

УДК 579.227:546.72:553.2

ДИНАМИКА ОБРАЗОВАНИЯ ВИВИАНИТА В НАКОПИТЕЛЬНЫХ КУЛЬТУРАХ МЕТАНОТРОФНЫХ И ВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ В ПРОЦЕССЕ АНАЭРОБНОГО $Fe(III)$ ВОССТАНОВЛЕНИЯ

© 2012 Н.Г. Шерышева, В.П. Моров

Институт экологии Волжского бассейна РАН, г. Тольятти (Россия)
Поступила 12.02.2012

Исследована динамика образования вивианита накопительными культурами метанотрофных и водородокисляющих бактерий при восстановлении пирофосфата трехвалентного железа в анаэробных условиях. Биогенез вивианита включает следующие стадии: накопление ионов Fe^{2+} в жидкой питательной среде в результате активного развития бактерий; образование аморфных соединений двухвалентного железа (центров кристаллизации); кристаллизация и выпадение нерастворимого минерального осадка. Представлена собственная схема превращения пирофосфата трехвалентного железа в минерал вивианит в процессе биологического анаэробного железовосстановления.

Ключевые слова: вивианит, динамика образования вивианита, анаэробное восстановление $Fe(III)$ пирофосфата, накопительные культуры бактерий

Sherysheva N.G., Morov V.P. THE KINETICS OF FORMATION OF THE VIVIANITE IN ENRICHMENT CULTURES OF METHANOTROPHS AND H_2 -OXIDIZING BACTERIA IN THE PROCESS OF THE ANAEROBIC $Fe(III)$ REDUCTION – The kinetics of formation of the vivianite during anaerobic ferric pyrophosphate reduction of enrichment cultures of methanotrophs and H_2 -oxidizing bacteria was studied. Biogenic formation of the vivianite includes three stages: the accumulation of the ions Fe^{2+} in broth growth medium as a result of an active growth of the bacteria; the formation of amorphous ferrous compounds (the centres of the crystallization); the crystallization and insoluble mineral precipitation. The own scheme of the transmutation ferric pyrophosphate in the mineral vivianite in the process of the anaerobic $Fe(III)$ reduction was demonstrated.

Key words: vivianite, the kinetics of formation of the vivianite, anaerobic ferric pyrophosphate reduction, enrichment cultures of the bacteria

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что вивианит ($Fe_3^{2+}[PO_4]_2 \cdot 8H_2O$) является конечным продуктом анаэробного процесса восстановления трехвалентного железа ($Fe(III)$) в результате жизнедеятельности микроорганизмов. Образование вивианита имеет место в современных диагенетических процессах в донных отложениях водных экосистем. К примеру, широко представлен вивианит в донных отложениях Байкала, в болотах Белоруссии, также известностью пользуется кристаллический вивианит в месторождениях бурых железняков Керченского полуострова (в Крыму) и на Таманском

Шерышева Наталья Григорьевна, кандидат биологических наук; *Моров Владимир Павлович*, сотрудник Экологического музея, moroff@mail.ru

полуострове (Князева, 1954; Страхов, 1986; Григорьев, 2002; Гранина, 2008). В то же время в лабораторных экспериментах отмечено образование вивианита в чистых бактериальных культурах и сокультурах в процессе восстановления фосфатного буфера и пирофосфата трехвалентного железа бактериями, принадлежащими к различным эколого-трофическим группам (Балашова и др., 1979; Балашова, 1985; Daniel et al 1999; Потехина и др., 2000; Потехина, 2006). При изучении процесса биотрансформации фосфатов железа важно понимание механизма преобразования соединений железа в минеральные кристаллические формы. Целью настоящей работы является экспериментальное исследование динамики биогенеза вивианита в результате анаэробного биологического восстановления.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Динамику вивианита изучали в накопительных культурах метанотрофных и водородокисляющих бактерий, полученных из торфянистых илов озер Клюквенное и Лизинка (Самарская Лука) в 2002 г. Накопительные культуры бактерий готовили следующим образом: в герметично закрытые бутылочки с анаэробной питательной средой «А» вводили 10% ила (Daniel et al., 1999). В качестве акцептора электронов в питательные среды добавляли пирофосфат железа - $\text{Fe}_4(\text{P}_2\text{O}_7)_3$ в конечной концентрации по железу 15 мМ/л. Пищевыми субстратами служили доноры электронов метана и водорода. В метанотрофных культурах 12% азота из газовой фазы замещали смесью газов $\text{CH}_4 : \text{CO}_2$ (90% : 10%), в водородокисляющих - 10% азота из газовой фазы замещали смесью газов $\text{H}_2 : \text{CO}_2$ (90% : 10%).

