

PROKARIOTY REDUKUJĄCE Fe(III): KLASYFIKACJA, WYSTĘPOWANIE, MECHANIZMY REDUKCJI Fe(III), ROLA EKOLOGICZNA I ZNACZENIE BIOTECHNOLOGICZNE

Anna Sikora^{1*} i Mieczysław K. Błaszczuk²

¹Zakład Biologii Molekularnej, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa

²Samodzielny Zakład Biologii Mikroorganizmów, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego,
ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa

Wpłynęło w styczniu 2009 r.

1. Wprowadzenie. 2. Charakterystyka fizjologiczno-biochemiczna grup mikroorganizmów redukujących Fe(III). 3. Mechanizmy redukcji Fe(III). 4. Rola ekologiczna prokariotów redukujących Fe(III) w środowisku. 5. Znaczenie prokariotów redukujących Fe(III) w biotechnologii. 5.1. Mikrobiologiczne ogniwa paliwowe. 5.2. Bioremediacja. 6. Podsumowanie

Fe(III)-reducing prokaryotes:

classification, distribution, mechanisms of Fe(III) reduction, ecological role and biotechnological significance

Abstract: FRM, ferric ion-respiring microorganisms, are a group of prokaryotes that use iron (III) and other metals as terminal electron acceptors in the process of anaerobic respiration. The list of culturable species of FRM is relatively short and the species belong to different phylogenetic groups. The article presents a physiological and biochemical characteristics of FRM, their ecological role and contribution to the circulation of elements in nature. Special attention is paid to the biotechnological significance of FRM, because of their potential role in (i) bioremediation of anaerobic environments contaminated by organic compounds and toxic heavy metals or radionuclides; (ii) electricity production in microbial fuel cells (MFC). The mechanisms of Fe(III) reduction are also described.

1. Introduction. 2. Physiological and biochemical characteristics of ferric respiring microorganisms. 3. Mechanisms of Fe(III) reduction. 4. Ecological role of FRM. 5. Biotechnological significance of FRM. 5.1. Microbial fuel cells. 5.2. Bioremediation. 6. Summary

Słowa kluczowe: prokarioty redukujące Fe(III), mechanizmy redukcji Fe(III), mikrobiologiczne ogniwa paliwowe, bioremediacja
Key words: Fe(III)-respiring microorganisms (FRM), mechanisms of Fe(III) reduction, microbial fuel cells, bioremediation

1. Wprowadzenie

Żelazo (Fe) jest dominującym pierwiastkiem naszej Planety, uważa się, że stanowi 45% jej masy. Jest głównym składnikiem (ok. 90%) jądra Ziemi, gdzie występuje w stanie rodzimym. Natomiast w skorupie ziemskiej, której grubość wynosi 5–70 km (średnio 45 km), zawartość żelaza szacuje się na ok. 5% i jest ono czwartym z kolei pierwiastkiem, po tlenie (O), krzemie (Si) i glinie (Al). W skorupie ziemskiej żelazo występuje głównie na +2 lub +3 stopniu utlenienia w postaci różnych minerałów (rud żelaza) przedstawionych w Tabeli I. Żelazo występuje również w niewielkich ilościach na stopniu utlenienia 0, w stanie rodzimym w skałach magmowych oraz meteorytach żelaznych. Żelazo jest bardzo reaktywne i jego forma Fe(II) – jon żelazawy w środowisku neutralnym i warunkach tlenowych łatwo ulega utlenieniu do formy Fe(III) – jon żelazowy [20]. Żelazo (III) może ulegać mikrobiologicznej redukcji do formy dwuwartościowej w wyniku dwóch procesów: (i) redukcji asymilacyjnej związanej z przyswajaniem żelaza i wbudowaniem go w enzymy, kofaktory [20] oraz (ii) redukcji

Tabela I
Minerały (rudy) żelaza występujące w skorupie ziemskiej
[20, 61, 62]

Ruda żelaza	Wzór chemiczny
Magnetyt	Fe_3O_4 lub $\text{FeO} \times \text{Fe}_2\text{O}_3$
Hematyt	Fe_2O_3
Limonit	$\text{Fe}_2\text{O}_3 \times n\text{H}_2\text{O}$ lub FeOOH
Syderyt	FeCO_3
Getyt	$\text{Fe}_2\text{O}_3 \times \text{H}_2\text{O}$
Ilmenit	$\text{FeO} \times \text{TiO}_2$
Wiwianit	$[\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \times 8\text{H}_2\text{O}]$
Piryty (markasyt)	FeS_2
Pirotyn	$\text{Fe}_n\text{S}_{n+1}$ (n=5–6)
Arsenopiryty	FeAsS

dysymilacyjnej związanej z wykorzystaniem żelaza Fe(III) jako ostatecznego akceptora elektronów w procesie oddychania w warunkach beztlenowych. Taki typ oddychania nazywany oddychaniem żelazowym lub oddychaniem Fe(III) (*ferric ion respiration* lub *Fe(III) respiration*) co oznacza, że cały proces związany jest z produkcją energii (61). Nie każdy proces

* Autor do korespondencji: tel. (22) 592 3337, e-mail:annaw@ibb.waw.pl

Tabela II

Lista mikroorganizmów redukujących żelazo (III) z domeny *Bacteria* zdolnych do oddychania żelazowego [5, 8, 9, 13, 15, 16, 20, 24, 3, 34, 35, 37, 38, 45, 48, 61, 62, 66, 67, 82, 83, 91, 95, 98, 100]

Typ/klasa	Gatunki przykładowe	Rodzaj
<i>Acidobacteria</i>	<i>Geothrix</i>	<i>G. fermentans</i>
<i>Actinobacteria</i>	<i>Acidimicrobium</i>	<i>Am. ferrooxidans</i>
<i>Aquificae</i>	<i>Sulfurihydrogenibium</i>	<i>S. azorense</i> , <i>S. subterraneum</i>
<i>Deferribacteres</i>	<i>Deferribacter</i>	<i>D. abyssi</i> , <i>D. thermophilus</i>
	<i>Geovibrio</i>	<i>G. ferrireducens</i>
<i>Deinococcus-Thermus</i>	<i>Deinococcus</i>	<i>D. geothermalis</i>
	<i>Thermus</i>	<i>T. scotoeductus</i>
<i>Firmicutes</i>	<i>Alkaliphilus</i>	<i>A. metalliredigens</i>
	<i>Anaerobranca</i>	<i>A. californensis</i> , <i>A. gottschalkii</i> , <i>A. horicoshi</i>
	<i>Bacillus</i>	<i>B. infernus</i> , <i>B. subterraneus</i>
	<i>Carboxydotherrmus</i>	<i>C. ferrireducens</i>
	<i>Sulfobacillus</i>	<i>S. acidophilus</i> , <i>S. thermosulfidooxidans</i>
	<i>Thermoanaerobacter</i>	<i>T. acetothylicus</i> , <i>T. brokii</i> , <i>T. siderophilus</i> , <i>T. sulfurophilus</i> , <i>T. wiegelii</i>
	<i>Thermolithobacter</i>	<i>T. ferrireducens</i> , <i>T. carboxydovorans</i>
	<i>Termoterrabacterium</i>	<i>T. ferrireducens</i>
	<i>Thermosinus</i>	<i>T. carboxydovorans</i>
<i>Thermovenabulum</i>	<i>T. ferrioganovororum</i>	
<i>Nitrospira</i>	<i>Magnetobacterium</i>	<i>M. magnetitacticum</i>
α - <i>Proteobacteria</i>	<i>Acidophilium</i>	<i>A. cryptum</i>
β - <i>Proteobacteria</i>	<i>Ferribacter</i>	<i>F. limneticum</i> , <i>F. thermoautotrophicum</i>
	<i>Ferribacterium</i>	<i>F. limneticum</i>
	<i>Rhodoferax</i>	<i>R. ferrireducens</i>
γ - <i>Proteobacteria</i>	<i>Acidithiobacillus</i>	<i>A. ferrooxidans</i>
	<i>Aeromonas</i>	<i>A. hydrophila</i>
	<i>Ferrimonas</i>	<i>F. balearica</i>
	<i>Pantoea</i>	<i>P. agglomerans</i>
	<i>Shewanella</i>	<i>S. alga</i> , <i>S. baltica</i> , <i>S. frigidimarina</i> , <i>S. oneidensis</i> , <i>S. olleyana</i> , <i>S. paeleana</i> , <i>S. potomacii</i> , <i>S. putrefaciens</i> , <i>S. saccharophila</i>
δ - <i>Proteobacteria</i>	<i>Anaeromyxobacter</i>	<i>A. dehalogenans</i>
	<i>Desulfobulbus</i>	<i>D. propionicus</i>
	<i>Desulfotomaculum</i>	<i>D. reducens</i>
	<i>Desulfitobacterium</i>	<i>D. frappieri</i> , <i>D. hafniense</i> , <i>D. metallireducens</i>
	<i>Desulfuromonas</i>	<i>D. acetexigenes</i> , <i>D. acetoxidans</i> , <i>D. chloroethenica</i> , <i>D. michiganensis</i> , <i>D. palmitatis</i> , <i>D. thiophila</i> , <i>D. svalbardensis</i>
	<i>Desulfuromusa</i>	<i>D. bakii</i> , <i>D. kysingii</i> , <i>D. ferrireducens</i> , <i>D. succinoxidans</i>
	<i>Geoalkalibacter</i>	<i>G. ferrihydriticus</i>
	<i>Geobacter</i>	<i>G. bemidjiensis</i> , <i>G. bremensis</i> , <i>G. chappellei</i> , <i>G. grbiciae</i> , <i>G. humireducens</i> , <i>G. hydrogenophilus</i> , <i>G. metallireducens</i> , <i>G. pelophilus</i> , <i>G. psychrophilus</i> , <i>G. pickeringii</i> , <i>G. sulfurreducens</i> , <i>G. thiogenes</i> , <i>G. uraniiireducens</i>
	<i>Geopsychrobacter</i>	<i>G. electrodiphilus</i> , <i>G. multivorans</i>
	<i>Geothermobacter</i>	<i>G. ehrlichii</i>
	<i>Malonomonas</i>	<i>M. rubra</i>
<i>Pelobacter</i>	<i>P. acetylenicus</i> , <i>P. acidigalici</i> , <i>P. carbinolicus</i> , <i>P. massiliensis</i> , <i>P. propionicus</i> , <i>P. venetianus</i>	
ϵ - <i>Proteobacteria</i>	<i>Sulfurispirillum</i>	<i>S. barnessi</i>
<i>Thermodesulfobacteria</i>	<i>Geothermobacterium</i>	<i>G. ferrireducens</i>
	<i>Thermodesulfobacterium</i>	<i>T. commune</i>
<i>Thermotoga</i>	<i>Thermotoga</i>	<i>T. lettingae</i> , <i>T. maritima</i> , <i>T. subterranea</i>

dysymilacyjnej redukcji żelaza związany jest z wytwarzaniem energii. Ma to miejsce wtedy, gdy redukcja żelaza towarzyszy innym typom oddychania np. fermentacji, czy redukcji siarczanów a żelazo Fe(III) stanowi dodatkowy akceptor elektronów. Uważa się, że jest to sposób na pozbycie się nadmiaru elektronów i protonów z komórki (siła redukcyjna), przy niedostatku zasadniczego akceptora [20, 62].

2. Charakterystyka fizjologiczno-biochemiczna grup mikroorganizmów redukujących Fe(III)

Dla określenia prokariotów wykorzystujących Fe(III) jako ostateczny akceptor elektronów w oddychaniu beztlenowym stosuje się skrót FRM (*Fe(III)-respiring microorganisms*). Oprócz Fe(III) redukują one Mn(IV) do Mn(II) oraz kwasy humusowe a także inne metale, pierwiastki promieniotwórcze, np. U(VI) i związki jak azotany, fumaran czy siarkę S⁰. FRM zdolne do oddychania Fe(III) nie tworzą specyficznej filogenetycznej grupy. Należą one do obu domen prokariotów: *Bacteria* i *Archaea*. Obecnie znanych jest znacznie ponad 100 gatunków FRM. Ponad połowa gatunków stale rezyduje w środowiskach psychro-mezofilnych (choć nie są psychrofilami, ale mogą być psychrotolerantami), reszta zajmuje środowiska termofilne i hipertermofilne (źródła gorące, wody geotermalne, kominy hydrotermalne). Jedna grupa FRM całkowicie utlenia materię organiczną do dwutlenku węgla, druga niekompletnie, zwykle do octanu. Liczne FRM, zwłaszcza hipertermofilne, wykorzystują wodór jako źródło elektronów do redukcji Fe(III). W naturalnych środowiskach prokarioty FRM w warunkach beztlenowych utleniają produkty rozkładu materii organicznej, głównie produkty fermentacji glikolitycznych i nieglikolitycznych. W związku z tym, że wodór i octan są dwoma głównymi pośrednimi produktami fermentacji materii organicznej to uważa się, że w naturalnych środowiskach o pH obojętnym bogatych w związki Fe(III) czy Mn(IV) stanowią one istotne źródło elektronów w procesach redukcji metali. Dlatego przy charakterystyce FRM w badaniach laboratoryjnych zawsze określa się ich zdolność do utleniania octanu i wodoru. Octan stosuje się jako źródło węgla i energii do selekcji prokariotów redukujących Fe(III). Utlenianie octanu przebiega zgodnie z reakcją 1, a wodoru zgodnie z reakcją 2 [61, 62, 67, 95]:

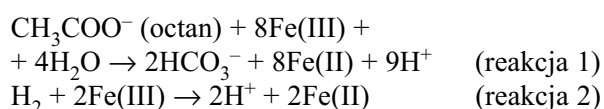


Tabela II pokazuje listę prokariotów FRM z domeny *Bacteria* a tabela III z domeny *Archaea* zdolnych do dysymilacyjnej redukcji żelaza, z wytworzeniem

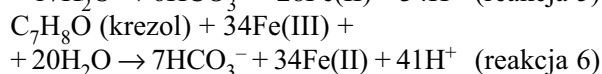
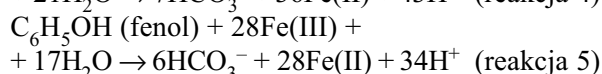
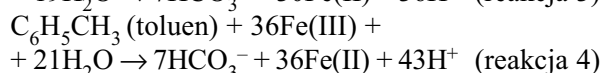
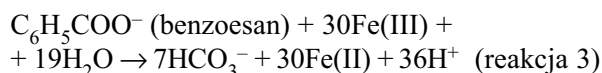
Tabela III

Lista mikroorganizmów redukujących żelazo (III) z domeny *Archaea* zdolnych do oddychania żelazowego [5, 39, 40, 95]

