

## Микробиологические факторы формирования железосодержащих биоминералов

Л. М. КОНДРАТЬЕВА<sup>1</sup>, Е. М. ГОЛУБЕВА<sup>2</sup>, З. Н. ЛИТВИНЕНКО<sup>3</sup>

<sup>1</sup> *Институт водных и экологических проблем ДВО РАН  
680000, Хабаровск, ул. Ким Ю Чена, 65*

<sup>2</sup> *Институт тектоники и геофизики ДВО РАН  
680000, Хабаровск, ул. Дикопольцева, 56*

<sup>3</sup> *МУП г. Хабаровска “Водоканал”  
680003, Хабаровск, ул. Пионерская, 8  
E-mail: zoyana2003@mail.ru*

Статья поступила 23.09.15

Принята к печати 30.10.15

### АННОТАЦИЯ

В статье рассмотрены особенности формирования биопленок в железосодержащей водной среде в присутствии органических веществ с разной степенью биодоступности (дрожжевой экстракт, пептон, гуминовые вещества). Проведенные исследования с использованием сканирующего электронного микроскопа и рентгеноструктурного анализа позволили идентифицировать в кристаллической структуре биоминерал гетит ( $\alpha$ -FeOOH). Предполагается, что при поступлении поверхностных вод с примесями органических веществ в железосодержащие подземные воды существует риск кольматажа порового пространства водоносного горизонта железосодержащими минералами биогенного происхождения.

**Ключевые слова:** подземные воды, органические вещества, биопленка, биоминерал, гетит.

Многие теоретические проблемы в области экологии решаются на примере создания имитационных моделей, основанных на данных изучения физико-химических процессов в определенном пространственно-временном масштабе. Однако, начиная с работ В. И. Вернадского и Г. А. Заварзина, среди базовых составляющих эволюции биосферы, наземной и подземной гидросферы, важное место отводится биогеохимическим процессам. Можно выделить целый ряд подсистем, в кото-

рых перенос вещества и энергии контролируется не только физико-химическими, но и микробиологическими факторами. Циклы органического и неорганического углерода не полностью замкнуты, и это приводит к биогеохимической сукцессии, определяющей многие механизмы эволюции геосферно-биосферной системы [Заварзин, 2000].

Среди актуальных направлений исследований гидросферы все больше внимания уделяется процессам преобразования веществ и

энергии, происходящим в контактных зонах разного масштабного уровня: “макро” масштаб – в пределах водоносного горизонта или водотока, “мезо” масштаб – в поровом пространстве горных пород и “микро” масштаб – на поверхности коллоидных частиц и бактериальной клетки. Исследования взаимодействий, происходящих на поверхности бактериальной клетки, позволяют оценить механизмы и контролирующие факторы, которые могли оказать влияние на дальнейшие более масштабные экологические процессы: развитие наземных и водных экосистем, формирование почв на пирокластическом материале, месторождений полезных ископаемых и эволюции биосферы. До настоящего времени остаются актуальными исследования, объединяющие в единое целое многие процессы формирования химического состава воды при ее взаимодействии с материнскими породами, позволяющие выявить ведущие факторы миграции и подвижности элементов. Взаимодействия в системе вода – горная порода характеризуются сложными и мало изученными механизмами, несмотря на то, что они являются основой геологической эволюции [Шварцев, 2008]. Важная информация получена при учете микробиологических процессов в древних и современных отложениях. Установлено, что некоторые наноразмерные структуры похожи на окаменелые бактерии. Чаще всего ископаемые бактерии существуют в виде специфических фосфатированных и пиритизированных биоморф. Некоторые из них заполнены карбонатом, некоторые бывают пустыми, а другие окружены одним или двумя слоями пирита [Cosmidis et al., 2014].

Роль ключевых агентов – микроорганизмов – в экологических и биогеохимических процессах не вызывает сомнения, однако многие механизмы до сих пор остаются недостаточно обоснованными, для прогнозирования рисков, связанных с изменением устойчивости экосистем при внедрении некоторых новых технологий.

В природных условиях основная часть микроорганизмов существует в виде ассоциаций, определяемых общим термином “биопленки” (БП). Они представлены самой древней и наиболее успешной формой современной жизни в природе, принимающей участие в циклах основных элементов (углерод,

азот, железо, марганец, фосфор, сера и другие), трансформации минеральных и растительных субстратов (почв, горных пород и разных поверхностей), заселении экстремальных местообитаний [Николаев, Плакунов, 2007].

Микробиологический фактор играет важную роль в биогеохимических реакциях цикла железа. Микробные сообщества принимают участие как в растворении (восстановлении) железосодержащих руд, так и в осаждении (окислении) растворенных ионов железа из железосодержащих подземных вод [Потехина, 2006]. При этом баланс между этими процессами также может регулироваться микробиологической активностью. Установлено, что скорость Fe(III) редукции уменьшается с увеличением соотношения Fe(II): лактат и приводит к образованию относительно большей доли кристаллического Fe(III) в форме гетита, лепидокрокита и сидерита, которые становятся менее доступными для бактериальной редукции. Окисление Fe(II) различными бактериями приводит к образованию минералов трехвалентного железа различного строения и морфологии. Сочетание абиотических или биотических условий влияет на процессы кристаллизации Fe(III)-минералов, которые включают слабокристаллизованные (гидро)оксиды, ферригидрит, гетит, лепидокрокит, магнетит, green rust и Fe(III)-фосфаты. Наблюдаемое разнообразие Fe(III)-минералов может быть результатом различных механизмов ферментативного окисления при взаимодействии клетки и двухвалентного железа в сочетании с различными условиями среды [Larese-Casanova et al., 2010].

Биогеохимический цикл железа неразрывно связан с органическими веществами (ОВ). Присутствие и устойчивость Fe(II) или Fe(III) в комплексах с растворимыми ОВ определяют подвижность и биологическую доступность железа в наземных и водных экосистемах. Например, экспериментально показано, что использование цистеина в качестве источника различных лиганд оказывает существенное влияние на форму нахождения железа. Так, спустя 12 мес. эксперимента установлено, что цистеин может выступать в качестве потенциального источника окислительно-восстановительных лиганд ( $\text{NH}_2$  и SH групп) и

регулировать преобладающую форму железа [Bhattacharyya et al., 2013].