Эксперимент проводили с ежедневным отбором проб для химического и микроскопического анализов в течение 12 суток. Отбор проб из накопительных культур для анализов и посевов осуществляли анаэробно, стерильными 1-миллилитровыми шприцами, проколом через пробку после интенсивного встряхивания образцов. Контролем влияния накопительных культур на восстановление пирофосфата трехвалентного железа служили варианты после автоклавирования. Инкубирование накопительных культур проводили при 30°C.

Восстановление Fe(III) оценивали по накоплению Fe(II) в среде. Концентрацию Fe(II) определяли феррозиновым методом спектрофотометрически (СФ-46) при 562 нм после экстракции проб 0,5 н соляной кислотой в течение 15 мин (Lovley and Phillips, 1986).

О накоплении вивианита в накопительных культурах судили по образованию минерального осадка синего цвета. Минералогический состав осадков, образованных накопительными культурами микроорганизмов, определяли методом рентгенофазового анализа (РФА). РФА выполнен в Самарском государственном университете совместно с д.х.н., проф. В.Н. Сережкиным. Спектры снимали на приборе ДРОН – 2.0 в Fe-излучении. Режим съемки: U – 40 кв., I – 14 mA, 0,5 град/мин.

Бактериальный рост оценивали по численности клеток, определенной прямым счетом в камере Горяева (Практикум по микробиологии, 1976).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В течение первых двух-трех дней эксперимента, несмотря на интенсивный бактериальный рост, в среде регистрировалось незначительное увеличение концентрации двухвалентного железа (рис. 1). Активизация процесса восстановления Fe(III) пирофосфата начиналась в конце экспоненциальной фазы роста бактерий или после стабилизации численности на высоком уровне. При этом численность

бактерий увеличивалась на порядок от $2-4 \times 10^7$ кл/мл до $4-8 \times 10^8$ кл/мл, а концентрация двухвалентного железа в среде - от $2,30 \pm 0,28$ мМ/л до $14,97 \pm 0,32$ мМ/л ($M \pm m$ при $p < 0,05$).