Typ	Rodzaj	Gatunki przykładowe
<i>Euryarchaeota</i>	<i>Archeoglobus</i>	<i>A. fulgidus</i>
	<i>Ferroglobus</i>	<i>F. indicus</i> , <i>F. placidus</i> , <i>F. pacificus</i>
	<i>Geoglobus</i>	<i>G. ahangari</i>
	<i>Pyrococcus</i>	<i>P. furiosus</i>
	<i>Thermococcus</i>	<i>T. celer</i> , <i>T. sibiricus</i>
<i>Crenarchaeota</i>	<i>Geogemma</i>	<i>G. barosi</i> , <i>G. indica</i> , <i>G. pacifica</i>
	<i>Hyperthermus</i>	<i>H. butylicus</i>
	<i>Pyrobaculum</i>	<i>P. aerophilum</i> , <i>P. islandicum</i>
	<i>Pyrodictium</i>	<i>P. abyssi</i> , <i>P. occultum</i>
	<i>Sulfolobus</i>	<i>S. acidocaldarius</i> , <i>S. shibatae</i>

energii w procesie oddychania żelazowego. Najlepiej znanymi i zbadanymi z FRM [5, 20, 34, 35, 38, 48, 61, 62, 66, 67, 91, 98] jest rodzina *Geobacteraceae* oraz rodzina *Desulfuromonadaceae*, obie z klasy δ -*Proteobacteria*, typu *Proteobacteria*. Wg Bergey Manual [5] do *Geobacteraceae* należy rodzaj *Geobacter*, który jest jak dotychczas stosunkowo dobrze zbadany. Pierwszą odkrytą bakterią z rodzaju *Geobacter* był *G. metallireducens* (początkowo oznaczony jako szczep GS-15), wyizolowany z osadu rzeki Potomac w USA w 1987 roku. Do *Geobacteraceae* należą gatunki bakterii mezofilnych, rosnące w zakresie temperatur 25–40°C a także psychrotolerancyjny *Geopsychrobacter electrodiphilus*, rosnący w zakresie temperatur 4–30°C oraz termofilny *Geothermobacter ehrlichii*, wyizolowany z hydrotermalnego źródła, rosnący w temperaturach 35–65°C przy optimum 55°C. Wśród *Geobacteraceae* są też inne bakterie ekstremofilne, np. *Geoalkalibacter ferrihydriticus*, bakteria alkalofilna o optymalnym pH = 8,6. Bakterie z rodziny *Geobacteraceae* występują w powierzchniowych warstwach osadów dennych różnorodnych zbiorników wodnych płytkich i głębokich, zwłaszcza piaszczystych, bogatych w związki Fe(III). Bakterie te występują szczególnie licznie w miejscach skażonych ropą naftową. Izolacja chromosomalnego DNA i amplifikacja na jego matrycy genów kodujących 16SrRNA wykazała, że w wymienionych środowiskach jest to dominująca grupa bakterii. Wg Bergey Manual [5] do następnej dość dobrze poznanej rodziny *Desulfuromonadaceae* należą gatunki z rodzaju *Desulfuromonas*, *Desulfuromusa*, *Malonomonas* i *Pelobacter*, występujące w osadach morskich. Psychrofilny *Desulfuromonas svalbardensis* i psychrotolerancyjny *Desulfuromusa ferrireducens* były izolowane z morskich osadów dennych Arktyki, z optymalną temperaturą wzrostu odpowiednio 14°C i 14–17°C i maksymalną 20°C i 23°C.

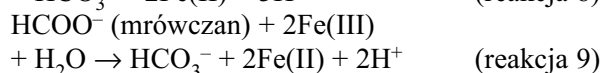
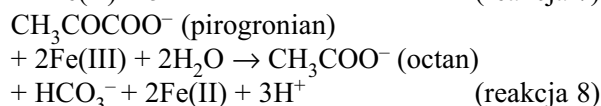
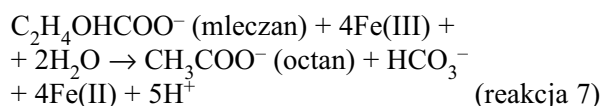
Oprócz rodzaju *Pelobacter*, pozostałe bakterie należące do dwóch powyższych rodzin są zdolne do całkowitego utleniania octanu do dwutlenku węgla z jednoczesną redukcją Fe(III). Większość z nich całkowicie utlenia kwasy organiczne, związki aromatyczne (np. toluen, benzoesan, fenol, krezol), niektóre etanol, długołańcuchowe kwasy tłuszczowe, cukry oraz aminokwasy. Duża część wykorzystuje wodór jako dawcę elektronów do procesów redukcji. Reakcje 3–6 przedstawiają kolejno utlenianie benzoesanu, toluenu, fenolu i krezolu z jednoczesną redukcją Fe(III):



Przed odkryciem zdolności do redukcji Fe(III) uważano, że bakterie z rodzaju *Pelobacter* uzyskują energię wyłącznie w wyniku procesów fermentacji. Fermentują one 2,3-butanediol, acetoinę, glikol etylenowy i polietylenowy, acetylen oraz kwas galusowy. Rodzaj *Desulfuromusa* oraz *Malonomonas rubra* prowadzą fermentację jabłczanu i fumaranu. Część gatunków *Desulfuromonas*, *Desulfuromusa*, *Geoalkalibacter ferrihydriticus*, *Pelobacter* jest ściśle beztlenowa, inne są zdolne także do oddychania tlenowego (*Geobacter*). Odkrycie, że *G. sulfurreducens* przeżywa w warunkach atmosferycznych oraz jest zdolny do wzrostu przy obniżonym stężeniu tlenu w stosunku do powietrza tłumaczy fakt, że rodzaj *Geobacter* dominuje w środowiskach beztlenowych, które czasami mogą ulegać natlenieniu. Rodzaje *Desulfuromonas*, *Desulfuromusa*, *Malonomonas*, *Pelobacter* oraz *G. sulfurreducens* mogą redukować także S^0 .

Kolejne FRM, które są intensywnie badane i dość dobrze poznane to gatunki z rodzaju *Shewanella*, z rodziny *Shewanellaceae*, klasy δ -*Proteobacteria*, typu *Proteobacteria* wyizolowane z osadów dennych i warstw podpowierzchniowych różnorodnych zbiorników wodnych oraz gleb. Należą tu bakterie słodkowodne i morskie. Są również szczepy patogenne. W środowiskach beztlenowych, gdzie zredukowane jest żelazo, stanowią one zaledwie do 2% ogólnej ilości bakterii, a nawet nie wykrywa się ich tam wcale. Prawdopodobną przyczyną niewielkiej ilości bakterii z rodzaju *Shewanella* w ogólnej puli FRM jest prawdopodobnie niewielka ilość dostępnych substratów w środowisku oraz fakt, że prowadzą one niepełne utlenianie bardziej złożonych substratów. Jako źródło elektronów do redukcji Fe(III) bakterie te wykorzystują wodór oraz związki organiczne jak kwasy organiczne (mleczan, pirogro-

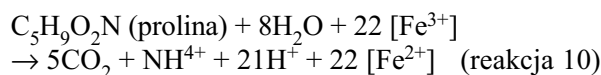
nian, mrówczan) i węglowodany (glukoza). Są to fakultatywne beztlenowce; ruchliwe Gram-ujemne pałeczki, które posiadają wici [5, 61, 62, 67]. Utlenianie mleczanu, pirogronianu i mrówczanu z jednoczesną redukcją Fe(III) przebiega odpowiednio według reakcji 7–9.



Fakultatywne beztlenowce z rodzaju *Ferrimonas* i *Aeromonas* to kolejne bakterie z klasy γ -*Proteobacteria* redukujące Fe(III) z jednoczesnym utlenianiem związków organicznych [20, 83].

Wśród FRM zidentyfikowano pojedyncze gatunki, filogenetycznie odległe od siebie oraz od pozostałych znanych redukujących Fe(III). *Geothrix fermentans* to Gram-ujemna nieruchliwa pałeczka, wyizolowana ze zbiornika wodnego zanieczyszczonego ropą naftową. Jest to ścisły beztlenowiec zdolny do redukcji Fe(III) z jednoczesnym utlenianiem propionianu, mleczanu, fumaranu, bursztynianu oraz długołańcuchowych kwasów tłuszczowych jak kwas palmitynowy. Energię może uzyskiwać także w wyniku fermentacji cytrynianu czy fumaranu. Jest gatunkiem należącym do typu *Acidobacteria* [8].

Geovibrio ferrireducens został wyizolowany z terenów skażonych węglowodorami. Jest to ruchliwy Gram-ujemny przecinkowiec, bakteria mezofilna, ściśle beztlenowa, niefermentująca. Elektrony do redukcji Fe(III) uzyskuje w wyniku utleniania octanu, wodoru, mleczanu, propionianu, bursztynianu, fumaranu, pirogronianu oraz, co jest rzadkie, aminokwasów. Reakcja utleniania prolina w połączeniu z redukcją żelaza przebiega zgodnie z reakcją 10:

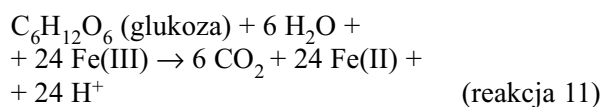


G. ferrireducens potrafi też redukować siarkę S^0 . Największe podobieństwo wykazuje do halofilnej, beztlenowej, heterotroficznej pałeczki *Flexistipes sinus-arabici*, z którą tworzy odrębną grupę filogenetyczną w obrębie domeny *Bacteria* [13].

Ferribacterium limneticum jest ruchliwą pałeczką należącą do klasy β -*Proteobacteria*, wyizolowaną z osadów dennych jeziora zanieczyszczonego odpadami kopalnianymi. Jest to bakteria ściśle beztlenowa, redukuje Fe(III) utleniając octan i inne kwasy organiczne, niezdolna do fermentacji. Najbardziej spokrewniona jest z bakterią fotosyntetyzującą *Rhodocyclops tenuis*, która nie jest heterotrofem i nie jest zdolna

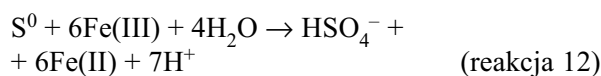
do redukcji Fe(III), ale *F. limneticum* nie jest bakterią fotosyntetyzującą [16].

Rhodferax ferrireducens jest krótką ruchliwą Gram-ujemną pałeczką z pojedynczą wicią, z klasy β -*Proteobacteria*, wyizolowaną z osadów dennych zatoki Oyster Bay w stanie Wirginia w USA, rosnącą w temperaturze 4–30°C. Jest fakultatywnym beztlenowcem wykazującym unikalną zdolność całkowitego utleniania glukozy do dwutlenku węgla z jednoczesną redukcją Fe(III) zgodnie z reakcją 11:



Rośnie też na podłożu zawierającym octan, mleczan, jabłczan, propionian, pirogronian, bursztynian, benzoosan. Mimo że bakteria ta jest najbardziej spokrewniona z rodzajem *Rhodferax* to nie jest ani bakterią fotosyntetyzującą ani fermentującą jak inni znani przedstawiciele tego rodzaju. Podobnie nie wykryto żadnej innej bakterii z rodzaju *Rhodferax* zdolnej do pozyskiwania energii z utleniania związków organicznych w połączeniu z redukcją Fe(III) [15].

Procesy redukcji Fe(III) zachodzą również w środowiskach kwaśnych. Wyizolowano bakterię *Acidophilium cryptum*, z klasy α -*Proteobacteria*, z osadów kwaśnego jeziora pokopalnianego. Jest to Gram-ujemna pałeczka, bezwzględny beztlenowiec zdolny do utleniania cukrów, kwasów organicznych i wodoru w połączeniu z redukcją żelaza [45]. Ze środowisk kwaśnych izoluje się także bakterie uważane za neutrofile. Jedną z nich to *Desulfitobacterium metallireducens* jedyny przedstawiciel rodzaju *Desulfitobacterium*, Gram-dodatni beztlenowiec zdolny do redukcji Fe(III), Mn(IV), U(VI), Co(III) oraz kwasów humusowych. Redukuje też siarkę S^0 i chlorozwiązki a utlenia kwasy organiczne i alkohole. Inna to *Anaeromyxobacter dehalogenans* z rzędu *Myxococcales* z δ -*Proteobacteria*, Gram-ujemny fakultatywny beztlenowiec utleniający octan i redukujący Fe(III), azotany, fumarany i związki chlorofenolowe [82]. Bakterie autotroficzne jak *Acidithiobacillus thiooxidans*, *A. ferrooxidans* czy *Sulfolobus acidocaldarius* też mogą redukować Fe(III) do Fe(II) w kwaśnym pH utleniając siarkę, co opisuje reakcja 12. Proces ten zachodzi w warunkach tlenowych lub beztlenowych i uważa się, że nie służy on produkcji energii [62].



Oprócz alkalofilnych przedstawicieli rodziny *Geobacteraceae* znane są także inne gatunki FRM izolowane ze środowisk o odczynie zasadowym. Należą tu Gram-dodatnie bezwzględne beztlenowce *Alkaliphilus metalliredigens*, którego optymalne pH wzrostu

wynosi 9,5, redukujący Fe(III), Co(III), Cr(VI) oraz kwasy humusowe czy *Tindallia magadiensis*, bakteria fermentująca aminokwasy o optymalnym pH wzrostu 8,5 [100].

Kolejną grupą FRM, choć słabo poznaną, są hypertermofilne archeony żyjące w środowiskach gdzie panują temperatury 80–110°C i gdzie znajduje się dużo związków Fe(III). Utleniają one wodór, octan, długołańcuchowe kwasy tłuszczowe oraz związki aromatyczne do dwutlenku węgla. Redukują również inne metale, Mn(IV), Au(III), Cr(VI), Co(III), U(VI), Tc(VII). Należą tu przedstawiciele następujących gatunków *Archaea*: *Pyrobaculum aerophilum*, *P. islandicum*, *Pyrodictium abyssi*, *Methanopyrus kandleri*, *Ferroglobus placidus*, *Geoglobus ahangari*, *Archeoglobus fulgidus*, *Pyrococcus furiosus*, *Geogemma barosii* (szczep 121) rosnący w temperaturze 121°C oraz bakterii: *Thermotoga maritima*, *Geothermobacterium ferrireducens*, *Thermoanaerobacter siderophilus*, *Thermus* sp., [5, 39, 40, 95].

Redukcję żelaza jako proces uboczny towarzyszący procesowi fermentacji obserwowano dla następujących gatunków i rodzajów bakterii: *Paenibacillus polymyxa*, *Bacillus circulans*, *B. megaterium*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Clostridium beijerinckii*, *C. pasteurianum*, *C. sporogenes*, *Lactobacillus lactis*, *Pseudomonas* spp., *Vibrio* sp., *Citrobacter freundii* [20, 62]. Wśród bakterii fermentujących wykrywa się też takie, które również mogą pozyskiwać energię w wyniku oddychania żelazowego. Przykładem może być *Pantonea agglomerans* należąca do rodziny *Enterobacteriaceae*, która występuje głównie w glebie oraz w zbiornikach wodnych. Jak wszystkie bakterie należące do tej rodziny jest fakultatywnym beztlenowcem i prowadzi procesy fermentacji. Ale wykazano, że także oddycha beztlenowo redukując Fe(III) oraz Mn(IV), Cr(VI) i kwasy humusowe utleniając octan i wodór [24].

Redukcja rozpuszczalnych związków Fe(III) oraz kwasów humusowych i Cr(VI) jest też procesem ubocznym towarzyszącym fermentacji, jako podstawowej formie zdobywania energii u ścisłego beztlenowca *Deinococcus radiodurans*. Bakteria ta jest najbardziej opornym organizmem na promieniowanie jonizujące spośród dotychczas odkrytych. Przeżywa dawki promieniowania o wartości do 1500 Gy (grej) [25].

