurenelementen erzielen können.

ARNON

I wonder how dependable this technique of increasing the content of a microelement in the seed would be under agricultural conditions. Granted that you can increase the content of an element in the seed, would there be a way of knowing in advance whether the increase is sufficient so that one could depend on it under field conditions when the supply in the soil is inadequate? It seems to me that this might be a service of difficulty;

the increased content in the seed might only partly solve the problem, and if the farmer would buy seed on the assumption that the seed is already ensured against a deficiency, he might get into trouble.

LUNDEGÅRDH

I think it is very important to know something about the physiologic condition of mobilising these elements at present in the seed. As a matter of fact we have found that the movement of anions in the plant is very important for the movement of the heavier ions. I told you a little about that in my speech. We have found, for example, that iron moves much faster if nitrogen is given as nitrate; and it may be that in practical application we have to recommend some special fertilization if we are using seeds in which we have raised the amount of microelements. For example, it may be that they are better mobilised if more nitrate is given to the soil, than if ammonia nitrogen is given. This seems to be important.

The second point is about the germination. The first stages of germination are important, because if the first period of germination goes very slowly you may have infections and the seeds do not grow. So I think there are a number of plant physiological problems we have to attend to here.

VIRTANEN

Yes, I agree with Prof. Lundegårdh. It is a very complicated problem. It is not only the question of adding the heavy element in question, but of all the other nutrients so that the plant can really take up the heavy element. On the other hand we know that, for instance, molybdenum content varies enormously in the commercial seeds. In extreme cases there can be in the Mo-rich seeds of beans ten times more molybdenum than in the poor ones.

What I mean is this: if we could always use seeds with high molybdenum content, we should not need to use this element as fertilizers when it is a question of plants with larger seeds. Also the copper content in the seeds can be raised so high that in soils which are not very poor of this element, normal yields could be obtained without Cu-fertilizers. In cases where the farmers don't know the deficiency of these elements in their soils, rich seeds should be of great importance.

WALLACE

I wonder whether this problem in practice is not rather the other way round, that we can't raise the content of, say, molybdenum very much above what it would be in a good soil. But we do know that if we grow plants on a soil which is poor in molybdenum or any other trace element, then the content in the seed will be low. What you have got to guard against is using seed that has come from soil that is poor in trace elements. We know from our experiments, for example, that we can easily decrease the molybdenum content of the seed, but we have no information that we can raise to any extent over that of a seed from a good soil.

VIRTANEN

I mean just that that we should produce the seeds in soils where it is possible to secure a high level of trace elements in the seeds. At present we never know the trace element content of the seeds. By using seeds rich in trace elements we could also save them because the plants take up these elements practically quantitatively from the seeds but from the soil only partly. This is a very important point of view when we think of the future.

WALLACE

May I just raise one point? It doesn't refer to a trace element but to calcium. We find that if the calcium content of the seed is low we get very bad results with the seedling plants. The seed germinates but the seedling is weak and may die. The calcium is needed soon after germination. Calcium is very important in that way — it must be present as soon as the seed has germinated.

ARNON

I am still troubled by one point. Suppose you take seed that is low in molybdenum and then you put it in a soil that is high in molybdenum. Then it makes no difference?

WALLACE

No, possibly not. The seedling would probably grow successfully.

ARNON

Would it not be safer then always to make sure that no matter what the seed status is, the soil supply of the micronutrient is adequate? Wouldn't it be a safer insurance policy to aim at supplying the needs of the plants growing in the soil since the amounts of micronutrients involved are very small.

VIRTANEN

But they are much smaller if you have the elements in the seeds.

ARNON

This is always desirable. Presumably there will be enough micronutrients in the seed for germination. If we have enough for germination and we concentrate our efforts on making sure that there is enough in the outside environment after the seed germinates, we cannot miss, so to speak, whether the content of the element in the seed is high or low. If it is high, it would not matter and if it is low, then by providing enough in the soil we would get around this initial handicap.

WALLACE

Well, we have attempted to meet this method which Prof. Arnon is now putting forward, by treating the plants — in the case of cauliflower — in the seed bed rather than treat the whole field. The plants are given molybdenum when they are young in the seed beds and then planted out in the field.

LUNDEGÅRDH

I think it is important to know something about those elements which are important for the first period of germination and the growth of the seedling. With regard to a charging of the seeds with microelements the available quantities will perhaps be more important than the amounts needed for the later periods. What Prof. Wallace said about calcium is quite true because calcium is one of the most important growth factors controlling the growth of the cell wall. In the picture I showed you about the percentage of elements in the cereal seed, there is a comparatively low percentage of Ca in the seed — I think only 5% of that of potassium, so

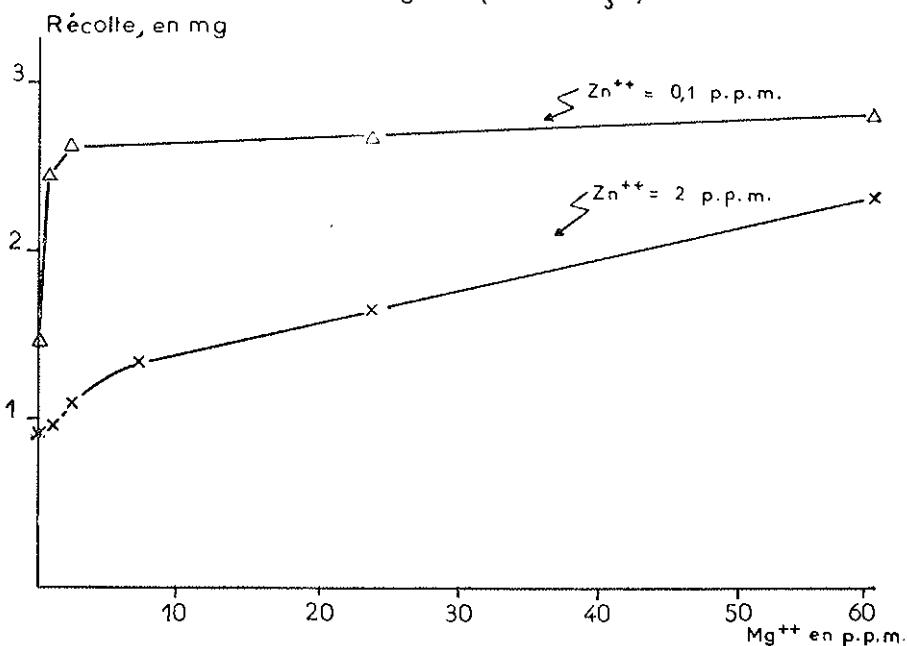
it will be near the lower limit. And then, of course, iron and copper are needed for the metabolism of the seedling. I don't know how much of other minor elements are needed for the first stages of germination. As a matter of fact I have never got any response of the seedling of cereals to the trace elements Fe, Cu, Zn, Mn and Mo. Sufficient quantities of them must then normally be present in the seeds.

LAVOLLAY

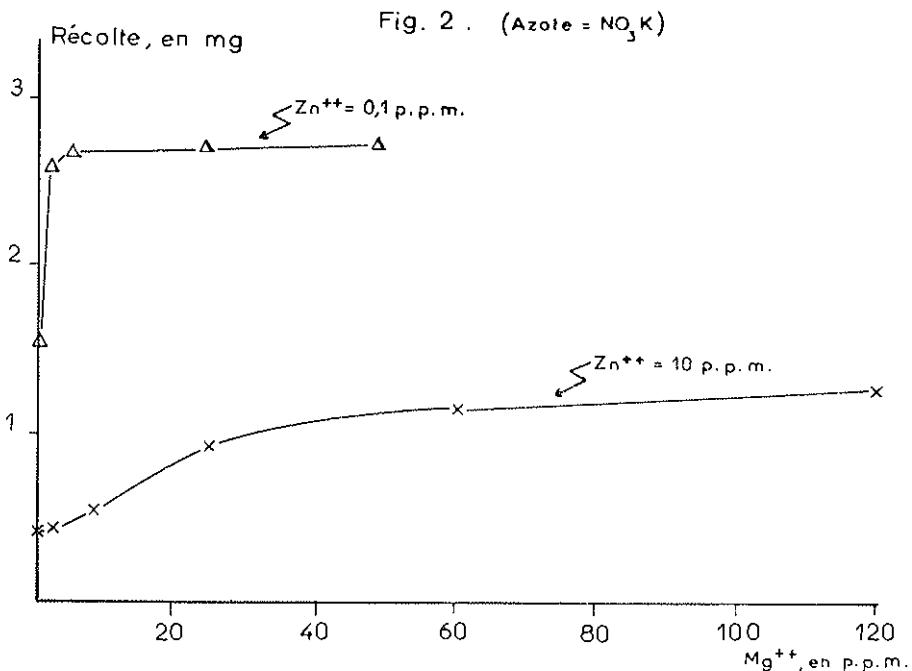
Nous avons recherché si l'interaction entre Zn^{++} et Mg^{++} que nous avons mise en évidence chez *Aspergillus niger* (1) se manifeste aussi chez les végétaux verts. Comme première espèce de végétaux chlorophylliens, nous avons choisi, avec G. Martin, *Lemna minor*. Des projections permettront de résumer les résultats :

Le cliché 1 montre deux courbes de poids de récoltes des frondes obtenues dans des conditions identiques, en faisant varier la concentration de

Fig. 1 (Azote = $NO_3^- K$)



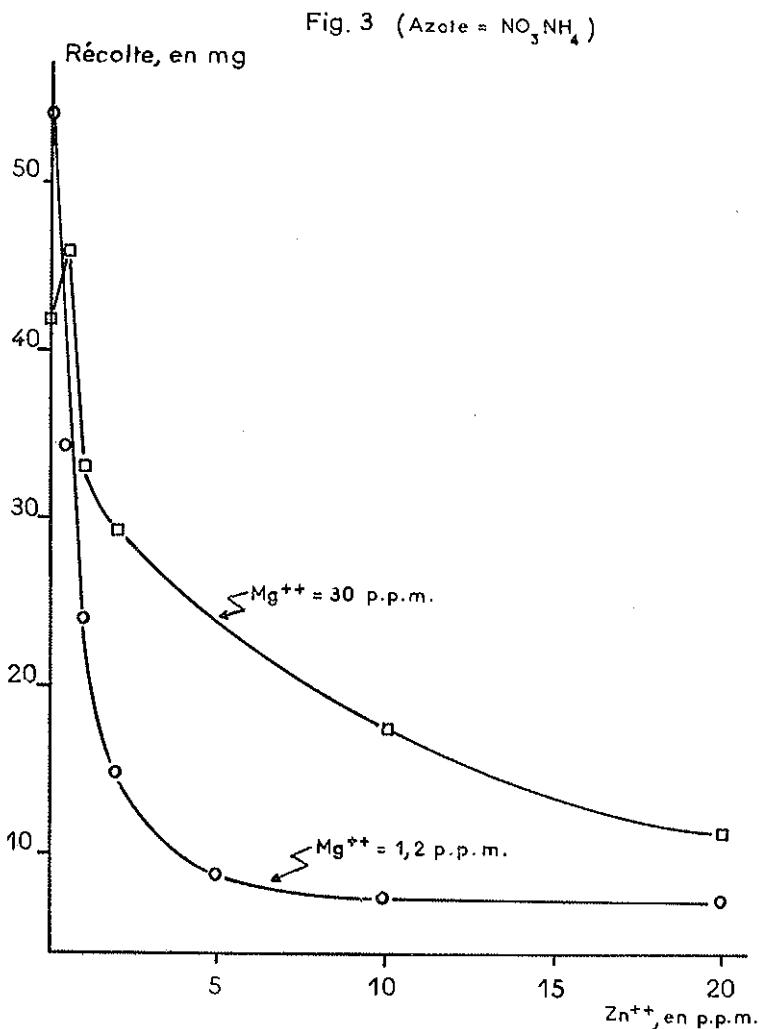
(1) LAVOLLAY J. et Mme LABOREY F., Congrès Int. Botanique, Paris, 1954.



