

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА»

ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

КАФЕДРА ОБЩЕЙ ФИЗИКИ

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

«ИССЛЕДОВАНИЯ БИОГЕННЫХ ПРЕОБРАЗОВАНИЙ ФЕРРИГИДРИТА И
МАГНЕТИТА»

Выполнила студентка

205М группы:

Антонова Ангелина Владимировна

подпись студента

Научный руководитель:

кандидат физико-математических наук, доцент

Чистякова Наталия Игоревна

подпись научного руководителя

Допущена к защите

Заведующий кафедрой общей физики

профессор А.М. Салецкий

подпись зав. кафедрой

Москва

2017

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМ БИОГЕННОГО ПРЕОБРАЗОВАНИЯ (ПО ДАННЫМ ЛИТЕРАТУРЫ)	6
1.1. Процессы биоминерализации железосодержащих минералов	6
1.2. Исследования структуры и свойств магнетита	10
1.2.1. Мессбауэровские исследования малых частиц магнетита	10
1.2.2. Рамановские исследования магнетита	12
1.2.3. Исследования магнетита методом неупругого ядерного рассеяния синхротронного излучения	14
1.3. Исследования структуры и свойств ферригидрита	17
ГЛАВА 2. МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА	20
2.1. Мессбауэровские исследования	20
2.1.1. Параметры мессбауэровского спектра	20
2.1.2. Обработка мессбауэровских данных	21
2.2. Неупругое ядерное рассеяние синхротронного излучения	22
2.2.1. Обработка спектров	23
2.3. Рамановская спектроскопия	25
ГЛАВА 3. ПРОЦЕССЫ БАКТЕРИАЛЬНОГО ПРЕОБРАЗОВАНИЯ ФЕРРИГИДРИТА И МАГНЕТИТА	27
3.1. Процессы преобразования синтезированного магнетита <i>Geoalkalibacter ferrihydriticus</i> при pH 9.5	28
3.1.1. Исследования преобразования синтезированного магнетита бактерией в отсутствии органических доноров электронов в минеральной среде	29
3.1.2. Исследования преобразования синтезированного магнетита <i>Geoalkalibacter ferrihydriticus</i> в присутствии органического донора электронов при pH 9.5	34
3.2. Исследования процессов преобразования гидроксидов и оксидов железа синтрофной культурой анаэробных бактерий <i>Geoalkalibacter ferrihydriticus</i> и <i>Contubernalis alkalaceticum</i> при pH 9.5	37
3.2.1. Исследование преобразования синтезированного ферригидрита синтрофной культурой в присутствии этанола при pH 9.5	38

3.2.2. Исследования преобразования синтезированного магнетита синтрофной культурой в присутствии этанола при pH 9.5	39
3.3. Процессы биогенного преобразования синтезированных ферригидрита и магнетита накопительной культурой: <i>Ectothiorodospira sp.</i> , <i>Geokalibacter sp.</i> , <i>Natronincola sp.</i>	43
3.3.1. Исследования преобразования синтезированного ферригидрита в процессе роста накопительной культуры.....	43
3.3.2. Исследования преобразования синтезированного магнетита в процессе роста накопительной культуры на свету	45
3.4. Процессы биогенного преобразования синтезированного магнетита бактерией <i>Fuchsiella ferrireducens</i> в присутствии этанола при pH 9.5.....	48
3.5. Исследование влияния площади поверхности минерала, доступной для восстановления бактерией <i>Geoalkalibacter ferrihydriticus</i> , на формирование новых фаз	50
ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ	56
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	59

ВВЕДЕНИЕ

Исследование микробиологического синтеза железосодержащих минералов, является важной задачей современной физики. Некоторые бактерии способны восстанавливать внеклеточно различные оксиды и гидроксиды железа в анаэробных условиях, получая таким образом энергию для дальнейшего роста и жизнедеятельности. Диссимиляторные железоредуцирующие бактерии используют атомы Fe^{3+} в качестве акцептора электронов, а в качестве донора могут использовать ацетат, этанол и H_2 [1-3]. Такие микроорганизмы являются звеном биогеохимического цикла железа [4], принимают активное участие в формировании осадочных формаций железистых кварцитов, состоящих преимущественно из слоев кварца, гематита, магнетита и маггемита. Особый интерес к бактериям, способным биоминерализировать различные соединения железа, вызван тем, что в лабораторных условиях можно получить наночастицы магнетита и ферригидрита [5,6].

Большой интерес вызывают магнитные свойства наноразмерного магнетита и ферригидрита. В настоящее время магнитные наноматериалы тщательно изучаются для возможного применения в медицине например, для целевой доставки лекарств, как контрастное вещество для магниторезонансной томографии. Использование таких частиц для направленной доставки лекарств обеспечивает транспортировку точного количества препарата до конкретной пораженной ткани, не затрагивая здоровые ткани. Таким образом, уменьшая возможность побочных эффектов и передозировок. Полученные в результате микробиологического синтеза магнитные наноматериалы, обладают такими свойствами, как биосовместимость и низкая токсичность [7].

Настоящая работа посвящена исследованию формирующихся железосодержащих фаз в процессе роста бактерий: *Geoalkalibacter ferrihydriticus*, *Contubernalis alkalaceticum*, *Ectothiorodospira*, *Geolkalibacter*, *Natronincola*, *Fuchsiella ferrireducens* в присутствии синтезированного

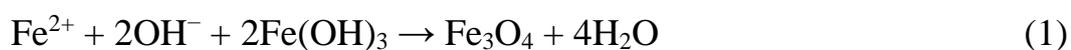
магнетита или ферригидрита в минеральной среде при различных условиях: без добавления ацетата в минеральную среду, с добавлением ацетата или этанола. Кроме того, в работе исследовались образцы разного размера, полученные при разном объеме минеральной среды, доступной для восстановления бактерией *Geoalkalibacter ferrihydriticus*. Обнаружение и идентификация железосодержащих фаз, изучение их свойств проводились методами мессбауэровской спектроскопии, ядерного резонансного неупругого рассеяния синхротронного излучения, рамановской спектроскопии, кроме того были проведены магнитные измерения и рентгенофазовый анализ.

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМ БИОГЕННОГО ПРЕОБРАЗОВАНИЯ (ПО ДАННЫМ ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Процессы биоминерализации железосодержащих минералов

Биоминерализация – совокупность биохимических процессов, в ходе которых происходит образование неорганических твердых веществ с участием живых организмов. Существует два основных механизма данного процесса: а) биологически контролируемая минерализация (БКМ) и б) биологически индуцированная (стимулированная) минерализация (БИМ). Главным отличием БКМ от БИМ, является то, что минералы формируются внутриклеточно, и бактерия оказывает полный контроль над всеми этапами зарождения и роста минерала. Поэтому, полученные в процессе БКМ минералы характеризуются малой нестехиометрией, все частицы чаще всего одного размера и со стойкой морфологией [8].

Магнетотактические бактерии – большая группа бактерий, преимущественно проживающих на дне водоемов [9]. В клетках этих бактерий обнаружены частицы магнетита, окруженные бислойной мембраной (магнетосомы), что позволяет им ориентироваться в соответствии с внешним магнитным полем (например, магнитным полем Земли). У таких бактерий отдельные кристаллы соединены в одну или несколько цепочек. За счет однодоменной структуры, магнитные моменты каждой частицы цепи выстраиваются параллельно друг другу вдоль цепи, таким образом цепь имеет очень устойчивый постоянный магнитный дипольный момент. Этот механизм подобен магнитной стрелке, благодаря этому бактерии способны плавать вдоль магнитных силовых линий. Минералы, «выращенные» магнетотактическими бактериями, не имеют примесей. Кристаллизация магнетита в магнетотактических бактериях происходит по реакции:



Главное преимущество БИМ заключается во внеклеточном протекании процесса, однако структура и свойства минералов, полученных в результате такого процесса, сильно зависят от условий окружающей среды. Биологически

индуцированная минерализация чаще всего протекает в анаэробных средах или на кислородно-бескислородных границах. В таких условиях бактерии используют минеральные (нерастворимые) формы соединений металлов переменной валентности в качестве акцепторов электронов. Способность микроорганизмов к облигатной железоредукции в анаэробных условиях впервые была показана Балашовой и Заварзиным в 1979 году. Способность к металлоредукции наиболее изучена для диссимиляторных бактерий отнесенных к родам *Geobacter* и *Shewanella*. Однако до сих пор не ясен механизм переноса электронов от клетки к нерастворимому субстрату. Выделяют три основных механизма экстраклеточного транспорта электронов [10]:

I) механизм, связанный с участием функциональных комплексов — цитохромов *c*, образующих электрон-транспортные цепи, по которым осуществляется перенос электронов от восстановленных хинонов в цитоплазматической мембране на редокс-белки, связанные с наружной клеточной мембраной, и затем на экстраклеточные субстраты, в том числе нерастворимые оксиды металлов. Реализация такого механизма возможна на расстояниях порядка 15–20 Å;

II) второй механизм связан с синтезом растворимых низкомолекулярных редокс-переносчиков – флавинов, поставляемых клеткой во внешнюю среду. Предполагается, что восстановление переносчиков протекает на цитохромах *c*, расположенных на внешней стороне наружной клеточной мембраны. Поэтому в отсутствие цитохромов *c* восстановление нерастворимых субстратов флавинами практически не протекает. В присутствии микромолярных концентраций флавинов скорость переноса электронов возрастает в 10 раз. Наиболее исследован этот механизм у бактерии *S. oneidensis* MR-1;

III) третий механизм, связан с образованием электропроводящих пилей у бактерий. Электропроводящие выросты – пили (длина 10 – 20 мкм), которые образуются при росте бактерии с нерастворимым оксидом Fe(III) вносят

основной вклад в транспорт электронов к нерастворимым акцепторам. Пили обладают проводимостью металлического типа, которая растет при снижении температуры. Основной вклад в проводимость пилей вносит белок – пилин (PilA). Предполагается, что проводимость металлического типа возможна за счет перекрывания π -орбиталей ароматических остатков и делокализации электронов в PilA. Пили обеспечивают транспорт электронов на расстояние до 1 см. Такой механизм скорее всего реализуется для бактерии *G. sulfurreducens* [10].

Shewanella oneidensis – грамотрицательная γ -протеобактерия, впервые обнаруженная в озере Онейд в штате Нью Йорк (США). Дыхание данной бактерии происходит совместно с процессом восстановления нитратов (NO_3^-), нитритов (NO_2^-), сульфитов (SO_3^{2-}), трисульфатов ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$). Когда в качестве электронного акцептора используется Fe^{3+} , тогда способен образовываться внеклеточный магнетит. Сформированный таким способом магнетит, идентичен магнетиту полученному неорганическим путем [11].

Магнетит, образованный железоредуцирующими бактериями (*Geobacter metallireducens* и *Shewanella putrefaciens*), характеризуется слабой степенью кристаллизации, различной морфологией, и размеры его частиц варьируются в диапазоне от 10-50 нм. Наноразмерные частицы магнетита проявляют суперпарамагнитные свойства. Количество образованного магнетита при помощи железоредукторов, зависит от количества, присутствующего ферригидрита и значений pH [12,13].

В работе [14] показали, что степень стехиометрии образованного магнетита бактерией *Shewanella putrefaciens* зависит от времени инкубации. По экспериментальным спектрам рассчитывалось значение $\beta = (S_A + S_{B1} / S_{B1})$, где S_A – площадь парциального спектра соответствующего атомам Fe^{3+} в тетраэдрических позициях, S_{B1} , S_{B1} – атомам $\text{Fe}^{2.5+}, \text{Fe}^{3+}$ в октаэдрических позициях в структуре магнетита, которое в пересчете дает параметр вакансий δ магнетита. Магнетит сформированный за один день инкубации имеет очень

небольшое отклонение от стехиометрии $\delta \sim 0.025$, а значение δ очень близкое к 0 было достигнуто через 5 дней. Через 7 дней, значение δ соответствовало магнетиту с явным превышением атомов Fe^{2+} , которому соответствует отрицательное значение $\delta \sim -0,02 \pm 0,01$. И, наконец, продукт, полученный после 26 дней инкубации является стехиометрическим магнетитом Fe_3O_4 . Также был исследован процесс синтетического восстановления лепидокрокита с формированием магнетита в отсутствие бактерии. Около 75% лепидокрокита было преобразовано в квазистехиометрический магнетит через 1 ч инкубации. Увеличение времени абиотической инкубации до 26 дней, способствовало преобразованию остальной части лепидокрокита в магнетит, однако параметр вакансий остался близким к $\delta \approx 0,05$. Таким образом, железоредукторы способствуют образованию смеси лепидокрокита и стехиометрического магнетита. Однако стехиометрический магнетит не был получен во время абиотического эксперимента, несмотря на то, что были выдержаны условия его формирования.

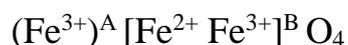
Последние исследования показали, что в осадочных средах микроорганизмы, способные к внеклеточному электронному транспорту, вероятно, способствуют протеканию электрических токов через проводящие минералы, таким образом связывая пространственно разделенные биогеохимические окислительно-восстановительные процессы. Для совместного роста микроорганизмов этот электрический путь, по-видимому, допускает взаимно выгодный метаболизм [15]. В работе [16] исследовался совместный метаболизм железоредуцирующей бактерии *Geobacter sulfurreducens* и фототрофной железо-окисляющей бактерии *Rhodospseudomonas palustris TIE-1* в присутствии магнетита. Показано, что жизнедеятельность микроорганизмов влияет на свойства магнетита, не изменяя его количества. В работе [17] исследовалась возможность электропроводимости магнетита: перенос электронов внеклеточно от ацетат окисляющих микроорганизмов к трихлорэтан-дехлорирующим в присутствии магнетита. Была подтверждена гипотеза о том, что наночастицы магнетита

ускоряют процесс внеклеточного переноса электронов при совместном метаболизме *Desulfitobacterium* и *Dehalococcoide*. Проводящие минералы повсеместно распространены в природе и, вероятно, такие процессы происходят естественным образом на многих загрязненных участках. Совместный рост микроорганизмов, способных к окислению и восстановлению, вносят большой вклад в геохимические циклы, в том числе связанные с уменьшением загрязняющих веществ в почве.

1.2. Исследования структуры и свойств магнетита

1.2.1. Мессбауэровские исследования малых частиц магнетита

Магнетит – часто встречающийся оксид железа, обнаруженный в магматических, метаморфических и осадочных горных породах. Магнетит может быть получен как в результате БИМ, так и БКМ. Выше температуры Вервея $T_v \sim 120$ К магнетит имеет кубическую структуру и характерный параметр решетки $a \sim 8,397$ Å. Кубическая кристаллическая решетка шпинели, формируется большими по размерам анионами кислорода O^{2-} , в междоузлиях (позициях) последних размещаются меньшие по размерам катионы Fe^{3+} и Fe^{2+} . При этом они могут быть окружены четырьмя анионами O^{2-} (тетраэдрические или А-позиции) и шестью анионами O^{2-} (октаэдрические или В-позиции) рис. (1). Установлено, что магнетит обладает кристаллической структурой так называемой обращенной шпинели:



Согласно этой структуре, в В-позициях размещается в два раза больше катионов железа, чем в А-позициях, при этом, в В-позициях половина катионов железа имеют степень окисления $2+$ [Fe^{2+}], а другая половина, – $3+$ [Fe^{3+}]. В А-позициях размещаются только катионы (Fe^{3+}) [18]. Магнетит обладает кубической анизотропией с $[1, 1, 1]$ и $[1, 0, 0]$ направлениями осей легчайшего и трудного намагничивания соответственно [19]. При комнатной температуре константа магнитокристаллической анизотропии в первом порядке отрицательна $K_1 = 1.35 \cdot 10^5$ эрг/см³ и меняет знак при температуре на

несколько градусов выше температуры Вервея. При охлаждении ниже T_v , переход от кубической до триклинной структуры дает изменения в одноосной анизотропии с $[0, 0, 1]$ вдоль оси легчайшего намагничивания.

