

УДК 573.4

ПРОЦЕССЫ ОБРАЗОВАНИЯ НАНОРАЗМЕРНОГО КАРБОНАТА КАЛЬЦИЯ МИКРООРГАНИЗМАМИ

© 2020 г. З. Б. Намсараев^{1,*}, А. А. Мельникова¹, А. П. Руденко¹, А. В. Комова¹

¹ Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

*E-mail: zorigto@gmail.com

Поступила в редакцию 25.05.2020 г.

После доработки 25.05.2020 г.

Принята к публикации 29.05.2020 г.

Образование карбоната кальция микроорганизмами играет важнейшую роль в глобальном цикле углерода на Земле и является основой для разработки технологий получения биоцемента, самовосстанавливающегося бетона и композитных биоматериалов. Способностью к образованию карбоната кальция обладают представители различных групп микроорганизмов: кислородных и анаэробных фототрофных микроорганизмов, аэробных органотрофных бактерий, в том числе аммонифицирующих бактерий, а также ряд анаэробных микроорганизмов, таких как сульфатредуцирующие бактерии, метаногены, микроорганизмы, осуществляющие анаэробное окисление метана и денитрифицирующие бактерии. В данном обзоре собрана информация об участии представителей этих физиологических групп в формировании наноразмерных частиц минералов карбоната кальция. Показано, что этот процесс наиболее изучен у представителей групп аэробных микроорганизмов, тогда как информации об участии анаэробных микроорганизмов гораздо меньше.

DOI: 10.1134/S1992722320010057

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение

1. Механизмы образования минералов карбоната кальция
2. Кислородные фотосинтезирующие микроорганизмы
3. Анаэробные фототрофные бактерии
4. Аэробные органотрофные микроорганизмы
5. Анаэробные микроорганизмы

Заключение

ВВЕДЕНИЕ

Образование минералов карбоната кальция (кальцита, арагонита и ватерита) играет важнейшую роль в цикле углерода на Земле. По современным оценкам порядка 99% всего углерода на Земле захоронено в литосфере, из них 41.9% представлено в виде карбонатных пород, состоящих преимущественно из известняков (CaCO_3) и доломита ($\text{CaCO}_3 \cdot \text{MgCO}_3$). При этом океан, атмосфера и биосфера суммарно содержат в себе около 0.04% углерода Земли [1].

Участие микроорганизмов в образовании минералов впервые было доказано в начале XX века российским микробиологом Георгием Надсоном. Им было показано образование карбоната

кальция в культуре бактерии *Proteus vulgaris*, выделенной из Вейсового соленого озера на богатой органической среде [2]. Несколькими годами позднее Гарольдом Дрю была показана способность денитрифицирующих микроорганизмов к образованию карбоната кальция [3]. Дальнейшие исследования показали, что биогенное минералообразование, т.е. процесс образования минералов, происходящий при участии живых организмов, играет важнейшую роль в природе [4]. При этом большинство отложений карбонатов, встречающихся в природе, имеет следы воздействия живых организмов [5].

В последние годы способность микроорганизмов к образованию минералов карбоната кальция активно изучается с целью получения искусственных биоматериалов, например биоцемента (biocement) – искусственного материала, затвердевающего под воздействием микроорганизмов или их ферментов и превращающегося в прочное камневидное тело. К числу наиболее актуальных задач, для решения которых могут быть использованы технологии получения биоцемента, относятся разработка самовосстанавливающегося бетона, содержащего иммобилизованные микроорганизмы. При образовании трещин в бетоне и поступлении в него воды микроорганизмы активизируются и начинают формировать минералы карбоната кальция, что приводит к закрытию тре-

щин. Потенциальные области применения этой технологии включают в себя повышение устойчивости к коррозии железобетонных конструкций и дорог, восстановление фасадов зданий, борьбу с эрозией и опустыниванием, снижение водо-, газо- и нефтепроницаемости пород и грунтов [6–8]. При этом экономический эффект только от разрушения и коррозии железобетонных конструкций в США оценивается в 250–300 млрд. долларов в год, что составляет около 1.5% от ВВП страны [9].

Также большой интерес представляет высокая прочность биокomпозитных материалов на основе органических соединений и карбоната кальция. Сравнение чистого кальцита и материала раковин беспозвоночных организмов, на 99% состоящего из карбоната кальция и на 1% из органических соединений, показывает, что биокomпозит по прочности превосходит чистый минерал на 2–3 порядка [10]. Эти свойства объясняются высоким уровнем организации биокomпозита, эффективным расположением органической матрицы относительно минеральной фазы и иерархической организацией биокomпозита от нано- до макроуровня. Материалы подобного уровня сложности пока не удается создать с использованием современных технологий, поэтому разработка подобных природоподобных технологий представляет значительный интерес [11, 12].

В настоящее время основной объем опубликованных исследований по образованию минералов карбоната кальция с участием микроорганизмов посвящен изучению процессов на макро- и микроскопическом уровне. Процессы, происходящие на наноразмерном уровне, изучены гораздо слабее [13]. Тем не менее они играют важнейшую роль в минералообразовании, так как именно на этом уровне происходят процессы нуклеации минералов и взаимодействие между компонентами клеток и неорганическими компонентами растворов. Цель данной работы – систематизировать информацию об участии микроорганизмов в образовании минералов карбоната кальция, уделив особое внимание процессам, происходящим на наноразмерном уровне.

