«Известия ТСХА»,
выпуск 5, 1978 год

УДК 631.461.5:576.8.093

ИЗБИРАТЕЛЬНАЯ РАСТВОРИМОСТЬ КРАСИТЕЛЕЙ В ЛИПИДАХ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ

В. А. СИГУТА, В. К. ШИЛЬНИКОВА

(Кафедра микробиологии)

Накопление липидов обычно происходит при несбалансированном росте клетки, когда она начинает откладывать их в виде резервных соединений [33]. Фракционный состав липидов может определять степень метаболической активности клеток клубеньковых бактерий [24], а уровень липидов, в частности поли-β-оксимасляной кислоты, служит в какой-то мере критерием их жизнеспособности [18].

При выявлении липидов в клетках ризобий в большинстве работ [1, 2, 21, 25, 30] применялись суданофильные методы, основанные на косвенном определении, т. е. на распределении красителя между растворителем краски и липидами. В данном случае накопление липидами красителя, а следовательно, и «окрашивание» зависят от множества факторов: от степени растворимости красителя в растворителе и липидах; от природы красителя и агрегатного состояния окрашиваемого липида; от растворителя данного красителя, который при этом не должен растворять липиды, но обязан обеспечить высокую пенетрацию красителя, растворенного в нем, и еще от многих других факторов.

Суданофильные методы, успешно применяемые при гистологических анализах и цитологических исследованиях растительных тканей, менее эффективны при окраске клубеньковых бактерий из-за небольших размеров последних (0,5—0,9×1,2—3,0 мкм). При окрашивании ризобий не получается четкой картины расположения липидов, клетка окрашивается полностью; при дифференциации картина несколько меняется: наблюдается неравномерное окрашивание клеток, завершающееся быстрым и полным исчезновением суданофильного материала из клетки и появлением окрашенных капелек за ее пределами. Это происходит при использовании всех суданофильных методов, разница заключается только в скорости вымывания красителя из клетки.

Поскольку с помощью этих методов, кроме того, практически невозможно выявить какие-либо зависимости содержания липидов от тех или иных особенностей клеток или факторов воздействия, при определении липидного состава клубеньковых бактерий в последние годы применялись преимущественно аналитические методы оценки содержания липидов и их фракций [9, 12, 13, 17].

Вместе с тем использование различных красителей-индикаторов определенных групп липидов (нильский синий окрашивает преимущественно нейтральные и кислые липиды, судан черный В — фосфолипиды, 3,4-бенз(а)пирен действует даже на связанные липиды в клетках), а также люминесцентной микроскопии, обеспечивающей контрастное окрашивание липидов в живых нефиксированных клетках, но не применявшейся ранее для выявления липидного состава клеток клубеньковых бактерий, позволит составить достаточно полное представление о формах липидов, их локализации и уровне в клетках различных функциональных состоя-

ний и, возможно, установить зависимость между степенью эффективности клетки и содержанием в ней липидов. В литературе имеются данные о связи содержания поли-β-оксибутирата в клетках ризобий люпина и гороха со степенью их эффективности [12—15], а также и о разном соотношении насыщенных и ненасыщенных жирных кислот в клетках Rhizobium meliloti различной степени активности [9].

Нами изучалась избирательная растворимость судановых и люминесцентных красителей в липидах клубеньковых бактерий разной степени эффективности методами светооптической микроскопии. Сделана попытка обнаружить липиды одним из этих методов и установить, существует ли связь между уровнем липидов в клетках ризобий и степенью их эффективности.

Объекты и методы исследований

Для выявления липидов использовали 3- и 5-суточные (соответственно быстро- и медленнорастущие), выросшие на агаризованной минеральной среде с маннитом, глюконатом кальция и дрожжевым экстрактом [29], чистые культуры Rhizobium lupini — штаммы 400 (неэффективный), 359а (эффективный); Rhizobium leguminosarum — штаммы 224б (неэффективный), 245 (эффективный) и 96 (эффективный для кормовых бобов), Rhizobium meliloti — штамм 87 (эффективный для люцерны, но неэффективный для бобов), Rhizobium japonicum — штаммы 640 (неэффективный), 646 (эффективный). Rh. japonicum — штамм 640 получен из Института микробиологии АН Армянской ССР, остальные из коллекции культур ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии ВАСХНИЛ. Бактероиды этих культур выделяли последовательным центрифугированием жидкого содержимого корневых клубеньков соответствующих растений по методу Бергерсена [23]. Вегетационные опыты проводили в лаборатории искусственного климата и в теплице Опытной станции полеводства и льноводства ТСХА.