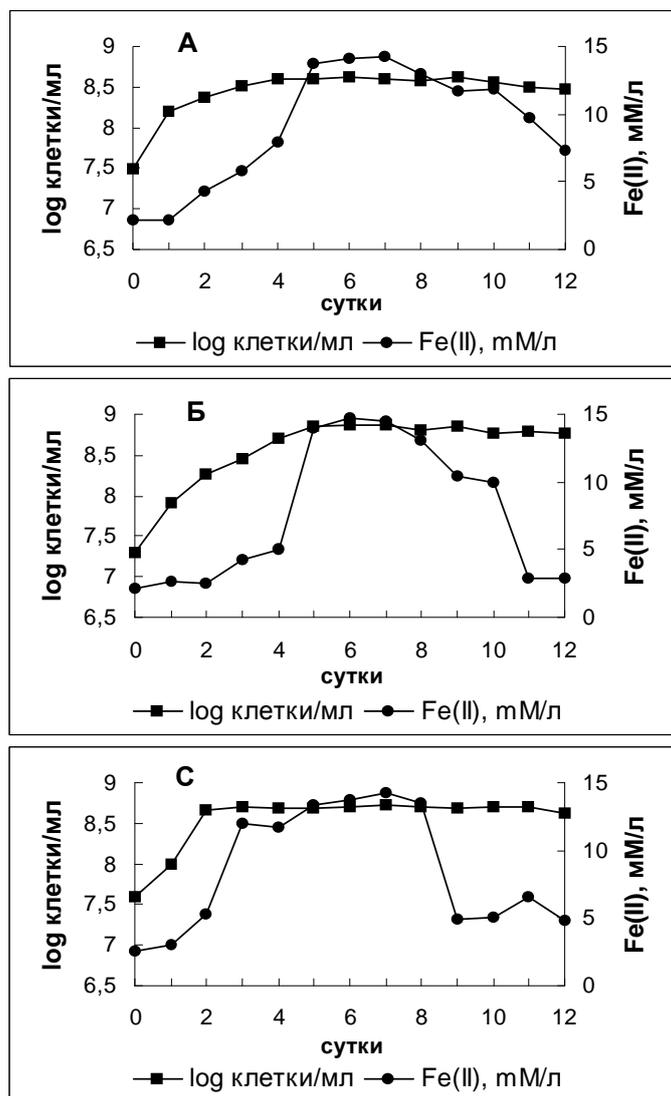


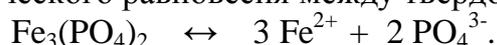
Рис 1. Динамика увеличения численности бактерий и концентрации двухвалентного железа в жидкой питательной среде при восстановлении пиррофосфата Fe(III) накопительными культурами метанотрофных (А, Б) и водородокисляющих (С) бактерий, выделенных из торфянистых илов озер Лизинка (А) и Клюквенное (Б, С)

При переходе культуры в стационарную фазу роста концентрация двухвалентного железа достигала максимального значения. При этом среда меняла свою консистенцию: из жидкой и прозрачной она становилась гелеобразной и мутной. Под микроскопом в этот период мы наблюдали массовое образование овальных или бесформенных скоплений. Рентгенофазовым анализом кристаллическое вещество также не выявлено.

При дальнейшем культивировании происходило снижение концентрации двухвалентного железа в среде, сопровождающееся формированием нерастворимых кристаллов и выпадением их в осадок. На этой стадии рентгенофазовый анализ идентифицировал в нерастворимом осадке кристаллические структуры водных

фосфатов железа $\text{Fe}_3[\text{PO}_4]_2 \times 8\text{H}_2\text{O}$. Методом РФА был идентифицирован тип минерала - вивианит: $d = 6,73\text{\AA}$; $4,90\text{\AA}$; $3,21\text{\AA}$ (JCPDS, 30-0662). В контрольных образцах (питательная среда с пирофосфатом Fe(III) без бактерий) по данным химического анализа и РФА отсутствовали рост концентрации двухвалентного железа и образование вивианита.

Согласно теории образования кристаллов, вещества кристаллизуются из жидкой фазы, если при данной температуре концентрация вещества превышает концентрацию насыщенного раствора (Фритмантл, 1991). В соответствии с этим можно предположить, что именно благодаря деятельности бактерий в накопительных культурах создается повышенная концентрация ионов двухвалентного железа и фосфат-ионов. Вследствие этого происходит образование малорастворимого $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2$, который и выпадает в осадок в виде кристаллов вивианита. Дальнейший рост этих кристаллов при поступлении новых порций двухвалентного железа происходит в условиях динамического равновесия между твердой и жидкой фазами:



Ранее наличие биогенного и постбиогенного этапов в динамике образования биоминерала магнетита термофильными бактериями установлено Д.Г. Заварзиной (2001): на биогенном этапе, обусловленном активным ростом микроорганизмов, происходит восстановление исходного соединения Fe^{3+} и образование начальных стадий минеральных фаз; на постбиогенном этапе происходит упорядочение кристаллической решетки, контролируемое физико-химическими параметрами среды.

В динамике биогенного образования вивианита нами выявлены аналогичные тенденции. Так, на биогенном этапе происходило восстановление пирофосфата Fe(III). Роль бактерий в этот период состояла в накоплении ионов Fe^{2+} в среде и создании его высоких концентраций в результате окислительно-восстановительных реакций. На постбиогенном этапе происходило образование кристаллов вивианита. Выпадение осадка вивианита начиналось после достижения максимальной концентрации двухвалентного железа, когда в среде было восстановлено 83-100% пирофосфата Fe(III).

