

М. В. ИВАНОВ, А. И. НЕСТЕРОВ, О. Г. ШИРОКОВ, Э. А. ОРЛОВА

ПОВРЕЖДЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПРИ ФИЛЬТРАЦИИ ПОД ДАВЛЕНИЕМ ЧЕРЕЗ КАМЕННЫЙ УГОЛЬ

(Представлено академиком А. А. Имшенецким 21 V 1969)

Экспериментальное изучение проницаемости горных пород для клеток микроорганизмов представляет несомненный интерес как для теоретических работ по геологической микробиологии, так и для практического использования геохимической деятельности микроорганизмов. Интенсификация процесса подземного выщелачивания сульфидных руд (¹), применение микроорганизмов для повышения добычи нефти (^{2, 3}) и другие методы воздействия на микробиологические процессы в месторождениях по-

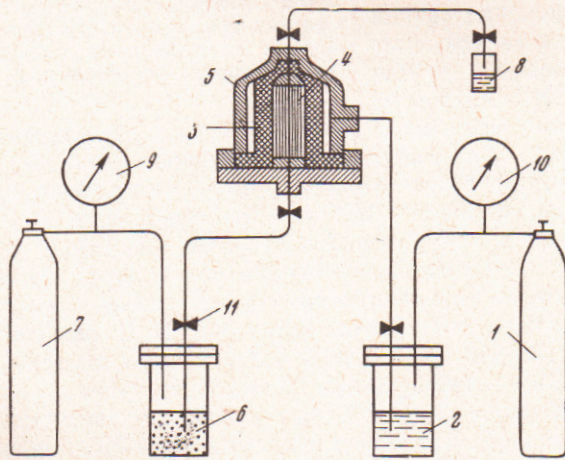


Рис. 1. Принципиальная схема фильтрационного стенда. 1—3 — система гидроотжима: 1 — баллон со сжатым воздухом, 2 — сосуд с водой, 3 — резиновый колпак, обжимающий керн 4; 5 — кернодержатель; 6 — стакан с бактериальной суспензией, фильтрующей через керн под давлением из баллона 7; 8 — приемник фильтрата; 9, 10 — манометры системы фильтрации и гидроотжима соответственно; 11 — вентили высокого давления

лезных ископаемых основаны на введении культур микроорганизмов в микропористую среду горных пород.

Опыты Э. С. Смирновой (⁴) показали, что клетки *Bact. prodigiosum*, добавленные в буровой раствор, проникают в породы различного состава на глубину до 75 мм. По данным А. А. Имшенецкого и С. С. Абызова (⁵), почвенные микроорганизмы проходят в простерилизованные образцы горных пород до глубины 50 мм при атмосферном давлении. Проникновение клеток *Serratia marcescens*, меченных P^{32} , в образцы вакуумированного керна изучали на специальной установке канадские исследователи (^{6, 7}). Важно подчеркнуть, что во всех этих экспериментах в породах были обнаружены жизнеспособные клетки бактерий.

В Московском горном институте разрабатывается метод микробиологического окисления метана в угольных пластах путем введения туда культуры метанооксиляющих бактерий (8). В связи с этим нами была поставлена задача исследовать морфологическое состояние бактерий, фильтрующихся под давлением через образцы каменного угля на специальном стенде (рис. 1).

Накопительную культуру метанооксиляющих бактерий, состоявшую главным образом из представителей родов *Mycobacterium* и *Pseudomonas*, выращивали в течение 3 суток на среде Таусона для углеводородоксиляющих бактерий в атмосфере метана и воздуха (1 : 2) на качалке при температуре 28—30°.

Трехсуточную культуру, разведенную до плотности 1—2·10⁶ кл/мл, помещали в стальной стакан, из которого ее впоследствии вытесняли сжатым воздухом, подаваемым из баллона под давлением 50—80 атм. (см. рис. 1).