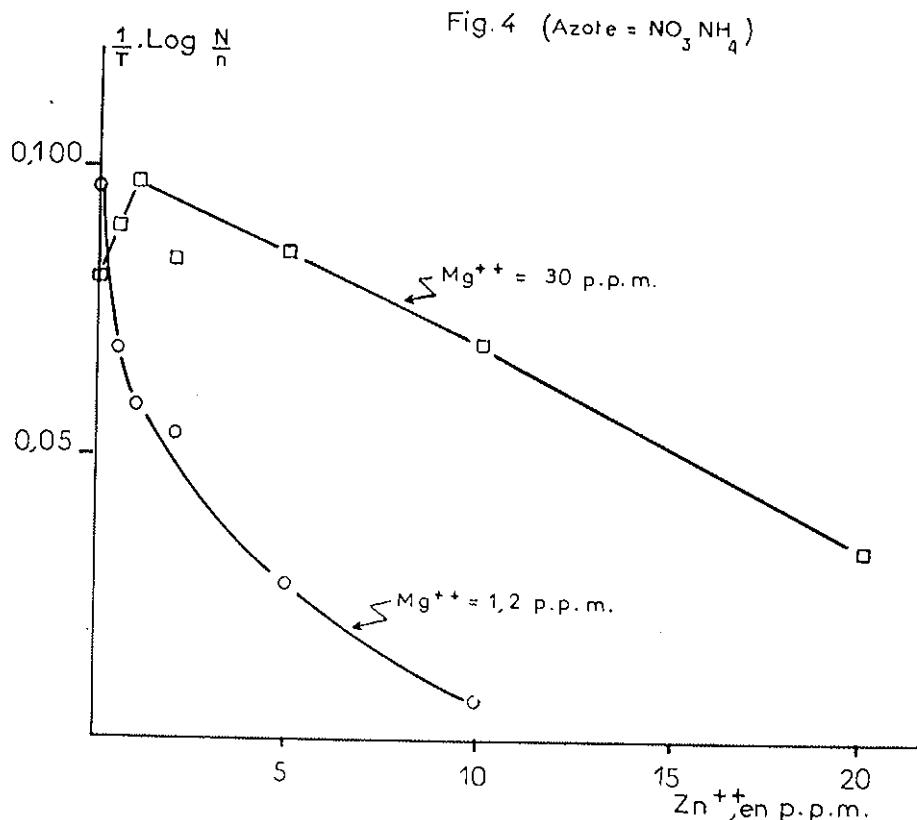
Mg⁺⁺ dans deux liquides nutritifs renfermant respectivement 0,1 et 2 mg de Zn⁺⁺ par litre. Avec 2 mg de Zn⁺⁺, la récolte est fortement déprimée, mais la toxicité du Zn⁺⁺ disparaît à mesure qu'augmente la concentration de Mg⁺⁺. Les besoins en Mg⁺⁺ sont plus élevés quand la teneur en Zn⁺⁺ est plus grande.

Le cliché 2 montre deux courbes de poids de récoltes obtenues en faisant varier la concentration de Mg⁺⁺ dans deux liquides renfermant respectivement 0,1 et 10 mg de Zn⁺⁺ par litre. Zn⁺⁺ est très毒害 à la concentration de 10 mg par litre, mais en élevant suffisamment la concentration de Mg⁺⁺, le développement devient possible; on n'atteint cependant pas les mêmes poids de récolte que lorsque Zn⁺⁺ est en concentration non toxicque.

Sur le cliché 3 figurent deux courbes représentant les poids de récoltes obtenues en faisant varier la concentration de Zn⁺⁺ dans deux milieux



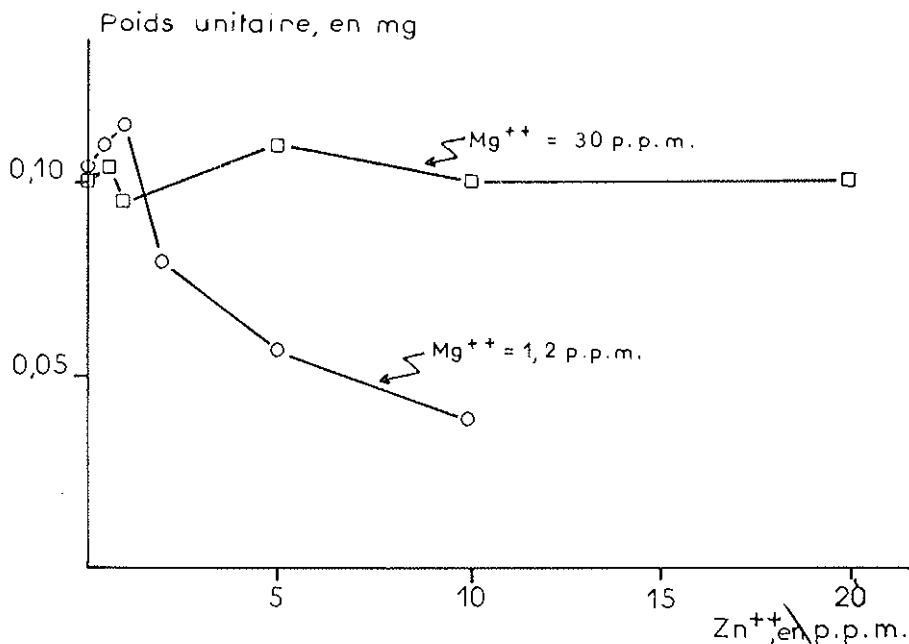
différant par leur concentration en Mg^{++} . Les concentrations en Zn^{++} qui réduisent la récolte de 50% sont égales à 0,8 mg par litre, lorsque la concentration du Mg^{++} est de 1,2 mg par litre et à 6,8 mg par litre, lorsque la concentration en Mg^{++} est de 30 mg par litre.



Le cliché 4 montre deux courbes représentant les vitesses de multiplication des frondes sur deux milieux renfermant 1,2 et 30 mg de Mg⁺⁺ par litre, en fonction de la concentration de Zn⁺⁺.

Le cliché 5 montre deux courbes représentant les poids moyens unitaires des frondes sur les deux mêmes milieux, en fonction de leur concentration en Zn⁺⁺.

Les clichés 4 et 5 mettent en évidence: 1) que la vitesse de multiplication des frondes diminue lorsque la teneur en Zn⁺⁺ augmente au-dessus des concentrations « normales », mais qu'elle diminue d'une façon moins importante, lorsque Mg⁺⁺ est en concentration plus élevée; 2) que dans un milieu, où Zn⁺⁺ est en concentration毒ique, le poids unitaire des

Fig. 5 (Azote = NO_3 , NH_4)

frondes n'est pas diminué à condition que la concentration de Mg^{++} soit assez grande; la vitesse de multiplication des frondes est cependant abaissée.

BERTRAND

Au sujet des essais d'introduction des oligoéléments dans les graines avant la germination, je voudrais rappeler que depuis longtemps déjà on s'est aperçu de la difficulté de faire pénétrer des substances extérieures à la graine dans l'intérieur de celle-ci, à moins que les couches de protection, les téguments de l'amande, soient lésées. Autrement dit, les parties vivantes de la graine, les cotylédons et l'embryon, sont ordinairement protégées par une enveloppe imperméable à tout ce qui peut venir de l'extérieur, sauf à l'eau. Quand une graine est mise en contact de l'eau, elle吸 absorbe celle-ci, mais n'absorbe pas en général les substances qui s'y

trouvent dissoutes. De sorte qu'il est difficile de réaliser l'enrichissement en oligoéléments d'une graine quelconque. Il se peut, étant donné la variabilité de résistance des téguments de la graine, que dans certains cas il y ait de la pénétration, mais ceci demanderait à être démontré. Quand on fait macérer des graines dans une solution de substances minérales et que l'on sème ensuite ces graines, il peut arriver que les sels qui se sont fixés sur l'enveloppe se diffusent dans le sol et l'enrichissent en oligoéléments; la petite plantule pourra alors les utiliser après sa germination.

Il y a, entre la richesse des graines et celle des plantes qui les ont formées, une règle que j'ai trouvée, en analysant séparément la graine et la plante d'à peu près 200 espèces végétales. J'ai toujours trouvé que la graine est plus pauvre en oligoéléments que la plante dont elle provient.

DISCUSSION SUR LES RAPPORTS BERTRAND, SCHARRER, SEEKLES, SANTOS-RUIZ

VIRTANEN

Prof. Scharrer hat in seiner interessanten und inhaltsreichen Vorlesung auch über die Variationen des Kobaltgehalts von Milch berichtet. Ich wollte gern fragen, ob Kobalt in Milch auch in anderer Verbindung als in Vitamin B_{12} vorkommt.

SCHARRER

Ich habe bisher nur den Gesamt-Kobaltgehalt der Milch in der Literatur gefunden, aber nichts darüber, wie das Kobalt gebunden ist, ob es als Vitamin B_{12} oder in anorganischer Form vorliegt. Das müsste natürlich bearbeitet werden.

VIRTANEN

Wir haben Vitamin B_{12} während eines Jahres in der Milch bestimmt, und es hat sich folgendes gezeigt: Der Gehalt an Vitamin B_{12} ist am grössten, wenn die Milchproduktion niedrig ist. Ist die Milchproduktion hoch, so ist der Vitamin B_{12} -Gehalt niedrig. Es gibt sehr grosse Unterschiede. Wir finden in Finnland etwa 3 Gamma Vitamin B_{12} pro Liter Milch, wenn die Milchleistung hoch ist, aber es kann bis über 10 und sogar bis 16 Gamma steigen, wenn die Milchproduktion niedrig ist. Es scheint, dass wir auf den Vitamin B_{12} -Gehalt der Milch in normalen Fällen nicht einwirken können; wenn wir den Kühen mehr Kobalt geben, so steigt der Vitamin B_{12} -Gehalt nicht in der Milch. Es scheint also, dass die Mikro-Organismen in Pflanzen nur eine gewisse Menge B_{12} pro Zeiteinheit bilden und dass der Kobaltgehalt in Pflanzen normalerweise nicht der abgrenzende Faktor der B_{12} -Synthese ist.

SCHARRER

Haben Sie auch das anorganische Kobalt bestimmt?

VIRTANEN

Nein, das haben wir nicht bestimmt.

SCHARRER

Nur das Kobalt, das als B_{12} gebunden ist?

VIRTANEN

Ja.

ARNON

I would like to refer to the point made in Prof. Scharrer's lecture that a prophylactic dose of micronutrients is being used in some parts of America to prevent Brucellosis. Am I correct in thinking that this has recently been shown to be ineffective? Is that correct?

SCHARRER

Diese Tatsache, dass die Brucellose bekämpft wird durch Kobalt, Mangan und Kupfer wurde mir mitgeteilt von einem Herrn aus Missouri, und die Theorie, die dieser Herr entwickelt hat, ist so, dass die Widerstandsfähigkeit dieser Mikro-Organismen geschwächt wird dadurch, dass eben diese Mikro-Elemente nicht vorhanden sind, sodass die Abwehrkräfte des tierischen Organismus dann im Stande sind, diese Mikro-Organismen abzutöten.

ARNON

I understand that recently it has been questioned in the U.S. whether these measures have proved to be effective. I wonder if you have any other information on that point. Perhaps Prof. Seekles would also like to comment in this point.