1. МЕХАНИЗМЫ ОБРАЗОВАНИЯ МИНЕРАЛОВ КАРБОНАТА КАЛЬЦИЯ

В процессе образования минералов карбоната кальция с участием микроорганизмов были выделены следующие этапы [14]:

- образование щелочного геохимического барьера;
- образование пересыщенного по CaCO_3 раствора;
- образование коллоидов кальцита;

- нуклеация CaCO_3 на бактериальной слизи, где находится иммобилизованный Ca^{2+} ;

- собственно диагенетические преобразования, ведущие к кристаллизации минералов кальция;

- преобразование осадков в породу за счет цементации и уплотнения.

По степени контроля со стороны клетки в биогенном минералообразовании может быть выделено два типа процессов. При самом высоком уровне контроля клетки способны направлять процесс образования минералов от самой первой стадии формирования кристалла до финального расположения кристалла на поверхности микроорганизма. Примером такого процесса является образование карбонатного экзоскелета сложной архитектуры у эукариотических микроводорослей кокколитофорид. В современной научной литературе для обозначения этого типа процесса используется термин “биологически контролируемое минералообразование”. При более низком уровне контроля клетки микроорганизмов создают лишь условия для образования минералов, формирования биокomпозитных материалов сложной архитектуры при этом не происходит. Этот тип процесса более характерен для прокариотических микроорганизмов и для его обозначения может использоваться термин “биологически индуцированное минералообразование” [15].

Основными факторами, влияющими на активность образования карбоната кальция микроорганизмами, являются концентрация кальция, концентрация неорганического углерода, pH и наличие сайтов нуклеации. Микроорганизмы способны влиять на эти факторы в зависимости от типа метаболизма. Например, сульфатредуцирующие бактерии способны разрушать гипс (CaSO_4) в ходе восстановления сульфата до сероводорода и при этом увеличивать концентрацию катионов кальция в среде [16]. Повышение концентрации неорганического углерода в ближайшем клеточном окружении может происходить в результате деятельности микроорганизмов, разрушающих органические соединения с образованием углекислоты как финального продукта реакции. Примерами таких микробных процессов являются аммонификация, денитрификация, сульфатредукция и ацетокластический метаногенез [17]. Повышение pH также может быть обусловлено деятельностью микроорганизмов. Примерами микробных процессов, приводящих к повышению pH, являются оксигенный и аноксигенный фотосинтез, аммонификация, денитрификация, сульфатредукция, ацетокластический метаногенез, анаэробное окисление метана (табл. 1). Формирование сайтов нуклеации минералов карбоната кальция может обеспечиваться синтезом органических соединений с отрицательно заряженными группами, связывающими-

Таблица 1. Химические реакции образования карбоната кальция, характерные для различных групп микроорганизмов

| | |
|---|---|
| Оксигенные фотосинтезирующие микроорганизмы [8] | $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_2\text{O} + \text{O}_2$ $2\text{HCO}_3^- \leftrightarrow \text{CO}_2 + \text{CO}_3^{2-} + \text{H}_2\text{O}$ $\text{CO}_3^{2-} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{OH}^-$ $\text{Ca}^{2+} + \text{HCO}_3^- \rightarrow \text{CaCO}_3\downarrow + \text{H}^+$ |
| Аноксигенные фотосинтезирующие бактерии [8] | $\text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{S} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow (\text{CH}_2\text{O}) + 2\text{S} + 2\text{H}_2\text{O}$ $2\text{HCO}_3^- \leftrightarrow \text{CO}_2 + \text{CO}_3^{2-} + \text{H}_2\text{O}$ $\text{CO}_3^{2-} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{OH}^-$ $\text{Ca}^{2+} + \text{HCO}_3^- \rightarrow \text{CaCO}_3\downarrow + \text{H}^+$ |
| Аммонифицирующие бактерии [8] | $\text{CO}(\text{NH}_2)_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NH}_2\text{COOH} + \text{NH}_3$ $\text{NH}_2\text{COOH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NH}_3 + \text{H}_2\text{CO}_3$ $2\text{NH}_3 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{NH}_4^+ + 2\text{OH}^-$ $2\text{OH}^- + \text{H}_2\text{CO}_3 \rightarrow \text{CO}_3^{2-} + 2\text{H}_2\text{O}$ $\text{Ca}^{2+} + \text{Cell} \rightarrow \text{Cell-Ca}^{2+}$ $\text{Cell-Ca}^{2+} + \text{CO}_3^{2-} \rightarrow \text{Cell-CaCO}_3\downarrow$ |
| Денитрифицирующие бактерии [18] | $2\text{HCOO}^- + 2\text{NO}_3^- + 2\text{H}^+ \rightarrow 2\text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O} + 2\text{NO}_2^-$ $\text{HCOO}^- + 2\text{NO}_2^- + 3\text{H}^+ \rightarrow \text{CO}_2 + 2\text{NO} + 2\text{H}_2\text{O}$ $\text{HCOO}^- + 2\text{NO} + \text{H}^+ \rightarrow \text{CO}_2 + \text{N}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}$ $\text{HCOO}^- + \text{N}_2\text{O} + \text{H}^+ \rightarrow \text{CO}_2 + \text{N}_2 + \text{H}_2\text{O}$ $\text{Ca}^{2+} + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CaCO}_3\downarrow + 2\text{H}^+$ |
| Сульфатредуцирующие бактерии [8] | $\text{CaSO}_4 + 2(\text{CH}_2\text{O}) \rightarrow \text{CaS} + 2\text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ $\text{CaS} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{H}_2\text{S}$ $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{CO}_3$ $\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{H}_2\text{CO}_3 \rightarrow \text{CaCO}_3\downarrow + 2\text{H}_2\text{O}$ |
| Ацетокластические метаногены [19] | $\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{HCO}_3^-$ $\text{Ca}^{2+} + \text{HCO}_3^- \rightarrow \text{CaCO}_3\downarrow + \text{H}^+$ |
| Анаэробное окисление метана [17] | $\text{CH}_4 + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{HS}^- + \text{HCO}_3^- + \text{H}_2\text{O}$ $\text{Ca}^{2+} + \text{HCO}_3^- \rightarrow \text{CaCO}_3\downarrow + \text{H}^+$ |