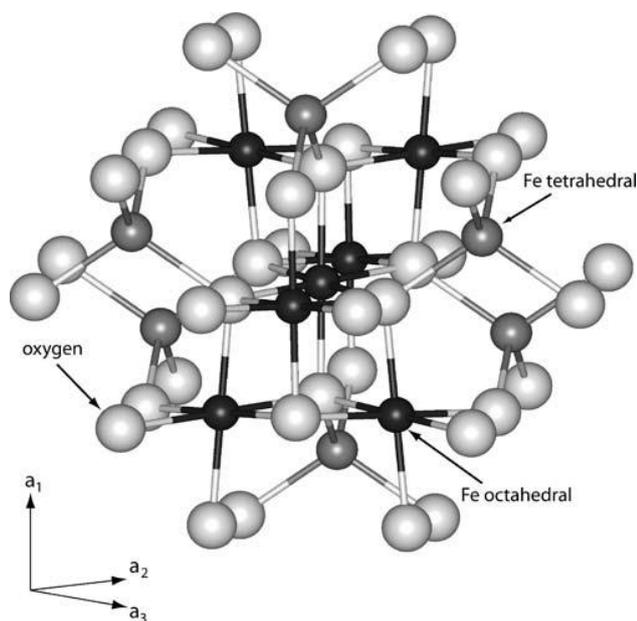


Рисунок 1 Визуализация атомов Fe в октаэдрических позициях (черные) и тетраэдрических (темно-серые), атомов O (светло-серые) в структуре магнетита [20].

Исследования мессбауэровских спектров магнетита показали, что характерной особенностью магнетита при комнатной температуре является постепенный переход от многодоменной структуры к суперпарамагнитному состоянию при уменьшении размеров частиц. При температуре 78 К у магнетита наблюдается изменение кристаллической симметрии решетки, а для образцов с диаметром от 10 до 50 нм перестают наблюдаться эффекты тепловых флуктуаций. Данная температура является температурой блокировки для частиц магнетита. Частицы с меньшим размером обладают температурой блокировки ~ 45 К. Температуры Вервея и блокировки, а также коэрцитивная сила уменьшаются с уменьшением размеров частиц. Для магнетита наблюдается уменьшение намагниченности с ростом температуры, и для полученных результатов эта зависимость описывается законом Блоха, т.е. $M_s \sim T^{3/2}$ [21]. Следует отметить, что намагниченность насыщения уменьшается и при уменьшении размера частиц. Это является следствием

спиновых эффектов на поверхности частиц, что приводит к уменьшению значения суммарного магнитного момента [22].

Для расшифровки мессбауэровских спектров малых частиц магнетита предлагаются различные модели обработки, обусловленные разными размерами частиц и степенью кристаллизации. Для спектров магнетита, измеренных при $T = 4.2$ К, со средним размером частиц $\langle d \rangle = 9$ нм авторами предложена модель, представляющая собой суперпозицию шести парциальных спектров. Один из парциальных спектров соответствует атомам железа в А-подрешетке и пять – атомам железа в В-подрешетке, причем три из них соответствуют атомам Fe^{2+} [23]. Для спектров магнетита ($\langle d \rangle < 5$ нм), измеренных при комнатной температуре, предлагается модель, состоящая из суперпозиции двух парциальных спектров, которые соответствуют атомам железа в А- и В-подрешетках [24,25].

1.2.2. Рамановские исследования магнетита

Колебательная спектроскопия (инфракрасная и рамановская спектроскопия), является мощным инструментом для прямого зондирования динамики решетки магнетита, в частности, для исследования оптических фононов через Вервей переход. Спектроскопия комбинационного рассеяния света является инструментом для быстрой идентификации различных оксидов и гидроксидов железа. Серьезная проблема заключается в том, что некоторые минералы железа легко преобразуются при воздействии на них лазерным излучением с мощностью уже от 1 мВт и более.

Автор [26] получил и определил нормальные моды колебаний, используя молекулярную модель, впервые предложенную Уолдроном. В этой модели колебательные режимы ферритов типа B_2AX_4 можно рассматривать с точки зрения трех отдельных единиц тетраэдрической симметрии. Он предложил сгруппировать 14 атомов элементарной ячейки в один B_4 тетраэдр (нецентрированный) и два AX_4 тетраэдров (центрированных). Для магнетита (Fe_3O_4) эта группировка приводит к одному Fe_4 и двум FeO_4 тетраэдрам (рис.2).

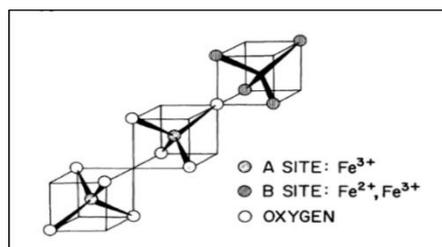


Рисунок 2 Четырнадцать атомов в элементарной ячейке для магнетита.

Нормальные моды изолированных молекулярных ячеек могут быть определены следующим образом: для каждого из $A\text{X}_4$ тетраэдров есть $1A_1$, $1E$, $1T_1$, и $3T_2$ моды, для B_4 : $1A_1$, $1E$, $1T_1$, и $2T_2$. Для магнетита: A_{1g} — валентные симметричные колебания $Fe - O$, E_g и T_{2g} (3) — симметричные и ассиметричные изгибы O относительно Fe , T_{2g} (2) — ассиметричные колебания Fe и O , $T_{2g}(1)$ — колебание всей FeO_4 . [27]

В статье [28] наночастицы магнетита были исследованы с помощью рамановской спектроскопии. Для возбуждения КР-сигналов использовалось излучение на длинах волн 514 нм (выходная мощность 0.5 мВт) и 785 нм (выходная мощность 1.2 мВт). Спектр полученный при возбуждении на линии 514 нм представлен шестью наиболее интенсивными линиями 215, 276, 398, 487, 654 и 1300 cm^{-1} . При сравнении спектров полученных на длинах волн 514 нм и 785 нм наиболее интенсивная полоса на 654 cm^{-1} смещается на 670 cm^{-1} . Это связано с возможным окислением образца, вызванным высокой мощностью лазерного излучения.

Авторами статьи [27] было установлено, что для порошкообразного магнетита лазерное излучение мощностью ниже 25 мВт вызывает быстрое окисление. Первые характерные для гематита пики появляются приблизительно на 300 и 410 cm^{-1} . При дальнейшем увеличении мощности лазерного излучения их интенсивность резко возрастает. Также обнаружено, что интенсивности пиков для гематита значительно больше, чем для магнетита. В результате, даже очень небольшое количество гематита в образце вызывает появление «паразитных пиков» в спектре комбинационного рассеяния магнетита.

1.2.3. Исследования магнетита методом неупругого ядерного рассеяния синхротронного излучения

Неупругое ядерное резонансное рассеяние синхротронного излучения (ЯНР СИ) – метод для изучения динамики атомных колебаний. В отличие от других похожих методов, таких как неупругое рассеяние нейтронов, рентгенография и комбинационное рассеяние, неупругое ядерное рассеяние дает прямую информацию о плотности фононных состояний. Благодаря резонансному характеру взаимодействия амплитуда резонансного рассеяния соизмерима с длиной волны излучения. Кроме того, большое поперечное сечение рассеяния позволяет исследовать динамику решетки очень тонких (~ 10 нм) образцов. Сочетание большого поперечного сечения рассеяния и малых размеров пучка синхротронного излучения ($\sim \text{мм}^2$) позволяет исследовать образцы малой массы (несколько миллиграмм), сверхтонкие пленки и наноматериалы. Методом неупругого ядерного рассеяния можно исследовать поликристаллические, неупорядоченные, и аморфные материалы, более того жидкие или газообразные образцы. Это снимает ограничения на агрегатное состояние исследуемого вещества и позволяет исследовать динамику решетки во время фазового или структурного перехода [29].

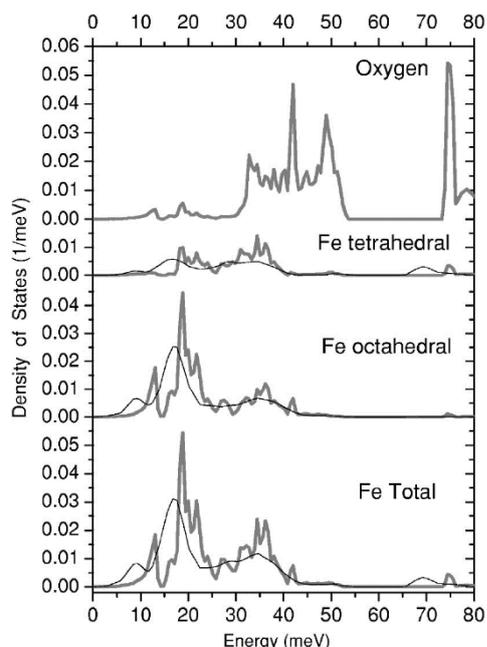


Рисунок 3 Теоретически рассчитаны фоновые плотности состояний для Fe_3O_4 [30,31].

В статьях [30,31] были теоретически рассчитаны фоновые плотности состояний для Fe_3O_4 . Низкочастотная часть спектра обусловлена колебаниями атомов Fe. Острый пик на 12 мЭв обусловлен поперечным движением акустических фононов Fe в октаэдрических позициях. Высоко интенсивные двойные пики на 18.6 и 21.7 мЭв, а также пики на 27,32,34.5,36.1 и 42 мЭв – вклад атомов Fe расположенных в октаэдрической подрешетке (рис.3). Атомы Fe в тетраэдрических позициях не дают значительного вклада в спектр в частотном диапазоне от 0 до 15 мЭв, однако начиная с 18.6 и до 25 мЭв относительный вклад от них возрастает. При значениях частот выше 25 мЭв вклады от атомов Fe в тетраэдрических и октаэдрических позициях становятся соизмеримы друг с другом. Линия экспериментальной кривой фоновой плотности состояний уширена по сравнению с теоретической. Это связано с тем, что реальные ветви дисперсионной кривой при комнатной температуре обычно уширены примерно на 2 мЭв, вследствие фонон-фононного рассеяния, вызванного ангармоничностью. Дополнительное уширение на 3-4 мЭв связано с уменьшением времени жизни фононов.

В работе [30] исследовалась эпитаксиальная (001) пленка магнетита (500нм), синтезированная на подложке MgO (001), обогащенная ^{57}Fe до 95%.

Наблюдалось постепенное изменение формы исходных спектров и соответствующих им фононных плотностей состояний при понижении температуры с 300 К до 25 К (рис.4). В исходном спектре основной пик примерно на 18 мЭв заметно расщепляется, появляется еще один пик на ~ 22 мЭв уже при $T = 120\text{K}$. В спектрах фононной плотности состояний при понижении температуры высокоэнергетическая часть основного пика постепенно расщепляется и смещается в сторону больших энергий, «центр тяжести» пика на 36 мЭв постепенно смещается в сторону низких энергий. При $T_v = 120\text{ K}$ интенсивность пика на 27 мЭв резко возрастает. В зависимости фактора Лэмба-Мессбауэра от температуры наблюдается заметный скачок значений при T_v , что указывает на то, что решетка становится более жесткой.

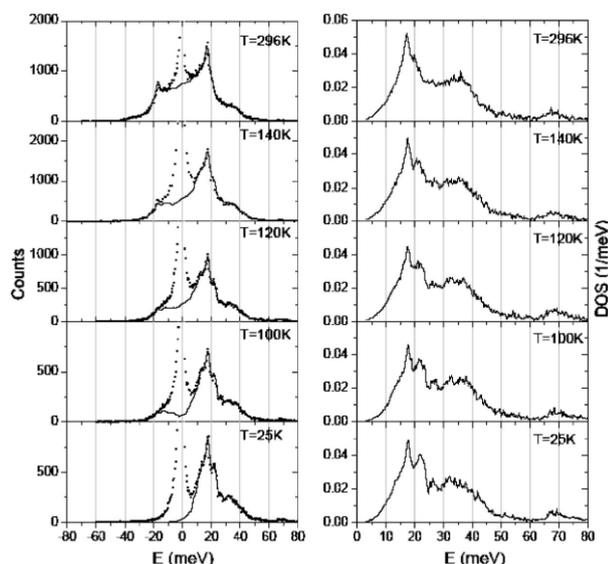


Рисунок 4 Экспериментально измеренные спектры ЯРНР СИ (справа) и парциальные спектры тепловых колебаний атомов Fe (справа).

В статье [32] исследовались образцы монокристаллов-магнетита стехиометрического и легированного цинком. Было предположено, что такие вещества испытывают переход Вервея первого и второго рода соответственно. (Нестехиометричный магнетит испытывает переход вервея второго рода аналогично легированным образцам). Методом неупругого ядерного рассеяния была исследована динамика атомов железа как функция температуры. Спектры фононной плотности состояний обоих образцов при понижении температуры сдвигаются в сторону высоких энергий, вероятно это

связано с изменениями в симметрии решетки. Исследования проведенные авторами статьи [32] говорят о том, что динамика кристаллической решетки магнетита претерпевающего переход Вервея первого и второго рода похожа во всем диапазоне температур.

В статье [33] было исследовано влияние размера частиц и эффектов окисления на спектры фононной плотности состояний. Для спектров нанокристаллических образцов характерно наличие мягких мод, уширение пика на 36 мЭв и увеличение интенсивности на промежутке 40-50 мЭв. Для спектров окисленных образцов характерно наличие пика на 18 мЭв, меньшая интенсивность пиков в области 30-35 мЭв и значительное увеличение интенсивности при энергиях > 40 мЭв. Очевидно, что не только окисление, но и уменьшение размера частиц влияет на наличие мягких мод. Для нанокристаллических образцов характерно изменение локального окружения, резкое возрастание количества граничных атомов, колебательные моды которых приводят к появлению низкоэнергетических мод. На высокоэнергетические моды влияет только окисление образца.

1.3. Исследования структуры и свойств ферригидрита

Гидроксид железа Fe(III) с формулой ($5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) или ферригидрит классифицируется по степени кристаллизации: ферригидрит с двумя («двухлинейчатый») и шестью («шестилинейчатый») линиями в рентгеновской дифрактограмме («six lines» и «two lines»). Появление двух или шести линий обусловлено либо размером частицы, либо степенью кристаллизации [34]. Малые частицы ферригидрита являются суперпарамагнитными. Температура блокировки растет с увеличением размера частицы от 10 до 20 К, и значение сверхтонкого магнитного поля чрезвычайно сильно зависит от размера частиц и уменьшается с уменьшением их размера [35]. Вопрос о катионном распределении в ферригидрите остается открытым. Анализ XAFS спектров оксидов и гидроксидов железа, проведенный авторами в [36], позволил сделать вывод о том, что в

ферригидрите кроме октаэдрических позиций железа существуют и тетраэдрические позиции. Однако, по мнению авторов [36], тетраэдрическое окружение атомов железа может возникать только на поверхности, причем, относительное содержание атомов в таких позициях не превышает 10%. Авторы работы [37] утверждают, что относительное содержание железа в тетраэдрических позициях около 20%. Анализ мессбауэровских спектров, измеренных при температуре $T = 4.2$ К и во внешнем магнитном поле $B_{\text{ext}} = 0$; 3; 6; 9 Тл, приложенном параллельно направлению пролета γ -квантов, в работе [38] показал, что двухлинейчатый ферригидрит является ферримагнетиком, в то время как шестилинейчатый – антиферромагнетик. Кроме того, авторы делают предположение о том, что атомы железа находятся только в октаэдрическом окружении кислорода, так как отсутствует асимметрия линий в спектрах с нулевым внешним полем.

При добавлении ферригидрита в водный раствор атомы железа образуют связи с молекулами воды на его поверхности. Причем молекула H_2O может быть связана только с одним атомом железа в отличие от атома кислорода, который может быть связан с несколькими атомами железа. Таким образом, позиции атомов железа на поверхности и в массиве образца становятся неэквивалентными. Из-за этого происходит модификация поверхности ферригидрита в растворах [39].

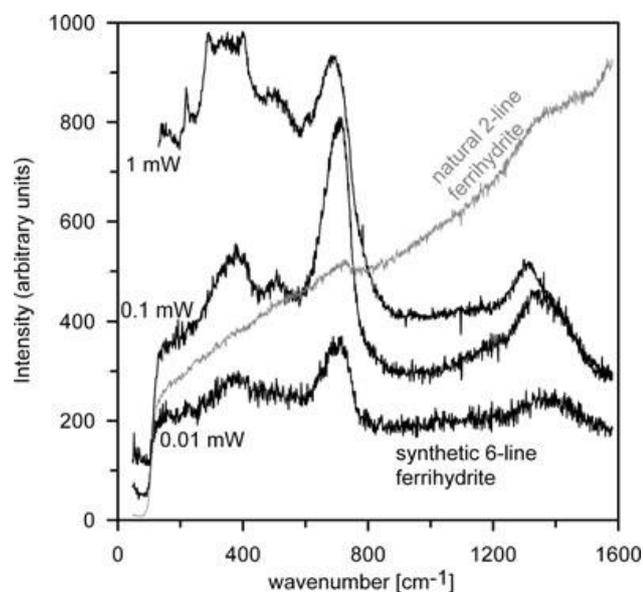


Рисунок 5 Рамановские спектры двухлинейчатого (серая линия) и шестилинейчатого ферригидрита (черная линия), измеренные при разных мощностях лазерного излучения.