Некоторые исследователи считают, что железо и фосфор значительно повлияли на биологическую продуктивность древних и современных водных экосистем. Более того, они являлись ключевыми регуляторами изменения климата в масштабах геологического времени. При участии микроорганизмов эти два элемента вовлекаются в процессы седиментации, что приводит к образованию на дне водоемов вивианита –  $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8(\text{H}_2\text{O})$ . Железофосфаты могут инкрустироваться на поверхности микробных клеток, поэтому от их активности зависит формирование биоминералов [Cosmidis et al., 2014]. Экспериментально было показано, что представители одного и того же рода *Shewanella* в результате диссимиляционной редукции ионов железа оказались способными к формированию магнетита [Salas et al., 2010]. При этом в ходе экспериментов при использовании лактата в качестве источника углерода аналогичные продукты восстановления железа сформировались различными штаммами с разными скоростями. Так, два штамма конвертировали все ионы железа в магнетит, а третий редуцировал большую часть  $\text{Fe}(\text{III})$  в неизвестный кристаллический материал. Образованная им смесь продуктов восстановления железа состояла из магнетита и так называемого минерала “green rust” – зеленой ржавчины. Особенность метаболизма этого штамма состояла в том, что он интенсивно образовывал полимерную биопленку. Авторы исследования пришли в выводу, что образование клеточных экзополимеров может помешать кристаллизации магнетита или содействовать образованию зеленой ржавчины. При этом относительное обилие конечных минеральных продуктов (вторичных минералов) и их соотношение в значительной степени зависели от вида бактерий или штамма, использующего ионы железа в качестве терминального акцептора электронов.

С помощью рентгеновской микроскопии исследованы возможные контакты бактериальных клеток с поверхностью минеральных пород [Coker et al., 2012]. Основным механизмом взаимодействия связывали с секрецией специальных переносчиков электронов или железо-хелатных комплексов, продуцирующих

электропроводящие “нановолокна” (nanowires). Присутствие бактериальных липопротеидов чаще всего связывалось с местами локализации магнетита ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ). Однако на участках образца богатых полисахаридами, представляющими внеклеточный полимерный матрикс, препятствующий прямому контакту бактериальных клеток с поверхностью, присутствовала фаза, схожая с маггемитом ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ).

Важную роль в образовании железосодержащих минералов играют соли, присутствующие в подземных водах. Например, окисление  $\text{Fe}(\text{II})$  в присутствии  $\text{NaCl}$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$  приводит к образованию псевдолепидокрокита ( $\gamma\text{-FeOOH}$ ), однако, если в среде содержится  $\text{As}(\text{V})$ , доминирующим продуктом является другая форма гидроксида железа [Van Genuchten et al., 2014].

Большой интерес представляют биогеохимические процессы, происходящие в поровом пространстве в контактной зоне вода – порода и на поверхности бактериальных клеток. Подземные воды (ПВ) представляют собой сложную многокомпонентную систему, которая формируется под влиянием многочисленных природных и антропогенных факторов. Разнообразие состава подземных вод во многом определяется наличием в них широкого спектра ОВ [Кулаков, Кондратьева, 2008]. В масштабе порового пространства динамика многих процессов соизмерима со скоростью биохимических реакций и зависит от скорости микробиологических процессов. Природные циклы большинства элементов, форма их существования в растворенном или нерастворенном состояниях зависят от окислительно-восстановительных условий, которые создаются микробными клетками в результате их индивидуального развития *in situ*. Основными источниками поступления ОВ в подземные воды являются почвы и нефтяные залежи. Быстро подвергаются разложению водорастворимые формы органического азота (NOB), которые могут быть представлены продуктами разложения животных, растительных белков и микробиальной биомассы: низкомолекулярными пептидами и аминокислотами. Часть ОВ поступает в подземные воды в виде химически и биологически стойких гуминовых веществ, фенолов, углеводородов, а другая часть является про-

дуктом сложных физико-химических и биохимических превращений, протекающих в процессе круговорота воды [Шварцев, 2008]. В результате преобразования ОВ в водных средах и на разделе фаз вода – порода микроорганизмы способны продуцировать внеклеточный полимерный матрикс, который образуется в основном в экспоненциальной фазе и служит в дальнейшем источником углерода и энергии, определяя внешнюю и внутреннюю структуру биопленок, а также выступает мощным аккумулятором различных элементов [Chan et al., 2009]. Формирование БП и заполнение порового пространства контролируется комплексом взаимосвязанных физических, химических и биологических процессов [Kim et al., 2010]. Смена физико-химической обстановки может повлиять на качественные и количественные перестройки в подземных микробных комплексах (МК), которые способны привести к биообрастанию порового пространства вокруг водозаборных скважин и самих скважин, а также к ухудшению качества подземных вод [Кармалов, Филимонова, 2011]. Процессы, связанные с образованием и эволюцией биопленок в поровом пространстве водоносных горизонтов, до сих пор остаются недостаточно изученными, находятся в состоянии неопределенности в связи с кольматацией порового пространства за счет формирующихся железосодержащих биоминералов. Современное развитие физики и химии твердого тела дало много новых фактов о реальной структуре и свойствах железосодержащих минералов. В связи с этим стали активно развиваться различные физические и химические методы синтеза новых веществ на базе наночастиц гидроокислов железа [Aragi et al., 2015]. Исследователи пришли к выводу, что свойства массивных материалов имеют усредненные характеристики. На микронном или нанометровом уровне многие свойства материалов изменяются. Получены многочисленные данные о “размерном эффекте” – изменении свойств кристаллов при последовательном уменьшении их размеров [Walter et al., 2001].

В отличие от высокотемпературных физико-химических процессов образования кристаллических структур железа, микро-

биологические процессы образования железосодержащих минералов происходят при естественном температурном режиме в масштабах размерного ряда бактериальных клеток и по всей вероятности, эти минералы будут отличаться своей кристаллической структурой, что, в конечном счете, может оказывать существенное влияние на их свойства. Несомненно, определенные рамки отдельно развивающихся дисциплин (геологии, геохимии, экологии, микробиологии, биохимии, гидрологии) могут быть преодолены при междисциплинарном исследовании процессов образования биоминералов. Цель наших исследований – анализ аккумуляции ионов железа на разных этапах формирования бактериальных пленок в железосодержащих подземных водах и их последующей эволюции (конверсии) в биоминералы.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В экспериментальных исследованиях процессов, происходящих в подземных железосодержащих водах, в качестве активных агентов использованы микробные комплексы (МК), формирующиеся в подземных водах и в скважинах пилотной установки по обезжелезиванию воды в пласте на Тунгусском месторождении (Приамурье) [Кулаков, Кондратьева, 2008].