ся с катионами кальция [12]. Эти соединения могут быть как белковой, так и полисахаридной природы и локализоваться как на поверхности клеток бактерий, так и внутри клеток микроводорослей. Примеры этих процессов более детально будут рассмотрены в следующих разделах обзора.

2. ОКСИГЕННЫЕ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИЕ МИКРООРГАНИЗМЫ

Участие оксигенных фотосинтезирующих микроорганизмов, и в первую очередь цианобак-

терий, в образовании минералов карбоната кальция интенсивно изучается в связи с их возможной ролью в образовании строматолитов в Архее и Протерозое [14]. Цианобактерии обладают рядом свойств, которые могут приводить к формированию карбонатных минералов. Это подщелачивание окружающей клетку среды в ходе оксигенного фотосинтеза, создание сайтов нуклеации на поверхности клетки и внеклеточного матрикса, внутриклеточное образование аморфного карбоната, экспорт ионов кальция из клетки с использованием кальций-протонных каналов [20, 21].

Характерным примером комбинации различных факторов, приводящих к образованию карбоната кальция, является процесс образования кальцита на поверхности штамма одноклеточной цианобактерии *Synechococcus sp.* GL24 [22]. Внешняя поверхность клеток покрыта гексагонально симметричным отрицательно заряженным белковым S-слоем, который на первом этапе связывает катионы кальция. Затем сульфатные анионы связываются с кальцием и образуют гипс. При этом сначала покрываются минералами центральные участки сегментов S-слоя, а потом кристаллы срастаются и поверхность клетки постепенно полностью покрывается минералом. Образованию гипса способствует рН озерной воды (~7.9), однако в процессе фотосинтеза клетка подщелачивает окружающую среду, и по мере повышения рН карбонатные ионы вытесняют сульфат, заменяя таким образом гипс вокруг клеток на стабильные кристаллы кальцита [23]. Авторы исследования [22] предполагают, что S-слой не только является местом первичной нуклеации минералов, но и позволяет клетке предотвращать негативное воздействие образованных минералов. Эта гипотеза подтверждается тем фактом, что растущие клетки *Synechococcus sp.* GL24 могут сбрасывать S-слой в окружающую среду, тем самым избавляя себя от нежелательных минералов на поверхности, способных мешать фотосинтезу или другим жизненно важным процессам в клетке.

Формирование кристаллов карбоната кальция может происходить не только на поверхности S-слоя клеточной оболочки, но и во внеклеточном полимерном матриксе вокруг клеток цианобактерий. Эксперименты на одноклеточной цианобактерии *Synechococcus leopoliensis* PCC7942 с использованием источника синхротронного излучения показали, что формирование кальцита культурой происходит в два этапа. На первом этапе происходит образование аморфного “арагонитоподобного” карбоната кальция на внеклеточном полимерном матриксе. Этот этап относительно короткий и составляет от нескольких часов до нескольких дней, при этом он наблюдается на подавляющем большинстве клеток цианобактерий. На втором этапе на поверхности некоторых клеток происходит образование термодинамически стабильного кальцита, раствор становится недонасыщенным по отношению к арагониту и происходит растворение аморфного карбоната кальция. При этом катионы кальция остаются сорбированными на поверхности внеклеточного матрикса. Авторы [24] выдвигают гипотезу, что образование аморфного карбоната кальция является защитным механизмом цианобактерий, позволяющим им избегать неконтролируемого выпадения кальцита на поверхности клеток.

Наиболее сложно организованным процессом образования минералов карбоната кальция у микроорганизмов является процесс формирования карбонатного экзоскелета у эукариотических микроводорослей, самыми изученными из которых являются кокколитофорида. Экзоскелет кокколитофорид состоит из кокколитов – отдельных пластинок диаметром от 1 до 20 мкм, состоящих из карбоната кальция и органического матрикса. Кокколиты обладают большим разнообразием форм и сложной архитектурой (рис. 1). В последние годы кокколиты привлекают внимание с точки зрения потенциального использования в качестве компонентов микро- и наноструктур [25, 26]. Образование кокколитов происходит внутри клетки в везикулах аппарата Гольджи. Сначала формируется органическая пластинка, состоящая из целлюлозных волокон, белков и кислых полисахаридов. Состав органических молекул и их пространственная организация в пластинке играют важнейшую роль в образовании сложной архитектуры кокколитов. Эксперименты *in vitro*, в ходе которых к органическим пластинкам из кокколитов микроводоросли *Pleurochrysis carterae* добавляли раствор кальция, привели к массовому накоплению катионов кальция на краях органических пластинок аналогично процессу, происходящему в живых клетках [27]. Органическая пластина также может контролировать минеральный состав образующихся на ее поверхности минералов. Выделенный из кокколитов *Gephyrocapsa oceanica* “кокколит-ассоциированный полисахарид” способствует формированию кальцита даже в условиях, благоприятствующих образованию других форм карбоната кальция, таких как ватерит или арагонит. В то же время в случае с “кокколит-ассоциированным полисахаридом”, выделенным из кокколитов *Emiliania huxleyi*, происходит образование сначала аморфного карбоната кальция, а затем образование той формы карбоната кальция, которая наиболее стабильна в конкретных условиях эксперимента [28].