SEEKLES

Mr. Chairman, I have had a discussion with the people in Missouri, when I was staying in the U.S. I was wondering about the scientific basis

of their conclusion, about the possibility of preventing Brucellosis in this way. So I asked about their experiments and to show me the data. But they could not, because it was just a theory. They were only convinced of the possibility.

Prof. Scharrer has explained to us that the resistance of the animals would increase under these conditions like the Missouri people said. I asked them to give me the experimental basis for this conception but they could not either. Now we know from what Prof. Arnon tells us, that there are some experiments contradictory to the theories of the Missouri scientists. So it is my impression, that not so much has come out of these theories. Brucellosis is an extraordinary important disease in cattle, and if there would be a simple method to overcome this disease, it would of course be of great importance. But as far as I know, it has not been shown.

LAATSCH

I should like to ask Prof. Seckles, if the cobalt in the blood of the cattle goes down in the same way as the copper concentration in spring, when the cattle are turned out into pasture.

SEEKLES

I cannot answer this question. I have never made estimations of cobalt in the blood for the cobalt content is very low in the blood, and I do not dispose of a method of determining cobalt as a routine analysis. I have determined cobalt in the liver, and in the herbage.

LAATSCH

Are there great variations of the cobalt concentration in the liver?

SEEKLES

I have not so many values, as we have on copper. But it is my impression, that cobalt deficiency is not a very big problem in animals in the Netherlands. When I compare the value of cobalt in Scotland and other countries in the world, where real deficiencies of cobalt occur, with my data, then our values are much higher. For instance, Prof. Scharrer has mentioned data given by Swanberg in Sweden to be 0.03; we have found

0.15, so five times as much. The animals were showing very slight symptoms of cobalt deficiencies. We only find the condition on the older soil. But the soil in Holland is very young as compared with other parts of the world.

LAATSCH

Thank you.

ARNON

I would like to ask Prof. Seekles if he has any theory to offer to account for these differences in the levels of copper among the different species. There is a great difference between the level of copper in the human being as compared with cattle and sheep, if I recall. How do you account for these differences?

SEEKLES

That is the most important point of the whole story, and we are active since many years on this problem. As far as I can see, we have two influences here. One influence is that in general in ruminants there is a cooperation between the microbes in the rumen and the tissues of the animal. So there is some complication in the uptake of the minor elements. That is the reason why I have started two years ago a special section in my laboratory for investigating the microbiological abstracts of microbiology, but I am not very far just now. That is one factor, on the other hand, we have other factors acting in the blood and in the tissues. I could not tell you the reason why there is in cattle always an influence on the copper reserves in the liver and on blood copper in the sense that the copper goes down in both of them. The same influence which in cattle lowers the copper in the blood and in the liver, act in horses and in man just in the opposite way. This holds for instance for infectious diseases. The cause of this difference is not known but it seems to be specifically inherent to ruminants.

GERRETSSEN

In möchte Herrn Prof. Scharrer fragen, geht das Bedürfnis an Bakterien im Magen der Kühe usw. aus einem Bedürfnis der Bakterien selbst hervor oder brauchen sie es nur für die Synthese von Vitamin B₁₂?

SCHARRER

Es ist wohl ein Bedürfnis der Bakterien selbst an Kobalt.

GERRETSSEN

Wenn das der Fall ist, wissen Sie vielleicht, welche Bakterien es sind und könnten Sie mir vielleicht einige Reinkulturen davon schicken. Wir sind daran sehr interessiert auch Kobalt mikrobiologisch zu bestimmen.

SCHARRER

Mikrobiologisch haben wir selbst über diese Dinge nicht gearbeitet.

SEEKLES

Das geht aus der Untersuchung von Tasic und Mitchell hervor (1948). They have shown that Cobalt is absorbed by the microbes of the rumen.

MITCHELL

That is Tasic and myself in Aberdeen. In cobalt deficient diets over 90 to 95% of the cobalt content of the diet led into the bodies of the rumen bacteria almost immediately, while in cobalt adequate diets perhaps 75% was absorbed by the bacteria. But I do not think Dr. Tasic identified the bacteria.

SEEKLES

He did not. It is not in the paper.

LUNDEGÅRDH

As most of you may not have heard about an extensive investigation on the contents of mineral elements in the human liver, I think it would be of some interest to tell you a little about this paper which has been published fifteen years ago in the Proceedings of a Swedish Society in Upsala. The investigation was based on material from 376 autopsies and the number of spectrochemical determinations was 4500.

I would like to show a few figures that may be interesting for the discussion. As shown in fig. 1 — a table in which mean values for a few diseases are given — the following elements were determined: K, Ca, Mg,

Fe, Mn, Na, Cu, Zn, Al, Rb, Li, Sr. Except from the wellknown fact that women show lower Fe—values than men no appreciable sex differences were found. With regard to different diseases it may be noticed that Cu is obviously accumulated in the liver during tuberculosis whereas Zn is accumulated in cancer. The surprisingly low content of Mn would seem to indicate that there is hardly any surplus storage of this element to be used in times of deficiency.

Table 1. Mean contents of the metallic elements in the liver calculated in mg/kg.

	K	Ca	Mg	Fe	Mn	Na	Cu	Zn	Al	Rb	Li	Sr	
Septicaemia													
♂ 36 cases . .	1877	28.9	131.3	199.4	1.48	1037	3.24	36.0	23.7	8.5	2.0	0.2	mg/kg
♀ 24 * . .	1990	31.7	138.0	186.5	1.26	1099	4.00	35.3	29.9	10.3	3.0	0.2	mg/kg
Cardiac Diseases													
♂ 14 cases . .	2033	33.3	133.7	212	1.87	1302	4.32	28.8	23.7	14.5	1.7	0.1	mg/kg
♀ 15 * . .	1775	39.7	124	184	1.98	1330	4.77	28.1	18.9	15.4	—	—	mg/kg
Cancer													
♂ 20 cases . .	1924	46.9	150.8	241.8	2.14	1247	4.70	52.9	27.8	15.4	—	—	mg/kg
♀ 33 * . .	1771	32.1	124.0	177.0	1.98	1242	4.19	45.8	31.8	12.0	—	—	mg/kg
Tuberculosis													
♂ 14 cases . .	2131	33.3	131.3	211.1	2.03	1166	7.37	38.6	33.2	12.0	4.2	0.2	mg/kg
♀ 14 * . .	1869	31.3	133.8	140.2	2.14	1164	6.48	50.2	28.0	12.0	4.2	0.1	mg/kg

FIG. 1.

Mean content of metallic elements in the human liver, calculated in parts per million fresh weight.
For dry weight the values have to be multiplied with the factor 4.

The total results have been arranged in age groups of five years, from 0 to 85. In figures 2 and 3 two of these curves are reproduced. The age-curve of copper shows a steady decrease with rising age, the same for both sexes (fig. 2). The newborn child starts with a large stock of copper stored in the liver. Because copper is an indispensable constituent of the blood plasma the shortage of this element in higher ages may perhaps be of some medical interest. Manganese takes the reversed course (fig. 3), rising with increasing age.

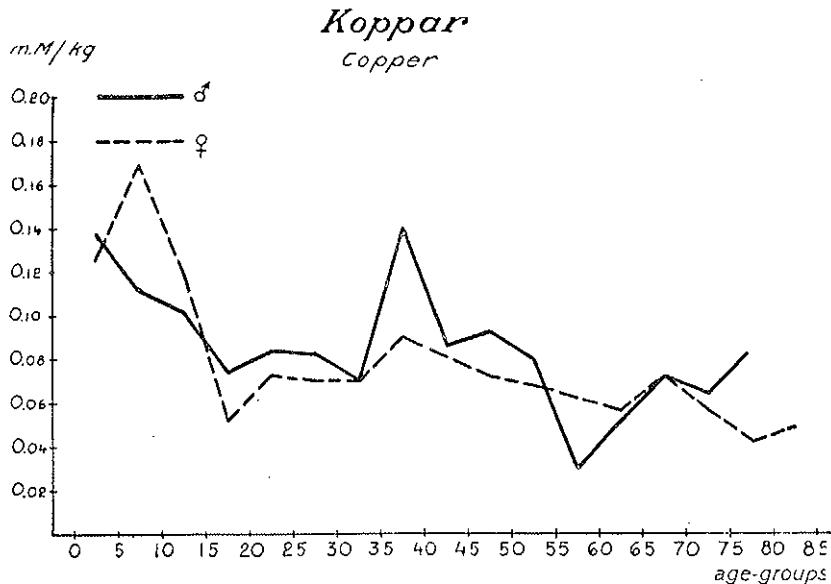


FIG. 2.

Age curve of copperin males and females. Age-groups in years.

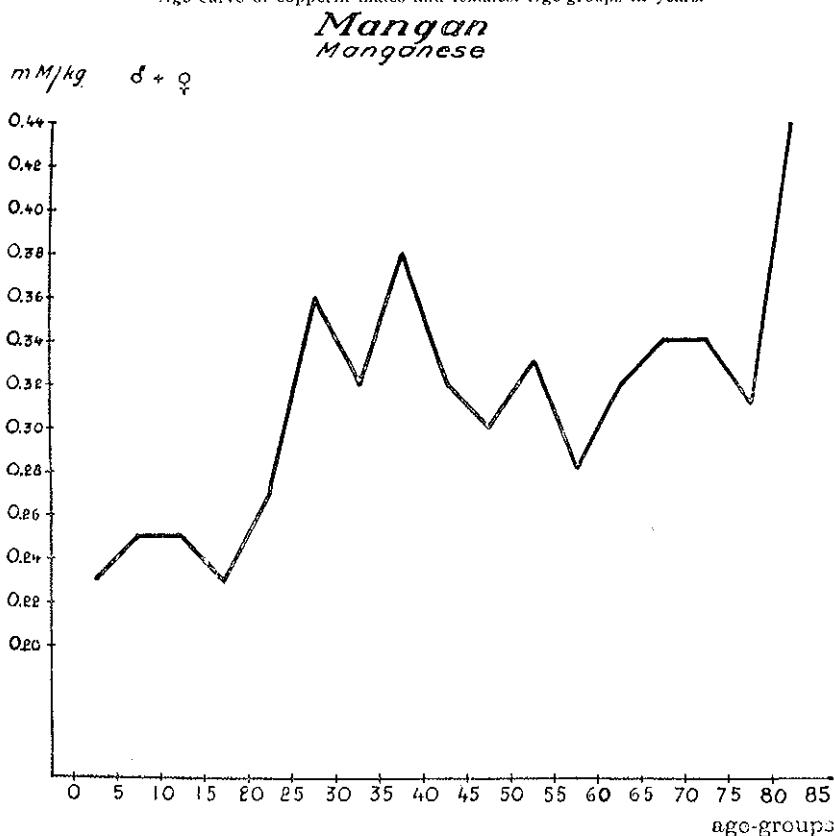


FIG. 3.

Age curve of manganese, values including both males and females.

Of other results the following may be briefly mentioned: potassium and magnesium have the same trend; the liver is a deposit for Rb, which is reversed during the course of life. Owing to the decomposition of the blood or an inactivity of the bone marrow Fe is stored in the liver at hemolytic anaemia or anaemia perniciosa. Women show low Fe—values during pregnancy and in the period of 35-50 year of age. Low values of Fe and Mn occur in the period age 10-30 years in both sexes. In respect of copper there is a balance between the mother's content in the blood and the child's content in the liver. A number of other metals, e.g. Na, Ca, Fe and Zn, show low values for the mother's content in the liver and high values for the full-time foetus.