Для оценки влияния смеси природных органических веществ и гидрата окиси железа на развитие микроорганизмов подземных железосодержащих вод в качестве инокулята использована биопленка (БП 1108), отобранная в одной из скважин пилотной установки. В качестве источника азота, углерода и других компонентов для роста и развития микроорганизмов применяли дрожжевой экстракт (ДЭ). Дрожжевые экстракты представляют собой сложную смесь органических веществ из предварительно гидролизованых или подвергшихся автолизу дрожжевых клеток (пептоны, аминокислоты, нуклеиновые кислоты и другие азотсодержащие ОВ). Инокулят, приготовленный из суспензии микроорганизмов (БП 1108), вносили по 1 мл в конические колбы со 100 мл минеральной основы среды Бромфильда с различными комбинациями добавок: I вариант + ДЭ (100 мг/л);

II вариант + Fe(OH)<sub>3</sub> (5000 мг/л); III вариант + ДЭ + Fe(OH)<sub>3</sub> (в тех же концентрациях).

Исследование особенностей формирования биопленок *in vitro* при участии природных МК из железосодержащих подземных вод проводили методом “стекло обрастания”. В качестве источников углерода использованы легкодоступные и трудноминерализуемые ОВ (пептон, ООО НПО “Порт-Петровск”, ГОСТ 13805-76); гуминовые вещества, Humic acid sodium salt, H16752, “Sigma-Aldrich”, Germany). Варианты эксперимента отличались не только качественным составом ОВ, но и присутствием или отсутствием растворимых солей Fe (II): I вариант – минеральная среда Бромфильда (СБ) + + 5 г/л FeSO<sub>4</sub> + 2 г/л пептона (II); II вариант – СБ + 5 г/л FeSO<sub>4</sub> + 0,025 г/л препарата гуминовых веществ (ГВ); III вариант – СБ + 2 г/л II; IV вариант – СБ + 0,025 г/л ГВ. Все эксперименты проводили в трех повторностях. В качестве инокулята использованы пробы, отобранные на разных глубинах водоносного горизонта: 2-1 (26 м), 2-2, 5-2 (36 м), 2-3 (47 м), биопленка, сформировавшаяся в одной из скважин (БП-8), и отдельный штамм, выделенный из этой биопленки (*Pseudomonas* sp.). Культивирование микроорганизмов проводили при температуре 22–23 °С в стационарных условиях. Визуальный анализ бактериальной адгезии и формирования БП в присутствии разных по доступности ОВ проводили на 7-е и 30-е сутки. В конце эксперимента произведен высеив из культуральной жидкости (КЖ) на агаризованные питательные среды для выявления жизнеспособных форм микроорганизмов. Стекла фиксировали, окрашивали по Граму и микроскопировали (микроскоп Imager-A2, Carl Zeiss).

Для моделирования биогеохимических барьеров использованы разные сочетания минеральных загрузок в экспериментальных колонках [Кондратьева и др., 2012]. В настоящей работе представлен анализ данных элементного состава кристаллического новообразования, сформированного через 1,5 года в контактной зоне цеолит – песок при участии микробных комплексов железосодержащих подземных вод. Биопленки, сформировавшиеся *in vitro*, и обрастания из скважин исследованы с помощью сканирующего электронного микроскопа (EVO-40HV, Carl Zeiss)

с напылением платины в режиме вторичных электронов. Для определения элементного состава биопленок и биоминералов использовали кремний-дрейфовый рентгеновский детектор X-MAX 80 мм<sup>2</sup>. Исследование кристаллической структуры экспериментального биоминерала, проводили методом рентгеноструктурного анализа с использованием порошкового дифрактометра Rigaku MiniFlexII. Идентификация кристаллических фаз, содержащихся в образце, проведена с использованием программы PDXL Qualitative Analysis (качественный анализ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Экспериментальные исследования свидетельствуют о значимой роли биотических факторов в ускорении, на первый взгляд, длительных процессов формирования известных железосодержащих минералов. Вклад микробной компоненты в геохимическую подвижность/устойчивость многих элементов можно оценить путем анализа их поведения в контактной зоне вода–минерал. Любые поверхности, на которых происходит формирование биопленок, можно рассматривать как биогеохимические барьеры. В этом случае переход к прикрепленному состоянию изменяет метаболизм клеток. Особенно ярко это выражается при синтезе полимерного матрикса, который способствует бактериальной адгезии и аккумуляции различных элементов из окружающей среды.

**Влияние ОВ на рост биопленок и их инокристалцию ионами железа.** Экспериментальные исследования показали, что на развитие биопленок в жидкой среде и адгезию на предметных стеклах повлияло внесение быстро метаболизируемых азотсодержащих ОВ. Наиболее активный рост в толще культуральной жидкости (КЖ) установлен при культивировании консорциума из биопленки БП-8 на пептоне в присутствии FeSO<sub>4</sub>. Штамм *Pseudomonas* sp. также предпочитал азотсодержащие органические вещества, его рост сопровождался образованием слизистых биопленок.

Микробные комплексы (МК) из подземных вод (скважины 5-2, 2-1 и 2-2) на 7-е сутки активно потребляли не только легкодоступ-

ные ОБ (вариант с пептоном в присутствии и без  $\text{FeSO}_4$ ), но и гуминовые вещества (ГВ). Однако при добавлении  $\text{FeSO}_4$  рост МК снизился за счет связывания ГВ в хелатные комплексы и их выпадения в осадок. Важно подчеркнуть, что микроорганизмы из нижних слоев водоносного горизонта (скважина 2-3) по сравнению с МК из скважин 2-1 и 2-2 интенсивнее образовывали биопленки на разных органических субстратах. Такая активность МК может свидетельствовать об их разнообразных потребностях, обусловленных поступлением ОБ в водоносный горизонт с инфильтрационными поверхностными водами. Учитывая, что многие виды гетеротрофных бактерий способны к росту при высоких и низких концентрациях ОБ, в конце эксперимента проведено определение пищевой потребности сформировавшихся МК. Для этого на 30-е сутки проведен высеv КЖ методом “штриха” на агаризованные питательные среды РПА и РПА : 10. В результате адаптации к условиям культивирования произошли существенные перестройки в структуре бактериального сообщества, которые отразились на характере их роста.

Так, высокие концентрации NOB стимулировали рост микроорганизмов, предварительно культивируемых на пептоне с  $\text{FeSO}_4$ . МК из верхних и нижних слоев водоносного горизонта (2-1, 2-3), утилизирующие ГВ в присутствии  $\text{FeSO}_4$ , в дальнейшем росли как при высоких, так и при низких концентрациях NOB.

Согласно световой микроскопии в структуру образцов биопленок входили палочковидные, Грам(+) и Грам(-) клетки разной длины и толщины. Некоторые из них оказались окружены слизистыми капсулами. При анализе электронных изображений биопленок выявлена инкрустация поверхности клеток гидратами окиси железа. Ярко выраженная инкрустация клеток *Pseudomonas* sp. отмечена уже на 7-е сутки (рис. 1).

