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

ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

КАФЕДРА ОБЩЕЙ ФИЗИКИ

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРЕОБРАЗОВАНИЙ СИДЕРИТА И ФЕРРИГИДРИТА ЭКСТРЕМОФИЛЬНЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ

Выполнила студентка группы 205м: Грачева Мария Александровна

Научный руководитель: кандидат ф.-м. наук, доцент Чистякова Наталия Игоревна

Допущена к защите «__» ____ 2019 г. Зав.кафедрой общей физики профессор А.М. Салецкий

Москва

ВВЕДЕНИЕ
ГЛАВА 1. Преобразования железосодержащих минералов
микроорганизмами (по данным литературы)5
1.1. Железовосстанавливающие микроорганизмы 5
1.2. Особенности структуры сидерита и ферригидрита 7
ГЛАВА 2. Методика эксперимента10
2.1. Мессбауэровская спектроскопия10
2.1.1. Параметры мессбауэровского спектра 10
2.1.2. Обработка спектров 13
2.2. Спектроскопия электронного парамагнитного резонанса13
2.3. Спектроскопия комбинационного рассеяния14
2.4. Рентгенофазовый анализ 15
ГЛАВА 3. Исследование процессов преобразования сидерита и ферригидрита
экстремофильными микроорганизмами16
3.1. Исследование кинетики преобразования сидерита накопительной
культурой, полученной из термального источника Солнечный 16
3.2. Исследование влияния площади поверхности ферригидрита, доступной
бактерии Geoalkalibacter ferrihydriticus для его преобразования, на
процессы биотрансформации
ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Основные результаты и выводы 41
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

ВВЕДЕНИЕ

Железо клеточных является незаменимым компонентом многих соединений и участником многочисленных физиологических процессов, происходящих в организмах. Окислительно-восстановительные реакции с являются одной из древнейших форм метаболизма участием железа 1980-х годах В микроорганизмов на Земле. была открыта новая физиологическая группа микроорганизмов, получивших название диссимиляторные железоредуцирующие микроорганизмы ИЛИ железоредукторы. Эти микроорганизмы способны в анаэробных условиях получать энергию для жизнедеятельности за счет реакции восстановления различных соединений окисного железа, используя его в качестве акцептора физико-химические [1]. При ЭТОМ состав И электронов свойства сформировавшихся минеральных фаз сильно зависят от условий роста культуры. Исследование минералов, образованных в результате роста железоредукторов, важно для воссоздания картины преобразований соединений железа в докембрийский период [2] и для поиска аналогов этих процессов в современном биогеохимическом цикле железа.

Особый интерес к этой группе микроорганизмов вызван тем, что в лабораторных условиях при восстановлении железоредукторами атомов железа в структуре некоторых железосодержащих минералов обнаружено формирование наноразмерных частиц магнетита [3]. Изучение свойств магнитных наноматериалов, полученных в результате микробиологического синтеза, в наши дни является одной из актуальных областей исследования, ввиду перспективы их применения в электронике и биомедицине. Исследование природных микробных сообществ интересно в точки зрения развития синтеза органических веществ на их основе и поиска альтернативных источников энергии [4].

Целью настоящей работы являлось исследование процессов преобразования природного сидерита и синтезированного ферригидрита экстремофильными микроорганизмами, выделенными из естественных мест

их обитания. В соответствии с поставленной целью в работе решались следующие задачи:

- Спектроскопическими методами идентифицировать продукты преобразования сидерита термофильной накопительной культурой, полученной из осадков термального источника Солнечный (кальдера Узон, Камчатка), и исследовать кинетику процесса биотрансформации.
- 2) Идентифицировать продукты преобразования ферригидрита бактерией Geoalkalibacter ferrihydriticus (штамм Z-0531) и исследовать влияние площади поверхности минерала, доступной бактерии для его преобразования, на формирование новых фаз.

Основным методом исследования являлся метод мессбауэровской спектроскопии на ядрах ⁵⁷Fe, который позволяет провести качественный и количественный фазовые анализы, дает информацию о локальной структуре, ближайшем атомном окружении, валентном и спиновом состояниях атомов железа. Для определения фазового состава образцов привлекались данные спектроскопии электронного парамагнитного резонанса, рентгенофазового анализа и спектроскопии комбинационного рассеяния.

ГЛАВА 1. Преобразования железосодержащих минералов

микроорганизмами (по данным литературы)

1.1. Железовосстанавливающие микроорганизмы

Открытие в 1980-x диссимиляторных железовосстанавливающих микроорганизмов легло В основу множества исследований [5]. Железоредукторы осуществляют внеклеточный процесс восстановления соединений окисного железа, используя его в качестве акцептора электронов. В качестве донора электронов для этой окислительно-восстановительной реакции микроорганизмы могут использовать органические (спирты, кислоты, пептиды) и неорганические (молекулярный водород) субстраты [1, 6]. Этот процесс некоторые авторы называют «железным дыханием» [7], так как в результате него микроорганизмы синтезируют АТФ. Способность К железоредукции наиболее изучена для диссимиляторных бактерий (рода Geobacter и Shewanella). Однако до сих пор не ясен механизм переноса электронов от клетки к нерастворимому субстрату. Выделяют три основных гипотезы механизма внеклеточного транспорта электронов [1, 8]:

1) Цитохром С образует электронную транспортную цепь, по которой осуществляется перенос электронов от восстановленных хинонов в цитоплазматической мембране на редокс-белки, связанные с внешней клеточной мембраной, и затем на внеклеточные субстраты (в том числе нерастворимые оксиды металлов). Реализация такого механизма возможна на расстояниях порядка 15–20 Å;

2) В клетке происходит синтез растворимых низкомолекулярных редокспереносчиков – флавинов. Попадая во внешнюю среду, они осуществляют восстановление внеклеточных субстратов.

3) Образование у бактерий электропроводящих пилей (выростов длиной 10 – 20 мкм). Пили обладают проводимостью металлического типа и обеспечивают транспорт электронов на расстояние до 1 см.

Деятельность микроорганизмов, способных использовать железо в реакциях своей жизнедеятельности, имеет большое экологическое значение, так как она влияет на водный и геохимический состав сред их обитания.

Практический интерес к этой группе микроорганизмов преимущественно вызван тем, что при восстановлении железоредукторами атомов железа в структуре ферригидрита обнаружено формирование наноразмерных частиц магнитоупорядоченной фазы [3, 9, 10]. За счет своей большой химической активности такие наночастицы могут использоваться для очищения почв и водоемов от ионов тяжелых металлов [11 - 13] и для получения энергии в форме электричества из осадков [4]. Кроме того, магнитные наноматериалы, полученные подобным способом, обладают такими свойствами, как биосовместимость, низкая токсичность и химическая стабильность, что расширяет их области применения от магнито-электроники до биомедицины [14]. Замкнутые циклы преобразований минералов железа с использованием простейших минеральных сред и субстратов создают теоретические предпосылки для разработки процессов хемосинтетической продукции высокоэнергетических органических соединений [15].

Степень восстановления, природа и свойства образованных минералов сильно зависят от условий роста микроорганизмов. Поэтому важно рассмотреть классификацию микроорганизмов на экофизиологические группы. По оптимальной степени кислотности среды роста микроорганизмы делятся на ацидофилы (pH < 6), нейтрофилы (6 < pH < 9) и алкалофилы (pH > 9). В зависимости от температуры роста выделяют следующие физиологические группы: психрофилы ($T < 20^{\circ}$ C), мезофилы ($T = 20-45^{\circ}$ C) и термофилы ($T > 45^{\circ}$ C). По отношению к кислороду микроорганизмы делятся на аэробов, которые нуждаются в кислороде для дыхания, и анаэробов, способных существовать в отсутствии кислорода [7]. Особый интерес представляют экстремофилы микроорганизмы, выделенные -ИЗ экологических ниш. Они экстремальных хорошо адаптированы К неблагоприятным факторам окружающей среды, таким как высокие температуры, щелочные среды, бескислородные условия и т.д. Эта группа микроорганизмов обладает огромным биотехнологическим потенциалом.

Во многих работах [3, 9, 10] было показано, что химический состав минеральной среды роста, ее температура и pH, концентрация Fe(III) и размер

частиц исходного минерала значительно влияют процессы на биотрансформаций. Кроме того, авторы [16] на примере железоредуцирующей бактерии Shewanella oneidensis доказали, что помимо физико-химических параметров на скорость восстановления и состав формирующихся фаз также влияют геометрические аспекты (размер и ориентация сосудов ДЛЯ Методами мессбауэровской культивирования). спектроскопии И рентгенофазового анализа было показано, что в эксперименте наблюдается преимущественное формирование минералов, содержащих Fe²⁺ в случае горизонтальной ориентации сосуда роста. В течение 8 дней в вертикально инкубированных пробирках, которые первоначально содержали 5 мМ ферригидрита, $44,4\pm1,3\%$ Fe³⁺ было восстановлено до Fe²⁺, в то время как в горизонтально инкубированных пробирках с такой же концентрацией ферригидрита было восстановлено 59,1±3,2% атомов Fe³⁺. Это исследование демонстрирует, что небольшие изменения в условиях роста могут значительно геомикробиологических повлиять на экспериментальные результаты экспериментов.