Niektóre gatunki rodzaju *Bacillus* również mogą pozyskiwać energię w wyniku oddychania żelazowego. Należą do nich *B. infernus* czy *B. subterraneus*. *B. infernus* został wyizolowany z niecki triasowej z głębokości 2.7 km. Jest to ściśle beztlenowa, termofilna, halotolerancyjna, lekko alkalofilna bakteria, która fermentuje glukozę a także redukuje Fe(III), Mn(IV), azotany utleniając mrówczan i mleczan [9]. *B. subterraneus* wyizolowano z odwiertu głębokich wód geotermalnych w basenie artezyjskim w Australii, jest to mezofilny fakultatywny beztlenowiec. Redukuje

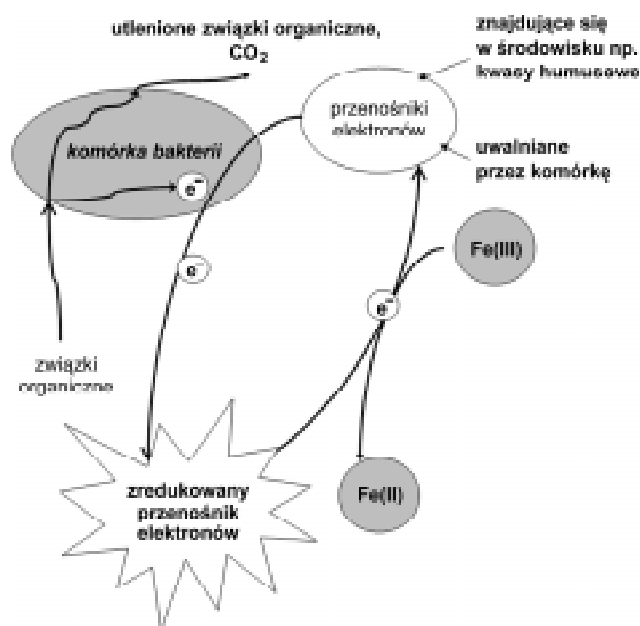
Fe(III), Mn(IV), fumaran, azotany i azotyny utleniając cukry, glicerol, etanol i mleczan [37].

Redukcja Fe(III) może towarzyszyć utlenianiu siarczanów przez bakterie redukujące siarczany. Jest to proces uboczny nie służący produkcji energii obserwowany u np. rodzaju *Desulfovibrio*, *Desulfobacterium autotrophicum* czy *Desulfobacter postgatei* [61, 62]. Ale niektórzy przedstawiciele bakterii redukujących siarczany też mogą oddychać przez redukcję Fe(III), Mn(IV) czy kwasów humusowych. Należą tu *Desulfobulbus propionicus* z rodziny *Desulfobulbaceae* występującej w morskich osadach dennych czy *Desulfotomaculum reducens* [33, 34].

3. Mechanizmy redukcji Fe(III)

Rozważając mechanizmy transferu elektronów między komórką bakterii a związkami Fe(III) w środowisku zewnętrznym należy wziąć pod uwagę następujące zagadnienia: bezpośredni kontakt mikroorganizmu z nierozpuszczalnym związkiem Fe(III); udział przenośników elektronów, zwłaszcza kwasów humusowych znajdujących się w środowisku; produkcję przenośników elektronów oraz substancji rozpuszczających nierozpuszczalne związki Fe(III) przez komórkę; bezpośredni kontakt mikroorganizmu z rozpuszczalnym związkiem Fe(III). W większości naturalnych środowisk Fe(III) występuje najczęściej w postaci nierozpuszczalnych tlenków. Filogenetycznie odległe bakterie z grupy FRM wykształciły różne sposoby przenoszenia elektronów na nierozpuszczalne związki żelaza Fe(III) [79].

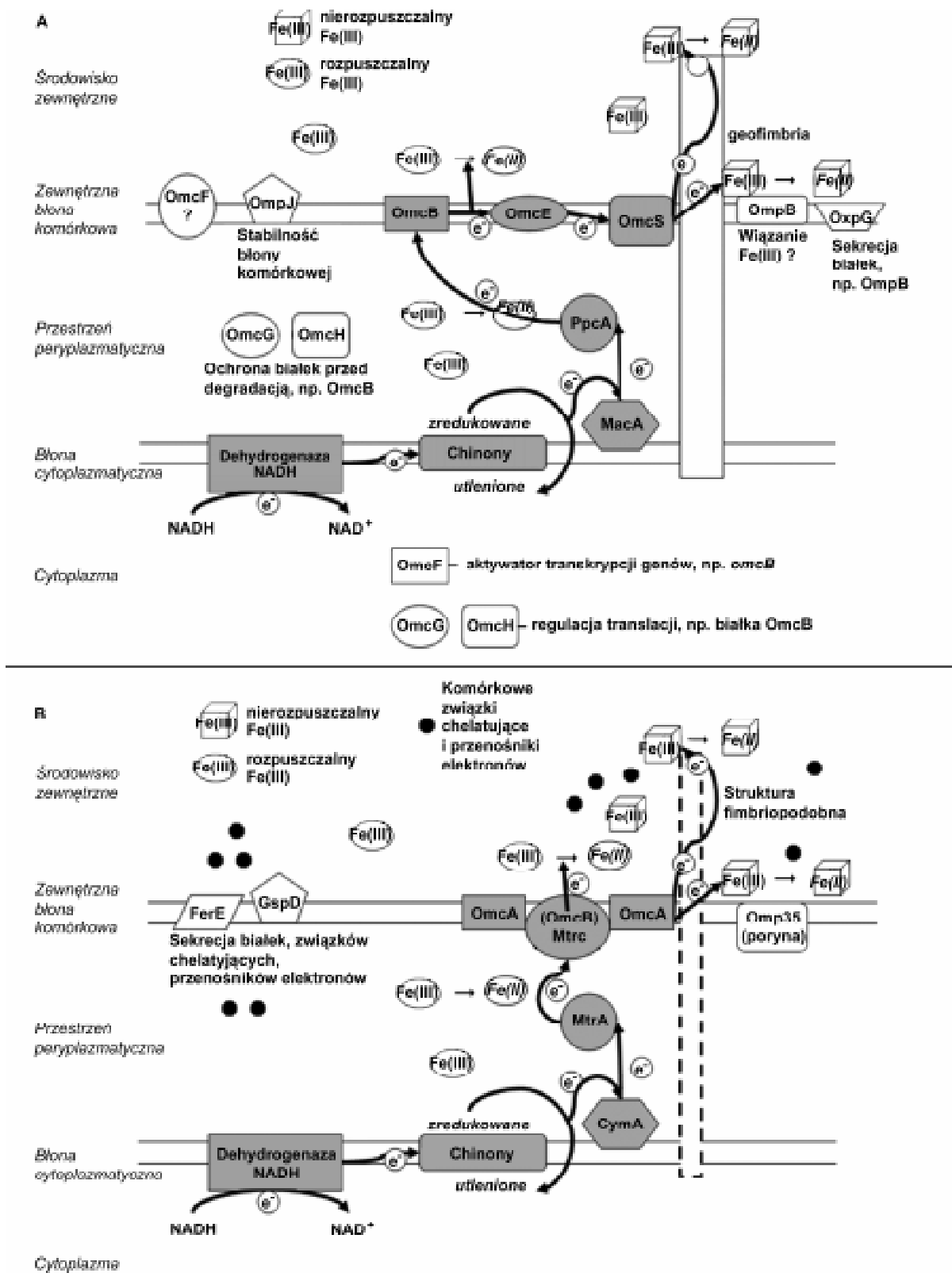
Naturalnie w środowisku występują przenośniki elektronów oraz związki chelatujące, które ułatwiają procesy mikrobiologicznej redukcji zwłaszcza nierozpuszczalnych związków Fe(III). Przenośnik elektronów wychwytuje elektrony produkowane przez komórkę, w wyniku czego sam ulega redukcji, a następnie abiotycznie redukuje Fe(III). W efekcie reakcji utlenienia następuje regeneracja przenośnika (Rys. 1). Najlepiej poznanymi przenośnikami elektronów są kwasy humusowe, które wchodzi w skład próchnicy glebowej a także naturalnych wód. Zawierają one chinony, związki o właściwościach aromatycznych zawierające dwie grupy ketonowe (C=O), których atomy węgla wchodzi w skład pierścienia aromatycznego. Pobranie przez nie elektronów powoduje powstanie wolnych rodników chinonowych. Kwasy humusowe mogą być końcowym akceptorem elektronów w oddychaniu FRM tak samo jak związki Fe(III). W środowiskach bogatych w kwasy humusowe oraz związki Fe(III) dochodzi do abiotycznej redukcji tego ostatniego. Mikrobiologicznie zredukowane kwasy humusowe mogą abiotycznie redukować związki Fe(III) do Fe(II) i same ulegać utlenie-



Rys. 1. Mechanizm działania przenośników elektronów w procesie redukcji związków żelaza (III) przez mikroorganizmy redukujące żelazo

niu w wyniku czego następuje ich regeneracja. W ten sposób te same kwasy mogą wielokrotnie ulegać procesom redukcji i utleniania. Obecność kwasów humusowych przyspiesza redukcję żelaza a także utlenianie materii organicznej [61, 69]. Oprócz kwasów humusowych także inne związki mają zdolność przenoszenia elektronów. Należą do nich związki fenolowe znajdujące się w liściach drzew np. klonu, dębu, orzecha włoskiego. Uważa się, że substancje humusowe występujące w naturalnych środowiskach posiadają też właściwości chelatujące (chelacyjne), czyli odznaczają się zdolnością do chemicznego wiązania z metalami i minerałami, przez co zwiększają ich rozpuszczalność. Pewne środowiska obfitują w naturalne przenośniki elektronów oraz związki chelatujące, w innych jest ich deficyt [79]. W badaniach laboratoryjnych do badania mechanizmów redukcji Fe(III) przy udziale przenośników elektronów jako analogów kwasów humusowych stosuje się chinony, najczęściej dwusiarczan 2,6-antrachinonu (AQDS) [69].

Mechanizmy transferu elektronów z komórki bakterii na zewnątrzkomórkowe akceptory jakimi są związki Fe(III) zostały dość dobrze poznane u *G. sulfurreducens*, ponieważ jego genom został całkowicie zsekwencjonowany. Ciekawą cechą tej bakterii jest obecność 111 genów kodujących białka uważane za cytochromy typu *c* na podstawie posiadanej charakterystycznej sekwencji CXXCH wiążącej hem. Szacuje się, że 31 tych białek zlokalizowanych jest w zewnętrznej błonie komórkowej [75]. Mechanizmy redukcji nierozpuszczalnych i rozpuszczalnych związków żelaza częściowo różnią się. Schemat mechanizmu re-



Rys. 2. Schemat mechanizmu redukcji Fe(III) przez *G. sulfurreducens* (A) i *S. oneidensis* MR-1 (B)

dukcji Fe(III) u *G. sulfurreducens* pokazuje rysunek 2A. Dawcą elektronów w komórce jest NADH. Dehydrogenaza NADH przekazuje elektrony na chinony w wewnętrznej błonie komórkowej. Kluczową rolę w przenoszeniu elektronów między wewnętrzną a zewnętrzną

błoną komórkową odgrywają peryplazmatyczne cytochromy typu *c*, MacA i PpcA. MacA jest białkiem o masie cząst. 36 kDa wiążącym dwie grupy hemo- we. Białko to odbiera elektrony ze zredukowanych chinonów i przekazuje je białku PpcA. Mutant *macA*

wykazuje znacznie niższą aktywność redukcji Fe(III), gdy dostarczone jest ono w postaci rozpuszczalnego cytrynianu Fe(III) [12]. PpcA jest białkiem o masie cząst. 9,6 kDa wiążącym trzy grupy hemowe. Mutacja *ppcA* obniża redukcję cytrynianu Fe(III) o 60% w porównaniu ze szczepem dzikim, gdy dawcą elektronów jest octan. Białko to nie ma znaczenia, gdy źródło elektronów stanowi wodór, bo utlenianie wodoru katalizowane jest przez peryplazmatyczną hydrogenazę. PpcA jest niezbędne do procesów redukcji uranu (VI) oraz kwasów humusowych [50]. PpcA przenosi elektrony na białko OmcB, które jest cytochromem typu *c* występującym w zewnętrznej błonie komórkowej. Wiąże ono wiele grup hemowych i pełni bardzo istotną rolę w transporcie elektronów do zewnętrznej błony komórkowej, do białek OmcE i OmcS. Mutant *omcB⁻* *G. sulfurreducens* jest niezdolny do wzrostu na podłożu zawierającym Fe(III) w postaci rozpuszczalnego cytrynianu. Białko OmcB konieczne jest też do redukcji nierozpuszczalnych tlenków Fe(III) oraz wymagane jest, gdy dawcą elektronów jest zarówno octan jak i wodór. W komórce *G. sulfurreducens* występuje jeszcze białko OmcC wykazujące aż 79% identyczności do OmcB, ale w mutancie *omcC⁻* proces redukcji żelaza w postaci cytrynianu żelazowego przebiega podobnie jak w szczepie dzikim. Funkcja białka OmcC nie jest znana [46].

OmcS, białko o masie cząst. 50 kDa wiążące sześć grup hemowych, i OmcE, białko o masie cząst. 30 kDa wiążące cztery grupy hemowe, to cytochromy typu *c* zlokalizowane na powierzchni zewnętrznej błony komórkowej, które są konieczne do wzrostu na podłożu zawierającym nierozpuszczalny tlenek Fe(III) jako jedyny akceptor elektronów. Zaobserwowano, że mutant *omcE⁻* wykazywał niewielką zdolność do redukcji tlenków Fe(III) i Mn(IV), natomiast *omcS⁻* nie, co wskazuje na ważniejszą rolę białka OmcS w procesach redukcji nierozpuszczalnych związków Fe(III) czy Mn(IV). Mutanty *omcE⁻* i *omcS⁻* rosną na podłożu z cytrynianem Fe(III) jak szczep dziki. Uważa się, że rolą białek OmcS i OmcE jest przekazywanie elektronów na geofimbrie (opis niżej). Gen *omcS* prawdopodobnie tworzy operon z genem *omcT* kodującym białko OmcT, które wykazuje 62.6% homologii do białka OmcS. Jego funkcja jest nieznana [74].

Badania pokazują, że redukcja Fe(III) wymaga współdziałania wielu cytochromów typu *c*. Rolą jednych jest transfer elektronów, inne pełnią funkcje regulatorowe. Do tej drugiej grupy należą białka OmcF, OmcG i OmcH. Białko OmcF wiążące tylko jedną grupę hemową jest najmniejszym z cytochromów typu *c* *G. sulfurreducens*, jego masa cząst. wynosi 9.4 kDa. Mutacja *omcF* powoduje znaczną utratę zdolności redukcji rozpuszczalnego cytrynianu Fe(III). W mutantach *omcF⁻* nie wykrywa się mRNA dla białek OmcB

i OmcC oraz obserwuje się zmiany ilościowe innych cytochromów typu *c*. Białko OmcF jest uważane za aktywator transkrypcji genów, głównie *omcB*, a także *omcC* i prawdopodobnie innych. Ciekawym zjawiskiem jest fakt, że mutacji *omcF* towarzyszy nadekspresja białka OmcS, co umożliwia bakterii spowolniony wzrost na podłożu z cytrynianem żelaza. Białko OmcF wykrywa się też w zewnętrznej błonie komórkowej bakterii [42].