В кернодержателе фильтрационного стенда закрепляли керн угля диаметром 60 мм и высотой 80 мм, который подвергали гидрообжигу для имитации горного давления (70—100 атм.), после чего через керн фильтровали суспензию бактерий. В фильтрате подсчитывали общее количество бактериальных клеток методом прямого счета (9) и проводили электронномикроскопические исследования.

Пробы микробных суспензий для электронномикроскопических наблюдений во всех вариантах опытов немедленно после отбора фиксировали формалином. Время между отбором проб и приготовлением препаратов для микроскопирования составляло 1—2 суток.

Препараты негативно контрастировали ФВК (10) или уранил-ацетатом и просматривали под микроскопом JEM-7 при ускоряющем напряжении 80 кВ и инструментальном увеличении 13—45 000×.

Количественный учет бактериальных клеток в суспензии, профильтрованной через образцы угля, показал, что наблюдается существенное уменьшение числа клеток при фильтрации. Как видно из рис. 2, даже максимальное количество клеток в фильтрате не превышает 60% от исходной суспензии, хотя, как показывают высевы на МПА и на жидкие среды, клетки в фильтрате остаются жизнеспособными и активно окисляют метан.

Причин снижения количества клеток при фильтрации может быть несколько: фильтрующий эффект микропористого керна и адсорбция клеток на угле, механическое разрушение части клеток при продавливании их через уголь и разрыв бактериальных клеток при резком перепаде давлений.

Поскольку фильтрационные свойства угля в процессе эксперимента не ухудшаются (см. рис. 2), мы не можем считать, что механическая задержка клеток в порах угля играет существенную роль в уменьшении числа клеток в фильтрате.

Вместе с тем, при электронномикроскопических исследованиях фильтратов было обнаружено, что в них, наряду с целыми клетками, в большом количестве встречаются поврежденные бактериальные клетки (рис. 3 а, б, в)

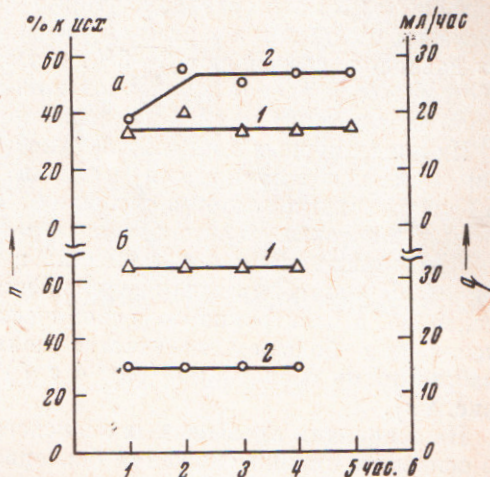


Рис. 2. Зависимость объемной скорости фильтрации — q (1) и количества клеток бактерий в профильтрованной суспензии — n (2) от времени. а — давление фильтрации 80 атм., давление обжима 100 атм.; б — давление фильтрации 50 атм., давление обжима 70 атм.

и более или менее крупные обрывки бактерий и их оболочек (рис. 3г, д). Поврежденные бактериальные клетки были обнаружены также и в препаратах, приготовленных из верхней, средней и нижней частей размельченного зерна, через который фильтровалась бактериальная суспензия (рис. 3 е, ж, з). Оценка доли поврежденных и целых клеток в препаратах затруднительна, однако можно сказать, что в большинстве исследованных препаратов они находились примерно в равных количествах; кроме того, в препаратах наблюдается много мелких клеточных обрывков и зернистого материала.

В препаратах контрольной бактериальной суспензии, не подвергавшейся давлению, также встречаются поврежденные клетки, однако количество их невелико: число целых клеток (рис. 4 е, ж) составляет 95—98% от всего клеточного материала. Аналогичная картина была получена при изучении препаратов из сосуда, где бактерии находились под давлением в течение всего опыта: и в этом случае почти все клетки остаются целыми (рис. 4а, б). Поврежденные клетки в этом случае, как и в контрольной суспензии, т. е. без давления, составляют 3—5%. Отсюда можно заключить, что само по себе высокое давление в условиях наших экспериментов не является причиной повреждения и разрушения бактериальных клеток.