Как известно, выпадение кристаллов в осадок возможно до тех пор, пока не установится равновесие между жидкой фазой (ионами Fe^{2+} и фосфат-ионами) и твердой фазой (минеральный осадок вивианита). По нашему мнению, такое равновесие устанавливалось в накопительных культурах после выпадения вивианита при дальнейшем культивировании в течение длительного времени. Так, концентрация ионов Fe^{2+} в среде, измеренная в период от 20 до 90 суток культивирования, составляла 1,95-2,78 мМ/л (при $\text{pH} = 7,0$ и $t = 30^\circ\text{C}$). Полученные значения концентраций Fe^{2+} согласуются с найденной величиной в насыщенном растворе вивианита - $2,1 \pm 0,4$ мМ/л при заданных условиях. Следовательно, на постбиогенном этапе в накопительных культурах микроорганизмов устанавливается молекулярно-ионное равновесие между жидкой и твердой фазами в насыщенном растворе вивианита.

Общеизвестно, что для превращения жидкой фазы в кристаллическую необходимы центры кристаллизации. Образование аморфного осадка – один из путей роста кристаллов при очень высоких степенях пересыщения (Лайтинен и др., 1979). При восстановлении Fe(III) пирофосфата микроорганизмами регистрировалось массовое образование аморфных структур, предшествовавших формированию кристаллов. Мы предполагаем, что эти аморфные структуры

могут служить центрами, вокруг которых формируются кристаллические решетки вивианита. Это согласуется с тем, что на поверхности оксидов или гидроксидов железа происходит адсорбция фосфатов путем замещения поверхностных гидроксильных групп Fe-OH фосфат-ионами (Tipping, 1981). На основе этого положения предполагается, что образование минерала вивианита при восстановлении пиррофосфата трехвалентного железа бактериями возможно также по пути замещения гидроксильных групп фосфатами. Ниже нами приводится схема, иллюстрирующая образование вивианита на биогенном и постбиогенном этапах бактериального восстановления Fe(III) пиррофосфата (рис. 2 - 5).

Стадии преобразования Fe²⁺ в вивианит:

1. Гидролиз пиррофосфата в слабокислой среде. Начальная среда с Fe(III) пиррофосфатом в накопительных культурах имеет нейтральную реакцию среды. В результате окисления бактериями пищевых субстратов с целью получения энергии (АТФ) образуется углекислота, среда становится слабокислой. При катализе ионом водорода происходит гидролитический разрыв фосфатных связей в молекуле пиррофосфата с образованием гидроксильных групп. В результате гидролиза образуются гидроксофосфаты трехвалентного железа (рис. 2):