1.2. Особенности структуры сидерита и ферригидрита

В данной работе изучались процессы биогенных преобразований атомов железа в структурах сидерита гидротермального происхождения и синтезированного ферригидрита. Для исследования данных железосодержащих минералов широко используются методы мессбауэровской спектроскопии и рентгеновской дифрактометрии.

Сидерит (FeCO₃) гидротермального происхождения образуется при температурах, что объясняет сравнительно невысоких интерес К трансформаций при воздействии термофильных исследованию его микроорганизмов. Его кристаллическая структура аналогична структуре кальцита (пространственная группа R3c). В центрах и вершинах граней ромбоэдра находятся ионы железа Fe^{2+} , а в центре ромбоэдра ионы $(CO_3)^{2-}$. (рис. 1). Сидерит, как карбонат закиси железа, может образовываться лишь в восстановительных условиях [17]. Ближайшее окружение атомов железа в структуре сидерита – октаэдрическое (координационное число = 6).

Мессбауэровский спектр ядер ⁵⁷Fe в структуре сидерита, измеренный при комнатной температуре, представляет собой один квадрупольный дублет, что является типичным для соли Fe²⁺ [18, 19]. В отсутствии внешнего поля все позиции Fe²⁺ в сидерите эквивалентны. В сидерите часто наблюдается асимметрия компонент квадрупольного дублета, связанная с самопроизвольной ориентацией частиц образца [20, 21]. Сидерит является парамагнетиком выше температуры Нееля T_N , которая для него, согласно большинству источников, равна 39 К. Ниже этой температуры сидерит является антиферромагнетиком [22].



Рисунок 1 – Визуализация атомов железа в октаэдрических позициях в структуре сидерита Ферригидрит является биодоступным гидроксидом Fe(III), который активно используется железоредукторами в качестве акцептора электронов. Наиболее употребляемой для ферригидрита является номинальная формула 5Fe₂O₃·9H₂O. Однако гидроксид Fe(III) может содержать другое количество молекул воды, которые не вошли в структуру кристалла. Ферригидрит классифицируют в зависимости от количества линий в рентгеновской дифрактограмме: ферригидрит с двумя линиями («двухлинейчатый») и с шестью («шестилинейчатый»). Такое отличие обусловлено размером частицы или степенью кристаллизации [23]. Вопрос о катионном распределении в ферригидрите в наши дни остается открытым. Анализ XAFS спектров гидроксидов железа, проведенный авторами в работе [24], позволил сделать предположение, что в ферригидрите, кроме железа в октаэдрическом кислородном окружении, существуют и тетраэдрические позиции. Авторы работы [25] утверждают, что октаэдрические позиции атомов железа находятся внутри объема ферригидрита, а тетраэдрическое окружение атомов железа может возникать только на поверхности, причем относительное содержание атомов в таких позициях не превышает 10% от общего числа железа в кристалле (рис. 2). Как правило, восстановление атомов трехвалентных атомов железа ферригидрита В структуре микроорганизмами железоредуцирующими ведет формированию К магнитоупорядоченной фазы, которая является смесью магнетита (FeO·Fe₂O₃) и маггемита (ү-Fe₂O₃) [3].

Мессбауэровский спектр ядер ⁵⁷Fe в структуре ферригидрита при комнатной температуре представляет собой два квадрупольных дублета с близкими параметрами. Температура магнитного упорядочения ферригидрита варьируется в зависимости от условий синтеза от 26 К до 120 К [26]. Мессбауэровские исследования, проведенные при температуре T = 4.2 К в работе [27], показали, что двухлинейчатый ферригидрит является ферримагнетиком, а шестилинейчатый – антиферромагнетик.



Рисунок 2 – Визуализация атомов железа в октаэдрических и тетраэдрических позициях в структуре ферригидрита [25]

ГЛАВА 2. Методика эксперимента

2.1. Мессбауэровская спектроскопия

В настоящей работе основным методом исследования процессов преобразования железосодержащих минералов, подвергшихся воздействию экстремофильных микроорганизмов, являлась мессбауэровская спектроскопия. Она представляет собой эффективный метод исследования структур вещества, находящегося в конденсированном состоянии. Благодаря своей рекордной относительной разрешающей способности мессбауэровская спектроскопия активно используется в физике, химии, геологии, минералогии, почвоведении, биологии и медицине.

Мессбауэровские исследования проводились с использованием источника ⁵⁷Со в матрице Rh на спектрометре MS-1104Em, калибровка осуществлялась с помощью эталонного образца α-Fe. Мессбауэровский эксперимент проводился в геометрии на прохождение в режиме постоянных ускорений с треугольной формой временной зависимости доплеровской скорости движения поглотителя относительно источника. Измерение мессбауэровских спектров при низких температурах и во внешних магнитных полях, ориентированных перпендикулярно направлению пролета у-квантов, проводились в Карлов университете (Прага, Чешская республика).

2.1.1. Параметры мессбауэровского спектра

Измеряемая в мессбауэровской спектроскопии энергия сверхтонкого взаимодействия всегда определяется произведением двух величин: некоторой характеристикой ядра и характеристикой электромагнитного поля в области расположения ядра или окружения ядра, создающего поле [28, 29]. При Мессбауэра рассмотрении эффекта предполагается, что структура электромагнитного поля не меняется в процессе у-перехода. В таком случае, важнейшими видами сверхтонкого взаимодействия атомного ядра с его монопольное, электрическое окружением являются электрическое квадрупольное и магнитное дипольное взаимодействия.

Если существует ненулевая плотность электронов $|\Psi(0)|^2$ в области расположения ядра, то электростатическое взаимодействие ядра конечных

размеров с его окружением вызывает сдвиг ядерных энергетических уровней на величину

$$\Delta E = \frac{2\pi Z e^2 R^2 \left|\Psi(0)\right|^2}{5},$$

где *е* – заряд электрона, *Ze* – заряд ядра, *R* – эффективный радиус ядра (радиус сферы с равномерно распределенным внутри нее зарядом ядра).

Поскольку ядра в различных энергетических состояниях имеют различные размеры, при переходе от источника к поглотителю может меняться электронная плотность в области расположения ядра. Следовательно, эта поправка приводит к изменению энергии γ-переходов и, так называемому, изомерному сдвигу мессбауэровской линии:

$$\delta_{I} = \frac{c}{E_{0}} \cdot \frac{2}{5} \pi Z e^{2} \left(R_{ex}^{2} - R_{g}^{2} \right) \left(\Psi_{a}(0) \right)^{2} - \left| \Psi_{s}(0) \right|^{2} \right),$$

где c – скорость света, E_0 – несмещенный уровень энергии перехода, индексы *ex* и *gr* относятся к возбужденному и основному состояниям ядра соответственно, а индексы *a* и *s* – к поглотителю и источнику соответственно.

Следующим членом разложения по мультиполям электростатического взаимодействия ядра с окружением является квадрупольный член. Квадрупольная структура определяется электрическим взаимодействием квадрупольного момента ядра Q с градиентом электрического поля, созданного окружающими зарядами в области расположения ядра. Это приводит к снятию вырождения ядерного уровня по абсолютной величине проекции полного момента m_1 и появлению квадрупольного смещения ε компонент в мессбауэровском спектре.

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

где *eq* – градиент электрического поля, η – параметр асимметрии.

Магнитное дипольное взаимодействие возникает вследствие взаимодействия ядерного магнитного дипольного момента с эффективным магнитным полем в области расположения ядра. Магнитное дипольное

взаимодействие снимает вырождение ядерного энергетического уровня по магнитному квантовому числу m_I . Это приводит к расщеплению основного и возбужденного состояний, в результате чего в мессбауэровском спектре проявляются несколько линий, число которых соответствует числу возможных переходов между магнитными подуровнями этих состояний. Анализ величины эффективного магнитного поля позволяет получить информацию об особенностях магнитной, электрической и атомной структур исследуемых соединений.

Еще одним параметром мессбауэровского спектра являются относительные интенсивности переходов между соответствующими подуровнями основного (gr) и возбужденного (ex) состояний. Они определяются квадратом модуля соответствующих матричных элементов оператора \hat{H} взаимодействия ядра с полем излучения:

$$I_{ex\to gr} = |\langle \Psi_{ex} | \widehat{H} | \Psi_{gr} \rangle|^2.$$

Эти интенсивности зависят от угла \mathscr{G} между волновым вектором γ -кванта \mathbf{k}_{γ} и осью квантования Z, направленной вдоль поля. При магнитном дипольном излучении (или поглощении) M1 с уровня J = 3/2 на уровень J = 1/2 (ядра ⁵⁷Fe) в случае аксиально-симметричного поля (нулевой параметр асимметрии $\eta = 0$) угловое распределение интенсивностей имеет вид:

$$I_{\pm 3/2 \to \pm 1/2} = b(1 + \cos^2 \vartheta),$$
$$I_{\pm 1/2 \to \pm 1/2} = b(\frac{5}{3} - \cos^2 \vartheta),$$

где b = const. Тогда отношение интенсивностей перехода, а, следовательно, и компонент квадрупольного дублета, будет равно:

$$k(\vartheta) = \frac{I_{\pm 3/2 \to \pm 1/2}}{I_{\pm 1/2 \to \pm 1/2}} = \frac{1 + \cos^2 \vartheta}{\frac{5}{3} - \cos^2 \vartheta} = \frac{2 - \sin^2 \vartheta}{\frac{2}{3} + \sin^2 \vartheta}$$

Нетрудно заметить, что существует характерный (так называемый «хитрый») угол $\vartheta_0 = 54.74^\circ$, при котором $k(\vartheta_0) = 1$. Таким образом, если в

эксперименте нормаль к поверхности образца составляет «хитрый» угол с направлением пролета *ү*-квантов, компоненты квадрупольного дублета равны.