После формирования органической пластинки на ней начинается образование наноразмерных кристаллов карбоната кальция и постепенное их увеличение в размерах. Во время этого процесса клетка должна поддерживать повышенный рН в пределах микроокружения везикулы, что приводит к началу кристаллизации и росту кристаллов. Процесс минерализации останавливается после выраженного увеличения везикулы кокколита одновременно со значительным уменьшением количества ионов кальция в микроокружении везикулы. Впоследствии путем экзоцитоза образованные кристаллы кальцита транспортируются на поверхность клетки и становятся частью ее экзоскелета [29].

Функциональная роль образования карбоната кальция для окисленных фотосинтезирующих микроорганизмов до сих пор вызывает вопросы. Предложены следующие гипотезы: фокусировка света на хлоропластах микроводорослей, отражение света для уменьшения фотоингибирования роста микроорганизмов, механизм, регулирующий pH внутри клетки и в ее ближайшем окружении, защита клеток от поглощения другими организмами, регулирование плавучести клетки. Тем не менее эти гипотезы не объясняют необходимости в поддержании сложных механизмов образования карбонатов и особенно образования кокколита такой сложной архитектуры, как у кокколитофорид [25, 30].

Кроме потенциального использования кокколита как компонентов для нано- и микроустройств способность окисленных фототрофов к образованию карбонатов может быть использована для ряда практических задач, в частности для закрепления грунтов на отвалах карьеров и для борьбы с опустыниванием [31]. Эксперименты в пустынных районах Китая и Ирана показали, что применение нитчатых цианобактерий приводит к формированию почвенных корок на поверхности дюн и закреплению их поверхности [32–35].

3. АНОКСИГЕННЫЕ ФОТОТРОФНЫЕ БАКТЕРИИ

Участие аноксигенных фототрофных бактерий в образовании минералов карбоната кальция изучено очень слабо, тем не менее этот вопрос имеет важное значение в связи с возможной ролью в образовании строматолитов в Архее. Образование карбоната кальция в ходе фотоавтотрофного роста на водороде было изучено в экспериментах с пурпурной бактерией *Rhodospirillum rubrum*. Во время роста в культуре не происходило изменения pH, при этом авторы предполагают, что осаждение карбоната кальция в культуре может быть связано с появлением сайтов нуклеации на поверхности клеток и синтезируемых ими полисахаридов, а также с поглощением клетками соединений, препятствующих осаждению минералов (фосфатов и др.) [36]. Возможность активного осаждения карбоната кальция в ходе фотогетеротрофного роста в присутствии ацетата натрия была показана на культурах пурпурных бактерий рода *Rhodovulum*. Авторами было сделано предположение, что потребление ацетата в ходе роста может приводить к повышению pH и, таким образом, к сдвигу карбонатного равновесия [37].

4. АЭРОБНЫЕ ОРГАНОТРОФНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ

Процесс образования карбоната кальция аэробными органотрофными микроорганизма-

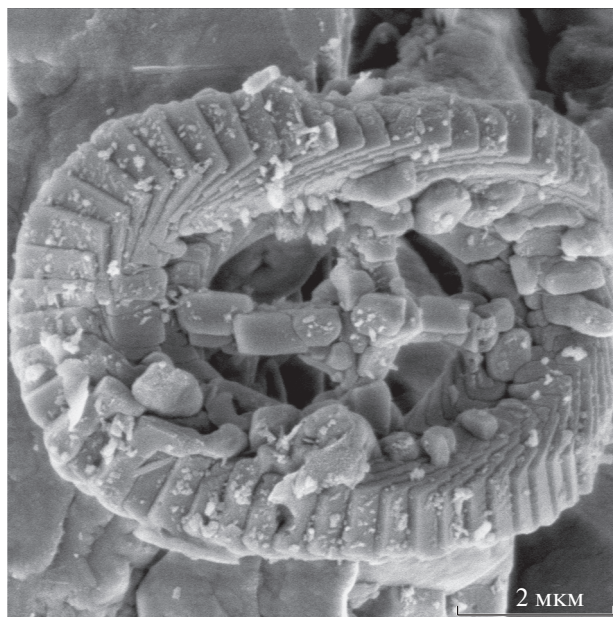


Рис. 1. Ископаемый кокколит в образце известняка, п-ов Крым.

ми, осуществляющими полное окисление органического вещества в присутствии кислорода, является одним из наиболее изученных процессов. Первые эксперименты Георгия Надсона по образованию кальцита проводились с использованием аэробной органотрофной бактерии *Proteus vulgaris* на среде, содержащей 2% пептона [2]. После инкубирования культуры бактерии в эксперименте им были обнаружены лежащие на поверхности среды сферы диаметром до 2 мм, состоящие преимущественно из карбоната кальция с примесью карбоната магния. В природных условиях формирование круглых конкреций диаметром до нескольких десятков миллиметров может происходить в течение нескольких недель или месяцев.