OmcG, białko o masie cząst. 78.7 kDa, i OmcH, białko o masie cząst. 103 kDa, to dwa homologiczne cytochromy typu *c* wiążące wiele grup hemowych. Wykazują 84.4% identyczności. Nie określano ich lokalizacji w komórce. W mutantach *omcG⁻* i *omcH⁻* nie wykrywa się białka OmcB, chociaż transkrypcja genu *omcB* zachodzi bez zakłóceń. Ekspresja tylko jednego z dwóch białek OmcG lub OmcH z plazmidu znosi efekty podwójnej mutacji *omcG omcH*. Przymuszaną rolą białek OmcG i OmcH jest regulacja translacji lub/i stabilizacja białka OmcB oraz ochrona przed degradacją w przestrzeni peryplazmatycznej [41].

Ponadto przy deficycie ostatecznych akceptorów elektronów w podłożu, ich rolę mogą przejściowo pełnić cytochromy typu *c*, znajdujące się w periplazmie i zewnętrznej błonie komórkowej. Szacuje się, że taki mechanizm dostarcza komórce *G. sulfurreducens* energii wystarczającej do przetrwania przez 8 minut lub zapewnia ruch wici na pokonanie odległości kilkuset długości komórki, aby przemieścić się do miejsca gdzie występują akceptory elektronów [22].

Do prawidłowego przebiegu procesów redukcji Fe(III) niezbędne konieczne są również białka zewnętrznej błony komórkowej nie będące przenośnikami elektronów. Należą do nich białka: OmpJ, OxpG, OmpB. Pełnią one rolę pośrednią w procesie transferu elektronów. OmpJ jest najobficiej występującym białkiem w zewnętrznej błonie komórkowej. Jest to białko specyficzne dla rodziny *Geobacteraceae*. Należy ono do poryn, grupy białek błonowych budujących kanały dyfuzyjne (pory) w zewnętrznej błonie komórkowej. Poryny mają strukturę β -harmonijki. Pory umożliwiają bierną dyfuzję różnych roztworów wodnych. Obecność białka OmpJ wymagana jest do redukcji rozpuszczalnego cytrynianu Fe(III) oraz nierozpuszczalnych tlenków Fe(III) i Mn(IV), ponieważ odgrywa ono ważną rolę w utrzymaniu fizycznej integralności błony komórkowej, zapewniając jednocześnie jej prawidłowe funkcjonowanie. Integralność błony komórkowej jest prawdopodobnie niezbędnym czynnikiem dojrzewania białek przenoszących elektrony i całego procesu przenoszenia elektronów. W mutancie *ompJ⁻* *G. sulfurreducens* następuje ok. 50% obniżenie ilości białek cytochromów typu *c* w przestrzeni peryplazmatycznej oraz w zewnętrznej błonie komórkowej. Obserwuje się również powiększenie przestrzeni peryplazmatycznej [1].

OmpB, białko o masie cząst. 139.6 kDa, jest prawdopodobnie oksydazą miedziową, gdyż posiada cztery miejsca wiązania jonów miedzi, dwa przy N-terminalnym i dwa przy C-terminalnym końcu. Wykazuje największe podobieństwo do oksydazy manganowej MofA *Leptothrix discophora*, bakterii utleniającej związek Mn(II). Białko OmpB ulega ekspresji na tym samym poziomie zarówno przy rozpuszczalnych jak i nierozpuszczalnych związkach Fe(III) jako ostatecznych akceptorów elektronów. Jest to białko występujące na powierzchni zewnętrznej błony komórkowej, wykrywa się go również w płynach zewnątrzkomórkowych. Mutant *ompB⁻* *G. sulfurreducens* redukuje rozpuszczalny cytrynian żelaza oraz fumaran jak szczep dziki, natomiast wykazuje znacznie obniżoną redukcję nierozpuszczalnych tlenków Fe(III) oraz Mn(IV). Nie wiadomo czy białko OmpB jest zaangażowane w redukcję Fe(III) i Mn(IV) czy ją pośrednio ułatwia pełniąc funkcję pomocniczą. Mimo że białko to jest uważane za oksydazę miedziową, to posiada też domenę odpowiedzialną za wiązanie fibronektyny, charakterystyczną dla bakteryjnych hydrolaz, zwłaszcza celulazy i chitynaz, odpowiedzialną za adhezję białka do polisacharydu i za zachowanie prawidłowej konformacji centrum aktywnego enzymu. W białku OmpB wykryto również sekwencję, która może być potencjalnym miejscem wiązania żelaza. Uważa się, że domeny odpowiedzialne za wiązanie żelaza i fibronektyny odgrywają rolę w oddziaływaniu między białkiem OmpB a tlenkami Fe(III) oraz Mn(IV). Za sekrecję białka OmpB odpowiada białko OxpG, które jest pseudopiliną, należącą do białek ogólnego systemu sekrecji typu II. Pseudopiliny tworzą fimbriopodobne struktury peryplazmatyczne, umożliwiające sekrecję białek przez tworzenie kanału dla wydzielanego białka lub wypychanie go na zewnątrz błony. Przypuszcza się, że rolą białka OxpG jest także sekrecja innych białek odpowiedzialnych za redukcję nierozpuszczalnych tlenków Fe(III) i Mn(IV). Mutant *oxpG⁻* nie jest zdolny do redukcji nierozpuszczalnych tlenków Fe(III) oraz Mn(IV). Natomiast redukcja rozpuszczalnego cytrynianu żelazowego zachodzi bez zmian, tak jak u szczepu dzikiego [73].

Początkowo uważano, że w redukcji Fe(III) biorą udział tylko cytochromy typu *c*. I tak jest, gdy akceptorem elektronów są rozpuszczalne związki żelaza, które odbierają elektrony bezpośrednio od białek w zewnętrznej błonie komórkowej lub w przestrzeni peryplazmatycznej. Jako ciekawostkę należy tu podać, że u bakterii z rodzaju *Pelobacter* nie wykryto cytochromów typu *c* [66]. Ostatnio u *G. sulfurreducens* wykryto fimbrie, nazwane geofimbriami, które mają zdolność przenoszenia elektronów. Zbadano przewodnictwo elektryczne białek fimbrii i innych białek zewnątrzkomórkowych i wykazano, że białka geofimbrii są do-

brymi przewodnikami elektronów i nazwano je „nanoprzewodami” (*microbial nanowires*). Geofimbrie tworzą się, gdy bakterie rosną na podłożu zawierającym nierozpuszczalne lub słabo rozpuszczalne związki trójwartościowego żelaza, np. tlenki żelaza a także przy innym niż Fe(III) akceptorze elektronów, np. fumaranie w warunkach suboptymalnych. Przy rozpuszczalnym cytrynianie żelazowym nie stwierdzono ich obecności. Przypomnijmy, że w większości środowisk dominują nierozpuszczalne tlenki Fe(III). Białko, z którego zbudowane są geofimbrie to produkt genu *pilA* [84]. PilA jest białkiem strukturalnym fimbrii typu IV. Fimbrie typu IV odpowiedzialne są za poruszanie się komórki niezależnie od wici, kolonizację i tworzenie biofilmów, zapewniają kontakt bakterii z podłożem. Najlepiej poznane są one u bakterii patogennych, np. z rodzaju *Neisseria* czy *Pseudomonas* [72]. W przypadku *G. sulfurreducens* białko PilA jest krótsze niż u innych bakterii, ale zawiera silnie konserwowaną N-terminalną domenę fimbrii typu IV. Mutant *pilA⁻* *Geobacter sulfurreducens* nie rósł na podłożu, gdzie jedynym akceptorem elektronów były nierozpuszczalne tlenki Fe(III). Natomiast, gdy do podłoża dodano inny akceptor elektronów, np. fumaran, to zarówno szczep dziki jak i mutant *pilA⁻* wykazywały normalny wzrost. Na zdjęciach spod mikroskopu elektronowego widać było, że kryształy tlenku żelaza otaczały geofimbrie w przypadku dzikiego szczepu a w mutancie *pilA⁻* tworzyły skupiska przy komórkach. To wskazuje, że funkcją fimbrii nie jest zapewnienie fizycznego kontaktu z kryształami związku żelaza, ale bezpośredni udział w przenoszeniu elektronów. Dokładny mechanizm tego zjawiska nie jest jeszcze poznany. Wprowadzenie plazmidu z dzikim genem *pilA* na plazmidzie do mutantu *pilA⁻* powodowało zniesienie efektów mutacji i powstanie funkcjonalnych geofimbrii. Uważa się, że geofimbrie odgrywają ważną rolę w środowiskach, gdzie przeważają nierozpuszczalne związki żelaza trójwartościowego [84]. Pokazano, że fimbrie *G. sulfurreducens* są konieczne zarówno do tworzenia biofilmu jak i przenoszenia elektronów na anodę w mikrobiologicznych ogniwach paliwowych [85, 86].

Procesy redukcji Fe(III) zostały też dość dobrze poznane dla *Shewanella oneidensis* szczep MR-1 (dawniej *S. putrefaciens* szczep MR-1) (rys. 2B), której genom również został zsekwencjonowany. Genom *S. oneidensis* zawiera 42 geny kodujące białka cytochromy typu *c*, 15 z nich związanych jest z błonami, w tym 5 z błoną zewnętrzną [31]. Podobnie jak u *G. sulfurreducens* białkowe przenośniki elektronów odbierają je ze zredukowanych chinonów w wewnętrznej błonie komórkowej. Pierwszym jest CymA, białko błony cytoplazmatycznej o masie cząst. 20,8 kDa, które jest cytochromem typu *c*, wiążącym cztery grupy

hemowe. Mutant *cymA*⁻ jest defektywny w redukcji związków Fe(III) i Mn(IV) a także azotanów i fumaranu [77]. Białko Cym A przenosi elektrony na białko MtrA o masie cząst. 36 kDa, które jest cytochromem typu *c* wiążącym 10 grup hemowych zlokalizowanym w peryplazmie. Mutant *mtrA*⁻ wykazuje brak zdolności redukcji Fe (III). Rolą białka MtrA jest przekazanie elektronów cytochromom typu *c* zewnętrznej błony komórkowej, białkom MtrC (OmcB) i OmcA. Być może łańcuszek białek przenoszących elektrony jest dłuższy, ale nie zostały one jeszcze poznane. Masa cząst. białka MtrC wynosi 75 kDa, a białka OmcA 83 kDa, oba wiążą 10 grup hemowych, są lipoproteinami i pełnią funkcję reduktaz Fe(III). Tworzą stabilny kompleks białkowy, heterotrimer zbudowany z dwóch cząsteczek białka OmcA i jednej cząsteczki MtrC. Pojedyncze mutanty *mtrC*⁻ i *omcA*⁻ zachowują częściową zdolność redukcji rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych związków Fe (III) [3, 92].

Podobnie jak u *G. sulfurreducens* w komórkach *S. oneidensis* inne białka niż tylko cytochromy typu *c* uczestniczą w procesie redukcji żelaza. W zewnętrznej błonie komórkowej znajduje się białko MtrB o masie cząst. 75 kDa, które posiada charakterystyczną sekwencję CXXC wiążącą metale. Prawdopodobną rolą białka MtrB jest wiązanie bakterii z jodem metalu w trakcie procesu redukcji związków Fe(III) i Mn(IV). Białko MtrB może też odpowiadać za właściwą lokalizację białek MtrC i OmcA w błonie zewnętrznej. Mutant *mtrB*⁻ jest niezdolny do redukcji Fe(III) i Mn(IV) [4, 93]. Innymi białkami są białka zewnętrznej błony komórkowej należące do ogólnego systemu sekrecji typu II: produkty genów *ferE* (*gspE*) oraz *gspD* odpowiedzialne za translokację białek MtrC i OmcA do i przez zewnętrzną błonę komórkową. Mutanty *ferE* i *gspD* są niezdolne do wzrostu na podłożu zawierającym związki Fe(III) i Mn(IV). Istnieje hipoteza, że ten system sekrecji bierze też udział w uwalnianiu na zewnątrz komórki substancji będących przenośnikami elektronów oraz związków chelatujących (patrz niżej) [19, 93]. Kolejnym białkiem wpływającym na proces redukcji Fe (III) jest białko z grupy poryn, Omp35, o masie cząst. 35 kDa występujące w zewnętrznej błonie komórkowej. Mutanty *omp35*⁻ wykazują zaburzenia w procesie redukcji fumaranu, azotanów i związków Fe(III) oraz Mn(IV), ale dokładny mechanizm tego zjawiska nie został poznany [71].

U *S. oneidensis* wykryto też fimbriopodobne, jak to określili autorzy, struktury pełniące funkcję nanodrutów, ale nie określono z jakich białek są one zbudowane. Stwierdzono, że tworzą się one w warunkach beztlenowych lub przy ograniczonej ilości tlenu w środowisku. Wykazano również, że przewodzenie elektronów przez nanodrutu u *S. oneidensis* wymaga funkcjonalnych cytochromów typu *c* MtrC i OmcA [28].

We wnętrzu komórek *S. oneidensis* wykryto granulę zawierającą tlenki Fe(II) i Fe(III) oraz tlenki Mn(IV). Uważa się, że bakterie te przechowują minerały zawierające Fe(III) lub Mn(IV) w komórce jako zapas ostatecznych akceptorów elektronów, które są wykorzystywane w warunkach beztlenowych przy braku tych związków w środowisku [26, 27].

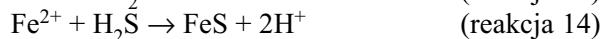
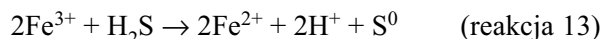
U gatunków z rodzaju *Shewanella* oraz u *Geothrix fermentans* opisano strategię umożliwiającą redukcję nierozpuszczalnych związków Fe(III), bez bezpośredniego kontaktu między komórką bakterii a akceptorem elektronów. Polega ona na uwalnianiu związków pełniących funkcję przenośnika elektronów (flawiny i chinony) oraz związków chelatujących (np. chinony). U rodzaju *Shewanella* zidentyfikowano przenośniki elektronów, którymi są flawiny, ryboflawina oraz mononukleotyd flavinowy (FMN) [14]. Uważa się, że przenośnikiem elektronów u *G. fermentans* jest rozpuszczalny w wodzie związek z grupy chinonów o masie cząst. mniejszej niż 12 kDa, chociaż nie został on zidentyfikowany. Produkcja przenośników elektronów jest wydatkiem energetycznym dla komórki i opłaca się, gdy bakterie żyją w populacjach o dużych gęstościach, przede wszystkim, gdy tworzą biofilm [79]. W badaniach nad mechanizmami redukcji nierozpuszczalnych związków Fe(III) u *S. oneidensis* stwierdzono, że substancje pełniące funkcje przenośników elektronów wydzielane są tylko do matriks biofilmu utworzonego przez te bakterie [47].

W obecności azotanów czy fumaranu jako akceptorów elektronów w podłożu bakterie redukujące żelazo (*G. metalireducens*, *G. sulfurreducens*, *G. fermentans* i *S. alga*) redukują je, wykorzystując jako źródło elektronów zredukowane kwasy humusowe a także zredukowane związki Fe(II). Zjawisko wykorzystania zredukowanych kwasów humusowych jako źródła elektronów do redukcji azotanów obserwuje się też dla bakterii denitryfikacyjnych [23, 68].