Наиболее активный рост проявляли МК из нижних водоносных горизонтов после предварительного культивирования на гуминовых веществах. Есть основание полагать, что эти сообщества могут принимать участие в формировании железосодержащих кристаллических структур в поровом простран-

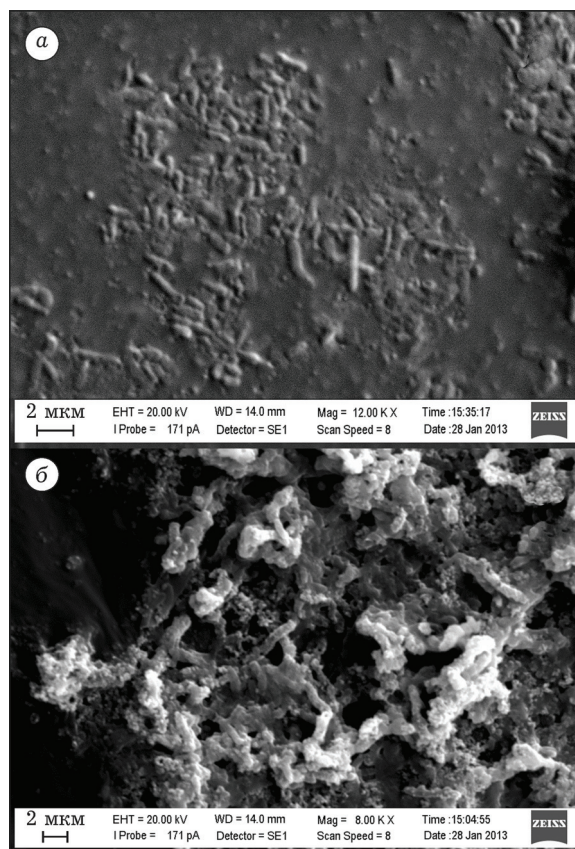


Рис. 1. Электронное изображение биопленок *Pseudomonas* sp.: а – клетки, погруженные в полимерный матрикс (при культивировании на пептоне), б – инкрустация клеток гидроксидами железа (при культивировании на пептоне с  $\text{FeSO}_4$ )

стве. Известно, что именно ГВ оказывают существенное влияние на рост кристаллов  $\text{Fe(III)}$  и способствуют формированию гетита [Schwertmann et al., 2005].

Проведенные исследования показали, что в железосодержащих подземных водах определяющими предпосылками образования биопленок служат присутствие биодоступных ОБ, способность микроорганизмов продуцировать внеклеточный полимерный матрикс и аккумуляция на поверхности клеток гидроксидов железа, которые уплотняют биопленку и способствуют формированию кристаллических структур вторичных минералов. Отсутствие ярко выраженных биопленок на стеклах в экспериментальном варианте II (ГВ +  $\text{FeSO}_4$ ) можно объяснить блокированием ионами железа доступности гуминовых веществ в качестве источника углерода для микроорганизмов и их переходом из раство-

ренного состояния в хелатные комплексы с последующим осаждением в виде биоминералов. В дальнейшем это может стать причиной коагуляции порового пространства водоносного горизонта.

**Влияние  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  на образование биопленок.** Установлено, что  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  оказывает определяющее влияние на образование биопленок и адгезивную активность микроорганизмов в присутствии комплексной смеси азотсодержащих органических веществ (NOB). Наиболее существенные изменения в характере роста БП-8 происходили в первый месяц культивирования. В модельном варианте I, без  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ , формировались бурые слизистые биопленки и происходила интенсивная адгезия на стекле. В варианте (II), в присутствии  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ , происходила слабая обратимая адгезия, после встряхивания тонкие темно-бурые биопленки отделялись от стекла. Сочетание органических веществ и  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  в варианте III стимулировало образование крупных биопленок, на которых происходила сорбция нерастворимых частиц  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ . В этом случае адгезия на стекле отсутствовала. В вариантах II и III с  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  при культивировании БП-8 в слизистой биомассе отмечены черные вкрапления. Это может быть связано с бактериальным восстановлением гидроокиси  $\text{Fe}(\text{III})$  до сульфидов железа при использовании серосодержащих аминокислот в метаболических процессах.

Известно, что потенциально сообщество БП организовано так, что в зависимости от сложившихся условий выбирает разные стратегии адгезии. В нашем эксперименте в присутствии нерастворенных тонкодисперсных частиц  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  происходило более активное взаимодействие с их поверхностью по сравнению со стеклом. При отсутствии  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  наблюдалась лучшая адгезия на стекле. Локальное образование сульфидов железа доказывает присутствие сульфатредуцирующих бактерий в структуре сообщества биопленки, которые совместно с другими гетеротрофными бактериями погружены в полимерный матрикс, определяющий формирование трехмерной структуры биопленки и повышающий ее устойчивость к неблагоприятным факторам [Николаев, Плакунов, 2007].

Экспериментальные исследования показали, что на формирование биопленок *in vitro*

влияют присутствующие микропримеси различных по строению органических веществ и физиологические свойства микроорганизмов. Установлено, что микробное окисление органических веществ за счет восстановления  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  сопровождается интенсивным образованием биопленок в вариантах с более сложным сообществом микроорганизмов, чем отдельными штаммами. “Социальное поведение” микроорганизмов из структурированной биопленки позволяет им защититься от экстремальных факторов окружающей среды и выжить при недостатке питательных веществ, а также эффективно осуществить комплекс взаимосвязанных биохимических процессов [Кондратьева, Литвиненко, 2014].

Судя по электронным изображениям (рис. 2), интенсивное образование полимерного матрикса (слизи) происходило в присутствии NOB. Легко различимы структурированные тяжи, много частиц, включенных в полупрозрачную массу. В состав биопленки входили следующие элементы: С, О, Na, P, Ca, Mn, Fe, Mg, Si, S. Известно, что двухвалентные катионы кальция и магния увеличивают вязкость и эластичность полимерного геля микробных пленок [Körstgens et al., 2001]. Согласно элементному составу бактериальные клетки инкрустированы  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ , кроме того, на электронных изображениях хорошо видны разрыхленные остатки бактериальных чехлов, которые, как правило, состоят из гидратов окиси железа. С возрастом и по мере инкрустации бактериальных чехлов содержание ионов железа в биопленках постепенно увеличивалось (табл. 1).

Вариации содержания железа в бактериальных чехлах могут быть связаны с активностью бактериальных клеток и длительностью процесса биосорбции ионов железа. Полимерный материал играет важную роль не только на первых стадиях образования биогенного гетита, в дальнейшем этот минерал также может выступать в качестве поверхности для адгезии других полимерных субстратов [Chan et al., 2009].

