

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

---

ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ  
Кафедра общей физики

## Флуоресценция кислородных и аноксигенных фототрофов отделяющихся водоемов Белого моря

Дипломная работа  
студентки 605 группы  
Харчевой Анастасии Витальевны

Работа допущена к защите «\_\_» декабря 2014 г.

Заведующий кафедрой общей физики  
д.ф.-м.н., профессор А.М. Салецкий

---

Научный руководитель  
к.ф.-м.н., ст. преподаватель С.В. Пацаева

---

Москва 2014

## Содержание

Введение .....	4
1. Криптофитовые водоросли (обзор литературы).....	6
1.1. Места обитания криптофитовых водорослей .....	6
1.2. Фотосинтетический аппарат криптофитовых водорослей и пигментный состав .....	7
1.3. Спектры поглощения .....	9
1.4. Спектры флуоресценции .....	10
2. Зеленые серные бактерии (обзор литературы).....	11
2.1. Места обитания зеленых серных бактерий .....	11
2.2. Фотосинтетический аппарат зеленых серных бактерий .....	12
2.3. Пигментный состав .....	14
2.4. Спектры поглощения экстрактов .....	15
2.5. Спектры флуоресценции .....	16
3. Экспериментальные методы .....	18
3.1. Аппаратура для получения вертикальных профилей характеристик воды .....	18
3.2. Получение культур зеленых серных бактерий .....	19
3.3. Приготовление экстрактов зеленых серных бактерий и криптофитовых водорослей .....	20
3.4. Спектральные приборы и методы .....	20
4. Экспериментальные результаты и их обсуждение .....	22
4.1. Отделяющиеся водоемы Кандалакшского залива Белого моря и типичные вертикальные профили характеристик воды .....	22
4.2. Исследование криптофитовых водорослей методом абсорбционной спектроскопии .....	28
4.3. Исследование криптофитовых водорослей флуоресцентным методом ...	29
4.4. Исследование зеленых серных бактерий методом абсорбционной спектроскопии .....	31
4.4.1. Спектры оптической плотности проб воды с зелеными серными бактериями .....	31
4.4.2. Спектры оптической плотности культур зеленых серных бактерий .....	32

4.4.3. Спектры оптической плотности экстрактов зеленых серных бактерий .....	34
4.5. Исследование зеленых серных бактерий флуоресцентным методом .....	36
4.5.1. Спектры флуоресценции проб воды с зелеными серными бактериями .....	36
4.5.2. Спектры флуоресценции культур зеленых серных бактерий .....	37
4.5.3. Спектры флуоресценции экстрактов зеленых серных бактерий .....	39
4.6. Распределение фотосинтетических пигментов по глубине в отделяющихся водоемах .....	42
5. Основные результаты и выводы .....	44
Список литературы.....	46

## Введение

Актуальность исследования природы арктического региона определяется его ролью в формировании глобального климата и поддержании устойчивости биосферы, а также наличием огромных запасов углеводородов. Для целей мониторинга природных водных объектов в настоящее время все более широкое применение находят разнообразные физические методы, включая методы оптической спектроскопии. Однако прибрежные водоемы, частично отделенные от моря, обладают целым рядом особенностей, из-за которых к ним применимы не все современные методы. Из-за малых размеров водоемов невозможно использовать спутниковое дистанционное зондирование, а их изоляция от основной акватории не позволяет использовать стационарное судовое оборудование. Глубина водоемов обычно небольшая, резкие градиенты наблюдаются уже на расстоянии нескольких сантиметров, что накладывает существенные ограничения на применение погружаемых аппаратов. Для изучения водоемов, образовавшихся в результате изоляции от моря, необходимо разрабатывать новые подходы и подбирать новые методы.

Берега Белого моря в районе Кандалакшского залива поднимаются со скоростью около 4 мм в год, в результате чего некоторые морские лагуны постепенно превращаются в озера. Экологическая система изолированных соленых водоемов со временем претерпевает катастрофические изменения – из-за ослабления амплитуды приливно-отливных колебаний или их прекращения, а также из-за уменьшения водообмена возникают застойные явления, поверхностный слой воды постепенно опресняется, а в придонной воде возникает дефицит кислорода и сероводородное заражение. Исходные морские фауна и флора постепенно деградируют и замещаются на солоноватоводные или пресноводные. Такие отделяющиеся водоемы интересны для изучения своей многослойностью: слои воды различаются не только температурой, соленостью и другими физико-химическими характеристиками, но и микроорганизмами, обитающими в них, содержанием растворенного органического вещества и оптическими свойствами.

Целью данной работы являлось исследование и разделение вкладов оксигенных и аноксигенных фотосинтезирующих микроорганизмов из отделяющихся водоёмов Кандалакшского залива Белого моря с использованием комплекса спектрально-оптических и физико-химических методов.

В работе ставились следующие задачи: отбор проб с различной глубины из разных водоемов, измерение физико-химических параметров воды и спектрально-оптические измерения, интерпретация полученных спектральных полос фотосинтетических пигментов микроорганизмов оксигенной и аноксигенной зоны водоемов. В работе регистрировали спектры поглощения и флуоресценции образцов воды, отобранных в экспедициях по отделяющимся водоёмам Кандалакшского залива Белого моря, содержащих зеленые серные бактерии и криптофитовые водоросли, культур зеленых серных бактерий, выделенных из проб воды, pripravивали их ацетон-метанольные экстракты, выделяли и идентифицировали основные полосы в спектрах, на основании значений оптической плотности и интенсивности флуоресценции определяли распределение пигментов и микроорганизмов по глубине, и эти данные сопоставляли с физико-химическими характеристиками воды (температурой, соленостью, рН, содержанием растворенного кислорода и освещенностью).

# 1. Криптофитовые водоросли (обзор литературы)

Фототрофные микроорганизмы – такие микроорганизмы, которые способны использовать энергию солнечного излучения на биосинтетические процессы. Они делятся на две физиолого-биохимические группы: кислородные фототрофы и анакислородные фототрофы [1]. В процессе кислородного фотосинтеза образуется кислород с использованием воды в качестве донора электронов; анакислородные организмы в процессе фотосинтеза используют иные доноры: водород, сульфид, арсениды и др.

Криптофитовые водоросли (Cryptophyta) – одноклеточные двужгутиковые эукариоты со специфическим составом пигментов, обладающие способностью к кислородному фотосинтезу. Большинство криптофитовых обитают в хорошо прогреваемых слоях воды, чаще в прибрежной зоне. Они преобладают в прудах, лужах, в очистных сооружениях различных предприятий; нередко встречаются в болотах, каналах, озерах, водохранилищах; цветение криптофитовых водорослей может происходить осенью и зимой. Криптофитовые водоросли часто используют в качестве кормового объекта при выращивании личинок и моллюсков (устриц, гребешков, мидий и др.) [2].

Некоторые виды из этой группы способны при определенных условиях приостанавливать фотосинтез и переходить на гетеротрофное питание готовыми органическими веществами в виде растворенной органики или оформленных частиц, а также бактериями. Способность организмов осуществлять как автотрофный, так и гетеротрофный тип питания, называется миксотрофией. Эта особенность позволяет миксотрофным организмам существовать в условиях с переменной или слабой освещенностью, например, в нижней части фотического слоя водоемов, при избытке органики. Благодаря этому криптофитовые водоросли нередко участвуют в формировании глубинного максимума хлорофилла в морях и глубоких озерах [3].

## 1.1. Места обитания криптофитовых водорослей

Большинство криптофитовых обитают в широком диапазоне температур, но некоторые представители, например из рода *Rhodomonas*, являются холодолюбивыми, они способны развиваться на поверхности льда и снега. Криптофитовые водоросли в могут массово развиваться в озёрах в местах с резким градиентом содержания кислорода. Еще одна особенность криптофитовых водорослей – высокая

чувствительность к коротковолновому свету, которая позволяет им обитать на глубинах с меньшей освещенностью, чем у поверхности. Зимой из-за низкой интенсивности света под снежным и ледяным покровом криптофитовые водоросли сосредотачиваются вблизи поверхности водоема [4]. Весной после таяния снега и в результате резкого увеличения света они подвержены значительному световому стрессу, в результате чего происходит перемещение организмов в более глубокие воды. Известны суточные вертикальные миграции слоев с криптофитовыми водорослями с амплитудой до 5 метров [5].

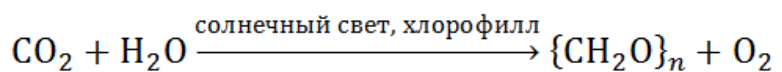
Пресноводные представители криптофитовых водорослей обычно обитают в водоемах со стоячей водой (отстойники, пруды), иногда встречаются в водохранилищах и озерах.

Благодаря составу пигментов и способности к миксотрофии они хорошо приспособлены к обитанию в стоячих водоемах с прозрачной водой и устойчивым градиентом плотности. Условия, подходящие для их массового развития, складываются в некоторых тропических озерах, в полярных областях, в горных районах, а также в мелких водоемах, которые принимают обогащенные органикой стоки на сельскохозяйственных территориях. В морских водоемах эти организмы распространены широко, однако массовое их развитие наблюдается крайне редко. В Белом море цветение криптонад бывает в водоемах, отделяющихся от моря: во льду и над границей сероводородной водной массы [6].

Криптофитовые водоросли играют значительную роль в водоёмах в круговороте кислорода, углерода, азота и фосфора, в синтезе органического вещества из минеральных веществ.

## **1.2. Фотосинтетический аппарат криптофитовых водорослей и пигментный состав**

Фотосинтез – это биологический процесс, при помощи которого высшие растения, водоросли и некоторые виды бактерий способны преобразовывать энергию солнечного света в химическую форму, доступную для биосинтеза клеточных компонентов [7].  
Общее уравнение фотосинтеза:



Основными стадиями процесса фотосинтеза являются световая и темновая [8]. В световой стадии происходит поглощение света пигментами, миграция энергии

электронного возбуждения к реакционным центрам (РЦ), перенос электронов по цепи электронного транспорта и сопряжённые с ним процессы, которые приводят к образованию первичных стабильных продуктов: НАДФ-Н и АТФ. Темновая стадия – это совокупность биохимических реакций, в результате которых происходит усвоение организмом атмосферного углекислого газа ( $\text{CO}_2$ ) и образование углеводов, которое протекает с использованием НАДФ-Н и АТФ. Несмотря на разнообразие в организации фотосинтетического аппарата различных видов фотосинтезирующих организмов, существует универсальность в структуре первичных этапов трансформации световой энергии в химическую [9]. У эукариот стадии фотосинтеза (все световые и часть темновых) протекают в субклеточных частицах – хлоропластах. Форма и размер хлоропластов зависят от вида водорослей.

Основную роль в процессах фотосинтеза играют системы пигментов, являющиеся первичными акцепторами энергии, осуществляющими её дальнейшее преобразование [7]. В фотосинтезирующих клетках активные пигменты расположены внутри тилакоидов в виде функционально-организованных единиц [8]. Криптофитовые – группа водорослей, содержащая в пигментном составе фикобилипротеины, хлорофиллы *a* и *c*, а также каротиноиды [10]. Свет может поглощаться либо непосредственно молекулами хлорофилла, либо вспомогательными пигментами, которые передают 80-100% поглощённой ими световой энергии хлорофиллу. В числе вспомогательных пигментов водорослей – каротиноиды и фикобилипротеины. У зеленых водорослей каротиноиды передают хлорофиллу дополнительную энергию с эффективностью ~50%). Также установлено участие каротиноидов в защите клеток от фотоокисления.

Фикобилипротеины – вспомогательные фотосинтетические пигменты, содержащиеся в некоторых группах водорослей. Различают более 10 типов фикобилипротеинов: фикоэритробилины, фикоцианобилины, аллофикоцианобилины, фикоэритроцианобилины и др. Их содержание в водорослях относительно количества хлорофилла тем больше, чем глубже обитают водоросли, [11]. Фикобилисомы – белковые комплексы, образованные при агрегации фикобилипротеинов друг с другом, у криптофитовых водорослей они являются основными светособирающими комплексами. До 90% поглощенной энергии они передают на хлорофилл.



### 1.3. Спектры поглощения

Для того чтобы свет мог быть использован в процессе фотосинтеза, необходимо его поглощение растительными пигментами. Пигменты – это окрашенные вещества, которые поглощают свет определенного спектрального диапазона. Часть солнечного спектра, не поглощенная пигментами, отражается и обуславливает видимую глазом окраску растительных тканей. Так, зеленый пигмент хлорофилл поглощает красные и синие лучи, тогда как зеленые лучи в основном отражаются поверхностью листа. Вещества, поглощающие весь видимый участок спектра, кажутся нам черными.

Хлорофилл (Хл) – важнейший пигмент фотосинтеза. В настоящее время известно несколько вариантов молекул Хл, отличающихся по химическому строению, окраске, распространению среди живых организмов. Все высшие растения содержат Хл *a* (зеленый с синеватым оттенком) и Хл *b* (зеленый с желтоватым оттенком). У некоторых водорослей в очень малых количествах обнаружены и другие формы: Хл *c*, Хл *d*. В растворе Хл *a* имеет полосы поглощения с максимумами 429 и 660 нм [12].

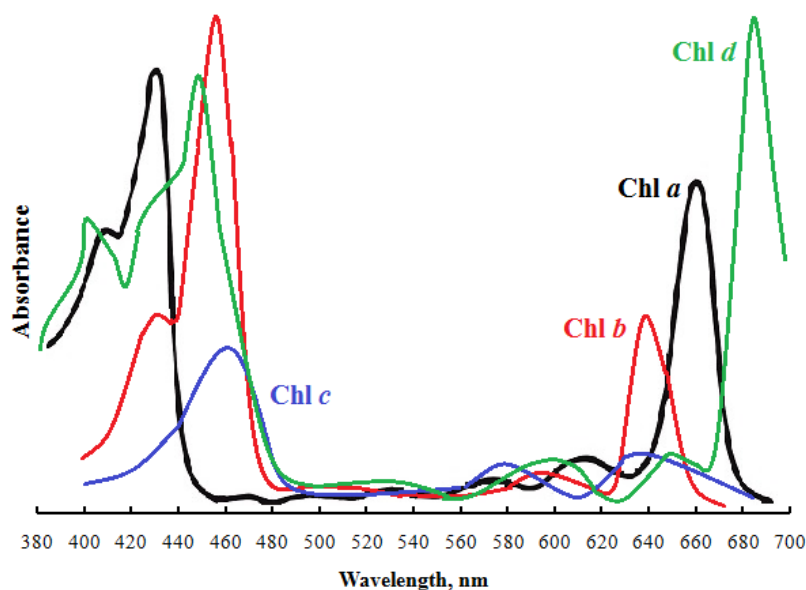


Рис. 1. Спектры поглощения экстрактов Хл *a*, *b*, *c* и *d* [6, 11].

Фикобилипротеины имеют один максимум поглощения в желто-зеленой области спектра (500-650 нм) между двумя максимумами поглощения света хлорофиллом – это позволяет водорослям, обитающим в глубине моря, использовать только слабый прошедший голубо-зеленый свет [13].

Фикобилипротеины, содержащиеся в цианобактериях, бурых и криптофитовых водорослях, достаточно хорошо изучены. Наиболее распространены четыре типа фикобилинов, отличающиеся друг от друга максимумами поглощения в видимой части

спектра: фикоэритрин (550 нм), фикоэритроцианин (575 нм), фикоцианин (620 нм) и аллофикоцианин (650 нм) [14].