SEEKLES

Mr. Chairman, Prof. Lundegårdh has given us a very important item. I am wondering about one special point, namely the absolute concentrations of copper in the liver. My figures given for man and for animals are on the dry matter basis. So we have to multiply Prof. Lundegårdh figures by 4 for comparison. If we do so, we get extremely low figures as compared with ours. First of all, I would like to ask Prof. Lundegårdh what is his idea about the copper content in normal subjects. It was not on the slide.

LUNDEGÅRDH

We have compared the results with those in the literature and found that our figures agree very well with figures from Gerlach and others.

As to the relation between the content of a number of elements in the human liver and in the seeds of barley, from which we have very accurate figures, the following table will give you some elucidation (values in p.p.m.).

	K.	Na	Mg	Ca	Fe	Cu	Mn
Barley seeds	3910	184	1000	240	55	10	10
Human liver	8000	4500	550	150	750	18	7

These values are calculated per unit day weight (mg per Kilogramm) and show with respect to iron and copper an accumulation in the liver. I am convinced that our values are all right and that there are no losses of copper during the very slowly proceeding ashing.

SEEKLES

We have found figures ranging from 32 to 87. The average is about 50 and Cartwright mentions 24 to 60; that is not much different. Cartwright has given values for copper in the liver in diseased conditions in man. He has found a decrease in nutritional anemia, and in all other conditions of human subjects the copper was increased. This is in agreement with the findings by Dr. van Ravenstein of Utrecht. Mr. President, I should appreciate having a short discussion on the method of determining copper. In Holland we have exchanged methods and samples between various laboratories. We then came to the conclusion, that dry ashing, that Prof. Lundgårdh has applied, is not as good as wet ashing. There seems to be an evaporation of copper at red heat temperature, especially when chloride is present in the sample. That is why we have adopted in Holland the wet ashing, especially for copper, not for manganese and not for the other elements, but just for copper. However, zinc will evaporate.

LUNDEGÅRDH

Yes, it may be true, but our figures are computed from a very extensive material and comparisons were made with wet ashing.

As may be easily understood the autopsy material from a big hospital gives you only comparatively few values from healthy persons who have been killed in accidents. On the other hand there *are* differences induced by special diseases, as I have already mentioned, but they are apparently primarily restricted to a disturbed balance between the blood and other tissues.

When Dr. Seekles says that we apply red heat I must add that we apply it in a special way. The first period of drying of the samples takes three weeks. The ashing procedure begins at c. 200° C for a couple of hours, after which the temperature is gradually raised to dark red heat. The whole combustion procedure takes about 6 hours. We have compared

it with the wet method, but I cannot remember that we ever got significant differences. So in our case no copper is lost during the ashing.

SANTOS-RUIZ

I am convinced that Prof. Lundegårdh's information concerning the content of chemical elements, especially copper, in the liver, is very interesting. But I have the impression that Dr. Mitchell can say us also something about his results in this matter.

MITCHELL

I think there was indeed one paper in the literature regarding nickel, but I do not think it has ever been substantiated. There is another point which I would like to make. I have got here some unpublished analyses, of sheep's liver which we have made for Dr. James Stuart of the Moredun Institute in Edinburgh. The figures for copper in sheep of approximately the same age, all grazed on the same herbage and killed at the same time, vary by some tenfold from one animal to another, from perhaps 4 to 140 parts per million in the dry matter. As Prof. Lundegårdh has reported for human livers, the manganese content is much lower than the copper, perhaps one tenth. Iron is about the same as copper, zinc is slightly higher. Of the other elements molybdenum, zinc, iron and manganese are relatively constant for man and animal. Cobalt varies a little but not so much as copper; nickel and silver vary a great deal.

LAVOLLAY

I was impressed by the high figures of zinc in the cases of cancer, as compared with the data in other diseases.

SANTOS-RUIZ

I would like to ask Prof. Scharrer and, also perhaps, Prof. Seekles, if they know something about the possibility of a synergic action of the nickel with cobalt in the coast disease or maladie de la côte in mutton.

I don't remember now but some author wrote a paper about the role of nickel in this disease. What do you think about it?

SEEKLES

Actually we have no coast disease in New Holland.

SANTOS-RUIZ

That is in Australia, and in New Zealand.

SEEKLES

Yes that's right, and I have not been there. I hope to go there some time, but it is a bit out of the way. Our cases of cobalt deficiency, if there are any, are just vague as compared with what they have in Scotland, in Australia, etc. So I don't have a competent opinion of it. I don't know either the influence of nickel. I have not made investigations on that.

SCHARRER

Ich habe gestern berichtet, dass im Schwarzwald starke Kobalt-Mangelscheinungen auftreten in Form der sogenannten Hirsch-Krankheit oder Semper-Krankheit. Diese Erscheinungen verschwinden, bezw. die Tiere werden geheilt, wenn Kobalt und Kupfer verfüttert werden. Die Nickelgehalte waren durchaus normal und hatten, soviel untersucht worden war, keinen Einfluss auf diese Erkrankung.

SEEKLES

Dr. Mitchell was good enough to show me his figures of copper in sheep, and they are similar to the figures, we have found in cattle. So those two species of ruminants don't show any difference as far as copper is concerned, as far as I see it. It is important to know that Dr. Mitchell has carried out his determinations in the spectrographical way. So he will agree as far as copper is concerned.

Ich möchte an Herrn Prof. Scharrer noch eine Frage richten:

Gibt es einen Einfluss von Mn auf die Bildung des Vitamins B₁? Mir ist nur die Auffassung Eggletons bekannt, nach welcher B₁ unter dem Einfluss von Zn gebildet wird.

Nach Rudra hat Mn einen Einfluss auf die Bildung des Vitamins C. Wie denkt Herr Scharrer über diese Frage?

SCHARRER

Diese Untersuchungen wurden hauptsächlich von Frau Dr. v. Bronsast in Stuttgart gemacht, und sie hat Beziehungen gefunden zwischen dem Mangangehalt und dem Vitamin B₁-Gehalt. Es waren auch Beziehungen zwischen dem Mangangehalt und dem Vitamin C-Gehalt festzustellen.

ARNON

I would like to ask one question about the iron. This is a very interesting point to me that iron cannot be eliminated from the human body. Iron gets continually ingested with the food as well. How then does the human body cope with that?

McCANCE

By controlled absorption. We established that before 1940, and it has been proved again and again by the use of trace elements.

ARNON

Well, why doesn't that mechanism operate for blood transfusions?

McCANCE

Because you put the blood in intravenously. You have to give transfusion intravenously, and that automatically cuts out the controlling mechanism in the intestine.

DISCUSSION SUR LE RAPPORT McCANCE

AYKROYD

If enormous amounts of an iron tonic are given over years, is the body still able to cope with that quantity of iron and refuse to absorb it?

McCANCE

Yes, it never gets tired of refusing to absorb it. It probably gets better and better at refusing to do so.

ARNON

At the risk of revealing my ignorance in medical problems, I would like to ask one more question along these lines. Isn't it true that you get a continual destruction of red blood corpuscles, their life is not very long? Well, what happens to the iron then?

McCANCE

It is stored and used again. A continuous circuit of iron goes on in the body.

ARNON

And there is never any loss of iron?

McCANCE

When I say none, I admit that there may be, and indeed we know there are a few microgrammes of iron in the urine every day, but there is no evidence that the faeces ever contain more than the food and how else can it be excreted in quantities which matter in this connection.

SEEKLES

Surely animals can excrete iron. What happens with the iron deposited in the tissues after poisoning animals with phenylhydrazine? It has been shown that iron, when given per mouth is helpful in the synthesis of hemoglobin, supposed the iron is given in the right form, e.g. ferrochloride or complex ferro or ferric salts.

McCANCE

I accept all the facts you have put up on the board about absorption, and I think all are well known. I think that mice have been shown to excrete a small amount. The human body may be loaded with iron and next to none of it will be excreted. When liberated inside the body, as after giving phenylhydrazine or multiple transfusions, iron is deposited in ferric form in a specific protein — not in all proteins or in all organs, and not, I think, in the proteins of the intestinal mucosa to an extent which could interfere with function. The iron is, I believe, thought to be deposited as ferric hydroxide in the space lattice of the protein. I am not clear at all where all the iron goes to when very large amounts have been given time after time by transfusion. Some goes to the liver, of course, but only a small fraction of the whole. Some goes to the spleen and the skin and the bone marrows. The amount of iron in the body is regulated by controlled absorption but what regulates the absorption is not known, not to me at any rate, though it is thought to have something to do with the level of circulating hemoglobin and the specific protein present in the mucosal cells. Absorption is probably a matter of active transport.

SEEKLES

I would like to ask another question. I have analysed urine, milk, hair and faeces of cattle — in all of them I have found iron. But I have not made balance experiments. Is it completely sure that there is no excretion of iron?

McCANCE

Oh yes, but very very little except in faeces, and you have no evidence that the iron found there had ever been inside the body in the true sense of the term. All I can do, Prof. Seekles, is to refer you to the many papers

which have been written about the excretion of iron in man. We have ourselves written a number on this subject and I feel quite confident that the information I am giving you is correct.

ARNON

Prof. McCance has raised a number of points for plant physiologists — one dealing with the active transport of iron. I think that perhaps some of you here who are not plant physiologists may not realize that in Professor Lundegårdh we are fortunate in having the world's leading research worker in the field of active transport of ions by plants. I would like to ask Prof. Lundegårdh to comment on the question of ion absorption by plants raised by Prof. McCance.

LUNDEGÅRDH

What Prof. Seekles has said about exchange processes of cations is a well-known fact from numerous experiments on plants. I have earlier distinguished between non-metabolic absorption and metabolic (or active) absorption. Metallic cations may be abundantly absorbed by means of non-metabolic exchange, anions not. Besides of the process of metabolic exchange of ions and the active anion respiration we have an absorption of molecules too, proceeding by means of dissolving in the protoplasm and/or diffusion. As a matter of fact organic acids, e.g. succinic acid, or fluoride, may be absorbed at much higher speed as undissociated molecules than as anions. This is very important in studying the effect of some inhibitors, e.g. mono-iodine acetic acid, fluoride, or of auxins. The disregard of this fact has deceived many biochemists *in vitro* studies of enzymatic reactions.

MCCANCE

There is an enormous amount of copper in the liver in Wilson's disease.

LUNDEGÅRDH

What do you mean by an enormous amount?

MCCANCE

I ought, of course, to be able to quote you chapter and verse for the

amount of copper in the liver in Wilson's disease. I can't, because I always fail to keep this sort of thing in my mind. I am afraid we must look it up in the original papers.

SEEKLES

I have some details in my head, not concerning man, but cattle.

McCANCE

But they don't have Wilson's disease.

SEEKLES

You are right. In cattle suffering from copper poisoning the copper content of the liver may be 2,000 to 3,000 instead of, let us say, 20 to 200.

McCANCE

This is where you catch me.

LAVOLLAY

Comme l'a dit M. Lundegårdh, je crois que le fer peut être absorbé à l'état combiné. Un travail important d'Albert et Rubblo, dont j'ai parlé dans mon rapport très rapidement, a démontré qu'avec *Staphylococcus aurens*, la 8-hydroxyquinoléine, provoque l'empoisonnement du micro-organisme. L'effet du poison n'est pas dû à une immobilisation du fer dans le milieu, mais, au contraire, au fait que le fer, en combinaison avec 8-hydroxyquinoléine, pénètre plus facilement dans le corps microbien: il en résulte une intoxication *par excès de fer*. Le fer pénètre donc très facilement dans la cellule lorsqu'il est chelaté par une substance convenable. Je crois qu'il y a là une vue extrêmement intéressante.