Сою сорта Харьковская скороспелая выращивали в пластмассовых сосудах Митчерлиха емкостью 6 кг кварцевого песка. Смесь Кнопа с 0,25 нормы азота вносили при набивке сосудов. Полив проводили по массе до 60% полной влагоемкости песка. Люпин узколистный сорта Немчиновский 846, горох карликовый Метеор и кормовые бобы Русские черные выращивали в водной культуре в стеклянных (на 1 л) сосудах (люпин и кормовые бобы по 3 растения на сосуд, горох по 5) в 10-кратной повторности на растворе солей Кнопа с 0,25 нормы азота — KNO_3 и $Ca(NO_3)_2$, pH среды 5,6. Раствор меняли каждые 5 дней. Анализировали бактероиды в период бутонизация — цветение.

Семена стерилизовали концентрированной серной кислотой [32]. Перед посевом проращенных семян их в течение 1,5 ч инокулировали водными суспензиями клеток клубеньковых бактерий соответствующих штаммов из расчета 20—30 тыс. клеток на одно семя [6], контролем служили неинокулированные растения, без заражения.

Эффективность штаммов клубеньковых бактерий в наших опытах по продуктивности развития и по содержанию в зеленой массе общего азота, определенного микрометодом Кьельдаля, соответствовала их производственной характеристике. Так, содержание общего азота в зеленой массе сои в контроле было 1,46%; при бактеризации штаммом 646 — 2,14, штаммом 640 — 1,94; у кормовых бобов в контроле — 2,15, при бактеризации штаммом 96 — 2,31; штаммом 87 — 2,20, люпина в контроле — 1,7, при бактеризации штаммом 359а — 1,9, штаммом 400 — 1,6; гороха в контроле — 2,81, при бактеризации штаммом 245а — 3,27, штаммом 224б — 8,26.

Для выявления липидов в клетках чистых культур и бактероидах из клубеньков бобовых растений использовали суданофильные (окраска

шарлахом R по Гольдману, коллоидным раствором судана черного В по Ромейсу, суданом черным В в пропиленгликоле [по 26]) и люминесцентные методы (окрашивание кофеин-бенз(а)пиреновым раствором, водным раствором фосфина 3R, раствором нильского синего).

При подготовке рабочего раствора по методу Гольдмана [16] использовали шарлах R вместо судана III. Мазки клеток фиксировали в формалиновом спирте в течение 3 мин. Препараты окрашивали горячим профильтрованным раствором шарлаха R и α-нафтола в 70° этиловом спирте в течение 3 ч при 37° в закрытых гистологических стаканах. Мы не пользовались дифференциацией в 70° этаноле, так как это приводило к значительному обесцвечиванию препаратов. Заключали мазки в глицерин-желатину.

Окраску коллоидным раствором судана [16] проводили в пробирках в течение 3 ч при 37°. Рабочим раствором служил раствор судана черного В в 40° этаноле, приготовленный по прописи [16].

Окрашивание суданом черным В, растворенным в пропиленгликоле [26], проводили на препаратах, фиксировавшихся в течение 1 ч в смеси Левицкого (50 мл 1% водного раствора хромовой кислоты смешивали с 50 мл 10% раствора формалина). После промывки водопроводной водой и дегидратации в пропиленгликоле, препараты помещали на 3 ч при 37° в раствор судана черного В в пропиленгликоле. Дифференциацию проводили в 85%, затем — в 50% растворах пропиленгликоля. После промывки теплой проточной и споласкивания теплой дистиллированной водой препараты заключали в глицерин-желатину.

Все суданофильные методы требуют доокраски цитоплазмы любым базофильным контрастирующим красителем (лихтгрюном, хризоидином, сафранином и т. д.) для определения местоположения суданофильного материала.

При использовании люминесцентных методов выявления липидов применяли водные растворы (50 мкг/мл) фосфина 3R и нильского синего, а также кофеин-ацетоновый раствор 3,4-бенз(а)пирена [22]. Живые нефиксированные клетки клубеньковых бактерий окрашивали в пробирках 10 мин при температуре воды в ультратермостате 65° или во влажных камерах на предметных стеклах в течение 60 мин при 37°.

Лучшим экстрагентом липидов из клеток принято считать смесь спирта с эфиром (1 : 3) [10]. Живые нефиксированные клетки клубеньковых бактерий обрабатывали этой смесью в течение 2 ч при 60° с обязательной сменой экстрагента каждый час. После промывки дистиллированной водой клетки заливали свежей смесью спирта с эфиром и оставляли при комнатной температуре. Эффективность смеси спирта с эфиром (1 : 3) объясняется тем, что этанол (а следовательно, и его смеси) расщепляет соединения липидов с белками [10]. Общее время экстракции составляло 24 ч.