#### 1.4. Спектры флуоресценции

Флуоресценция представляет собой свечение, вызванное переходом с первого  $S_1$ , или реже – второго возбужденного синглетного уровня  $S_2$  на основной синглетный уровень  $S_0$ . Хлорофилл обладает способностью к флуоресценции. Флуоресценция Хл *a* – прямой показатель, который позволяет оперативно и точно степень неблагоприятного воздействия различных факторов на растения, поскольку спектр флуоресценции Хл *a* меняется в зависимости от физиологического состояния клеток. Спектры флуоресценции Хл *a* для тканей растений обычно состоят из двух широких полос. Полоса в красной области (675-685 нм) обусловлена свечением Хл *a* фотосистемы 2, а в дальней красной области (730-740 нм) – фотосистемы 1.

Для фикобилипротеинов характерна яркая оранжевая флуоресценция с максимумом 575 нм у фикоэритрина и красная с максимумом на длине волны 660 нм у фикоцианина [13].

**Табл. 1. Главные максимумы спектров поглощения и испускания флуоресценции различных видов фикобилипротеинов [15].**

Тип фикобилипротеина	Максимум спектра поглощения (нм)	Максимум спектра флуоресценции (нм)
Фикоэритрин 545	538-551	580-587
Фикоэритрин 555	553-568	578
Фикоэритрин 566	563-568	600-619
Фикоцианин 569	568-569	650, 656
Фикоцианин 612	612-615	634-641
Фикоцианин 630	625-630	648, 649
Фикоцианин 645	641-650	654-662

## **2. Зеленые серные бактерии (обзор литературы)**

Аноксигенные фототрофные бактерии – наиболее древняя группа фототрофов. Согласно данным молекулярной биологии, фототрофы появились приблизительно 3,5 миллиарда лет назад [16]. Среди многообразия хлорофиллсодержащих бактерий все являются фототрофами, но только некоторые способны к фотосинтезу, в процессе которого синтезируется первичное органическое вещество.

Зеленые серные бактерии являются аноксигенными фототрофами. Научный интерес к изучению данных микроорганизмов определяется простой организацией их фотосистем, что делает их удобными моделями для биохимических и биофизических работ.

Зелёные серные бактерии широко распространены в водоемах: обычно в среде, где содержится сероводород (пруды, морские лагуны, озера), поскольку он им необходим. Зеленые серные бактерии в основном неподвижны. Имеются морфологически схожие виды, отличающиеся цветом клеток – зелёные (с бактериохлорофиллами *c* и *d* и каротиноидом хлоробактином) и шоколадно-коричневые (с бактериохлорофиллом *e* и каротиноидом изорениератином). Изорениератин поглощает свет в коротковолновой спектральной области, поэтому коричневые виды зеленых серных бактерий доминируют на больших глубинах, где преобладает зелёный свет [1].

Зеленые серные бактерии могут быть использованы для удаления неприятных запахов сероводорода в процессе анаэробной обработки отходов [17].

### **2.1. Места обитания зеленых серных бактерий**

Зеленые серные бактерии обитают в водоемах разных типов: в пелагиалях озер и лагун, в нижних слоях бактериальных матов приливных отложений, в горячих источниках [18]. В результате этого существуют ограничения их физиологических возможностей, бактерии могут обитать только в узком слое водоёма, в области с противоположными градиентами света и сульфида. В озерах и лагунах обычно этот слой имеет толщину 0,5-2 м и расположен на глубине от 2 до 20 метров.

Располагаются зеленые серные бактерии в хемоклине (слое с максимальным значением градиента минерализации) термических или меромиктических озер. Зеленые серные бактерии были найдены в озерах Польши, во фьордах Норвегии, в различных меромиктических озерах (например, в России, Италии, Швейцарии, Финляндии, США, Канаде, Камеруне, и т.д.) [17, 18, 19]. Черное море является меромиктическим

водоемом с самым большим содержанием бескислородной водной массы: хемоклин начинается на глубине около 70-90 м и содержит самые глубоководные зеленые серные бактерии [17].

Основным фактором, определяющим видовой состав зеленых серных бактерий в природных местах обитания, является спектральный состав подводного света. В озерах, в которых хемоклин находится на больших глубинах ( $\geq 9$  м), в эвтрофных озерах (с большим содержанием фитопланктона) в результате селективного поглощения света фитопланктоном, вода пропускает только свет в голубом и зеленом диапазоне длин волн, который становится доступным для анаэробного фотосинтеза. Бурые формы зеленых серных бактерий, которые содержат высокие внутриклеточные концентрации каротиноидов в светособирающих антеннах, имеют большее преимущество обитания в данных условиях. В отличие от них, зеленые виды доминируют в областях ниже обитания популяции пурпурных серных бактерий или в дистрофных озерах (с сильно гумифицированной водой), где проходит свет синего (450 нм) или красного (700 нм) диапазона длин волн.

Зеленые серные бактерии могут достигать высоких плотностей биомассы (до 4000 мкг Бхл/л). Для анаэробного фотосинтеза требуется углерод, зеленые серные бактерии могут существовать только в тех водных экосистемах, где пищевая цепь является анаэробной [19, 20]. Исключением являются геотермальные источники, в которых сульфид имеет геологическое происхождение.

Впервые зелёные серные бактерии были найдены в сточных водах серных источников в Польше и были описаны в 1910-1913 годах.

## **2.2. Фотосинтетический аппарат зеленых серных бактерий**

Зеленые серные бактерии в процессе фотосинтеза кислород не образуют, более того, они вообще не переносят кислорода. В качестве доноров водорода служит сероводород согласно уравнению:



Фототрофный образ жизни означает преобразование электромагнитной энергии света в энергию химических связей, которая используется для осуществления клеточного метаболизма и роста. В процессе фотосинтеза из углекислоты синтезируется первичное органическое вещество. Зеленые серобактерии фиксируют  $\text{CO}_2$  с помощью обратного цикла трикарбоновых кислот и окисляют сульфид [21].

Фотосинтетический аппарат зеленых серных бактерий сосредоточен в фотосинтезирующих мембранах, связанных с цитоплазматической мембраной. Во время фотосинтетического процесса высокоорганизованные мембранные агрегаты преобразовывают свет в биохимическую энергию с высокой эффективностью. В качестве светособирающих комплексов в зеленых серных бактериях служат хлоросомы [22]. Они представляют собой расположенные на внутренней поверхности цитоплазматической мембраны эллипсоидные тельца с типичными размерами 70-180x30-60x10-20 нм в зависимости от вида и условий выращивания [23]. Однослойная липидная оболочка хлоросом окружает 10-30 продольно расположенных в 1-3 гексагонально плотно упакованных слоях цилиндрических субъединиц диаметром 10 нм. Эти водорастворимые субъединицы состоят из самособирающихся пигментных агрегатов бактериохлорофиллов (Бхл) *c*, *d* или *e* и их. Отдельная хлоросома может включать от 3000 до 200000 молекул Бхл *c*, *d* или *e*. Также они содержат липиды, белки, каротиноиды и хинон. Каждая хлоросома служит коллективной светособирающей антенной десятков РЦ (более 40) [24, 25].

В РЦ световая энергия трансформируется в химическую. Все РЦ разделяются на два типа: тип I и тип II. Аноксигенные фотосинтетики располагают одним типом РЦ. Пурпурные несерные и серобактерии, а также зеленые нитчатые бактерии имеют РЦ типа II, гелиобактерии, зеленые серобактерии и аэробные зеленые бактерии – РЦ типа I. РЦ типа I содержат гомодиметрическое ядро с [4Fe-4S] – кластером в качестве терминального акцептора электронов. Они продуцируют слабые оксиданты и сильные редуцтанты. РЦ типа II имеют гетеродимерное ядро с хиноном в качестве акцептора электронов, продуцируют сильные оксиданты и слабые редуцтанты. Все аноксигенные фототрофные организмы содержат только один тип РЦ.

Возбужденный электрон, образовавшийся в РЦ, мигрирует по циклической цепи переноса электронов, в результате чего происходит запасание энергии в виде АТФ, которая расходуется на биосинтетические процессы [1]. В реакционных центрах под действием поглощенного кванта света подъем электронов осуществляется до такого уровня, что делает возможным прямое восстановление НАД<sup>+</sup> или ферредоксина путем переноса электронов с вторичного акцептора на эти соединения [26]. Таким образом, в результате фотохимической реакции индуцируется как циклический транспорт электронов, приводящий к образованию АТФ, так и нециклический, при котором возникает восстановитель [27].

### 2.3. Пигментный состав

Хлорофиллы, входящие в состав бактерий, принято называть бактериохлорофиллами (Бхл). Известны шесть видов Бхл: *a*, *b*, *c*, *d*, *e* и *g*. В фотосинтетической антенне эти пигменты в качестве хромофоров определяют основной светосбор. Молекулы хлорофиллов, сближенные и взаимоориентированные в составе антенны, обеспечивают высокоэффективную направленную миграцию энергии. В РЦ основной функцией хлорофильных молекул наряду с поглощением света является первичное разделение заряда. Один организм может продуцировать различные гомологи Бхл.

Основным пигментом аноксигенного фотосинтеза является бактериохлорофилл *a*. Хлорофиллы со сдвинутым в длинноволновую область поглощением возникли в эволюции в ходе конкуренции соответствующих микроорганизмов за световые ресурсы. К таким хлорофиллам относятся, например, бактериохлорофиллы *c*, *d*, *e*. В РЦ типа I у зеленых серобактерий содержится одновременно бактериохлорофилл *a* и хлорофилл *a* [19, 28].

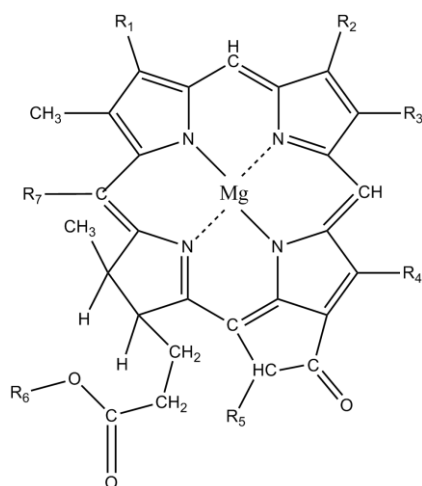


Рис.2. Структура молекул Бхл *c*, *d* и *e*. Бхл *a*, *b* и *g* не содержат двойную связь в верхнем правом пятичленном кольце [29].

Табл. 2. Различные составляющие бактериохлорофиллов[29].

Бхл	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>
<i>a</i>	-CO-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	-CO-OCH <sub>3</sub>	Phytyl or geranylgeraniol	-H
<i>b</i>	-CO-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	-CO-OCH <sub>3</sub>	Phytyl or phytadienyl	-H
<i>c</i>	-CHOH-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-H	Farnesyl or	-CH <sub>3</sub>

			-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> -C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	-CH <sub>3</sub>		stearyl	
<i>d</i>	-CHOH-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> -C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> -C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> -CH <sub>3</sub>	-H	Farnesyl	-H
<i>e</i>	-CHOH-CH <sub>3</sub>	-CHO	-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> -C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-H	Farnesyl	-CH <sub>3</sub>
<i>g</i>	-CH=CH <sub>2</sub>	-CH <sub>3</sub>	=CH-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	-CO-OCH <sub>3</sub>	Geranylgeraniol	-H

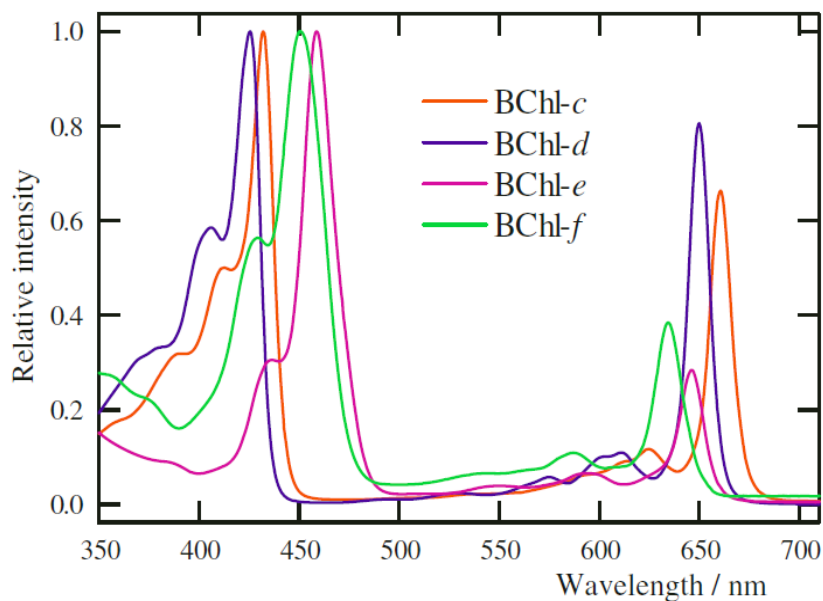
В состав пигмент-белковых комплексов входят также каротиноиды. Их основная функция – передача практически без потерь поглощенной солнечной энергии в синем и зеленом спектральном диапазоне на бактериохлорофиллы. Другая функция каротиноидов – защита от повреждений клетки супероксидными радикалами, возникающих в процессе фотосинтеза. У большинства зеленых серобактерий основным каротиноидом является моноциклическое соединение с ароматическим кольцом, названное хлоробактином. Но некоторые представители этих микроорганизмов синтезируют изорениератин, имеющий два ароматических кольца. Кроме того, у зеленых серобактерий в небольшом количестве находят  $\gamma$ -каротин, ликопин и родопсин. Окраска зеленых серобактерий из-за наличия различных каротиноидов может быть не только зеленой, но желтоватой или коричневой.

Вариации в пигментном составе (каротиноидах и бактериохлорофилах) дают возможность из-за различий в спектрах поглощения существовать нескольким видам фотосинтезирующих бактерий в одном биотопе, не затеняя друг друга.

#### 2.4. Спектры поглощения экстрактов

Поглощение Бхл перекрывает всю видимую часть спектра от 300 до 800 нм в растворе, простираясь в инфракрасную область до 1100 нм *in vivo*. Характерны две главные полосы поглощения: полоса в ультрафиолетовом участке спектра и длинноволновый максимум в красной или ближней инфракрасной области. В зеленом участке спектра существует выраженный провал между максимумами поглощения, размер которого определяется степенью батохромного сдвига длинноволновых полос у конкретных хлорофиллов.

В зависимости от пигментного состава, культуры зеленых серных бактерий могут иметь зеленый или коричневый цвет, доминирующими пигментами в их фотосинтетическом аппарате являются Бхл *c*, *d* и *e*. В неповрежденных клетках длинноволновые пики в спектрах поглощения бактериохлорофиллов расположены на длинах волн 745-755 нм (Бхл *c*), 715-745 нм (Бхл *d*), 710-725 нм (Бхл *e*). Спектры поглощения могут использоваться для того, чтобы быстро отличить друг от друга зеленые серные бактерии и другие фотосинтетические прокариоты, такие, как пурпурные серные бактерии и цианобактерии [17].



**Рис.3. Спектры поглощения экстрактов бактериохлорофиллов *c*, *d*, *e* и *f* [30].**

В спектрах поглощения экстрактов бактерий Бхл *a* имеет пик в области 795-800 нм, Бхл *c* – в области 745-750 нм [25]. Мономерные формы Бхл *c* содержат пик на длине волны 660 нм [24].

## 2.5. Спектры флуоресценции

Зеленые серные бактерии являются облигатными анаэробами, в которых фотосинтетический аппарат оптимизирован для бескислородных условий с недостаточной освещенностью. Эти условия жизни можно объяснить тем, что в присутствии кислорода наблюдается сильное уменьшение флуоресценции [24]. Тушение флуоресценции, которое зависит от присутствия кислорода или других окислителей и связано с изменениями в окислительно-восстановительном потенциале, было отмечено в целых клетках, изолированных хлоросомах и ФМО-белках. Флуоресценция уменьшается в аэробных условиях.