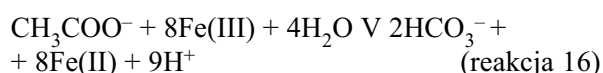
Redukcja Fe(III), która nie służy produkcji energii, u bakterii fermentujących jest wynikiem działania hydrogenaz. Dawcą elektronów do procesów redukcji jest wodór. Pokazano, że w warunkach beztlenowych *E. coli* może redukować rozpuszczalne związki technetu Tc(VII) do nierozpuszczalnych form ulegających wytrącaniu. Reakcja ta jest katalizowana przez hydrogenazę Hyc, która wchodzi w skład kompleksu FHL, odpowiedzialną za produkcję wodoru z mrówczanu w fermentacji kwasów mieszanych (fermentacji kwasu mrówkowego). Dawcą elektronów do redukcji Tc(VII) stanowi mrówczan lub wodór [52]. Okazuje się również, że hydrogenaza I *Clostridium pasteurianum* posiada aktywność reduktazy selenianu (IV) $\text{SeO}_3^{2-} \rightarrow \text{S}^0$ a także związków telluru (IV) TeO_3^{2-} . Elektrony pochodzą z utleniania cząsteczek wodoru, a pośrednikiem w ich przenoszeniu jest ferredoksyna [99]. Z kolei

u prokariotów redukujących siarczany rolę reduktazy metali pełni cytochrom c_3 [65].

Fe(III) może być też redukowane do Fe(II) abiotycznie, np. w reakcji z siarkowodorem produkowanym przez prokarioty redukujące siarczany zgodnie z reakcjami 13–15 [20]:



Podobną redukcję Fe(III) do Fe(II) obserwuje się w reakcji z innym metabolitem jakim jest kwas mrówkowy zgodnie z reakcją 16 [62]:



4. Rola ekologiczna prokariotów redukujących Fe(III) w środowisku

Redukcja Fe(III) uważana jest za jedną z pierwotnych, obok redukcji S^0 , a nawet wręcz najbardziej pierwotną formą oddychania mikroorganizmów. Uważa się, że pierwsze organizmy żywe to przedstawiciele FRM. Prawdopodobnie utlenianie wodoru połączone z redukcją Fe(III) było prametabolizmem, który dał początek ewolucji życia na Ziemi. Warunki środowiskowe wczesnego okresu początków życia na Ziemi, 3–5 miliardów lat temu, czyli wysoka temperatura, duża ilość wodoru oraz związków żelaza pochodzących z wnętrza Ziemi a występujących na jej powierzchni w formie utlenionej Fe(III), głównie na skutek intensywnego działania promieniowania UV, sprzyjała produkcji energii w wyniku utleniania wodoru i redukcji związków Fe(III). Istnieje wiele dowodów na to, że złoża magnetytu z okresu wczesnego prekambriu są pochodzenia mikrobiologicznego a dokładnie wynikiem aktywności żyjących ówczesznie hypertermofilnych FRM. Metodą badania stosunku zawartości dwóch izotopów węgla ^{12}C do ^{13}C stwierdzono, że wiek materii organicznej towarzyszącej prekambryjskim złożom magnetytu jest ściśle skorelowany z wiekiem utlenionej materii organicznej z tamtego okresu. Jak dotychczas nie został poznany żaden abiotyczny proces związany z jednoczesnym utlenianiem materii organicznej i redukcją Fe(III) do magnetytu [61, 62].

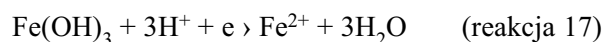
Uważa się, że analogiczne procesy mikrobiologicznej redukcji Fe(III) w połączeniu z utlenianiem wodoru jakie miały miejsce w okresie początków życia na Ziemi obecnie odbywają się w środowiskach, w których panują wysokie temperatury (80–110°C), np. w gorących źródłach. Gorące źródła obfitują w duże ilości Fe(II), które ulega utlenieniu do formy Fe(III)

w zetknięciu się z powietrzem. Wokół źródeł gromadzą się osady bogate w związki Fe(III). Z gorących źródeł wydobywają się też duże ilości wodoru. Wszystko to sprawia, że tworzą się idealne warunki do rozwoju termofilnych i hypertermofilnych beztlenowych mikroorganizmów redukujących Fe(III), dla których źródłem elektronów jest utlenianie wodoru. Oprócz wodoru współczesne termofilne i hypertermofilne FRM prawdopodobnie utleniają również związki organiczne jak octan, związki aromatyczne czy długołańcuchowe kwasy tłuszczowe. Dowodem na aktywność tych mikroorganizmów w gorących środowiskach jest wykrywany tam magnetyt w postaci ziarnistych struktur [39, 61, 62, 95]. Również meteoryty pochodzące z Marsa zawierają ziarniste struktury magnetytu. Istnieje przypuszczenie, że powstały one w wyniku aktywności FRM na Marsie [61]. Jak wiadomo badania nad magnetytem pozwoliły na odkrycie zasad magnetyzmu i elektryczności. Jako ciekawostkę warto tu dodać, że padło nawet stwierdzenie, że gdyby nie *G. metallireducens* (GS-15) i inne FRM nie mieliśmy dziś radia i telewizji [61].

Innymi minerałami powstałymi w wyniku aktywności bakterii redukujących Fe(III) i Mn(IV) są syderyt (FeCO_3), wiwianit [$\text{Fe}_3(\text{PO}_4) \times 8\text{H}_2\text{O}$] czy rodochrozyt (MnCO_3). FRM mogą też redukować związki uranu U(VI), w wyniku czego powstają złoża U(IV) w postaci uraninitu (UO_2) [61].

Analogiczne procesy mikrobiologicznej redukcji U(VI) do tych zachodzących w warunkach mezofilnych mają też miejsce w środowiskach termofilnych i hypertermofilnych. Pokazano, że hypertermofilny archeon *Pyrobaculum islandicum* jest zdolny do redukcji U(VI) do U(IV) w temperaturze 100°C, w wyniku czego powstaje nierozpuszczalny uraninit. Redukcja U(VI) wymaga obecności wodoru jako dawcy elektronów [40].

Z mikrobiologiczną redukcją Fe(III) w glebach związane jest zjawisko powstawania gleb glejowych. Polega ono na tym, że gleba staje się kleista i przyjmuje szarą lub zielonkawo-niebieską barwę. Jest to wynik powstania związku $\text{Fe}_3(\text{OH})_8$ zawierającego żelazo na stopniu utlenienia +2 i +3 w wyniku reakcji 17 i 18 [20]:



Innym zjawiskiem jest lateryzacja gleby w wilgotnych i gorących klimatach. W wyniku intensywnej aktywności prokariotów redukujących Fe(III) cząstki organiczne ulegają prawie całkowitej mineralizacji i jednocześnie tworzą się duże ilości tlenków Fe(II), które ulegają wytrącaniu i powodują jakby cementowanie cząsteczek gleby. W efekcie tworzy się twardy

Tabela IV

Wartości termodynamiczne redukcji nieorganicznych akceptorów elektronów w obecności materii organicznej [89]

Reakcja	Wartości Eh (V)	ΔG (kcal/mol)
Redukcja tlenu: $O_2 + 4H^+ + 4e^- - 2H_2O$	0,812	-29,9
Redukcja jonów azotanowych: $NO_3^- + 6H^+ + 6e^- - N_2 + 3H_2O$	0,747	-28,4
Redukcja jonów Mn^{+4} do Mn^{2+} : $MnO_2 + 4H^+ + 2e^- - Mn^{2+} + 2H_2O$	0,526	-23,3
Redukcja jonów Fe^{3+} do Fe^{2+} : $Fe(OH)_3 + 3H^+ + e^- - Fe^{2+} + 3H_2O$	-0,047	-10,1
Redukcja jonów SO_4^{2-} do H_2S : $SO_4^{2-} + 10H^+ + 8e^- - H_2S + 4H_2O$	-0,221	-5,9
Redukcja CO_2 do CH_4 : $CO_2 + 8H^+ + 8e^- - CH_4 + 2H_2O$	-0,244	-5,6

czerwony lub ciemnobrązowy lateryt. Jego składnikami są także tlenki glinu [20].

Redukcja Fe(III) oraz Mn(IV) przez bakterie wpływa na stan wód, głównie wód gruntowych. W wyniku reakcji redukcji niektóre nierozpuszczalne tlenki Fe(III) i Mn(IV) ulegają przekształceniu do rozpuszczalnych związków Fe(II) i Mn(II). W takiej formie dostają się do wód gruntowych, gdzie w wyniku zetknięcia się z powietrzem ulegają utlenieniu do nierozpuszczalnych tlenków Fe(III) i Mn(IV). Powoduje to złą jakość wody pitnej, jej nieodpowiedni smak i kolor, problemy typu zatykanie się rur wodno-kanalizacyjnych, itp. Ponadto wraz z rozpuszczalnymi zredukowanymi związkami Fe(II) i Mn(II) do wód gruntowych mogą przedostać się fosforany i śladowe ilości toksycznych metali, które zwykle adsorbują się na nierozpuszczalnych tlenkach Fe(III) i Mn(IV). W efekcie tych procesów następuje wzrost siły jonowej, wzrost stężenia kationów, także wzrost pH i skażenie wód metalami toksycznymi. To wszystko z kolei ma niekorzystny wpływ na wzrost roślin [61, 62].

Jak już wspomniano przy omawianiu mechanizmów redukcji Fe(III) końcowym akceptorem elektronów w oddychaniu FRM mogą być kwasy humusowe. Zredukowane kwasy humusowe w środowisku mogą stanowić źródło elektronów do innych procesów mikrobiologicznej redukcji np. azotanów, selenianów, arsenianów [61].

Utlenianie materii organicznej z jednoczesną redukcją Fe(III) lub Mn(IV) stanowi ważny element w obiegu węgla w beztlenowych osadach dennych słodkowodnych zbiorników wodnych, w osadach morskich, na terenach podmokłych, w podmokłych glebach, np. pola ryżowe, w płytkich zbiornikach wodnych zanieczyszczonych związkami organicznymi. Niezbędnym warunkiem jest dostępność związków Fe(III) oraz Mn(IV) i łatwość utleniania ich form zredukowanych [61]. Oddychanie przez redukcję Fe(III) oraz Mn(IV) odgrywa istotną rolę w środowiskach ubogich w azotany i siarczany, gdzie nie zachodzi metanogeneza [20].

Jednocześnie mikrobiologiczna redukcja siarczanów jak i procesy metanogenezy są zahamowane w środowiskach bogatych w Fe(III). Dodanie tlenków Fe(III) lub Mn(IV) do środowisk, gdzie intensywnie zachodzą procesy redukcji siarczanów oraz procesy metanogenezy, powoduje ich wyraźne spowolnienie. Nie wynika to z toksyczności związków żelaza, tylko ze zmiany składu mikroflory i zdominowania jej przez organizmy FRM. Podobny efekt obserwuje się po wprowadzeniu do podłoża wodoru i/lub octanów. Zjawisko to jest wynikiem współzawodnictwa między poszczególnymi grupami mikroorganizmów o substraty organiczne będące donorami elektronów. Decyduje o tym potencjał oksydoredukcyjny reakcji redukcji związków nieorganicznych i utleniania materii organicznej [89]. Jak widać z danych w Tabeli IV prokarioty redukujące Fe(III) i Mn(IV) żyją na pograniczu dodatniego i ujemnego potencjału oksydoredukcyjnego, uzyskując przy tym dwukrotnie więcej energii przy utlenieniu mola substratu organicznego niż prokarioty redukujące siarczany (PRS) oraz archeony metanogenne. FRM są więc bardziej istotne ekologicznie.

Ogromne znaczenie dla środowiska ma usuwanie zanieczyszczeń organicznych z terenów skażonych ropą naftową czy wysypisk śmieci przez FRM (rozd. 5.2).

Mikrobiologiczna transformacja form żelaza Fe(II) i Fe(III) pełni ważną rolę w obiegu żelaza w przyrodzie. Do procesów mikrobiologicznych wpływających na krążenie żelaza oprócz oddychania Fe(III) i innych form dysymilacyjnej redukcji żelaza należą oddziaływanie końcowych produktów metabolizmu bakterii na minerały zawierające żelazo oraz procesy mikrobiologicznego utleniania jonu żelazawego do jonu żelazowego [20]. FRM mają też istotne znaczenie w krążeniu manganu w przyrodzie. Uważa się, że ilość związków manganu w środowisku stanowi 10% ilości związków żelaza, ale za to Mn(IV) jest chętniej wykorzystywany jako akceptor elektronów niż Fe(III), co również spowodowane jest potencjałem redoks reakcji redukcji Fe(III) i Mn(IV) (Tabela IV) [61, 89].

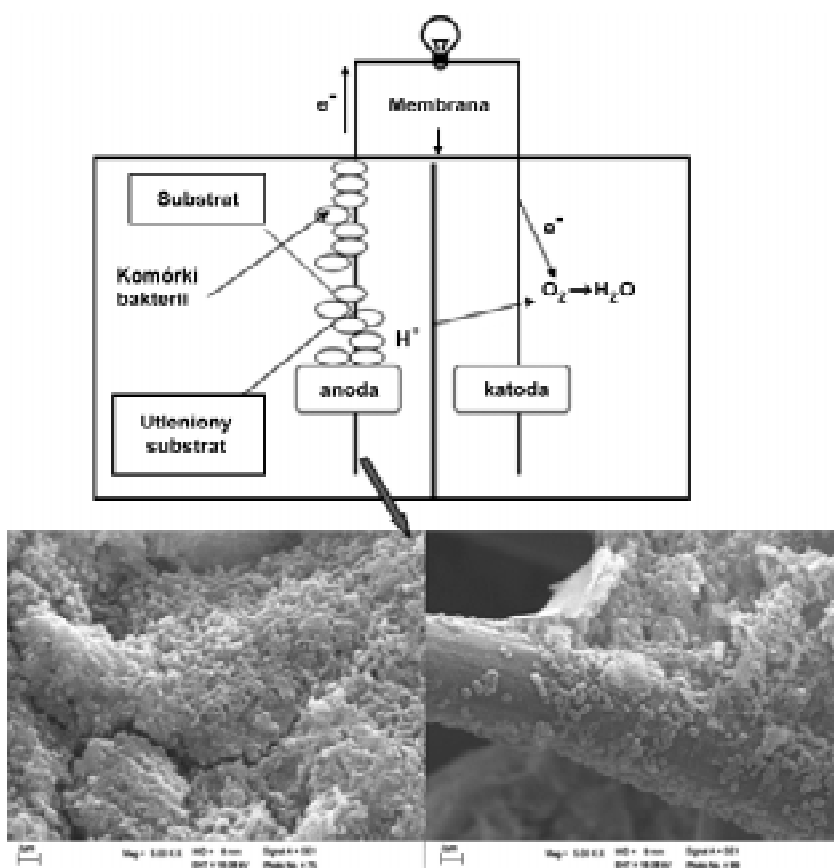
5. Znaczenie prokariotów redukujących Fe(III) w biotechnologii

Biotechnologię określa się jako integrację nauk przyrodniczych i inżynierskich w celu zastosowania czynników biologicznych (organizmów, komórek, enzymów) do pozyskania dóbr i usług. Wśród czynników biologicznych wykorzystywanych w biotechnologii dominującą rolę odgrywają bakterie. Prokarioty redukujące Fe(III) oraz inne metale stanowią bardzo ciekawą grupę drobnoustrojów z punktu widzenia biotechnologii. Wyizolowane i zidentyfikowane niedawno, w przyszłości mogą odegrać dużą rolę w procesach bioremediacji oraz znaleźć zastosowanie w mikrobiologicznych ogniwach paliwowych do produkcji prądu z jednoczesnym usuwaniem różnorodnych odpadów organicznych.