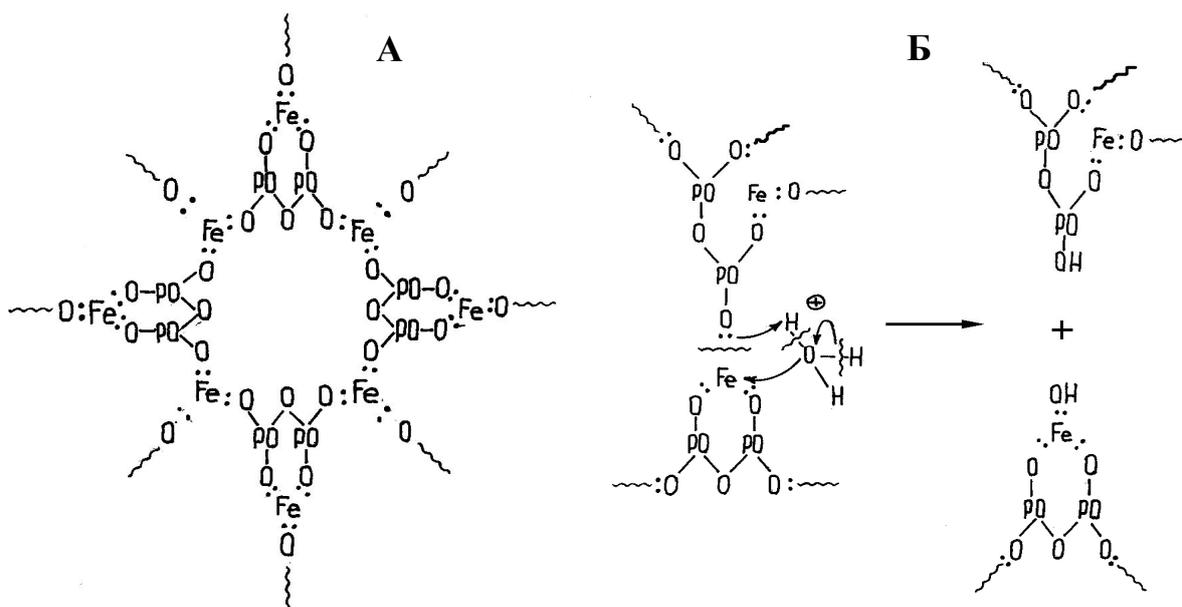
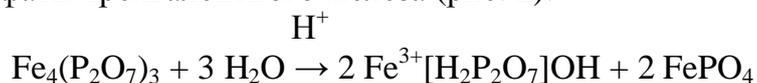
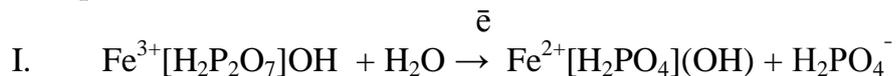


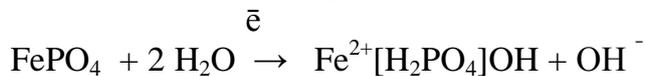
Рис. 2. Фрагмент структуры пиррофосфата Fe(III) (А). Разрыв пиррофосфатной ионной связи (Б): свободная ионная пара кислорода присоединяет протон из воды с образованием гидроксильной группы; свободная ионная пара железа присоединяет гидроксил из воды

2. Восстановление трехвалентного железа. Электроны, образующиеся при окислении пищевых субстратов, связываются акцепторными центрами, в качестве которых выступают ионы Fe³⁺ в структуре гидроксофосфатов. В результате протекает восстановление Fe³⁺ с образованием двухвалентного гидроксофосфата. Одно-

временно происходит гидролиз по пиррофосфатной связи с образованием фосфорной кислоты (рис. 3):



II. Восстановление нормального фосфата Fe (параллельный процесс):



В результате восстановленное железо переходит в раствор в виде изолированных молекул гидроксофосфатов, а высвободившаяся фосфорная кислота может утилизироваться бактериальными клетками для получения энергии (АТФ).