На рисунке 5 представлены рамановские спектры природного двухлинейчатого и синтетического шестилинейчатого ферригидрита. В спектре последнего наблюдается три пика на 370, 510 и 710 см⁻¹ интенсивность этих пиков возрастает при увеличении мощности лазера от 0.01 до 0.1 мВ. В спектре двухлинейчатого ферригидрита виден только один пик на 710 см⁻¹. [40]. При увеличении мощности лазера уже при 1 мВ происходит трансформация ферригидрита как двухлинейчатого, так и шестилинейчатого, в гематит.

ГЛАВА 2. МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

2.1. Мессбауэровские исследования

2.1.1. Параметры мессбауэровского спектра

Важнейшими типами взаимодействий атомного ядра с внеядерными полями является электрическое монополюсное, электрическое квадрупольное и магнитное дипольное взаимодействия [41].

Электростатическое взаимодействие ядра конечных размеров с его окружением вызывает сдвиг ядерных энергетических уровней, если существует плотность электронов $|\psi(0)|^2$ в области расположения ядра, на величину:

$$\Delta E = \frac{2}{3} \pi Z e^2 \langle r^2 \rangle |\Psi(0)|^2 \quad (2)$$

Так как в основном и в возбужденном состояниях размеры ядра значительно отличаются, а при переходе от источника к поглотителю в общем случае меняется электронная плотность в области расположения ядра, то будет наблюдаться так называемый изомерный (или химический) сдвиг мессбауэровской линии, который равен:

$$\delta = \frac{c}{E_0} \cdot \frac{2}{5} \pi Z e^2 \left(R_{\text{ex}}^2 - R_{\text{gr}}^2 \right) \left(|\Psi_a(0)|^2 - |\Psi_s(0)|^2 \right) \quad (3)$$

Измерения изомерных химических сдвигов для различных химических соединений позволяют получить информацию об изменении электронной плотности на ядре, отражающем изменения в характере химической связи или в электронной структуре системы. Этот параметр чувствителен к топологическим и композиционным неоднородностям.

Квадрупольное смещение ε компонент мессбауэровской линии определяется электрическим квадрупольным взаимодействием. Квадрупольное смещение возникает при нахождении ядра в неоднородном электрическом поле.

$$\varepsilon = \frac{e^2 q Q}{4} \left(1 + \frac{\eta^2}{3} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (4)$$

Квадрупольное смещение ε компонент сверхтонкой структуры дает информацию о симметрии ближайшего окружения мессбауэровских ядер, об электронной конфигурации и валентности атомов. Параметр ε также чувствителен к топологической и композиционной локальным неоднородностям.

Магнитное дипольное взаимодействие приводит к расщеплению основного и возбужденного состояний, в результате чего в спектре поглощения проявляется несколько линий, число которых соответствует числу возможных переходов между магнитными подуровнями этих состояний [42].

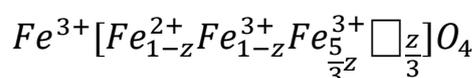
2.1.2. Обработка мессбауэровских данных

Обработка спектров проводилась с помощью модельной расшифровки парциальных спектров в программе SpectrRelax [43]. Задача расшифровки мессбауэровских спектров связана с поиском физических параметров, которыми определяется форма огибающей спектра. Нахождение оптимальных значений параметров спектра, соответствующих выбранной модели, решается с помощью минимизации составного функционала χ^2 .

Для обработки спектров суперпарамагнитных частиц использовалась модель многоуровневой суперпарамагнитной релаксации. Такая модель позволяет задавать количество состояний $2S+1$ (число проекций спина на ось Z). В этой модели к стандартным параметрам зеемановского секстета: сдвиг мессбауэровской линии δ , квадрупольное смещение ε , сверхтонкое магнитное поле в области расположения ядра ^{57}Fe H_n , ширина линии Γ , добавлены параметры, отвечающие за релаксацию.

В предположении, что частицы сферические, используя релаксационный параметр α , который прямо пропорционален объёму частицы, можно оценить размер частиц [44,45].

Для оценки нестехиометрии магнетита [46] была предложена формула:



$$z = \frac{6 - 3k}{6 + 5k}$$

$$k = \frac{S_B}{S_A},$$

где S_A – площадь парциального спектра соответствующего атомам железа в тетраэдрических позициях, S_B – в октаэдрических позициях в структуре магнетита.

2.2. Неупругое ядерное рассеяние синхротронного излучения

Для измерения спектров неупругого ядерного рассеяния требуется синхротронное излучение (СИ) с определенными параметрами, такими как высокая яркость излучения и высокая спектральная плотность. Самый высокоэнергетичный в Европе синхротрон среди источников синхротронного излучения — ESRF. Источник синхротронного излучения третьего поколения, расположенный в Гренобле, Франция – электронный синхротрон на энергию 6 ГэВ, полным током пучка 200 мА и временем жизни 60 часов, горизонтальным эмиттансом 4 нм рад. Благодаря появлению таких мощных источников СИ стала возможной экспериментальная реализация метода ядерного резонансного неупругого рассеяния рентгеновского излучения. Данный метод позволяет измерять парциальную функцию фононных состояний, если в образце присутствуют мессбауэровские изотопы. Экспериментальная установка показана на рисунке 6.

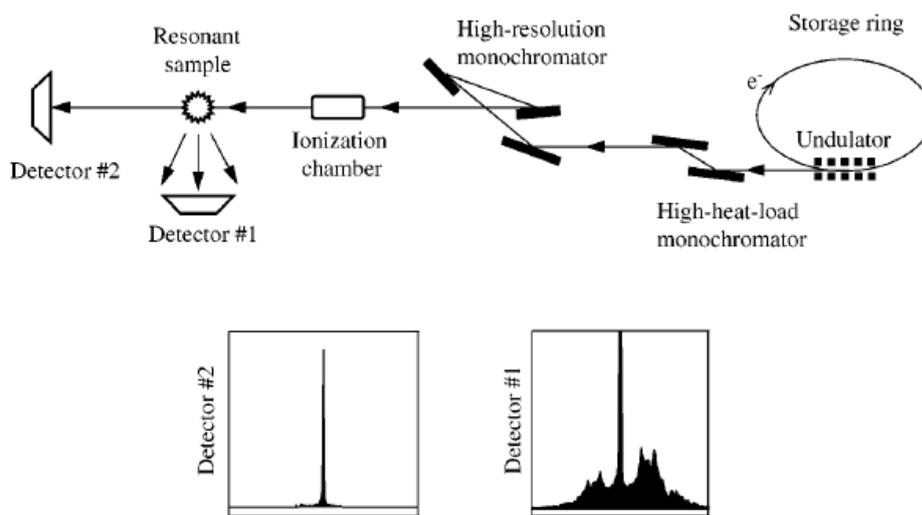


Рисунок 6 Схема установки для измерения спектров неупругого ядерного рассеяния синхротронного излучения.

Пучок синхротронного излучения генерируется ондулятором, расположенным в накопительном кольце. Монохроматизация происходит в два этапа. На первом этапе, пропускная способность снижается до нескольких эВ монохроматором высокой тепловой нагрузки. Монохроматор состоит из двух независимых кристаллов (кремний на ESRF), которые охлаждаются. На втором этапе, пропускная способность снижается вплоть до нескольких мЭВ с помощью монохроматора с высокой разрешающей способностью. После монохроматора высокого разрешения, луч проходит через ионизационную камеру, которая контролирует поток падающего излучения, облучающего образец, и возбуждает резонансные ядра. Рассеянное излучение считается двумя лавинными фотодиодными детекторами. Первый детектор располагается как можно ближе, чтобы обеспечить перекрытие максимального телесного угла. Второй детектор расположен дальше от образца и регистрирует рассеяние вперед. С помощью него измеряется инструментальная функция спектрометра [29].

2.2.1. Обработка спектров

Экспериментально полученные энергетические зависимости ядерного поглощения после нормировки дают вероятность ядерного поглощения как функцию энергии падающего рентгеновского излучения. Типичный спектр

представлен на рисунке 7. Узкий пик при $E = 0$ отвечает упругому рассеянию резонансных фотонов. Правая часть спектра ($E > 0$) соответствует процессам рождения фононов, а левая часть ($E < 0$) — процессам уничтожения фононов.

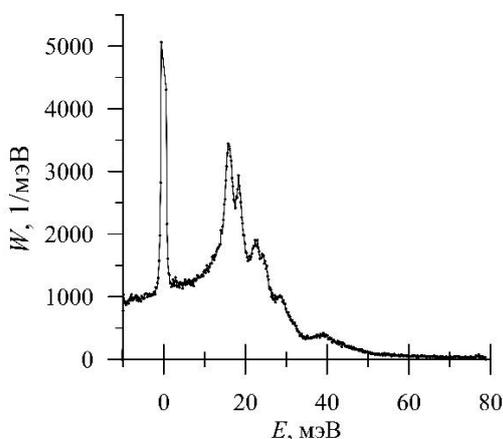


Рисунок 7 Экспериментально измеренный спектр ЯРНР СИ для сидерита.

Центральный пик, связанный с упругим рассеянием СИ, вычитается с использованием инструментальной функции спектрометра. Процедура вычитания сильного центрального пика не дает возможности точного восстановления спектра при малых энергиях, близких по величине к ширине этого пика, при конечной статистической точности данных. После вычитания центрального пика и нормировки получаем экспериментально измеренные спектры ЯРНР соответствуют неупругой части вероятности ядерного поглощения $S(E)$.

Парциальная плотность колебательных состояний атомов железа $g(E)$ вычисляется с помощью двойного фурье-преобразования функции $S(E)$. Процедура обработки экспериментальных данных включает все необходимые поправки, в том числе учитывает многофононные процессы резонансного поглощения. На рисунке 8 представлены зависимости $g(E)$, площади под спектрами нормированы на единицу [29].

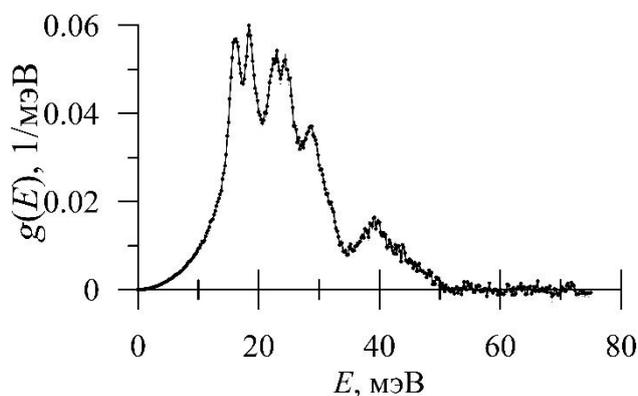


Рисунок 8 Парциальный спектр тепловых колебаний атомов железа в структуре сидерита.

2.3. Рамановская спектроскопия

Для получения всех спектров комбинационного рассеяния использовался сканирующий конфокальный лазерный рамановский микроспектрометр «Confotec CARS» в сочетании с инвертированным микроскопом NIKON TE2000-E и с использованием двух микрообъективов 40x-0.6NA и 60x-1.2NA (рис.9). Для калибровки частоты использовалась полоса 520 см^{-1} кремниевой пластины. На оптической платформе для исследования комбинационного рассеяния установлены три цветных лазера. Для возбуждения КР-сигналов на длинах волн 633 и 532 нм использовался He-Ne-лазер (модель Melles Griot 05-LHP-991) и диодным лазером с регулируемой выходной мощностью (модель SLM-417-20) соответственно. Возбуждение на 785 нм обеспечивалось пикосекундным лазером с пассивной синхронизацией на частоте 85 МГц (модель EKSPLA, PT257-SOPO), настраиваемым в диапазоне 690-990 нм.

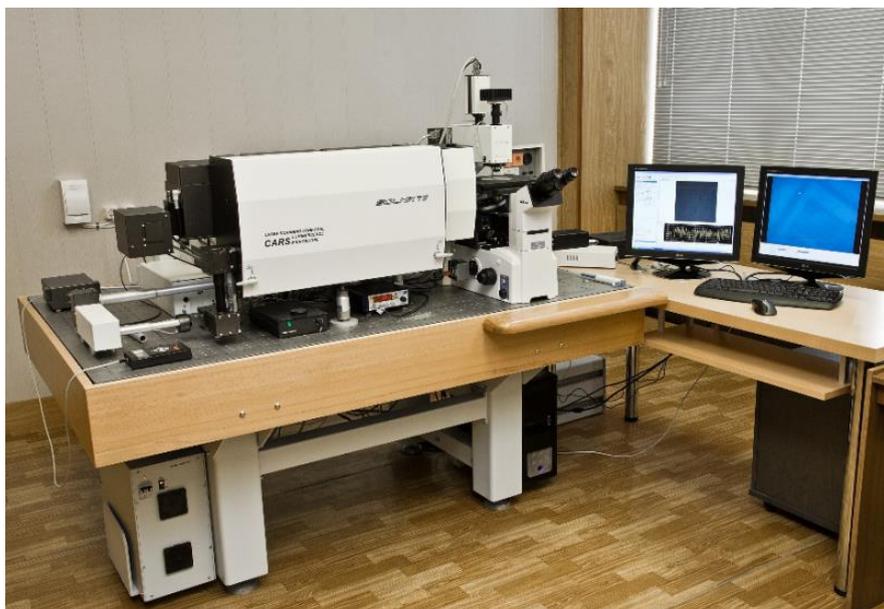


Рисунок 9 Фотография сканирующего конфокального лазерного рамановского микроспектрометра «Confotec CARS» и инвертированного микроскопа NIKON TE2000-E

Средняя мощность лазера на образце контролируется переменным нейтральным фильтром с оптической плотностью 0-3, что позволяет варьировать мощность от нескольких мкВт до десятков мВт. Свет возбуждения фокусировался на образец в пятне ~ 1 мкм (40x) или в пятне ~ 650 нм в случае нанесения капли воды на объектив с высоким NA.

Полезный световой сигнал, прошедший через фильтры фокусируется с помощью объектива на регулируемом по диаметру конфокальном отверстии и попадает в монохроматор-спектрограф модели MS520 с решеткой 600 штр. / мм и детектируются с помощью ПЗС-матрицы с охлаждением Пельтье Камеры (ProScan HS-101 H), охлажденной до -20 °С. Обычно спектры получали при разных локализациях образцов с временем интегрирования (1-30 сек.), со спектральным разрешением $2,0$ см⁻¹. Камера для записи изображения на экране, прикрепленная к микроскопу, позволяла получать микрофотографии белого света в исследуемой области [47].

ГЛАВА 3. ПРОЦЕССЫ БАКТЕРИАЛЬНОГО ПРЕОБРАЗОВАНИЯ ФЕРРИГИДРИТА И МАГНЕТИТА

Целью данной работы было исследование преобразования синтезированных ферригидрита и магнетита в процессе развития анаэробных бактерий в щелочных условиях. Работа велась в сотрудничестве с сотрудниками лаборатории реликтовых микробных сообществ института микробиологии им. С.Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН с.н.с. Д.Г. Заварзиной и в.н.с. Т.Н. Жилиной. Работы по подготовке образцов, включая сушку образцов проводились в лаборатории института микробиологии. Нашей задачей являлась диагностика преобразований минеральных фаз, полученных в результате разных экспериментов, с разными бактериями, объединенными только тем, что все исследуемые бактерии являлись анаэробными и были выделены из содовых озер, т.е. развивались при значениях рН 9-10. Таким образом, приведенные ниже результаты являются составной частью нескольких отдельных (не связанных друг с другом) экспериментальных исследований, но связанных с изучением биогеохимического цикла железа в анаэробных условиях содовых озер. Такая ситуация привела к необходимости дать в начале экспериментальной части схему, позволяющую визуализировать эксперименты, которые проводились нашими коллегами, а также ввести подробную рубрикацию, где в начале каждого раздела кратко излагается цель большого эксперимента, частью которого являлись исследования твердых фаз, приведенные в дипломной работе.

