

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

ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра общей физики

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА
Спектральное исследование аноксигенных фотосинтезирующих бактерий в
стратифицированных водоемах

Выполнила студентка
405 группы
Жильцова Анна Александровна

Научный руководитель:
доцент Пацаева С.В.

Допущена к защите «__»

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

Москва
2017

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	3
Глава 1. Аноксигенные фототрофные бактерии и спектральный анализ их пигментного состава (обзор литературы).....	5
1.1. Биологические характеристики и места обитания аноксигенных фототрофов. Стратифицированные водоемы	5
1.2. Пигментный состав аноксигенных фототрофов	7
1.3. Строение фотосинтетического аппарата зеленых серных бактерий.....	9
1.4. Спектры поглощения и флуоресценции зеленых серобактерий	11
Глава 2. Объекты и методы исследования.....	15
2.1. Объекты изучения	15
2.2. Приборы гидрохимического анализа	15
2.3. Спектральное оборудование и методика спектральных измерений ..	16
2.4. Измерение концентрации бактериохлорофиллов методом абсорбционной спектроскопии ацетон-метаноловых экстрактов	18
Глава 3. Экспериментальные результаты и их обсуждение	19
3.1. Исследование чистых культур зеленых серобактерий методом абсорбционной спектроскопии.....	19
3.2. Исследование чистых культур зеленых серобактерий флуоресцентным методом.....	21
3.3. Аппроксимация полос поглощения чистых культур зеленых серобактерий математическими функциями.....	24
3.4. Исследование проб природной воды методом абсорбционной спектроскопии	25
3.5. Исследование проб природной воды флуоресцентным методом	30
3.6. Сравнение результатов, полученных спектральными методами, с физико-химическими характеристиками водоемов	35
3.7. Оценка количества бактериохлорофилла в одной клетке зеленых серобактерий разного типа.....	40
ЗАКЛЮЧЕНИЕ. ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ	41
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	45

ВВЕДЕНИЕ

Спектрально-оптические методы широко используются в экологических исследованиях водных экосистем. Важность экологического мониторинга водоемов возникает при решении таких практических задач, как строительство приливных электростанций, дамб, мостов и других гидротехнических сооружений, приводящее к отделению некоторых акваторий от моря. В результате изоляции соленых водоемов, искусственной или природной, их экосистема претерпевает катастрофические изменения – возникают застойные явления, поверхностный слой воды постепенно опресняется, а в придонной воде возникает дефицит кислорода и сероводородное заражение. Смена условий обитания приводит не только к изменению физико-химических характеристик водоема, но и вымиранию одних видов организмов и развитию других, что влечет за собой резкую смену экологии акватории. Возникает интерес к природе возникновения и развитию процессов, происходящих в водоеме. Так как в настоящее время для дистанционного контроля окружающей среды широко используются спектральные методы, благодаря таким преимуществам как высокая чувствительность, быстрота и возможность их применения непосредственно в среде, то актуальной задачей спектроскопии является изучение спектральных характеристик разных типов водных микроорганизмов.

Особый интерес для изучения в водоемах с нарушенным режимом циркуляции воды представляют аноксигенные фототрофные микроорганизмы – зеленые серные бактерии (ЗСБ), широкое распространение которых обусловлено возможностью использовать при фотосинтезе сероводород вместо воды. Благодаря уникальному фотосинтетическому аппарату, а именно наличию фотосинтетических пигментов – бактериохлорофиллов и каротиноидных пигментов, микроорганизмы обладают особыми спектральными характеристиками, по

которым становится возможным их обнаружение и анализ с помощью спектральных приборов.

Исследуемые в работе отделяющиеся водоемы Белого моря составляют особую группу гидрологических объектов. Их возникновение и эволюция связаны с подъемом берегов Кандалакшского залива со скоростью около 0,5 - 4 мм/год [1,2]. В результате этого небольшие заливы и проливы обособляются и теряют связь с морем. Всего насчитывается от десятков до сотен подобных водоемов, находящихся в разной стадии отделения, в которых под влиянием внешних воздействий сформировалась своя стратифицированная структура.

Основной целью данной работы являлось подробное исследование с помощью спектральных методов типичных аноксигенных фотосинтезирующих микроорганизмов близлежащих к Белому морю водоемов с высокой стратификацией. Для выполнения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи: измерить спектры поглощения и спектры флуоресценции с несколькими длинами волн возбуждающего света для чистых культур бактерий, выделенных из исследуемых озер; выбрать спектральные характеристики, обеспечивающие наиболее информативные данные при анализе фототрофных бактерий в природной воде; на основе полученных данных и разработанных методов провести спектральные измерения и анализ проб природной воды из нескольких водоемов Кандалакшского залива Белого моря, сравнить результаты экспериментов и обработки спектральных данных с гидрохимическими характеристиками водоема.

Глава 1. Аноксигенные фототрофные бактерии и спектральный анализ их пигментного состава (обзор литературы)

В соответствии с имеющимися на сегодняшний день литературными данными флуоресценция бактериохлорофилла, как фотосинтетического пигмента аноксигенных бактерий, мало изучена по сравнению с хлорофиллом. Это можно объяснить тем, что в современных экосистемах кислородный фотосинтез является преобладающим. Однако существуют доказательства, что аноксигенные бактерии, образующие бактериохлорофиллы, появились прежде кислородных бактерий, образующих хлорофиллы [3]. Более того, зеленые серные бактерии являются самыми древними фотосинтезирующими организмами, существующими в настоящее время [4]. Таким образом, спектральные исследования данных микроорганизмов могут быть полезными не только с практической точки зрения, но и для понимания процессов эволюции фотосинтеза в целом.