Среди аэробных процессов для получения карбоната кальция наиболее широко используется процесс аммонификации, определяемый как разложение содержащих азот органических веществ с выделением аммония [38, 39]. В ходе аммонификации происходит дезаминирование органических соединений с образованием аммония, повышением pH и сдвигом карбонатного равновесия в сторону CO_3^{2-} , что облегчает осаждение карбонатов. Благодаря низкой стоимости и хорошей изученности наиболее распространенным органическим соединением, используемым в экспериментах, является мочевины (карбамид). Гидролиз мочевины в клетках аммонификаторов может проходить по двум путям. Наиболее изучен путь разложения мочевины с использованием уреазы, при котором происходит гидролиз моче-

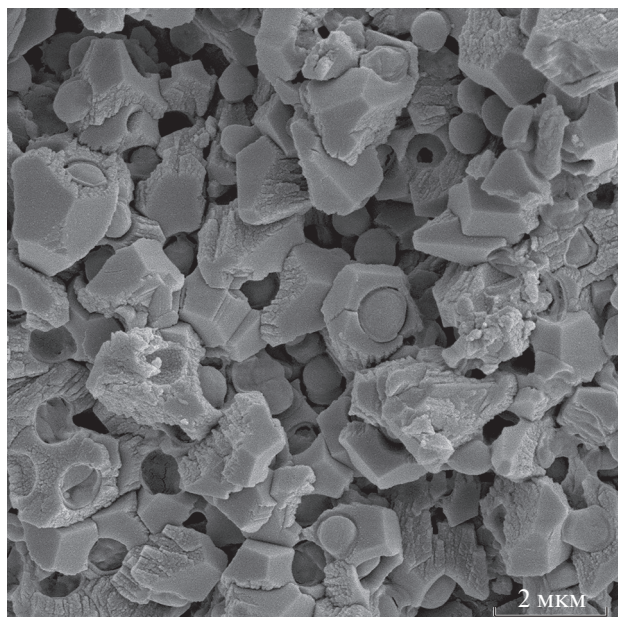


Рис. 2. Образец биоцемента, полученный с использованием бактерии *Sporosarcina pasteurii*.

вины до аммиака и карбамата, который затем разлагается с образованием второй молекулы аммиака и углекислоты. Альтернативный путь разложения мочевины происходит с помощью АТФ-зависимого фермента амидолиазы мочевины или гомологичного ему комплекса из двух белков — амидазы и карбоксилазы мочевины. Образующаяся углекислота диффундирует во внеклеточное пространство и в щелочных условиях реагирует с кальцием с образованием карбоната кальция на поверхности клетки (рис. 2) [40, 41]. С помощью энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии и сканирующей просвечивающей электронной микроскопии было показано, что в процессе уреолитической активности на поверхности клеток появляется множество единичных сайтов нуклеации наноразмерных кристаллов карбоната кальция, способных постепенно целиком покрывать поверхность клетки [42]. Единичные бактерии выступают в качестве центров зарождения кристаллов, затем мелкие агрегаты клеток прилипают друг к другу, образуя сложные кристаллические сети, постепенно увеличивающие свой объем [43]. Наиболее часто используемым в экспериментах микроорганизмом является уреолитическая бактерия *Sporosarcina pasteurii* (ранее *Bacillus pasterurii*). Этот микроорганизм способен расти и осажать карбонат кальция в аэробных условиях. В анаэробных условиях не размножается, но продолжает осажать карбонат кальция за счет имеющейся в клетках уреазы. Это делает его удобным объектом для экспериментов, хотя он имеет ограниченную применимость в анаэробных слоях грунтов [44, 45].

Управление процессом образования карбоната кальция в эксперименте может происходить с помощью варьирования скорости подачи реактивов, их соотношения, количества вносимых клеток, наличия или отсутствия аэрации. Среди новейших способов управления процессом можно назвать использование генетически модифицированных организмов и использование неорганических наночастиц. Эксперименты с генетически модифицированными штаммами бактерии *E. coli*, обладающей уреазной активностью, показали, что генномодифицированный штамм с относительно низкой скоростью образования карбоната кальция производил наиболее крупные кристаллы, обладавшие наибольшей твердостью. Было показано, что средний размер кристаллов обратно связан как с активностью уреазы, так и с начальной скоростью удаления кальция из раствора. В конце эксперимента средний размер кристаллов у микроорганизмов с низкой уреазной активностью стал почти в 20 раз больше, чем у микроорганизмов с высокой уреазной активностью. Для оценки того, зависят ли механические свойства биогенного CaCO_3 от свойств осаждающего микроорганизма, исследователи использовали наноиндентирование. Оказалось, что модифицированный штамм *E. coli* с наименьшей скоростью карбонатообразования в 34.8% случаев производил кристаллы с модулем наноиндентирования не менее 40 ГПа, а для кристаллов, образованных с использованием уреазы с более высокой активностью, этот процент снизился до 14.7–22.1% [46].

Наночастицы и нанопластинки также могут использоваться для улучшения свойств биоцемента и самовосстанавливающегося бетона. Добавление наночастиц магнетита вместе с бактериями рода *Bacillus* позволило снизить водопроницаемость образца бетона на 22–26%. В ходе эксперимента наночастицы магнетита электростатически прикреплялись к отрицательно заряженным группам на поверхности бактерий, что защищало клетки во время смешивания и застывания бетона. Это способствовало более высокой активности бактерий по формированию минералов карбоната кальция в трещинах и снижению водопроницаемости [47]. Применение графитовых нанопластинок также может влиять на прочностные характеристики самовосстанавливающегося бетона. Добавление таких нанопластинок вместе с аммонифицирующими бактериями способствует повышению прочности на сжатие бетона относительно обычного на 9.8%. Помимо закрытия микротрещин в бетоне за счет образования бактериями кальция такое повышение прочности может быть связано с тем, что нанопластинки способствуют уменьшению размера слабой переходной зоны между кристаллами, а также они могут являться ограничителями тре-

щин, блокируя их распространение на наноуровне [48].

5. АНАЭРОБНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ

В анаэробных условиях активность сульфатредуцирующих бактерий является одним из важнейших процессов, приводящих к образованию карбоната кальция. Например, во время исследования современных строматолитов, образующихся на Багамских островах, было показано, что наиболее активно выпадение карбоната кальция происходило в слоях с высокой активностью сульфатредукции [49]. Особенностью процесса сульфатредукции являются потребление сульфата, являющегося одним из ингибиторов осаждения карбонатов, и восстановление его до сероводорода, который может удаляться из зоны обитания сульфатредуцирующих бактерий. В ходе этого процесса может происходить растворение гипса, что приводит к высвобождению в раствор ионов кальция [16].

Кроме увеличения концентрации кальция основными факторами, благоприятствующими образованию карбоната кальция в ходе сульфатредукции, являются повышение щелочности и появление сайтов нуклеации на полисахаридном матриксе, продуцируемом сульфатредуцирующими бактериями [50, 51]. На образование карбоната может оказывать влияние тип донора электронов, используемый сульфатредукторами. Было показано, что использование формиата и водорода приводило к повышению pH и, как следствие, образованию карбонатов. При использовании других типов доноров электронов (лактата, этанола и гликолята) в среде происходило снижение pH, препятствующее карбонатообразованию [52].

Исследование начальных стадий образования кристаллов карбоната кальция в культуре сульфатредуцирующих бактерий *Desulfonatronum lacustre* показало, что в среднем 50% поверхности клеток в ходе роста бактерий покрывается маленькими сферами кальцита размером 80–100 нм. Эти сферы встроены в тонкий слой пленки внеклеточных полимеров толщиной около 20 нм, прилегающий к клеточной стенке. Также на поверхности клетки наблюдаются большие сферы кальцита размером 120–200 нм и целые глобулы из подобных сфер. Было замечено, что глобулы и единичные сферы могут отрываться от поверхности клетки и увеличиваться в размерах в среднем в 5 раз. Могут образовываться и массивные глобулы из нескольких сотен сфер [53].

Участие метаногенных микроорганизмов в образовании карбонатов в настоящий момент изучено достаточно слабо. Тем не менее некоторые наблюдения показывают, что метаногены могут

опосредованно оказывать влияние на образование карбоната кальция. Исследование металлических свай на укреплениях дамб в Нидерландах выявило тонкий слой карбонатов на их поверхности. Высказана гипотеза, что образование карбонатов вызвано активностью комплексного микробного сообщества, в котором важнейшую роль играют метанобразующие микроорганизмы. Возможным механизмом образования карбонатов является потребление гидрогенотрофными метаногенами водорода, образующегося в ходе коррозии железа. Также ацетокластические метаногены могут минерализовывать органические кислоты, что приводит к увеличению количества неорганического углерода. При этом происходит потребление углекислоты из воды в ходе реакции метаногенеза и образование метана, который улетучивается из зоны реакции. В результате происходит сдвиг карбонатного равновесия и увеличение pH. Это приводит к созданию благоприятных условий для образования карбоната кальция при условии поступления кальция из окружающей среды [54, 55]. Аналогичные комбинации ацетокластического и гидрогенотрофного метаногенеза могут приводить к образованию карбоната кальция в анаэробных реакторах на станциях очистки сточных вод при условии поступления кальция со сточными водами с предприятий по производству бумаги или пищевых производств [19].

Анаэробное окисление метана микроорганизмами приводит к образованию карбонатов, тогда как аэробное окисление метана приводит к разложению карбонатов в результате подкисления среды [56]. В ходе анаэробного окисления метан окисляется микроорганизмами до бикарбоната, а сульфат служит акцептором электронов и восстанавливается до сероводорода. При этом происходит реакция образующегося бикарбоната с кальцием из окружающей среды. В природных условиях этот процесс можно наблюдать в районе метановых сипов в анаэробной зоне Черного моря, где образуются карбонатные постройки высотой до 4 м, покрытые микробными матами [57].

Карбонат кальция может образовываться в результате деятельности денитрифицирующих микроорганизмов. Денитрификация — это анаэробный процесс восстановления нитратов до нитритов и далее до молекулярного азота под воздействием микроорганизмов. В ходе денитрификации происходит утилизация органических кислот с образованием углекислоты, которая реагирует с кальцием с образованием карбоната кальция. Денитрификация может успешно применяться для закрепления грунтов и создания самовосстанавливающегося бетона благодаря возможности протекания процесса в анаэробных условиях. Эксперименты в Нидерландах с использованием ацетата кальция, нитрата кальция

и накопительной культуры денитрифицирующих микроорганизмов показали, что в образце грунта происходили осаждение карбоната кальция, рост бактерий, а также производство газообразного азота и некоторого избытка углекислого газа. Использование солей кальция как донора и акцептора электронов приводило к высокому выходу CaCO_3 , способного связывать песчинки между собой и закреплять грунт [18].