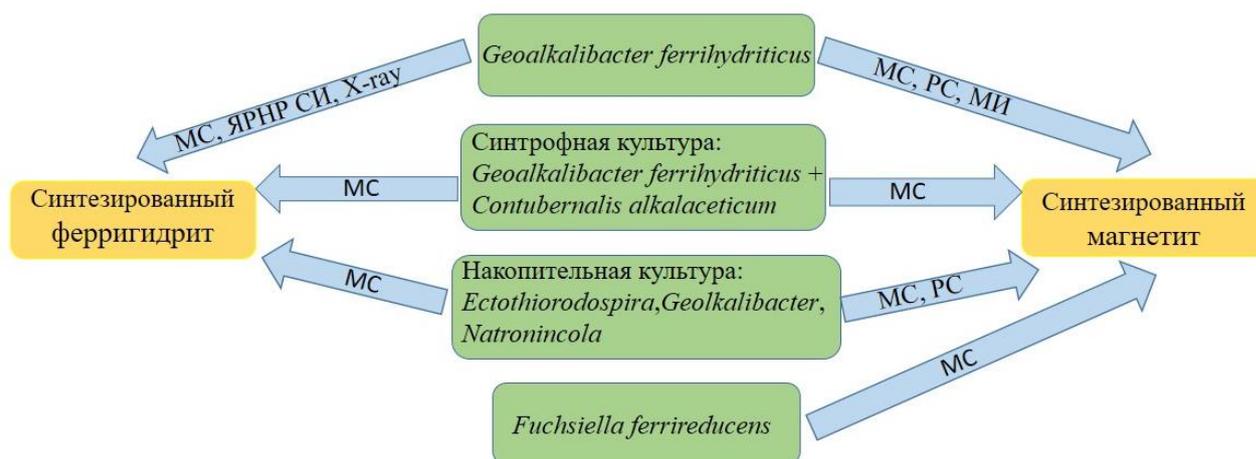


Рисунок 10 Визуализация объектов и методов исследования. МС – мессбауэровская спектроскопия, ЯНР СИ – метод ядерного резонансного неупругого рассеяния синхротронного излучения, РС – рамановская спектроскопия, МИ – магнитные измерения.

3.1. Процессы преобразования синтезированного магнетита *Geoalkalibacter ferrihydriticus* при pH 9.5

Для проведения исследований был синтезирован магнетит: эквивалентные количества солей сульфата двух- и трех- валентного железа титровались 10% раствором NaOH до pH 8.5, затем осадок трехкратно декантировали дистиллированной водой. В процессе приготовления вероятно образование небольшой примеси гидроокиси трехвалентного железа. Полученный магнетит был добавлен в минеральную среду, предназначенную для культивирования алкалофильной диссимиляторной бактерии *Geoalkalibacter ferrihydriticus* (штамм Z-0531) (рис. 11). Данная бактерия способна восстанавливать аморфный гидроксид Fe(III), антрахинон-2,6-дисульфонат (синтетический аналог гуминовых кислот), Mn(VI) и S⁰, окисляя ацетат [3]. В ряде экспериментов в минеральную среду культуры добавлялся ацетат.

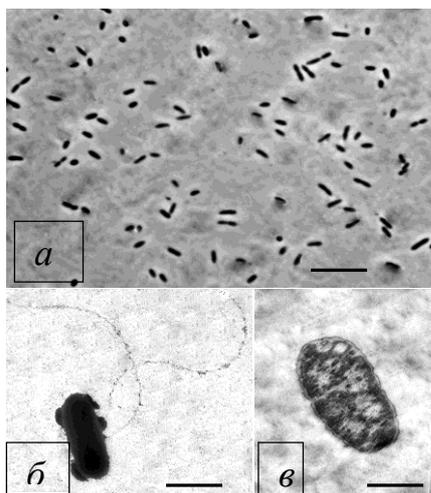


Рисунок 11 *Geoalkalibacter ferrihydriticus* (штамм Z-0531) а) фотография, сделанная с помощью оптического микроскопа, масштаб шкалы – 10 мкм б) изображение клетки с боковыми жгутиками, масштаб шкалы – 1.0 мкм в) изображение продольного среза клетки, масштаб шкалы – 0.5 мкм, полученные при помощи электронной микроскопии [3].

Мессбауэровские исследования проводились при комнатной температуре и при $T = 81$ К. Для обработки мессбауэровских спектров была использована модель, состоящая из трех зеемановских секстетов в модели многоуровневой суперпарамагнитной релаксации и двух квадрупольных дублетов. Секстеты S_1 , S_2 , S_3 относятся к трем различным позициям атомов железа в структуре нестехиометрического магнетита: S_1 , S_2 – атомам Fe^{3+} в тетраэдрическом и октаэдрическом кислородных окружениях соответственно, а S_3 – атомам $Fe^{2.5+}$ в октаэдрическом окружении; дублет D_1 соответствует атомам Fe^{3+} , а D_2 – атомам Fe^{2+} .

3.1.1. Исследования преобразования синтезированного магнетита бактерией в отсутствие органических доноров электронов в минеральной среде

В данном эксперименте предполагалось показать, что магнетит, содержащий в себе атомы и трех- и двухвалентного железа, может выступать одновременно и в качестве донора, и в качестве акцептора электронов. При этом осуществляется перенос электрона с двухвалентного атома железа на трехвалентный атом в структуре магнетита (рис.12), что должно приводить к

образованию двух новых минеральных фаз: более окисленной и более восстановленной по отношению к магнетиту.

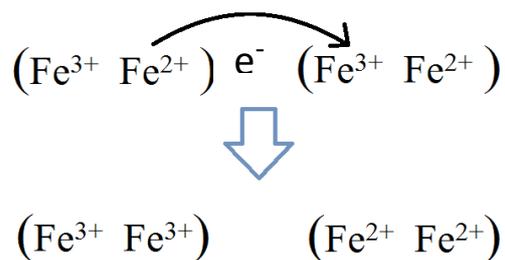


Рисунок 12 Схематичное изображение биоминерализации магнетита в отсутствии органического донора электронов.

Для проведения описанного эксперимента бактерия *Geoalkalibacter ferrihydriticus* (штамм Z-0531) была пересеяна с ферригидрита на синтезированный магнетит. Были проведены шесть периодических пересевов для доказательства возможности роста культуры в заданных условиях. Исследовались контрольный образец, полученный в результате абиотического взаимодействия синтезированного магнетита с минеральной средой и образцы, полученные в результате роста бактерии на минеральной среде в присутствии синтезированного магнетита.

Параметры мёссбауэровского спектра контрольного образца, измеренного при комнатной температуре (рис. 13 а), представлены в Таблице 1. Секстеты S_1 , S_2 , S_3 относятся к позициям атомов железа в структуре магнетита. Квадрупольный дублет D_1 – может соответствовать атомам Fe^{3+} как в структуре гидроксида железа, так и в структуре малых частиц (диаметр частиц составляет примерно 13 нм) магнетита или маггемита [48,49].

Таблица 1 Параметры спектра контрольного образца ($T=300$ К)

Парц. спектр	I, %	δ , мм/с	ϵ , мм/с	H, кЭ	d, нм
S_1	$27,1 \pm 1,8$	$0,24 \pm 0,18$	$0,07 \pm 0,18$	492 ± 2	$13,2 \pm 0,4$
S_2	$33,8 \pm 1,7$	$0,37 \pm 0,15$	$-0,06 \pm 0,15$	491 ± 2	
S_3	$32,2 \pm 0,7$	$0,68 \pm 0,02$	$-0,04 \pm 0,02$	464 ± 2	
D_1	$6,9 \pm 0,4$	$0,34 \pm 0,01$	$0,38 \pm 0,02$	-	-

Для определения формирующейся фазы, содержащей атомы Fe^{3+} , был измерен спектр при $T = 81$ К (рис. 13 б). Относительная интенсивность парциального спектра D_1 в случае контрольного образца равна $I_{D_1} = 7,3 \pm 0,4\%$. Так как значение данной интенсивности практически не изменяется с уменьшением температуры измерения, можно сделать вывод о том, что парциальный спектр D_1 не является парциальным спектром суперпарамагнитных частиц магнитоупорядоченной фазы, а соответствует трехвалентным атомам железа по-видимому в структуре гидроксида железа Fe(III) , образовавшегося при синтезе магнетита.

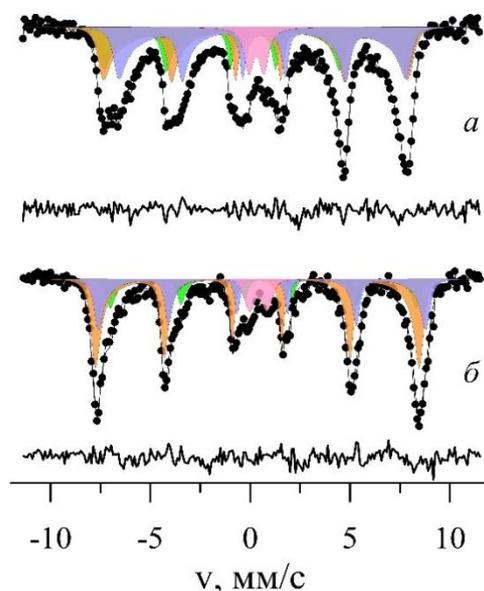


Рисунок 13 Мессбауэровские спектры ядер ^{57}Fe в структуре минералов контрольного образца при а) комнатной температуре, б) $T = 81$ К.

При сравнении спектров контрольного образца и образца, полученного в случае роста бактерии, в последнем наблюдается появление квадрупольного дублета D_2 . Параметры этого квадрупольного дублета соответствуют атомам Fe^{2+} в структуре сидерита (см. Таблицу 2). Анализ спектров показал, что размер частиц магнетита не меняется. Для определения формирующейся фазы, содержащий атомы Fe^{3+} , были измерены спектры при $T = 81$ К (рис. 14).

Таблица 2 Параметры спектра образца, полученного в результате роста бактерии ($T=300$ К)

Парц. спектр	I , %	δ , мм/с	ε , мм/с	H , кЭ	d , нм
S_1	$27,8 \pm 3,9$	$0,24 \pm 0,03$	$0,04 \pm 0,03$	493 ± 2	$13,1 \pm 0,4$
S_2	$27,2 \pm 3,7$	$0,38 \pm 0,04$	$-0,05 \pm 0,03$	488 ± 3	
S_3	$30,3 \pm 1,8$	$0,66 \pm 0,02$	$-0,03 \pm 0,02$	466 ± 3	
D_1	$7,1 \pm 0,5$	$0,33 \pm 0,01$	$0,32 \pm 0,01$	-	-
D_2	$7,9 \pm 0,7$	$1,24 \pm 0,01$	$0,95 \pm 0,01$	-	-

Относительная интенсивность парциального спектра в случае опытного образца равны $I_{D1} = 8.9 \pm 0.6\%$. Так как значение интенсивности практически не изменяется при изменении температуры измерения, можно сделать вывод о том, что парциальный спектр D_1 соответствует трехвалентным атомам железа в структуре гидроксида, аналогично контрольному образцу.

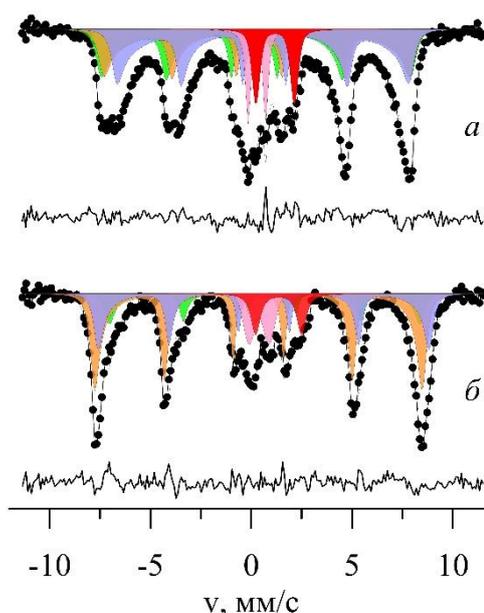


Рисунок 14 Мессбауэровские спектры ядер ^{57}Fe в структуре минералов, полученных в результате роста бактерии, измеренные при а) комнатной температуре, б) $T = 81$ К.

Изучение спектров опытных образцов полученных при последовательных пересевах (рис. 15) показало, что не происходит перераспределения относительных вкладов в интенсивность от парциальных спектров в структуре магнетита, а интенсивность квадрупольного дублета,

соответствующего сидериту, уменьшается. Это означает, что интенсивность преобразования магнетита с каждым последующим пересевом уменьшается, что свидетельствует о том, что заданные условия являются неблагоприятными для роста *Geoalkalibacter ferrihydriticus*. Подобное явление может быть связано с отсутствием в среде факторов роста (таких как, витамины, органический источник углерода), необходимых для развития микроорганизма. Этот вывод не отменяет принципиального вывода о возможности использования синтезированного магнетита одновременно в качестве донора и акцептора электронов.

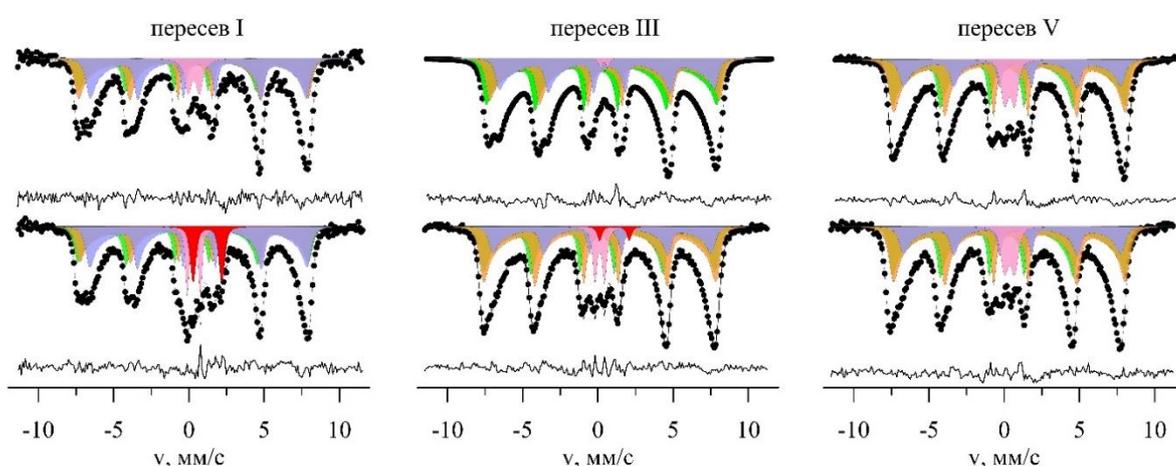


Рисунок 15 Мессбауэровские спектры контрольных образцов (верхняя строка) и образцов, полученных в результате роста бактерии в среде в присутствии синтетического магнетита и в отсутствие ацетата (нижняя строка).

3.1.2. Исследования преобразования синтезированного магнетита *Geoalkalibacter ferrihydriticus* в присутствии органического донора электронов при pH 9.5

Нами были исследованы образцы, полученные в результате экспериментов, в которых исследовалась возможность роста *Geoalkalibacter ferrihydriticus* в присутствии синтезированного магнетита и органического донора в минеральной среде (рис.16). В качестве последнего использовался ацетат (10 мМ). Целью экспериментов было доказательство возможности использования бактерией трехвалентного железа, входящего в состав синтезированного магнетита в качестве акцептора электронов.

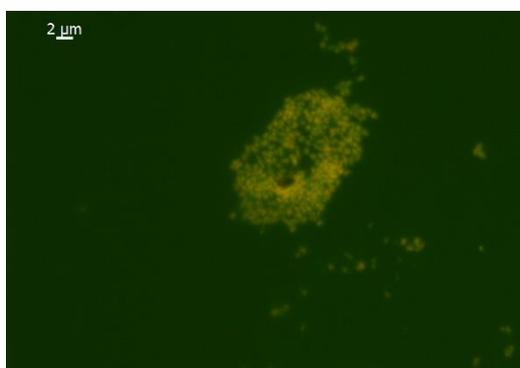


Рисунок 16 Фотография клеток *Geoalkalibacter ferrihydriticus*, колонизирующих поверхность магнетита с ацетатом, добавленным в качестве донора электронов. Фотография получена на люминесцентном микроскопе. Клетки бактерии окрашены флуоресцентным красителем акридин оранжевым. Фото предоставлено для диплома с.н.с. Заварзиной Д.Г.