1.1. Биологические характеристики и места обитания аноксигенных фототрофов. Стратифицированные водоемы

Фототрофные, или фотосинтезирующие, бактерии — типично водные микроорганизмы, способные преобразовать электромагнитную энергию света в энергию химических связей и в дальнейшем использовать ее для осуществления клеточного метаболизма и роста. В зависимости от типа протекаемого в клетках бактерий фотосинтеза различают кислородные и аноксигенные фототрофы. Кислородный фотосинтез, подобно фотосинтезу в клетках растений, сопровождается выделением кислорода с использованием воды в качестве донора электронов, аноксигенный фотосинтез протекает без выделения кислорода, донорами электронов в этом случае чаще всего являются водород и сульфиды [3]. Зеленые серные бактерии (ЗСБ) являются аноксигенными фототрофами, размеры которых сравнительно малы и составляют $0.7-1 \times 0.8-1.6$ мкм. Свое название они получили из-за наиболее распространенной окраски и характерных внутриклеточных процессов.

Обобщенная формула фотосинтеза в клетках серобактерий имеет вид:



Серобактерии выделяются своей способностью жить при чрезвычайно низкой интенсивности света, недоступной для фотосинтеза других фотосинтезирующих организмов. Эта особенность определила их широкое распространение. Места обитания фототрофных бактерий нередко легко обнаружить, т.к. в результате их массового развития меняется цвет всей воды в водоеме, или отдельные ее слои становятся окрашенными. На сегодняшний день фототрофные серные бактерии обнаружены на глубине 80 метров в Черном море, в озере Вехтен (Lake Vechten) в Нидерландах, в Испании (Lake Ciso), в озерах Шира и Шунет в Хакасии, проведены исследования фототрофов в горячих источниках и озерах Японии и США [5,2].

Согласно литературным данным ЗСБ встречаются в тех акваториях, которые имеют анаэробную зону, содержащую восстановленные соединения серы и доступную солнечному свету. Для формирования такой зоны необходимо наличие у водоема определенной структуры, препятствующей вертикальному перемешиванию его слоев.

Наиболее устойчивая стратификация может быть обеспечена изменением с глубиной плотности воды, которая связана с концентрацией растворенных в ней веществ. Озера, обладающие этим свойством, называют меромиктическими. Повышенное содержание растворенных веществ в придонных слоях меромиктических водоемов может быть обусловлено различными причинами: возможно наличие подземных минерализованных источников или подстилающих горных пород, в водоем может осуществляться сток химических и бытовых веществ. Через меромиктическую стадию проходят и прибрежные водоемы при отделении их от моря. В таких акваториях верхний слой, обладающий меньшей плотностью по сравнению с наполненным морской водой нижним слоем, образовывается за счет опреснения от осадков и подземных вод. В отличие от

эстуариев, где тоже смешивается пресная вода с морской, градиент солености в отделяющихся от моря водоемах направлен не по горизонтали, а по вертикали [2]. В озерах и лагунах «цветная полоса» бактерий, как правило, находится на границе окисленного и сероводородного слоев на глубине 2-20 м, однако в зависимости от времени года ее положение может меняться [6].

1.2. Пигментный состав аноксигенных фототрофов

Способность фототрофных бактерий к фотосинтезу, как и у растений, определяется наличием специальных окрашенных веществ — пигментов, которые поглощают свет определенного спектрального диапазона. Часть солнечного света, не поглощаемая пигментами, отражается и обуславливает видимую окраску клеток. Фотосинтетическими пигментами бактерий являются бактериохлорофиллы (Бхл), состав которых отличается от хлорофиллов растений. Известны шесть видов Бхл: *a*, *b*, *c*, *d*, *e* и *g*, из которых выделяют, присутствующие в клетках аноксигенных фототрофов, так называемые хлоросом-хлорофиллы или хлоробиум хлорофиллы (Бхл *c*, *d* и *e*) и Бхл *a*. Среди перечисленных фотосинтетических пигментов наиболее распространенным является Бхл *a*, он найден во всех типах ЗСБ и в большинстве пурпурных бактерий. Для Бхл *a*, радикалом R является фитил, Бхл *c*, *d* и *e* в клетках аноксигенных фототрофов представляют собой смесь нескольких гомологов, радикалы которых представлены в таблице 1.

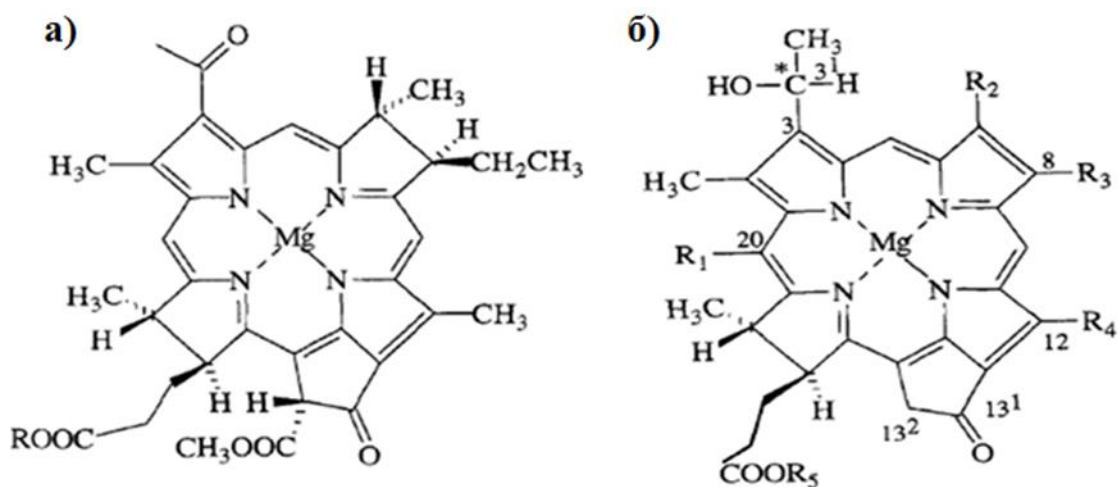


Рис.1. Структура молекул а) Бхл *a* и б) хлоросом-хлорофиллов (Бхл *c*, *d* и *e*) [7].

Табл. 1. Различные составляющие бактериохлорофиллов, характерные для ЗСБ [7].