Метод с использованием Шифф-надуксусной кислоты для выявления липидов, содержащих ненасыщенные связи [7, 10], предполагает образование окрашенного соединения альдегидных групп, полученных при окислении двойных связей ненасыщенных липидов в результате обработки препаратов надуксусной кислотой с реактивом Шиффа. Надуксусная кислота, будучи слабым окислителем, не реагирует с углеводами. Мазки клеток ризобий фиксировали в формалин-кальциевом растворе в течение 1 ч; промывали проточной водопроводной водой и окисляли в течение 5 мин 40% надуксусной кислотой и обрабатывали реактивом Шиффа [19] 30 мин. После промывки в сернистых водах и споласкивания в дистиллированной воде препараты высушивали на воздухе и заключали в каплю нефлюоресцирующего вазелинового масла.

Контролем служило блокирование двойных связей ненасыщенных липидов бромом (после этого надуксусная кислота не способна окислять их). Препараты обрабатывали бромной водой (1 мл жидкого брома,

растворенного в 40 мл дистиллированной воды) в течение 2 ч, затем тщательно промывали водопроводной водой и споласкивали 1% бисульфитом натрия. Мы, кроме того, попытались не только окрасить с помощью данного метода чистые 5-суточные культуры Rh. lupini (штаммы 359а и 400) и бактероиды из клубеньков люпина узколистного, но и количественно сравнить полученные результаты, применяя для этой цели микроскоп — цитофлюориметр.

При использовании люминесцентных методов препараты просматривали в воде или красящем растворе в люминесцентном микроскопе ЛМ-2 в УФ-лучах (окраска фосфином 3R и кофеин-безн(а)пиреновым раствором) и сине-фиолетовых (окраска нильским синим и обработка Шифф-надуксусной кислотой). Фотографировали на пленку РФ-3 (об. 90×, ап 1,30 ФМИ; ок. 5×, гомаль). Препараты, окрашенные суданами, просматривали и фотографировали на пленку Микрат-200 в микроскопе «Ampleval» (об. 100×, ап. 1,32 МИ, ок. 5×, гомаль).

Результаты и обсуждение

При использовании люминесцентных методов окраски (в УФ-лучах) наиболее полно выявлялось содержание липидов с помощью коллоидного водно-кофеинового раствора 3,4-бенз(а)пирена. Считается, что в этом случае выявляются все группы липидов, находящиеся в клетке как в свободном, так и связанном состоянии. Вместе с тем здесь визуально не

