

УДК 669.213.6

*Б. К. КЕНЖАЛИЕВ, М. М. ИГНАТЬЕВ, Г. В. СЕМЕНЧЕНКО, В. Л. ЗАЙЦЕВ, А. К. КОЙЖАНОВА*

## **ИССЛЕДОВАНИЕ ПОВЕРХНОСТНЫХ СТРУКТУР БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК «Т-10 ИМИО» В ЩЕЛОЧНО-ЦИАНИСТЫХ РАСТВОРАХ МЕТАЛЛОВ**

Для уточнения роли бактерий «Т-10 ИМИО» в процессах растворения благородных и цветных металлов и разработки на этой основе эффективной технологии были проведены исследования поверхностных структур бактерий в процессе биохимического выщелачивания акбакайского концентрата и при растворении золота в щелочно-цианистом бактериальном растворе. Дополнительные комплексы металлов с метаболитами бактерий, как показали морфологические исследования, не фиксируются на оболочке или мембрanaх клеток и по этой причине могут быть легко удалены из раствора подходящим сорбентом (активированным углем).

Известно, что отличительный признак микроорганизма, отраженный в самом его названии, – крайне малые размеры отдельной особи. Эти малые размеры не только дали основание для отделения микроорганизма от животных и растений, ими определяются морфология, активность микроорганизмов, гибкость их обмена веществ и экология. Диаметр большинства бактерий не превышает 0,001 мм. Объем бактериальной клетки примерно 1 мкм<sup>3</sup>. Столь большое отношение поверхности к объему клетки имеет своим следствием весьма активный обмен с окружающей средой и обуславливает также высокую интенсивность метаболизма микроорганизма. Правило Ругнера (1893 г.) гласит, что интенсивность обмена веществ у животных в состоянии покоя пропорционально не массе, а поверхности тела. Если это правило отнести к отдельным клеткам, то можно ожидать, что интенсивность обмена веществ у тех и других будет различаться на несколько порядков. Литературные данные о потреблении кислорода подтверждают зависимость между интенсивностью обмена веществ и размером клеток. Соответственно высокими оказываются и темпы роста микроорганизма. Микроорганизмам также свойственна метаболическая изменчивость. Бактериям высокая способность к адаптации совершенно необходима из-за их малой величины, клетки их способны вместить лишь несколько сот тысяч белковых молекул. Поэтому те ферменты, в которых в данных условиях нет необходимости, не сохраняются. Определенные ферменты образуются клеткой только по мере надобности, при появлении в среде соответствующих субстратов. На долю этих инду-

цицельных ферментов может приходиться до 10 % всего белка клетки. Регуляторные клеточные механизмы играют у микроорганизмов значительно большую роль, чем у других живых существ. Малые размеры микроорганизмов имеют также экологическое значение. Благодаря малому весу они легко переносятся потоками воздуха. Поэтому в естественных условиях ни одно место и ни один субстрат не требуют инокуляции – микроорганизмы заселяют его сами.

Для уточнения роли бактерий «Т-10 ИМИО» в процессах растворения благородных и цветных металлов и разработки на этой основе эффективной технологии были проведены исследования поверхностных структур бактерий в процессе биохимического выщелачивания акбакайского концентрата и при растворении золота в щелочно-цианистом бактериальном растворе. Морфологические исследования бактерий в реакционной среде могут дать ценную информацию о жизнедеятельности и активности культуры. При культивировании микроорганизмов происходит изменение размеров клеток и их органелл в ходе нескольких циклов, что обуславливает количественные изменения в популяции клеток в производственных процессах с применением микроорганизмов. Наличие тех или иных поверхностных структур, а также изменения морфологии клеток (наличие переживающих форм, потеря специфических органелл, ответственных за движение клеток) могут свидетельствовать либо о приспособительных реакциях бактерий, либо о вырождении популяции. В последнем случае производственная культура может потерять ценные для технологического процесса свойства.

Для морфологических исследований бактерий «Т-10 ИМиО» были проведены подготовительные работы. Были запланированы и проведены эксперименты по исследованию взаимодействия золота с поверхностными структурами гетеротрофных бактерий в режиме свободного растворения в щелочно-цианидном растворе, а также в процессе биохимического сорбционного выщелачивания акбакайского флотационного концентрата. В этих целях была собрана установка для исследования бактериальных систем растворения-биосорбции золота в модельных системах, изготовлен вращающийся диск с золотым электродом, собраны и обобщены литературные данные по методическим приемам работы с электродом типа вращающегося диска в различных режимах растворения металлов. Был выбран метод свободного растворения золота в бактериально-цианистом растворе при определенных параметрах вращения диска и насыщения среды кислородом. Проведены эксперименты по растворению золота методом вращающегося диска с отбором проб через определенные промежутки времени для оценки поверхностных структур бактерий.