Бхл	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
<i>c</i>	-CH ₃	-CH ₃	-C ₂ H ₅ -C ₃ H ₇ -C ₄ H ₉	-C ₂ H ₅ -CH ₃	фарнезил (91%) фитил (3%)
<i>d</i>	-H	-CH ₃	-C ₂ H ₅ -C ₃ H ₇ -C ₄ H ₉ -C ₅ H ₁₁	-C ₂ H ₅ -CH ₃	фарнезил (major)
<i>e</i>	-CH ₃	-CHO	-C ₂ H ₅ -C ₃ H ₇ -C ₄ H ₉	-C ₂ H ₅	фарнезил (major)

По сравнению с хлорофиллами растений Бхл поглощают свет в более длинноволновой области. Так, зеленые бактерии абсорбируют свет примерно до 850 нм. Считается, что хлорофиллы со сдвинутым в длинноволновую область поглощением возникли в результате эволюции соответствующих микроорганизмов в ходе конкуренции за световые ресурсы [4]. Кроме хлорофиллов, все фототрофные бактерии содержат пигменты каротиноиды, основной функцией которых является прямая передача поглощенной солнечной энергии на Бхл в синем и зеленом спектральном диапазоне. ЗСБ бывают двух типов: зеленоокрашенные, содержащие Бхл *c* и *d* и каротиноид хлоробактин (моноциклическое соединение с ароматическим кольцом), и коричневоокрашенные, содержащие Бхл *e* и каротиноид изорениератин (имеющий два ароматических кольца). Присутствие того или иного типа микроорганизмов в среде зависит от ряда условий и может меняться в зависимости от состояния водоема и внешних факторов [5].

1.3. Строение фотосинтетического аппарата зеленых серных бактерий

Фотосинтетические пигменты бактерий - бактериохлорофиллы - располагаются в специальных свето-собирающих комплексах – хлоросомах, плотно прижатых к внутренней стороне цитоплазматической мембраны клетки. Размеры и толщина хлоросом зависят от вида клеток, их стадии развития и условий роста. Обычно хлоросомы серных бактерий имеют длину около 150 нм и ширину от 30 до 60 нм. Все хлоросомы состоят из ядра и 2-3 нм оболочки (см. рис.2). В свою очередь ядро представляет собой 10-30 стержневых элементов, сформированных в основном из бактериохлорофиллов. В одной такой фотосинтетической единице ЗСБ может содержаться от 900 до 4500 хлоросом-хлорофилл молекул (в хлоросоме) и около 80-250 молекул Бхл *a*, которые передают энергию возбуждения на реакционный

центр, включенный в цитоплазматическую мембрану клетки. Для сравнения, фотосинтетическая единица зеленой нитчатой бактерии (*green filamentous bacterium*) содержит

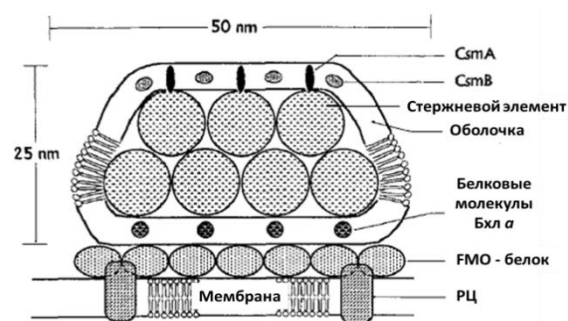


Рис.2. Модель антенной системы ЗСБ [7].

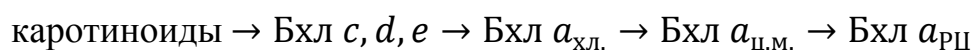
100-200 молекул Бхл *c* в хлоросоме и около 10 молекул Бхл *a* [7,9].

Хлоросомы отличаются от других известных фотосинтетических антенных комплексов тем, что в них геометрическое расположение пигментов определено преимущественно не пигмент - белковыми взаимодействиями, а пигмент - пигментными. Из Бхл *c, d* и *e* в хлоросомах ЗСБ формируются огромные олигомеры, так называемые агрегированные бактериохлорофиллы, с характерными спектральными свойствами. Считается, что благодаря близким пространственным взаимодействиям между пигментами устанавливаются сильные электрические связи, и многие оптические свойства объясняются экситонными взаимодействиями

(взаимодействиями электронов и дырок) [8]. Помимо хлоросом ЗСБ содержит другой уникальный антенный комплекс, состоящий из нескольких белковых молекул бактериохлорофилла *a*, называемых FMO-белками. Вместе эти два комплекса составляют фотосинтетический аппарат ЗСБ [9].

При помощи FMO-белков хлоросомы прикрепляются к функциональному центру фотосинтетического аппарата бактерий - реакционному центру (РЦ). В РЦ происходит трансформация энергии света в энергию химических соединений [11]. Выделяют два типа реакционных центров. ЗСБ (*Chlorobiaceae*) содержат железо-серный тип РЦ, аналогично гелиобактериям и фотосистеме 1 цианобактерий. Пурпурные несерные и серобактерии, а также зеленые нитчатые бактерии имеют РЦ типа II (хинон-типичный РЦ). Все аноксигенные фототрофы содержат только один тип РЦ [3,7]. РЦ ЗСБ состоит из 5 молекул Бхл *a* и ядра, содержащего основной электронный донор P840 и каротиноиды. Внутри РЦ происходит процесс фотосинтеза: многочисленные реакции превращения энергии света в энергию химических соединений, посредством электрон-транспортной цепи [3].

Полный путь переноса энергии возбуждения в клетках ЗСБ можно представить в виде общей схемы:



где Бхл $a_{\text{хл.}}$, Бхл $a_{\text{ц.м.}}$, Бхл $a_{\text{РЦ}}$ – Бхл *a*, содержащиеся в хлоросоме, цитоплазматической мембране и реакционном центре соответственно [8], а каротиноиды выполняют функцию передачи поглощенной солнечной энергии на Бхл.