Для проведения измерений в такой геометрии, что нормаль к поверхности образца составляла «хитрый» угол ($\vartheta = 54.74^{\circ}$) с направлением пролета γ -квантов, образцы в виде порошка помещались в парафиновый конус.

Обработка мессбауэровских спектров суперпарамагнитных частиц проводилась в модели многоуровневой суперпарамагнитной релаксации [30]. В этой модели используется дополнительный параметр, отвечающий за релаксацию, $\alpha = \frac{KV}{k_BT}$, где V – объем частицы, T – температура, K – константа магнитной анизотропии, а k_B – постоянная Больцмана. Данная формула позволяет по зависимости параметра α от обратной температуры оценить объем и, следовательно, размер суперпарамагнитных частиц.

2.1.2. Обработка спектров

Для обработки и анализа экспериментальных мессбауэровских спектров использовалась программа SpectrRelax, которая позволяет восстанавливать несколько независимых распределений сверхтонких параметров парциальных спектров, а также проводить модельную расшифровку спектра [31]. При решении этих задач в программе SpectrRelax используется метод наименьших квадратов (МНК) и алгоритм Левенберга-Марквардта (LMA). Расшифровка мессбауэровских спектров связана с поиском модели, характеризуемой набором физических параметров, которые однозначно определяют огибаюшую спектра. В качестве варьируемых параметров моделей используются величины, имеющие непосредственный физический смысл: мессбауэровской сдвиг линии, квадрупольное смещение компонент, сверхтонкое магнитное поле, площадь спектра, площади и ширины компонент спектра, скорости релаксации.

2.2. Спектроскопия электронного парамагнитного резонанса

Еще одним эффективным методом исследования образцов, находящихся в конденсированном состоянии, является спектроскопия электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). ЭПР – это явление избирательного

(резонансного) поглощения энергии электромагнитного излучения парамагнитным образцом, помещенным в постоянное магнитное поле [32].

Измерения спектров ЭПР проводились при комнатной температуре на спектрометре Х-диапазона (9.12 ГГц), сопряженном с персональным компьютером. Спектры записывались с использованием модуляционной частоты 100 кГц, амплитуды модуляции 10 Э, микроволновой мощности 10 мВт, шириной развертки магнитного поля 4 кЭ. Образцы в виде мелкодисперсных порошков на дне узкой (диаметр 4 мм) кварцевой ампулы помещались в центр прямоугольного резонатора с модой TE₁₀₂.

Спектры ЭПР измерены проф. кафедры общей физики физического факультета Ю.А. Кокшаровым.

2.3. Спектроскопия комбинационного рассеяния

Комбинационное рассеяние света – это рассеяние света на частицах газов, жидкостей или кристаллов, сопровождающееся заметным изменением его частоты. В спектре комбинационного рассеяния излучения наблюдаются новые спектральные линии, отсутствовавшие в линейчатом спектре возбуждающего света. Эти новые составляющие спектра возникают в результате взаимодействия первичного излучения с веществом. Число, интенсивность и частоты линий комбинационного рассеяния определяются молекулярным строением и составом вещества [33].

Спектры комбинационного рассеяния измерялись на спектрометре Raman Flex400 (PerkinElmer) с оптоволоконным зондом в геометрии отражения. Длина волны возбуждения диодного лазера составляла 785 нм (ширина линии 0,03 нм) и размер пятна 3 мм. Мощность лазера составляла 50 мВт. Время набора спектра составляло 4 с при 20 сканированиях. Базовая линия была скорректирована автоматически в соответствии с внутренним стандартом. Обработка спектра, определение положения, интенсивности, формы и ширины линий проводились с помощью программ SPECTRUM (Perkin Elmer).

Измерения спектров комбинационного рассеяния выполнены на кафедре физики твердого тела под руководством д. ф.-м. наук Т.Ю. Киселевой.

2.4. Рентгенофазовый анализ

Для проверки результатов обработки мессбауэровских спектров и идентификации неизвестных фаз в работе использован метод порошковой рентгеновской дифракции. В его основе лежит уравнение Брэгга-Вульфа

$2d\sin\theta = n\lambda$,

где 2 θ – угол дифракции, d - расстояние между плоскостями n- целое число, λ – длина волны падающего излучения.

Результатом исследования является зависимость интенсивности рассеянного излучения от угла дифракция 2*θ*. Геометрия, параметры и интенсивность пиков дают информацию об элементарной ячейке кристалла и функции распределения электронной плотности внутри кристалла.

Рентгеновские исследования выполнены на кафедре физики твердого тела под руководством д. ф.-м. наук Т.Ю. Киселевой. Дифрактограммы измерены на дифрактометре PANalytical Empyrean с использованием медного анода ($\lambda = 1.5405$ Å, рабочие режимы I = 40 мА, U = 40 кВ) в геометрии Брегга-Брентано с использованием двухкоординатного детектора Pixel3D и системы варьируемых щелей. Фазовый анализ дифрактограмм проводился с помощью программного обеспечения HighScore Plus (PANalytical) с применением кристаллографической базы данных ICSD PDF2.

ГЛАВА 3. Исследование процессов преобразования сидерита и ферригидрита экстремофильными микроорганизмами

Данная работа проводилась в сотрудничестве с к.г.-м.н., с.н.с. Д.Г. Заварзиной и к.б.н., с.н.с. С.Н. Гавриловым (лаборатория реликтовых микробных сообществ института микробиологии им. С.Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН). Работы по подготовке образцов, включая рост микроорганизмов и сушку образцов твердых фаз, проводились в лаборатории института микробиологии. Нашей задачей являлась диагностика преобразований минеральных фаз, полученных в результате экспериментов, и исследование их физических свойств.

3.1. Исследование кинетики преобразования сидерита накопительной

культурой, полученной из термального источника Солнечный

Устойчивая термофильная накопительная культура (рис. 3) получена из пробы донных осадков источника Солнечный (кальдера Узон, Камчатка). Источник представляет собой большой неглубокий источник (3-3.5 м) неопределенной формы с красно-коричневым глиняным дном и двумя крупными выходами газа. Температура источника $T = 61-64^{\circ}$ С. Анализ полученной культуры показал наличие в ней микроорганизмов, способных использовать железо в реакциях своего метаболизма [34].



Рисунок 3 – Изображение накопительной культуры, полученное с помощью оптического микроскопа

В первом эксперименте исследованы образцы твердых фаз, полученных в результате роста устойчивой накопительной культуры в закрытой пробирке, содержащей жидкую минеральную среду (30 мл), газовую фазу (20 мл) и сидерит в качестве донора электронов. Во втором эксперименте культура была пересеяна в 3-х литровый ферментер с минеральной средой, содержащей около 100 г сидерита на 3 л среды. Ферментер представляет собой прибор для глубинного культивирования микроорганизмов, осуществляющий перемешивание жидкой фазы и поддержание постоянной температуры. Соотношение объемов газовой и жидкой фаз было установлено на уровне 1:6. Такой режим культивирования позволил смоделировать природную гидротермальную систему источника Солнечный с плотными отложениями железосодержащих минералов на дне, активным выходом газообразного СО₂ в центре источника и окисленным верхним слоем гидротермального флюида. Образцы твердых фаз, полученные после роста микроорганизмов, 3 раза промывали ацетоном и досушивали в эксикаторе в атмосфере 100% N₂.

Для исследования процессов биогенного преобразования сидерита необходимо было сначала провести исследования зарядовых состояний атомов железа в его структуре после взаимодействия со стерильной минеральной средой. На рис. 4 (а) представлен мессбауэровский спектр контрольного абиогенного образца, полученного после взаимодействия исходного сидерита со средой в отсутствии микроорганизмов.



Рисунок 4 – Мессбауэровские спектры образца исходного гидротермального сидерита, измеренные при *T* = 300 K в обычной геометрии (слева) и при *θ* = 54.74° (справа)

Видно, что компоненты квадрупольного дублета имеют неравные интенсивности $(I_2/I_1 = 1.06 \pm 0.01)$. Было выдвинуто предположение, что это может быть связано с тем, что исследуемый поликристаллический образец является текстурированным (самопроизвольно ориентированным). Для устранения этого эффекта измерен мессбауэровский спектр контрольного образца в такой геометрии, что нормаль к поверхности образца составляла «хитрый» угол ($\vartheta = 54.74^{\circ}$) с направлением пролета γ -квантов. Полученный спектр представлен на рис. 4 (б). Для его обработки использована модель, состоящая из одного квадрупольного дублета с компонентами равной интенсивности и мессбауэровскими параметрами $\delta = 1.23 \pm 0.01$ мм/с и $\varepsilon = 0.89 \pm 0.01$ мм/с, характерными для двухвалентных атомов железа в структуре сидерита [18]. Тем самым подтверждено предположение о наличии образце текстуры (самопроизвольной ориентации). Интенсивность В компоненты квадрупольного дублета, соответствующая π -переходу, (правая линия) больше интенсивности компоненты, соответствующей σ-переходу (левая линия). Поскольку согласно данным работ [22, 35] константа сверхтонкого квадрупольного взаимодействия положительна, в соответствии с формулой $k(\vartheta)$ (см. Главу 2) рассчитано среднее значение угла между направлением пролета у-квантов и главной осью тензора градиента электрического поля в предположении аксиально-симметричного поля. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что среднее значение этого угла равно 51.5±0.8°.