5.1. Mikrobiologiczne ogniwa paliwowe

Mikrobiologiczne ogniwa paliwowe (MFC, *microbial fuel cell*) to układy w których wykorzystuje się mikroorganizmy beztlenowe do produkcji energii elektrycznej. W wyniku oddychania komórkowego następuje przekształcenie energii chemicznej ukrytej w wiązaniach chemicznych w związkach organicznych

w energię elektryczną. MFC działają na zasadzie chemicznych ogniw paliwowych. W tych ostatnich produkcja energii elektrycznej następuje w wyniku elektrochemicznej reakcji spalania paliwa (wodoru lub prostego związku chemicznego bogatego w wodór, jak np. metanol czy lekkie węglowodory) doprowadzanego do anody w utleniaczu, np. tlenie z powietrza doprowadzanym do katody. Mikrobiologiczne ogniwo paliwowe składa się z przedziałów anodowego i katodowego oddzielonych od siebie membraną jonoselektywną przepuszczającą jony, zwykle protony. W przedziale anodowym mają miejsce reakcje utleniania. Protony przenoszone są z przedziału anodowego do przedziału katodowego przez membranę. Elektronów przenoszonych są na katodę przez zewnętrzny obwód elektryczny, w którym wydziela się energia elektryczna. W przedziale katodowym następują reakcje redukcji. Jak do tej pory zaproponowano kilka typów MFC [11, 55, 94]. Jedną z koncepcji zakłada, że w przedziale anodowym MFC hodowane są bakterie redukujące Fe(III), które tworzą biofilm na anodzie. W wyniku utleniania przez te bakterie związków organicznych w procesie oddychania powstają elektrony, które przenoszone są bezpośrednio na anodę MFC zamiast na naturalne akceptory znajdujące się w środowisku zewnątrzkomórkowym. W efekcie tego procesu produkowana jest energia elektryczna (rys. 3). Bakterie



Rys. 3. Schemat mikrobiologicznego ogniwa paliwowego z udziałem bakterii redukujących żelazo (III).

Na zdjęciach pokazano anodę MFC w postaci tkaniny węglowej porośniętej bakteriami z hodowli selekcyjnej bakterie redukujące żelazo (badania własne).

zdolne do produkcji energii w wyniku bezpośredniego transferu elektronów pochodzących z utleniania materii organicznej na anodę mikrobiologicznego ogniwa paliwowego zostały nazwane przez jednych autorów elektricigenami (*electricigens*) [57–60] a przez innych egzoelektrogenami (*exoelectrogens*) [55]. Do tej pory opisano działanie MFC z udziałem czystych kultur następujących gatunków bakterii: *Rhodospirillum rubrum* [15], *Geothrix fermentans* [8], *Desulfobulbus propionicus* [33], *Aeromonas hydrophila* [83], *Clostridium butyricum* szczep EG3 [81], *Geopsychrobacter electrophilus* [35], *Geobacter sulfurreducens* [6], *G. metallireducens*, *Desulfuromonas acetoxidans* [7], *S. putrefaciens* szczep MR-1 [43]. Najczęściej stosowanym materiałem, z którego wykonuje się anody w tego typu ogniwach jest grafit. W eksperymentach z *Geobacter sulfurreducens* pokazano, że bardzo dobrym materiałem anodowym może być złoto. To odkrycie jest ważne dla zastosowań MFC z udziałem bakterii redukujących żelazo na mikroskalę [88].

Buduje się również osadowe mikrobiologiczne ogniwa paliwowe (SMFC, *sediment MFC*). Anoda tego typu ogniwa umieszczana jest bezpośrednio w beztlenowych osadach dennych zbiorników wodnych a katoda w miejscach, do których dociera tlen. Osiągana gęstość mocy produkowanego prądu wynosi od kilku do kilkudziesięciu mW/m². Takie układy zwane też BUGs (*Benthic Unattended Generators*) mogą mieć zastosowanie jako systemy przeznaczone do zasilania urządzeń elektrycznych w odległych miejscach jak głębiny oceanu, gdzie wymiana baterii jest technicznie trudna i kosztowna. Osadowe MFC można też zbudować w warunkach laboratoryjnych umieszczając anodę ogniwa w próbkach osadów dennych. Analizy biofilmów pokrywających anody osadowych MFC pokazały, że ich dominującym składnikiem są bakterie z rodziny *Geobacteraceae*, rodzaj *Desulfuromonas* w przypadku słonych osadów morskich i rodzaj *Geobacter* w przypadku osadów słodkowodnych. W różnych warunkach znaczący udział mają też inne bakterie, np. z rodziny *Desulfobulbaceae* czy rodzaj *Geothrix* [7, 17, 33, 55, 56, 57, 97]. Osadowe mikrobiologiczne ogniwa paliwowe pozwalają na odkrywanie i izolację nowych elektrochemicznie aktywnych gatunków i szczepów bakterii [35, 81, 83].

Obecnie rozważa się trzy kierunki rozwoju i zastosowań MFC z udziałem elektricigenów. Pierwszy to usuwanie odpadów organicznych z jednoczesną produkcją energii elektrycznej. Substratami miałyby tu być ścieki pochodzące z gospodarstw domowych czy odpady z produkcji rolnej. Rozważa się stworzenie układów, odpowiedników systemów BUGs, które pokrywałyby częściowo zapotrzebowanie na energię, zwłaszcza na dużych obszarach rolnych oraz w krajach rozwijających się. Drugi kierunek to samowystarczalne

roboty pobierające substraty organiczne z otoczenia. Trzeci kierunek to zastosowania na wspomnianą już mikroskalę, głównie biosensory, czyli systemy, które wykorzystują reakcje biologiczne do wykrywania różnych związków. Obecność danego związku w przedziale anodowym uruchamia przepływ prądu, co rejestrowane jest metodami elektronicznymi [6, 44]. Te potencjalne zastosowania wymagają zwiększenia wydajności i optymalizacji MFC. Konieczne jest więc dogłębne poznanie mechanizmów transferu elektronów na anodę bioogniwa przez znane już mikroorganizmy zwane elektricigenami, ich fizjologii, ekologii oraz poszukiwanie nowych gatunków. Narzędzi ku temu dostarcza obecny burzliwy rozwój genomiki i różnorodnych metod biologii molekularnej. Szuka się sposobu zwiększenia aktywności oddechowej bakterii pokrywających anodę. Rozważana jest koncepcja modyfikacji genetycznych bakterii w kierunku konstrukcji mutantów np. nadprodukcujących białka, odpowiedzialnych za kontakt z powierzchnią anody [56–59].

Wydaje się, że nie było i nie istnieje żadna presja ewolucyjna w kierunku produkcji energii przez elektricigeny w naturalnych środowiskach. Nie wiadomo czy białka odpowiedzialne za przenoszenie elektronów na akceptory znajdujące się na zewnątrz komórki w naturalnym środowisku i w warunkach laboratoryjnych działają równie wydajnie, gdy bakteria rośnie na materiale, z którego zbudowana jest anoda MFC [59]. Stosując technikę mikroczipów DNA oraz hybrydyzację northern porównywano ekspresję genów *G. sulfurreducens* rosnących na podłożu z cytrynianem żelaza oraz na anodzie grafitowej w mikrobiologicznym ogniwie paliwowym. Stwierdzono zmienioną ekspresję 474 genów, gdy elektroda była jedynym akceptorem elektronów. 197 genów było transkrybowanych silniej a 277 słabiej. Największą różnicę, bo aż 19-krotny wzrost ekspresji, obserwowano dla genu kodującego białko OmcS, cytochrom typu *c* w zewnętrznej błonie komórkowej. Co więcej, mutant z delecją *omcS* nie był zdolny do produkcji energii. Podwyższonej ekspresji podlegały też geny *omcE* i *omcT*. Przypomnijmy, że białka OmcS i OmcE są odpowiedzialne za redukcję nierozpuszczalnego tlenku żelazowego. Żadnych różnic nie obserwowano natomiast dla transkryptów *omcB*, *ompB*, *ompJ* oraz piliny budującej nanodrut. Ponadto mutacje w genach *omcB* i *pilA* nie zmieniły produkcji energii elektrycznej. Cytochromy typu *c* zlokalizowane w zewnętrznej błonie komórkowej prawdopodobnie odgrywają istotną rolę w kontaktach komórki bakterii z elektrodą [36].

Wyniki innych badań sugerują, że również inne białka mogą być istotne w transferze elektronów na naturalne akceptory w środowisku niż na anodę mikrobiologicznego ogniwa paliwowego. Otrzymały mutanty *S. oneidensis* MR-1, które produkowały

prąd w MFC, ale nie były w stanie zredukować tlenku Fe(III) [10]. Z kolei inna bakteria z rodziny *Geobacteraceae*, *Pelobacter carbinolicus* jest zdolna do redukcji żelaza (III), ale w MFC z jej udziałem nie był produkowany prąd [87].

5.2. Bioremediacja

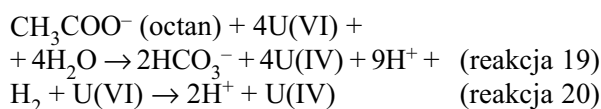
Terminem bioremediacja określa się technologię leczenia środowiska naturalnego ze skażeń, głównie powodowanych przez metale ciężkie, produkty ropy naftowej i pierwiastki radioaktywne, za pomocą żywych mikroorganizmów w celu ich rozkładu lub przeprowadzenia w formy mniej szkodliwe. Bioremediacja *in situ* włącza procesy degradacji, detoksyfikacji oraz immobilizacji zanieczyszczeń przez mikroorganizmy, które naturalnie żyją w strefach skażonych [60].

FRM mogą znaleźć zastosowanie w procesach bioremediacji na dwa sposoby. Pierwszy to utlenianie do dwutlenku węgla w warunkach beztlenowych związków organicznych, jak np. węglowodory aromatyczne w miejscach skażonych ropą naftową, połączone z redukcją żelaza. Tereny skażone przez ropę naftową obfitują w FRM, głównie rodzaj *Geobacter*. Istnieje pomysł zastosowania układów opartych na mikrobiologicznych ogniwach paliwowych do oczyszczania terenów skażonych ropopochodnymi związkami organicznymi. W wyniku utleniania tych związków przez bakterie z grupy FRM produkowana byłaby energia elektryczna [76]. Dodanie substancji chelatujących nierozpuszczalne tlenki Fe(III) do próbek osadów zanieczyszczonych ropą naftową powodowało przyspieszenie procesu utleniania ropopochodnych związków aromatycznych i procesów redukcji Fe(III). Może to być strategią stosowaną w bioremediacji terenów skażonych ropą naftową przy udziale bakterii z grupy FRM [70].

Drugi sposób zastosowania bakterii redukujących żelazo w procesach bioremediacji to wykorzystanie ich zdolności do redukcji innych metali niż Fe(III) czy Mn (IV), zwłaszcza tych, które są toksyczne i niebezpieczne dla człowieka i środowiska. Większość pierwiastków może występować na różnym stopniu utlenienia w różnych związkach chemicznych. Stopień utlenienia, na którym znajduje się dany pierwiastek wpływa na własności fizyko-chemiczne (np. rozpuszczalność w wodzie) związków, które tworzy. Szczególne znaczenie z punktu widzenia bioremediacji mają procesy (często są to procesy redukcji) przeprowadzania form toksycznych pierwiastków rozpuszczalnych w wodzie w formy nierozpuszczalne, które ulegają wytrącaniu i w ten sposób łatwo je usunąć z miejsc skażonych.

FRM mogą być skutecznym narzędziem do bioremediacji terenów skażonych uranem pochodzącym z odpadów radioaktywnych. Okres półtrwania uranu

w zależności od izotopu wynosi od 247 tysięcy do 4.5 miliardów lat. Związki uranu (VI) są rozpuszczalne w wodzie, stąd bardzo trudne do usunięcia ze środowiska. Natomiast uran (IV) tworzy nierozpuszczalne tlenki – uraninit, które łatwo ulegają wytrąceniu. Zatem mikrobiologiczna redukcja U (VI) do U (IV) może przyczynić się do usuwania uranu ze środowiska, zwłaszcza ze skażonych wód [2, 63, 64, 96]. Czyste kultury bakterii z grupy FRM (rodzaj *Geobacter*, *Shewanella*) redukują U(VI) do U(IV) i w ten sposób pozyskują energię niezbędną do procesów życiowych. Reakcje 19 i 20 opisują redukcję U(VI) do U(IV) przy udziale elektronów pochodzących z utleniania odpowiednio octanu i wodoru.



Do redukcji uranu (VI) zdolne też są prokarioty redukujące siarczany, jednak proces ten nie służy pozyskiwaniu energii. Dotychczas stwierdzono, że zdolność redukcji uranu (VI) do uranu (IV) posiadają bakterie z rodziny *Desulfobacteriaceae*, np. *Desulfobacterium desulfuricans*, a także nieliczni przedstawiciele z rodziny *Peptococcaceae*, np. rodzaj *Desulfotomaculum*. Filogenetyczna analiza populacji bakterii w próbkach pobranych z osadów skażonych uranem pokazuje, że dominują tam przedstawiciele rodzin *Geobacteraceae* i *Desulfobacteriaceae* [96].

W badaniach laboratoryjnych pokazano, że prostą metodą zwiększania procesów redukcji uranu (VI) w skażonych próbkach pobranych z naturalnych środowisk wodnych jest dodanie octanu jako dawcy elektronów. W takich warunkach następuje silny rozwój FRM, głównie z rodziny *Geobacteraceae*, które stanowią nawet do 40% całego zespołu mikroorganizmów (*microbial community*) [32]. Taką samą strategię (wzbogacanie w octan) zastosowano w badaniach *in situ* w zbiorniku wodnym zanieczyszczonym związkami uranu. Doświadczenie trwało 3 miesiące. Początkowo również obserwowano rozwój bakterii z rodziny *Geobacteraceae* i wzmożone wytrącanie uraninitu. Stwierdzono 70% obniżenie zawartości U(VI). Jednak po pewnym czasie dominującą grupą stały się bakterie redukujące siarczany, które utleniały octan. Spowodowane to było głównie wyczerpaniem się związków żelaza Fe(III). W efekcie nastąpił wzrost ilości uranu (VI) w badanym środowisku. Bakterie redukujące siarczany również redukowały uran (VI) do U(IV), ale znacznie mniej efektywnie w porównaniu do stanu, gdy w badanym środowisku dominowała rodzina *Geobacteraceae* [2]. W trzecim miesiącu opisanego eksperymentu pobrano próbkę osadu dennego i wyizolowano z niej nowy gatunek należący do rodzaju *Geobacter* – *Geobacter uranii-reducens* [91].