Из литературных данных известно^(11, 12), что резкое изменение давления (взрывная декомпрессия) приводит к разрушению значительного числа бактериальных клеток в суспензии. Этот принцип используется, в частности, в некоторых системах дезинтеграторов типа френч-пресса.

При резком снижении давления в стакане фильтрационного стекла (рис. 1, б) мы обнаружили уменьшение числа бактериальных клеток в суспензии, а электронномикроскопические исследования показали, что в суспензии в большом количестве появляются поврежденные клетки с разорванными оболочками (рис. 4 г, д) и обрывки клеток и их оболочек (рис. 4 е).

На основании проведенных исследований можно утверждать, что одной из основных причин снижения бактериальных клеток при их фильтрации через каменный уголь является декомпрессионное разрушение клеточных оболочек. Этот вывод подтверждается нашими опытами по взрывной декомпрессии и характером повреждений бактериальных клеток, наблюдаемым в электронномикроскопических препаратах.

Оценить другие причины снижения числа бактериальных клеток — фильтрующий эффект угля и механическое разрушение клеток при их продавливании через уголь — пока не представляется возможным. В этом направлении необходимы дальнейшие исследования.

Институт микробиологии
Академии наук СССР
Москва

Поступило
30 V 1969

Московский горный институт

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. И. Голомзик, Г. И. Каравайко и др., Бюлл. Цветная металлургия, № 16, 20 (1965). ² С. И. Кузнецов, М. В. Иванов, Н. Н. Ляликова, Введение в геологическую микробиологию, Изд. АН СССР, 1962. ³ J. Karaskiewicz, Vorträge III Intern. wiss. Konferenz Geochem. Microbiol. u. Erdöl, Budapest, 1963, p. 566. ⁴ З. С. Смирнова, Микробиол., 26, № 6, 745 (1957). ⁵ S. S. Abyzov, A. A. Imshenetsky, Life Sciences and Space Research, 3, Amsterdam, 1965, p. 155. ⁶ G. E. Myers, R. G. L. McGready, Canad. J. Microbiol., 12, № 3, 477 (1966). ⁷ G. E. Myers, W. D. Samiroden, Producers Monthly, 31, № 4, 22 (1967). ⁸ А. И. Ксенофонтова, А. С. Бурчаков и др., Авт. свид. СССР № 188442, 1966; Изобретения, промышленные образцы, товарные знаки, № 22, 21 (1966). ⁹ С. И. Кузнецов, В. М. Романенко, Микробиол. изучение внутренних водоемов, Изд. АН СССР, 1963. ¹⁰ H. A. Bloden, M. U. Nylen, E. J. Fitzgerald, J. Bacteriol., 88, № 3, 763 (1964). ¹¹ D. Fraser, Nature, 167, 33 (1951). ¹² J. W. Foster, R. M. Cowun, T. A. Maag, J. Bacteriol., 83, 330 (1962).