Применение денитрифицирующих микроорганизмов перспективно для создания самовосстанавливающегося бетона. В условиях высокого рН (рН ~ 13 в бетоне и рН ~ 10 в трещинах), характерного для бетонных конструкций, денитрификация проходит только частично и конечным продуктом является не молекулярный азот, а нитрит, способный пассивировать металл и защищать его от коррозии, что особенно актуально для железобетонных конструкций. При этом образующийся в ходе денитрификации карбонат кальция значительно снижает водопроницаемость строительных конструкций [58].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Способность к образованию карбоната кальция присутствует у различных групп микроорганизмов: оксигенных и аноксигенных фототрофных микроорганизмов, аэробных органотрофных бактерий, в том числе аммонифицирующих бактерий, а также у ряда анаэробных микроорганизмов, таких как сульфатредуцирующие бактерии, метаногены, микроорганизмов, осуществляющих анаэробное окисление метана, и денитрифицирующих бактерий. Степень изученности процесса карбонатообразования у этих групп микроорганизмов сильно различается. Наиболее изучен этот процесс у представителей аэробных микроорганизмов, включая оксигенных фототрофных микроорганизмов, и представителей аммонифицирующих бактерий.

Несмотря на большой объем исследований по изучению роли микроорганизмов в осаждении карбоната кальция, процессы, происходящие на наноразмерном уровне, изучены слабо. Тем не менее именно они играют важнейшую роль в минералообразовании, так как на этом уровне происходят процессы нуклеации минералов и взаимодействие между компонентами клеток и неорганическими компонентами растворов.

Исходя из имеющихся данных, можно выстроить следующую картину процессов образования наноразмерного карбоната. Основными факторами, влияющими на активность образования карбоната кальция микроорганизмами, являются концентрация кальция, концентрация неорганического углерода, рН и наличие сайтов нуклеации. Исследованиями показано, что вначале

ионы кальция накапливаются на носителе внутри клетки (органический матрикс кокколитофоров у кокколитофорид или аморфный карбонат кальция у цианобактерий) или вне клетки (белковый S-слой или внеклеточные полисахариды). Формирование сайтов нуклеации минералов карбоната кальция, как правило, обеспечивается наличием отрицательно заряженных групп органических соединений, связывающихся с катионами кальция. После нуклеации образовавшиеся минералы увеличиваются в размерах, сростаются, образуя чехол, или покидают поверхность, на которой сформировались.

Разработка технологий получения биоцемента, самовосстанавливающегося бетона и биоконструктивных материалов с помощью микроорганизмов обладает высокой практической значимостью. Использование нанотехнологий и генетической модификации микроорганизмов является перспективным подходом для улучшения свойств получаемых материалов и разработки принципиально новых методов их изготовления.

Авторы выражают благодарность Р.А. Камышинскому за помощь в изучении образцов карбоната кальция, полученного с использованием микроорганизмов.

Работа выполнена при поддержке НИЦ “Курчатовский институт” (приказ № 1360 от 25.06.2019 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zeebe R.E. // Annu. Rev. Earth Planetary Sci. 2012. V. 40. № 1. P. 141.
2. Надсон Г.А. Микроорганизмы как геологические деятели. Т. 1. О сероводородном брожении в Вейсовом соляном озере и об участии микроорганизмов в образовании чёрного ила (лечебной грязи). Санкт-Петербург: Типография П.П. Сойкина, 1908. 119 с.
3. Drew G.H. // J. Mar. Biol. Association United Kingdom. 1911. V. 9. P. 142.
4. Исаченко Б.Л. // Микробиология. 1948. Т. 17. № 2. С. 121.
5. Вернадский В.И. Очерки геохимии. 4-е (2-е рус.) изд. М.; Л.: Грозный; Новосибирск: ОНТИ НКТП СССР, Горгеонефтеиздат, 1934. 380 с.
6. Ferris F.G., Stehmeier L.G., Kantzas A., Mourits F.M. // J. Can. Pet. Technol. 1996. V. 35. № 08. P. 56.
7. De Muynck W., De Belie N., Verstraete W. // Ecol. Eng. 2010. V. 36. № 2. P. 118.
8. Seifan M., Samani A.K., Berenjian A. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2016. V. 100. № 6. P. 2591.
9. Angst U.M. // Mater. Struct. 2018. V. 51. № 1. P. 4.
10. Kamat S., Su X., Ballarini R., Heuer A.H. // Nature. 2000. V. 405. P. 1036.
11. Finnemore A., Cunha P., Shean T. et al. // Nature Commun. 2012. V. 3. № 1. P. 1.
12. Walsh P.J., Fee K., Clarke S.A. et al. // Marine Drugs. 2018. V. 16. № 8. P. 288.