W obecności azotanów nie obserwuje się redukcji U(VI) do U(IV) zarówno w badaniach *in situ* jak i w warunkach laboratoryjnych w czystych hodowlach *G. metallireducens* oraz w próbkach pobranych z różnych miejsc skażonych uranem. We wszystkich tych układach redukowany jest jon azotanowy [21, 23, 90]. Istnieje kilka przyczyn tego zjawiska. Po pierwsze, reakcja redukcji jonu azotanowego jest bardziej korzystna termodynamicznie dla bakterii redukujących żelazo zdolnych też do redukcji NO_3^- niż reakcja redukcji uranu (VI). Po drugie, w naturalnych środowiskach redukcja metali jest energetycznie mniej korzystną formą oddychania beztlenowego w porównaniu z redukcją azotanów i konkurencję wygrywają bakterie denitryfikacyjne. Po trzecie, zredukowane formy U(IV) podobnie jak Fe(II) mogą być utleniane w obecności azotanów przez bakterie denitryfikacyjne, a nawet przez same FRM. Poza tym utlenianie zarówno U (IV) oraz żelaza Fe(II) może zachodzić abiotycznie [23].

Bardzo ważnym odkryciem z punktu widzenia zastosowania rodzaju *Geobacter* do bioremediacji terenów skażonych uranem (VI) było wykazanie, że dawcą elektronów do procesów redukcji prowadzonych przez te bakterie może być grafitowa elektroda [29]. Takie elektrody pokryte biofilmem bakteryjnym umieszczano w miejscach skażonych uranem (VI). Stanowiły one źródło elektronów do mikrobiologicznej reakcji redukcji U(VI) do U(IV). Takie rozwiązanie znacznie ułatwia usuwanie wytrąconego uraninitu ze środowiska, gdyż osadza się on na powierzchni elektrod [30].

Produktem rozszczepienia uranu jest technet ^{99}Tc . Występuje w dużych ilościach w miejscach testowania broni jądrowej oraz tam, gdzie składowane są odpady radioaktywne. Okres półtrwania technetu ^{99}Tc jest bardzo długi i wynosi 213 tysięcy lat. W środowisku Tc występuje na +7 stopniu utlenienia w postaci jonu TcO_4^- , który może być włączany w łańcuch pokarmowy jako analog siarczanów. Technet Tc(VII) może ulegać mikrobiologicznej redukcji, w wyniku czego powstaje nierozpuszczalny tlenek TcO_2 , w którym technet występuje na +4 stopniu utlenienia. W takiej postaci technet może być stosunkowo łatwo usunięty ze środowiska. Pokazano dwa mechanizmy redukcji Tc(VII) do Tc(IV) dla *G. sulfurreducens*. W pierwszym technet redukowany jest enzymatycznie przy jednoczesnym utlenianiu wodoru. Uważa się, że funkcją reduktazy Tc(VII) pełni hydrogenaza. Drugi mechanizm zakłada, że Tc(VII) może ulegać redukcji do Tc(IV) pośrednio w sposób abiotyczny przez zredukowane kwasy humusowe oraz magnetyt. Wytrącony TcO_2 osadza się na powierzchni kryształów magnetytu. Do redukcji technetu oprócz *G. sulfurreducens* zdolny jest także *G. metallireducens* i inny przedstawiciel grupy FRM, *S. putrefaciens* [51], a także *E. coli* (mechanizm redukcji opisany w rozdz. 3) [52, 53] czy *D. desulfuricans*.

W przypadku tej ostatniej, gdy donorem elektronów był wodór lub mrówczan, a akceptorem elektronów jon TcO_4^- zamiast siarczanu w warunkach beztlenowych, następowało utlenienie wodoru lub mrówczanu z jednoczesną redukcją TcO_4^- do nierozpuszczalnego siarczku Tc. Wynik ten wskazywał na enzymatyczną redukcję Tc(VII), którą przeprowadza peryplazmatyczna hydrogenaza. Oprócz tego jon TcO_4^- może być redukowany abiotycznie do siarczku technetu w reakcji z siarkowodorem, powstałym w wyniku aktywności bakterii redukujących siarczany [53, 54].

Członkowie rodzin *Geobacteraceae* oraz *Shewanellaceae* są modelowymi organizmami w badaniach nad zastosowaniem bakterii redukujących żelazo do bioremediacji terenów skażonych uranem czy metalami ciężkimi. Jak wiadomo bakterie z rodzin *Geobacteraceae* oraz *Shewanellaceae* są neutrofilami. Poddano zatem analizie konsorcja redukujące żelazo i uran, z podpowierzchniowych osadów z terenów skażonych uranem i azotanami, o niskim pH. Metodą analizy sekwencji genu kodującego 16S rRNA z DNA pochodzącego z pobranych próbek osadów wykazano znaczny udział fakultatywnych beztlenowców zdolnych do redukcji żelaza należących do rodzaju *Anaeromyxobacter* [82].

Wykazano również, że przedstawiciel rodziny *Geobacteraceae*, *G. metallireducens*, jest zdolny do pozyskania energii w wyniku utleniania materii organicznej w połączeniu z redukcją wanadu V(V) do V(IV). Wanad jest naturalnie występującym metalem skorupy ziemskiej w ilościach podobnych do cynku. Do środowiska dostaje się również, w ilościach powodujących jego skażenie, wraz z odpadami z przemysłu wydobywczego, metalurgicznego, farmaceutycznego oraz nowoczesnych technologii. Wanad może występować w środowisku na +3, +4 i +5 stopniu utlenienia. Najbardziej toksyczną formą jest V(V). Związki V(V) są rozpuszczalne w wodzie. Wanad na stopniu utlenienia +4 jest nierozpuszczalny w wodzie. Występuje w postaci kationów VO^{2+} , które ulegają adsorpcji na cząsteczkach kwasów humusowych i tworzą z nimi trwałe kompleksy. Zatem przekształcenie formy V(V) do V(IV) może stanowić metodę immobilizacji wanadu a następnie usuwanie go ze skażonych terenów [80].

Bakterie z rodzaju *Geobacter* oraz bakterie ekstremofilne jak *Pyrobaculum islandicum* mogą też redukować Hg(II) do Hg(0), Cr(VI) do Cr(III), czy Co(III) do Co(II) [49, 64].

Redukcja metali niezwiązana z pozyskiwaniem energii niezbędnej do życia jest dość szeroko rozpowszechniona wśród bakterii i odgrywa dużą rolę w krążeniu różnych metali w przyrodzie. Procesy te mają szczególnie istotne znaczenie dla środowiska z powodu przekształcania różnych toksycznych metali w formy mniej toksyczne, łatwe do usunięcia. Do

tych metali należą: selen [redukcja Se(VI), Se(IV), Se(0) przez różne gatunki *Clostridium*, *Citrobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*], chrom [redukcja Cr(VI) do Cr(III) przez różne gatunki *Pseudomonas*, *Bacillus* oraz *Aeromonas dechromatica*, *Achromobacter eurydice*, *Micrococcus roseus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Desulfovibrio desulfuricans*], rtęć [redukcja Hg(II) do Hg(0)], technet [redukcja Tc(VII) do Tc(IV) przez rodzaj *Moraxella* i *Planococcus*], wanad [redukcja V(V) do V(IV) przez gatunki *Pseudomonas*], molibden [redukcja Mo(V) do Mo(IV) przez *Pseudomonas guillermontii*, *Micrococcus* sp., *Acidithiobacillus ferrooxidans*, gatunki *Sulfolobus*], miedź [redukcja Cu(II) do Cu(I) przez *A. ferrooxidans*], palad [redukcja Pd(II) do Pd(0) przez *Desulfovibrio desulfuricans*] [64].

Zdolność mikroorganizmów do redukcji metali zarówno mającej na celu produkcję energii (*G. metallireducens*) jak i będącej procesem ubocznym (*E. coli*, *D. desulfuricans*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*) można też wykorzystać do otrzymywania cennych kruszców jakimi są złoto i srebro. W wyniku redukcji rozpuszczalnych form Au(III) lub Au(I) powstaje złoto metaliczne, a Ag(I) metaliczne srebro [18, 64].

6. Podsumowanie

Wyniki dotychczasowych badań nad FRM wskazują, że energia pozyskiwana do wzrostu i rozwoju z dysymilacyjnej redukcji Fe(III) oraz Mn(IV) i innych metali wpływa istotnie na cykle biogeochemiczne w środowiskach beztlenowych. FRM tworzą „superrodzinę”, do której należą różnorodne taksony z domeny *Bacteria* jak i domeny *Archaea*. FRM są także ważnym czynnikiem w procesie bioremediacji zarówno zanieczyszczeń organicznych oraz metalami ciężkimi i pierwiastkami promieniotwórczymi w beztlenowych warstwach środowisk mezofilnych jak i psychrofilnych, termofilnych i hypertermofilnych. FRM znalazły również zastosowanie w MFC jako czynnik produkujący energię elektryczną. FRM wykształciły szereg mechanizmów umożliwiających redukcję rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych związków Fe(III), Mn(IV) i innych metali.

7. Piśmiennictwo

1. Afkar E., Reguera G., Schiffer M., Lovley D.R.: A novel *Geobacteraceae*-specific outer membrane protein J (OmpJ) is essential for electron transport to Fe(III) and Mn(IV) oxides in *Geobacter sulfurreducens*. *BMC Microbiol.* **5**, 41 (2005)
2. Anderson R.T., Lovley D.R. i wsp.: Stimulating the in situ activity of *Geobacter* species to remove uranium from the groundwater of a uranium-contaminated aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 5884–5891 (2003) (wyżej cytowana praca jest dziełem 13 autorów)
3. Beliaev A.S., Saffarini D.A., McLaughlin J.M., Hunnicut D.: MtrC, an outer membrane decahaem c cytochrome required for metal reduction in *Shewanella putrefaciens* MR-1. *Mol. Microbiol.* **39**, 722–730 (2001)
4. Beliaev A.S., Saffarini D.A.: *Shewanella putrefaciens* mtrB encodes an outer membrane protein required for Fe(III) and Mn(IV) reduction. *J. Bacteriol.* **180**, 6292–6297 (1998)
5. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Edition, Springer, New York 2001/2005
6. Bond D.R., Lovley D.R.: Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 1548–1555 (2003)
7. Bond D.R., Holmes D.E., Tender L.M., Lovley D.R.: Electrode-reducing microorganisms that harvest energy from marine sediments. *Science*, **295**, 483–485 (2002)
8. Bond D.R., Lovley D.R.: Evidence for involvement of an electron shuttle in electricity generation by *Geothrix fermentans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 2186–2189 (2005)
9. Boone D.R., Liu Y., Zhao Z.J., Balkwill D.L., Drake G.R., Stevens T.O., Aldrich H.C.: *Bacillus infernus* sp. nov., an Fe(III)- and Mn(IV)-reducing anaerobe from the deep terrestrial subsurface. *Int. J. System. Bacteriol.* **45**, 441–448 (1995)
10. Bretschger O., K.H. Nealson i wsp.: Current production and metal oxide reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1 wild type and mutants. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 7003–7011 (2007) (wyżej cytowana praca jest dziełem 18 autorów)
11. Bullen R.A., Arnot T.C., Lakeman J.B., Walsh F.C.: Biofuel cells and their development. *Biosens. Bioelectron.* **21**, 2015–2045 (2006)
12. Butler J.E., Kaufmann F., Coppi M.V., Nunez C., Lovley D.R.: MacA, A diheme c-type cytochrome involved in Fe(III) reduction by *Geobacter sulfurreducens*. *J. Bacteriol.* **186**, 4042–4045 (2004)
13. Caccavo F., Coates J.D., Rossello-Mora R.A., Ludwig W., Schleifer K.H., Lovley D.R., McInerney M.J.: *Geovibrio ferrireducens*, a phylogenetically distinct dissimilatory Fe(III)-reducing bacterium. *Arch. Microbiol.* **165**, 370–376 (1996)
14. von Canstein H., Ogawa J., Shimizu S., Lloyd J.R.: Secretion of flavins by *Shewanella* species and their role in extracellular electron transfer. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 615–623 (2008)
15. Chaudhuri S.K., Lovley D.R.: Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells. *Nature Biotechnol.* **21**, 1229–1232 (2003)
16. Cummings D.E., Caccavo F., Spring S., Rosenzweig R.F.: *Ferribacterium limneticum*, gen. nov., sp. nov., an Fe(III)-reducing microorganism isolated from mining-impacted freshwater lake sediments. *Arch. Microbiol.* **171**, 183–188 (1999)
17. DeLong E.F., Chandler P.: Power from the deep. *Nature Biotechnol.* **20**, 788–789 (2002)
18. Deplanche K., Macaskie L.E.: Biorecovery of gold by *Escherichia coli* and *Desulfovibrio desulfuricans*. *Biotechnol. Bioeng.* **99**, 1055–1064 (2008)
19. DiChristina T.J., Moore C.M., Haller C.A.: Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction by *Shewanella putrefaciens* requires *ferA*, a homolog of the *pulE* (*gspE*) type II protein secretion gene. *J. Bacteriol.* **184**, 142–151 (2002)
20. Ehrlich H.L., Geomicrobiology of iron (w) Geomicrobiology, red. H.L. Ehrlich, Marcel Dekker, Inc. New York, Basel, 2002, s. 345.