Спектры поглощения и флуоресценции (см. далее) всех перечисленных типов бактериохлорофиллов в схеме сдвинуты в длинноволновую область по отношению друг к другу, что свидетельствует о неминуемом «скатывании» энергии вниз по цепи и образования градиента возбуждения внутри РЦ [7]. У ЗСБ и у гелиобактерий в реакционных центрах под действием поглощенного кванта света подъем электронов осуществляется до уровня порядка – 500 мв,

а в результате фотохимической реакции первого типа индуцируется как циклический транспорт электронов, приводящий к образованию АТФ, так и нециклический, при котором возникает восстановитель.

РЦ принимает электрон от цитохрома, связанного с внешней стороной мембраны. В процессе последующей миграции электрона

происходит прямое восстановление ферредоксина или НАД⁺ на внутренней стороне мембраны, путем переноса электронов с вторичного акцептора на это соединение, и запасание энергии в виде АТФ, которая расходуется на биосинтетические процессы [3,7]. Первым промежуточным носителем электронов (А₀) является молекула хлоросом-хлорофилла (Бхл *c/d/e*), близкая по строению к хлорофиллу *a*. Следующим электронным носителем (А₁) может быть молекула менахинона-7, назначение которой окончательно не определено. Три железо-серных центра (*FeS_x*, *FeS_A* и *FeS_B*) работают как конечные электронные акцепторы.

1.4. Спектры поглощения и флуоресценции зеленых серобактерий

Процесс фотосинтеза, происходящий в клетках микроорганизмов, обусловлен наличием в них фотосинтетических пигментов. Молекула пигмента, получившая квант света, переходит в возбужденное состояние, которое длится порядка 10⁻⁹-10⁻⁸ сек и заканчивается возвращением ее к исходному, стабильному уровню. Этот переход сопровождается либо передачей возбужденного состояния другой молекуле пигмента, либо потерей энергии в виде тепла, флуоресценции (в случае синглетного

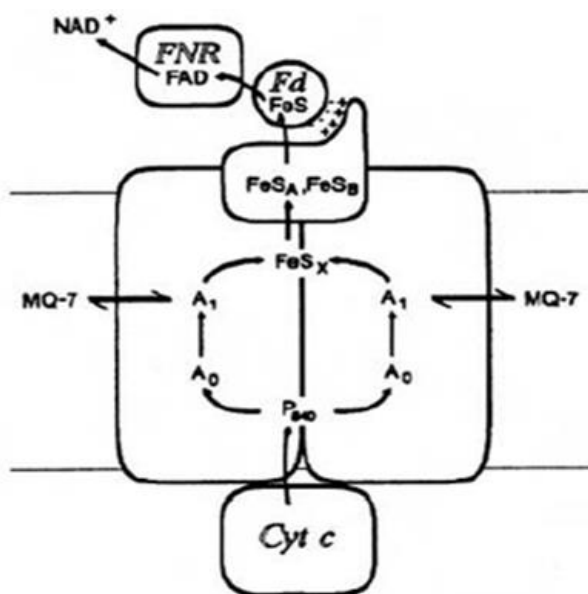


Рис. 3. Модель РЦ ЗСБ. Cyt = цитохром, MQ-7 = менахинон-7, Fd = ферредоксин [8].

возбужденного состояния) и флуоресценции (при триплетном состоянии возбужденной молекулы) [12].

При прохождении света через вещество часть его поглощается, это связано с преобразованием световой энергии волны в разные формы внутренней энергии вещества или в энергию вторичного излучения другого направления. Интенсивность поглощения света в фотометрических методах определяется законом Бугера-Ламберта-Бера [13]:

$$\frac{I_{\text{пр}}}{I_0} = 10^{-KCl},$$

где I_0 , $I_{\text{пр}}$ – соответственно падающий и прошедший через образец толщины l световые потоки, C – концентрация молекул поглощающего вещества в слое, K – молярный коэффициент поглощения.

Для разных веществ способность поглощать энергию электромагнитного излучения различна, количественно ее можно охарактеризовать спектрами поглощения, представляющие собой зависимость оптической плотности $D = \lg \frac{I_0}{I_{\text{пр}}}$ объекта (раствора/суспензии) от длины световой волны. Вид спектров зависит от числа возбужденных уровней, на которые переходит молекула, поглощая фотоны той или иной энергии. Считается, что каждый электронный переход дает полосу поглощения, которая на графике представляется близкой к гауссовой кривой нормального распределения [14].

Различия в структуре и составе соединений различных типов Бхл приводит к разному виду их спектров поглощения. В общем случае Бхл дает два главных максимума, расположенных в коротковолновом (ультрафиолетовом) и длинноволновом (красном или инфракрасном) участке спектра. Длинноволновый максимум поглощения мономерной формы Бхл *c*, наблюдаемый в органических растворах, приходится на 660 нм [7], а Бхл *a* – на 772 нм [15]. Однако внутри хлоросом бактериохлорофиллы находятся в высоко агрегированной форме, что влечет за собой смещение их максимумов поглощения в красную область спектра на 70-80 нм по

отношению к мономерной форме. В суспензии клеток различных штаммов ЗСБ длинноволновый максимум поглощения Бхл *c* содержащих видов лежит между 745 и 760 нм. Для Бхл *d* и Бхл *e* содержащих видов данное значение составляет 725-745 нм и 715-725 нм соответственно [8]. На рисунке 4 представлены спектры поглощения хлоросом, выделенные из трех видов ЗСБ.