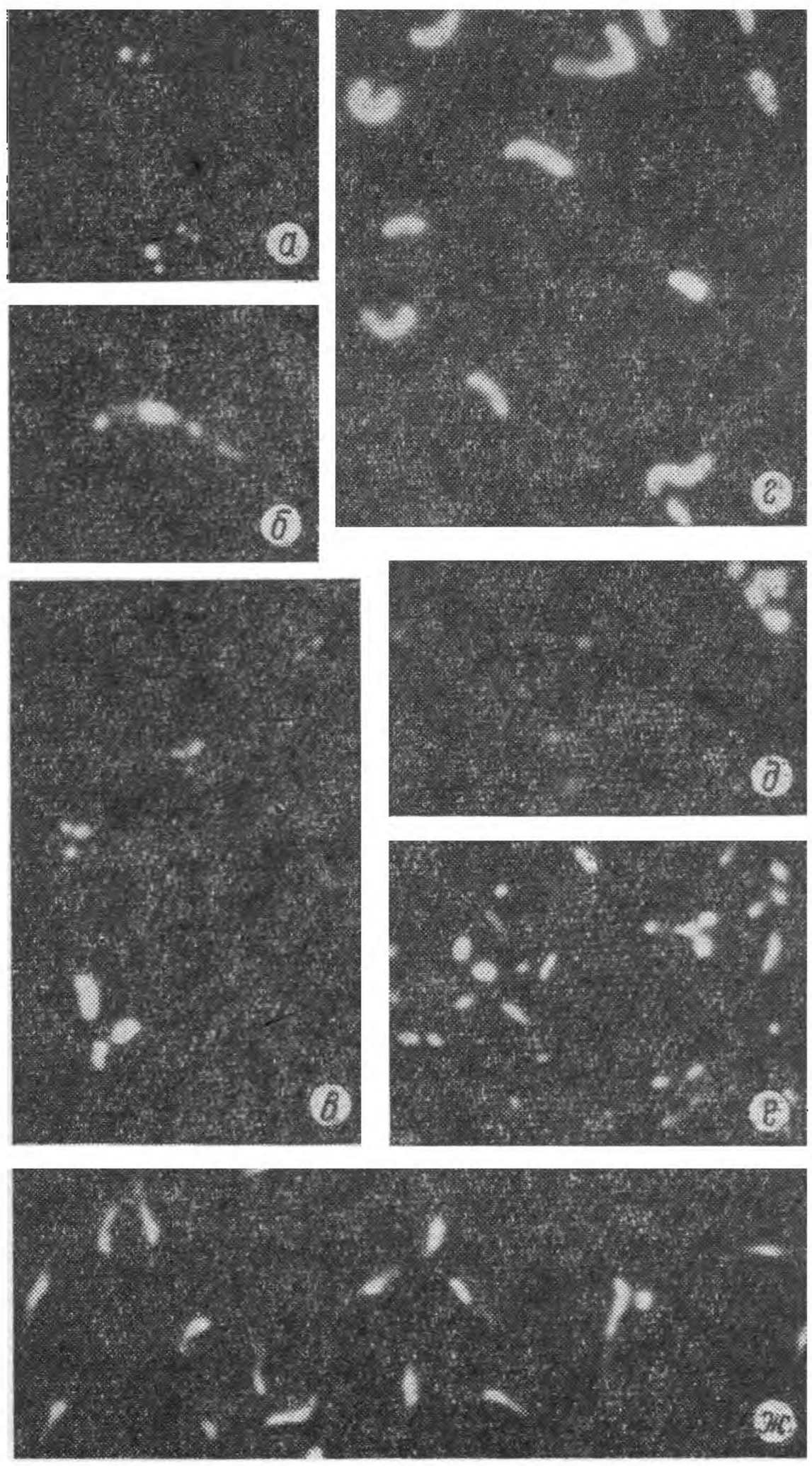

Рис. 1. Клетки клубеньковых бактерий кормовых бобов — штамм 96 (*а*, *е*), штамм 87 (*в*), люпина — штамм 359а (*б*, *г*, *ж*), штамм 400 (*д*). Обработка нильским синим (*а*, *в*, *д*), фосфином 3 R (*г*, *е*, *ж*), 3,4-бенз(а)пиреном (*б*) препаратов 3- и 5-суточных культур на среде Исварана (*а*, *г*) и препаратов из клубеньков в период бутонизация — цветение.

выявляется какое-либо повышение численности гранул липидов или яркости свечения по сравнению с наблюдаемыми при использовании других методов окрашивания. Как правило, при обработке бенз(а)пиреном на фоне диффузного серовато-голубоватого свечения цитоплазмы ярким серебристо-голубым светом выделяются четко очерченные гранулы, располагающиеся обычно по всей клетке. В клетках чистых культур ризобий не выявляются различия не только в зависимости от степени эффективности штаммов, но даже и от видовых особенностей культур. При окрашивании бенз(а)пиреном препаратов из клубеньков подобных различий также практически нет, но на фоне слабо опалесцирующей цитоплазмы значительно более четко, чем в случае чистых культур, просматриваются крупные глыбки липидов серебристого цвета (рис. 1, *б*).

Бенз(а)пирен накапливается в липидных структурах и включениях живых и фиксированных клеток [8, 22]. Добавленный в среду, он может аккумулироваться бактериальными клетками и локализоваться не только в липидных гранулах, но и в липопротеидных мембранах, в частности в мезосомах и цитоплазматической мембране [11]. В качестве контроля при такой обработке рекомендуется параллельный тест на мезосомы и другие мембранные структуры, основанный на избирательном поглощении клеткой тетрациклина [28]. В тех случаях, когда клетки ризобий и бактероиды инкубировали в течение 14 ч при 28° на качалке, заменяя маннит в среде № 5 [35] бенз(а)пиреном в количестве 10 мкг/мл, большая часть клеток выглядела подобно тем, которые выявлялись на препаратах, обработанных бенз(а)пиреном (рис. 1, *б*). Остальные клетки были аналогичны обработанным водным раствором тетрациклина (1 :50 000) по методу Дю Бая и Шовэйкра 28 (инкубация 14 ч при 28° на качалке на среде № 5 с заменой маннита на тетрациклин). Как и ранее, место локализации мезосом, выявляемые бенз(а)пиреном, соответствовали тем, которые наблюдались при обработке тетрациклином, и выглядели точечными светящимися гранулками, быстро гаснущими. Но различий в строении, величине или яркости свечения мезосом в зависимости от биологических особенностей культур нам также не удалось обнаружить.

Хорошие результаты были получены нами при использовании водного раствора фосфина 3R, дающего серебристо-белую флюоресценцию в УФ-лучах со всеми липидами, кроме жирных кислот, масел и стеринов. Водный раствор нильского синего окрашивает нейтральные липиды (жиры, воска, масла), свободные жирные кислоты и фосфолипиды. Для окрашивания клеток клубеньковых бактерий требуется довольно длительное воздействие красителя (60 мин при 37° или 10 мин при 65°). Флюорохромирование в течение 30 мин при 37° пригодно только для лиофильно высушенных клеток клубеньковых бактерий и практически не обеспечивает четкой люминесценции липидных гранул у живых клеток клубеньковых бактерий из чистых культур или клубеньков (рис. 2, *а*). Аналогичный препарат из клубеньков сои, подготовленный при более жестком режиме воздействия фосфина 3R, дает совершенно иную картину: на фоне слабо светящейся цитоплазмы яркие серебристо-белые глыбки, по 2—3 на клетку; одна из них, обычно наиболее крупная, иногда может занимать почти всю клетку (рис. 1, *г, е, ж;* 2, *б, д*). У бактероидов из клубеньков сои, бактеризованных неэффективным штаммом, свечение было значительно более интенсивным, а гранулы больше и четче выявляемыми (рис. 2, *б*), чем в случае бактеризации эффективным штаммом (рис. 2, *д*). Однако если эта закономерность четко прослеживалась для симбиотической культуры сои, то в других исследованных нами бобово-ризобиальных симбиозах она не проявлялась.