**Табл. 3. Главные максимумы спектров поглощения хлорофиллов (в клетках и в ацетоновых экстрактах) и максимумы спектров флуоресценции [31].**

Хлорофиллы	Максимумы спектров поглощения (нм)		Максимумы спектров флуоресценции (нм)
	Клетки	Ацетоновые экстракты	Клетки
Хл <i>a</i>	670-675	435, 663	680-685
Хл <i>b</i>		455, 645	(в ацетоне 652)
Бхл <i>a</i>	375, 590, 805, 830-911	358, 579, 771	907-915
Бхл <i>b</i>	400, 605, 835-850, 986-1035	368, 407, 582, 795	1040
Бхл <i>c</i>	457-460, 745-755	433,663	775
Бхл <i>d</i>	450, 715-745	425, 654	763
Бхл <i>e</i>	460-462, 710-725	459, 648	738

Зеленые серные бактерии обладают переменной флуоресценцией, которая может изменяться под воздействием света [32]. Базальный уровень флуоресценции наблюдается при слабой интенсивности света. Интенсивность флуоресценции снижается до базального уровня в течение нескольких секунд после того как прекращается освещение. При включении света все зеленые серные бактерии имеют сложную индукцию флуоресценции бактериохлорофилла. В течение нескольких секунд после включения освещения достигается наивысший уровень флуоресценции. Высокий начальный уровень флуоресценции уменьшается в течение 100 секунд к стационарному уровню флуоресценции. Уменьшение флуоресценции не всегда бывает простым, иногда могут появляться вторичные пики или переходные плато. Форма индукции флуоресценции зависит от многих факторов, в том числе предварительного освещения и условий культивирования. В целом переменная флуоресценция зелёных серных бактерий имеет сходство с переменной флуоресценцией зелёных листьев растений [33].

Форма индукции флуоресценции зависит от предварительного освещения, фоновой подсветки, температуры и условий культивирования. Уменьшение флуоресценции, которое происходит в течение нескольких минут после включения освещения, может быть вызвано тем же самым механизмом, который модулирует быстрое увеличение интенсивности флуоресценции. В некоторых случаях могут быть вызваны несколько различных механизмов тушения флуоресценции.

### 3. Экспериментальные методы

#### 3.1. Аппаратура для получения вертикальных характеристик воды

В районе Кандалакшского залива Белого моря были исследованы пять меромиктических водоемов на разной стадии отделения от моря:

- лагуна Зеленого мыса,
- озеро Кисло-Сладкое,
- озеро Нижнее Ершовское,
- озеро Еловое,
- озеро Трехцветное.

Для отбора проб воды использовался погружаемый насос. Пробы отбирались с разных горизонтов и измерялись физико-химические характеристики: температура, соленость (при помощи кондуктометра), рН и Eh(при помощи рН-метра), концентрация растворенного кислорода (при помощи оксиметра), освещенность (люксметр) и концентрация сероводорода (при помощи потенциометрического анализатора-иономера).

Кондуктометр – специальный прибор для измерения электропроводности электролитов водных растворов и расплавов, коллоидных систем и твердых веществ. Кондуктометрия включает в себя косвенные методы анализа (напр., в газовом анализе) и прямые методы (напр., в солемерах) с использованием прямого или переменного тока. Чувствительным элементом при измерении электропроводности является кондуктометрическая ячейка. Конструкция классической ячейки представляет собой два параллельных измерительных электрода площадью  $1 \text{ см}^2$ , погруженных в раствор и расположенных на расстоянии 1 см друг от друга. Все датчики работают в широком диапазоне температур [34].

Оксиметр – прибор для измерения содержания растворенного кислорода (мера содержания в растворе газообразного кислорода). Существует несколько естественных причин наличия растворенного кислорода в воде. Основная – попадание кислорода в воду из атмосферы, где кислород, содержащийся в воздухе, легко смешивается с водой до степени насыщения при движении воды. Также вода может получать кислород через фотосинтез, где кислород вырабатывается водными растениями и водорослями как побочный продукт фотосинтеза. Количество растворенного в воде кислорода обычно измеряется в процентах насыщения или выражается в концентрации в миллиграммах на моль воды [35].

pH-метр – прибор для непрерывного автоматического измерения активности ионов водорода и окислительно-восстановительных потенциалов в воде и водных растворах. Принцип работы прибора основан на преобразовании ЭДС электродной системы, состоящей из измерительного и вспомогательного электродов, в постоянный ток, пропорционально измеряемой величине. Многие измерители pH имеют встроенный термометр, который позволяет автоматически подстраиваться под любые значения температуры.

Люксметр – прибор, который используется для измерения уровня освещенности. Принцип работы люксметра основан на явлении фотоэлектрического эффекта. Свет, при попадании на полупроводниковый фотоэлемент, передает свою энергию электронам. В результате происходит высвобождение электронов в объеме полупроводника, вследствие чего через фотоэлемент начинает проходить ток. Величина силы тока пропорциональна освещенности фотоэлемента.

Потенциометрический анализатор-иономер – прибор для ионометрических измерений. В исследуемый раствор погружаются ионоселективный и электрод сравнения, затем при помощи иономера измеряют разность потенциалов между этими электродами, которая зависит от концентрации ионов в растворе [36].

### **3.2. Получение культур зеленых серных бактерий**

Накопительные и чистые (имеющие только зеленую или коричневую окраску) культуры водорослей были предоставлены для измерений сотрудниками Института микробиологии имени С.Н. Виноградского РАН.

Для получения накопительных культур зеленых серных бактерий в полевых условиях свежееотобранную озерную воду с необходимой глубины наливали в стерильные пенициллиновые флаконы, добавляли 1–2 капли 10% дрожжевого экстракта. Для подавления оксигенного фотосинтеза в каждый флакон вносили порошок диурона на кончике шпателя. Флаконы герметично закрывали пенициллиновой пробкой, оставляя пузырек воздуха, размером с горошину.

Затем пробы озерной воды объемом 5 мл высевали с помощью стерильных шприцов в герметично закрытые стеклянные пенициллиновые флаконы со средой объемом 30 мл. Использовали среду (с несколькими вариантами солености по NaCl) следующего состава (на 1 л дистиллированной воды):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ – 0.7 г; NaCl– 5 г, 10 г, 15 г, 20 г или 25 г;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.5 г;  $\text{NH}_4\text{Cl}$ – 0.7 г; KCl – 0.33 г;  $\text{NaHCO}_3$  – 0.15 г;  $\text{CaCl}_2$ – 0.1 г;  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  – 1г;  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  – 0.5 г;  $\text{Na}_{\text{ацетат}}$  – 0.5 г;  $\text{Na}_{\text{пируват}}$ – 0.5 г;

дрожжевой экстракт – 0.1 г; раствор микроэлементов – 1 мл [37]; витамин В12– 20 мкг, порошок диурона, рН среды 7,5–8.

Для определения относительной численности аноксигенных фототрофных бактерий в лабораторных условиях был произведен посев проб воды, из тех же горизонтов методом предельных серийных разведений природного материала на агаризованную (0,5% агара) питательную среду (15 г/л NaCl). Культивирование проводили анаэробно в течение месяца в люминостате при освещенности 2000 и температуре 20–25°C. Выделение и очистка культур достигались методом предельных разведений посевного материала с использованием жидких и агаризованных сред с разной соленостью. В среду для зеленых серобактерий добавляли комплекс витаминов.

Для первичной идентификации микроорганизмов использовали такие признаки как форма и размер клеток и микроколоний, цвет отдельных колоний фототрофных бактерий, наличие газовых вакуолей, образование и способ отложения капель серы, а также спектр поглощения суспензии целых клеток чистой культуры в 50% глицерине и в ацетон-метаноловом экстракте (7:2) [38].

### **3.3. Приготовление экстрактов зеленых серных бактерий и криптофитовых водорослей**

Для получения экстрактов зеленых серных бактерий культуру осаждали центрифугированием, затем добавляли смесь ацетона с метанолом (7:2). После добавления экстрагирующей смеси пробирку закрывали герметически и заворачивали в фольгу, после чего помещали в холодильник на несколько суток. Затем смесь вновь центрифугировали и проводили измерения супернатанта.

Для получения экстрактов криптофитовых водорослей пробирку со свежесобранными образцами воды (50 мл) центрифугировали в течение 5 минут со скоростью 3000 об/мин. После этого удаляли надосадочную жидкость. Пробирку с оставшимися 2 мл воды с осадком помещали в морозильную камеру, оставляли на 2 часа, затем размораживали и добавляли 8 мл ацетона.

### **3.4. Спектральные приборы и методы**

Электронные спектры поглощения – это спектры, получающиеся при прохождении излучения с непрерывным спектром в веществе и его избирательном ослаблении на некоторых длинах волн за счет поглощения [39]. Они возникают при переходах с нижних невозбужденных электронных уровней энергии на верхние. Спектр

возбуждения – это зависимость величины, характеризующей поглощательную способность вещества, от длины волны или волнового числа. Прибор для измерения спектров поглощения – спектрофотометр.

Люминесценция – это свечение атомов, молекул, ионов и других более сложных комплексов, возникающее в результате электронного перехода в этих частицах при их возвращении из возбужденного состояния в нормальное. Спектр флуоресценции – это зависимость интенсивности флуоресценции от длины волны или от волнового числа. Прибор для измерения спектров флуоресценции – спектрофлуориметр.

Спектр испускания флуоресценции – это зависимость интенсивности люминесценции, измеренной в квантах на единичный интервал длин волн, от длины волны. Спектр возбуждения флуоресценции – это зависимость интенсивности испускания флуоресценции при определенной длине волны возбуждения. В случае синхронных спектров сканирование производится синхронно двумя монохроматорами таким образом, что разница между длиной волны возбуждения и длиной волны регистрации остается постоянной.

Спектры флуоресценции образцов воды регистрировались на спектрофлуориметре Solar CM2203 в стандартных кварцевых кюветах с длиной оптического пути 10 мм. Для образцов воды регистрировали спектры испускания флуоресценции для длин волн возбуждения  $\lambda_{ex} = 270, 390, 410, 440$  и  $550$  нм и спектры возбуждения флуоресценции на длинах волн регистрации  $\lambda_{em} = 680, 770$  и  $815$  нм. Также измерялись синхронные спектры с разницей длин волн  $\Delta=50$  нм. Спектры поглощения проб воды измерялись на спектрофотометре Unicо.

## **4. Экспериментальные результаты и их обсуждение**

### **4.1. Отделяющиеся водоемы Кандалакшского залива Белого моря и типичные вертикальные профили характеристик воды**

Меромиктические водоемы являются уникальными объектами природы с определенными гидрологическими и физико-химическими характеристиками, сильно влияющими на их экосистемы [39]. Такие водоемы отличаются вертикальным разделением на несколько перемешивающихся слоев, отличающихся физико-химическими характеристиками. Верхний слой, как правило, распространяется на метр под поверхностью озера и подвергается воздействию атмосферы. Перемешивание воды в данном слое обычно происходит в течение года под действием приливов, ветров, течений. Только зимой в северных меромиктических водоемах в данном слое не происходит перемешивания воды из-за льда, который покрывает поверхность воды. Средний слой, хемоклин (находится на глубине примерно 1,5-2 м от поверхности водоема), характеризуется резким увеличением солености воды и уменьшением растворенного кислорода. Вода в этом слое может быть изумрудно-зеленого или ярко-красного цвета. В данном слое могут существовать анаэробные формы жизни. Нижний слой отрезан от атмосферы.

Плотность воды – важное физическое свойство меромиктических водоемов: чем выше соленость воды, тем больше ее плотность. Поэтому самая соленая вода (рассол с соленостью больше, чем в море) концентрируется у дна. Формирование такого рассола происходит в морском льду. Соль не включается в кристаллическую структуру льда, поэтому при замерзании образуется пресный лед, в его порах находится жидкий концентрированный рассол. Образование новых ледяных кристаллов в рассоле приводит к растрескиванию льда и излиянию рассола вниз. При этом соль в сильно охлажденном рассоле не растворяется в воде, но успевает заморозить рядом расположенную воду, формируются трубчатые ледяные структуры, которые имеют название «пальцы смерти» [41].

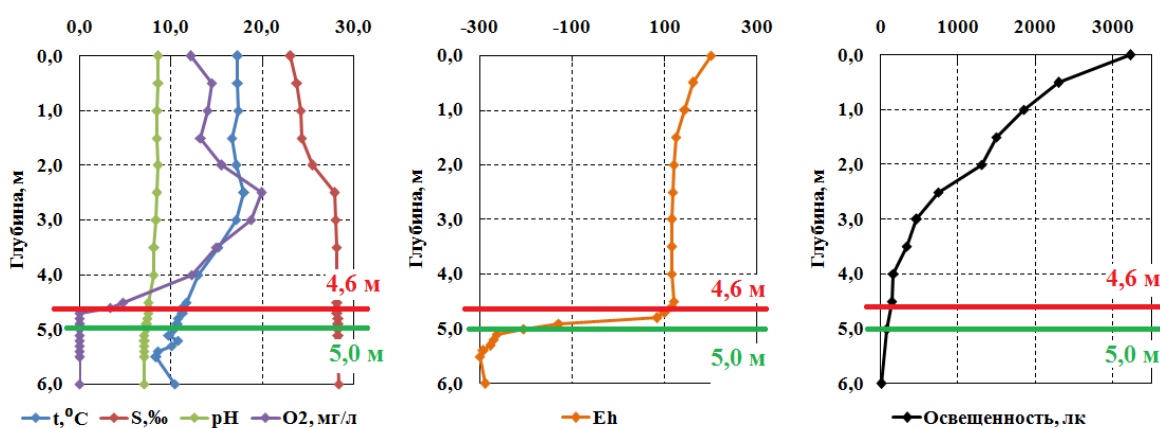
В арктическом регионе отделяющиеся от моря водоёмы на конечной стадии эволюции превращаются в пресноводные, однако на промежуточных стадиях изоляции они приобретают черты меромиктических, где, ввиду устойчивой вертикальной стратификации, ветровое и конвективное перемешивание вод ограничено поверхностным слоем, а в придонной водной массе возникает дефицит кислорода и появляется сероводородное заражение. Каждому из слоев соответствует определенное

экологическое сообщество – из аэробных организмов в верхнем слое, из анаэробных в нижнем. На их границе, в зоне хемоклина, возникает уникальное богатое сообщество из микроорганизмов, которое использует своеобразные абиогенные условия - близкое соседство окисленной и восстановленной зон. В типичных водоемах в районе Кандалакшского залива, отделившихся от Белого моря, практически пресный верхний слой, вода в нижнем слое близка по солености к морской воде в Белом море. Разложение на глубине поступающей сверху органики приводит к дефициту кислорода и сероводородному заражению нижних слоев воды, которое наблюдается во всех водоемах вблизи моря.

### *Лагуна Зелёного мыса (Lagoon on the Cape Zeleny)*

Соленая лагуна на Зеленом мысу – частично изолированный от моря водоем, в который через порог во время прилива поступает морская вода из Кислой губы. Глубина водоема 6,5 м; амплитуда приливных колебаний около 10 см. Соленость воды в нижних слоях лагуны выше, чем в прилегающей части моря: начиная с глубины 3 м она составляет 27‰ и ко дну повышается до 28‰. Реакция среды в верхней части водоема на уровне морской – 8, в нижней постепенно падает до 6,8.

На глубине 4,6 м в слое воды розового цвета были обнаружены криптофитовые водоросли *Rhodomonas*, толщина данного слоя составляла 20 см. На данной глубине происходило резкое изменение рН в более кислую сторону, количество растворенного кислорода падало практически до нуля, соленость выше, чем в морской воде и на поверхности лагуны.