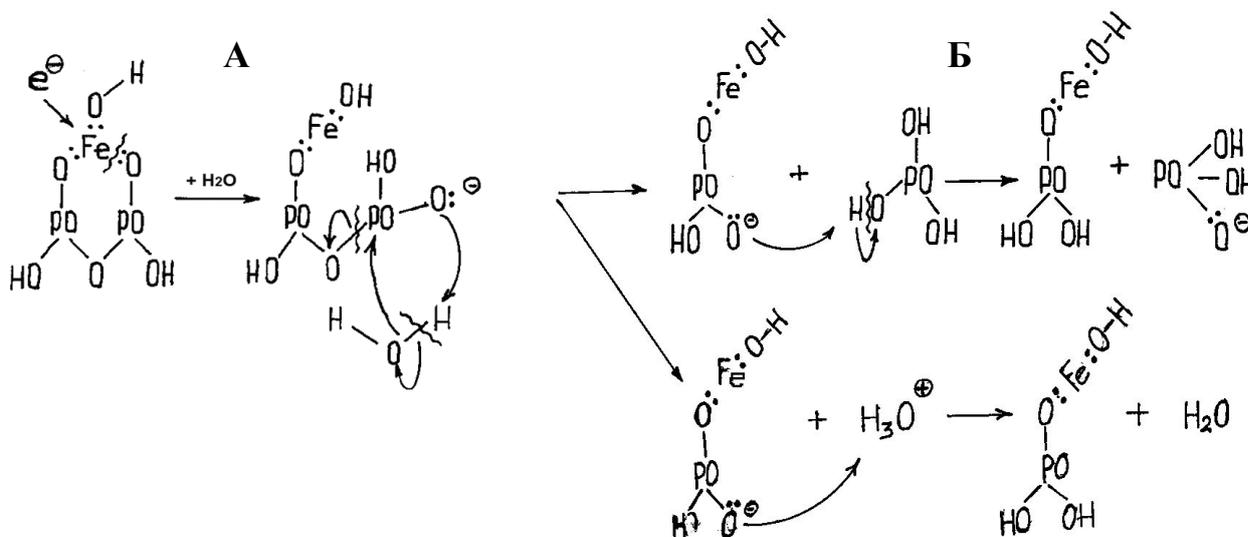


Рис. 3. Восстановление железа и гидролиз по пиррофосфатной связи (А) и образование гидроксофосфатов (Б)

3. *Образование центров роста - гидроксофосфатов (стадия аморфных структур).* С течением времени в растворе происходит димеризация относительно неустойчивых гидроксофосфатов, приводящая к укрупнению частиц вплоть до появления макрочастиц - центров роста кристаллов. На этой стадии процесса гидроксил-ионы замещаются фосфат-ионами (рис. 4).

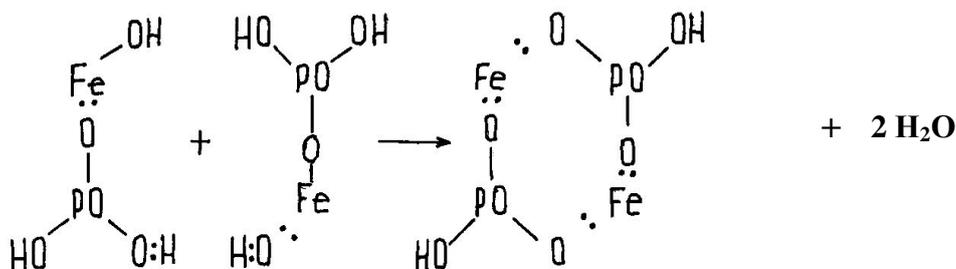
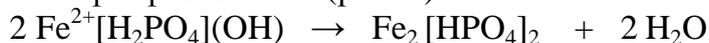


Рис. 4. Димеризация исходной оксосоли (гидроксофосфатов) с образованием кристаллов (фаза коллоидов)

4. **Рост кристалла (стадия кристаллизации).** Происходит перестройка гидроксофосфатов в правильную кристаллическую решетку вивианита за счет отщепления фосфорной кислоты (рис. 5).

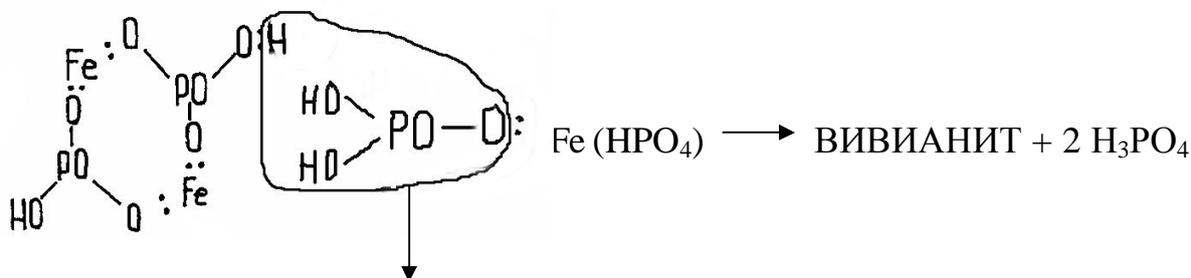
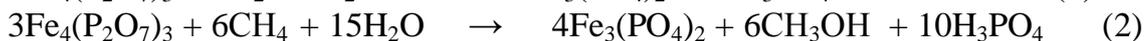
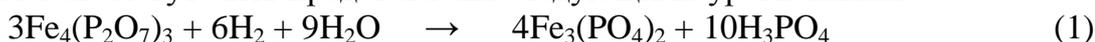