21. Elias D.A., Krumholz L.R., Wong D., Long P.E., Sufilita J.M.: Characterization of microbial activities and U reduction in a shallow aquifer contaminated by uranium mill tailings. *Microb. Ecol.* **46**, 83–91 (2003)
22. Esteve-Nunez A., Sosnik J., Visconti P., Lovley D.R.: Fluorescent properties of *c*-type cytochromes reveal their potential role as an extracytoplasmic electron sink in *Geobacter sulfurreducens*. *Environ. Microbiol.* **10**, 497–505 (2008)
23. Finneran K.T., Housewright M.E., Lovley D.R.: Multiple influences of nitrate on uranium solubility during bioremediation of uranium-contaminated subsurface sediments. *Env. Microbiol.* **4**, 510–516 (2002)
24. Francis C.A., Obraztsova A.Y., Tebo B.M.: Dissimilatory metal reduction by the facultative anaerobe *Pantoea agglomerans* SP1. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 543–548 (2000)
25. Fredrickson J.K., Kostandarites H.M., Li S.W., Plymale A.E., Daly M.J.: Reduction of Fe(III), Cr(VI), U(VI), and Tc(VII) by *Deinococcus radiodurans* R1. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2006–2011 (2000)
26. Glasauer S., Langley S., Boyanov M., Lai B., Kemner K., Beveridge T.J.: Mixed-valence cytoplasmic iron granules are linked to anaerobic respiration. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 993–996 (2007)
27. Glasauer S., Langley S., Beveridge T.J.: Intracellular manganese granules formed by a subsurface bacterium. *Environ. Microbiol.* **6**, 1042–1048 (2004)
28. Gorby Y.A., Fredrickson J.K. i wsp.: Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 11358–11363 (2006) (wyżej cytowana praca jest dziełem 24 autorów)
29. Gregory K.B., Bond D.R., Lovley D.R.: Graphite electrodes as electron donors for anaerobic respiration. *Environ. Microbiol.* **6**, 596–604 (2004)
30. Gregory K.B., Lovley D.R.: Remediation and recovery of uranium from contaminated subsurface environments with electrodes. *Environ. Sci. Technol.* **39**, 8943–8947 (2005)
31. Heidelberg J.F. C.M. Fraser i wsp.: Genome sequence of the dissimilatory metal iron-reducing bacterium *Shewanella oneidensis*. *Nature Biotechnol.* **20**, 1118–1123 (2002) (wyżej cytowana praca jest dziełem 43 autorów)
32. Holmes D.E., Finneran K.T., O’Neil R.A., Lovley D.R.: Enrichment of *Geobacteraceae* associated with stimulation of dissimilatory metal reduction in uranium-contaminated aquifer sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 2300–2306 (2002)
33. Holmes D.E., Bond D.R., Lovley D.R.: Electron transfer by *Desulfobulbus propionicus* to Fe(III) and graphite electrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 1234–1237 (2004)
34. Holmes D.E., Bond D.R., O’Neil R.A., Reimers C.E., Tender L.R., Lovley D.R.: Microbial communities associated with electrodes harvesting electricity from a variety of aquatic sediments. *Microb. Ecol.* **48**, 178–190 (2004)
35. Holmes D.E., Nicoll J.S., Bond D.R., Lovley D.R.: Potential role of a novel psychrotolerant member of the family *Geobacteraceae*, *Geopsychrobacter electrophilus* gen. nov., sp. nov., in electricity production by a marine sediment fuel cell. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 6023–6030 (2004)
36. Holmes D.E., Chaudhuri S.K., Nevin K.P., Mehta T., Methe B.A., Liu A., Ward J.E., Woodard T.L., Webster J., Lovley D.R.: Microarray and genetic analysis of electron transfer to electrodes in *Geobacter sulfurreducens*. *Environ. Microbiol.* **8**, 1805–1815 (2006)
37. Kanso S., Greene A.C., Patel B.K.C.: *Bacillus subterraneus* sp. nov., an iron- and manganese-reducing bacterium from a deep subsurface Australian thermal aquifer. *Int. J. System. Evol. Microbiol.* **52**, 869–874 (2002)
38. Kashefi K., Holmes D.E., Baross J.A., Lovley D.R.: Thermophily in the *Geobacteraceae*: *Geothermobacter ehrlichii* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic member of the *Geobacteraceae* from the “Bag City” hydrothermal vent. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 2985–2993 (2003)
39. Kashefi K., Holmes D.E., Lovley D.R., Tor J.M.: Potential importance of dissimilatory Fe(III)-reducing microorganisms in hot sedimentary environments (w) The Subseafloor Biosphere at Mid-Ocean Ridges, Geophysical Monograph Series 144, 2004, str. 199.
40. Kashefi K., Moskowicz B.M., Lovley D.R.: Characterization of extracellular minerals produced during dissimilatory Fe(III) and U(VI) reduction at 100°C by *Pyrobaculum islandicum*. *Geobiology*, **6**, 147–154 (2008)
41. Kim B.H., Qian X., Leang C., Coppi M.V., Lovley D.R.: Two putative *c*-type multiheme cytochromes required for the expression of OmcB, an outer membrane protein essential for optimal Fe(III) reduction in *Geobacter sulfurreducens*. *J. Bacteriol.* **188**, 3138–3142 (2006)
42. Kim B.H., Leang C., Ding Y.-H. R., Glaven R.H., Coppi M.V., Lovley D.R.: OmcF, a putative *c*-type monoheme outer membrane cytochrome required for the expression of outer membrane cytochromes in *Geobacter sulfurreducens*. *J. Bacteriol.* **187**, 4505–4513 (2005)
43. Kim H.J., Park H.S., Hyun M.S., Chang I.S., Kim M., Kim B.H.: A mediator-less microbial fuel cell using a metal reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*. *Enzyme Microb. Technol.* **30**, 145–152 (2002)
44. Kim H.J., Hyun M.S., Chang I.S., Kim B.H.: A Microbial Fuel Cell Type Lactate Biosensor Using a Metal-Reducing Bacterium, *Shewanella putrefaciens*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **9**, 365–367 (1998)
45. Kusel K., Dorsch T., Acker G., Stackebrandt E.: Microbial reduction of Fe(III) in acidic sediments: isolation of *Acidiphilum cryptum* JF-5 capable of coupling the reduction of Fe(III) to the oxidation of glucose. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3633–3640 (1999)
46. Leang C., Coppi M.V., Lovley D.R.: OmcB, a *c*-type polyheme cytochrome, involved in Fe(III) reduction in *Geobacter sulfurreducens*. *J. Bacteriol.* **185**, 2096–2103 (2003)
47. Lies D.P., Hernandez M.E., Kappler A., Mielke R.E., Gralnick J.A., Newman D.K.: *Shewanella oneidensis* MR-1 uses overlapping pathways for iron reduction at a distance and by direct contact under conditions relevant for biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 4414–4426 (2005)
48. Lin W.C., Coppi M.V., Lovley D.R.: *Geobacter sulfurreducens* can grow with oxygen as a terminal electron acceptor. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 2525–2528 (2004)
49. Lloyd J.R., Lovley D.R.: Microbial detoxification of metals and radionuclides. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**, 248–253 (2001)
50. Lloyd J.R., Leang C., Hodges-Myerson A.L., Coppi M.V., Cuifo S., Methe B., Sandler S.J., Lovley D.R.: Biochemical and genetic characterization of PpCA, a periplasmic *c*-type cytochrome in *Geobacter sulfurreducens*. *Biochem. J.* **369**, 153–161 (2003)
51. Lloyd J.R., Sole V.A., van Praagh C.V.G., Lovley D.R.: Direct and Fe(II)-mediated reduction of technetium by Fe(III)-reducing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 3743–3749 (2000)

52. Lloyd J.R., Cole J.A., Macaskie L.E.: Reduction and removal of heptavalent technetium from solution by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**, 2014–2021 (1997)
53. Lloyd J.R., Thomas G.H., Finlay J.A., Cole J.A., Macaskie L.E.: Microbial reduction of technetium by *Escherichia coli* and *Desulfovibrio desulfuricans*: Enhancement via the use of high-activity strains and effect of process parameters. *Bio-technol. Bioeng.* **66**, 122–130 (1999)
54. Lloyd J.R., Nolting H.-F., Sole V.A., Bosecker K., Macaskie L.E.: Technetium reduction and precipitation by sulfate-reducing bacteria. *Geomicrobiol. J.* **15**, 45–58 (1998)
55. Logan B.E.: Microbial fuel cells, red. B.E. Logan, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, USA, 2008.
56. Lovley D.R.: Microbial energizers: fuel cells that keep on going. *Microbe*, **1**, 323–329 (2006)
57. Lovley D.R.: Bug juice: harvesting electricity with microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 497–508 (2006)
58. Lovley D.R.: Microbial fuel cells: novel microbial physiologies and engineering approaches. *Curr Opin. Biotechnol.* **17**, 327–332 (2006)
59. Lovley D.R.: Taming electricigens. *The Scientist*, July 2006, 46
60. Lovley D.R.: Anaerobes to the rescue. *Science*, **293**, 1444–1446 (2001)
61. Lovley D.R., Fe(III) and Mn(IV) reduction (w) Environmental Microbe-Metal Interactions, red. D.R. Lovley. ASM Press Washington, D.C., 2000, s. 3.
62. Lovley D.R.: Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Microbiol. Rev.* **55**, 259–287 (1991)
63. Lovley D.R.: Dissimilatory reduction of iron and uranium (w) Trends in Microbial Ecology, red. R. Guerrero i C. Pedros-Alio. Spanish Society for Microbiology Barcelona, 1993, s. 71.
64. Lovley D.R.: Dissimilatory metal reduction. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**, 263–290 (1993)
65. Lovley D.R., Philips E.P.: Reduction of chromate by *Desulfovibrio vulgaris* and its c_3 cytochrome. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 726–728 (1994)
66. Lovley D.R., Philips E.J.P., Lonergan D.J., Widman P.K.: Fe(III) and S^0 reduction by *Pelobacter carbinolicus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 2132–2138 (1995)
67. Lovley D.R., Holmes D.E., Nevin K.P.: Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Adv. Microbiol. Physiol.* **49**, 219–286 (2004)
68. Lovley D.R., Fraga J.L., Coates J.D., Blunt-Harris E.L.: Humics as an electron donor for anaerobic respiration. *Environ. Microbiol.* **1**, 89–98 (1999)
69. Lovley D.R., Fraga J.L., Blunt-Harris E.L., Hayes L.A., Phillips E.J., Coates D.J.: Humic substances as a mediator for microbially catalyzed metal reduction. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* **26**, 152–157 (1998)
70. Lovley D.R., Woodward J.C., Chappelle F.H.: Rapid anaerobic benzene oxidation with a variety of chelated Fe(III) forms. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 288–291 (1996)
71. Maier T.M., Myers C.R.: The outer membrane protein Omp35 affects the reduction of Fe(III), nitrate, and fumarate by *Shewanella oneidensis* MR-1. *BMC Microbiol.* **4**, 23 (2004)
72. Mattick J.S.: Type IV pili and twitching motility. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**, 289–314 (2002)
73. Mehta T., Childers S.E., Glaven R., Lovley D.R., Mester T.: A putative multicopper protein secreted by an atypical type II secretion system involved in the reduction of insoluble electron acceptors in *Geobacter sulfurreducens*. *Microbiology*, **152**, 2257–2264 (2006)
74. Mehta T., Coppi M.V., Childers S.E., Lovley D.R.: Outer membrane c -type cytochromes required for Fe(III) and Mn(IV) oxide reduction in *Geobacter sulfurreducens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 8634–8641 (2005)
75. Methe B.A., C.M. Fraser I wsp.: Genom of *Geobacter sulfurreducens*: metal reduction in subsurface environments. *Science*, **302**, 1967–1969 (2003) (wyżej cytowana praca jest dziełem 34 autorów)
76. Morris J.M., Jin S.: Feasibility of using microbial fuel cell technology for bioremediation of hydrocarbons in groundwater. *J. Env. Sci. Health*, **43**, 18–23 (2008)
77. Myers C.R., Myers J.: Cloning and sequence of *cymA*, a gene encoding a tetraheme cytochrome c required for reduction of iron (III), fumarate and nitrate by *Shewanella putrefaciens* MR-1. *J. Bacteriol.* **179**, 1143–1152 (1997)
78. Nevin K.P., Lovley D.R.: Mechanisms for accessing insoluble Fe(III) oxide during dissimilatory Fe(III) reduction by *Geothrix fermentans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 2294–2299 (2002)
79. Nevin K.P., Lovley D.R.: Mechanisms for Fe(III) oxide reduction in sedimentary environments. *Geomicrobiol. J.* **19**, 141–159 (2002)
80. Ortiz-Bernard I., Anderson R.T., Vrionis H.A., Lovley D.R.: Vanadium respiration by *Geobacter metallireducens*: novel strategy for in situ removal of vanadium from groundwater. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 3091–3095 (2004)
81. Park H.S., Kim B.H., Kim H.S., Kim H.J., Kim G.T., Kim M., Ch I.S., Park Y.K., Chang H.I.: A novel electrochemically active and Fe(III)-reducing bacterium phylogenetically related to *Clostridium butyricum* isolated from a microbial fuel cell. *Anaerobe*, **7**, 297–306 (2001)
82. Petrie L., North N.N., Dollhopf S.L., Balkwill D.L., Kostka J.E.: Enumeration and characterization of iron(III)-reducing microbial communities from acidic subsurface sediments contaminated with uranium. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 7467–7479 (2003)
83. Pham C.A., Jung S.J., Phung N.T., Lee J., Chang I.S., Kim B.H., Yi H., Chun J.: A novel electrochemically active and Fe(III)-reducing bacterium phylogenetically related to *Aeromonas hydrophila*, isolated from a microbial fuel cell. *FEMS Microbiol. Lett.* **223**, 129–134 (2003)
84. Reguera G., McCarthy K.D., Mehta T., Nicoll J.S., Tuominen M.T., Lovley D.R.: Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature*, **435**, 1098–1101 (2005)
85. Reguera G., Nevin K.P., Nicoll J.S., Covalla S.F., Woodard T.L., Lovley D.R.: Biofilm and nanowire production leads to increased current in *Geobacter sulfurreducens* fuel cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 7345–7348 (2006)
86. Reguera G., Pollina R.B., Nicoll J.S., Lovley D.R.: Possible nonconductive role of *Geobacter sulfurreducens* pilus nanowires in biofilm formation. *J. Bacteriol.* **189**, 2125–2127 (2007)
87. Richter H., Lanthier M., Nevin K.P., Lovley D.R.: Lack of electricity production by *Pelobacter carbinolicus* indicates that the capacity for Fe(III) oxide reduction does not necessarily confer electron transfer ability to fuel cell anodes. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 5347–5353 (2007)
88. Richter H., McCarthy K., Nevin K.P., Johnson J.P., Rotello V.M., Lovley D.R.: Electricity generation by *Geobacter sulfurreducens* attached to gold electrodes. *Langmuir*, **24**, 4376–4379 (2008)
89. Schlesinger W.H.: Biogeochemistry: an analysis of global change. Academic Press, San Diego, 1997
90. Senko J.M., Istok J.D., Suflita J.M., Krumholz L.R.: In-situ evidence for uranium immobilization and remobilization. *Environ. Sci. Technol.* **36**, 1491–1496 (2002)

91. Shelobolina E.S., Vrionis H.A., Findlay R.H., Lovley D.R.: *Geobacter uraniireducens* sp. nov., isolated from subsurface sediment undergoing uranium bioremediation. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**, 1075–1078 (2008)
92. Shi L., T.C. Squier i wsp.: Isolation of a high-affinity functional protein complex between OmcA and MtrC: two outer membrane decaheme *c*-type cytochromes of *S. oneidensis* MR-1. *J. Bacteriol.* **188**, 4705–4714 (2006) (wyżej cytowana praca jest dziełem 17 autorów)
93. Shi L., Squier T.C., Zachara J.M., Fredrickson J.K.: Respiration of metal (hydr)oxides by *Shewanella* and *Geobacter*: a key role for multiheme *c*-type cytochromes. *Mol. Microbiol.* **65**, 12–20 (2007)
94. Sikora A., Sikora R.: Mikrobiologiczne ogniwa paliwowe (Microbial fuel cells). *Biotechnologia Monografie*, **2(2)**, 68–77 (2005)
95. Slobodkin A.I.: Thermophilic microbial metal reduction. *Microbiology*, **74**, 501–514 (2005)
96. Suzuki Y., Kelly S.D., Kemner K.M., Banfield J.F.: Direct microbial reduction and subsequent preservation of uranium in natural near-surface sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 1790–1797 (2005)
97. Tender L.M., Reimers C.E., Stecher H.A., Holmes D.E., Bond D.R., Lowy D.A., Pilobello K., Fertig S.J., Lovley D.R.: Harnessing microbially generated power on the seafloor. *Nature Biotechnol.* **20**, 821–825 (2002)
98. Vandieken V., Muâmann M., Niemann H., Jorgensen B.B.: *Desulfuromonas svalbardensis* sp. Nov. And *Desulfuromusa ferrireducens* sp. Nov., psychrophilic, Fe(III)-reducing bacteria isolated from Arctic sediments, Svalbard. *Int. J. System. Evol. Microbiol.* **56**, 1133–1139 (2006)
99. Yanke L.J., Bryant R.D., Laishley E.J.: Hydrogenase I of *Clostridium pasteurianum* functions as a novel selenite reductase. *Anaerobe*, **1**, 61–67 (1995)
100. Ye Q., Roh Y., Carroll S.L., Blair B., Zhou J., Zhang C.L., Fields M.W.: Alkaline anaerobic respiration: isolation and characterization of a novel alkaliphilic and metal-reducing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 5595–5602 (2004)

Praca powstała w ramach grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr 2P04B00429