**Рис.4. Вертикальное распределение физико-химических характеристик воды в лагуне на Зеленом мысу (август 2014). Красной линией обозначен слой воды розового цвета, зеленой линией – зеленый слой воды.**

Величина окислительно-восстановительного потенциала начинала меняться в розовом слое с криптофитовыми водорослями и достигало минимума в слое воды с зеленоватой окраской, содержащем зеленые серные бактерии.

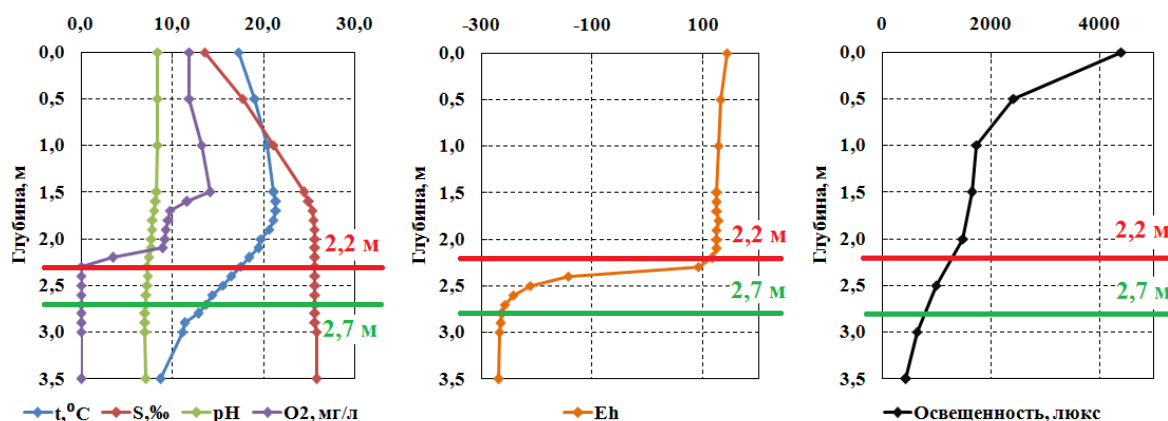
В лагуне на Зеленом мысу на глубине 5,1 м появился сероводород (2,4 мг/л), его концентрация равномерно увеличивалась с глубиной до величины 47,5 мг/л.

### ***Озеро Кисло-Сладкое (Lake Kislo-Sladkoye)***

Оз. Кисло-Сладкое (Полупресная лагуна) – соленое озеро с максимальной глубиной около 4,5 м, расположенное в 1,5 км от ББС им. Н.А. Перцова, соединяющееся с морем небольшим протоком, вследствие чего морская вода может попадать в озеро во время высоких приливов.

В озере на глубине около 2 м был обнаружен ярко-розовый слой, содержащий криптофитовые водоросли *Rhodomonas*, толщина этого слоя около 10-20 см. В зависимости от времени года, освещенности и других факторов слой может располагаться на различной глубине. Летом 2013 розовый слой был обнаружен на глубине 3 м, летом 2014 года – на глубине 2,2 м. Зимой 2013-2014 данный слой не был обнаружен. Для данной глубины характерно резкое изменение рН в более кислую сторону, уменьшение Eh с положительной на отрицательную. Также происходит уменьшение содержания растворенного кислорода практически до нуля.

Ниже розового слоя появляется сероводород, его содержание увеличивается с глубиной (в августе 2014 года было зафиксировано 7,459 мг/л на глубине 3,5 м). Цвет воды имел грязно-зеленую окраску. Это говорит о том, что в данном озере обитают зеленые серные бактерии.



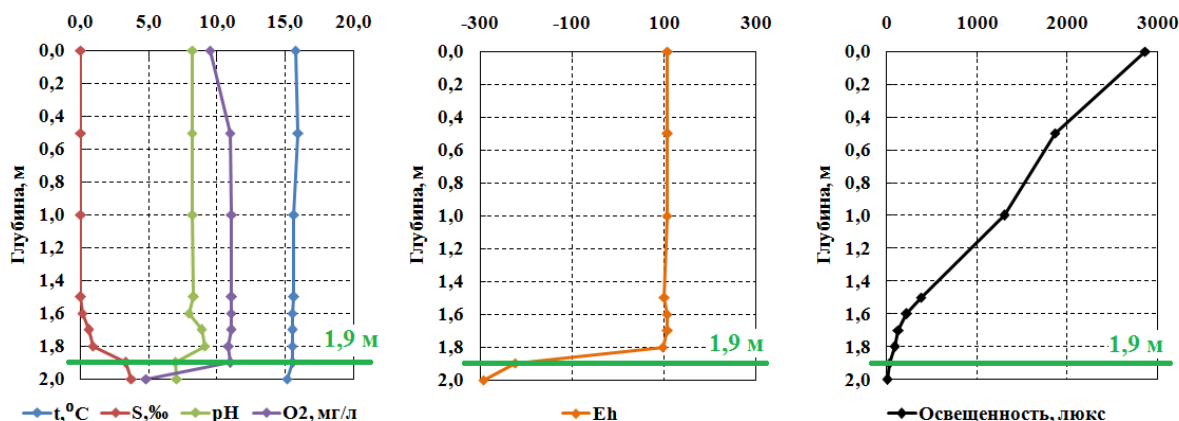
**Рис. 5. Вертикальное распределение физико-химических характеристик воды в озере Кисло-Сладком (август 2014). Красной линией обозначен слой воды розового цвета, зеленой линией – зеленый слой воды.**



### ***Озеро Нижнее Ершовское (Lake Nizhnee Ershovskoye)***

Оз. Нижнее Ершовское – нижнее из двух озер, образовавшихся на месте древнего пролива, оно соединено протокой с пресным Верхним Ершовским озером, из которого получает пресную воду. Максимальная глубина водоема – 2,5 м. Большая часть водной толщи почти пресная, но донные углубления, начиная с 2 м, заполнены солоноватой водой 5,9-7,7‰. Из Н. Ершовского в море вытекает пресный ручей, морская вода в озеро не поступает.

На глубине 1,9 м цвет воды был ярко-зеленым, что говорит о том, что в данном слое обитают зеленые серные бактерии. На данной глубине резко упало значение рН до величины 6,9, концентрация растворенного кислорода – уменьшаться. На данной глубине не были обнаружены признаки сероводорода, но на глубине 2,0 м его концентрация составляла 4,5 г/л.



**Рис. 6. Вертикальное распределение физико-химических характеристик воды в озере Нижнем Ершовском (август 2014). Зеленой линией обозначен слой воды зеленого цвета.**

### ***Озеро Еловое (Lake Elovoe)***

Оз. Еловое (ур. Еловый Наволок на берегу материка близ острова Елового в Кузкоцком архипелаге) – пресное на поверхности и соленое, начиная с глубины 1,5 м до максимальной глубины 5 м, соединяющееся с Белым с морем ручьем, морская вода в него практически не попадает.

Вода у поверхности озера имела желтоватый цвет, что говорит о высоком содержании гуминовых веществ в воде. На глубине 2,9 м вода имела коричневый цвет, что говорит о том, что в данном слое (толщина около 30 см) обитают зеленые серные бактерии. Величина рН на данной глубине уменьшалась, соленость стала сравнима с

морской водой (поверхность озера пресная). На данной глубине освещенность падает практически до нуля. На глубине 3,5 м концентрация сероводорода составляла 7,5 г/л.

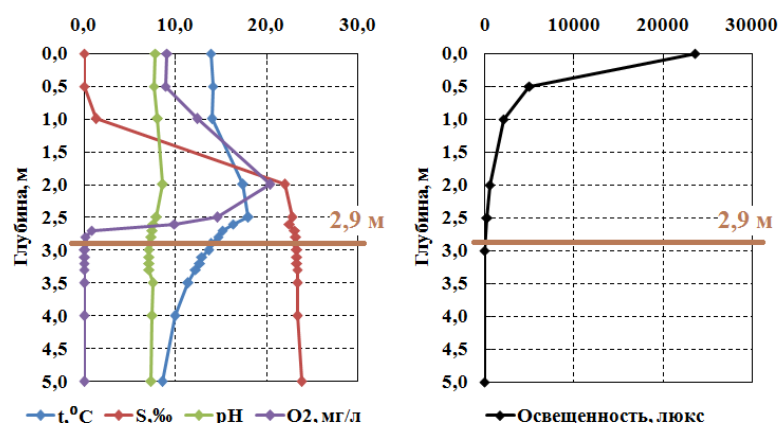


Рис. 7. Вертикальное распределение физико-химических характеристик воды в озере Еловом (сентябрь 2014). Коричневой линией обозначен слой воды коричневого цвета.

### Озеро Трехцветное (Lake Tricolor)

Оз. Трехцветное в Пеккелинской губе имеет глубину 6,5 м и обладает четкой вертикальной стратификацией. На поверхности до глубины 1 м вода практически пресная, и, начиная с глубины 1,5 м, соленость возрастает до 22‰. Поверхностная вода желтая без запаха, pH более 8. Средний слой – от 1,5 до 2 м с соленостью 15-20‰, окрашен в зеленый цвет, pH в нем падает от 8 до 6. Глубинный слой – соленый и холодный с сильным запахом сероводорода, соленость повышается до 22 ‰, реакция среды кислая, pH=6.

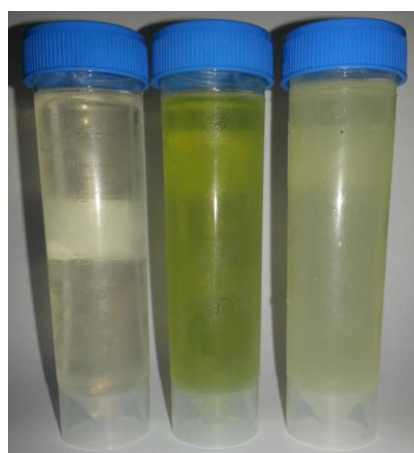
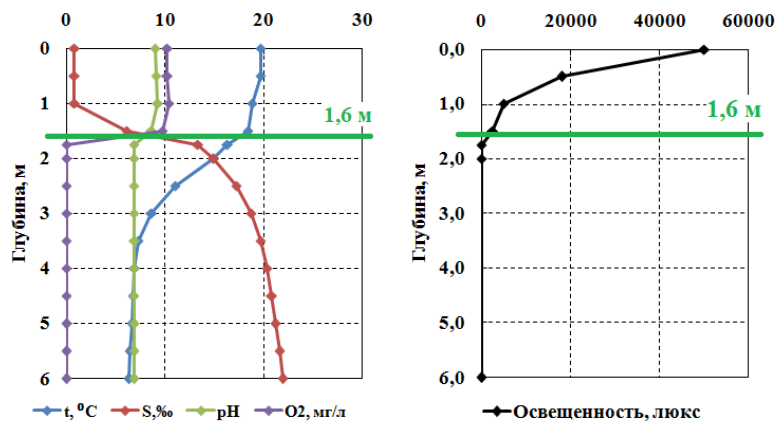


Рис. 9. Три слоя воды в озере Трехцветном (июнь 2013). Слева – поверхностный слой (1 м), центральный – ярко-зелёный слой (1,6 м), справа – нижний слой (2 м).

Озеро имеет такое название, так как имеет три слоя различной окраски: поверхностный слой (0-1,6 м) – прозрачный, затем расположен тонкий (10-20 см на глубине около 1,75 м) слой изумрудно-зелёной воды, ниже которого расположен слой

лимонно-жёлтой воды, которая имеет сильный запах сероводорода, увеличивающийся с глубиной.

Летом 2013 года на глубине 1,6 м (летом 2014 года – на глубине 2,2 м) был обнаружен слой, содержащий зеленые серные бактерии. Освещенность в данном слое падала практически до нуля.



**Рис. 8. Вертикальное распределение физико-химических характеристик воды в озере Трехцветном (июль 2013). Зеленой линией обозначен слой воды зеленого цвета.**

В данном озере на глубине 1,8 м и ниже присутствовал сероводород. Его концентрация равномерно увеличивалась с глубиной до величины 95,7 г/л на глубине 5,0 м.

#### 4.2. Исследование криптофитовых водорослей методом абсорбционной спектроскопии

Спектры оптической плотности образцов воды с криптофитовыми водорослями *Rhodomonas* sp. регистрировались в спектральном диапазоне 200-1000 нм.

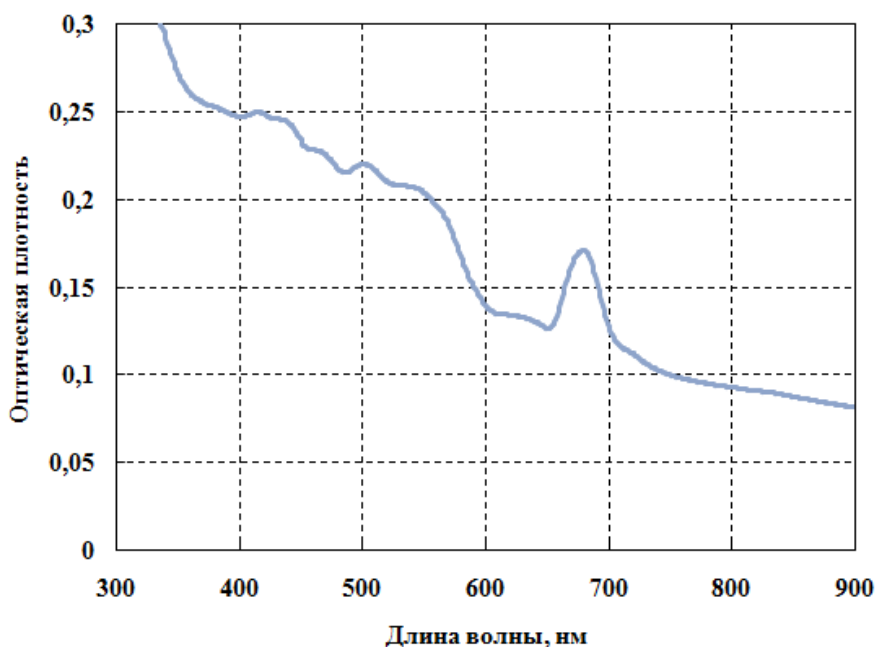


Рис. 22. Спектр поглощения образца воды, содержащий криптофитовые водоросли *Rhodomonas*, лагуна Зеленого мыса (июнь 2013), глубина 4,75 м.

Спектры поглощения содержат полосы поглощения, соответствующие наличию трех пигментов. Максимум на длине волны 670 нм соответствует поглощению света хлорофиллом *a*. Широкая полоса поглощения в диапазоне 400-500 нм говорит о присутствии каротиноидов в клетках водорослей. Широкий максимум в области 500-600 нм соответствует поглощению света молекулами фикоэритрина.

### 4.3. Исследование криптофитовых водорослей методом флуоресцентной спектроскопии

Спектры испускания флуоресценции образцов воды с криптофитовыми водорослями *Rhodomonas* sp. регистрировались при длине волны возбуждения  $\lambda_{ex} = 410$  и 550 нм. Синхронные спектры флуоресценции регистрировались с разницей длин волн  $\Delta=50$  нм.