**Формирование железосодержащих кристаллических структур.** В качестве определяющего момента в формировании биоминералов может выступать изменение элементного состава органоминерального комплекса, образующегося в результате длительных био-

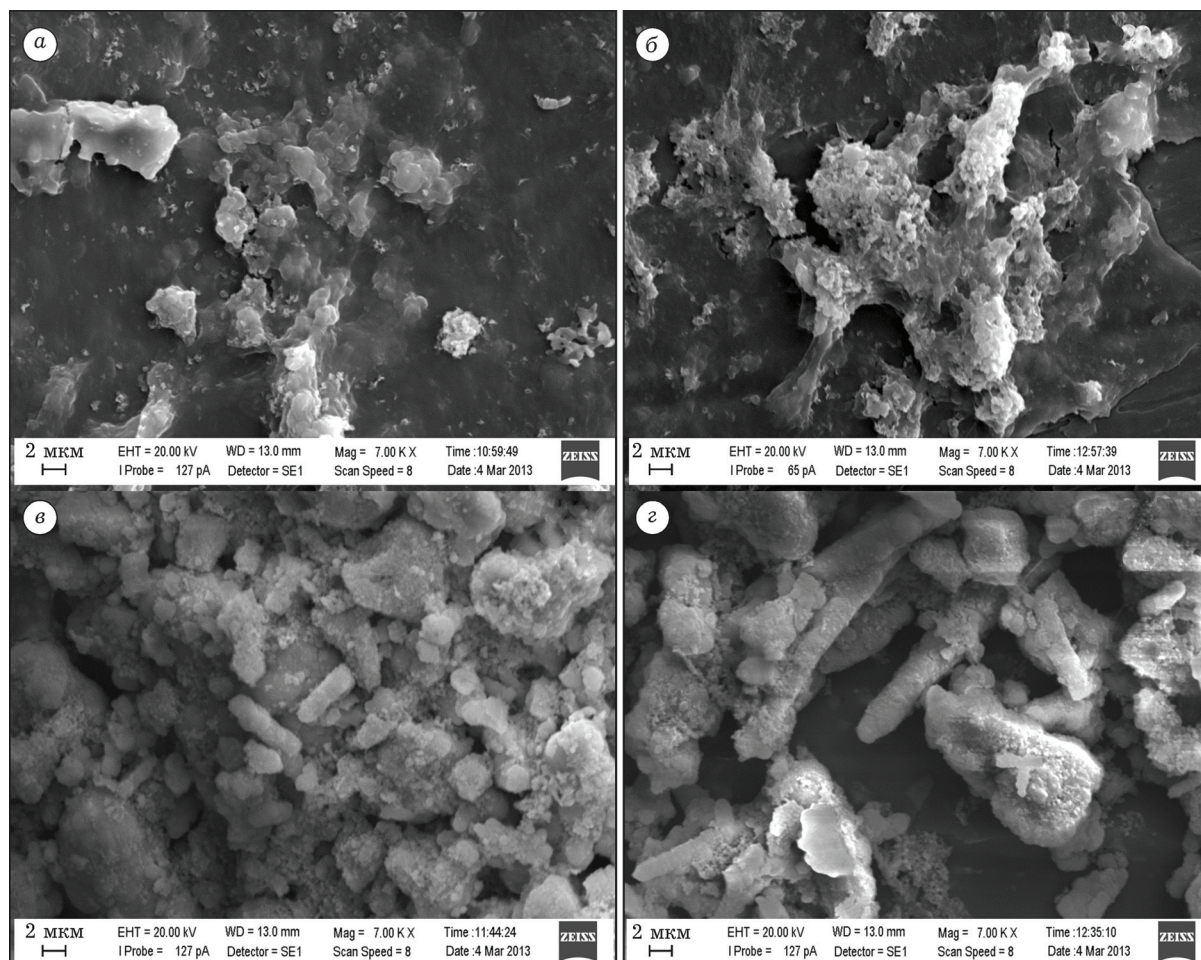


Рис. 2. Электронное изображение биопленки БП-1108 из различных вариантов культивирования: а, б – в присутствии ДЭ, в – в присутствии  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ , г –  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  + ДЭ

геохимических процессов. Прежде всего это касается постепенного снижения концентрации углерода и увеличения содержания ионов железа вследствие инкрустации поверхности клеток. В нашем эксперименте на биогеохимическом барьере между цеолитом и песком при участии железомарганцевых бактерий сформировалось плотное, ярко-охристое, кристаллическое образование на весь диаметр

колонки, которое с трудом разбилось на части. Установлено существенное преобразование элементного состава поверхности цеолита при участии биопленок бактерий, способствующих образованию нерастворимых гидратов окиси железа. Некоторые глобулы и трубчатые структуры имели сходство с инкрустированными железом “чехлами”, в которых заключены клетки хемогетеротрофных бак-

Т а б л и ц а 1

Элементный состав (вес. %) разных стадий развития биопленки в присутствии растворенных ионов железа

Стадия формирования	С	О	Fe
Биопленка (7 сут.)	58,04	24,58	0,15
Биопленка (30 сут.)	52,35	28,09	3,75
1 стадия инкрустации	17,56	66,69	14,45
2 стадия инкрустации	12,98	47,41	37,89
Гетит	–	6,76	62,86



терий родов *Leptothrix* и *Sphaerotilus*. После их отмирания этот “чехол” может составлять основу для образования биоминералов железа и железомарганцевых конкреций [Кондратьева, Голубева, 2014].

Фактически бактериальная клетка, являясь на первых этапах центром аккумуляции различных элементов, со временем сохраняет только наиболее стабильные в геохимическом плане элементы. На более поздних стадиях развития и отмирания бактериального сообщества процентное содержание ионов железа достигает существенных значений.

По нашим экспериментальным данным, переход от бактериальной биомассы к минеральным “новообразованиям” или вторичным биоминералам может осуществляться в течение 1–2 лет в зависимости от структуры микробных комплексов и использованных субстратов при формировании биогеохимических барьеров. Например, образование биоминерала гетита происходило на цеолитовой матрице при участии бактерий из железосодержащих подземных вод. В этом случае определенную роль играет структура микробного сообщества и наличие первопоселенцев, способных при низких концентрациях ОВ продуцировать полимерный матрикс, обеспечивающий не только активную адгезию к минеральным частицам, но и дополнительный источник углерода для других членов консорциума [Кондратьева, Литвиненко, 2014].