Для исследования образцов твердых фаз, полученных в результате роста устойчивой накопительной культуры в закрытой пробирке, измерены мессбауэровские спектры в обычной геометрии и под «хитрым» углом (рис. 5). Для обработки обоих спектров использована модель, состоящая из трех квадрупольных дублетов: исходного D₁, соответствующего Fe^{2+} в структуре исходного сидерита, и новых D₂ и D₃, соответствующих Fe^{2+} и Fe^{3+} в структуре новой формирующейся фазы. Параметры дублетов D₂ и D₃ указаны в таблице 1.



Рисунок 5 – Мессбауэровские спектры образца, полученного в результате роста накопительной культуры в закрытой пробирке, измеренные при *T* = 300 K в обычной геометрии (слева) и при *θ* = 54.74° (справа)

Анализ параметров новых квадрупольных дублетов D₂ и D₃ позволяют сделать вывод, что в ходе роста культуры в пробирке в присутствии сидерита происходит окисление двухвалентных атомов железа в его структуре, а затем образованием минерала, содержащего восстановление с ИХ двух- и трехвалентные атомы железа. Вероятно, формирующийся минерал представляет собой оксигидроксикарбонат Fe^{II-III} (карбонатная зеленая [36]. Общая формула оксигидроксикарбонатов ржавчина) выглядит следующим образом: $[Fe^{II}_{6(1-x)}Fe^{III}_{6x}O_{12}H_{2(7-3x)}]^{2+}$ $[CO_3^{2-} \cdot 3H_2O]^{2-}$, где параметр $x = \frac{N(\text{Fe}^{\text{II}})}{N(\text{Fe}^{\text{II}}) + N(\text{Fe}^{\text{III}})}$ колеблется в интервале $\left[\frac{1}{3}, \frac{2}{3}\right]$. В представленной обработке параметр $x = 0.50 \pm 0.07$, что совпадает с результатами других авторов, Fe^{II-III} получивших оксигидроксикарбонат В результате деятельности микроорганизмов[37].

Таблица 1. Мессбауэровские параметры парциальных спектров, соответствующих атомам железа в структуре новой фазы.

	<i>I</i> , %	δ , мм/с	<i>є</i> , мм/с
D ₂	5.3±1.1	1.22±0.06	1.32±0.08
D ₃	5.1±0.8	0.31±0.08	0.22±0.03

Помимо этого, методом мессбауэровской спектроскопии исследована временная зависимость состава образцов твердых фаз, полученных в результате продолжительного роста накопительной культуры в ферментере в присутствии сидерита в качестве донора электронов. Изображение одного из образцов, полученное с помощью конфокального микроскопа, представлено на рис. 6.



Рисунок 6 – Изображение образца твердых фаз из ферментера, полученное с помощью конфокального микроскопа

Обработка полученных спектров в рамках модели исходного сидерита не увенчалась успехом. Поэтому в модель добавлены новый квадрупольный дублет и зеемановский секстет (рис. 7). Параметры нового квадрупольного дублета ($\delta = 1.18\pm0.01$ мм/с и $\varepsilon = 0.94\pm0.01$ мм/с) во всех опытных образцах близки к параметрам сидерита, но несколько отличаются от параметров исходного минерала. Минеральная фаза, содержащая двухвалентные атомы железа с такими же параметрами, была обнаружена в работе [38] при росте термофильной бактерии *Thermincola ferriacetica* и была идентифицирована как биогенный сидерит. Параметры зеемановского секстета позволяют предположить, что в ходе роста культуры формируются крупные (~100 нм) частицы магнитоупорядоченной фазы (МУФ) магнетита (FeO·Fe₂O₃), однако их относительное содержание слишком мало для точной идентификации.



Рисунок 7 – Мессбауэровские спектры образцов, полученных в результате роста культуры в присутствии сидерита в течение 11 (а) и 47 (б) дней

Всего исследовано 7 образцов, отличающихся временем роста культуры. Мессбауэровские исследования образцов, полученных в результате роста микроорганизмов в среде для культивирования в присутствии сидерита, формирование новой парамагнитной выявили фазы, содержащей двухвалентные атомы железа, И малого количества оксидной магнитоупорядоченной фазы, содержащей трехвалентные атомы железа. Зависимость относительного содержания разных фаз от времени роста культуры представлена на рис. 8. Нетрудно заметить, что относительное содержание биогенного сидерита в образце растет с увеличением времени роста культуры. Было выдвинуто предположение, что новая парамагнитная фаза, содержащая двухвалентные атомы железа, является биогенным сидеритом, а магнитоупорядоченная фаза является смесью гематита и магнетита.



Рисунок 8 – График зависимости относительного содержания фаз в образцах от времени роста культуры

Для уточнения факта формирования МУФ проведены ЭПР исследования образцов: 1) соответствующего началу роста культуры и 2) **ДВУХ** соответствующего 47 дням роста (т.е. того, в котором в соответствии с исследованиями относительное мессбауэровскими содержание магнитоупорядоченной фазы наибольшее). Полученные ЭПР спектры представлены на рис. 9. В спектре первого образца виден слабый сигнал, почти незаметный на уровне фона. В спектре второго образца сигнал уже заметный. Его ширина примерно 1300 Э, g-фактор равен 2,3. Полученные результаты образце свидетельствуют том, что присутствуют 0 В частицы магнитноупорядоченной фазы, так как в случае парамагнитной фазы g-фактор был бы равен 2,0. Ширина спектра указывает на то, что магнитоупорядоченная фаза представлена в образце в виде микрочастиц или наночастиц в агломерате, так как ширина спектра для изолированных наночастиц магнетита при комнатной температуре как минимум в 2 раза меньше [39]. Анализ ЭПР

спектров подтвердил наше предположение, что в ходе роста культуры происходит формирование магнетита.



Рисунок 9 – Спектры ЭПР образцов, соответствующих началу роста культуры (черный) и 47 дням роста (красный)

Для идентификации формирующейся парамагнитной фазы проведен рентгенофазовый анализ образцов исходного минерала, полученного в результате взаимодействия со средой в отсутствии микроорганизмов, и твердых фаз, полученных в результате роста культуры в присутствии сидерита в минеральной среде. Рентгенофазовый анализ показал наличие в обоих образцах сидерита, кварца и оксида алюминия, добавленного в ходе мессбауэровских исследований. На рис. 10 представлена дифрактограмма образца твердых фаз, полученных в результате роста культуры в присутствии сидерита. Обработка дифрактограммы выявила наличие образце, В подвергшегося биотрансформации, два типа сидерита: 1) аналогичный сидериту, обнаруженному в исходном образце с параметрами решетки $a = 4,694 \pm 0.001$ Å, $c = 15,386 \pm 0.002$ Å и средним размером частиц ~2,8 мкм, новый биогенный $a = 4,701 \pm 0.001$ Å, сидерит с параметрами $c = 15,407 \pm 0.005$ Å, частицы которого 0,2 мкм. Пики, меньше соответствующие другим парамагнитным железосодержащим фазам, не наблюдаются в дифрактограмме. Обработка дифрактограммы образца

исходного сидерита, полученного в результате взаимодействия со средой в отсутствии микроорганизмов, показала отсутствие в нем биогенного сидерита с вышеуказанными параметрами. Это подтверждает наше предположение о формировании в образцах биогенного сидерита как конечного продукта трансформации.



Рисунок 10 – Дифрактограмма образца твердых фаз, полученных в результате роста культуры в присутствии сидерита

Измерены спектры комбинационного рассеяния света образцов исходного минерала и полученного в результате роста культуры (рис. 11). В спектре контрольного образца (черный) присутствуют линии, соответствующие сидериту (289 см⁻¹, 736 см⁻¹, 1087 см⁻¹) и кварцу (464 см⁻¹), соответствует результатам рентгенофазового анализа. Эти линии ЧТО присутствуют и в спектре образца, полученного в результате роста культуры в присутствии сидерита (синий). Помимо них, в спектре наблюдаются новые линии малой интенсивности, соответствующие гематиту (224 см⁻¹, 411 см⁻¹)

[40] и смеси магнетита и маггемита (544 – 664 см⁻¹) [41]. Следует отметить, что в образце возможно окисление сформировавшегося магнетита в маггемит в результате воздействия лазерного луча. Помимо этого, в спектре образца, полученного в результате роста культуры, наблюдался значительный флуоресцентный фон, который был вычтен в ходе обработки, и широкие линии в диапазонах 1250 – 1350 см⁻¹, 1390 – 1500 см⁻¹. Подобные значения характерны для колебаний связей С-Н, С-О и С-С [42]. Их наличие объясняется присутствием в образце органических материалов.