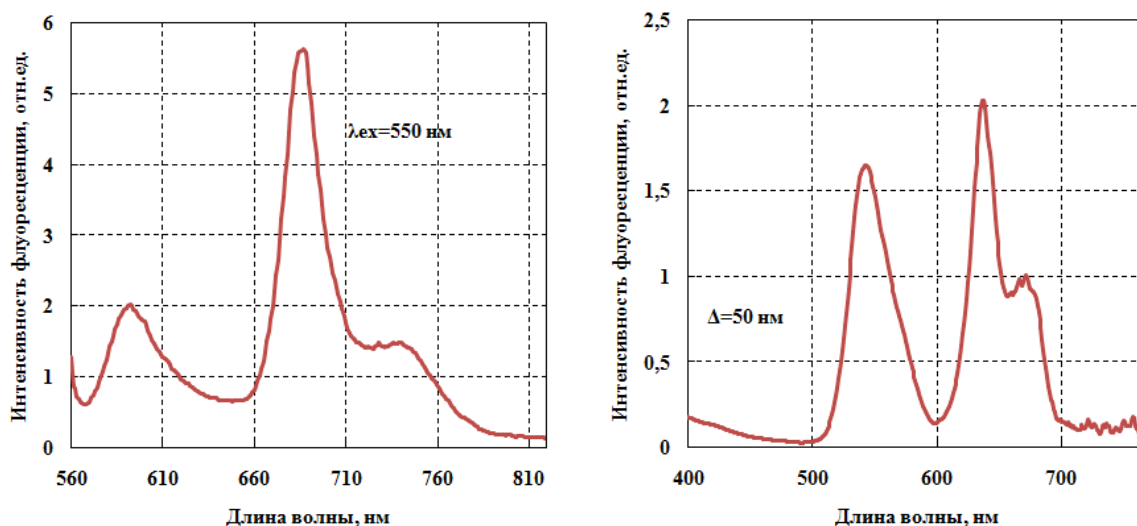


Рис. 23. Спектры флуоресценции образца воды с максимальным содержанием криптофитовых водорослей *Rhodomonas* из озера Кисло-Сладкого (август 2014), глубина 2,2 м: испускания ( $\lambda_{ex}=550$  нм) – слева, синхронный ( $\Delta=50$  нм) - справа.

Максимум на длине волны 595 нм (545 нм в синхронном спектре) соответствует испусканию фикоэритрином. Максимумы на длинах волн 685 нм (635 нм в синхронном спектре) и 740 нм (690 нм в синхронном спектре) характерны испусканию Хл *a*, содержащемуся в клетках водорослей. С увеличением концентрации клеток в слоях воды увеличивается интенсивность флуоресценции.

Спектры возбуждения флуоресценции образцов воды с криптофитовыми водорослями *Rhodomonas* sp. регистрировались при длине волны испускания  $\lambda_{em} = 685$  нм. В них также присутствуют максимумы флуоресценции двух пигментов: Хл *a* соответствует широкая полоса с максимумами на длинах волн 440 и 470 нм, фикоэритрину – максимум на длине волны 550 нм.

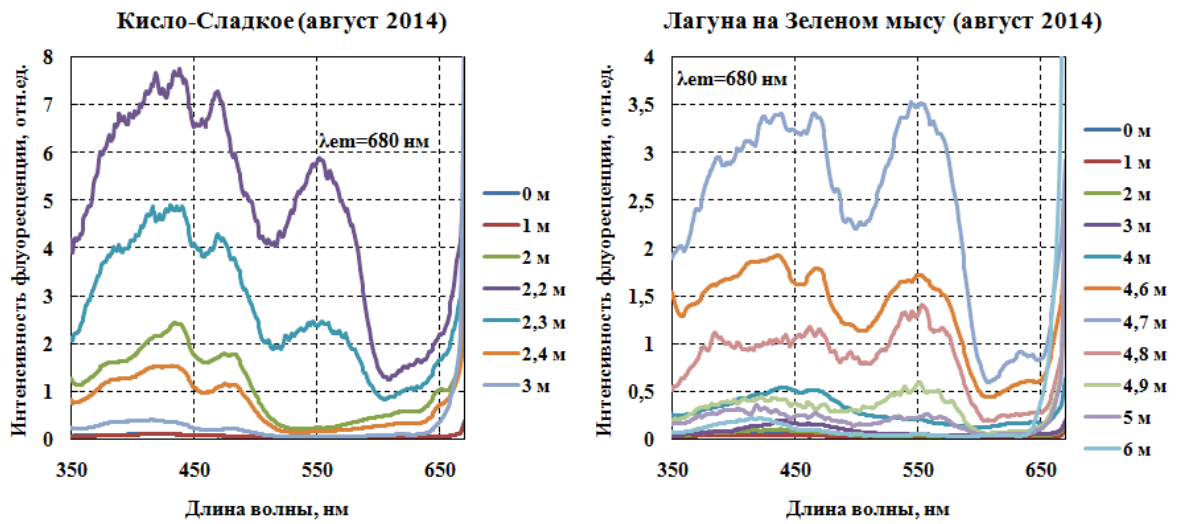


Рис. 24. Спектры возбуждения флуоресценции ( $\lambda_{em}=680 \text{ нм}$ ) образцов воды из лагуны на Зеленом мысу и из озера Кисло-Сладкого (август 2014).

#### 4.4. Исследование зеленых серных бактерий методом абсорбционной спектроскопии

##### 4.4.1. Спектры оптической плотности проб воды с зелеными серными бактериями

Спектры оптической плотности проб воды регистрировали в спектральном диапазоне 200-1000 нм. Спектры поглощения поверхностных слоёв воды (расположенные над слоем, содержащим зелёные серные бактерии) имеют максимум в области 270 нм, соответствующий поглощению света гуминовыми веществами.

Для всех проб воды с зелёными серными бактериями характерны максимумы в области 450-460 и 720 нм, соответствующими поглощению света Бхл *d* и *e*. Высота данных максимумов зависит от концентрации клеток бактерий в слоях воды. Для всех озёр характерно резкое увеличение оптической плотности на глубине с наиболее яркой окраской воды, затем следует плавное уменьшение данных пиков.

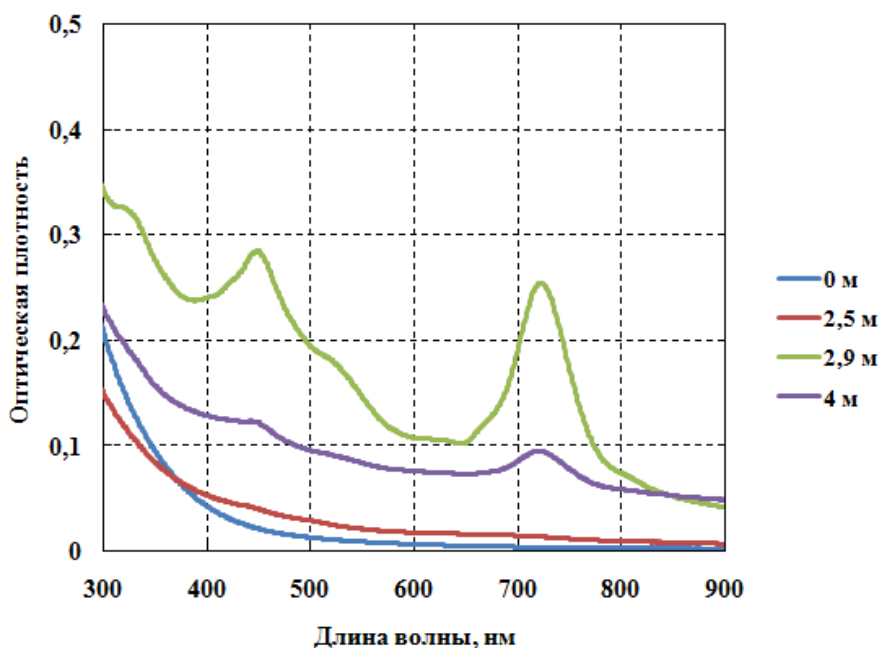


Рис. 10. Спектры поглощения проб воды из озера Елового, август 2013.

Также для слоёв с наиболее интенсивной окраской воды характерны максимумы в области 670-680 нм, соответствующие поглощению света Хл *a*, содержащегося в клетках зелёных серных бактерий. Максимумы в области 400-450 нм соответствуют поглощению света каротиноидами.

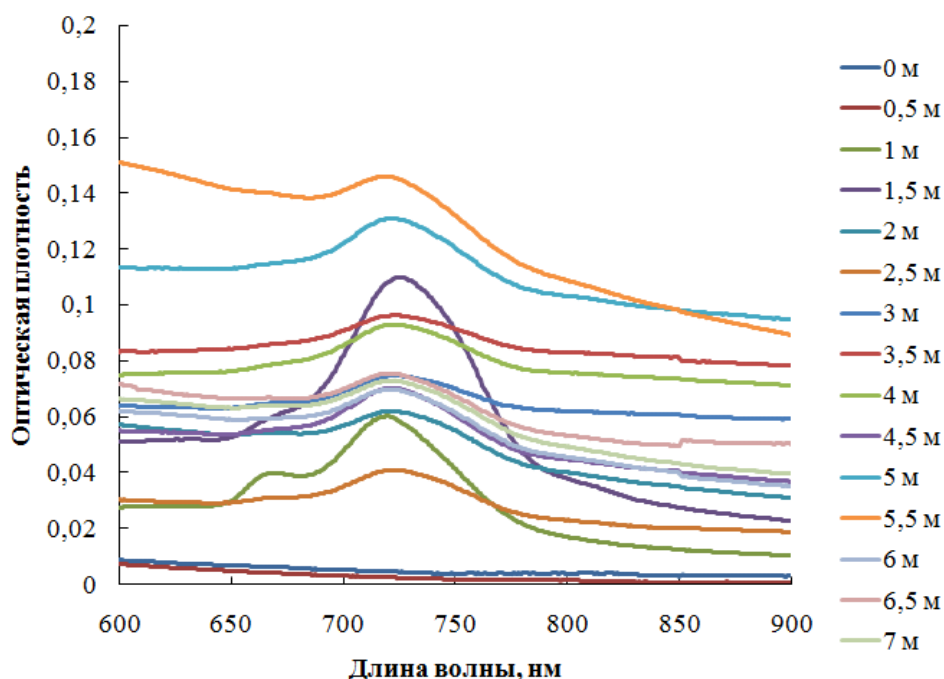


Рис. 11. Спектры поглощения проб воды из озера Трехцветного (март 2013).

#### 4.4.2. Спектры оптической плотности культур зеленых серных бактерий

Спектры оптической плотности культур зеленых серных бактерий регистрировали относительно 1 % раствора NaCl (хлорид натрия) и Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (тиосульфат натрия) в спектральном диапазоне 200-1000 нм.

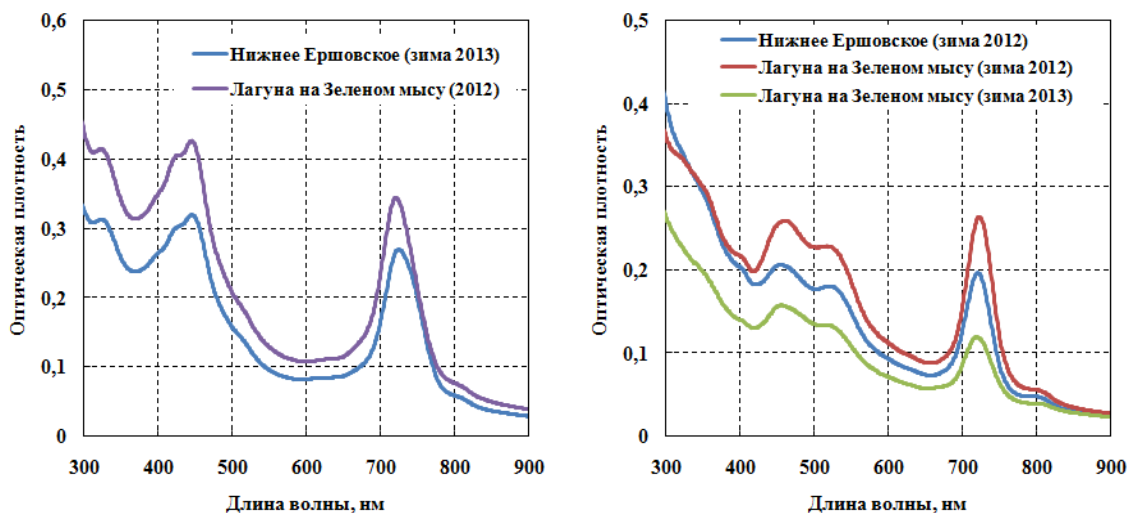
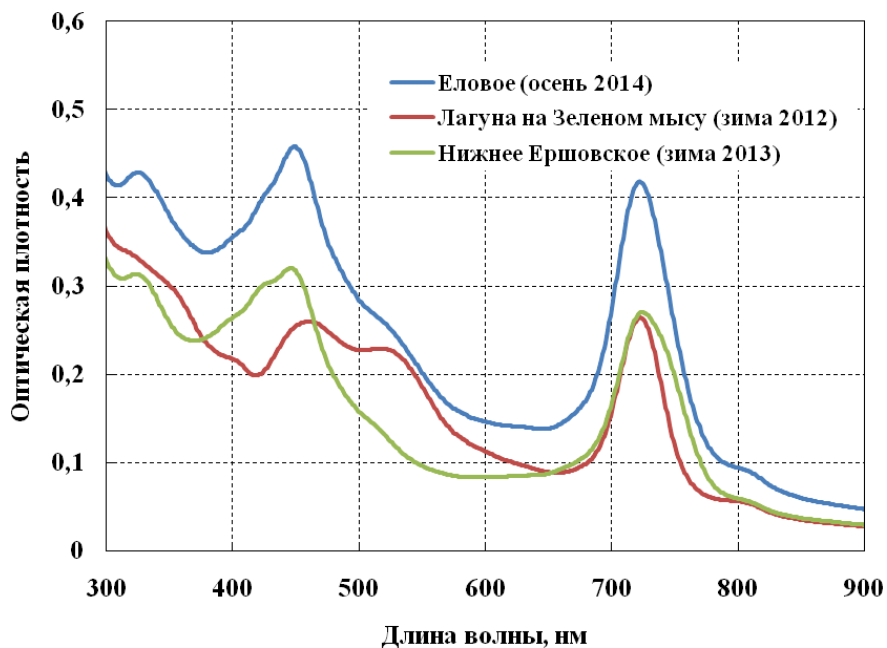


Рис. 12. Спектры поглощения зеленоокрашенных (слева) и коричневоокрашенных (справа) культур зеленых серных бактерий.

Спектры поглощения культур зеленых серных бактерий имеют два максимума, соответствующими поглощению света молекулами БХл *c*, *d* и *e*: узкий – в длинноволновой области спектра (725-730 нм) и широкий – в коротковолновой (450-



550 нм). Для культур зеленоокрашенных зеленых серных бактерий характерна широкая полоса поглощения с максимумом на длине волны 450 нм – соответствует поглощению БХл *d*. Для культур коричневоокрашенных зеленых серных бактерий характерна полоса поглощения с максимумами на длине волны 465 – соответствуют поглощению света БХл *e*, и на длине волны 525 нм – поглощение каротиноидами. Высота максимумов зависит от концентрации клеток серобактерий в культуре.



**Рис.13.** Сравнение спектров поглощения зеленоокрашенных (Нижнее Ершовское (зима 2013)) и коричневоокрашенных (лагуна на Зеленом мысу (зима 2012)) культур зеленых серных бактерий и накопительная культура (Еловое (осень 2014)).

Спектры поглощения накопительной культуры зеленых серных бактерий представляют собой суммарный спектр оптической плотности зеленоокрашенной и коричневоокрашенной культур со всеми характерными полосами поглощения, что говорит об одновременном присутствии в такой культуре молекул БХл *d* и *e*. Высота максимумов зависит от концентрации клеток в растворе, соотношение полос поглощения варьируется в зависимости от соотношения клеток серобактерий, имеющих зеленую или коричневую окраску. Спектр накопительной культуры зеленых серных бактерий в длинноволновой области имеет более широкую полосу поглощения.