Отобранные образцы фиксировали, наносили на медные подложки и анализировали в электронном микроскопе для выяснения изменений морфологии и поверхностных структур клеток в процессе растворения золота в щелочно-цианистом биохимическом растворе. В результате морфологических исследований поверхностных структур были уточнены некоторые вопросы систематической принадлежности бактерий.

По международной классификации *Pseudomonas aureofaciens* относят к группе *Proteobacteria*, классу *Gammaprotobacteria*, семейству *Pseudomonadaceae*, роду *Pseudomonas*. Род *Pseudomonas*, по данным литературы, включает более ста видов не образующих споры грамотрицательных бактерий, имеющих форму полочек размером 0,5–0,8×1,0–3,0 мкм. Имеются сведения, что в популяции бактерий *Pseudomonas* также содержатся овальные и круглые формы. Нет единого мнения о количестве жгутиков у бактерий этого рода и их расположении. Одни авторы считают, что бактерии *Pseudomonas* имеют один полярный жгутик, другие – что бактерии имеют от 3 до 7 жгутиков, расположенных пучком на одном полюсе. Длина жгутиков 5–7 мкм, диаметр 20 нм. Размножение осуществляется путем бинарного деления

клетки. Внешняя оболочка клетки имеет рельефную или гладкую поверхность

При исследовании негативно окрашенных препаратов из образцов 1 и 2 «Т-10 ИМиО» обнаружены как одиночные клетки, так и их небольшие скопления, в популяции наблюдались палочковидные, овальные и округлые формы бактерий, а также бактерии на разных стадиях деления. В образцах не установлено других форм, а также спорообразующих бактерий. При анализе структуры внешней оболочки бактерий в исследованных пробах выявлено, что основная масса клеток имеет бугристо-складчатый и шероховато-зернистый рельеф (рис. 1).

При исследовании поврежденных бактерий, а также бактерий, не содержащих внутренних структурных компонентов цитоплазмы и поверхностного слоя оболочки, установлено, что капсула имеет вид упорядоченной решетки с частотой полос 5–8 нм и многочисленными порами по полюсам. Внешний диаметр пор (отверстий) 15–18 нм. На поверхности мембранны наблюдаются выросты (пили) высотой 45–60 нм и диаметром 5–6 нм. При детальном анализе поврежденных клеток кроме поверхностной выявлялась внутренняя мембрана, содержащая органеллы цитоплазмы в виде округлых электронно-плотных включений (тел), различного размера везикул, гранулярного материала мембранных структур (рис. 2). Аналогичные плотные включения постоянно присутствовали в цитоплазме нативных клеток.

При анализе поверхностных структур интактных бактерий жгутики обнаружены только на одном из полюсов, одиночно или пучком из 2–3 штук. Диаметр жгутиков 18–20 нм.

Сравнительный анализ размеров, морфологии и тонкой структуры вариантов клеток «Т-10 ИМиО» показал, что они не имеют существенных отличий в морфологии и тонкой структуре. Основная масса клеток в популяциях вариантов представлены палочковидными формами, овальных и коккообразных форм не более 5–10 %. В популяциях обоих вариантов превалируют клетки с грубым рельефом внешней поверхности. По данным литературы грубый рельеф поверхности наблюдается у клеток на поздних сроках культивирования, тогда как для растущих характеристика почти гладкая поверхность. Исследования тонкой структуры негативно окрашенных клеток