На наш взгляд, образование гетита контролировалось двумя важными факторами: присутствием ионов Fe(II) и специализированным микробным комплексом, адаптированным к условиям водоносного горизонта. Поэтому на первом этапе за счет кворум-фактора (“quorum sensing”) биопленки создают благоприятные условия для быстрого развития консорциума, но в дальнейшем, по мере накопления элементов, полимерный матрикс выступает в виде “экологической ловушки”. Формирование чехлов при инкрустации поверхности клеток ионами железа чаще всего приводит к ингибированию роста индивидуальных клеток. Биологический цикл развития консорциума (биопленки), вероятно, заканчивается, когда происходит полная инкрустация поверхности клеток Fe(III), приводящая к нарушению обмена веществ и их лизису. При этом заполнение порового про-

странства гидратами окиси железа постепенно приводит к образованию вторичного минерала. Фактически, биогенный фактор отвечает не только за начальные этапы формирования биопленок. В дальнейшем на смену хемолитотрофным бактериям, которые выступают центрами кристаллообразования, приходят различные физиологические группы гетеротрофных бактерий. Так, недавние исследования показали, что на более поздних этапах образования биоминералов кроме железомарганцевых бактерий важную роль могут играть гетеротрофные бактерии *Pseudomonas putida*, способные к адгезии на поверхности уже сформированных кристаллов гетита за счет продуцирования экзополимеров [Rong et al., 2010].

Анализ электронных изображений (рис. 3) экспериментальных новообразований, сформированных на биогеохимическом барьере цеолит – песок, показал, что визуально распознаваемые бактериальные кокки и палочки содержали значительную долю ионов железа (35,1–57,0 вес. %).

Структурные биообразования можно условно разбить на несколько групп по особенностям их элементного состава (табл. 2). Группа 1 (спектры 26, 27, 34) – кокковидные клетки, собранные в пакеты с высоким содержанием железа (46,9–53,1 вес. %), примесями марганца (0,9–1,3 вес. %) и кальция (0,24–0,4 вес. %). Присутствие кальция можно интерпретировать как его аккумуляцию при наличии полимерного матрикса. Группа 2 (спектры 28, 29) – крупные палочковидные

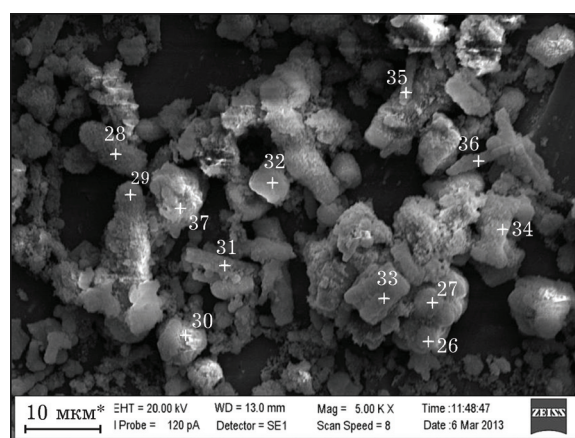


Рис. 3. Аккумуляция ионов железа на поверхности бактериальных клеток (элементный состав представлен в табл. 2)

Элементный состав (вес. %) структурных образований биопленки

Номер спектра	C	O	Fe	Mn	Ca	S
26	10,9	41,1	46,9	0,91	0,24	–
27	9,8	35,4	53,0	1,3	0,4	–
28	7,9	36,5	54,8	0,7	–	–
29	7,4	35,1	57,0	0,3	–	0,2
30	9,7	40,6	48,4	0,6	0,2	0,3
31	13,2	42,8	42,9	0,7	0,3	–
32	10,1	43,4	45,2	0,5	0,2	0,3
33	9,5	41,4	48,0	0,7	0,2	0,3
34	9,0	34,5	53,1	1,1	0,3	–
35	10,3	41,7	47,3	0,5	0,2	–
36	9,9	36,5	52,6	0,8	0,2	–
37	11,0	44,9	38,7	0,5	0,2	0,3

клетки с минимальным содержанием углерода, ярко выраженной инкрустацией ионами железа (54,8–57 вес. %), без полимерных субстанций, в которых могли бы сорбироваться ионы кальция. Группа 3 (спектры 30, 32, 33, 37) – укороченные палочки со средним содержанием ионов железа (45,2–48 вес. %); кроме основных макроэлементов присутствовали ионы серы (0,2–0,3 вес. %). Группа 4 (спектры 31, 35, 36) – морфологически более тонкие палочки, но мало отличающиеся

от других групп по содержанию ионов железа (42,9–52,6 вес. %), с высоким разбросом в содержании марганца (0,5–0,8 вес. %). Следует обратить внимание на микроструктурные образования, содержащие серу. Их можно отнести к сульфатредуцирующим бактериям, которые участвуют в формировании сульфида железа, предшественника пирита. На рис. 4 представлен один из таких спектров, отражающих присутствие серы в этих структурных образованиях.

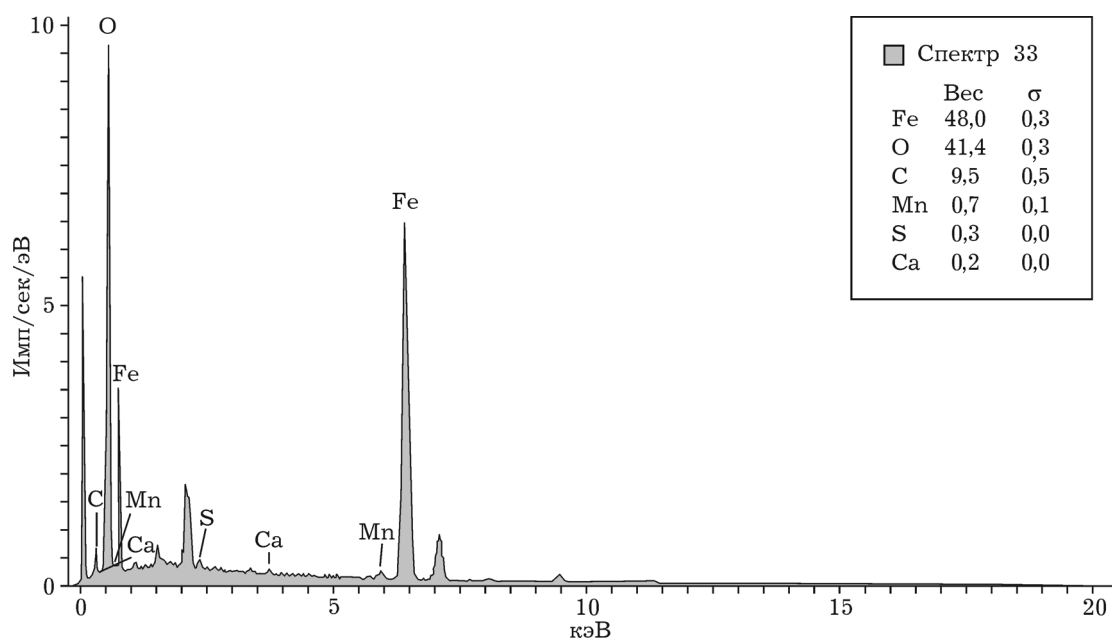


Рис. 4. Спектральная характеристика, отражающая начальную стадию образования биогенного пирита