#### 4.4.3. Спектры оптической плотности экстрактов культур зеленых серных бактерий

Спектры оптической плотности экстрактов культур зеленых серных бактерий регистрировались относительно раствора ацетона и метанола в соотношении 7:2 в спектральном диапазоне 200-1000 нм.

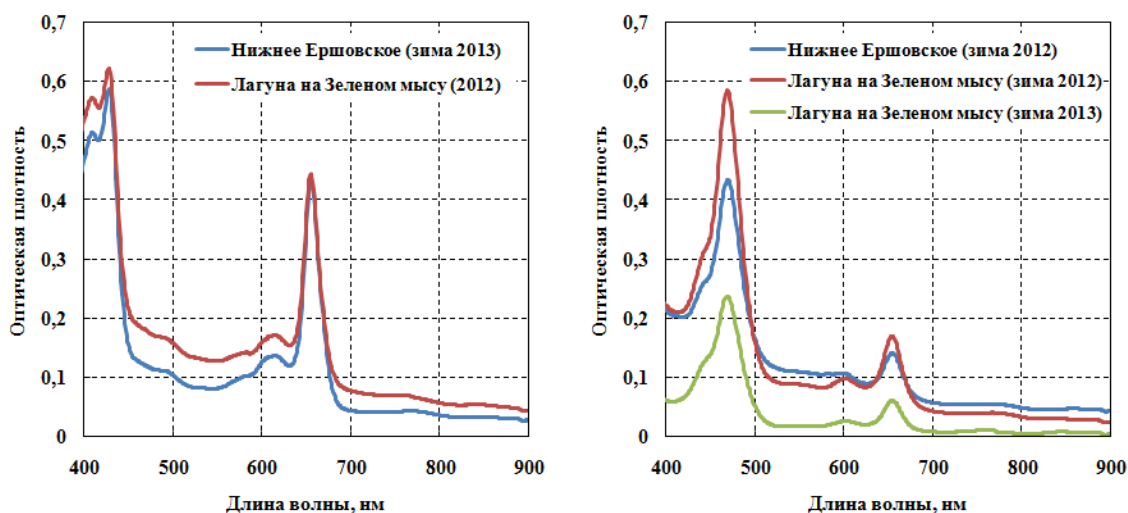
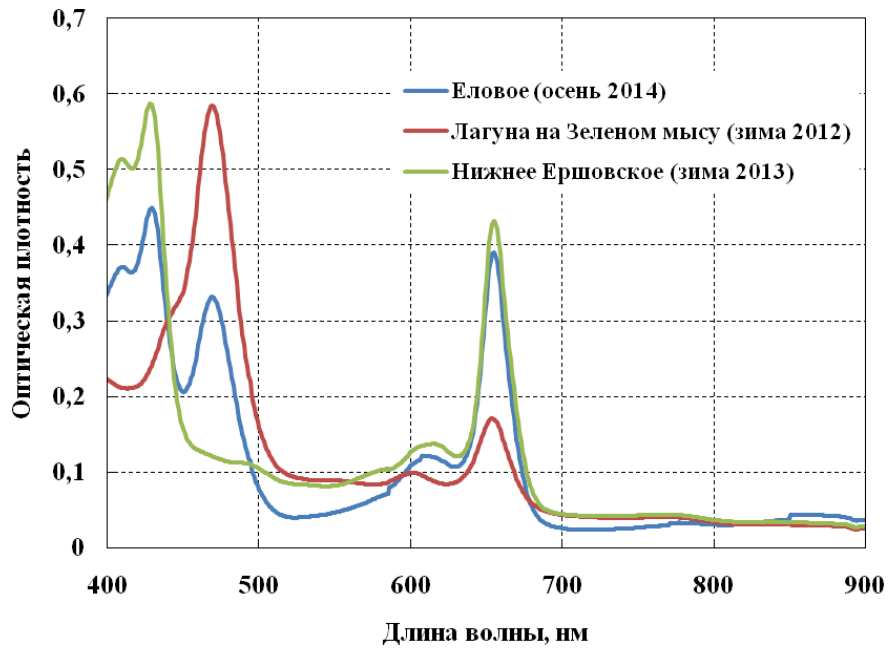


Рис. 14. Спектры поглощения экстрактов зеленоокрашенных (слева) и коричневоокрашенных (справа) зеленых серных бактерий.

Спектры поглощения экстрактов серобактерий одной окраски содержат два узких пика с максимумами в длинноволновой области 650-660 нм и коротковолновой – 420-480 нм. В длинноволновой области обе культуры имеют максимум на длине волны 555 нм, однако величина оптической плотности для зеленоокрашенных серобактерий была большей по сравнению с величиной оптической плотности коричневоокрашенных серобактерий одинаковой концентрации клеток в исходной культуре.

Коротковолновые полосы поглощения экстракты зеленоокрашенных и коричневоокрашенных зеленых серных бактерий имеют принципиальные отличия. Экстракты зеленоокрашенных зеленых серных бактерий имеют полосу поглощения с максимумом на длине волны 430 нм, соответствующую поглощению света БХл *d*. Экстракты коричневоокрашенных зеленых серных бактерий имеют полосу поглощения с максимумом на длине волны 470 нм, соответствующую поглощению света БХл *e*. Величина оптической плотности зависит от концентрации клеток зеленых серных бактерий в исходных культурах.



**Рис. 15.** Сравнение спектров поглощения экстрактов зеленоокрашенных (Нижнее Ершовское (зима 2013)) и коричневоокрашенных (лагуна на Зеленом мысу (зима 2012)) зеленых серных бактерий и экстракт накопительной культуры (Еловое (осень 2014)).

Для экстрактов накопительных культур зеленых серных бактерий характерны признаки, свойственные зеленоокрашенным и коричневоокрашенным зеленым серным бактериям одновременно. Величина оптической плотности длинноволнового максимума больше по сравнению с чистыми культурами бактерий одной окраски той же концентрации клеток в исходном растворе. В коротковолновой области спектр поглощения накопительной культуры содержит два максимума, соответствующие поглощению света БХл *d* и *e*.

## 4.5. Исследование зеленых серных бактерий флуоресцентным методом

### 4.5.1. Спектры флуоресценции культур зеленых серных бактерий

Спектры испускания флуоресценции культур зеленых серных бактерий были зарегистрированы при возбуждении длинами волн  $\lambda_{ex} = 390$  и  $440$  нм. В спектрах испускания всех трех культур (накопительной, зеленоокрашенной и коричневоокрашенной) обнаружены два максимума флуоресценции: в области  $740$ - $770$  нм и на длине волны  $815$  нм, соответствующие испусканию молекулами БХл  $c$ ,  $d$  и  $e$ .

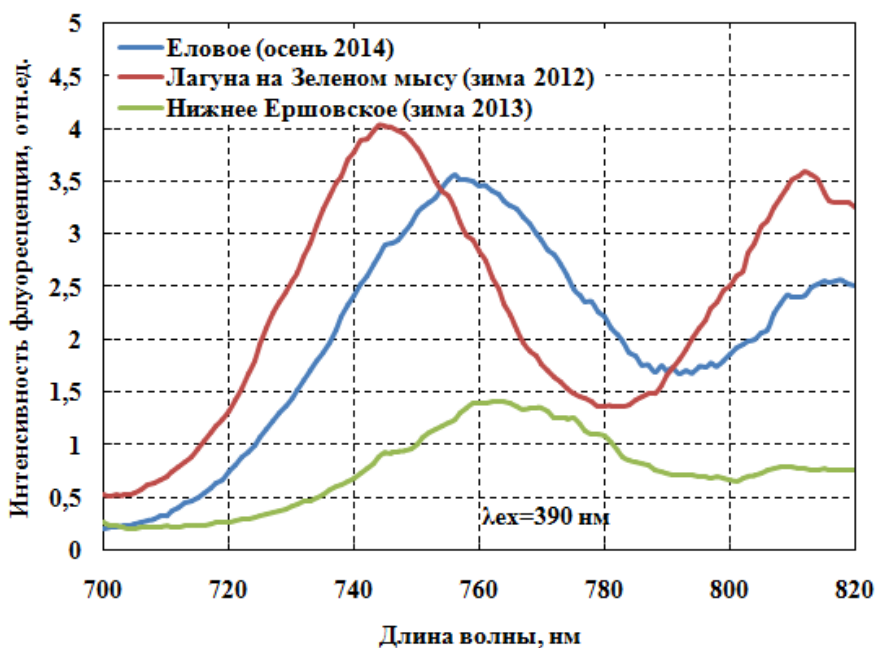


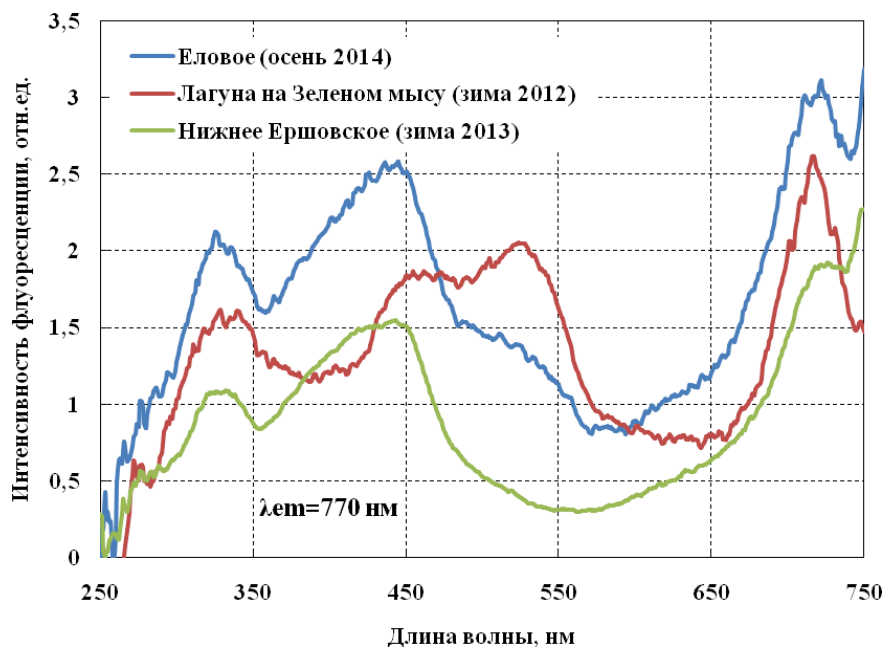
Рис. 16. Спектры испускания флуоресценции ( $\lambda_{ex}=390$  нм) культур зеленых серных бактерий: накопительной (Еловое (осень 2014)), коричневоокрашенной (Лагуна на Зеленом мысу (зима 2012)) и зеленоокрашенной (Нижнее Ершовское (зима 2013)).

Положение второго максимума в области  $815$  нм не зависел от культуры и присутствующих пигментов. Первый максимум флуоресценции зеленоокрашенных зеленых серных бактерий располагался на длине волны  $765$  нм, соответствующий испусканию флуоресценции пигмента БХл  $d$ . Данный максимум флуоресценции коричневоокрашенной культуры зеленых серных бактерий был зарегистрирован на длине волны  $745$  нм, соответствующий испусканию света БХл  $e$ .

В накопительной культуре зеленых серных бактерий присутствуют одновременно два пигмента — БХл  $d$  и  $e$ , в результате чего соответствующий максимум флуоресценции данной культуры расположен на длине волны  $758$  нм. По положению максимума была проведена оценка соотношения зеленоокрашенных и

коричневоокрашенных зеленых серных бактерий: в данной культуре присутствует  $(61,9 \pm 4,8)\%$  зеленоокрашенных зеленых серных бактерий.

Спектры возбуждения флуоресценции были зарегистрированы при длине волны испускания  $\lambda_{em} = 770$  и 815 нм. Для них характерны два максимума (рис. 17).



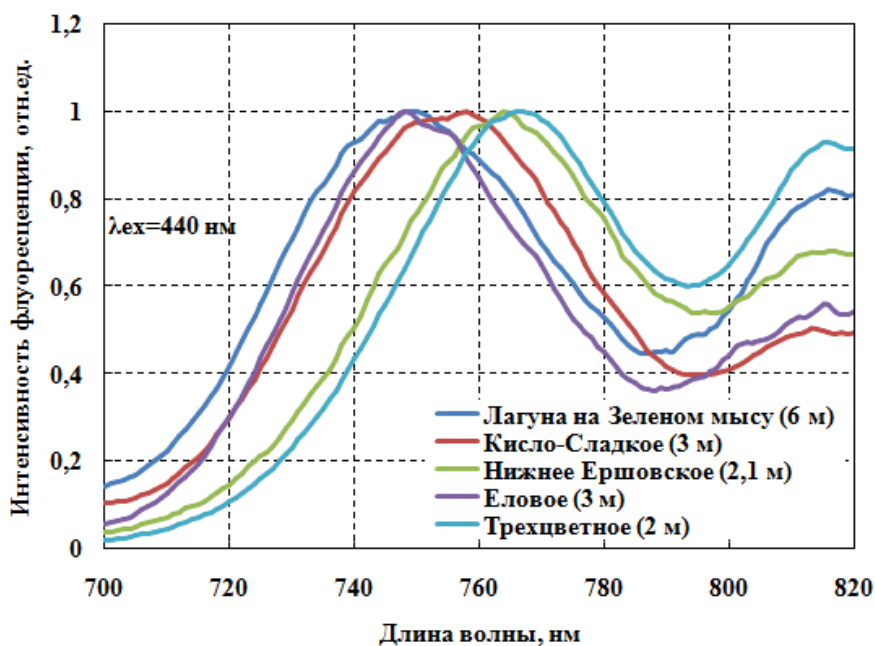
**Рис. 17.** Спектры возбуждения флуоресценции ( $\lambda_{em}=770$  нм) культур зеленых серных бактерий: накопительной (Еловое (осень 2014)), коричневоокрашенной (Лагуна на Зеленом мысу (зима 2012)) и зеленоокрашенной (Нижнее Ершовское (зима 2013)).

Длинноволновый максимум располагался на длине волны 720 нм независимо от типа измеряемой культуры. Зеленоокрашенная культура имеет один широкий максимум на длине волны 450 нм (БХл *d*), коричневоокрашенная – два максимума, 460 (БХл *e*) и 530 нм (каротиноиды). Спектры возбуждения флуоресценции накопительной культуры зеленых серных бактерий содержит все максимумы, характерные для зеленоокрашенных и коричневоокрашенных культур. По форме спектры возбуждения похожи на спектры оптической плотности культур бактерий.

#### **4.5.2. Спектры флуоресценции проб воды с зелеными серными бактериями**

Спектры испускания флуоресценции образцов воды из отделяющихся озер, содержащих зеленые серные бактерии, регистрировались при возбуждении  $\lambda_{ex} = 270, 410, 390$  и 440 нм. Так же, как и в культурах зеленых серных бактерий, спектры содержали максимумы в области 740-770 нм и на длине волны 815 нм, соответствующие флуоресценции БХл *c, d* и *e*. На рисунке 18 представлены спектры

испускания флуоресценции образцов воды из пяти озер с глубин, содержащих максимальную концентрацию зеленых серных бактерий (наиболее яркая окраска воды).



**Рис. 18. Спектры испускания флуоресценции образцов воды с зелеными серными бактериями (август-сентябрь 2014), нормированные на максимум.**

По спектрам испускания флуоресценции разложением максимума в области 740-770 нм на две составляющие (гауссианы с максимумами на длинах волн 745 и 765 нм) была проведена оценка относительной доли содержания зеленоокрашенных и коричневоокрашенных зеленых серных бактерий в образцах воды.