Рис. 5. Рост кристалла вивианита (стадия кристаллизации)

Суммарные окислительно-восстановительные реакции восстановления пирофосфата трехвалентного железа с участием в качестве доноров электронов водорода и метана могут быть представлены следующими уравнениями:



На основании вышеизложенного можно предположить, что в донных отложениях водоемов, имеющих восстановительные условия, фосфаты трехвалентного железа могут восстанавливаться с образованием вивианита и фосфорной кислоты. В качестве доноров электронов могут выступать конечные продукты анаэробного распада органического вещества в донных отложениях - водород, метан. Центрами кристаллизации в реальных илах могут быть частицы гидроксидов закисного железа, так как они склонны к сорбции. Это согласуется с тем, что формирование вивианита происходит во время восстановления $\text{FeO}(\text{OH})$ – важнейшего адсорбента в донных отложениях (Golterman, 1995).

В природных условиях вивианит образуется в восстановительных условиях за счет фосфора органических остатков; обычно распространен в богатых фосфором торфяниках, болотах (Годовиков, 1983). Локализация процесса образования в озерах вивианита объяснялась тем, что в илах накапливались остатки высшей растительности, которые создавали благоприятные условия для развития микроорганизмов, восстанавливающих железо. Деятельность микроорганизмов в донных отложениях сводится в первую очередь к высвобождению фосфора из связанных форм и к переводу его в подвижное состояние путем минерализации органических соединений фосфора (Мартынова, 1984). Избыток фосфора, образующийся при разложении органических остатков, создает благоприятные условия для осаждения двухвалентного железа в виде вивианита.

При проведении экспериментов обнаружилось, что в накопительных культурах микроорганизмов, полученных из торфянистых илов, происходило максимально активное образование вивианита по сравнению с глинистыми и детритными илами (Шерышева и др., 2007; Шерышева, 2011). По-видимому, этому способствует гумифицированное органическое вещество, которым, как известно, богаты тор-

фянистые илы. Преобладающей группой гумусовых веществ в торфянистых почвах являются гуминовые кислоты (ГК) (Орлов, 1990). В состав ГК входят биохимически очень подвижные и активные функциональные группы: гидроксильные, карбоксильные, кетонные, енольные. Обилие функциональных групп обуславливает взаимодействие ГК с разнообразными компонентами в илах. Это приводит к многообразию форм соединений как минеральных, так и органических, в том числе и железосодержащих соединений. В образовании металл-гумусовых осадков большую (если не основную) роль играют явления адсорбции и коагуляции. Поэтому имеется основание предположить, что в торфянистых илах присутствует большое разнообразие комплексов, которые могут служить центрами для биогенного образования минералов. Наличие в торфянистых илах в больших количествах потенциальных центров кристаллизации, по-видимому, создает благоприятные условия для образования вивианита. Роль бактерий на этой стадии состоит в образовании аморфных соединений двухвалентного железа в результате восстановления ими Fe(III), которые могут служить центрами формирования вивианита. Содержащиеся в илах органические пирофосфаты железа, а также Fe(OH)₃ и FeO(OH) реагируют аналогично приведенному механизму.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования выявлено три стадии в динамике биогенеза вивианита: 1 - повышение концентрации ионов Fe²⁺ в жидкой питательной среде в результате активного развития бактерий; 2 - образование аморфной фазы соединений двухвалентного железа (гидроксофосфаты); 3 - кристаллизация вивианита и выпадение его в осадок. Роль бактерий на биогенной стадии минералообразования состоит в накоплении ионов двухвалентного железа в среде в результате осуществляемых ими окислительно-восстановительных реакций в процессе биологического восстановления Fe(III) пирофосфата. В насыщенном растворе ионов двухвалентного железа возникают центры кристаллизации (по нашему мнению – это гидроксофосфаты), вокруг которых формируется кристаллическая решетка вивианита. Образование и рост кристаллов – это уже физико-химический процесс, характерный для постбиогенной стадии.