Мессбауэровские спектры были измерены для контрольного образца и образца, полученного в результате роста бактерии, при температурах $T = 300$ К и $T = 81$ К. Для обработки спектров, измеренных при $T = 81$ К (рис. 17), была использована модель, состоящая из четырех зеемановских секстетов S_1, S_2, S_3, S_4 в модели многоуровневой суперпарамагнитной релаксации. Секстеты S_1 и S_3 относятся к атомам Fe^{2+} в октаэдрических позициях, а S_2, S_4 — атомам Fe^{3+} в тетраэдрических и октаэдрических позициях магнетита соответственно. При сравнении спектров контрольного и опытного образцов видно, что относительная интенсивность парциального спектра S_1 , соответствующего двухвалентным атомам железа уменьшается, а

интенсивность парциального спектра, соответствующего трёхвалентным атомам железа S_4 , возрастает примерно на 2% (Таблица 3).

Таблица 3 Относительные интенсивности парциальных спектров контрольного и опытного образца

Парц. спектр	I , % контроль	I , % опыт
S_1	$7,44 \pm 0,24$	$5,69 \pm 0,23$
S_2	$34,7 \pm 0,9$	$34,8 \pm 0,9$
S_3	$22,7 \pm 0,7$	$22,2 \pm 0,7$
S_4	$35,1 \pm 1,2$	$37,2 \pm 1,1$

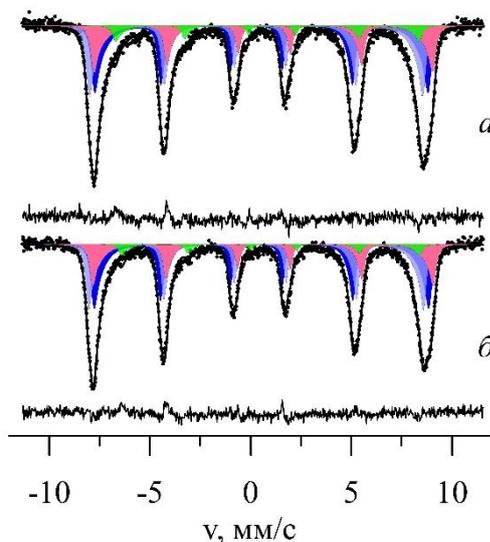


Рисунок 17 Мессбауэровские спектры ядер ^{57}Fe в структуре минералов а) контрольного образца, б) опытного образца при $T = 81$ К.

Для этих образцов были исследованы также магнитные свойства. Магнитные измерения были проведены на кафедре магнетизма физического факультета МГУ Родионовым И.Д. Проведены исследования зависимости намагниченности от температуры во внешнем магнитном поле 10 кЭ в режимах ZFC (zero field cooled) и FC (field cooled) в диапазоне температур 80 – 300 К (рис.18). Анализ этих зависимостей показал, что значение намагниченности насыщения больше для опытного образца, чем для контрольного (51,5 емю/г, 54,5 емю/г).

На рис. 19 представлены петли гистерезиса, измеренные при температурах 80 К и 300 К. Анализ зависимости $M(H)$ показал, что для контрольного образца значения коэрцитивных сил при температурах 80 К и

300 К в режиме FC равны 254 Э и 61 Э, соответственно. Для образца, полученного в результате роста бактерии значения коэрцитивной силы составили 270 Э и 61 Э при температурах 80 К и 300 К, соответственно. Кроме того, наблюдается увеличение намагниченности для опытного образца при сравнении с контрольным.

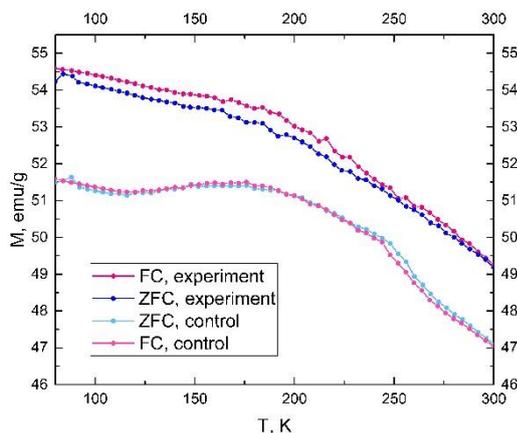


Рисунок 18 Температурный ход намагниченности в режиме ZFC и FC, измеренный при нагреве-охлаждении (80-300-80К) контрольного образца и опытного образца во внешнем магнитном поле 10 кЭ.

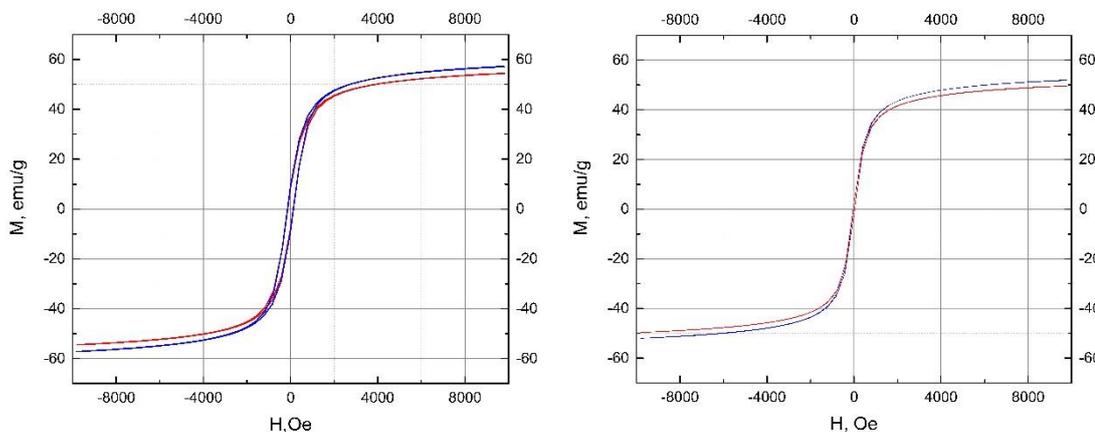


Рисунок 19 Петли гистерезиса, измеренные при температуре 80К (слева) и 300К (справа), для контрольного образца (красная линия), опытного образца (синяя линия).

Рамановские спектры образцов синтетического магнетита были получены при комнатной температуре. Для возбуждения КР-сигналов использовалось излучение на длине волны 633 нм. Световой сигнал фокусировался с помощью иммерсионного объектива 60х. Для обеспечения

требуемой спектральной области и спектрального разрешения в монохроматоре-спектрографа использовалась дифракционная решетка 600 штр./мм. Рамановские спектры контрольного, и опытного образца мало отличаются друг от друга и представляют набор характерных пиков для магнетита (рис. 20).

Проведенные исследования образцов показали, что не происходит существенного изменения фазового состава образца и его магнитных свойств. Небольшое увеличение фазы, соответствующей трехвалентным атомам железа вероятнее, вызвано окислением образца, которое может быть вызвано как окислением образца, так и жизнедеятельностью бактерии. Таким образом, показано, что *Geoalkalibacter ferrihydriticus* не способен использовать синтезированный магнетит в качестве акцептора электронов.

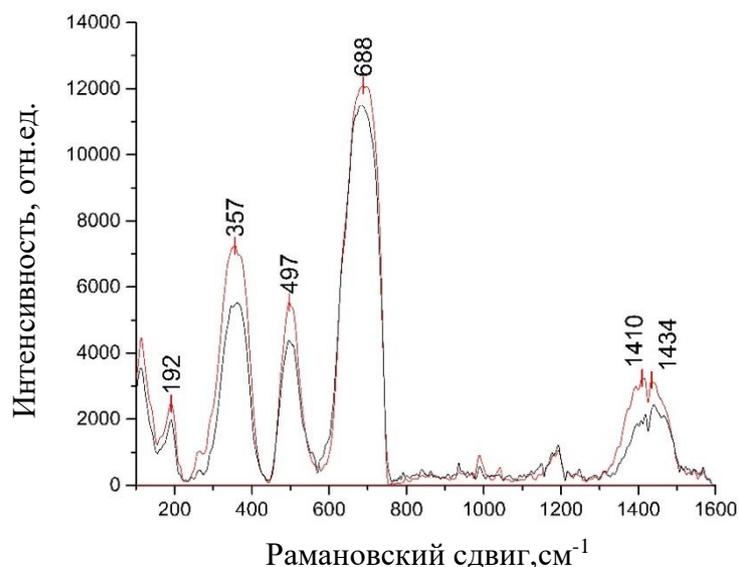


Рисунок 20 Рамановский спектр контрольного образца (черная линия) и опытного образца (красная линия).

3.2. Исследования процессов преобразования гидроксидов и оксидов железа синтрофной культурой анаэробных бактерий *Geoalkalibacter ferrihydriticus* и *Contubernalis alkalaceticum* при pH 9.5

Целью экспериментов являлась демонстрация возможности синтрофного роста алкалофильных бактерий: *Geoalkalibacter ferrihydriticus* (штамм Z-0531) и *Contubernalis alkalaceticum* [50] на синтезированном магнетите и синтезированном ферригидрите с этанолом в качестве донора

электронов. *Contubernalis alkalaceticum* – облигатно синтрофная бактерия, не способная расти в отсутствие партнера, осуществляющего окисление водорода, образующегося при сбраживании этанола. Эту функцию в эксперименте осуществлял *Geoalkalibacter ferrihydriticus*, использующий водород в качестве донора электронов, а синтезированный ферригидрит или магнетит в качестве акцептора электронов. Также было исследовано влияние времени на преобразование минералов.

3.2.1. Исследование преобразования синтезированного ферригидрита синтрофной культурой в присутствии этанола при pH 9.5

Для изучения процессов биоминерализации синтезированного ферригидрита под воздействием синтрофной культуры были проведены мессбауэровские исследования при комнатной температуре контрольного и опытного образцов. Для обработки полученных спектров была использована модель, состоящая из двух квадрупольных дублетов. Параметры квадрупольного дублета, отмеченного розовым на рисунке соответствуют трехвалентным атомам железа в структуре синтезированного ферригидрита, а дублета, отмеченного красным, — двухвалентным атомам железа в структуре сидерита (рис.21).

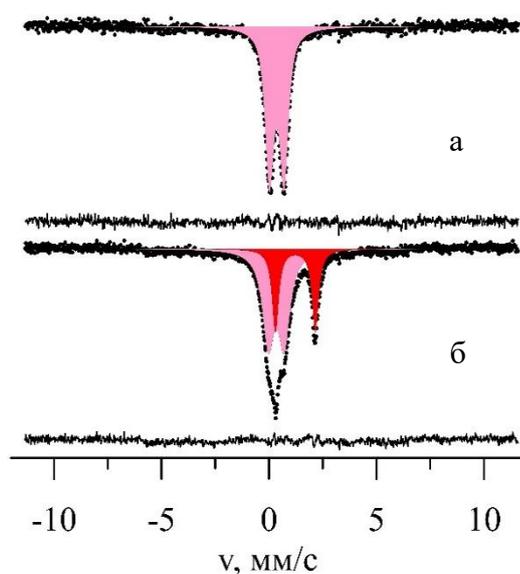


Рисунок 21 Мессбауэровские спектры, измеренные при $T = 300$ К, контрольного образца синтезированного ферригидрита (а), опытного образца, полученного в результате роста бактерий (б).

добавлении синтезированного ферригидрита и этанола в минеральную среду показало, что в процессе роста синтрофной культуры бактерий *Geoalkalibacter ferrihydriticus* (штамм Z-0531) и *Contubernalis alkalaceticum* наблюдается восстановление атомов Fe^{3+} с образованием сидерита.

3.2.2. Исследования преобразования синтезированного магнетита синтрофной культурой в присутствии этанола при pH 9.5

В опытах с синтезированным магнетитом и этанолом был исследован рост синтрофной культуры в средах, содержащих различную концентрацию минерала (рис.22). Для этого были исследованы контрольный образец и опытные образцы, полученные в результате роста бактерий в присутствии 10 и 40 мМ СМ. Образцы анализировались через месяц после засева синтрофной культуры.

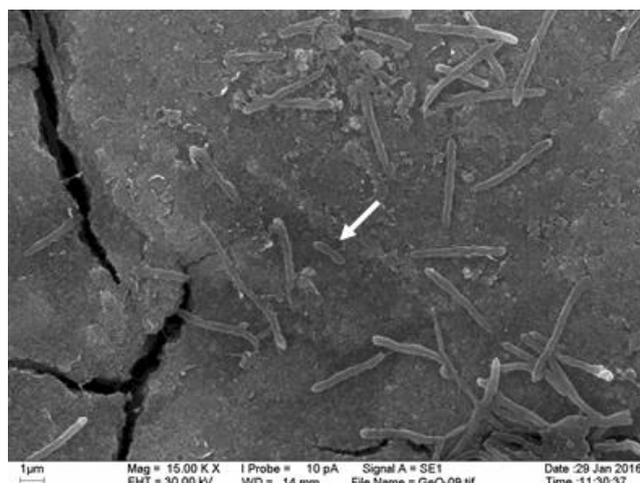


Рисунок 22 Сканирующий электронный микроскоп. Развитие синтрофной культуры на поверхности магнетита. Стрелкой показаны клетки *Geoalkalibacter ferrihydriticus*, остальные – клетки *Contubernalis alkalaceticum*. (Фото предоставлено для диплома Д.Г. Заварзиной).

Анализ спектров контрольного образца и опытного, полученного при росте синтрофной культуры в присутствии 10 мМ магнетита (рис. 23 (а,б)) показал, что в нем происходит изменение параметров парциальных спектров S_1, S_2, S_3 , увеличивается значение относительной интенсивности дублета D_1 . Кроме того, в спектре опытного образца наблюдается появление двух секстетов S_5, S_6 релаксационного типа и одного квадрупольного дублета D_2 . Секстеты S_5 и S_6 соответствуют малым частицам нестехиометрического магнетита ($z = 0.52$). Параметры дублета D_2 характерны для атомов Fe^{2+} в структуре сидерита.

Спектр опытного образца в присутствии 40 мМ магнетита в среде обрабатывался в рамках модели аналогичной образцу, содержащему 10 мМ магнетита, состоящей из пяти зеемановских секстетов и двух квадрупольных дублетов (рис. 23 в). Анализ спектра показал, что S_1, S_2, S_3 соответствуют атомам железа в разных позициях в структуре магнетита со степенью стехиометрии $z = 0.14$, секстеты S_5 и S_6 соответствуют малым частицам нестехиометрического магнетита ($z = 0.53$). Относительные интенсивности дублетов в этом случае составили примерно 1 %.

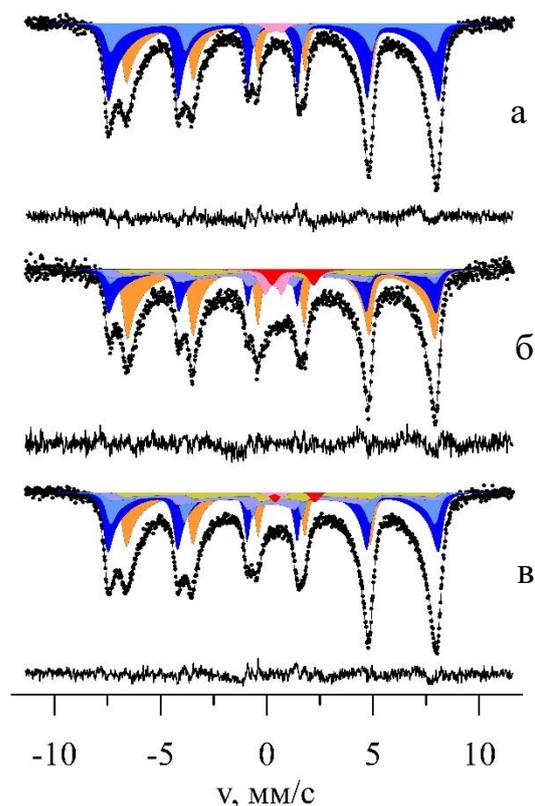


Рисунок 23 Мессбауэровские спектры ядер ^{57}Fe в структуре а) контрольного образца, образцов, полученных в результате роста синтрофной культуры в присутствии (б) 10 мМ, (в) 40 мМ синтезированного магнетита в минеральной среде.

Таким образом, при росте синтрофной культуры алкалофильных анаэробных бактерий *Contubernalis alkalaceticum* и *Geoalkalibacter ferrihydriticus* в присутствии синтезированного магнетита и этанола в минеральной среде происходит перекристаллизация магнетита и гематита с образованием хорошо раскристаллизованного магнетита и малых частиц нестехиометического магнетита (фаза близкая к маггемиту). При малой концентрации исходного магнетита (10 мМ) происходит увеличение относительного содержания ферригидрита и сидерита, что не наблюдается при большей исходной концентрации магнетита (40 мМ).