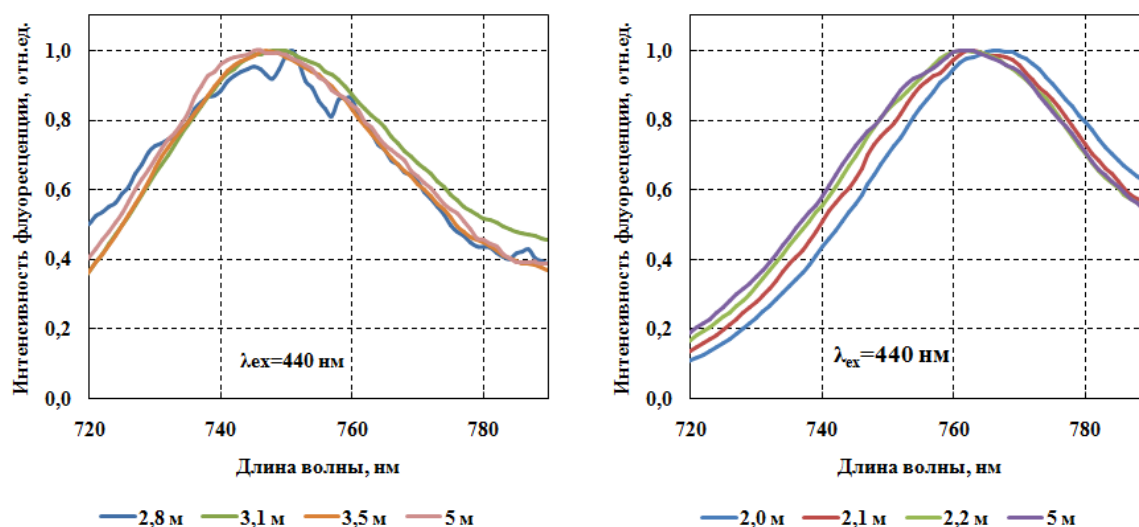
В озерах Трехцветном и Нижнем Ершовском на глубинах с максимальной концентрацией зеленых серных бактерий содержались только зеленоокрашенные зеленые серные бактерии –  $(98,0 \pm 2,0) \%$ .

В озере Кисло-Сладком на глубине 3 м содержалось примерно одинаковое количество зеленоокрашенных и коричневоокрашенных зеленых серных бактерий –  $(50,0 \pm 4,7) \%$ .

В лагуне на Зеленом мысу и озере Еловом преобладали коричневоокрашенные зеленые серные бактерии по сравнению с зеленоокрашенными –  $(61,0 \pm 2,8) \%$  в лагуне на Зеленом мысу и  $(61,7 \pm 2,5) \%$  в озере Еловом.

С увеличением глубины в озерах соотношение зеленоокрашенных и коричневоокрашенных зеленых серных бактерий меняется: чем больше глубина, тем больше коричневоокрашенных зеленых серных бактерий. В лагуне на Зеленом мысу,

озерах Кисло-Сладком и Нижнем Ершовском слой с бактериями находится у дна, поэтому соотношение не успевает измениться.



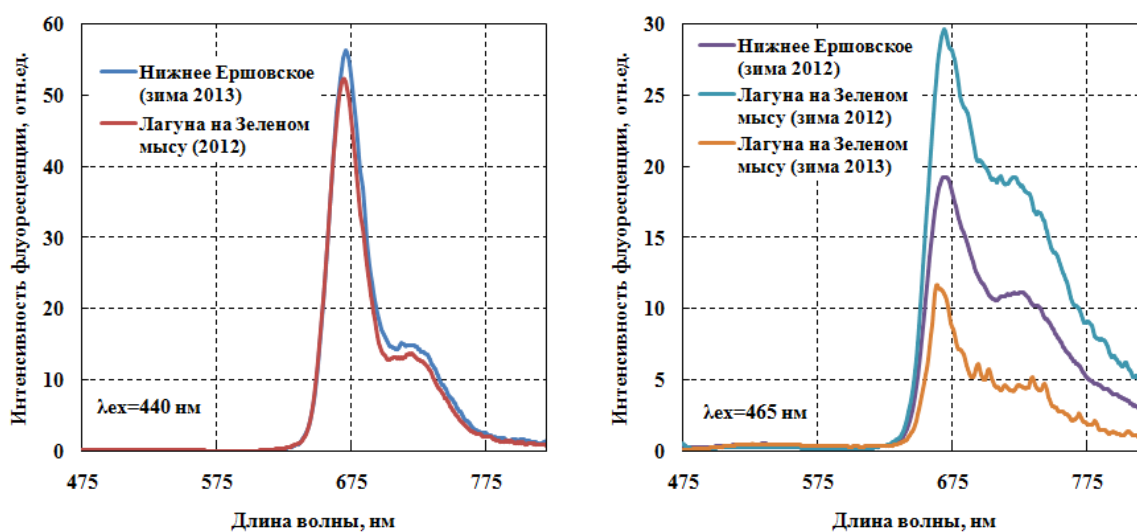
**Рис. 19. Спектры испускания флуоресценции ( $\lambda_{ex} = 440$  нм) образцов воды из озер Елового (слева) и Трехцветного (справа).**

В озере Еловом количество коричневоокрашенных зеленых серных бактерий увеличивается с  $(61,7 \pm 2,5)$  % на глубине с максимальной концентрацией аноксигенных микроорганизмов до  $(76,3 \pm 2,9)$  % у дна. В озере Трехцветном содержание зеленоокрашенных зеленых серных бактерий уменьшается с  $(98,0 \pm 2,0)$  % на глубине 2,0 м до  $(79,2 \pm 4,2)$  % на глубине 2,2 м, затем практически не меняется. Это связано с тем, что у БХл *d*, содержащегося в зеленоокрашенных зеленых серных бактериях, полосы поглощения расположены на большем расстоянии, чем у БХл *e*, содержащегося в коричневоокрашенных зеленых серных бактериях, поэтому коричневоокрашенным зеленым серным бактериям для осуществления процесса фотосинтеза нужно меньше света. В результате этого слои с зеленоокрашенными зелеными серными бактериями в водоемах расположены выше слоев с коричневоокрашенными зелеными серными бактериями.

#### **4.5.3. Спектры флуоресценции экстрактов зеленых серных бактерий**

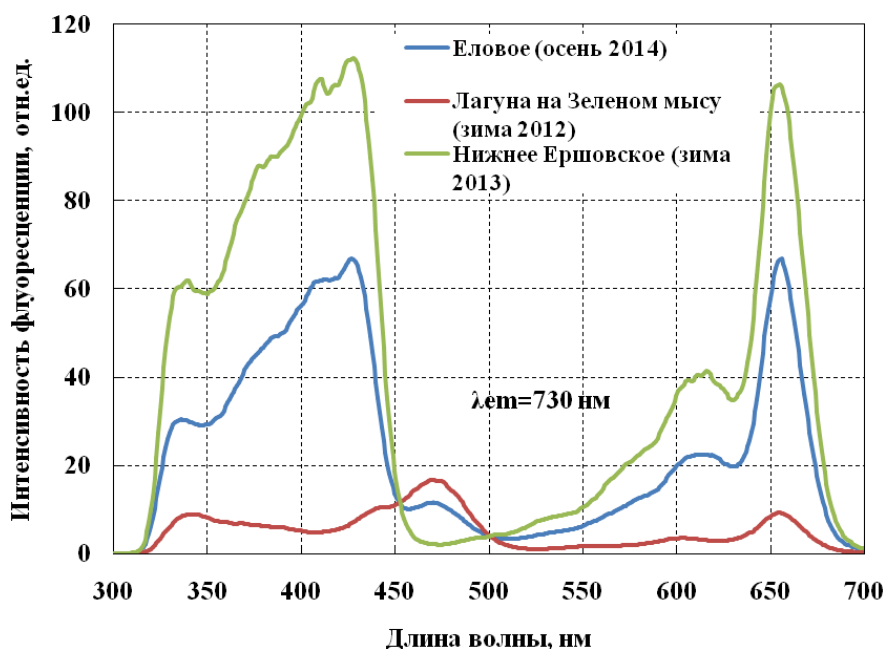
Спектры испускания флуоресценции экстрактов культур зеленых серных бактерий регистрировались при возбуждении длинами волн 440 (для зеленоокрашенных зеленых серных бактерий) и 465 нм (для коричневоокрашенных зеленых серных бактерий). Все спектры имеют два максимума флуоресценции не зависимо от длины волны возбуждения и типа бактерий: на длинах волн 670 и 721 нм. Соотношения максимумов

оказались разными для различных видов бактерий: для зеленоокрашенных зеленых серных бактерий оно было равно  $3,32 \pm 0,10$ , для коричневоокрашенных –  $1,92 \pm 0,05$ .



**Рис. 20. Спектры испускания флуоресценции экстрактов зеленых серных бактерий: зеленоокрашенных – слева, коричневоокрашенных – справа.**

Спектры возбуждения флуоресценции экстрактов зеленых серных бактерий были зарегистрированы при длине волны испускания  $\lambda_{em} = 670, 730$  и  $815$  нм. В длинноволновой области спектра все экстракты содержали максимумы на длинах волн  $615$  и  $655$  нм.



**Рис. 21. Спектры возбуждения флуоресценции ( $\lambda_{em}=730$  нм) экстрактов культур зеленых серных бактерий: накопительной (Еловое (осень 2014)), коричневоокрашенной (Лагуна на Зеленом мысу (зима 2012)) и зеленоокрашенной (Нижнее Ершовское (зима 2013)).**



Спектры содержат максимумы в коротковолновой области на длине волны 430 нм для экстрактов культур зеленоокрашенных зеленых серных бактерий и 475 нм для экстрактов культур коричневоокрашенных зеленых серных бактерий. Спектры возбуждения флуоресценции накопительной культуры зеленых серных бактерий содержат одновременно признаки наличия зеленоокрашенных и коричневоокрашенных зеленых серных бактерий и все соответственные максимумы флуоресценции.

#### 4.6. Распределение фотосинтетических пигментов по глубине в отделяющихся водоемах

Используя синхронные спектры флуоресценции (рис. 23) были построены вертикальные распределения фотосинтезирующих хлорофиллсодержащих микроорганизмов в озерах: содержание Хл *a* определялась по максимуму на длине волны  $\lambda = 685$  нм, фикоэритрина –  $\lambda = 595$  нм. Большую долю кислородных микроорганизмов составляли криптофитовые водоросли *Rhodomonas* sp. (соответствуют распределению фикоэритрина), их максимальная концентрация была обнаружена на глубине с самой интенсивной окраской воды (розового, почти красного цвета), в области хемоклина. Остальные кислородные фотосинтезирующие организмы расположены над данным слоем.

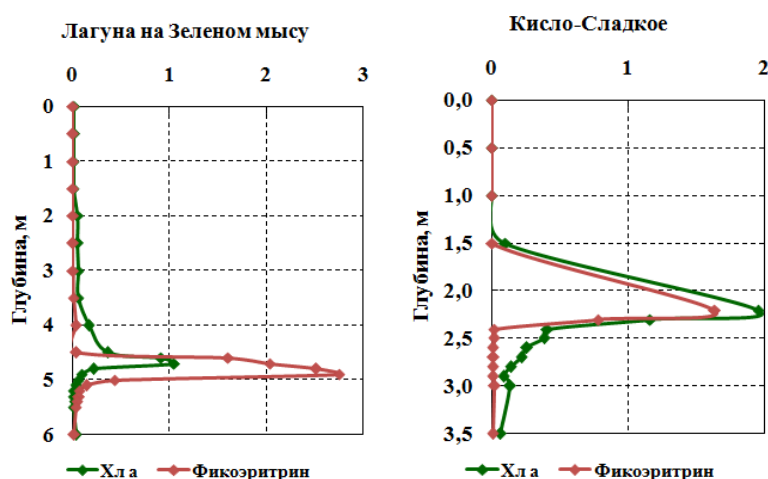


Рис. 25. Вертикальное распределение флуоресценции *Rhodomonas* и Хл в отделяющихся водоемах (август-сентябрь 2014).

По спектрам испускания флуоресценции ( $\lambda_{ex} = 440$  нм) были построены вертикальные распределения фотосинтезирующих пигментов в отделяющихся водоемах: Хл *a* – по максимуму на длине волны  $\lambda = 685$  нм, и БХл – по максимуму  $\lambda = 760$  нм. Используя разложения максимума в области 740-770 нм на две гауссианы, были рассчитаны относительные доли содержания БХл *d* и *e* в каждой измеряемой точке и построены их распределения по глубине (рис. 26). Области максимального содержания Хл *a* и БХл расположены на расстоянии от 0,2 до 1,5 м друг от друга, что говорит о том, что кислородные и анакислородные микроорганизмы обитают в разных слоях воды в озере, разделенных слоем, практически не содержащим микроорганизмы. С увеличением глубины доля коричневоокрашенных зеленых серных бактерий в водоемах увеличивается по сравнению с зеленоокрашенными зелеными серными бактериями.

Максимальное содержание БХЛ, а значит и анаэробных микроорганизмов, было обнаружено в слое с наиболее интенсивной окраской воды (зеленого цвета или цвета хаки).

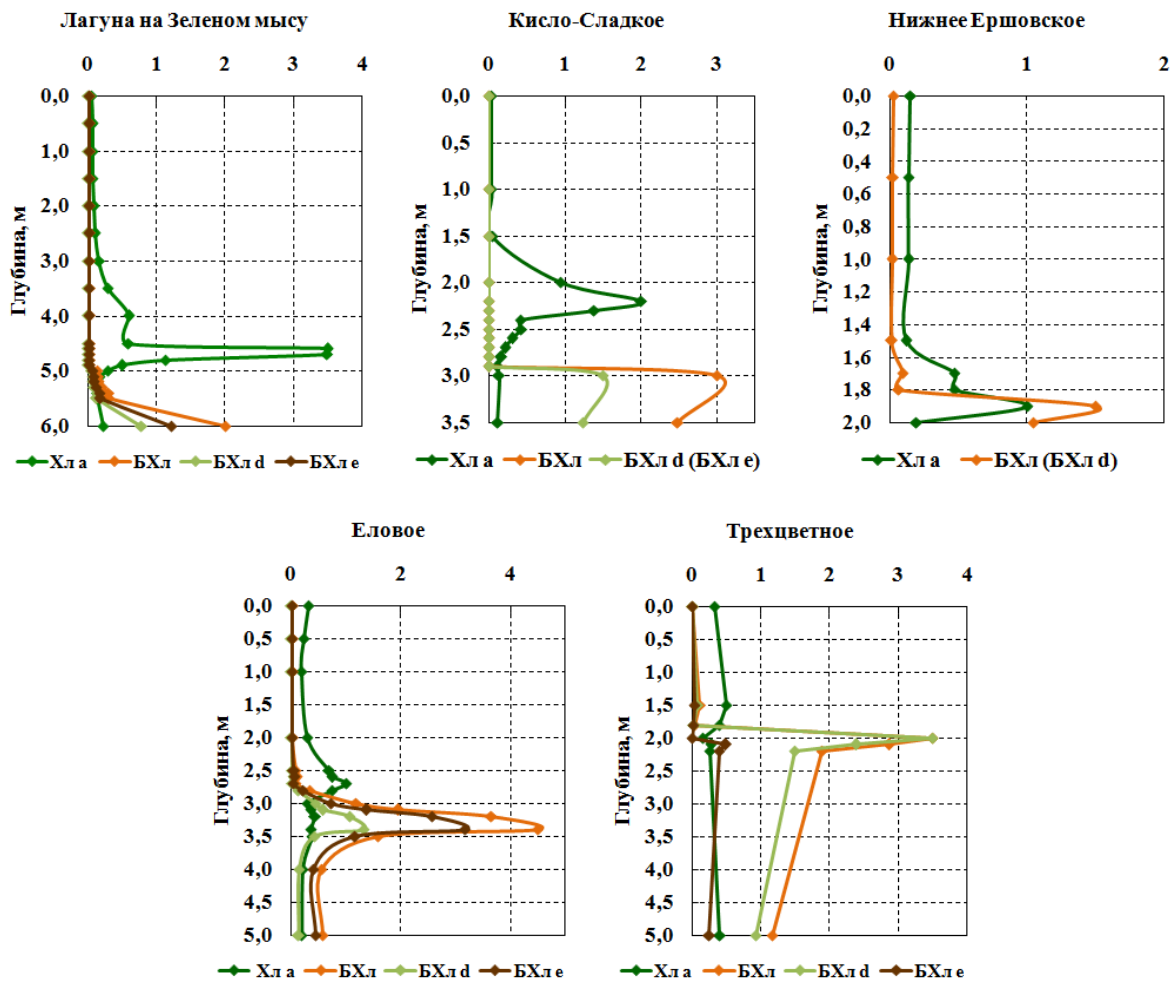


Рис. 26. Вертикальное распределение флуоресценции Xла и БХЛ (БХЛ d и e) в отделяющихся водоемах (август-сентябрь 2014).