Экспериментально определена концентрация ионов Fe²⁺ в насыщенном растворе вивианита, образованном накопительными культурами метанотрофных и водородоокисляющих бактерий при pH = 7,0 и t = 30°C - 2,054 ± 0,97 мМ /л.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Балашова В.В., Заварзин Г.А. Анаэробное восстановление окисного железа водородной бактерией // Микробиология. 1979. Т. 48. Вып. 5. - **Балашова В.В.** Минералы железа при восстановлении ферригидрита водородными бактериями // Микробиология. 1985. Т. 54. Вып. 3.

Годовиков. А.А. Минералогия. М.: Недра, 1983. - **Гранина Л.З.** Ранний диагенез донных отложений осадков озера Байкал / Л.З. Гранина : отв. ред. И.Б. Мизандронцев. Новосибирск: Академическое издательство «Гео», 2008. 160 с. - **Григорьев А.В.** Природные минеральные пигменты. Синие пигменты. <http://nesusvet.narod.ru/ico/books/zhar/blue.htm>. 2002.

Заварзина Г.Д. Биогеохимические факторы преобразования соединений железа в восстановительной обстановке: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М., 2001.

Князева Л.М. Вивианит в донных илах озера Байкал // Докл. АН СССР. 1954. Т. 97, № 3.

- Лайтинен Г.А., Харрис В.Е.** Химический анализ / Пер. с англ.; под ред. Ю.А. Клячко. М.: Химия, 1979.
- Мартынова М.В.** Азот и фосфор в донных отложениях озер и водохранилищ. М.: Наука, 1984.
- Орлов Д.С.** Гумусовые кислоты почв и общая теория гумификации. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1990.
- Потехина Ж.С., Шерышева Н.Г., Бычек-Гущина И.А., Готтшалк Г.** Анаэробный рост бактерий на метане с Fe(III)восстановлением, как электрон акцептирующим процессом // Изв. Самар. НЦ РАН. 2000. Т. 2, № 2. - **Потехина Ж.С.** Метаболизм Fe(III) восстанавливающих бактерий. Тольятти: ИЭВБ РАН, 2006. 225 с. - **Практикум по микробиологии** / Под ред. Н.С. Егорова. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1976.
- Страхов Н.М.** Избранные труды. Проблемы осадочного рудообразования. М.: Наука, 1986. С. 218-219, 288-290.
- Фримантл М.** Химия в действии. В 2-х ч. Ч. 1. М.: Мир, 1991.
- Шерышева Н.Г., Ракитина Т.А., Поветкина Л.П.** Образование минералов железа сообществами бактерий донных отложений озер Самарской Луки // Микроорганизмы в экосистемах озер, рек / Материалы 2-го Байкальского микробиол. симпозиума (BSM-2007), 10-15 сентября, 2007. Иркутск: Изд-во Института географии им. В.Б. Сочавы СО РАН, 2007. С. 251-252. - **Шерышева Н.Г.** Образование вивианита в накопительных культурах микроорганизмов в процессе Fe(III) восстановления / Материалы VIII Междунар. научно-практ. конф. «Татищевские чтения: актуальные проблемы науки и практики. Часть 1» Тольятти: Волжский университет им. В.Н. Татищева, 2011. С. 225-234.
- Daniel R., Warnecke F., Potekhina J.S., Gottschalk G.** Identification of the syntrophic partners in a coculture coupling anaerobic methanol oxidation to Fe(III) reduction // FEMS Microbiol. Lett. 1999. V. 180.
- JCPDS-International Centre for Diffraction Data.** PCPDFWIN. 1997. V. 1.30.
- Golterman H.L.** The labyrinth of nutrient cycles and buffers in wetlands: results based on research in the Camargue (southern France) // Hydrobiol. 1995.
- Lovley, D.R., Phillips, E.J.P.** Organic matter mineralization with reduction of ferric iron in anaerobic sediments // Appl. Environ. Microbiol. 1986. V. 51.
- Tipping E.** The adsorption of aquatic humic substances by iron oxides // Geochim. et cosmochim. Acta.. 1981. V. 45, № 2.