Рисунок 11 – Спектры комбинационного рассеяния образцов исходного минерала (черный) и полученного в результате роста культуры (синий)

Образцы, полученные со стенок и лопастей ферментера после роста культуры, также исследованы методами мессбауэровской спектроскопии. Для обработки полученных спектров (один из них представлен на рис 12.) использована модель, состоящая из трех квадрупольных дублетов (D_1 , D_2 , D_3) и распределения сверхтонкого магнитного поля в модели многоуровневой суперпарамагнитной релаксации. Параметры квадрупольных дублетов D_1 (синий) и D_2 (зеленый) соответствуют двухвалентным атомам железа в структурах исходного и биогенного сидеритов. Присутствие распределения (отмечено красным) в спектре и его параметры ($H = 515\pm5$ кЭ) позволяют сделать вывод о формировании в исследуемом образце малых частиц гематита. Параметры квадрупольного дублета D_3 (оранжевый) могут соответствовать трехвалентным атомам железа в структуре ферригидрита или малых (10%) частиц гематита. Относительная интенсивность спектров, соответствующих трехвалентным атомам железа, составляет приблизительно 30%. Вероятно, их появление обусловлено окислением образца.



Рисунок 12 – Мессбауэровский спектр образца, полученного со стенок ферментера

На основании мессбауэровских исследований преобразования исходного абиогенного гидротермального сидерита в этой культуре и наблюдавшейся зафиксированной продукции ацетата, сотрудниками института микробиологии им. С.Н. Виноградского, было сделано предположение о функционировании устойчивого биогеохимического цикла железа в культуре (рис. 13). Железоокисляющие ацетогены осуществляют продукцию ацетата, который затем может быть использован железоредукторами в качестве донора электронов для восстановления образовавшихся окисленных минералов, содержащих Fe³⁺. Полученные результаты показали принципиальную существования замкнутого преобразований возможность цикла минералов, железосодержащих сопряженного с хемосинтетической продукцией органического вещества (ацетата), что создает теоретические предпосылки для разработки процессов хемосинтетической продукции



Рисунок 13 – Схема существующего в источнике Солнечный замкнутого цикла железа

3.2. Исследование влияния площади поверхности ферригидрита, доступной бактерии *Geoalkalibacter ferrihydriticus* для его преобразования, на процессы биотрансформации

В работе изучались минералы, полученные в результате роста бактерии *Geoalkalibacter ferrihydriticus* (штамм Z-0531) в присутствии синтезированного ферригидрита в среде для культивирования. Данная бактерия выделена из донных осадков слабо минерализованного содового озера Хадын (республика Тыва). *G. ferrihydriticus* является алкалофильной бактерией, способной восстанавливать аморфный гидроксид Fe(III), окисляя ацетат [43].

В работе исследованы три образца, синтезированных при разных площадях поверхности минерала, доступного для трансформации бактерии. Различные площади ($Sq_1 < Sq_2 < Sq_3$) достигнуты путем различной ориентацией сосудов с минеральной средой, бактериями и СФ (рис. 14). Время роста бактерии для всех образцов одинаково. Концентрация исходного СФ в среде

роста составляла 100 мМ. СФ был получен в результате титрования FeCl₃ 10%ным раствором NaOH. Для проведения низкотемпературных измерений и предотвращения окисления высушенные образцы твердых фаз спрессовывались в таблетки (рис. 15) с помощью амидного воска (C₃₈H₇₆N₂O₂, регистрационный номер CAS 110-30-5).



Рисунок 14 – Различная ориентация сосудов с минеральной средой, бактериями и СФ



Рисунок 15 – Исследуемые образцы твердых фаз, спрессованные в таблетки

Для исследования процессов биогенных трансформаций синтезированного ферригидрита (СФ) необходимо было сначала провести исследования структурных и зарядовых состояний атомов железа в его

структуре после взаимодействия со стерильной минеральной средой. Образец, полученный в результате добавления СФ в среду в отсутствие микроорганизмов, исследован методами мессбауэровской спектроскопии при комнатной температуру и при температуре T = 4.2 К. Для исследования относительного содержания атомов железа в различных позициях (см. Главу 1) измерен мессбауэровский спектр при T = 4.2 К с приложением внешнего магнитного поля $B_{ext} = 6$ Тл, ориентированного перпендикулярно направлению пролета γ -квантов.

Мессбауэровский спектр контрольного образца, измеренный при комнатной температуре, (рис. 16 (а)) является спектром парамагнитного типа и идентичен спектру исходного СФ. Для их обработки использована модель, состоящая из двух квадрупольных дублетов с параметрами, характерными для ферригидрита ($\delta_1 = 0.34 \pm 0.01$ мм/с, $\varepsilon_1 = 0.29 \pm 0.01$ мм/с, $\delta_2 = 0.33 \pm 0.01$ мм/с, $\varepsilon_2 = 0.51 \pm 0.01$ мм/с, $\Gamma_1 = \Gamma_2 = 0.44 \pm 0.01$ мм/с). Из полученных результатов сделан вывод, что стерильная минеральная среда не оказывает влияние на исходный СФ и не приводит к формированию новых железосодержащих минералов в образце.



Рисунок 16 – Мессбауэровские спектры образца СФ, измеренные при комнатной температуре (а) и при *T* = 4.2 К (б), распределение сверхтонкого магнитного поля в области расположения ядра железа (в)

Измеренный при температуре T = 4.2 К мессбауэровский спектр СФ является симметричным и содержит шесть резонансных линий (рис. 16 (б)). Обработка спектра проводилась с помощью восстановления распределения Sd сверхтонкого магнитного поля в области расположения ядра. Параметры парциального спектра Sd представлены в таблице 2.

	<i>I</i> , %	<б>, мм/с	$\delta_{ ext{max}}$,	<i>ɛ</i> , MM/C	< <i>H</i> _n >,	$H_{ m n}$ max,	Г, мм/с	
Sd	100	0.46±0.01	0.46 ± 0.01	-0.005 ± 0.001	489±1	501±2	0.58 ± 0.01	
	Во внешнем магнитном поле $B_{\text{ext}} = 6$ Тл							
Sd_1	66.3±1.3	0.46±0.001	0.46 ± 0.01	-0.008 ± 0.001	462±1	467±2	0.59±0.01	
Sd_2	33.7±1.3	$0.44{\pm}0.01$	0.44 ± 0.01	-0.005 ± 0.001	532±1	523±4	0.60 ± 0.01	

Таблица 2. Мессбауэровские параметры парциальных спектров, соответствующих атомам Fe^{3+} в структуре СФ, при T = 4.2 К.

Мессбауэровский спектр СФ, измеренный при температуре T = 4.2 К с приложенным внешним магнитным полем, представляет собой секстет с уширенными спектральными линиями (Рис. 17). Обработка спектра велась с помощью независимого восстановления двух распределений Sd₁ и Sd₂ сверхтонкого магнитного поля в области расположения ядра. Параметры распределений (табл. 2) соответствуют атомам трехвалентного железа в двух неэквивалентных позициях. Анализ полученных данных выявил, что приложение внешнего магнитного поля приводит к увеличению значения сверхтонкого магнитного поля в области расположения ядер железа в одной позиции и к уменьшению в другой. Соотношения между площадями линий I_2/I_1 для обоих парциальных спектров равны соответственно 0.75±0.01 и 0.66±0.01, что существенно меньше теоретического 1.33. По-видимому, как было показано в работе [44], с точки зрения магнитной структуры при $T = 4.2 \text{ K C} \Phi$ представляет собой сперомагнетик. Следовательно, как было показано в работе [45], при приложении внешнего магнитного поля магнитную структуру СФ можно представить в виде совокупности магнитных моментов, ориентированных по полю и против поля в пределах двух пространственных конусов с углами раствора 54° и 44° соответственно. В

случае отсутствие внешнего поля магнитные моменты направлены случайным образом.



Рисунок 17 – Мессбауэровский спектр образца СФ, измеренный при *T* = 4.2 К во внешнем магнитном поле *B*_{ext} = 6 Тл (слева), распределения сверхтонкого магнитного поля в области расположения ядра железа (справа)

Мессбауэровские спектры образца, полученного в результате роста бактерии при минимальной доступной для трансформации площади Sq₁ (крышкой вниз), представлены на рис. 18. Для обработки спектра, полученного при комнатной температуре, использована модель, состоящая из двух квадрупольных дублетов и распределения сверхтонкого магнитного поля в модели многоуровневой суперпарамагнитной релаксации, параметры которого соответствуют трехвалентным атомам железа в структуре частиц магнетита или маггемита. Оценка размеров этих частиц проведена с помощью параметра α (см. Главу 2) в предположении того, что форма частиц является сферической. Для оценки размера частиц использовалось значение константы $K_V = 13000 \frac{\#}{M^3}$. объемной магнитной анизотропии магнетита, для Рассчитанный размер частиц около 7 нм. Относительная интенсивность распределения $I = 31.9 \pm 0.7$ %. По сравнению со спектром исходного СФ наблюдается уширение линий квадрупольных дублетов ($\Gamma = 0.51 \pm 0.01$). Это свидетельствует о том, что параметры квадрупольных дублетов могут соответствовать трехвалентным атомам железа как в структуре СФ, так и в структуре малых частиц (диаметр частиц меньше 6 нм) магнетита или маггемита.