Для исследования влияния времени культивирования на формирующиеся минеральные фазы был измерен мессбауэровский спектр опытного образца (рис.24), полученного в результате роста синтрофной культуры через шесть месяцев после засева. В данном случае исходное содержание синтезированного магнетита в минеральной среде составляло

40 мМ. При сравнении спектров образцов, полученных через один и шесть месяцев после засева, в спектре последнего наблюдается увеличение относительной интенсивности секстетов, соответствующих малым частицам нестехиометрического магнетита, в 3,5 раза. Рассчитанное значение z для формирующихся малых частиц больше для образца, полученного в результате роста бактерии в течении шести месяцев. Кроме того, в исследуемом спектре, появляется квадрупольный дублет, параметры которого соответствуют трехвалентным атомам железа. Значения параметров не позволяют сделать утверждение, что формирующуюся фаза – ферригидрит.

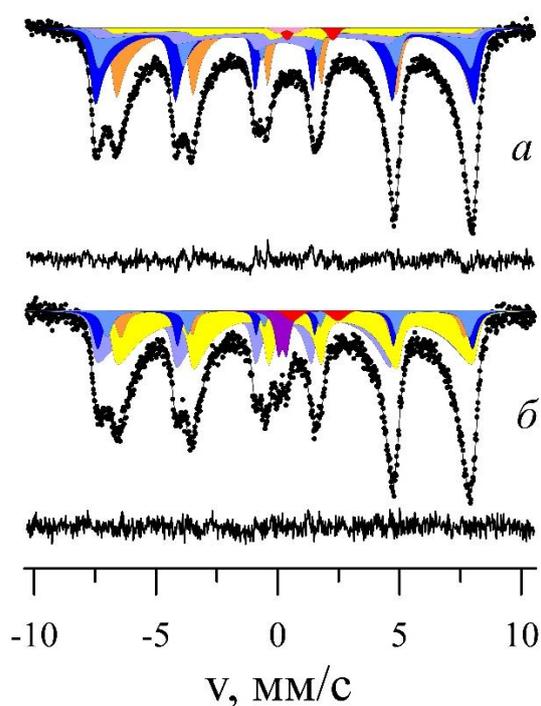


Рисунок 24 Мессбауэровские спектры ядер ^{57}Fe в структуре образцов, полученных через один (*a*) и шесть (*б*) месяцев после засева синтрофной культуры в минеральную среду, содержащую 40 мМ синтезированного магнетита.

Таким образом, время культивирования синтрофной культуры влияет на относительное содержание формирующихся частиц магнетита и их степень стехиометрии, кроме того при увеличении времени культивирования формируется новая фаза, содержащая трехвалентные атомы железа.

3.3. Процессы биогенного преобразования синтезированных ферригидрита и магнетита накопительной культурой: *Ectothiorodospira sp.*, *Geokalibacter sp.*, *Natronincola sp.*

Целью эксперимента было исследование возможности автотрофного роста накопительной культуры на свету, существующей за счет преобразования минералов железа при полном отсутствии органического источника углерода. Полученная в результате нескольких последовательных пересевов на синтезированном магнетите на свету накопительная культура, по данным метагеномного анализа содержала три формы бактерий таксономически близких к аноксигенным фототрофам рода *Ectothiorodospira* и железоредуцирующим бактериям родов *Geokalibacter* и *Natronincola*. Для выделения чистых культур этих бактерий из накопительной культуры был применен метод последовательных десятикратных разведений, при котором в каждую последующую пробирку, содержащую 10 мл среды вносится 1 мл посевного материала из предыдущей. Таким образом, при условии, что в исходной пробирке содержится 10^9 кл/мл, в девятую по счету пробирку попадет только одна клетка, из которой может быть получена чистая культура. Этот метод позволяет, с одной стороны определить исходную численность бактерий в накопительной культуре (последнее разведение, в котором наблюдается рост), с другой – выделить доминирующую форму в чистую культуру. Нами были проанализированы образцы минералов (магнетита или ферригидрита), полученные в результате роста накопительной культуры, а также из последних положительных разведений.

3.3.1. Исследования преобразования синтезированного ферригидрита в процессе роста накопительной культуры

Для изучения биогенного преобразования синтезированного ферригидрита, были проведены мессбауэровские исследования при комнатной температуре. Были измерены спектры образцов, полученные в результате роста накопительной культуры, а также из последнего положительного разведения, полученного при попытке выделения чистой

культуры аноксигенных фототрофов рода *Ectothiorodospira*, являющейся преобладающей формой в исследуемой накопительной культуре (рис. 25).

Для обработки полученных спектров использовалась модель, состоящая из трех квадрупольных дублетов, два из которых соответствуют трехвалентным атомам железа в структуре ферригидрита, третий – двухвалентным атомам железа.

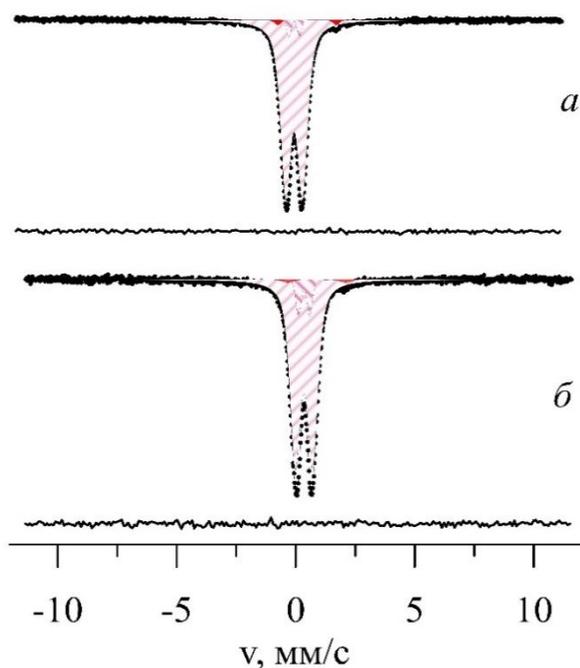


Рисунок 25 Мессбауэровские спектры ядер ^{57}Fe в структуре минералов а) образца, полученного в результате роста накопительной культуры б) образца, полученного после второго пересева.

Исследования синтезированного ферригидрита показали, что в процессе роста синтрофной культуры наблюдается образование новой фазы, содержащей двухвалентные атомы железа. Относительное содержание образующейся фазы $\sim 1,5\%$ как в случае роста накопительной культуры, так и в случае второго пересева.

3.3.2. Исследования преобразования синтезированного магнетита в процессе роста накопительной культуры на свету

Были проведены исследования минералов, образующихся в процессе преобразования синтезированного магнетита накопительной культурой на свету (рис.26). Также исследовались контрольный образец и образец, полученный в результате роста бактерий из последних положительных разведений.

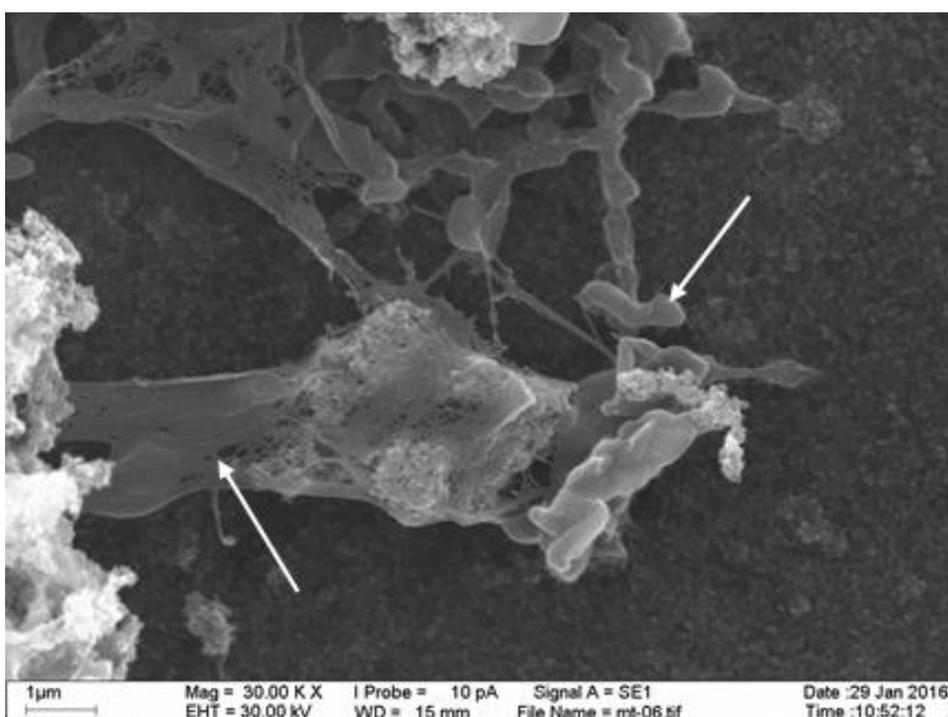


Рисунок 26 СЭМ. Развитие накопительной культуры на поверхности синтезированного магнетита на свету. Стрелками показано образование биопленок и клеток бактерий рода *Ectothiorodospira*.

Мессбауэровские исследования образцов проводились при комнатной температуре. Для обработки спектра контрольного образца (рис 25 а), использовалась модель, состоящая из трех зеемановских секстетов S_1 , S_2 , S_3 . Параметры секстетов S_1 и S_2 характерны для атомов железа в тетра- и октаэдрических позициях магнетита. Секстет S_3 соответствует малым частицам смеси магнетита и маггемита. Для обработки спектров опытных образцов в модель были добавлены еще два секстета. Секстеты S_5 и S_6

относятся к различным позициям атомов железа в структуре крупных частиц магнетита с отличной от синтезированных частиц степенью нестехиометрии.

Изучение мессбауэровских спектров минералов, полученных в результате преобразований бактериями из последних положительных разведений (рис 27 б) показало, что наблюдается образование частиц магнетита с $d = 15$ нм и степенью нестехиометрии $z = 0.19$, а также диаметром

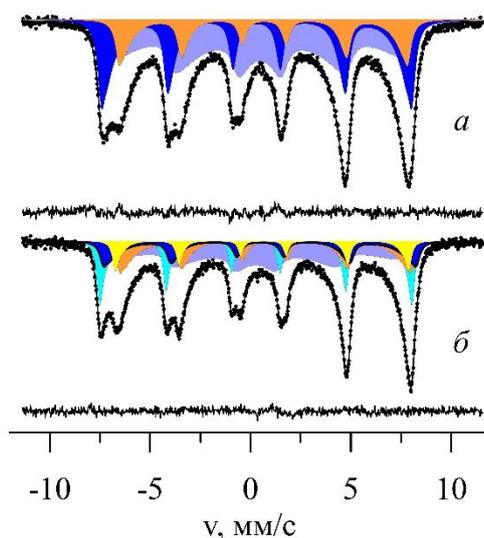


Рисунок 27 Мессбауэровские спектры ядер ^{57}Fe в структуре а) контрольного образца, б) образца, полученного в результате роста бактерий из последних положительных разведений.

20 нм и $z = 0.55$. Относительное содержание малых частиц смеси магнетита с маггемитом уменьшилось с 50% до 36%.

Анализ спектра опытного образца, полученного при росте накопительной культуры в присутствии синтезированного магнетита (рис 28 б), показал, что происходит образование частиц нестехиометричного магнетита $z = 0.4$ и $z = 0.7$ и диаметром 15 нм, 18 нм соответственно. Относительное содержание малых частиц смеси магнетита с маггемитом уменьшилось с 50% до 35%. Появление квадрупольного дублета, параметры которого соответствуют атомам Fe^{2+} , можно объяснить образованием новой фазы – сидерита ($I_0 \sim 1,2\%$).

Анализ мессбауэровского спектра образца, полученного после второго пересева культуры (рис 28 в) показал, что в образце присутствуют частицы магнетита с диаметром $d = 15$ нм и нестехиометрией $z = 0.46$, а также

диаметром 21 нм и $z = 0.7$. Относительное содержание малых частиц смеси магнетита с маггемитом не изменилось.

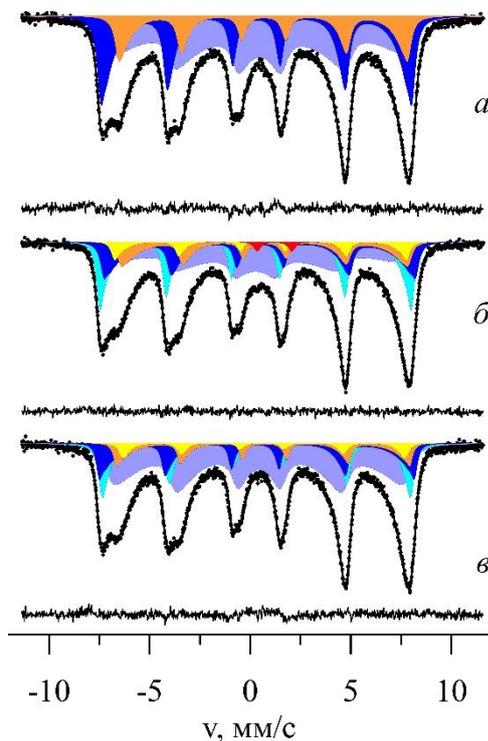


Рисунок 28 Мессбауэровские спектры ядер ^{57}Fe в структуре минералов а) контрольного образца, б) образца, полученного в результате роста накопительной культуры в) образца, полученного после второго пересева культуры.

Рамановские спектры образцов синтезированного магнетита были получены при комнатной температуре. Для возбуждения КР-сигналов использовалось излучение на длине волны 633 нм 785 нм. Рамановские спектры контрольного и опытного образца, полученного после второго пересева культуры, представляют набор характерных пиков для магнетита (рис. 29). Возрастание интенсивности всех пиков можно объяснить присутствием крупных частиц магнетита.

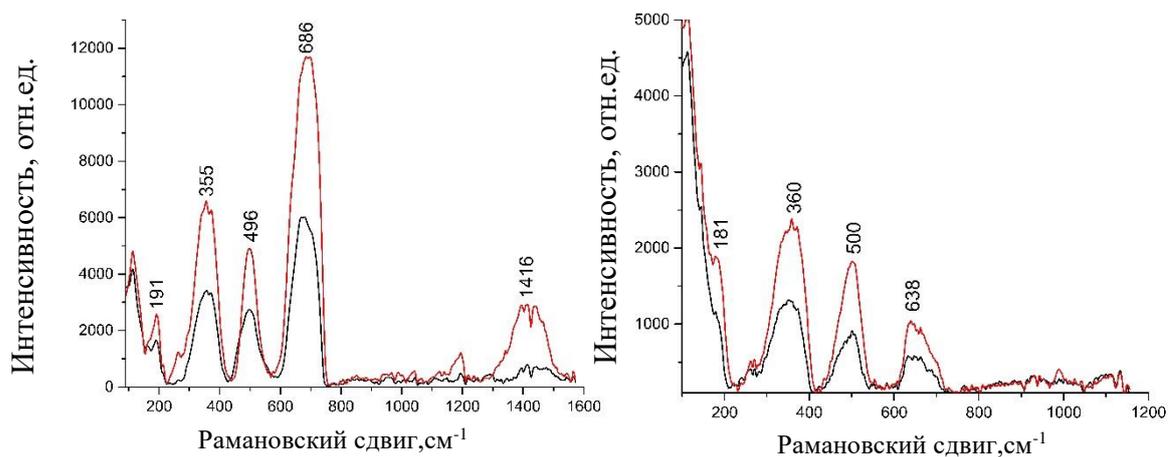


Рисунок 29 Рамановские спектры, полученные на длине волны возбуждения 633нм (слева), 785 нм (справа), контрольного (черная линия) и опытного образца, полученного в результате второго пересева культуры (красная линия).

Таким образом, рост бактерий из последних положительных разведений в присутствии синтезированного магнетита в минеральной среде приводит к формированию частиц с меньшей нестехиометрией, а также к образованию более крупных частиц нестехиометрического магнетита. При росте накопительной культуры кроме образования крупных частиц нестехиометрического магнетита наблюдается формирование сидерита, который не наблюдается в случае второго пересева.