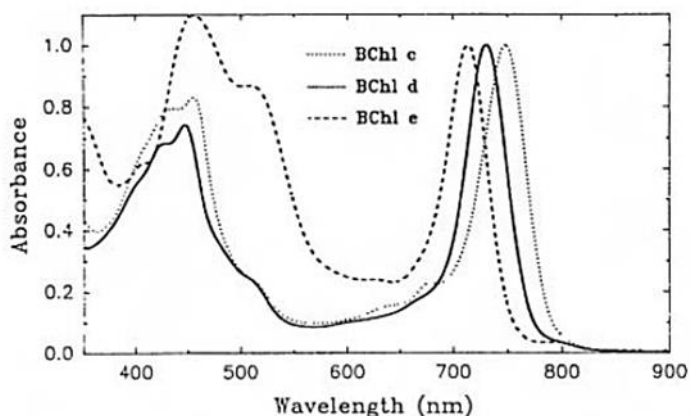


Рис. 4. Спектры поглощения хлоросом, выделенных из культур ЗСБ: *Chlorobium limicola* (BChl *c*), *Chlorobium vibrioforme* (BChl *d*) и *Pelodictyon phaeoclathratiforme*

У ЗСБ большинство молекул Бхл *a* локализовано в цитоплазматической мембране, а именно в водорастворимом FMO- белке [16], однако в высокоочищенных хлоросомах был найден специфический Бхл *a* - комплекс с характерным максимум поглощения на 790-795 нм (эта особенная форма Бхл *a* известна как B790 или B795). Его количество сильно зависит от условий роста культуры. Молярное соотношение Бхл *c* к Бхл *a* в изолированных хлоросомах в среднем колеблется от 25:1 (рост при низкой интенсивности света) до 2:1 (при высокой интенсивности света). Но существуют факты, свидетельствующие о росте этого соотношения до 100:1 [8]. Характерные максимумы поглощения Бхл *a*, находящегося в РЦ-х ЗСБ, приходятся на 810, 610 и 370 нм [9]. В неповрежденных клетках каротиноид изорениератин поглощает на длине волны 505 нм [8].

Таким образом, учитывая оптические свойства бактериохлорофиллов и их места расположения, схема пути переноса энергии возбуждения в клетке (см. Гл.1 §1.5) принимает следующий вид [17]:

каротиноиды → Бхл *c, d, e* (B710-750) → Бхл *a* (B795) → Бхл *a* (B809) →
 Бхл *a* (B813) →→ Бхл *a* (B836) → РЦ (P840)

Спектром флуоресценции называют зависимость интенсивности света, измеренной в относительных единицах, от длины волны. Согласно правилу Стокса длина волны испускания флуоресценции больше соответствующих длин волн поглощения. Это означает, что энергия квантов флуоресценции меньше энергии поглощенных квантов, что объясняется превращением части энергии фотона в тепловую энергию окружающих молекул [14]. На рисунке 5 представлены спектры флуоресценции хлоросом, выделенные из трех видов ЗСБ.

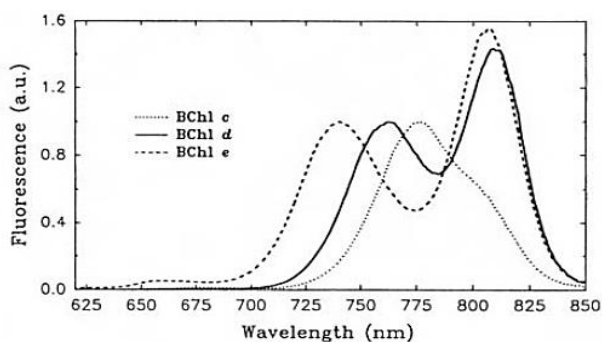


Рис. 5. Спектры флуоресценции хлоросом, выделенных из культур ЗСБ: *Chlorobium limicola* (BChl *c*), *Chlorobium vibrioforme* (BChl *d*) и *Pelodictyon*

В таблице, расположенной ниже, приведены значения главных максимумов спектров поглощения бактериохлорофиллов (в клетках и в ацетоновых экстрактах) и максимумы спектров флуоресценции [18].

Табл. 2. Главные максимумы спектров поглощения хлорофиллов (в клетках и в ацетоновых экстрактах) и максимумы спектров флуоресценции [18].

Хлорофиллы	Максимумы спектров поглощения (нм)		Максимумы спектров флуоресценции (нм)
	Клетки	Ацетоновые экстракты	Клетки
Бхл <i>a</i>	375, 590, 805, 830-911	357, 391, 573, 772	~800
Бхл <i>c</i>	457-460, 745-755	433, 622, 660	667
Бхл <i>d</i>	450, 715-745	425, 612, 650	763
Бхл <i>e</i>	460-462, 710-725	459, 648	738

Глава 2. Объекты и методы исследования

2.1. Объекты изучения

В ходе выполнения работы были исследованы образцы чистых культур микроорганизмов, выращенные в лаборатории Института микробиологии имени С. Н. Виноградского. Проведены спектральные измерения проб природной воды взятых при помощи погружаемого насоса из нескольких отделяющихся от Белого моря водоемов: озер Трехцветного, Нижнего Ершовского, лагуны на Зеленом мысу и – самого большого меромиктического озера Кандалакшского залива – Больших Хрусломен. Образцы были взяты с разных глубин водоемов в ходе мартовской экспедиции 2017 года.

2.2. Приборы гидрохимического анализа

Методом зондирования непосредственно в озере фиксировалось изменение с глубиной физико-химических характеристик воды: температуры, освещенности (при помощи люксметра), солености (при помощи кондуктометра), концентрации растворенного кислорода (при помощи оксиметра), значений рН (при помощи рН-метра) и окислительно-восстановительного потенциала Eh.

В лаборатории кафедры Общей физики Физического факультета МГУ были проведены дополнительные исследования некоторых параметров привезенных проб, а именно: растворенного кислорода, сульфид-анионов (S^{2-}), значений Eh и рН. Определение растворенного кислорода (мг/л), температуры ($^{\circ}C$) проводилось на анализаторе Эксперт-009 с оптическим датчиком и встроенным термоэлектрическим преобразователем. Для измерений значений Eh, рН и S^{2-} , применялась методика йонометрии – разновидности потенциометрического анализа, с применением специальных ионоселективных электродов, внутренний объем которых отделен от исследуемого раствора мембраной, проницаемой только для определенного вида ионов [19,20].