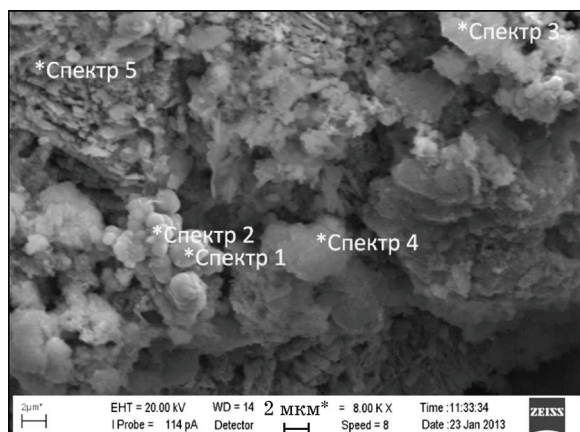


Рис. 5. Микроструктурная организация биоминерала, сформированного *in situ*

Ранее установлено [Cosmidis et al., 2014], что чаще всего пирит образуется в виде плотно упакованных кристаллов, окруженных биоморфами. Кристаллы пирита, расположенные на расстоянии от биоморф, оказались меньше размером и распределялись более редко. Кроме того, показано, что неорганический углерод в основном присутствует в виде карбонатных групп и равномерно распределен в образцах, в то время как органический углерод сосредоточен в поверхностных чехлах фосфатных биоморф.

В нашем случае фосфор встречался крайне редко и только на первых этапах формирования биопленок и в начале инкрустации поверхности клеток ионами железа. Кальций регистрировали также в период уплотнения биопленок, затем, вероятнее всего, происходило их растворение и вымывание в результате бактериального метаболизма.

Исследования показали, что элементный состав зернистых частиц размером более 1 мкм

является более богатым, чем тонкодисперсных (100–500 мкм). Электронная микроскопия и элементный анализ разноразмерных фрагментов кристаллического новообразования свидетельствуют об его гетерогенности (рис. 5). Эти различия можно объяснить разными механизмами биоаккумуляции элементов. Так, биопленки могли формироваться на биогеохимическом барьере, непосредственно на поверхности частиц цеолита и песка. В этом случае их состав обогащался за счет элементов минеральной матрицы. Совсем другая ситуация складывается при аккумуляции элементов биопленками, которые формируются в поровом пространстве за счет их растворенных форм. Тонкодисперсная составляющая в этом случае представлена очень высоким содержанием кристаллов гидроксидов железа. Это хорошо иллюстрируется спектром 5, относящимся к кристаллическим структурам в виде тонких пластинок, состав которых представлен на 60 вес. % ионами железа (табл. 3).

Сферические образования (спектры 1 и 2) можно назвать биоморфами, по элементному составу они напоминают бактериальные клетки, входящие в биопленки, развивающиеся в эксперименте в присутствии  $Fe(OH)_3$ . По данным рентгеновской дифракции, образцы полученных кристаллических образований с высокой концентрацией железа содержали в основной своей массе гетит.

Исследования кристаллов природного и синтезированного гетита показали, что его предшественником является магнетит [Yang et al., 2006]. Позднее, при использовании метода сканирующей электронной микроскопии, показано, что клетки факультативно-ана-

Т а б л и ц а 3

Элементный состав различных локусов кристаллического новообразования

Элемент (вес. %)	Спектр 1	Спектр 2	Спектр 3	Спектр 4	Спектр 5
C	6,99	6,28	12,40	17,51	5,08
O	53,06	55,23	62,37	57,91	33,41
Si	0,58	0,97	7,42	3,99	0,95
S	0,29	0,30	0,43	0,29	Не обн.
Fe	39,07	36,92	15,27	18,72	60,56
Al	Не обн.	0,29	1,56	1,28	Не обн.
K	»	Не обн.	0,18	0,3	»
Ba	»	»	0,37	Не обн.	»

эробных бактерий *Shewanella putrefaciens* способны образовывать агрегаты с частицами  $\gamma$ -FeOOH (lepidocrocite), которые в ходе минерализации поэтапно трансформировались в магнетит. Эти данные вызывают большой интерес к исследованию механизмов образования биоминералов, так как позволяют выявить важные параметры окислительно-восстановительной минерализации и показать роль бактериально-минеральных агрегатов в формировании железосодержащих минералов с новыми свойствами [Zegeye et al., 2010]. Дело в том, что включение молекул органического углерода в состав гетита может оказывать существенное влияние на скорость роста кристаллов и на его магнитные свойства [Larese-Casanova et al., 2010].

Проведенные исследования показали, что формирование биоминералов возможно в природных условиях при наличии в водной среде растворенного железа и биомассы железомарганцевых бактерий. Дальнейшие исследования в этом направлении связаны с поиском экологических факторов, которые могут ускорять/замедлять кристаллизацию образующихся структур.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследования показали, что на современном этапе возможно формирование полезных ископаемых (магнетита, гетита, сидерита и пирита) при активизации микробиологических процессов на природной минеральной матрице при наличии железосодержащих подземных вод. На примере биопленок, образуемых железомарганцевыми бактериями, показано, что присутствие минимальных количеств ОБ в водной среде приводит к запуску механизма образования адгезирующих веществ полимерной структуры и закреплению бактериальных первопоселенцев на поверхности минеральных частиц. На следующем этапе происходит интенсивное деление клеток, которое энергетически поддерживается присутствующими ОБ. По мере потребления ОБ главенствующую роль в структуре сообщества начинают приобретать процессы получения энергии за счет использования донорно-акцепторных взаимодействий. Они сопровождаются переходом ра-

створенной формы железа в нерастворенное состояние. При этом полимерный матрикс выступает в качестве автохтонного источника углерода для микробного консорциума.