LAATSCH

You said, that primitive people who change from their nutrition to our nutrition will get corroded teeth. I have read the same thing in a book by Styles entitled « Nutrition and Physical Degeneration » published by the American Academy of Applied Nutrition. Styles has analysed primitive nutrition and our own nutrition, and he found out that the primitive nutrition was much richer in vitamins and minerals than our own. He came to the conclusion that not only caries but also other degenerative diseases

have their origin in a deficiency of vitamins and minerals. If this should be right, why do not physicians and dentists tell their patients to go over to another nutrition? If Styles is right, then it seems to me that it should not be necessary to introduce fluorine into the water.

McCANCE

So far as fluorine is concerned I believe the author of that book is substantially correct, but in other respects he is really a worshipper of nature. He *believes* that the return to a primitive diet is the only salvation for man, and he would probably like to see the food grown without artificial fertilizer on humus alone. There are lots of these people about — many of the advocates of brown bread come into this category. Your author almost certainly belongs to that group. I may appear rather dogmatic but I have made quite a big investigation of the psychology behind all this and I think I am correct in my reply.

WALLACE

Prof. McCance has posed one or two questions to us this afternoon on which I should like to make some comments.

First of all, do we know anything about the effect of trace elements on crop production? This, of course, is a very important question from the point of view of the world production of food, but it is a very difficult question even if one attempts to examine it for quite a small country. We have tried in England for quite a while now to get data on the effect of trace elements on crop production, and to attempt to do this we have collaborated with offices of the National Agricultural Advisory Service throughout the country. We had a scheme whereby the advisory officers were to report cases of trace element deficiencies to us and to give any further data they obtain regarding the effects of yields etc. Well, we failed to get the data we wanted.

During the war I had a small team of men who used to visit any part of the country where unusual failures of crops were reported, to see how far these failures could be attributed to faulty mineral nutrition.

We were able to find soil conditions in various parts of the country where failure from the different elements occurred and we obtained much

useful information on trace element deficiencies in this way. For example, I remember going into one area in the Fens in which farmers did not want to break up their grass pastures and grow arable crops, because they said there were records in continuous failures in the areas which had been passed down from father to son by farmers who had tried to cultivate arable crops at various times.

We examined many crops on these soils. They were generally failures — the farmers were right, but fortunately we were able to diagnose the causes; they were usually deficiencies of boron and manganese, and later copper deficiency was also diagnosed in the area.

This brings me to the second point. We have also carried out experiments to attempt to assess the increases in yield that result from different methods of treatment with trace elements where deficiencies occur. Here again we came up against very difficult problems because, in many of these failures, if we applied the deficient trace element to the soil in the usual way, we often got very little response, and we were unable by this method to determine the optimal yields. This brings me to the point that before we can make such assessments we must know the best way to apply the particular trace elements and also the best time to apply them to the plants. We have found in treating many crops with trace elements, particularly horticultural crops, e.g. fruit trees, with manganese, iron, copper, zinc, that, if we are to get any result within the first season, we have to apply the elements to the plants at an early stage in the seasonal growth cycle. If you apply them late in the growth season there is no observable response that season. The same holds for magnesium; it must be applied whilst the foliage is young — for apples just after blossoming is finished.

We have, however, a curious situation in the case of the so-called Marsh Spot of peas, where the problem is, as you know, that of supplying manganese to the developing seed to prevent the formation of lesions in the coppledons. If you follow the usual method of putting the manganese into the plant by applying it to the foliage of the young plant, you get a very fine effect on the foliage but you do not get the best effect on the Marsh Spot. It is not simply a matter of yield, you see, it is a question of whether the seeds get Marsh Spot or not. To obtain the best control of Marsh Spot symptoms experiments so far have shown that the manga-

nese spray must be applied at the flowering time. Thus in attempting to assess the effects of trace element deficiencies you are faced with all these difficulties. What is the best method of applying the trace elements and when must we apply it; then, if you must use sprays, what is the best strength for the application? We have done much work on these practical problems but it is going to be a very long time before we can get useful yield figures for different crops, for different parts of the world. Then, of course, in many areas of the world problems of trace elements have not been studied at all and we don't know how far trace elements enter into the problems of crop and animal production. But this is a problem which ought to be faced sooner or later — it may take years to do it, but we should begin to get the basic data and see how far we can make useful progress.

There are one or two other problems, on which I should like to comment. I think you raised the point in connection with copper of what you would term genetic diseases. We have some similar problems in plants. For instance, there is the problem of congenital chlorosis including foliage variegation in plants. Many years ago the leaves of some variegated plants were analysed by a scientist named Church; I think about 1879. His results are recorded in the Journal of the British Chemical Society. Church found that the outstanding difference between the chlorotic and the green parts of the leaf was that the chlorotic part had a relatively low calcium-potassium ratio. When I began work on lime-induced chlorosis — an iron deficiency problem — about 1920 I obtained a similar result. The chlorotic leaves showed the low calcium, high potassium condition although in this chlorosis the plants were growing on a soil with a very high content of calcium carbonate.

Then I should just like to make one observation about mercury. It is a fact that mercury is very largely used for seed treatments and also as a spray on fruit trees for the control of fungus diseases such as apple scab (*Venturia inaequalis*). Having known and seen one or two cases of Pink disease and now that I know the cause of it, I feel more strongly than ever that this question of the use of mercury on crops should be carefully examined.

AYKROYD

I have several comments on one part of Prof. McCance's talk and that is the part that dealt with fluorine and dental caries. I firstly became interested in this question when working in India some years ago, because we were able to show that there was a clear cut relationship between the fluorine content of water supplies and incidence of dental caries. On the other hand, it is quite clear that the level of fluorination does not explain the epidemiology of dental caries throughout the world. As Prof. McCance has pointed out, it is when you get populations passing from a relatively unsophisticated diet to a diet of the Western type that you find dental caries appearing.

In India, after studying the incidence of dental caries, we arrived at the rather simple conclusion that the poorer and the more miserable the group, the better their teeth. I recall that the only group in that country that showed any serious degree of dental caries were the Anglo-Indians, the Eurasians, who had adopted a more Western type of diet.

Now, what I would like to ask Prof. McCance, and it is no doubt a difficult question, is this: has any attempt been made to link up the fact of the undeniable relationship between dental caries and fluorine with the other facts about dental caries, mainly its epidemiology in relation to certain kinds of diet and particularly its higher prevalence when a diet of the Western type is eaten? We know, of course, that there has been a vast amount of work on dental caries in experimental animals, with which Prof. McCance is no doubt familiar. Here, again, I would like to ask whether all that work has thrown any blinding light on the problem of dental caries in man?

Prof. McCance also raised the interesting question of the reaction of people to adding fluorine to water supplies. It would seem, from the evidence available from the United States, that this method is pretty free from risk and is obviously effective; and I think, as Prof. McCance has suggested, that the reaction is psychological rather than scientific. There may be some analogy here, perhaps, between the fluorination of water supplies and the iodisation of salt for the prevention of goitre. Now in the case of that particular public measure — salt iodisation — a rather similar reaction has been evident in certain parts of the world. I know a country, for

example, where the medical profession has been opposed to the introduction of iodisation on the grounds that it is dangerous — that it may lead to toxic goitre — although there is abundant evidence from other parts of the world that a similar level of salt iodisation has produced no such effect.

The whole question of the enrichment of foods or water supplies with supplementary substances is one of great interest which comes into the field with which the organisation I work for — F.A.O. — is concerned. A great deal is written about it, and people who hold one view or another get very angry on the question. The fact is, I think, that it is almost impossible to generalise about enrichment procedures with respect to their effect on public health and any danger or disadvantage involved; each situation has, in fact, to be judged on its merits. Under certain circumstances — and I think that the addition of fluorine to water supplies is an example — the procedure seems rational, safe and inexpensive. There are, however, other enrichment procedures, followed in various parts of the world, which I think are much less defensible. The whole question, of course, is a big one and rather outside the scope of this discussion.

I was interested in the reference to what may be called « unsophisticated » diets free from abnoxious chemicals, produced on natural soil and so on and their effect on health. We know that a great deal has been written on that subject. You would be surprised to know how often in our organisation we get queries from different parts of the world on just that theme. People write to inform us, for example, that the whole of mankind is being poisoned by the use of chemical fertilizers. This is a common type of reaction, and some of these queries are not always easy to deal with in a straightforward way. I can remember getting personally involved in a controversy on the use of chemical manures versus that of natural manures; one useful fact to quote was that the population of New Zealand, where practically all the crops, I understand, are grown with the use of chemical manures, happens to have the best vital statistics of any country in the world.

ARNON

I have jotted down several points which Prof. McCance posed here and I am not sure what would be the most profitable order to bring them

up. If I raise a point which should perhaps be deferred, I would appreciate it if the Chair would so advise me.

Now, first of all, in relation to fluorine: I think that an analysis of the fluorine problem illustrates several questions in this general problem of micro-nutrient elements. First of all, before perhaps coming to fluorine, I think a further mention of the effects of micro-nutrients on agriculture might be cited in support of what Prof. Wallace has already stated. I think there can be very little doubt that micro-nutrient elements are of great agricultural importance in many areas of the world. As you know, the United States should be regarded as a continent instead of a country because it has such a tremendous diversity of climates and soils; yet if we take the two states of Florida and California, between the two of them they supply most of the fruits and a good share of vegetable crops for the entire population of the United States. Now, in so far as Florida is concerned, agriculture in one of its most fertile and most important vegetable crop areas — the Everglades — is based almost entirely on the fact that the soils are being treated with manganese and copper. Prior to that, they were completely worthless agriculturally.

In California, again, within the last thirty years zinc, which not so long ago was in the laboratory stage only as far as higher plants are concerned, is now, I am informed, second only to nitrogen as a fertilizer element used on our tree crops in California. Now this is rather important because California tree crops supply a good share of the entire fruit production in the United States. Large areas are involved and the application procedure consists of spraying for the most part. As Prof. Wallace has pointed out it is unprofitable and not feasible to apply the element in the soil.

So much then for the agricultural importance of micro-nutrient elements in the United States. I think that the effect of boron on sugar beets are probably equally spectacular in various parts of the world. Other examples can be cited: molybdenum in Australia on pastures, molybdenum in many parts of the world treating whiptail in cauliflower etc. I have not the slightest doubt that the agricultural importance of micro-nutrient elements is very great indeed.

There are several facets to the problem of micro-nutrients in the field. The simplest situation is when we are dealing with an element which is required for the plant itself. There, if the plant does not receive the element in question from the soil, it appears diseased and it is obvious that the element has to be supplied or crop failure or at least reduced growth will result. That is rather a simple problem and the farmer or the plant physiologist in collaboration with the soil scientist or the agronomist and horticulturist cope with it. But there are other elements, and fluorine is I think a good example, where the plant, if it requires it, requires it in such minute amounts that it doesn't seem to run short of it under most conditions in the field and laboratory, so that a mere inspection of the plant cannot reveal any likely deficiencies from the standpoint of human nutrition or animal nutrition.

Of the other elements of this category, there is cobalt. Here, again, the plant looks quite normal in areas which we know do not provide sufficient cobalt for animals. Several problems both theoretical and practical are involved here. The theoretical problem, if I may digress for a moment, is that raised by Prof. McCance. What status should we assign to fluorine in so far as animal nutrition is concerned? Is it an essential element or a beneficial element? I would like to submit one point for discussion and that is that until, and unless, we can remove fluorine completely from the animal's diet we can never really answer that question with any degree of precision. Even in those cases where there is a response to fluoride, added to water, in reducing caries, a certain amount of fluorine is, of course, always present in the diet — it can never be removed. The reduction in caries may result from increasing the amount of fluorine in the body. If, however, we were to succeed in removing fluorine completely, perhaps the results would be fatal; perhaps no calcification of the bone could take place at all in the absence of traces of fluorine. So the distinction between a beneficial and an essential or an indispensable element becomes largely a matter of experimental technique, and it may be that for certain elements which are required in traces but which are beneficial in greater amounts, the answer can never really be given in those terms which have been presented here unless we succeed in refining our methods to a point which we have not attained as yet.