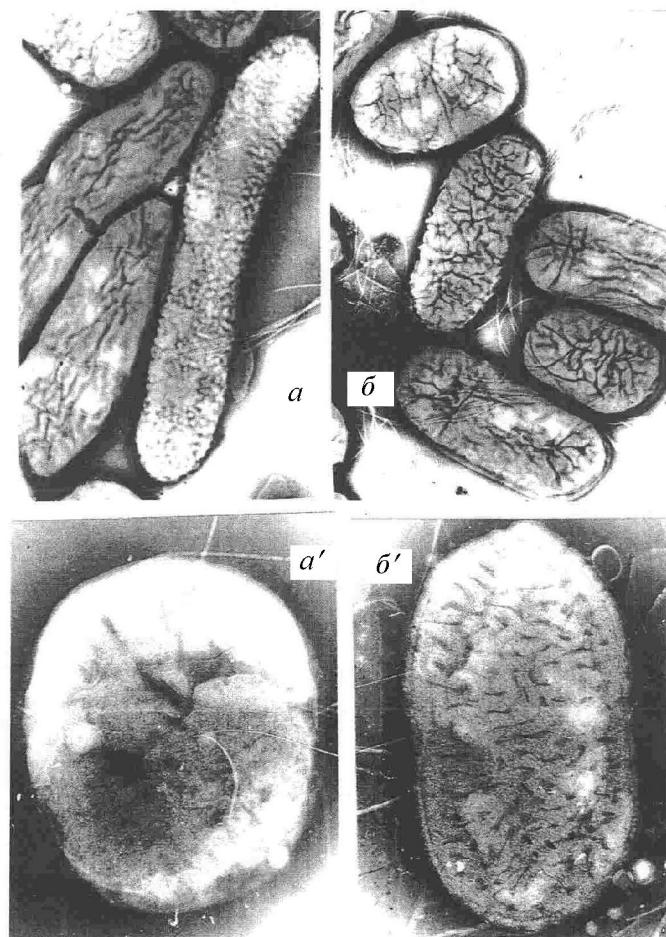


Рис. 1. Структура поверхности оболочки бактерий «Т-10 ИМиО» из образцов 1 и 2:  
а, а' – шероховато-зернистая поверхность;  
б, б' – бугристо-складчатая поверхность.

Ув. х 28 000, 65 000

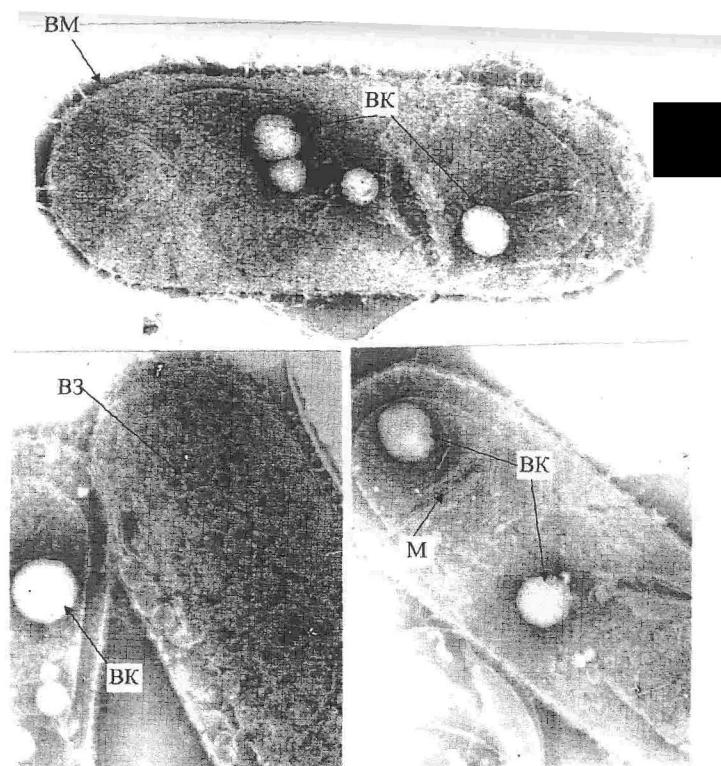


Рис. 2. Внутренние структурные элементы поврежденных клеток «Т-10 ИМиО»:  
ВМ – оболочка; ВК – окружные включения;  
М – мембранные структуры; ВЗ – везикулы.

Ув. х 56 000

показали, что отдельные ее элементы просматривается лишь у поврежденных бактерий. Четко выявляются поверхностная мембрана толщиной приблизительно 20–25 нм, электронно-плотный промежуточный слой толщиной 5–15 нм и цитоплазматическая мембрана толщиной 5–8 нм. Общая толщина оболочки варьирует в пределах 30–45 нм.

На заключительном этапе исследований проведен морфометрический анализ размеров негативно окрашенных клеток бактерий в популяциях исследуемых проб 1 и 2 (см. таблицу). Результаты анализа показали, что в популяциях исследованных проб преобладают исходные формы бактерий (до 80 %) «Т-10 ИМиО». Размер палочковидных варьирует в пределах 650–900 x 800–1400 нм (проба 1) и 650–850 x 800–1500 нм (проба 2). Размер встречающихся округлых (коккообразных) форм клеток варьирует в пределах 300–450 нм.