## 5. Основные результаты и выводы

В работе исследованы спектрально-люминесцентные свойства двух типов микроорганизмов - криптофитовых водорослей и зелёных серных бактерий, обитающих в отделяющихся водоёмах Кандалакшского залива Белого моря. Измерения проводились как для проб воды, отобранных в период с марта 2013 г. по сентябрь 2014 г. из пяти отделяющихся водоёмов Кандалакшского залива Белого моря, так и для накопительных и чистых культур зелёных серных бактерий из этих же водоёмов в виде суспензий в воде и ацетоновых экстрактов. Спектры флуоресценции криптофитовых водорослей из отделяющихся озёр Кандалакшского залива изучены впервые.

Как показали измерения физико-химических характеристик воды, изученные водоёмы имеют признаки меромиксиса - четкую вертикальную стратификацию, разделение толщи воды на верхний опресненный слой, хемоклин и нижний солёный слой. Каждый слой воды характеризуется спектральными характеристиками, практически не изменяющимися в течение годового цикла наблюдения. В переходном слое - хемоклине - наблюдается резкое изменение температуры, солёности, среда становится более кислой, количество растворенного кислорода и освещение становятся минимальными. Данный слой воды может иметь зелёную (оз. Трёхцветное, Нижнее Ершовское), коричневую (оз. Еловое) или розовую (оз. Кисло-Сладкое, лагуна на Зелёном мысу) окраску, обусловленную наличием пигментированных микроорганизмов. Сероводород появляется ниже хемоклина, и его концентрация увеличивается с глубиной.

Проведена идентификация основных полос в спектрах поглощения и флуоресценции проб природной воды с микроорганизмами. Спектры оптической плотности образцов воды с криптофитовыми водорослями *Rhodomonas* sp. содержат полосы поглощения света хлорофиллом *a* (670 нм) и фикоэритрином (500-600 нм). В спектрах флуоресценции образцов воды с криптофитовыми водорослями *Rhodomonas* sp. максимум на длине волны  $\lambda = 590$  нм соответствует испусканию фикоэритрином. Спектры оптической плотности образцов воды с зелёными серными бактериями содержат полосы поглощения света бактериохлорофиллами *c*, *d* и *e* (710-725 нм) и каротиноидами (400-500 нм). В спектрах флуоресценции образцов воды с зелёными серными бактериями максимумы на длинах волн  $\lambda = 770$  и 820 нм соответствуют испусканию бактериохлорофиллами *c*, *d* и *e*.

Исследованы чистые культуры зеленоокрашенных и коричневоокрашенных зеленых серных бактерий. По спектрам поглощения ацетон-метанольных экстрактов установлено, что основным пигментом зеленоокрашенных зеленых серных бактерий является бактериохлорофилл *d* (430 нм), коричневоокрашенных – бактериохлорофилл *e* (470 нм). Экстракты накопительных культур бактерий и образцов воды содержат обе полосы поглощения. По спектрам флуоресценции культур зеленых серных бактерий определены полосы испускания бактериохлорофиллом *d* (765 нм) и *e* (747 нм). В накопительных культурах и образцах воды максимум испускания зависит от соотношения концентраций различных видов бактериохлорофилла.

Проведены количественные оценки концентрации микроорганизмов. По спектрам флуоресценции построены профили вертикального распределения фотосинтетических пигментов водорослей и зеленых серных бактерий, которые отражают распределение микроорганизмов по глубине в исследованных водоёмах. Рассчитаны относительные доли зеленоокрашенных и коричневоокрашенных зеленых серных бактерий в водоёмах на глубине с максимальным содержанием микроорганизмов.

Выражаю благодарность кандидату биологических наук, старшему научному сотруднику Беломорской биологической станции МГУ *Красновой Елене Дмитриевне* и кандидату биологических наук, старшему научному сотруднику лаборатории биоинформатики Института проблем передачи информации РАН *Воронову Дмитрию Анатольевичу* за проведение экспедиций по изучению отделяющихся водоёмов и помощь в отборе проб, а также другим *сотрудникам Беломорской биологической станции имени Н.А.Перцова МГУ им. М.В.Ломоносова* за предоставленную возможность работы на биостанции.

Благодарю кандидата биологических наук, младшего научного сотрудника Института микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН *Лунину Ольгу Николаевну* за предоставленные для спектральных измерений чистые и накопительные культуры зеленых серобактерий.

## Список литературы

1. Труды Института микробиологии имени С.Н. Виноградского: Вып. 15: Фотосинтезирующие микроорганизмы / Ин-т микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН. Отв. редактор В.Ф. Гальченко. – М.: МАКС Пресс, 2010. – 352 с. ISBN 978-5-317-03436-8
2. Л.В. Ладыгина. Микроводоросль *Rhodomonas salina* – перспективный кормовой объект в аквакультуре моллюсков //Экология и мир, 81, с. 50-52, 2010.
3. Camacho A. On the occurrence and ecological features of deep chlorophyll maxima (DCM) in Spanish stratified lakes. // Limnetica. 2006. V. 25(1–2). P. 453–478.
4. Lee R.E. Phycology. Cambridge University Press, 2008. – 547 p.
5. Knapp C.W., deNoyelles F., Graham D.W. Physical and chemical conditions surrounding the diurnal vertical migration of *Cryptomonas* spp. (Cryptophyceae) in a seasonally stratified midwestern reservoir (USA). // J. Phycol. 39: 855-861, 2003.
6. Е.Д. Краснова, А.Н. Пантюлин, Д.Н. Маторин, Д.А. Тодоренко, Т.А. Белевич, И.А. Милютина, Д.А. Воронов. Цветение криптофитовой водоросли *Rhodomonas* sp. (Cryptophyta, Pyrenomonadaceae) в редокс-зоне водоемов, отделяющихся от Белого моря. Микробиология, том 83, № 3, с. 346-354, 2014.
7. Kharcheva A. V. Fluorescence intensities ratio F685/F740 for maple leaves during seasonal color changes and with fungal infection //Saratov Fall Meeting 2013. – International Society for Optics and Photonics, 2014. – P. 90310S-90310S-6.
8. G. Britton. The Biochemistry of Natural Pigments. Cambridge University Press, 1983. – 422 p.
9. Клейтон Р. Фотосинтез. Физические механизмы и химические модели. М., Мир, 1984.
10. Котелевцев С.В., Маторин Д.Н., Садчиков А.П. Эколого-токсикологический анализ растительных сообществ в водных экосистемах: Учеб.-Метод. Пособие. – М.: Альтекс, 2012.
11. A.J. Lewitus, D.A. Caron. Effects of light and glycerol on the organization of the photosynthetic apparatus in the facultative heterotroph *Pyrenomonas salina* (Cryptophyceae). J. Phycol. 27, 578-587, 1991.
12. Chlorophyll *a* Fluorescence: A Signature of Photosynthesis (Advances in Photosynthesis and Respiration). /Ed. G.C. Papageorgiou, Govindjee. Dordrecht, The Netherlands, Springer, 2004.

13. Y. Hirai, Y. Saga. NMR spectroscopic studies of light-harvesting bacteriochlorophylls purified from green sulfur photosynthetic bacteria // *Kinki University Series on Quantum Computing – vol.6: Quantum Information and Quantum Computing* 155-159, 2013. ISBN 978-981-4425-21-6
14. J. Oelze. Analysis of Bacteriochlorophylls, *Methods in Microbiology* 18: 257-284, 1985. ISBN 0-12-521518-5
15. C. Cohen. *Chemicals from Microalgae* / CRC Press, 1999. – 419 p.
16. Проблемы ранней эволюции фотосинтеза. Отв. ред. В.М. Горленко, С.В. Рожнов. Серия «Геобиологические процессы в прошлом». Москва, ПИН РАН, 2011. 218 с. ISBN 978-5-903825-20-2
17. J. Overmann. The Family Chlorobiaceae, *The Prokaryotes* 7: 359-378, 2006.
18. Y. Mori, T. Kataoka, T. Okamura, R. Kondo. Dominance of green sulfur bacteria in the chemocline of the meromictic Lake Suigetsu, Japan, as revealed by dissimilatory sulfite reductase gene analysis // *Arch. Microbiol.* 195: 303-312, 2013.
19. K.S. Habicht, M. Miller, R.P. Cox, N.U. Frigaard, M.G. Falkenby, J.S. Andersen. Comparative proteomics and activity of a green sulfur bacterium through the water column of Lake Cadagno, Switzerland // *Environmental Microbiology* 13(1): 203-215, 2011.
20. L.H. Gregersen, D.A. Bryant, N.U. Frigaard. Mechanisms and evolution of oxidative sulfur metabolism in green sulfur bacteria // *Frontiers in Microbiology* 2: 116, 2011.
21. D.M. Karl. Hidden in a sea of microbes // *Nature*, vol. 415: 690-691, 2002.
22. C. Holkenbrink, S.O. Barbas, A. Møllerup, H. Otakit, N.U. Frigaard. Sulfur globule oxidation in green sulfur bacteria is dependent on the dissimilatory sulfite reductase system // *Microbiology*, 157: 1229-1239, 2011.
23. P.G. Adams, A.J. Cadby, B. Robinson, Y. Tsukatani, M. Tank, J. Wen, R.E. Blankenship, D.A. Bryant, C. Neil Hunter. Comparison of the physical characteristics of chlorosomes from three different phyla of green phototrophic bacteria, *Biochimica et Biophysica Acta* 1827: 1235-1244, 2013.
24. J.M. Olson. Chlorophyll Organization and Function in Green Photosynthetic Bacteria, *Photochemistry and Photobiology* 67 (1): 61-75, 1998.
25. J. Kuo-Hsiang Tang, S.K. Saikin, S.V. Pingali, M.M. Enriquez, J. Huh, H.A. Frank, V.S. Urban, A. Aspuru-Guzik. Temperature and carbon assimilation regulate the chlorosome biogenesis in green sulfur bacteria // *Biophysical Journal* 105: 1346-1356, 2013.

26. T. Fujita, J.C. Brookes, S.K. Saikin, A. Aspuru-Guzik. Memory-assisted excitation diffusion in the chlorosome light-harvesting antenna of green sulfur bacteria // *J. Phys. Chem. Lett.* 3 (17): 2357-2361, 2012.
27. S. Masuda, J. Harada, M. Yokono, Y. Yuzawa, M. Shimojima, K. Murofushi, H. Tanaka, H. Masuda, M. Murakawa, T. Haraguchi, M. Kondo, M. Nishimura, H. Yuasa, M. Noguchi, H. Oh-oka, A. Tanaka, H. Tamiaki, H. Ohta. A monogalactosyldiacylglycerol syntase found in the green sulfur bacterium *Chlorobaculum tepidum* reveals important roles for galactolipids in photosynthesis // *The Plant Cell* 23 (7): 2644-2658, 2011.
28. H. Tamiaki, J. Komada, M. Kunieda, K. Fukai, T. Yoshitomi, J. Harada, T. Mizoguchi. In vitro synthesis and characterization of bacteriochlorophyll-*f* and its absence in bacteriochlorophyll-*e* producing organisms, *Photosynth Res* 107: 133-138, 2011. DOI 10.1007/s11120-010-9603-3
29. J. Overmann, F. Garcia-Pichel. The phototrophic way of life. In: M. Dworkin et al. (eds.) *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, 3-rd edition, Springer, New York, 2000.
30. S.C.M. Otte, J.C. van der Heiden, N. Pfennig, J. Amesz. A comparative study of the optical characteristics of intact cells of photosynthetic green sulfur bacteria containing bacteriochlorophyll c, d or e // *Photosynthesis Research* 28: 77-87, 1991.
31. M.F. Hohmann-Marriott, R.E. Blankenship. Variable fluorescence in green sulfur bacteria, *Biochimica et Biophysica Acta* 1767: 106-113, 2007.
32. Медведев С.С. Физиология растений: учебник. – СПб.: БХВ-Петербург, 2012. – 512 с. ISBN 978-5-9775-0716-5
33. M. Becker, M.T. Stubbs, R. Hubber. Crystallization of phycoerythrin 545 of *Rhodomonas lens* using detergents and unusual additives // *Protein Science* (1998), 7: 580-586.
34. Т.А. Худякова, А.П. Крешков. Теория и практика кондуктометрического и хронокондуктометрического анализа. М.: Химия, 1976. – 304 с.
35. А.Г. Муравьев. Руководство по определению показателей качества воды полевыми методами. Третье издание, доп. и перераб. – СПб.: «Крисмас+», 2004. – 248 с. ISBN 5-89495-113-5
36. Горшкова О.М., Зайцев Н.К., Слипечук М.В., Шорин С.В., Чевель К.А. Определение сульфид-аниона методом ионометрии в морской воде с повышенным содержанием сероводорода // *Наука, образование, общество:*



- тенденции и перспективы: Сборник научных трудов по материалам Международной научно-практической конференции 1 августа 2014 г. В 3 частях. Часть II. М.: "АР-Консалт", 2014 г. - 158 с. — 2014. — С. 100–104.
37. N. Pfennig, K.D. Lippert. Über das Vitamin B<sub>12</sub>-Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien // Arch. Mikrobiol. 1966. V. 55. P. 245–256.
38. О.Н. Лунина, А.С. Саввичев, Б.Б. Кузнецов, Н.В. Пименов, В.М. Горленко. Аноксигенные фототрофные бактерии стратифицированного озера Кисло-Сладкого (Кандалакшский залив Белого моря). Микробиология, 2014, том 83, № 1, с. 90-108.
39. Л.В. Левшин, А.М. Салецкий. Оптические методы исследования молекулярных систем. Издательство Московского университета, 1994.
40. A.V. Kharcheva, A.V. Meschankin, I.I. Lyalin, E.D. Krasnova, D.A. Voronov, S.V. Patsaeva. The study of coastal meromictic water basins in the Kandalaksha Gulf of the White Sea by spectral and physicochemical methods // Proc. SPIE 9031, Saratov Fall Meeting 2013: Optical Technologies in Biophysics and Medicine XV; and Laser Physics and Photonics XV, 90310T (January 30, 2014); DOI: 10.1117/12.2051737
41. Е.Д. Краснова, Д.А. Воронов, А.Д. Воронова. Роль вымораживания рассола из морского льда в формировании вертикальной стратификации в водоёмах, отделяющихся от Белого моря // Геология морей и океанов: Материалы XX Международной научной конференции (Школы) по морской геологии. Т. III. – М.: ГЕОС, 2013. – 424 с.