2.3. Спектральное оборудование и методика спектральных измерений

Спектрофотометр – прибор, используемый для измерения спектров поглощения растворов, суспензий или тканей. Принцип работы заключается в следующем: свет от источника (ксеноновая лампа) пропускают через монохроматор (устройство для выделения определенного диапазона длин волн), после чего монохроматический пучок света проходит через кювету, и его интенсивность измеряют детектором света – фотоэлектронным умножителем (ФЭУ). Фототок подается на вход усилителя, затем сигнал преобразуется в специальном электронном блоке и подается на компьютер. Преобразующее устройство по полученным значениям интенсивности рассчитывает оптическую плотность образца и на экране можно наблюдать график зависимости последней от длины волны света источника [4].

Флуориметр – прибор, предназначенный для регистрации спектров флуоресценции. Флуориметр состоит из двух монохроматоров, один из которых служит для выделения монохроматического возбуждающего света (монохроматор_1), а другой – для измерения спектра флуоресценции (монохроматор_2). Устройство прибора таково, что угол между направлением возбуждающего пучка и измеряемого излучения равен 90° . Это позволяет собирать значительную часть флуоресценции и исключить влияние вещества самой кюветы.

Для оценки погрешностей использовались следующие формулы [24]:

Среднеквадратичная погрешность среднего арифметического:

$$S_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{1}{n(n-1)} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Суммарная погрешность: $\sigma = \sqrt{\sigma_{\text{пр}}^2 + \sigma_{\text{мет}}^2 + \sigma_{\text{гаусс}}^2}$

где $\sigma_{\text{пр}}$ – погрешность прибора (Табл. 3), $\sigma_{\text{мет}}$ – экспериментально установленная погрешность применяемого метода, $\sigma_{\text{гаусс}}$ – стандартное

отклонение аппроксимации экспериментального спектра кривой гауссова распределения (аппроксимация проводилась с помощью математического пакета origin).

Табл. 3. Погрешности используемых приборов

спектрофотометр Unico	Пределы допускаемой абсолютной погрешности при измерении оптической плотности, %	± 1
	Пределы допускаемой абсолютной погрешности установки длин волн, нм.	$\pm 2,0$
флуориметр Solar CM2203	Точность фотометрирования, %	< 3
	Точность установки длины волны, нм.	$\pm 0,5$

Флуориметр позволяет измерить три типа спектров – спектры испускания флуоресценции, спектры возбуждения флуоресценции и синхронные спектры. Для регистрации первых фиксируется значение длины волны возбуждения, а спектр испускания измеряется фотодетектором при сканировании монохроматора_2 в определенном интервале длин волн. При снятии спектров возбуждения задается фиксированная длина волны регистрации флуоресценции, а длина волны возбуждения сканируется монохроматором_1 в определенном интервале [25].

Таким образом, спектр испускания представляет собой зависимость интенсивности испускания от длины волны при фиксированной длине волны возбуждающего излучения, а спектр возбуждения – зависимость интенсивности испускания флуоресценции от длины волны возбуждающего света при постоянном потоке фотонов, падающих на образец.

В лабораторных условиях измерены спектры оптической плотности проб при помощи спектрофотометра Solar PB2201, спектры испускания и возбуждения флуоресценции регистрировались на флуориметре Solar CM2203 (в эксперименте использовались стандартные кварцевые кюветы с длиной оптического пути 10 мм для флуориметрии, 10 и 30 мм для измерения спектров поглощения). Спектры поглощения проб воды или суспензий клеток регистрировали по отношению к дистиллированной

воде, спектры поглощения ацетон-метаноловых экстрактов – по отношению к смеси ацетон-метанол-вода. При длине кюветы 30 мм значения оптической плотности делили на 3.

2.4. Измерение концентрации бактериохлорофиллов методом абсорбционной спектроскопии ацетон-метаноловых экстрактов

Для получения ацетон-метаноловых экстрактов проб воды с зелеными серными бактериями к 1 мл пробы добавляли 4 мл смеси ацетона с метанолом (5:2). Таким же образом из дистиллированной воды и смеси ацетона с метанолом (5:2) готовили стандарт для вычитания базовой линии спектрофотометра.

С помощью значений, полученных при измерении спектров поглощения в различных образцах, была рассчитана суммарная концентрация бактериохлорофиллов d и e (мг/м³):

$$C (\text{Бхл}(d + e)) = (1.315 \cdot E_{655}' - 0.643 \cdot E_{667}' + 0.005) \cdot v \cdot (10)^6 / (V \cdot d \cdot \varepsilon \cdot \text{Бхл}d)$$

где $E_{655}' = E_{655} - E_{850}$, $E_{667}' = E_{667} - E_{850}$ – величины оптической плотности экстракта пигментов при длинах волны 655 и 667 нм соответственно (исключая мутность при E_{850})

$v = 10$ мл – объем ацетон-метанолового экстракта

$V = 2$ мл – объем профильтрованной пробы озерной воды

$d = 1$ см – ширина кюветы

ε - абсорбционный коэффициент ($\varepsilon * \text{Бхл}d = 98$ мг/см, $\varepsilon * \text{Хла} = 84$ л/(г*см)) [26]

Глава 3. Экспериментальные результаты и их обсуждение

3.1. Исследование чистых культур зеленых серобактерий методом абсорбционной спектроскопии

В ходе выполнения работы были получены спектры поглощения двух типов чистых культур ЗСБ – зеленоокрашенных и коричневоокрашенных, культивированных из разных озер Кандалакшского залива Белого моря в период с 2012 по 2017-й гг.