The problem of fluorine raises also another question. How are we to interpret this beneficial effect of fluorine in reducing caries in terms of civilized diets? Let us refer to those experiments that you mentioned previously. Let us take the two towns in the United States; the diet is as near by the same as one could arrange conditions statistically. Very frequently these towns are not very far removed geographically. In both those towns the diet is, to use the term — it has been used here previously — sophisticated. We have the same average cultural levels, and the same dietary habits. Has the addition of fluoride then returned to the diet the specific component which our sophistication has removed? Is this then the difference between our sophisticated diet and the diet of primitive peoples which confers upon them the resistance to caries? I am leaving territory where I have some background of experience, but I would be very surprised to hear that fluoride is indeed the only difference between sophisticated and primitive diet. It seems to me that we perhaps have to look at this problem in a different way. There are many ways to bring about caries and there are probably many ways to confer resistance to caries. We have simply struck upon one way of conferring resistance to caries by adding fluoride to water; but by doing so we are not in any way compensating for the difference between a civilized or a sophisticated diet and a primitive diet. I would welcome comments on this point.

McCANCE

May I reply to the two last speakers at this point? First of all Dr. Aykroyd. He asked a specific question about work on caries in animals and its prevention by fluoride. In spite of all Lady Mellanby's experimental work on vitamin D the study of caries in animals has not had, I think, much application to man. As regards enrichment procedures, I am in complete agreement with Dr. Aykroyd. Some of them are eminently unsatisfactory and unnecessary to my way of thinking, and in some cases they have been proposed and carried out for advertising reasons. There is no secret about this, it is in the milling literature that the proposal to add vitamin B₁ to bread in England before the war was reckoned by the milling fraternity to be one of the best advertising points that they had ever succeeded in making. The work we have done on the relative merits of white and brown bread have gone to show that the diets in use in

England at the present time — and certainly the diets which we were using experimentally in Germany — are equally good whether 75% of the calories are coming from white bread or from brown. There does not seem to be any care for enrichment, but I do not expect the millers will go back on their proposal to do so. We are booked for white bread and enrichment sooner or later in every civilized country that has got a milling industry with the power of ours and of that of the United States.

The people who are so opposed to chemical manures are not as a rule susceptible to rational argument: they are essentially nature worshippers. You cannot alter their beliefs any more than you can alter any man's belief by scientific argument.

Two points have been raised by Prof. Arnon. Firstly only by removing fluorine entirely can you prove that it is, or is not, an essential element; and secondly that the primitive diets may have contained enough fluorine to prevent the development of caries.

Both questions are entirely sound and I cannot give you a positive answer to either, but it is thought that the action of fluorine on teeth is a local one and that it is due to the fluorine in water not the fluorine in food.

ARNON

Why do primitive tribes, presumably drinking the same water with unchanged fluoride content develop caries when they change their diet?

AYKROYD

The question — I would put it in this way, Prof. McCance — is the following: How can you relate those facts about fluorine to the other series of facts about the increase of incidence in caries when primitive peoples come in contact with the Western type of diet?

VIRTANEN

I think we have no time to discuss the caries problem — this is entirely another problem. The parallel between the concentration of sugar and caries is so clear that, I think, this is the principal reason; but this is not a conference for caries really, and I think we will not continue to discuss this point. If there is something regarding fluorine, then it is possible, otherwise we cannot go into that very big problem. So, Dr. Aykroyd, you don't have anything to ask?

AYKROYD

Well, it was actually a question relating to fluorine that I asked. Can you relate the effect of fluorine to the other known fact about dental caries?

MCCANCE

I am not quite clear as you state the case, exactly what your difficulty is. Apart altogether from the presence or absence of fluorine in the water, some diets seem to encourage the development of caries and others to prevent it.

There are at least two ways of producing caries, a sophisticated diet is one, and too little fluoride in the water is another. There is also a genetic factor.

Fluorine never gives a community complete protection; and fluorine, mark you, protects certain teeth much more efficiently than others. Does the reply answer your question?

AYKROYD

Not quite, but I think, as the Chairman said, we might continue the discussion elsewhere.

SCHARRER

Ich wollte noch darauf hinweisen, dass auch in Deutschland das Fluorproblem immer wichtiger wird, wie ich gestern schon in meinem Vortrage mitgeteilt habe. Die Stadt Kassel, immerhin eine Industriestadt von 300.000 Einwohnern, fluoriert seit einigen Jahren ihr Trinkwasser und auch andere Städte wollen diesem Beispiel folgen; also das Ergebnis ist bisher durchaus positiv bezüglich der Karies gewesen.

LAVOLLAY

Je voulais dire simplement, en réponse au Prof. Arnon, que si l'absorption de fluor diminue la fréquence des caries chez les populations qui reçoivent les régimes « sophistiqués », cela ne veut pas dire nécessairement qu'il y a une carence en fluor. Cela peut aussi bien signifier que les besoins en fluor sont augmentés par le mode de vie des occidentaux.

BERTRAND

La question du fluor est particulièrement intéressante au point de vue des besoins généraux en oligoéléments. Le fluor est connu depuis très long-

temps. C'est Morichini, un chimiste italien, qui l'a mis en évidence pour la première fois dans les fossiles, puis dans d'autres animaux vivants, au commencement du XIX siècle. Et bien, depuis ce temps-là, il s'est présenté des accidents fréquents très variés et on a très mal compris la signification qu'ont les régimes. Il y a notamment une maladie des dents répandue surtout chez les animaux herbivores dans l'Afrique du Nord, dans les régions du Maroc et même en Tunisie. Cette maladie, qui s'appelle « dormous », affecte la couche protectrice des dents qui, vous savez, est extrêmement riche en fluorure calcique, et les dents finissent par tomber.

Un vétérinaire de ces régions, observateur consciencieux et subtil, a fini par découvrir que ceci était dû à un excès de fluor dans l'eau consommée par les animaux qui vivent là où se trouvent des gisements fossiles formés de débris d'os.

D'autre part, on a constaté des accidents dentaires qui semblent pareils à ceux des animaux de l'Afrique du Nord, mais qui ont été perçus dans certaines régions de l'Amérique. En poursuivant les recherches et en mettant autant d'imagination qu'il en fallait pour combler les arguments discriminatifs, on a pensé que les altérations dentaires étaient dues à ce qu'il n'y avait pas assez de fluor dans les eaux et on a même conseillé d'ajouter un peu de fluorure de sodium dans les eaux de ces régions-là. Chose curieuse, cette introduction d'un peu de fluor a empêché les altérations et la chute des dents.

On est donc en présence de deux séries de faits qui semblent contradictoires, car les mêmes conséquences médicales se vérifient s'il y a trop de fluor ou carence de fluor. Si on veut bien maintenant rapprocher ces faits, en apparence opposés, de la loi de l'optimum dont j'ai parlé l'autre jour, on trouve qu'il n'y a pas de contradiction, mais au contraire accord. D'après cette loi, lorsqu'on introduit dans l'alimentation des petites quantités croissantes d'un élément qui manque, on voit les effets avantageux de ces additions augmenter aussi avec les doses de l'oligoélément, mais, à partir d'un certain moment, les accroissements de poids des doses deviennent incapables de provoquer les même phénomène et même, si on continue à introduire des quantités plus grandes, si on dépasse l'optimum, ce sont des accidents qui se produisent. Ainsi est-on conduit en Afrique du Nord à diminuer la proportion du fluor dissout dans l'eau et, en Amérique à l'augmenter.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. Les éléments chimiques dont dépend l'édification et le fonctionnement de tous les êtres vivants sont empruntés au sol, à l'eau et à l'air. Ils sont en premier lieu prélevés dans ce milieux par les plantes.

2. Un grand nombre d'éléments ont été trouvés dans les plantes; parmi ces éléments, il a été établi que les suivants sont essentiels pour toutes les plantes en quantité variées, — à savoir, le carbone, l'hydrogène, l'oxygène, l'azote, le phosphore, le soufre, le potassium, le calcium, le manganèse, le fer, le magnésium, le bore, le cuivre, le zinc et le molybdène.

3. Des acquisitions récentes suggèrent que l'on peut ajouter à cette liste le chlore et le vanadium. En outre, certaines plantes, des algues bleues-vertes, ont besoin de sodium et de cobalt.

Il est possible que d'autres éléments soient plus tard reconnus comme nécessaires grâce à des techniques analytiques et biologiques plus fines.

4. Les éléments reconnus comme essentiels pour les plantes ont été répartis arbitrairement, d'après les quantités requises, en deux groupes:

a) éléments majeurs ou macroaliments minéraux;

b) microaliments ou oligoéléments essentiels.

On considère habituellement comme essentiels les oligoéléments suivants: fer, manganèse, bore, cuivre, zinc et molybdène.

5. Il a été établi que certains des éléments trouvés dans les plantes, mais dont le caractère indispensable n'a pas été prouvé, exercent des effets utiles pour certaines plantes cultivées: par exemple le sodium pour la betterave à sucre.

Pour d'autres éléments des effets utiles n'ont pas été trouvés; certains peuvent être nuisibles.

6. Bien que les plantes possèdent dans une certaine mesure une capacité d'absorption différentielle pour les éléments indispensables, elles ne paraissent pas douées d'un mécanisme qui exclurait les éléments non essentiels.

Les éléments essentiels comme les éléments non indispensables peuvent être absorbés en quantités excessives et produire alors des effets nuisibles.

7. Tous les animaux, y compris l'Homme, dépendent en définitive des plantes (et de l'eau) pour couvrir leurs besoins minéraux. Les besoins des animaux en substances minérales ne coïncident cependant pas avec ceux des plantes.

En plus des éléments essentiels aux végétaux, les animaux ont besoin d'iode, de chlore, de cobalt et de sodium; par contre, pour les animaux, la nécessité du bore n'a pas encore été établie.

8. Bien que les besoins en substances minérales des plantes et des animaux ne coïncident pas, les plantes peuvent cependant servir de véhicule pour tous les éléments requis par les animaux, à condition que le sol puisse les fournir.

9. Les besoins des animaux supérieurs, y compris l'Homme, se distinguent de ceux des autres animaux, surtout en ce qu'ils sont plus grands pour certains éléments, tels que le calcium, le phosphore, le sodium, le chlore et le fer.

Problèmes spéciaux concernant les oligoéléments dans la nutrition végétale

10. La distribution des oligoéléments dans le sol dépend de processus géochimiques et pédologiques. Le rayon ionique et d'autres propriétés physico-chimiques des éléments sont des facteurs géochimiques importants, dont dépend la distribution des oligoéléments dans les différentes roches qui sont à l'origine des sols. Les processus pédologiques sont très complexes; ils sont déterminés par des facteurs physiques, chimiques et biologiques.

11. Les propriétés du sol affectent l'assimilabilité des éléments par les plantes: le degré d'acidité, les matières organiques, les micro-organismes et le drainage sont d'une importance particulière à cet égard.

12. Les plantes se distinguent par leurs aptitudes différentes à absorber les oligoéléments et par leurs besoins particuliers en ces éléments. Ces deux faits posent des problèmes particuliers pour chaque culture et pour leur compatibilité avec différents sols.