Рисунок 18 – Мессбауэровские спектры образца, полученного в процессе роста бактерии в случае доступной площади поверхности Sq_1 , измеренные при комнатной температуре (a), при T = 4.2 К (б) и при T = 4.2 К во внешнем магнитном поле $B_{\text{ext}} = 6$ Тл (в)

Для точной идентификации состава формирующихся частиц проведены измерения при T = 4.2 К (рис. 18 (б)). Обработка проводилась с помощью модели, содержащей три зеемановских секстета (S_1, S_2, S_3) и распределение Sd сверхтонкого магнитного поля в области расположения ядра железа в структуре СФ. Форма распределения фиксирована в соответствии с обработкой спектра исходного СФ. Анализ полученных результатов позволяет сделать вывод, что только 47% образца преобразованы бактерией в смесь магнетита и маггемита. Параметры секстетов, соответствующие атомам железа в структурах магнетита и маггемита, представлены в таблице 3. Секстет S_1 (красный) соответствует Fe^{3+} в тетраэдрической позиции, S_2 (оранжевый) - Fe³⁺ в октаэдрической позиции, S₃ (зеленый) - Fe²⁺ в октаэдрической Оставшиеся 53% СΦ позиции. остались

нетрансформированными. Это значение меньше суммарной относительной интенсивности квадрупольных дублетов, полученных в спектре, измеренном при комнатной температуре. Следовательно, в образце присутствует около 15 % малых частиц (диаметр частиц меньше 6 нм) смеси магнетита и маггемита.

В структурах магнетита и маггемита присутствуют две неэквивалентные позиции: тетраэдрическая (A) и октаэдрическая (B). Измеренный спектр не позволяет однозначно разделить A (S₁) и B (S₂, S₃) позиции магнетита и маггемита, поэтому измерен мессбауэровский спектр при T = 4.2 K во внешнем магнитном поле $B_{ext} = 6$ Тл. При приложении внешнего магнитного поля, направленного перпендикулярно направлению пролета γ -квантов, значение сверхтонкого магнитного поля атомов железа в A-позиции увеличивается, а в B-позиции уменьшается [46].

Таблица 3. Параметры парциальных спектров, соответствующих атомам железа в структуре минералов, полученных в результате трансформации СФ в случае доступной площади Sq_1 , при T = 4.2 К.

	<i>I</i> , %	δ , мм/с	<i>є</i> , мм/с	<i>Н</i> _n , кЭ		
S ₁	20.7±0.1	$0.47{\pm}0.01$	-0.07 ± 0.01	502±1		
S_2	26.3±0.2	0.48±0.01	0.02±0.01	525±1		
S ₃	2.0±0.1	1.16	0.84±0.02	349±2		
Во внешнем магнитном поле $B_{\text{ext}} = 6$ Тл						
S ₁	17.2±0.4	0.39±0.01	$0.00{\pm}0.01$	567±1		
S ₂	30.4±0.6	0.53±0.01	-0.03±0.01	466±1		
S ₃	2.0±0.2	1.18±0.04	0.88	324±1		

Обработка измеренного спектра (рис. 18 (в)) проводилась с помощью модели, состоящей из трех зеемановских секстетов и двух распределений Sd₁ и Sd₂ сверхтонкого магнитного поля в области расположения ядра железа в структуре ферригидрита. Форма распределения фиксирована в соответствии с обработкой спектра исходного СФ. Рассчитанные параметры секстетов представлены в таблице 3. Сравнение значений сверхтонкого магнитного поля в области расположения ядре железа при приложении внешнего магнитного

поля и в его отсутствии подтверждает увеличение этого значения в А-позиции и уменьшение в В-позиции. Примечательно, что для секстетов S₁ и S₂ модуль изменения значения сверхтонкого магнитного поля примерно равен 60 кЭ, что соответствует величине индукции внешнего магнитного поля $B_{\text{ext}} = 6$ Тл. Это свидетельствует о том, что при приложении магнитного поля магнитные моменты атомов железа в А-позиции выстраиваются антипараллельно B_{ext} , а в В-позиции –параллельно.

Вероятно, в образце происходит восстановление трехвалентных атомов железа до двухвалентного состояния с формированием магнетита. Однако только секстет S_3 соответствует атомам Fe^{2+} . Его относительная интенсивность около 2%. Это может свидетельствовать об окислении сформировавшегося в образце магнетита с образованием маггемита.



Рисунок 19 – Мессбауэровские спектры образца, полученного в процессе роста бактерии в случае доступной площади поверхности Sq_2 , измеренные при комнатной температуре (a), при T = 4.2 К (б) и при T = 4.2 К во внешнем магнитном поле $B_{\text{ext}} = 6$ Тл (в)

Мессбауэровские спектры образца, полученного в результате роста бактерии в случае доступной для трансформации площади поверхности Sq₂ (крышкой вверх), представлены на рис. 19. Для обработки спектра, полученного при комнатной температуре, использована модель, состоящая из трех квадрупольных дублетов и распределения сверхтонкого магнитного поля в модели многоуровневой суперпарамагнитной релаксации. Как и в вышеописанном случае, параметры распределения соответствуют трехвалентным атомам железа в структуре частиц магнетита или маггемита, параметры квадрупольных дублетов (синий и голубой) могут соответствовать Fe^{3+} как в структуре СФ, так и в структуре малых частиц магнетита или маггемита. Появления нового дублета (отмечен желтым) обусловлено формированием в образце фазы, содержащей двухвалентные атомы железа. Параметры этого дублета соответствуют двухвалентным атомам железа в структуре сидерита. Относительная интенсивность дублета, отмеченного желтым, равна примерно 3%.

Для образца, полученного в результате роста бактерии при доступной площади поверхности Sq_2 , проведены мессбауэровские измерения при T = 4.2 К и во внешнем магнитном поле $B_{\text{ext}} = 6$ Тл. Обработка спектров проводилась с помощью модели, аналогичной вышеописанной для случая Sq_1 с добавлением секстета S₄ (желтый), соответствующего двухвалентным атомам железа в структуре сидерита. Рассчитанные параметры парциальных спектров, соответствующих сформировавшимся минералам, представлены в таблице 4.

Суммарная относительная интенсивность парциальных спектров, соответствующих двухвалентным атомам железа около 5%. Анализ полученных результатов позволяет сделать вывод, что около 52% образца трансформировано бактерией в смесь магнетита, маггемита и сидерита. Половина исходного СФ осталась непреобразованной. Как и в случае Sq_1 , сравнение спектров, измеренных при комнатной температуре и при T = 4.2 K, показало наличие в образце малых частиц (диаметр частиц меньше 6 нм) магнетита или маггемита. Их относительное содержание около 29%.

Таблица 4. Параметры парциальных спектров, соответствующих атомам железа в структуре минералов, полученных в результате трансформации СФ в случае доступной площади Sq_2 , при T = 4.2 К.

	<i>I</i> , %	δ , мм/с	<i>є</i> , мм/с	<i>Н</i> _n , кЭ		
\mathbf{S}_1	17.8±0.1	0.45±0.01	-0.06±0.01	502±1		
S_2	29.6±0.3	$0.48{\pm}0.01$	0.004 ± 0.004	524±1		
S ₃	2.3±0.1	1.160	0.91±0.02	368±2		
\mathbf{S}_4	2.8±0.2	1.45 ± 0.01	1.11±0.01	173±1		
Во внешнем магнитном поле $B_{\text{ext}} = 6$ Тл						
\mathbf{S}_1	18.4±0.3	0.39±0.01	$0.00{\pm}0.01$	566 ±1		
\mathbf{S}_2	31.6±0.2	0.51±0.01	-0.01±0.01	466±1		
S ₃	2.3±0.3	1.11±0.06	0.12±0.06	287±4		
\mathbf{S}_4	2.4±0.3	1.24±0.01	$0.77{\pm}0.01$	152±1		

В образце, полученном в результате трансформации СФ в случае доступной площади поверхности Sq_2 , также происходит восстановление трехвалентных атомов железа до двухвалентного состояния с формированием магнетита. Секстеты S₃ и S₄ соответствует атомам Fe²⁺. Их суммарная относительная интенсивность около 5%.

Наибольшие изменения наблюдаются в образце, полученном в результате роста бактерии при горизонтальной ориентации сосуда, т.е. при максимальной доступной площади поверхности Sq_3 (рис. 20). Для обработки мессбауэровского спектра, измеренного при комнатной температуре, использована модель, состоящая из трех распределений сверхтонкого магнитного поля в модели многоуровневой суперпарамагнитной релаксации, параметры которых соответствуют Fe³⁺ в структуре маггемита, Fe³⁺ и Fe^{2,5+} в структуре магнетита.

Для обработки спектров, измеренных при T = 4.2 К, использована модель, состоящая из набора зеемановских секстетов. Рассчитанные мессбауэровские параметры представлены в таблице 5 и близки к параметрам магнетита, полученным в работе [47]. Парциальные спектры S₃, S₄, S₅ (отмечены оттенками зеленого) соответствуют двухвалентным атомам железа в

структуре магнетита. Модель обработки спектра, полученного при приложении внешнего магнитного поля, содержит два секстета S₃, S₄, соответствующих двухвалентным атомам железа в структуре магнетита. Суммарные относительные интенсивности парциальных спектров, соответствующих двухвалентным атомам железа, в обоих спектрах равны ~29%.