Режим обработки препаратов нильским синим также был достаточно жестким. Наблюдения в фазовом контрасте позволили выявить в клетке блестящие гранулы овальной формы, а наблюдения в люминес-

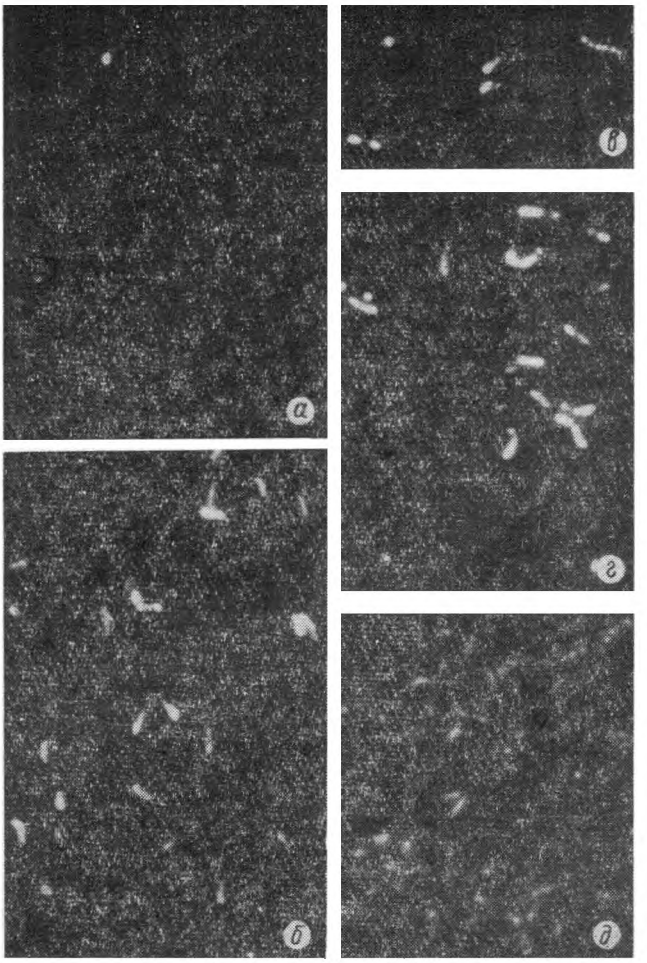

Рис. 2. Клетки клубеньковых бактерий сои — штамм 640 (*а*, *б*, *г*) и штамм 646 (*в*, *д*) — из клубеньков в период бутонизация — цветение (× 5625).

а — обработка фосфином 3R при 37° в течение 30 мин; *б*, *д* — то же при 60° 10 мин; *в* — нильским синим без экстракции; *г* — то же с экстракцией.

центном микроскопе — светящиеся красновато-оранжевые или золотисто-оранжевые. Окраска определяется избирательным накапливанием нильского синего в липидах, в основном в нейтральных жирах [3—5, 27]. Поскольку живые клетки не сразу окрашиваются нильским синим, для его восстановления нужно время [3, 27]. Практически всегда включения липидов при окрашивании нильским синим располагались по всей клетке равномерно, следуя как бы одно за другим — короткими (рис. 1, *а*) или длинными цепочками (рис. 1, *д*; 2, *в*); особенно своеобразно располагались гранулы в разветвленных бактероидах кормовых бобов (рис. 1, *в*).

Экстрагирование смесью спирта с эфиром нарушало гранулированное расположение липидов, приводя к частичному или полному заполнению клеток грубыми глыбками (рис. 2, *г*).

Анализ полученных результатов позволяет предположить, что при всех примененных методах окраски вместе с липидами выявляется полиэфир поли-β-оксибутират и количество его больше количества липидов. Об этом, в частности, свидетельствует сферическая форма выявляемых разными способами гранул, напоминающих гранулы поли-β-оксимасляной кислоты, которые описаны Люндгреном с соавторами [31].