Pour la résolution de ces problèmes un certain nombre de questions d'ordre physiologique et biochimique demandent encore une réponse. Ces questions concernent notamment l'absorption et le transport des éléments, leur distribution dans les organes et leurs rôles dans les processus vitaux de la plante.

Problèmes d'alimentation animale

13. En général les quantités d'oligoéléments que les animaux obtiennent des plantes sont adéquates; les exceptions les plus fréquentes concernent l'iode et, peut-être, le fluor pour les mammifères, ainsi que le cuivre et le cobalt, pour les ruminants.

Les besoins en oligoéléments des animaux inférieurs n'ont pas encore été suffisamment étudiés.

14. Pour certains animaux, des problèmes spéciaux de toxicité sont soulevés par la présence de certains oligoéléments à l'intérieur ou à la surface des plantes, en particulier des herbacées. Les principaux éléments en cause sont le molybdène (en quantités excessives), le sélénium, le fluor, le plomb et l'arsenic.

15. Chez les animaux les désordres où se trouvent impliqués les oligoéléments sont très complexes; chez les ruminants par exemple, ils dépendent de l'activité des microorganismes du rumen et du gros intestin.

Problèmes de physiologie humaine

16. Les oligoéléments ont un rôle essentiel dans la nutrition de l'homme; certains de ces éléments sont utilisés à titre curatif et préventif en médecine.

17. Certains oligoéléments essentiels peuvent s'accumuler en quantités toxiques dans différentes parties du corps; leur élimination pose des problèmes thérapeutiques difficiles.

18. Certains oligoéléments, en quantités toxiques, peuvent contaminer les aliments et les milieux, surtout dans les conditions de la civilisation moderne et peuvent ainsi être nuisibles à la santé de l'Homme.

Aspects généraux du problème des oligoéléments

19. Les problèmes concernant les oligoéléments présentent une grande importance pour la production des substances alimentaires dans le monde.

20. Actuellement l'amplitude de ces problèmes et les effets des oligoéléments sur la production des aliments ne peuvent pas être évalués avec exactitude. Cependant, il y a peu de doute que des recherches plus poussées dans ce domaine doivent conduire à des progrès de la connaissance permettant d'accroître et d'améliorer considérablement les ressources alimentaires mondiales, aussi bien les récoltes que les produits animaux, et apporter ainsi une contribution considérable au bien-être de l'humanité.

Suggestions relatives aux recherches paraissant les plus aptes à résoudre les difficultés

Les suggestions suivantes relatives aux futures recherches ont été formulées :

Sols

- 1) Méthodes de détermination de l'assimilabilité des oligoéléments par les plantes.
- 2) Influence des matières organiques et des microorganismes sur l'état des oligoéléments dans les sols.

Plantes

- 3) Les fonctions physiologiques et biochimiques de chacun des oligoéléments essentiels.
- 4) La recherche d'autres oligoéléments essentiels.
- 5) L'accumulation différencielle d'oligoéléments dans les différentes espèces végétales.
- 6) La physiologie comparée des plantes inférieures et supérieures en rapport avec les oligoéléments.

Animaux

- 7) Les fonctions physiologiques et biochimiques de chacun des oligoéléments essentiels.
- 8) Les besoins en oligoéléments des différentes espèces animales.
Les problèmes relatifs à la nutrition des ruminants méritent une considération spéciale.

Homme

- 9) Le rôle des oligoéléments en physiologie et en pathologie.
- 10) Les mécanismes d'absorption, d'excrétion et de transport des oligoéléments à l'intérieur de l'organisme et de la cellule.

SCHLUSSFOLGERUNGEN

1. Für alle Organismen ist eine Anzahl anorganischer Elemente zur Aufrechterhaltung ihrer Lebensfunktionen notwendig. Diese Elemente stammen aus Boden, Wasser und Luft. Aus diesen 3 Medien werden sie zuerst von den Pflanzen aufgenommen.

2. Eine grosse Anzahl von Elementen wurde in den Pflanzen gefunden, von denen die nachstehend aufgeführten für alle Pflanzen in unterschiedlicher Menge notwendig sind: Kohlenstoff, Wasserstoff, Sauerstoff, Stickstoff, Phosphor, Schwefel, Kalium, Calcium, Mangan, Eisen, Magnesium, Bor, Kupfer, Zink und Molybdän.

3. Neuere Beobachtungen lassen vermuten, dass diese Liste durch Chlor und Vanadium ergänzt werden kann. Es ist nicht ausgeschlossen, dass verfeinerte analytische und biologische Untersuchungsmethoden auch weitere Elemente als notwendig herausstellen. Bisher ist ein Beweis hierfür noch nicht erbracht. Doch scheinen gewisse Pflanzen — einige blaugrüne Algen — Natrium und Kobalt zu brauchen.

4. Die Elemente, die man als notwendig für die Pflanzen erkannt hat, sind auf der Grundlage der benötigten Mengen in 2 Gruppen eingeteilt worden:

- a) Makro-NährElemente;
- b) Mikro-NährElemente oder notwendige Oligoelemente.

Als Mikro-NährElemente betrachtet man gewöhnlich Eisen, Mangan, Bor, Kupfer, Zink und Molybdän.

5. Von den anderen Elementen, die wohl in den Pflanzen gefunden wurden, nicht aber für ihr Wachstum unentbehrlich sind, begünstigen einige die Entwicklung bestimmter Pflanzen, z.B. fördert Natrium das Gediehen der Zuckerrübe. Günstige Effekte der übrigen Elemente konnten nicht nachgewiesen werden, einige von ihnen können schädlich sein.

6. Obgleich die Pflanzen bis zu einem gewissen Grade ein unterscheidendes Aufnahmevermögen für die notwendigen Elemente zeigen besitzen sie offenbar keinen Mechanismus, durch den die Aufnahme der nicht notwendigen Elemente verhindert wird. Sowohl die notwendigen als auch die nicht notwendigen Elemente können in schädlichen Mengen aufgenommen werden und Vergiftungserscheinungen hervorrufen.

7. Alle Tiere und Menschen hängen letzten Endes hinsichtlich der

Deckung ihres Mineralstoffbedarfes von Pflanzen (und Wasser) ab. Der Mineralstoffbedarf der Tiere deckt sich jedoch nicht mit dem der Pflanzen, denn die Tiere müssen ausser den für die Pflanzen notwendigen Elementen Jod, Fluor, Kobalt und Natrium aufnehmen, während ein Bedürfnis für Bor noch nicht erwiesen ist.

8. Obwohl die Ansprüche der Pflanzen und Tiere nicht übereinstimmen, können die Pflanzen als Mittler aller der Elemente dienen, welche die Tiere benötigen, sofern der Boden diese Elemente in pflanzenverfügbarer Form enthält.

9. Höhere Tiere und auch der Mensch unterscheiden sich in ihrem Mineralstoffbedarf von anderen Tieren hauptsächlich dadurch, dass sie gewisse Elemente wie Calcium, Phosphor, Natrium, Chlor und Eisen in grösseren Mengen annehmen müssen.

Die besonderen Probleme der Oligoelemente in der Pflanzenernährung

10. Die Verteilung der Oligoelemente in den Böden hängt von geochemischen und bodenbildenden Vorgängen ab. Wichtige geochemische Faktoren sind die Ionenradien der Elemente und andere physikochemische Eigenschaften. Diese bestimmen die Verteilung der Oligoelemente in den verschiedenen Gesteinen, die das Ausgangsmaterial der Böden bilden. Die Prozesse der Bodenbildung sind sehr komplexer Natur und schliessen biologische, physikalische und chemische Vorgänge ein.

11. Die Eigenschaften der Böden beeinflussen die Verfügbarkeit der Elemente für die Pflanzen. In dieser Hinsicht sind der Säuregrad, die Mikroorganismen und die Durchlässigkeit des Bodens von besonderer Bedeutung.

12. Die Pflanzen unterscheiden sich durch ihr Aneignungsvermögen und durch ihren besonderen Bedarf an Oligoelementen. Aus diesen beiden Tatsachen ergeben sich spezielle Probleme des Anbaus verschiedener Feldfrüchte und ihrer Eignung für verschiedene Böden. Zur Lösung dieser Probleme müssen noch eine ganze Anzahl verschiedener physiologischer und biochemischer Fragen beantwortet werden. Zu ihnen gehören die Aufnahme und die Verlagerung der Elemente, ihre Verteilung in pflanzlichen Organen und ihre Rolle in den Stoffwechselprozessen der Pflanze.

Probleme der Tierernährung

13. Im allgemeinen sind die Oligoelement-Mengen, welche die Tiere von den Pflanzen erhalten, angemessen. Die häufigsten Ausnahmen bilden

Jod und möglicherweise Fluor für die Säugetiere und Kupfer und Kobalt für Wiederkäuer. Der Bedarf niederer Tiere ist bisher noch nicht ausreichend untersucht worden.

14. Besondere Fragen der Giftwirkung auf Tiere ergeben sich aus dem Vorkommen bestimmter Oligoelemente in Pflanzen oder an ihren Oberflächen, besonders auf den Weiden. Derartige Wirkungen sind besonders bekannt vom Molybdän (bei grossem Überschuss), Selen, Fluor, Blei und Arsen.

15. Die Probleme der tierischen Krankheiten, bei denen Oligoelemente eine Rolle spielen, sind sehr verwickelt. So wird z.B. die Aktivität der Mikroorganismen im Pansen und im Dickdarm der Wiederkäuer durch Oligoelemente beeinflusst.

Probleme der Physiologie des Menschen

16. Die Oligoelemente sind für die menschliche Ernährung unentbehrlich. Einige von ihnen werden sowohl in der heilenden als auch in der vorbeugenden Therapie angewandt.

17. Einige notwendige Oligoelemente können sich in Teilen des Körpers in giftigen Konzentrationen anreichern. Ihre Entfernung bietet schwierige Probleme der Krankenbehandlung.

18. Einige Oligoelemente können in giftiger Konzentration die Nahrung und Umgebung des Menschen verunreinigen und seine Gesundheit schädigen. Dies trifft besonders unter den Bedingungen der modernen Zivilisation zu.

Zusammenfassende Betrachtung der Oligoelemente

19. Probleme der Oligoelemente haben Weltbedeutung und sind von grosser Wichtigkeit für die Nahrungserzeugung.

20. Im Augenblick können der Umfang der Probleme und die Wirkung der Oligoelemente auf die Nahrungsproduktion nicht genau abgeschätzt werden. Zweifellos wird weitere Forschung auf diesem Gebiet zur Vertiefung von Erkenntnissen in Bezug auf pflanzliche und tierische Produkte führen, durch welche die Nahrungsmittelproduktion der Welt erheblich vergrössert wird. Hierdurch wird ein wesentlicher Beitrag für die Wohlfahrt der Menschheit geleistet.

Vorschläge für Forschungsaufgaben, die am meisten geeignet scheinen, bestehende Schwierigkeiten zu lösen

Folgende Vorschläge werden für die weitere Forschung gemacht:

Böden

- 1) Methoden zur Bestimmung der Verfügbarkeit der Oligoelemente für die Pflanzen.
- 2) Der Einfluss der organischen Bestandteile und Mikroorganismen auf den Zustand der Oligoelemente in Böden.

Pflanzen

- 3) Die physiologischen und biochemischen Funktionen der einzelnen notwendigen Oligoelemente.
- 4) Aufsuchen weiterer notwendiger Oligoelemente.
- 5) Die unterschiedliche Anreicherung der Oligoelemente in verschiedenen Pflanzenarten.
- 6) Vergleichende Physiologie niederer und höherer Pflanzen in Bezug auf die Oligoelemente.