#### **Размеры палочковидных и овальных форм бактерий в популяциях анализированных образцов**

Проба	Кол-во изменившихся клеток	Диаметр клеток, нм	Средний диаметр, нм	Длина клеток, нм	Средняя длина, нм
Проба 1	126	650 до 900	763	800 до 1400	1138
Проба 2	134	650 до 850	757	800 до 1500	1165

В целом морфологические исследования показали однородность популяций бактерий в обоих образцах, что указывает на преимущественное развитие именно исходной культуры бактерий «Т-10 ИМиО», которая на протяжении продолжительного периода времени способна работать в экстремальных условиях без вырождения популяции. Превалирование грубого рельефа внешней оболочки клетки свидетельствует

об эффективных адаптивных процессах, происходящих в клетке в ответ на ужесточение условий существования.

Анализ поверхностных структур методами негативного контрастирования и ультратонких срезов интактных клеток позволил заключить, что исследуемые бактерии не содержат включений золота в виде электронно-плотных гранул, аналогичных гранулам коллоидного золота или других образований в цитоплазме и в структурах оболочки клеток. Для более основательного заключения по этому вопросу требуются дополнительные цитохимические исследования с применением зондов на металлы либо дифференциальное центрифугирование в градиенте плотности подходящего стабилизирующего раствора с дальнейшей послойной идентификацией клеточных структур и включений.

Дополнительные комплексы металлов с метаболитами бактерий, как показали морфологические исследования, не фиксируются на оболочке или мембранах клеток и поэтому могут быть легко удалены из раствора под действием сорбентом (активированным углем).

#### **Резюме**

Бағалы және түсті металдардың еру процесіндегі «Т-10 ИМиО» бактериясының ролін айқындау және осы негізде тиімді технология өндеу үшін ақбакайлық концентраттарды биохимиялық шаймалау процесіндегі және сілтіліцианды бактериалды ерітінділерде алтынның еруіндегі бактериялардың беттің құрылымдарына зерттеулер жүргізілді.

Морфологиялық зерттеулер көрсеткендей, металдардың бактерия метаболиттерімен қосынша комплекстері клеткалардың қабықшаларында және мембраннында байқалмады және де осыған байланысты ерітіндіден қолайлы сорбентпен (активителген көмір) жеңіл ажыратылуы мүмкін.

*Институт metallurgии и обогащения МОН РК,  
г. Алматы*

*Поступила 16.03.06г.*

поскольку атом углерода заменяется на атом азота, то изменение в энергии атомов будет равно разнице  $\delta\alpha_N$  между кулоновскими интегралами углерода и азота. Естественно было ожидать и различий в химической активности этих соединений.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Дроздов Н.С. Электрохимическое восстановление пиридинина // Ж. общ. химии. 1933. № 3. С. 351-359.
2. Кирилюс И.В. Катодные синтезы органических препаратов. Алма-Ата: Наука, 1982. 144 с.
3. Томилов А.П., Кирилюс И.В. Катодные синтезы органических препаратов. Алма-Ата: Наука, 1982. 144 с.
4. Орехов А.П. Химия алкалоидов. М., 1955. 850 с.
5. Кирилюс И.В., Мурзатова Г.К., Сокольский Д.В. Об электрокатализитическом гидрировании пиридинина на скелетном никеле // Электрохимия. 1979. Т. 5, вып. 10. С. 1543-1544.

6. Иванский В.И. Химия гетероциклических соединений. М.: Высшая школа, 1978. 559 с.

7. Садыков А.С. Химия алкалоидов Anabasis aphylla. Ташкент: Изд-во АН УзССР, 1956. 223 с.

8. Орехов А.П., Бродский Д.А. Катализитическое гидрирование анабазина // Хим. фарм. пром. 1933. №4. С. 189-192.

9. Дьюар М., Догерти Р. Теория возмущений молекулярных орбиталей в органической химии. М.: Мир, 1977. 696 с.

#### Резюме

Пиридин мен анабазиннің электркаталиптік тотықсыздандының ерекшеліктерін зерттеу нәтижелері келтірілген. Қоздырылған молекулалар орбиталдары әдісін қолдана отырып тәжірибелер нәтижелері түсіндіріледі.

*Институт органического  
синтеза и углехимии РК,  
г. Караганда*

*Поступила 23.03.06г.*