Положительный эффект окрашивания, получаемого при термостатировании или увеличении срока воздействия красителя при снижении температуры до 37°, объясняется, очевидно, липофанерозом — разрывом при этих условиях части липидных гранул в клетке. Нарушение мем-

бран липидных гранул приводит к потере сцепления между ними, и в итоге — к потере ими формы и частичному высвобождению связанных форм липидов (фосфолипидов, жирных кислот и т. п.), что сопровождается единичным или полным заполнением клетки глыбками неправильной формы.

Доказательством того, что липидный материал клеток ризобий состоит, в основном, из поли-β-оксимасляной кислоты, является экстракция липидов живых нефиксированных клеток смесью спирта с эфиром (1 : 3). Липиды полностью не исчезают из клеток, хотя свечение становится менее ярким и быстрогаснущим, меняется и топография липидных капель. Вероятно, та незначительная часть видимых липидов, которые имеются и в клетках ризобий, экстрагируется из них, а цитоплазматические гранулы поли-β-оксимасляной кислоты, не растворяющиеся в эфире и спирте, окруженные двойными мембранами и тесно связанные с цитоплазмой [34], разрушаются, так как спирт расщепляет соединения липидов с белками [11] и полимер, растекаясь, «замазывает» всю клетку. Несомненно, изменяется и физико-химическое состояние поли-β-оксибутирата, отчего свечение становится или сероватым (фосфин 3R и 3,4-бенз(а)пирен) или желтовато-зеленым (нильский синий) и быстрогаснущим.

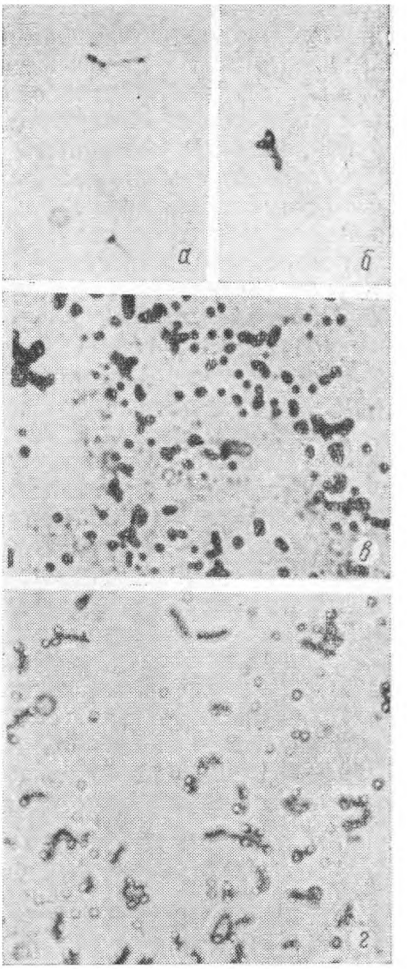

Рис. 3. Клетки клубеньковых бактерий Rhizobium leguminosarum штамм 87 (*а*, *б*), штамм 224б (*в*, *г*) (×6250). Обработка шарлаком R по методу Гольдмана (*а*, *б*) и суданом черным В в пропиленгликоле (*г*) препаратов из клубеньков бобов Русские черные в период бутонизация — цветение (*а*, *б*) и препарата 3-суточной культуры на среде Исварана (*в*, *г*).

Шифф-положительное вещество, полученное после окраски реактивом Шиффа препаратов, окисленных 40% раствором надуксусной кислоты, имело неяркое, но четкое свечение зеленовато-желтоватого цвета почти по всей клетке как в чистых культурах Rh. lupini так и в бактероидах из клубеньков люпина узколистного, инфицированного штаммами 359а и 400.

В препаратах, предварительно бромированных, свечение отсутствовало. Вероятно, окраска характерна для липидов с непредельными связями. Собственной люминесценции у клеток ризобий практически не было. При сравнении интенсивности флюоресценции окрашенных препаратов ризобий на микроскопе — цитофлюориметре (среднее количество Шифф-положительного вещества на 1 клетку из 250—300 измерений, в условных единицах) было установлено, что чистые культуры неэффективного штамма 400 содержат липидов с непредельными связями в 6 раз больше (2,5), чем чистые культуры эффективного штамма 359а (0,4). Уровень липидов в бактероидах эффективного штамма 359а возрастает в 10 раз (4,1), тогда как в бактероидах неэффективного штамма 400 он несколько снижается (2,2) по сравнению с чистыми культурами (2,5). Эти данные согласуются с результатами опытов Л. Д. Петренко [9], по-

казавшей, что у эффективного по фиксации азота штамма Rh. meliloti преобладают ненасыщенные жирные кислоты, а отношение насыщенных жирных кислот к ненасыщенным составляет для эффективного штамма 1,2 : 1, а для неэффективного — 2,8 : 1. Поскольку липиды с ненасыщенными связями определяют физико-химические свойства мембран, их функциональная активность и уровень, очевидно, в определенной степени отражают степень азотфиксирующей способности клетки.