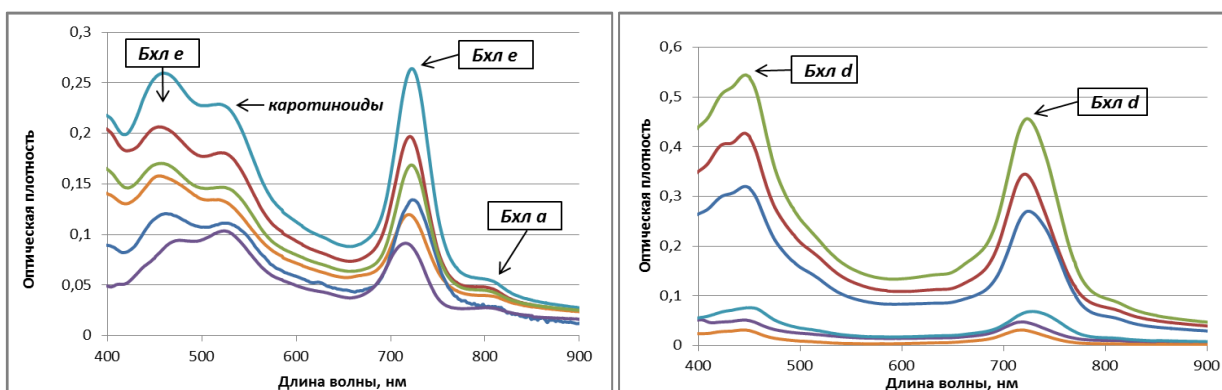


Рис. 6. Спектры поглощения коричневоокрашенных (слева) и зеленоокрашенных (справа) чистых культур ЗСБ.

Все спектры имеют два максимума, соответствующие поглощению света молекулами Бхл *d*, *e* и каротиноидами. Высота максимумов зависит от концентрации клеток серобактерий в культуре. Для коричневоокрашенных в коротковолновой области наблюдается широкая полоса поглощения пигментов и каротиноидов со сдвоенными максимумами, приходящимися на длины волн 455-469 нм и 518-526 нм. Длина волны, на которой находится длинноволновый максимум поглощения этой чистой культуры, принадлежит интервалу от 716 до 724 нм. Для всех образцов около 800 нм характерен небольшой пик, соответствующий поглощению света Бхл *a*. Максимумы коротковолновой полосы поглощения зеленоокрашенного типа ЗСБ приходятся на длины волн 426 и 446 нм, а длинноволновой – на 719-728 нм, что соответствует поглощению света Бхл *d* [Рис. 7]. При сравнении полученных данных со спектрами поглощения Бхл *c*-содержащих хлоросом,

приведенных в литературе (см. 1.4.), присутствие Бхл *c* в клетках бактерий не выявлено. Таким образом, содержанием Бхл *c* при расчетах можно пренебречь по сравнению с количеством присутствующего в клетках Бхл *d*.

Если в пробе присутствуют оба вида бактерий, то ситуация усложняется, полосы поглощения двух различных бактериохлорофиллов перекрываются, и однозначно установить содержание того или иного типа Бхл по спектрам поглощения клеток в среде не представляется возможным.

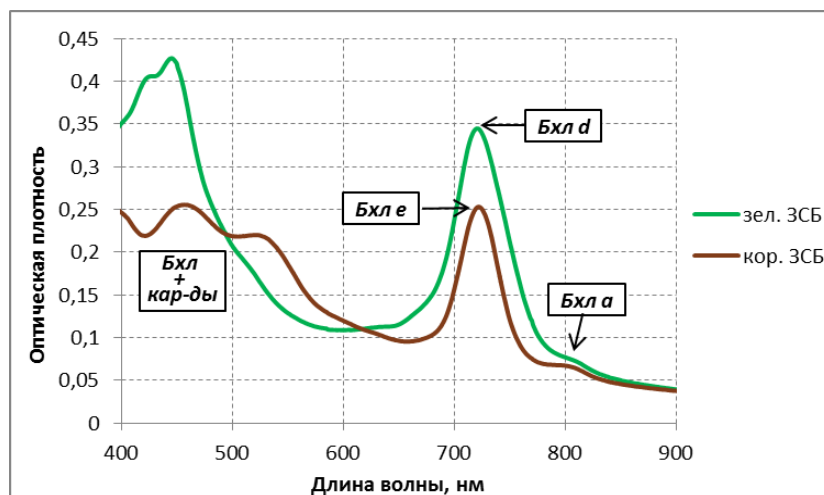


Рис. 7. Сравнение спектров поглощения двух типов чистых культур ЗСБ.

Для чистых культур как зеленоокрашенных, так и коричневоокрашенных ЗСБ были приготовлены ацетон-метаноловые экстракты и измерены их спектры поглощения в диапазоне 200-1000 нм.

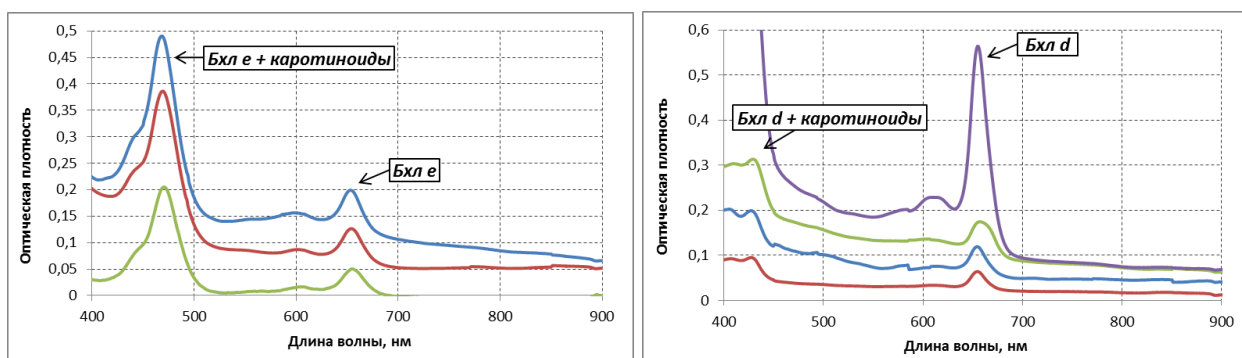


Рис. 8. Спектры поглощения ацетон-метаноловых экстрактов коричневоокрашенных (слева) и зеленоокрашенных (справа) чистых культур ЗСБ.