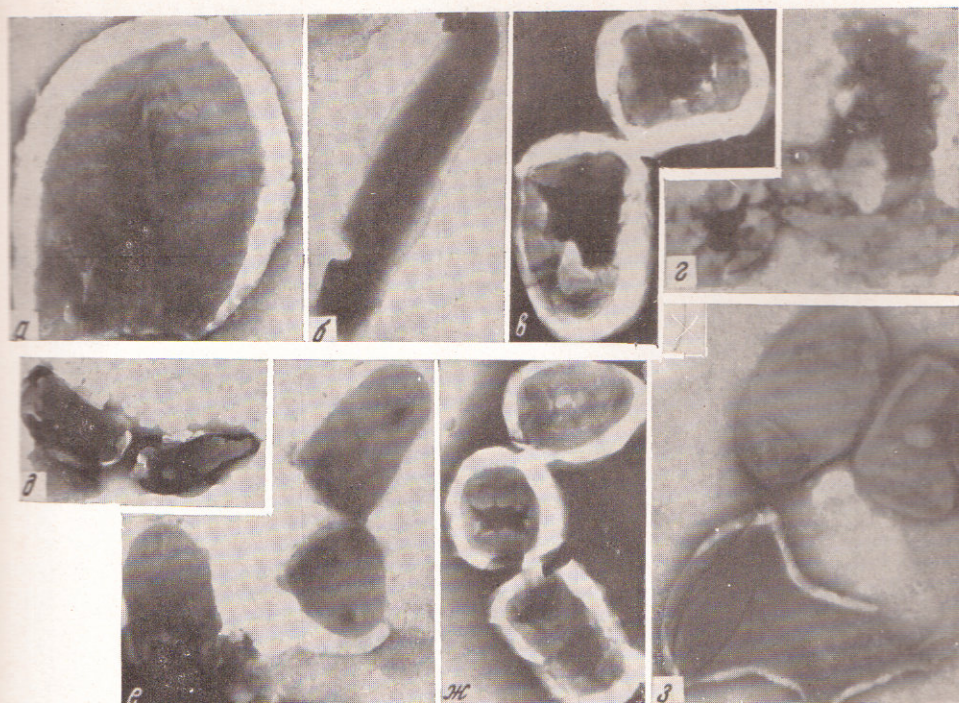


Рис. 3. Различные формы повреждения клеток бактерий, профильтрованных через угольный керн (а—д), и поврежденные клетки из различных участков угольного керна (е—з). а—45 000 X, б—17 500 X, в—30 000 X, г—13 000 X, д—30 000 X, е—20 000 X, ж—20 000 X, з—25 000 X

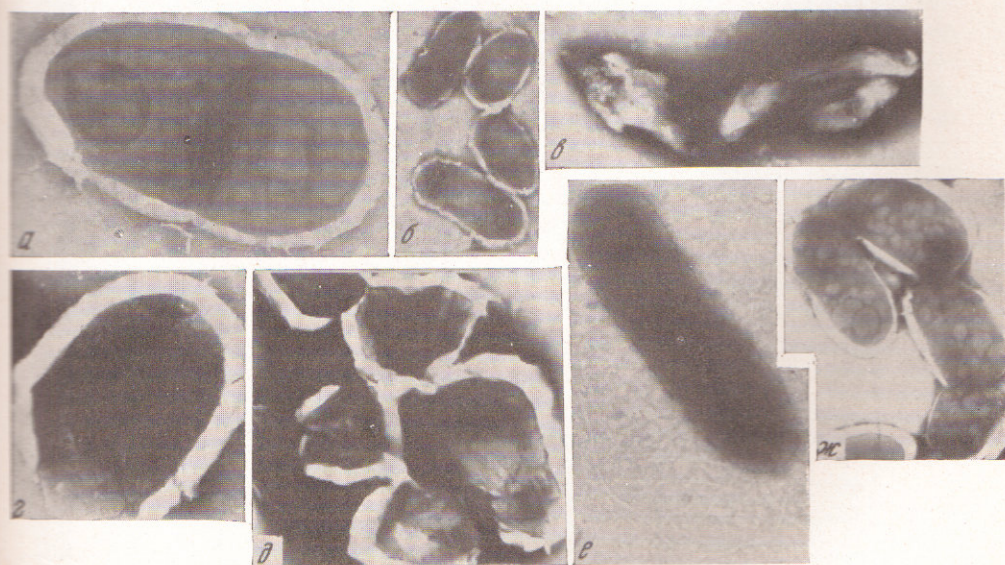


Рис. 4. Бактериальные клетки из стакана высокого давления (а, б) и различный характер повреждения клеток при взрывной декомпрессии (в—д). е, ж — контрольная суспензия бактерий. а—35 000 X, б—13 000 X, в—24 000 X, г—35 000 X, д, е—20 000 X, ж—15 000 X