Примененные в качестве контрольных суданофильные методы окрашивания липидов с последующим просмотром окрашенных клеток в светлопольном микроскопе значительно уступали по результатам выше рассмотренным люминесцентным методам. Метод Гольдмана оказался, на наш взгляд, одним из лучших, поскольку обеспечивал наиболее четкое распределение липидных гранул в клетке (рис. 3, *а, б*). Обработки суданом черным В в пропиленгликоле и коллоидным раствором судана черного В по Ромейсу давали примерно одинаковые результаты (рис. 3, *в, г*). Клетки выглядели грубыми однородными густо окрашенными глыбами, при дифференцировке избытка судана спиртами часть красителя диффундировала в среду, скапливаясь в виде окрашенных капелек вокруг клетки (рис. 3, *г*).

Анализируя избирательную растворимость красителей в липидах клубеньковых бактерий, следует подчеркнуть, что полиэфир поли-β-оксимасляной кислоты, занимающий по физиологическим свойствам промежуточное положение между липидами и углеводами [15], обладает четко выраженной суданофилией — свойством, типичным для всех свободных липидов. Аналогично ведут себя люминесцентные красители: нильский синий, фосфин 3R, 3,4-бенз(а)пирен, которые пенетрируют из растворов не только в липиды, но и в гранулы поли-β-оксимасляной кислоты. «Окрашивание» полиэфира осуществляется благодаря липофанерозу, нарушающему стабильность связей в гранулах этого полимера.

Выводы

1. Применительно к клеткам клубеньковых бактерий рассмотрена способность судановых и люминесцентных красителей растворяться в липидах. В тех и других случаях одновременно со свободными липидами выявляется полиэфир — поли-β-оксимасляная кислота.

2. По сравнению с суданами люминесцентные красители обеспечивают более четкую локализацию и яркое изображение липидов и поли-β-оксимасляной кислоты в живых нефиксированных клетках клубеньковых бактерий. Лучшими для выявления липидного состава, характеризующего функциональное состояние клетки клубеньковых бактерий, оказались кофеин-ацетоновый раствор 3,4-бенз(а)пирена и водный раствор фосфина 3R.

3. Закономерной связи между содержанием липидов и степенью эффективности клубеньковых бактерий не установлено. Вместе с тем данные об уровне липидов с ненасыщенными связями, полученные цитохимическим методом Шифф-надуксусная кислота, дают основание полагать, что цитофлюориметрия может оказаться перспективной для оценки степени эффективности клубеньковых бактерий и использоваться в дальнейшем для предварительного отбора эффективных штаммов ризобий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аввакумова Е. Н., Шамцян М. Г. Цитохимические особенности клубеньковых бактерий сои. В сб.: Вопросы микробиол. Вып. IV (XIV). Изд-во АН АрмССР, Ереван, 1969, с. 202—209. — 2. Аввакумова Е. Н., Шамцян М. Г., Пилосян В. С., Овсепян М. В. Цитохимические исследова-