Tiere

- 7) Die physiologischen und biochemischen Funktionen der einzelnen notwendigen Oligoelemente.
- 8) Der Bedarf verschiedener Tierarten. Die Ernährungsprobleme der Wiederkäuer verdienen besondere Beachtung.

Mensch

- 9) Die physiologische und pathologische Bedeutung der Oligoelemente.
- 10) Der Mechanismus der Aufnahme, Ausscheidung und des Transportes der Oligoelemente im Körper und in der lebenden Zelle.

CONCLUSIONS

1. All forms of life depend for their vital processes on the presence within them of a number of inorganic elements. These elements are derived from soil, water and air. In the first instance they are absorbed from these media by plants.

2. A large number of elements have been found in plants, and of these it has been established that the following are essential for all plants in varying quantities — namely: carbon, hydrogen, oxygen, nitrogen, phosphorus, sulphur, potassium, calcium, manganese, iron, magnesium, boron, copper zinc and molybdenum.

3. Recent evidence suggests that this list may be augmented by chlorine and vanadium. With further refinements in analytical and biological techniques other elements may also be shown to be necessary, but as yet the evidence is lacking. In addition, certain plants — some blue-green algae — appear to need sodium and cobalt.

4. The elements accepted as essential for plants have been grouped arbitrarily, on the basis of the amounts required, into two groups:

- a) Major or macro-nutrient elements;
- b) Micro-nutrient elements or essential oligoelements.

The following are usually regarded as essential oligoelements: iron, manganese, boron, copper, zinc and molybdenum.

5. Of the other elements found in plants that have not been proved to be indispensable for growth some have been shown to produce beneficial effects in certain plants — e.g. sodium for sugar beet. The remainder have not been shown to produce beneficial effects and some may be harmful.

6. Though plants show some degrees of differential absorption for essential elements, they do not appear to have a mechanism that will exclude non-essential elements. Both essential and non-essential elements may be absorbed in excessive amounts and produce harmful effects.

7. All animals, including man, ultimately depend on plants (and water) for their mineral requirements. The mineral requirements of animals, however, do not coincide with those of plants, since animals need in addition to the elements essential for plants iodine, fluorine, cobalt and sodium, and a requirement for boron has not so far been established.

8. Although the requirements of plants and animals do not coincide, nevertheless the plants may serve as vehicles of all the elements needed by the animals, provided the soil can supply them.

9. The requirements of higher animals, including man, differ from those of other animals mainly in that they need larger quantities of certain elements such as calcium, phosphorus, sodium, chloride and iron.

The special problems of oligoelements in plant nutrition

10. The distribution of oligoelements in soils depends on geochemical and pedological processes. Important geochemical factors are the ionic radii of the elements and other physico-chemical properties. These determine the distribution of the oligoelements in the various rocks that form the parent materials of the soils. The pedological processes are very complex and involve biological, physical and chemical factors.

11. The properties of the soil affect the availability of the elements to the plants and in this respect the degree of acidity matter, micro-organisms and drainage are of special importance.

12. Plants differ in their capacity to absorb oligoelements and in their particular requirements for them. These two facts give rise to special problems in the cultivation of different crops and their suitability for different soils. For the solution of these problems a variety of physiological and bio-chemical questions must still be answered. These include the absorption and translocation of the elements, their distribution in plant organs and their roles in the vital processes of the plant.

Problems of animal nutrition

13. In general, the quantities of oligoelements obtained by animals from plants are adequate, the most common exceptions being iodine and possibly fluorine for mammals and copper and cobalt for ruminants. The requirements for lower animals have not as yet been sufficiently investigated.

14. Special problems of toxicity to animals arise from the presence of certain oligoelements in or on plants, particularly herbage plants; the main elements known to be concerned are molybdenum (in excessive amounts), selenium, fluorine, lead and arsenic.

15. The problems of animal disorders in which oligoelements are concerned are very complicated; e.g. in the ruminants the activity of the micro-organisms of the rumen and large intestine is involved.

Problems of human physiology

16. The oligoelements play an essential part in the nutrition of man; some of them have a role in both curative and preventive medicine.

17. Some essential oligoelements, however, may accumulate in parts of the body in toxic amounts; their removal presents difficult problems in treatment.

18. Some oligoelements in toxic amounts may contaminate the food and environment of man, particularly in the conditions of modern civilization, and by so doing may injure his health.

Global aspects of oligoelements

19. Problems of oligoelements are world-wide and are of great importance to food production.

20. At the present time the magnitude of the problems and the effects of oligoelements on food production cannot be accurately assessed. There is little doubt, however, that further research in this field will lead to advances in knowledge which will enable the world's food supplies, both as regards crops and animal products, to be greatly increased and improved and thereby make a substantial contribution to the well-being of mankind.

Proposals related to research which seem the most apt to solving difficulties

The following proposals are made for further research:

Soils

- 1) Methods of measuring the availability of oligoelements for plants.
- 2) The influence of organic matters and micro-organisms on the status of oligolements in soils.

Plants

- 3) The physiological and biochemical functions of each of the essential oligoelements.
- 4) A search for further essential oligoelements.
- 5) The differential accumulation of oligoelements in plant species.
- 6) The comparative physiology of lower and higher plants in relation to oligoelements.

Animals

- 7) The physiological and biochemical functions of each of the essential oligoelements.
- 8) The requirements of different species; the nutritional problem of ruminants merits special consideration.

Man

- 9) The physiological and pathological aspects of oligoelements.
- 10) Mechanisms underlying the absorption, excretion and transport of oligoelements within the body and the living cell.

I N D E X

	PAG.
AVANT-PROPOS	VII
INTRODUCTION	XI
LA TROISIÈME SEMAINE D'ÉTUDE SUR LE PROBLÈME DES OLIGOÉLÉMENTS DANS LA VIE VÉGÉTALE ET ANIMALE	XIX
L'AUDIENCE ET LE DISCOURS DU SAINT PÈRE	XXV
RÈGLEMENT DES SEMAINES D'ÉTUDE	XXXIX

TRAVAUX SCIENTIFIQUES

[1] Origine de la notion d'oligoéléments de la matière vivante (M. G. BERTRAND)	3
[2] The geochemical and pedological distribution of trace elements in soils (R. L. MITCHELL)	39
[3] Die umforming des Mangans in Boden in Abhängigkeit von der Witterung (W. LAATSCH)	71
[4] Importance of some oligoelements in nitrogen fixing organisms (A. I. VIRTANEN)	83
[5] Manganese deficiency in relation to soil conditions (F. C. GER- RETSEN, n. I)	105
[6] Oligoelementos en las bacterias (L. VILAS)	121
[7] Le oligoéléments en relation avec la nutrition et la croissance des microorganismes, spécialement des moisissures (J. LAVOLAY)	133
[8] Physiological and biochemical aspects on microelements (H. LUN- DEGÅRDH, n. I)	171
[9] Algunos casos de deficiencias de oligoelementos en relación con los factores de formación del suelo (J. M. ALBAREDA HERRERA)	193
[10] Trace-element deficiencies in relation to soil conditions (E. G. MUL- DER)	215
[11] Boron, an essential element for azotobacter and some other micro- organisms (F. C. GERRETSEN, n. II)	231
[12] Molybdenum in the nutrition of algae with special reference to nitrogen metabolism (D. I. ARNON, n. I)	245
[13] Some effects of deficiencies, excesses and interactions of oligoele- ments on crop plants (T. WALLACE)	277

	PAG.
[14] Die bedeutung der Mikronährstoffe (Oligo-Elemente) für die Tierenährung (K. SCHARRER)	335
[15] The biochemical approach to the function of microelements in mammals with special reference to copper metabolism (L. SEEKLES)	363
[16] Reparto de algunos oligoelementos en alimentos y tejidos humanos (A. SANTOS-RUIZ)	389
[17] Some clinical aspects of the trace elements (R. A. McCANCE)	423
[18] Some functional aspects of inorganic micronutrients in plant metabolism (D. I. ARNON, n. II)	441
[19] Absorption, translocation and secretions of ions applied to the theory of salt accumulation (H. LUNDEGÅRDH, n. II)	463

DISCUSSIONS

Rapport MITCHELL	503
Rapport LAATSCH	519
Rapports VIRTANEN et GERRETSSEN, n. I	521
Rapport VILAS	531
Rapports LAVOLLAY et LUNDEGÅRDH	539
Rapport ALBAREDA-HERRERA	543
Rapports MULDER et GERRETSSEN, n. II	545
Rapport ARNON	551
Rapport WALLACE	559
Rapports BERTRAND, SCHARRER, SEEKLES et SANTOS-RUIZ	571
Discussion sur le rapport McCANCE	583
 CONCLUSIONS	 599

EXPLICATION DES NUMÉROS DES SILHOUETTES DES TABLES HORS TEXTE

- (S.P.) - LE SOUVERAIN PONTIFE
- (2) *S. E.* J. M. Albareda Herrera, *président de la Semaine d'Etude*
- (3) *Prof.* D. I. Arnon, *participant à la Semaine*
- (4) *Doct.* W. A. Aykroyd »
- (5) *Prof.* G. E. Bertrand »
- (6) *S. E.* G. B. Bonino »
- (7) *Prof.* F. C. Gerretsen »
- (8) *S. E.* F. Giordani »
- (9) *Prof.* W. Laatsch »
- (10) *Prof.* J. Lavallay »
- (11) *Prof.* H. Lundegårdh »
- (12) *Prof.* R. A. MacCance »
- (13) *Prof.* R. L. Mitchell »
- (14) *Prof.* A. Santos Ruiz »
- (15) *Prof.* L. Seekles »
- (16) *Prof.* K. Scharrer »
- (17) *Prof.* S. Tonzig »
- (18) *Prof.* L. Vilas »
- (19) *S. E.* A. I. Virtanen »
- (20) *Prof.* T. Wallace »
- (21) *S. E.* A. Gemelli, *président de l'Académie*
- (22) *S. E.* U. Amaldi, *académicien pontifical*
- (23) *S. E.* G. Armellini »
- (24) *S. E.* M. Boldrini »
- (25) *S. E.* A. Castellani »
- (26) *S. E.* G. A. Crocco »
- (27) *S. E.* G. Colonnetti »
- (28) *S. E.* D. De Blasi, *académicien pontifical*
- (29) *S. E.* T. De Karman »
- (30) *S. E.* J. García Sineriz »
- (31) *S. E.* A. Ghigi »
- (32) *S. E.* L. Lombardi »
- (33) *S. E.* M. Panetti »
- (34) *S. E.* A. Pensa »
- (35) *S. E.* U. Pierantoni »
- (36) *S. E.* E. Pistolesi »
- (37) *S. E.* F. Severi »
- (38) *S. E.* A. Tiscius »
- (39) *Rev.* P. A. Albareda, *académicien surnumér.*
- (40) *Rev.* P. D. O'Connell »
- (41) *Rev.* P. G. Junkes »
- (42) *Doct.* P. Salviucci, *chancelier de l'Académie*
- (43) *Mlle* J. Lucas, *secrétaire sténodactylographe polyglotte*
- (44) *Mlle* M. Pino »
- (45) *Mlle* G. Miceli »
- (46) *Doct.* F. Salviucci, *chargé du Service de Presse*
- (47) *M.me* L. Salviucci
- (48) *S. E.* F. Callori di Vignale, *Maitre de Chambre de Sa Sainteté*
- (49) *Mons.* M. Nasalli Rocca di Corneliano, *Camérier Secret. Participant de Sa Sainteté*
- (50) *Prof.* E. B. Chain
- (51) *Prof.* B. G. De Maria