13. *Muhammad N.Z., Shafaghat A., Keyvanfar A. et al.* // Construction and Building Materials. 2016. V. 112. P. 1123.
14. *Заварзин Г.А.* // Микробиология. 2002. Т. 71. № 1. С. 5.
15. *Dupraz C., Reid R.P., Braissant O. et al.* // Earth-Science Rev. 2009. V. 96. № 3. P. 141.
16. *Hammes F., Verstraete W.* // Rev. Environ. Sci. Biotechnol. 2002. V. 1. № 1. P. 3.
17. *Zhu T., Dittrich M.* // Front Bioeng. Biotechnol. 2016. V. 4. P. 4.
18. *Van Paassen L.A., Daza C.M., Staal M. et al.* // Ecol. Eng. 2010. V. 36. № 2. P. 168.
19. *Kenward P.A., Goldstein R.H., Gonzalez L.A. et al.* // Geobiology. 2009. V. 7. № 5. P. 556.
20. *Kamennaya N.A., Ajo-Franklin C.M., Northen T. et al.* // Minerals. 2012. V. 2. № 4. P. 338.
21. *Benzerara K., Skouri-Panet F., Li J. et al.* // Proc. Nat. Acad. Sci. 2014. V. 111. № 30. P. 10933.
22. *Schultze-Lam S., Harauz G., Beveridge T.J.* // J. Bacteriol. 1992. V. 174. № 24. P. 7971.
23. *Thompson J.B., Ferris F.G.* // Geology. 1990. V. 18. № 10. P. 995.
24. *Obst M., Dynes J.J., Lawrence J.R. et al.* // Geochim. Cosmochim. Acta. 2009. V. 73. № 14. P. 4180.
25. *Moheimani N.R., Webb J.P., Borowitzka M.A.* // Algal Res. 2012. V. 1. № 2. P. 120.
26. *Skeffington A.W., Scheffell A.* // Curr. Opin. Biotechnol. 2018. V. 49. P. 57.
27. *Gal A., Wirth R., Kopka J. et al.* // Science. 2016. V. 353. № 6299. P. 590.
28. *Walker J.M., Marzec B., Lee R.B. et al.* // Adv. Funct. Mater. 2019. V. 29. № 1. P. 1807168.
29. *Bäuerlein E.* // Angew. Chem. Int. Ed. 2003. V. 42. № 6. P. 614.
30. *Merz M.U.E.* // Facies. 1992. V. 26. P. 81.
31. *McCutcheon J., Wilson S.A., Southam G.* // Environ. Sci. Technol. 2016. V. 50. № 3. P. 1419.
32. *Chen L., Xie Z., Hu C. et al.* // J. Arid Environ. 2006. V. 67. № 3. P. 521.
33. *Wang W., Liu Y., Li D. et al.* // Soil Biol. Biochem. 2009. V. 41. № 5. P. 926.
34. *Kheirfam H., Sadeghi S.H., Homae M., Darki B.Z.* // Soil Tillage Res. 2017. V. 165. P. 230.
35. *Kheirfam H., Sadeghi S.H., Darki B.Z., Homae M.* // Catena. 2017. V. 152. P. 40.
36. *Bosak T., Greene S.E., Newman D.K.* // Geobiology. 2007. V. 5. № 2. P. 119.
37. *Bundeleva I.A., Shirokova L.S., Bénézeth P. et al.* // Chem. Geol. 2012. V. 291. P. 116.
38. *Solomon C.M., Collier J.L., Berg G.M. et al.* // Aquatic Microbial Ecology. 2010. V. 59. № 1. P. 67.
39. *Stein L.Y., Klotz M.G.* // Curr. Biol. 2016. V. 26. № 3. P. R94.
40. *Zhang Y., Guo H.X., Cheng X.H.* // Construction Building Mater. 2015. V. 77. P. 160.
41. *Okwadha G.D.O., Li J.* // Chemosphere. 2010. V. 81. № 9. P. 1143.
42. *Ghosh T., Bhaduri S., Montemagno C. et al.* // PloS one. 2019. V. 14. № 1. P. e0210339.
43. *Ghashghaei S., Emtiazi G.* // Curr. Microbiol. 2013. V. 67. № 4. P. 406.
44. *Martin D., Dodds K., Ngwenya B.T. et al.* // Environ. Sci. Technol. 2012. V. 46. № 15. P. 8351.
45. *Mitchell A.C., Espinosa-Ortiz E.J., Parks S.L. et al.* // Biogeosciences. 2019. V. 16. № 10. P. 2147.
46. *Heveran C.M., Liang L., Nagarajan A. et al.* // Sci. Rep. 2019. V. 9. № 1. P. 1.
47. *Seifan M., Sarmah A.K., Ebrahiminezhad A. et al.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2018. V. 102. № 5. P. 2167.
48. *Khalig W., Ehsan M.B.* // Construction Building Mater. 2016. V. 102. P. 349.
49. *Visscher P.T., Reid R.P., Bebout B.M.* // Geology. 2000. V. 28. № 10. P. 919.
50. *Braissant O., Decho A.W., Dupraz C. et al.* // Geobiology. 2007. V. 5. № 4. P. 401.
51. *Lin C.Y., Turchyn A.V., Steiner Z. et al.* // Geochim. Cosmochim. Acta. 2018. V. 237. P. 184.
52. *Gallagher K.L., Kading T.J., Braissant O. et al.* // Geobiology. 2012. V. 10. № 6. P. 518.
53. *Aloisi G., Gloter A., Kruger M. et al.* // Geology. 2006. V. 34. № 12. P. 1017.
54. *Kip N., Jansen S., Leite M.F. et al.* // Sci. Rep. 2017. V. 7. № 1. P. 11899.
55. *Kip N., Frank J., Jansen S. et al.* // Appl. Environ. Microbiol. 2019. V. 85. № 20. P. e01369-19.
56. *Reeburgh W.S.* // Chem. Rev. 2007. V. 107. № 2. P. 486.
57. *Michaelis W., Seifert R., Nauhaus K. et al.* // Science. 2002. V. 297. № 5583. P. 1013.
58. *Ersan Y.Ç., Verbruggen H., De Graeve I. et al.* // Cement Concrete Research. 2016. V. 83. P. 19.