3.4. Процессы биогенного преобразования синтезированного магнетита бактерией *Fuchsiella ferrireducens* в присутствии этанола при pH 9.5.

Для проведения исследований был синтезирован магнетит, добавленный в минеральную среду, имеющую следующий состав (г/л): NH_4Cl , 0.5; KH_2PO_4 , 0.2; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.1; KCl , 0.2; yeast extract (Difco), 0.05; Na_2CO_3 , 100; NaHCO_3 , 15; NaCl , 95; этанол (20 мМ). Среда была инокулирована чистой культурой бактерии *Fuchsiella ferrireducens*, штамм Z-7101^T, выделенной из высокоминерализованного содового озера Танатарской группы (Алтай, Россия) [19]. Этот микроорганизм относится к группе гомоацетогенных бактерий, единственным продуктом жизнедеятельности которых является ацетат (CH_3COOH). На примере этого микроорганизма впервые удалось

показать способность гомоацетогенных бактерий осуществлять обратный процесс окисления ацетата за счет восстановления синтезированного ферригидрита [19].

Мессбауэровские исследования были проведены для контрольного образца синтезированного магнетита и опытных образцов для двух повторностей при комнатной температуре (рис.30). Для обработки мессбауэровского спектра контрольного образца была использована модель, состоящая из трех зеемановских секстетов и квадрупольного дублета. Секстеты S_1 и S_2 относятся к различным позициям атомов железа в структуре магнетита. Параметры секстета S_3 характерны для атомов Fe^{3+} в структуре гематита. Присутствие дублета D_1 в спектре указывает на то, что образец содержит небольшое количество ферригидрита ($I_0 \sim 2\%$). Размер частиц контрольного образца порядка 15 нм.

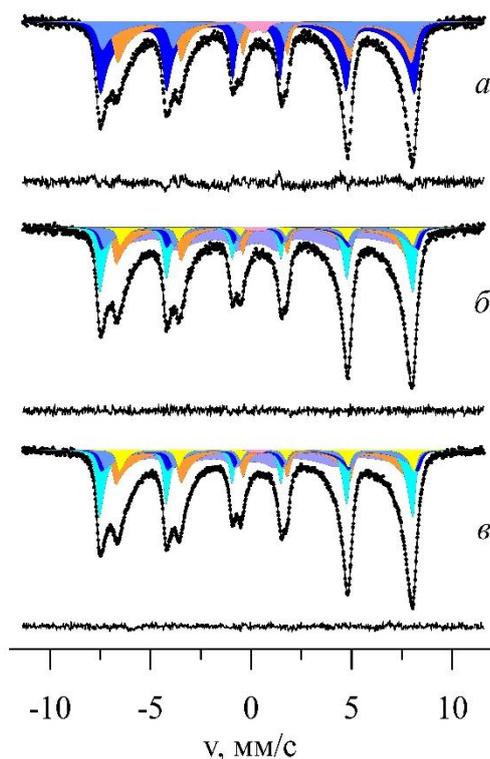


Рисунок 30 Мессбауэровские спектры ядер ^{57}Fe в структуре минералов а) контрольного образца, б) образца, полученного в результате роста накопительной культуры, в) образца, полученного после второго пересева.

Для улучшения качества обработки спектров опытных образцов в модель были добавлены три секстета. Секстеты S_4 и S_5 соответствуют

крупным частицам ($d = 20$ нм) нестехиометрического магнетита, а секстет релаксационного типа S_6 соответствует малым частицам смеси магнетита и маггемита.

Таким образом, при росте бактерии *Fuchsiella ferrireducens* в присутствии синтезированного магнетита в минеральной среде не происходит образования сидерита, как в случае добавления синтезированного ферригидрита [51]. Однако в случае добавления магнетита происходит образование крупных частиц нестехиометрического магнетита, т.е. фактически идет перекристаллизация магнетита.

3.5. Исследование влияния площади поверхности минерала, доступной для восстановления бактерией *Geoalkalibacter ferrihydriticus*, на формирование новых фаз

Содержание синтезированного ферригидрита в минеральной среде бактерии оказывает сильное влияние на процесс восстановления железа, а также на фазовый состав. В работе [52] было показано, что при добавлении в среду исходного СФ, содержащего 10 мМ трехвалентного железа в результате роста бактерии *Geoalkalibacter ferrihydriticus* образуется новая фаза, содержащая двухвалентные атомы железа. При увеличении доступного для восстановления объема минеральной фазы за счет увеличения площади доступной поверхности (флаконе, представляющий собой параллелепипед, клали на большую поверхность), относительное содержание формирующейся фазы уменьшается. При содержании железа 100 мМ в исходном ферригидрите в результате биогенных преобразований происходит образование не только сидерита, но и магнетита. При этом, размер частиц магнетита зависит от доступной для восстановления поверхности ферригидрита минеральной среды и увеличивается при ее уменьшении.

При исследовании минералов, полученных в результате роста *G. ferrihydriticus* в присутствии синтезированного ферригидрита в минеральной среде, методами мессбауэровской спектроскопии рассчитанное

значение относительного содержания двухвалентных атомов железа оказывалось меньше значений полученных химическими методами. Для проверки данного феномена были проведены исследования методом ядерного неупругого рассеяния синхротронного излучения (СИ).

В данной работе исследовались образцы твердых фаз, полученных в результате роста бактерии *G. ferrihydriticus* в минеральной среде, содержащей различную концентрацию гидроксида железа. Варьировались объёмы минеральной среды, доступной для биовосстановления, $V_1 < V_2 < V_3$, но значение объема V_2 ближе к значению V_1 , чем к V_3 . N1 – образец, полученный в результате роста бактерии в минеральной среде объёмом V_3 , содержащей 10 мМ СФ, N2 – образец, полученный в результате роста бактерии в минеральной среде объёмом V_3 , содержащей 100 мМ СФ, N3 – образец, полученный в результате роста бактерии в минеральной среде объёмом V_2 , содержащей 100 мМ СФ, N4 – образец, полученный в результате роста бактерии в минеральной среде объёмом V_1 , содержащей 100 мМ СФ. Мессбауэровские спектры этих образцов представлены на рисунке 31. Относительное содержание магнетита, сидерита, возможное содержание Fe^{2+} , а также размер частиц магнетита, полученные из анализа мессбауэровских спектров, представлены в Таблице 3. Значения размера частиц образцов N2 и N4, полученные при анализе релаксационных парциальных спектров, хорошо коррелирует со значениями рассчитанными по формуле Дебая-Шерера при анализе дифрактограммы данных образцов (N2: $d = 2.8 \pm 1.5$; N4: $d = 12.3 \pm 1.5$) рис.32. Рентгенофазовый анализ был проведен на кафедре физики твердого тела доцентом Киселевой Т.Ю.

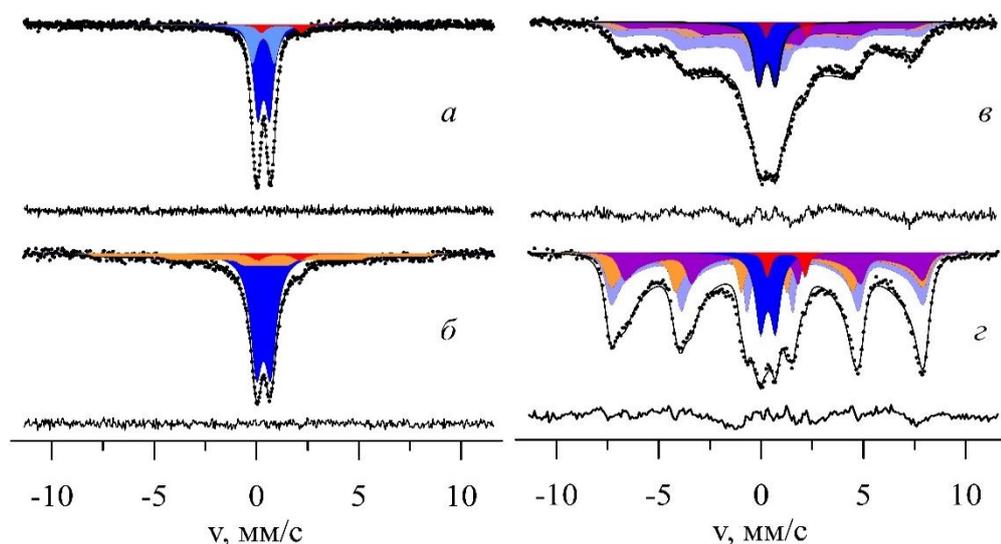


Рисунок 31 Мессбауэровские спектры ядер ^{57}Fe в структуре минералов а) N1 б) N2 в) N3 г) N4.

Таблица 5 Относительное содержание магнетита, сидерита, размер частиц, полученные из анализа мессбауэровских спектров

Образец	Относительное содержание, %			d , нм
	магнетит	сидерит	ферригидрит	
N1	–	3.5 ± 0.7	96.5 ± 4	–
N2	29.6 ± 1.8	4.2 ± 1.6	66.2 ± 1.9	3
N3	86.3 ± 12	1.9 ± 0.4	11.8 ± 0.5	5
N4	85.3 ± 1.8	2.8 ± 0.24	11.6 ± 0.3	12

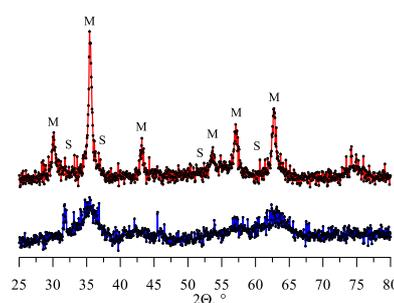


Рисунок 32 Дифрактограммы образцов N4 (красная линия), N2 (синяя линия): М – магнетит, S – сидерит.

Энергетические зависимости ядерного неупругого поглощения СИ были измерены в диапазоне от - 30 до 70 мэВ для образцов: исходного СФ, сидерита, магнетита и опытных образцов. С помощью двойного фурье-преобразования экспериментально полученного спектра (после вычитания упругого пика и нормировки) была рассчитана парциальная плотность колебательных состояний атомов железа $g(E)$. На рисунке 33 представлены парциальные

плотности фононных состояний и приведенные плотности фононных состояний атомов железа $g(E)/E^2$. По спектрам был рассчитан термодинамический параметр для атомов железа – фактор Лэмба-Мессбауэра (f_{LM}). Было обнаружено, что значение этого параметра зависит от размера частиц магнетита (см. Таблицу 6).

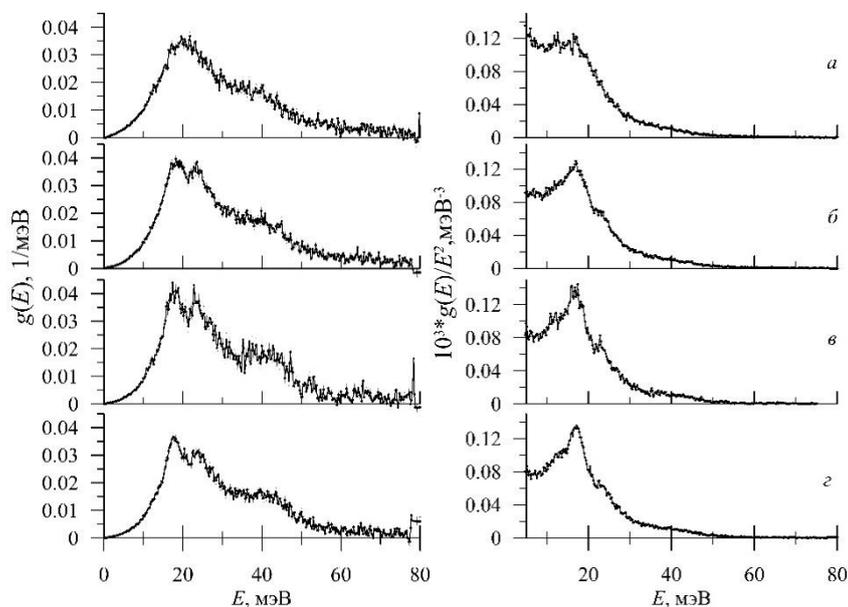


Рисунок 33 Парциальные спектры (слева), приведенные парциальные спектры (справа) тепловых колебаний атомов железа в образцах а) N1, б) N2, в) N3, г) N4.

Таблица 6 Значения размера частиц и фактора Лэмба-Мессбауэра для исследуемых образцов

Образец	d , нм	f_{LM}
N1	-	$0,703 \pm 0.03$
N2	3	$0,708 \pm 0.03$
N3	5	$0,715 \pm 0.03$
N4	12	$0,762 \pm 0.04$

Экспериментальные спектры опытных образцов (рис. 34) были обработаны в программе SpectrRelax в рамках модели, состоящей из спектров для контрольных образцов ферригидрита, сидерита и магнетита. Результаты обработки представлены в Таблице 7. Анализ результатов показал, что относительное содержание сидерита и магнетита, полученное с помощью метода ЯРНР СИ, существенно больше, чем с помощью методов мессбауэровской спектроскопии.

По полученным данным было рассчитано возможное относительное содержание двухвалентных атомов железа в опытных образцах. При расчетах предполагалось, что магнетит был стехиометричным, то есть треть всех атомов железа в структуре магнетита были двухвалентными. Таким образом, значения относительного содержания двухвалентных атомов железа, представленные в таблице, являются несколько завышенными. Полученные значения хорошо коррелируют со значениями, полученными химическими методами.

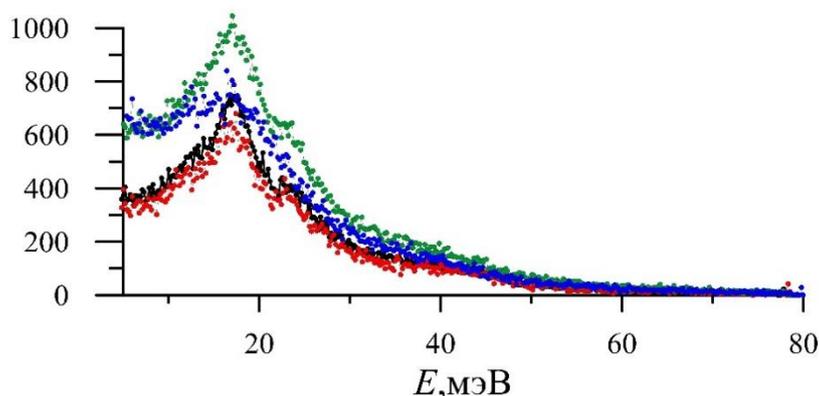


Рисунок 34 Экспериментально измеренные спектры ЯРНР СИ для образцов N1 (синяя линия), N2 (зеленая линия), N3 (красная линия), N4 (черная линия).

Таблица 7 Относительное содержание сидерита, ферригидрита, магнетита, атомов Fe^{2+} .

Образец	Относительное содержание, % (метод ЯРНР)			Относительное содержание атомов Fe^{2+} , %	
	Сидерит	Ферригидрит	Магнетит	Метод ЯРНР	Хим. метод
N1	–	80.3±2.2	19.7±2.2	~ 6.6	6.2
N2	14.6±1.5	70.3±2.4	15.±2.1	~ 19.6	25.9
N3	32.2±3.1	41.3±5	26.6±4	~ 41	28.9
N4	33.2±2.1	41.2±4	25.6±3	~ 41.1	27.5

Результаты синхротронных исследований дают завышенное, по сравнению с мессбауэровскими исследованиями, значение относительного содержания фаз (магнетита и сидерита), содержащих двухвалентные атомы железа. Однако эти результаты хорошо согласуются с данными, полученными химическими методами. Наблюдаемое различие, к сожалению, нельзя объяснить отличием фактора Лэмба-Мёссбауэра для двух- и трёхвалентных

атомов железа в структуре ферригидрита, магнетита и сидерита, поскольку полученные значения фактора Лэмба-Мёссбауэра для ферригидрита (содержащего только Fe^{3+}) и сидерита (содержащего только Fe^{2+}) мало отличаются (f_{LM} (сидерит) = 0,72; f_{LM} (ферригидрит) = 0,73). Кроме того, объяснить эти расхождения зависимостью фактора Лэмба-Мёссбауэра от размера частиц не удастся, так как этот фактор изменяется незначительно.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

Проведены мессбауэровские исследования с привлечением методов ядерного резонансного неупругого рассеяния синхротронного излучения, рамановской спектроскопии, магнитных измерений и рентгенофазового анализа продуктов преобразования синтезированных ферригидрита и магнетита бактериями: *Geoalkalibacter ferrihydriticus*, *Contubernalis alkalaceticum*, *Ectothiorodospira*, *Geolkalibacter*, *Natronincola*, *Fuchsiella ferrireducens*. В результате проведенных исследований установлено следующее.