Рисунок 20 – Мессбауэровские спектры образца, полученного в процессе роста бактерии в случае доступной площади поверхности Sq_3 , измеренные при комнатной температуре (a), при T = 4.2 К (б) и при T = 4.2 К во внешнем магнитном поле $B_{\text{ext}} = 6$ Тл (в)

В спектре, измеренном в присутствии внешнего магнитного поля, ориентированного перпендикулярно направлению пролета *у*-квантов, наблюдается увеличение значений сверхтонкого магнитного поля в области расположения ядер железа для А-позиции магнетита (секстет S₁, отмечен красным) и уменьшение для В-позиции магнетита (секстет S₂, отмечен

красным). При обработке спектра удалось выделить парциальные спектры, предположительно соответствующие маггемиту: S₅ (отмечен фиолетовым) соответствует трехвалентным атомам железа в А-позициях, S₆ (отмечен коричневым) – в В-позициях.

	<i>I</i> , %	δ , мм/с	<i>є</i> , мм/с	<i>Н</i> _п , кЭ				
S ₁	36.8±2.0	0.41±0.01	0.004±0.003	507±1				
S ₂	36.2±1.5	0.54±0.01	-0.002 ± 0.004	526±1				
S ₃	14.3±0.6	0.73±0.01	-0.17±0.01	479±1				
S ₄	8.3±0.4	1.17±0.02	-0.15±0.02	461±2				
S ₅	4.3±0.3	1.24±0.03	0.75±0.02	368±2				
	Во внешнем магнитном поле $B_{\text{ext}} = 6$ Тл							
S ₁	18.0±1.2	0.38±0.01	0.00±0.01	570±1				
S ₂	24.7±3.0	0.46±0.02	-0.17±0.03	467±1				
S ₃	16.6±0.8	0.94±0.01	-0.42±0.02	423±1				
S ₄	12.1±0.7	1.08 ± 0.02	0.44±0.03	414±2				
S ₅	10.7±0.2	0.39±0.01	-0.05±0.01	554±2				
S ₆	17.9±3.4	0.57±0.01	0.06±0.01	468±1				

Таблица 5. Параметры парциальных спектров, соответствующих атомам железа в структуре минералов, полученных в результате трансформации СФ в случае доступной площади *Sq*₃, при *T* = 4.2 K.

Для исследования размеров формирующихся частиц дополнительно измерены мессбауэровские спектры при T = 135 К и T = 100 К (рис. 21) для образца, полученного в процессе роста бактерии в случае доступной площади поверхности Sq_3 . Оценка размеров проведена в соответствии с описанной в Главе 2 процедурой в предположении того, что форма частиц является сферической. Для оценки размера частиц использовалось значение константы объемной магнитной анизотропии для магнетита, $K_V = 13000 \frac{Д_{\#}}{M^3}$. Анализ полученных значений показал наличие в образце как частиц со средним диаметром $d = 6\pm 1$ нм (им соответствует парциальный спектр, отмеченный красным), так и частиц с $d = 16\pm 2$ нм (им соответствуют парциальные спектры,

фиолетовым, оранжевым и зеленым). При уменьшении отмеченные температуры от 300 К до 100 К происходит уменьшение относительной интенсивности распределения, соответствующего частицам меньшего размера. Это обусловлено тем, что температура блокировки, при которой прекращаются тепловые флуктуации магнитных моментов атомов и их спиновое состояние замораживается, зависит от размера частиц. Понижение увеличение относительной температуры приводит К интенсивности парциальных спектров, соответствующих более крупным частицам (для которых температура блокировки уже пройдена), и уменьшению среднего размера частиц, вычисленного из параметров этих парциальных спектров. Такие изменения, наблюдаемые в мессбауэровских спектрах, свидетельствует о наличии распределения частиц по размерам в образце. Оценка погрешностей размера частиц на основе данных обработки спектров, измеренных при разных температурах, позволяет сделать вывод, что в образце формируются частицы в диапазоне от 5 нм до 18 нм.



Рисунок 21 – Мессбауэровские спектры образца, полученного в процессе роста бактерии в случае доступной площади поверхности Sq_3 , измеренные при T = 135 К (слева) и при T = 100 К (справа)

На рис. 22 представлены диаграммы относительных интенсивностей парциальных спектров, соответствующих разным позициям атомов железа в исследованных образцах. Отдельно выделены А- и В-позиции атомов железа в структурах маггемита и магнетита. Полученный результат о преимущественной железоредукции в случае горизонтальной ориентации сосуда совпадает с результатами авторов [16] в эксперименте с *Shewanella*

oneidensis. Однако в представленной работе наблюдается гораздо большее различие в зависимости активности процесса восстановления железа от доступной площади поверхности минерала. Помимо этого, во всех образцах не происходит формирование значительного количества сидерита, который является типичным результатом процесса железоредукции. Этот результат совпадает с полученным в работе [3] выводом, утверждающим, что при концентрации СФ в среде более 70 мМ формирование сидерита затруднено.



Рисунок 22 – Диаграммы относительных интенсивностей парциальных спектров, соответствующих разным позициям атомов железа в исследованных образцах

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Основные результаты и выводы

Проведены спектроскопические исследования с привлечением данных рентгенофазового анализа продуктов преобразования гидротермального сидерита устойчивой накопительной культурой из осадков термального источника Солнечный. В результате установлено следующее.

• Образец исходного гидротермального сидерита является текстурированным (самопроизвольно ориентированным). Среднее значение угла между направлением пролета *у*-квантов и главной осью тензора градиента электрического поля составляет (51.5±0.8)°.

• В процессе роста накопительной культуры в пробирке с добавлением сидерита в среду для культивирования происходит окисление двухвалентных атомов железа в структуре исходного минерала, сопровождаемое формированием оксигидроксикарбоната Fe^{II-III} [Fe^{II}₃Fe^{III}₃O₁₂H₁₁]²⁺ [CO₃^{2-·3}H₂O]²⁻.

• При росте накопительной культуры в ферментере в присутствии сидерита наблюдается преобразование исходного гидротермального сидерита в биогенный и формирование малого количества (<7%) оксидной магнитоупорядоченной фазы, содержащей трехвалентные атомы железа.

Методами мессбауэровской спектроскопии исследованы образцы, полученные в результате биотрансформации при различных ориентациях сосуда со средой для культивирования, обеспечивающих различные площади поверхности синтезированного ферригидрита, доступной бактерии *Geoalkalibacter ferrihydriticus* для преобразования. Анализ полученных результатов показал следующее.

• В случае горизонтальной ориентации сосуда при максимальной доступной площади поверхности весь ферригидрит преобразуется бактерией в смесь магнетита и маггемита. В процессе роста бактерии формируются частицы разного размера от 5 до 18 нм.

• При вертикальной ориентации сосуда крышкой вверх (промежуточная доступная площадь поверхности) наблюдается

формирование малого количества сидерита (<3%), отсутствующего при вертикальной ориентации крышкой вниз (минимальная доступная площадь поверхности).

• В обоих случаях вертикальной ориентации сосуда в образце остается около 50% исходного ферригидрита. Преобразованная часть образца представляет собой смесь малых частиц маггемита и магнетита. Средний размер формирующихся частиц *d* < 8 нм.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Lovley D.R., Holmes D.E., Nevin K.P. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) Reduction //Advances in Microbial Physiology. – 2004. – T. 49. – C. 219.

2. Konhauser K.O., Hamade T., Raiswell R. et al. Could bacteria have formed the Precambrian banded iron formations? //Geology. – 2002. – T. 30. – №. 12. – C. 1079.

3. N.I. Chistyakova, V.S. Rusakov, A.A. Shapkin et al. Investigations of Iron Minerals Formed by Dissimilatory Alkaliphilic Bacterium with ⁵⁷Fe Mössbauer Spectroscopy. //AIP Conf. Proc. – 2010. – T. 1258. – C. 68.

4. Bond, D. R., Holmes, D. E., Tender, L. M., Lovley, D. R. Electrode-reducing microorganisms that harvest energy from marine sediments //Science. – 2002. – T. 295. – C. 483.

5. Lovley D.R., Kashefi K., Vargas M., Tor J.M., Blunt-Harris E.L. Reduction of humic substances and Fe(III) by hyperthermophilic microorganisms //Chemical Geology. $-2000. - T. 169. - N_{\odot}. 3. - C. 289.$

6. Балашова В.В., Заварзин Г.А. Анаэробное восстановление окисного железа водородной бактерией //Микробиология. – 1979. – Т. 48. – №. 5. – С. 773.

7. Нетрусов А. И., Котова И. Б. Микробиология. – Academia, 2006.

8. T.B., Попов B.O. Тихонова Структурные И функциональные исследования мультигемовых цитохромов с, вовлеченных в экстраклеточный электронов процессах диссимиляторной транспорт В бактериальной металлоредукции //Успехи биологической химии. – 2014. – Т. 54. – С.349.

9. N.I. Chistyakova, V.S. Rusakov, A.A. Shapkin et al. Mössbauer study of biogenic formation processes of iron minerals// Journal of Physics: Conference Series. -2012. - T. 1489. - C. 95.

10. Заварзина Д.Г. Железоредукторы содовых озер — реликты «железного века»? //Природа. – 2013. – Т. 9. – С. 59.