Экспериментально подтверждено, что сообщество железомарганцевых бактерий, адаптированное к среде обитания в подземных водах, активно участвует в аккумуляции ионов железа. На более поздних этапах полимерный матрикс способствует накоплению разных элементов, находящихся в водной среде. После исчерпания доступных ОБ биогенный материал с аккумулярованными ионами железа переходит в новое состояние вторичных биоминералов.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Заварзин Г. А. Недарвиновская область эволюции // Вестн. РАН. 2000. Т. 70, № 5. С. 403–411.
- Кармалов А. И., Филимонова С. В. Методы борьбы с последствиями кольматации и коррозии оборудования водозаборных скважин // Водоснабжение и санитарная техника. 2011. № 9. С. 21–25.
- Кондратьева Л. М., Голубева Е. М. Образование минералов железа на цеолитовой матрице // Геология и геофизика. 2014. № 12. С. 1738–1747.
- Кондратьева Л. М., Литвиненко З. Н. Формирование биопленок микробными комплексами подземных вод *in vitro* // Биотехнология. 2014. № 3. С. 73–82.
- Кондратьева Л. М., Морозова О. Ю., Андреева Д. В., Стукова О. Ю., Голубева Е. М. Микробиологический фактор миграции железа на искусственных биогеохимических барьерах. Геологическая эволюция взаимодействия воды с горными породами: мат-лы Всерос. конф. Томск: Изд-во НТЛ, 2012. С. 321–324.
- Кулаков В. В., Кондратьева Л. М. Биогеохимические аспекты очистки подземных вод Приамурья // Тихоокеанская геология. 2008. Т. 27, № 1. С. 109–118.
- Николаев Ю. А., Плакунов В. К. Биопленка – “город микробов” или аналог многоклеточного организма? // Микробиология. 2007. Т. 76, № 2. С. 149–163.
- Потехина Ж. С. Метаболизм Fe(III) восстанавливающих бактерий. Тольятти: ИЭВБ РАН, 2006. 218 с.
- Шварцев С. Л. Взаимодействие в системе вода–порода как новая база для развития гидрогеологии // Тихоокеанская геология. 2008. № 6. С. 5–16.
- Arami H., Khandhar A. P., Tomitaka A., Yu. E., Goodwill P. W., Conolly S. M., Krishnan K. M. *In vivo* multimodal magnetic particle imaging (MPI) with tailored magneto/optical contrast agents // Biomaterials. 2015. Vol. 52. P. 251–261.
- Bhattacharyya A., Stavitski E., Dvorak J., Martínez C. E. Redox interactions between Fe and cysteine: Spectroscopic studies and multiplet calculations // Geochim. et Cosmochim. Acta. 2013. Vol. 2, N 1. P. 89–100.
- Chan C. S., Fakra S. C., Edwards D. C., Emerson D., Banfield J. F. Iron oxyhydroxide mineralization on microbial extracellular polysaccharides // Ibid. 2009. Vol. 73. P. 3807–3818.

- Coker V. S., Byrne J. M., Telling N. D., Van der Laan G., Lloyd J. R., Hitchcock A. P., Wang J., Patrick R. A. Characterization of the dissimilatory reduction of Fe(III)-oxyhydroxide at the microbe-mineral interface: the application of STXM-XMCD // *Geobiology*. 2012. Vol. 10, N 4. P. 347–354.
- Cosmidis J., Benzerara K., Morin G., Busigny V., Lebeau O., Jézéquel D., Noël V., Dublet G., Othmane G. Biomineralization of iron-phosphates in the water column of Lake Pavin (Massif Central, France) // *Geochim. et Cosmochim. Acta*. 2014. Vol. 126, N 1. P. 78–96.
- Kim J., Choi H., Pachepsky Y. A. Biofilm morphology as related to the porous media clogging // *Water research*. 2010. Vol. 44, N 4. P. 1193–1201.
- Körstgens V., Flemming H.-C., Wingender J., Borchard W. Influence of calcium ions on the mechanical properties of a model biofilm of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* // *Water Sci. and Technol.* 2001. Vol. 43, N 6. P. 49–57.
- Laresse-Casanova P., Haderlein S. B., Kappler A. Biomineralization of lepidocrocite and goethite by nitrate-reducing Fe(II)-oxidizing bacteria: Effect of pH, bicarbonate, phosphate, and humic acids // *Geochim. et Cosmochim. Acta*. 2010. Vol. 74, N 13. P. 3721–3734.
- Rong X. M., Chen W. L., Huang Q. Y., Cai P., Liang W. *Pseudomonas putida* adhesion to goethite: studied by equilibrium adsorption, SEM, FTIR and ITC // *Colloids and Surfaces*. 2010. Vol. 80. P. 79–85.
- Salas E. C., Berelson W. M., Hammond D. E., Kampf A. R., Neelson K. A. The impact of bacterial strain on the products of dissimilatory iron reduction // *Geochim. et Cosmochim. Acta*. 2010. Vol. 74, N 2. P. 574–583.
- Schwertmann U., Wagner F., Knicker H. Ferrihydrite-humic associations: magnetic hyperfine interactions // *Soil Sci. Soc. Amer. Journ.* 2005. Vol. 69. P. 1009–1015.
- Van Genuchten C. M., Peña J., Amrose S. E., Gadgil A. J. Structure of Fe(III) precipitates generated by the electrolytic dissolution of Fe(0) in the presence of groundwater ions // *Geochim. et Cosmochim. Acta*. 2014. Vol. 127. P. 285–304.
- Walter D., Buxbaum G., Laqua W. The mechanism of the thermal transformation from goethite to hematite // *J. Thermal Analysis and Calorimetry*. 2001. Vol. 63. P. 733–748.
- Yang H., Lu R., Downs R. T., Costin G. Goethite,  $\alpha$ -FeO(OH), from single-crystal data // *Acta Crystallographica*. 2006. Vol. 62, N 12. P. 250–252.
- Zegeye A., Mustin C., Jorand F. Bacterial and iron oxide aggregates mediate secondary iron mineral formation: green rust versus magnetite // *Geobiology*. 2010. Vol. 8, N 3. P. 209–222.

## Microbiological Factors of Iron Biominerals Formation

L. M. KONDRATYEVA<sup>1</sup>, E. M. GOLUBEVA<sup>2</sup>, Z. N. LITVINENKO<sup>3</sup>

<sup>1</sup> *Institute of Water and Ecological Problems, FEB RAS  
680000, Khabarovsk, Kim Yu Chen str., 65*

<sup>2</sup> *Institute of Tectonics and Geophysics, FEB RAS  
680000, Khabarovsk, Dikopoltseva str., 56*

<sup>3</sup> *Municipal Unitary Enterprise “Vodocanal”  
680003, Khabarovsk, Pionerskaya str., 8  
E-mail: zoyana 2003@mail.ru*

The article considers the peculiarities of biofilm formation in iron-bearing groundwater in the presence of organic substances with different degrees of bioavailability (yeast extract, peptone, humic substances). Scanning electron microscopy and X-ray analysis helped to identify a biomineral in the crystal structure – goethite ( $\alpha$ -FeOOH). It was supposed that admission of surface water with organic substances into the iron groundwater creates a risk of colmatage of aquifer pore space with iron minerals of biogenic origin.

**Key words:** groundwater, organic substances, biofilm, biomineral, goethite.