1. Бактерия *Geoalkalibacter ferrihydriticus* может использовать синтезированный магнетит одновременно в качестве донора и акцептора электронов в первых пересевах культуры с синтезированным ферригидритом на синтезированный магнетит в отсутствие ацетата в минеральной среде. При дальнейшем пересевании культуры такой процесс преобразования магнетита угасает. В присутствии ацетата в минеральной среде происходит незначительное окисление исходного синтезированного магнетита.
2. В процессе роста синтрофной алкалофильной культуры анаэробных бактерий *Geoalkalibacter ferrihydriticus* и *Contubernalis alkalaceticum* на синтезированном ферригидрите и этаноле формируется новая фаза, содержащая атомы Fe^{2+} , которая может быть идентифицирована как сидерит $FeCO_3$.
3. В процессе роста синтрофной алкалофильной культуры анаэробных бактерий *Geoalkalibacter ferrihydriticus* и *Contubernalis alkalaceticum* на синтезированном магнетите и этаноле, наблюдается образование малых частиц магнетита с одинаковой нестехиометрией, которая уменьшается с увеличением времени культивирования бактерий. Также наблюдается образование новых минеральных фаз, содержащих двух- и трехвалентные атомы железа, относительное содержание и состав

которых определяется начальной концентрацией синтезированного магнетита и временем культивирования.

4. В процессе роста накопительной культуры, состоящей из представителей родов *Ectothiorodospira*, *Geotkalibacter*, *Natronincola* в присутствии синтезированного ферригидрита на свету, происходит его восстановление с образованием сидерита.
5. В присутствии синтезированного магнетита под воздействием этой накопительной культуры наблюдается перекристаллизация исходного магнетита, с образованием крупных частиц нестехиометрического магнетита.
6. В процессе роста *Fuchsiella ferrireducens* с синтезированным магнетитом и этанолом происходит образование крупных частиц нестехиометрического магнетита, связанное с процессом перекристаллизации.

В результате можно сделать утверждение, что в процессе роста микроорганизмов наблюдается три основных процесса:

- 1) образование новой минеральной фазы – сидерита, связанное с процессом восстановления;
- 2) образование малых частиц нестехиометрического магнетита или маггемита, связанное с процессом окисления;
- 3) образование крупных частиц магнетита, обусловленное процессами перекристаллизации.

Проведены исследования методом ядерного резонансного неупругого рассеяния синхротронного излучения (ESRF, Гренобль, Франция) образцов, полученных в результате роста бактерии *Geoalkalibacter ferrihydriticus* в среде, содержащей синтезированный ферригидрит. В результате проведенных исследований установлено, что с увеличением размера исследуемых частиц возрастает значение фактора Лэмба-Мессбауэра. Относительное содержание двухвалентных атомов железа в структурах сидерита и магнетита превышает

значения, полученные методами мессбауэровской спектроскопии, и хорошо согласуются с данными химического анализа.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Балашов В.В., Заварзин Г.А. Анаэробное восстановление окисного железа водородной бактерией //Микробиология. – 1979. – Т. 48. – №. 5 – С. 773.
2. Lovley D.R., Stolz J.F., Nord G.L.Jr., Phillips E.J.P. Anaerobic production of magnetite by a dissimilatory iron-reducing microorganism //Nature. – 1987. – Т.330. – №. 6145. – С. 252.
3. Zavarzina D.G., Kolganova T.V., Boulygina E.S., Kostrikin N.A., Tourova T.P., Zhilina T.N. *Geoalkalibacter ferrihydriticus* gen. nov. sp. nov., the first alkaliphilic representative of the family *Geobacteraceae*, isolated from a soda lake //Microbiology. –2006. – Т. 75. – №. 6. – С. 673
4. Слободкин А.И., Заварзина Д.Г., Соколова Т.Г., Бонч-Осмоловская Е.А. Диссимиляционное восстановление неорганических акцепторов электронов термофильными аэробными прокариотами //Микробиология. – 1999. – Т. 68. –№. 5. – С. 600.
5. Заварзина Д.Г. Железоредукторы содовых озер—реликты «железного века»? //Природа. – 2013. – №. 9. – С. 59-67.
6. Райхер Ю.Л. и др. Магнитные свойства биоминеральных наночастиц, продуцируемых бактериями *Klebsiella oxytoca* //Физика твердого тела. – 2010. – Т. 52. – №. 2. – С. 277-284.
7. Sarkar D., Mandal M., Mandal K. Domain controlled magnetic and electric properties of variable sized magnetite nano-hollow spheres //Journal of Applied Physics. – 2012. – Т. 112. – №. 6. – С. 064318.
8. Bazylnski D. A., Frankel R. B., Konhauser K. O. Modes of biomineralization of magnetite by microbes //Geomicrobiology Journal. – 2007. – Т. 24. – №. 6. – С. 465-475.
9. Frankel R. B. et al. Magneto-aerotaxis in marine coccoid bacteria //Biophysical journal. – 1997. – Т. 73. – №. 2. – С. 994-1000.

10. Тихонова Т.В., Попов В.О. Структурные и функциональные исследования мультигемовых цитохромов *c*, вовлеченных в экстраклеточный транспорт электронов в процессах диссимиляторной бактериальной металлоредукции //Успехи биологической химии. – 2014. –Т.54. – С.349-348.
- 11.Perez-Gonzalez T. et al. Magnetite biomineralization induced by *Shewanella oneidensis* //Geochimica et Cosmochimica Acta. – 2010. – Т. 74. – №. 3. – С. 967-979.
- 12.Piepenbrock A. et al. Dependence of microbial magnetite formation on humic substance and ferrihydrite concentrations //Geochimica et Cosmochimica Acta. – 2011. – Т. 75. – №. 22. – С. 6844-6858.
- 13.Li Y.L. Pfiffner S.M., Dyar M.D., Konhauser K., Vali H., Cole D.R., Phelps T.J. Degeneration of biogenic superparamagnetic magnetite //Geobiology. – 2009. – Т. 7.– №. 1. – С. 25.
- 14.Zegeye A. et al. In situ monitoring of lepidocrocite bioreduction and magnetite formation by reflection Mössbauer spectroscopy //American Mineralogist. – 2011. – Т. 96. – №. 8-9. – С. 1410-1413.
- 15.Nielsen L. P. et al. Electric currents couple spatially separated biogeochemical processes in marine sediment //Nature. – 2010. – Т. 463. – №. 7284. – С. 1071-1074.
- 16.Byrne J. M. et al. Redox cycling of Fe (II) and Fe (III) in magnetite by Fe-metabolizing bacteria //Science. – 2015. – Т. 347. – №. 6229. – С. 1473-1476.
- 17.Aulenta F. et al. Conductive magnetite nanoparticles accelerate the microbial reductive dechlorination of trichloroethene by promoting interspecies electron transfer processes //ChemSusChem. – 2013. – Т. 6. – №. 3. – С. 433-436.
- 18.Белов К. П., Белов К. П., аномалии магнитных свойств магнетита Fe₃O₄ Р. Загадки магнетита //Соросовский Образовательный Журнал. – 2000. – №. 4. – С. 71-76.

19. Coker V. S. et al. Formation of magnetic minerals by non-magnetotactic prokaryotes // *Magnetoreception and magnetosomes in bacteria*. – Springer Berlin Heidelberg, 2006. – C. 275-300.
20. Patrick R. A. D. et al. Cation site occupancy in spinel ferrites studied by X-ray magnetic circular dichroism // *European Journal of Mineralogy*. – 2002. – T. 14. – №. 6. – C. 1095-1102.
21. Cannas C. et al. Superparamagnetic behaviour of γ -Fe₂O₃ nanoparticles dispersed in a silica matrix // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2001. – T. 3. – №. 5. – C. 832-838.
22. Goya G. F. et al. Static and dynamic magnetic properties of spherical magnetite nanoparticles // *Journal of Applied Physics*. – 2003. – T. 94. – №. 5. – C. 3520-3528.
23. Dézsi I. et al. Phase transition in nanomagnetite // *Journal of applied physics*. – 2008. – T. 103. – №. 10. – C. 104312.
24. Li Y. L., Zhu S. Y., Deng K. Mössbauer hyperfine parameters of iron species in the course of Geobacter-mediated magnetite mineralization // *Physics and Chemistry of Minerals*. – 2011. – T. 38. – №. 9. – C. 701.
25. Da Costa G. M., De Grave E., Vandenberghe R. E. Mössbauer studies of magnetite and Al-substituted maghemites // *Hyperfine Interactions*. – 1998. – T. 117. – №. 1-4. – C. 207-243.
26. Verble J. L. Temperature-dependent light-scattering studies of the Verwey transition and electronic disorder in magnetite // *Physical Review B*. – 1974. – T. 9. – №. 12. – C. 5236.
27. Shebanova O. N., Lazor P. Raman spectroscopic study of magnetite (FeFe₂O₄): a new assignment for the vibrational spectrum // *Journal of Solid State Chemistry*. – 2003. – T. 174. – №. 2. – C. 424-430.
28. Panta PC and Bergmann CP, Raman Spectroscopy of iron oxide of nanoparticles (Fe₃O₄) // *Material Science & Engineering*. – 2015.

29. Chumakov A. I., Sturhahn W. Experimental aspects of inelastic nuclear resonance scattering // *Hyperfine interactions*. – 1999. – T. 123. – №. 1. – С. 781-808.
30. Handke B. et al. Experimental and theoretical studies of vibrational density of states in Fe₃O₄ single-crystalline thin films // *Physical Review B*. – 2005. – T. 71. – №. 14. – С. 144301.
31. Seto M. et al. Site-specific phonon density of states discerned using electronic states // *Physical review letters*. – 2003. – T. 91. – №. 18. – С. 185505.
32. Kołodziej T. et al. Nuclear inelastic scattering studies of lattice dynamics in magnetite with a first-and second-order Verwey transition // *Physical Review B*. – 2012. – T. 85. – №. 10. – С. 104301.
33. Pasquini L. et al. Size and oxidation effects on the vibrational properties of nanocrystalline α -Fe // *Physical Review B*. – 2002. – T. 66. – №. 7. – С. 073410.
34. Zachara J. M., Kukkadapu R. K., Fredrickson J. K., Gorby Y. A., Smith S. C. Biomineralization of poorly crystalline Fe (III) oxides by dissimilatory metalreducing bacteria (DMRB) // *Geomicrobiology Journal*. – 2002. – T. 19. – №. 2. – С. 179.
35. Zegeye A., Abdelmoula M., Usman M., Hanna K., Ruby C. In-situ monitoring of lepidocrocite bioreduction and magnetite formation by reflection Mossbauer spectroscopy // *American Mineralogist*. – 2011. – T. 96. – №. 8-9. – С. 1410.
36. Porsch K., Dippon U., Rijal M.L., Appel E., Kappler A. In-situ magnetic susceptibility measurements as tool to follow geomicrobiological transformation of Fe minerals // *Environ. Sci. Technol.* – 2010. – T. 44. – №. 10. – С. 3846.
37. Coker V.S., Bell A.M.T., Pearce C.I., Pattrick R.A.D., Laan G., Lloyd J.R. Time-resolved synchrotron powder X-ray diffraction study of magnetite formation by Fe(III)-reducing bacterium *Geobacter sulfurreducens* // *American Mineralogist*. – 2008. – T. 93. – №. 4. – С. 540.

38. Roh Y., Zhang C.-L., Vali H., Lauf R.J., Zhou J., Phelps T.J. Biogeochemical and environmental factors in Fe biomineralization magnetite and siderite formation //Clays and Clay Minerals. – 2002. – Т. 51. – №. 1. – С. 83.
39. Bazylnski D.A., Frankel R.B., Konhauser K.O. Modes of biomineralization of magnetite by microbes //Geomicrobiology Journal. – 2007. – Т. 24. – №. 6. – С. 465.
40. Hanesch M. Raman spectroscopy of iron oxides and (oxy) hydroxides at low laser power and possible applications in environmental magnetic studies //Geophysical Journal International. – 2009. – Т. 177. – №. 3. – С. 941-948.
41. Русаков В.С. Основы мессбауэровской спектроскопии. Учебное пособие. М.:Физический факультет МГУ, 2011.
42. Вертхейм Г. Эффект Мёссбауэра., перевод с английского А.М.Афанасьева, М.: Мир, 1966.
43. Matsnev M. E., Rusakov V. S. SpectrRelax: An application for Mössbauer spectra modeling and fitting //AIP Conference Proceedings. – AIP, 2012. – Т. 1489. – №. 1. – С. 178-185.
44. Chistyakova N. I. et al. Mössbauer and magnetic studies of nanocomposites containing iron oxides and humic acids //Hyperfine Interactions. – 2013. – Т. 1. – С. 242.
45. Shapkin A. A. et al. Mössbauer Study of Microbial Synthesis of Iron-Containing Nanoparticles //Solid State Phenomena. – Trans Tech Publications, 2015. – Т. 233. – С. 766-770.
46. Чалабов Р. И., Любу тин И.С., Анохина Л.К. Новый метод определения катионного распределения в двухподрешеточном ферримагнетике с помощью мессбауэровской спектроскопии //Физика твердого тела, 1981. – Т.23. – №. 8.
47. Арзуманян Г.М. Мультимодальная оптическая платформа для исследования конденсированных сред // Сообщения ОИЯИ, Дубна, 2013.

48. Reiff W. M. Mixed oxidation states and averaged electronic environments in iron compounds // *Mössbauer Effect Methodology*. – Springer US, 1973. – С. 89-105.
49. Jones D. H., Srivastava K. K. P. Many-state relaxation model for the Mössbauer spectra of superparamagnets // *Physical Review B*. – 1986. – Т. 34. – №. 11. – С. 7542.
50. Zhilina T. N. et al. “*Candidatus Contubernalis alkalaceticum*,” an obligately syntrophic alkaliphilic bacterium capable of anaerobic acetate oxidation in a coculture with *Desulfonatronum cooperativum* // *Microbiology*. – 2005. – Т. 74. – №. 6. – С. 695-703.
51. Чистякова Н.И., Антонова А.В., Грачева М.А., Шапкин А.А., Заварзина Д.Г., Жилина Т.Н., Русаков В.С. Мёссбауэровские исследования процессов восстановления синтезированного ферригидрита алкалофильной железоредуцирующей бактерией *Fuchsiella ferrireducens* // *известия РАН. Серия физическая*. – 2017. – Т.81, №.7. С. 988–993.
52. Шапкин А.А. Мессбауэровские исследования процессов восстановления атомов железа анаэробными диссимиляторными бактериями // *Кандидатская диссертация, Физический факультет МГУ, 2014.*

Выражаю искреннюю благодарность научному руководителю кандидату физико-математических наук, доценту Наталии Игоревне Чистяковой за предложенную интересную тему, постановку задачи, помощь во всем, внимательное, теплое отношение и безграничное терпение в течение всего периода моей работы в лаборатории. Благодаря педагогическому таланту и научному опыту Наталии Игоревны работа была интересной, творческой и плодотворной.

Выражаю глубокую благодарность доктору физико-математических наук профессору Вячеславу Серафимовичу Русакову за помощь в подготовке курсовых и дипломной работ, за поддержку и ценные советы в течение всего периода моей работы в возглавляемой им научной группе.

Благодарю за теплый приём и дружелюбную атмосферу всех сотрудников научной группы «Мёссбауэровская спектроскопия локально неоднородных систем» кафедры общей физики физического факультета МГУ. Отдельно хочу выразить благодарность аспиранту Ярославцеву С.А. за готовность помочь и обсудить интересующие вопросы.

Выражаю глубокую благодарность сотрудникам Института Микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН: кандидата геолого-минералогических наук Заварзину Д.Г. и доктора биологических наук Жилину Т.Н. за предоставленные образцы и фотографии бактерий. Отдельно хочу выразить благодарность Дарье Георгиевне за научные консультации и отзывчивость в течение всего периода сотрудничества.

Выражаю глубокую благодарность сотрудникам ID18 ESRF Александру Игоревичу Чумакову и Рудольфу Рюфферу за теплый прием и отличную организацию эксперимента. В особенности хочу поблагодарить Александра Игоревича за помощь в проведении эксперимента, научные консультации.

Фононные спектры, представленные в работе, получены в рамках проекта HC-2443, ESRF, Гренобль, Франция.