11. Madden A.S., Swindle A.L., Beazley M.J., et al. Longterm solid phase fate of co-precipitated U(VI)-Fe(III) following biological iron reduction by Thermoanaerobacter //American Mineralogist. $-2012. - T. 97. - N_{2}. 10. - C. 1641.$ 12. Cutting R.S., Coker V.S., Telling N.D., et al. Optimizing Cr(VI) and Tc(VIII) remediation through nanoscale biomineral Engineering //Envirom. Sci. Technol. -2010. $-T. 44. - N_{2}. 7. - C. 2577.$

13. Veeramani H., Alessi D.S., Suvorova E.I., et al. Products of abiotic U(VI) reduction by biogenic magnetite and vivianite //Geochimica et Cosmochimica Acta. $-2011. - T. 75. - N_{\odot}. 9. - C. 2512.$

14. Debasish Sarkar, Madhuri Mandal, and Kalyan Mandal, Domain controlled magnetic and electric properties of variable sized magnetite nano-hollow sphere //J. Appl. Phys.. $-2012. - T. 112. - N_{\odot}. 6. - C. 064318.$

15. Yang T., Lyons S., Aguilar C., Cuhel R. and Teske A. Microbial communities and chemosynthesis in Yellowstone Lake sublacustrine hydrothermal vent water //Front. Microbio. -2011. - T. 2. - C. 130.

16. Dippon, U., Schmidt, C., Behrens, S., and Kappler, A. Secondary mineral formation during ferrihydrite reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1 depends on incubation vessel orientation and resulting gradients of cells, Fe^{2+} and Fe minerals. //Geomicrobiol. – 2015. – T. 32. – C. 878.

17. Бетехтин А. Г. Курс минералогии. – Гос. изд-во геол. лит-ры, 1951.

18. Takashima Y., Ohashi S., The Mössbauer spectra of Various Natural Minerals //Bulletin of the Chemical Society of Japan. – 1968. – T. 41. – C. 88.

19. Stevens J. G. et al. Mossbauer mineral handbook. – North Carolina: Mossbauer Effect Data Center, 1998.

20. Vinogradov I. A. et al. Inversion of the anisotropy of vibration of iron atoms in crystals of siderite //Solid State Communications. – 1970. – T. 8. – №. 12. – C. 965-967.

21. Goldanskii V. I. et al. Quantitative test of the vibrational anisotropy origin of the asymmetry of quadrupole Mössbauer doublets //Physical Review Letters. – 1968. – T. 20. – No. 4. – C. 137.

22. D. Nagy, K. Kulcsar, H. Spiering, R. Zimmerman. On the anisotropy of the recoilless fraction in FeCO₃ at 4.2 K. //Journal de Physique Colloques. -1974. - T. 35 (C6). - C. 385.

23. Jambor J.L., Dutrizac J.E. Occurrence and Constitution of Natural and Synthetic Ferrihydrite, a Widespread Iron Oxyhydroxide //Chem. Rev. $-1998. - T. 98. - N_{\odot}$. 7. -C. 2549.

24. Zhao J., Huggins F.E., Feng Z., Huffman G.P. Ferrihydrite surface structure and its effects on phase transformation //Clay and Clay mineral. $-1994. - T. 42. - N_{\odot}. 6. - C. 737.$

25. Michel F.M., Ehm L., Antao S.M., Lee P.L., Chupas P.J., Liu G., Strongin D.R. The structure of ferrihydrite, a nanocrystalline material //Science. $-2007. - T. 316. - N_{\odot}. 5832. - C. 1726.$

26. Zergenyi, R.S., Hirt, A.M., Zimmermann, S., Dobson, J.P., Lowrie, W., Low-temperature magnetic behavior of ferrihydrite. //J. Geophys. Res. – 1999. – T. 105 (B4). – C. 8297.

27. 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. $-2002. - T. 51. - N_{\odot}. 1. - C. 83.$

28. Русаков В. С. Основы мессбауэровской спектроскопии. – 2011.

29. Фабричный П. Б., Похолок К. В. Мессбауэровская спектроскопия и ее применение для химической диагностики неорганических материалов //М.: МГУ. – 2008.

30. K. K. P. Srivastava, The theory of superparamagnetic relaxation: Mossbauer study //J. Phys.: Condens. Matter. – 2003. – T. 15. – C. 549.

31. M.E. Matsnev and V.S. Rusakov, SpectrRelax: An Application for Mössbauer Spectra Modeling and Fitting AIP Conference Proceedings. – 2012. – T. 1489. – C. 178.

32. Блюменфельд Л. А., Тихонов А. Н. Электронный парамагнитный резонанс //Соросовский образовательный журнал. – 1997. – №. 9. – С. 91-99.

33. Левшин Л. В., Салецкий А. М. Оптические методы исследования молекулярных систем. – 1994.

34. Menzel, P., Gudbergsdóttir, S.R., Rike, A.G. et al. Comparative Metagenomics of Eight Geographically Remote Terrestrial Hot Springs //Microb. Ecol. - 2015. - T. 70. - C. 411.

35. Music S. et al. Mossbauer effect study of siderite and limonite ores //Bulletin de la Societe Chimique (Beograd). -1980. - C.541.

36. J.-M. R. Génin, A. Renard, Ch. Ruby, Fougerite Fe^{II-III} oxyhydroxycarbonate in environmental chemistry and nitrate reduction //ICAME. – 2007. – C. 913.

37. M. Etique, F.P.A. Jorand, C. Ruby, Magnetite as a precursor for green rust through the hydrogenotrophic activity of the iron-reducing bacteria *Shewanella putrefaciens* //Geobiology. -2016. - T. 14. - C. 237.

38. Chistyakova N.I., Rusakov V.S., Zavarzina D.G., Mössbauer Investigation of Biologically-Induced Mineralization Processes //Hyperfine Interactions. – 2002. – C. 397.

39. Gorin, D.A., Yashchenok, A.M., Koksharov, Y.A. et al. Surface morphology and optical and magnetic properties of polyelectrolyte/magnetite nanoparticles nanofilms //Tech. Phys.. – 2009. – T. 54. – C. 1675.

40. D.L.A. de Faria, S. Venancio Silva, M.T. de Oliveira, Raman microspectroscopy of some iron oxides and oxyhydroxides //Journal of Raman Spectroscopy. – 1997. – T. 28. – C. 873.

41. Soler M. A. G., Qu F. Raman spectroscopy of iron oxide nanoparticles //Raman Spectroscopy for Nanomaterials Characterization. – Springer, Berlin, Heidelberg, 2012. – C. 379.

42. Sánchez-Román, M., Fernández-Remolar, D., Amils, R., et al. Microbial mediated formation of Fe-carbonate minerals under extreme acidic conditions. //Sci. Rep. -2014. - T. 4. - C. 4767.

43. Zavarzina D. G., Kolganova T. V., Boulygina E. S., et al. *Geoalkalibacter ferrihydriticus* gen. nov. sp. nov., the first alkalaphilic representive of the family

Geobacteracea, isolated from a soda lake //Microbiology. $-2006. - T. 75. - N_{\odot}. 6. - C. 673.$

44. Madsen M. B., Mørup S., Koch C. J. W. Magnetic properties of ferrihydrite //Hyperfine Interactions. $-1986. - T. 27. - N_{\odot}. 1-4. - C. 329.$

45. Чистякова Н.И., Русаков В.С., Заварзина Д.Г., Гренеш Ж.-М. Исследования кинетики процесса бактериального синтеза минералов железа методами мессбауэровской спектроскопии //Известия РАН. Серия физическая. – 2007. – Т. 71. – №. 9. – С. 1325.

46. Helgason, O., Rasmussen, H.K., Mørup, S. Spin-canting and transverse relaxation in maghemite nanoparticles and tin-doped maghemite //J. Magn. Magn. Mater. -2006. - T. 302 - C. 413.

47. Doriguetto, A., Fernandes, N., Persiano, A. et al. Characterization of a natural magnetite //Phys Chem Minerals. – 2003. – T. 30. – C. 249.

Выражаю глубокую благодарность своему научному руководителю кандидату физико-математических наук, доценту кафедры общей физики Наталии Игоревне Чистяковой за постановку интересной задачи, помощь, терпение и чуткое научное руководство.

Также хочу поблагодарить доктора физико-математических наук, профессора Вячеслава Серафимовича Русакова за ценные замечания, консультации и постоянный стимул к научной деятельности в течение всего периода моей работы в возглавляемой им научной группе.

Отдельно хочу поблагодарить младшего научного сотрудника кафедры общей физики Сергея Андреевича Ярославцева и аспиранта Ангелину Владимировну Антонову за консультации и помощь при измерении и обработке спектров.

Благодарю сотрудников Института микробиологии им. С.Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН: кандидата геологоминералогических наук Дарью Георгиевну Заварзину и кандидата биологических наук Сергея Николаевича Гаврилова, за предоставленные образцы исследования и плодотворное сотрудничество.

Благодарю доктора физико-математических наук, профессора кафедры общей физики Юрия Алексеевича Кокшарова и доктора физикоматематических наук, доцента кафедры физики твердого тела Татьяну Юрьевну Киселеву за помощь в проведении эксперимента и обработке результатов.

Хочу выразить признательность доктору физико-математических наук, профессору кафедры физики твердого тела Алле Андреевне Новаковой за внимательное рассмотрение данной работы и ценные рекомендации.