ния клубеньковых бактерий в связи с эффективностью симбиотической азотфиксации. В сб.: Вопросы микробиол. Вып. V (XVI). Изд-во АН АрмССР, Ереван, 1973, с. 62—72. — 3. Алексеева В. М. О так называемом липофанерозе при облучении клеток. «Журн. общей биол.», 1961, т. 22, № 2, с. 146—149. — 4. Алексеева В. М., Каминир Л. Б. Флуориметрический метод определения количества липидов в клетках дрожжевых организмов. «Цитология», 1965, т. 7, № 6, с. 776—779. — 5. Алексеева В. М. Люминесцентно-микроскопические исследования жировых и липоидных веществ. «Изв. АН СССР», сер. биол., 1967, № 4, с. 575—582. — 6. Калниньш А. Д., Леймане И. Я. Приживаемость и эффективность нитрагинных рас в зависимости от примененной дозы инокулята. В сб.: Микроорганизмы и растения. Вып. V, № 3. «Зинатне», 1973, с. 3—15. — 7. Кисели Д. Практическая микротехника и гистохимия. Будапешт, Изд-во АН Венгрии, 1962. — 8. Мейсель М. Н., Заварзина Н. Б. Действие канцерогенных углеводородов на микробную клетку. «Журн. общей биол.», 1947, т. 8, № 1, с. 37—51. — 9. Петренко Л. Д. Липиды клубеньковых бактерий. В сб.: Микробы и их метаболиты. Минск, «Наука и техника», 1974, с. 40—44. — 10. Пирс Э. Гистохимия. М., ИЛ, 1962. — 11. Поглазова М. Н., Мейсель М. Н. Локализация бенз(а)пирена в бактериальных клетках. «Микробиология», 1971, т. XL, вып. 6, с. 1050—1053. — 12. Романов В. И., Юшкова Л. А., Кретович В. Л. Связь между содержанием поли-β-оксимасляной кислоты в бактероидах Rhizobium lupini, их дыханием и азотфиксацией. «Докл. АН СССР», 1974, т. 216, № 3, с. 694—697. — 13. Романов В. И., Юшкова Л. А., Кретович В. Л. Синтез и распад поли-β-оксимасляной кислоты у Rhizobium lupini. «Микробиология», 1975, вып. X, IV, № 5, с. 820—824. — 14. Романов В. И., Шрамко В. И., Федулова Н. Г., Кретович В. Л. Азотфиксация и содержание поли-β-оксимасляной кислоты в бактериодах Rhizobium leguminosarum и Rhizobium lupini. «Физиология растений», 1976, т. 23, № 6, с. 1149—1152. — 15. Романов В. И. Физиологическая роль и метаболизм поли-β-оксимасляной кислоты у микроорганизмов. «Успехи биол. химии», 1977, т. 18, с. 211—230. — 16. Ромейс Б. Микроскопическая техника. М., ИЛ, 1954. — 17. Фаизова Г. К., Бородулина Ю. С., Самсонова С. П. Липиды клубеньковых бактерий Rhizobium leguminosarum. «Микробиология», 1971, т. X, вып. 3, с. 471—474. — 18. Федулова Н. Г., Сигута В. А., Романов В. И., Шильникова В. К. Содержание поли-β-оксибутирата в клубеньковых бактериях люпина в связи с их выживаемостью. Тез. докл. республик. конференции «Микробиологические процессы в почвах и урожайность с.-х. культур». Каунас, 1978, с. 358. — 19. Хачатуров Е. Н., Смирнова Е. А. Применение риванола-SO_2 для цитофлуориметрии ДНК. «Изв. АН СССР», сер. биол., 1966, № 6, с. 900—905. — 20. Шильникова В. К., Поглазова М. Н., Агаджанян К. Г. Дегидрогеназная активность клубеньковых бактерий в условиях симбиоза. «Изв. ТСХА», 1966, вып. 5, с. 41—44. — 21. Шильникова В. К. Анатомия и закономерности развития клубеньковых бактерий в симбиозе с растениями и в условиях искусственной питательной среды. Автореф. докт. дис. М., 1971. — 22. Berg N. O. "Acta pathol. et microbiol. Scand. Suppl.", 1951, vol. 90, N 1, p. 5—192. — 23. Bergersen F. J. "Biochim. Biophys. Acta", 1966, vol. 130, p. 304—312. — 24. Bunn C. R., Elkan G. H. "Canad. J. Microbiol.", 1971, vol. 17, N 2, p. 291—295. — 25. Burdon K. L. "J. Bacteriol.", 1946, vol. 52, N 6, p. 665—678. — 26. Chiffele T. L., Putt E. A. "Stain Technol.", 1951, vol. 2, p. 51—56. — 27. Drawert H., Gutz H. "Naturwissenschaften", 1953, Bd. 40, S. 512—514. — 28. Du Buy H. G., Showacre J. L. "Sci.", 1961, vol. 133, N 3447, p. 196—197. — 29. Iswaran V., Sen Abhiswar, Apte R. "Zbl. Bakteriol. Parasitenk., Infektionskrankh. und Hyg.", 1973, Abt. 2, Bd 128, N 1—2, S. 23—24. — 30. Lewis J. M. "J. Bacteriol.", 1938, vol. 35, N 6, p. 573—587. — 31. Lundgren D. G., Plister R. M., Merrick J. M. "J. gen. Microbiol.", 1964, vol. 34, p. 441—445. — 32. Nutman P. S. "Nature", 1945, vol. CLVI, p. 20. — 33. Schlegel H. G., Gottschalk G., von Bartha R. "Nature", 1961, vol. 191, p. 463—465. — 34. Vincent J. M. "J. gen. Microbiol.", 1962, vol. 29, N 3, p. 551—555. — 35. Van Egeraat A. W. Pea-root Exudates and their Influence upon Root-Nodule Bacteria. Wageningon-Press., 1972.

Статья поступила 29 мая 1978 г.

SUMMARY

Nodule bacteria cells of different efficiency and bacteroids from the nodules of lupine, soybeans, fodder beans and peas were treated with Sudan and luminescent dyes. Sudanophilia of rhizobia cells was influenced not only by the content of free lipids, but by the content of polyether of poly-β-oxybutyric acid as well. Luminescent dyes allowed to obtain more accurate localization and bright picture of free lipids and granules of poly-β-oxybutyric acid in living (non-fixed) cells. Caffeine-acetone solution of 3.4-benz(a)pyrene and water solution of phosphine 3 R proved to be the best for determining lipid composition characterizing the functional condition of a nodule bacteria cell.