Подобно спектрам поглощения клеток ЗСБ в растворе спектры экстрактов имеют две главные полосы поглощения. Длины волн, на которые приходится максимальное поглощение электромагнитной энергии света чистыми пигментами, для коричневоокрашенного вида составляют 468-471, 599-604 и

653-655 нм, а для зеленоокрашенного 432-436, 604 и 653-657 нм. В связи с воздействием смеси ацетона и метанола (в соотношении 7:2) на клетку бактерии происходит разрушение не только ее оболочки, но и плотно упакованных хлоросом, внутри которых располагаются фотосинтетические пигменты. Сдвиг максимумов поглощения Бхл *e* и *d* в коротковолновую область спектра на величину порядка 70 нм свидетельствует о переходе бактериохлорофиллов из высоко агрегированной формы, в которой они находились в хлоросомах, к мономерной.

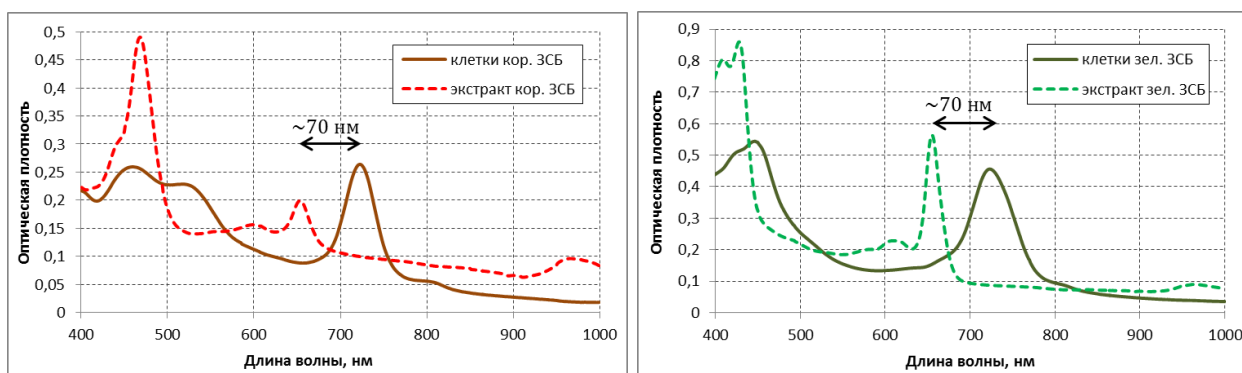


Рис. 9. Сравнение спектров поглощения неповрежденных клеток чистых культур ЗСБ с ацетон-метаноловыми экстрактами.

3.2. Исследование чистых культур зеленых серобактерий флуоресцентным методом

Снятие спектров флуоресценции чистых культур ЗСБ производилось в двух режимах: испускания и возбуждения (см. 2.3.). Для образцов культур спектры испускания флуоресценции были зарегистрированы для длин волн возбуждения $\lambda_{\text{ex}} = 270, 355, 390, 440, 450$ и 525 нм.

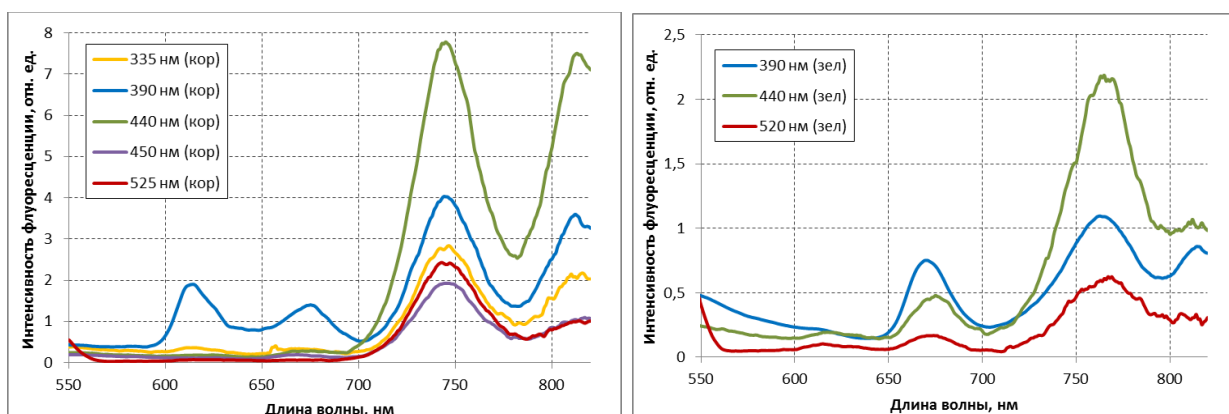


Рис. 10. Спектры испускания флуоресценции для различных $\lambda_{\text{возб}}$ коричневоокрашенных (слева) и зеленоокрашенных (справа) чистых культур ЗСБ.

Общими для всех спектров флуоресценции коричневоокрашенного вида ЗСБ являются два максимума испускания: в диапазоне от 743 до 747 нм, соответствующего флуоресценции Бхл *e*, и на 813 нм, возникающего за счёт флуоресценции Бхл *a*. Для зеленоокрашенного вида ЗСБ длины волн на которые приходятся общие для всех проб максимумы составляют 763-767 и 813 нм, обусловленные присутствием Бхл *d* и Бхл *a* соответственно.

На основе полученных экспериментальных данных рассчитаны средние значения длин волн, на которые приходится максимум флуоресценции бактериохлорофиллов, приведенные в табл. 4.

Табл.4. Значения максимумов флуоресценции бактериохлорофиллов, определенные экспериментально на чистых культурах.

Бхл <i>d</i> (зеленоокрашенные), нм.	$\lambda_{max} = 760 \pm 7$
Бхл <i>e</i> (коричневоокрашенные), нм.	$\lambda_{max} = 744,2 \pm 2,6$
Бхл <i>a</i> , нм.	$\lambda_{max} = 812,5 \pm 1,1$

Очевидна зависимость интенсивности испускания флуоресценции бактериохлорофиллов от длины волны возбуждающего света. Для нахождения оптимального режима проведения измерений, были сняты спектры возбуждения флуоресценции на длинах волн испускания $\lambda_{em} = 740$, 745 нм для коричневоокрашенных ЗСБ и $\lambda_{em} = 765$, 770 нм для зеленоокрашенных.

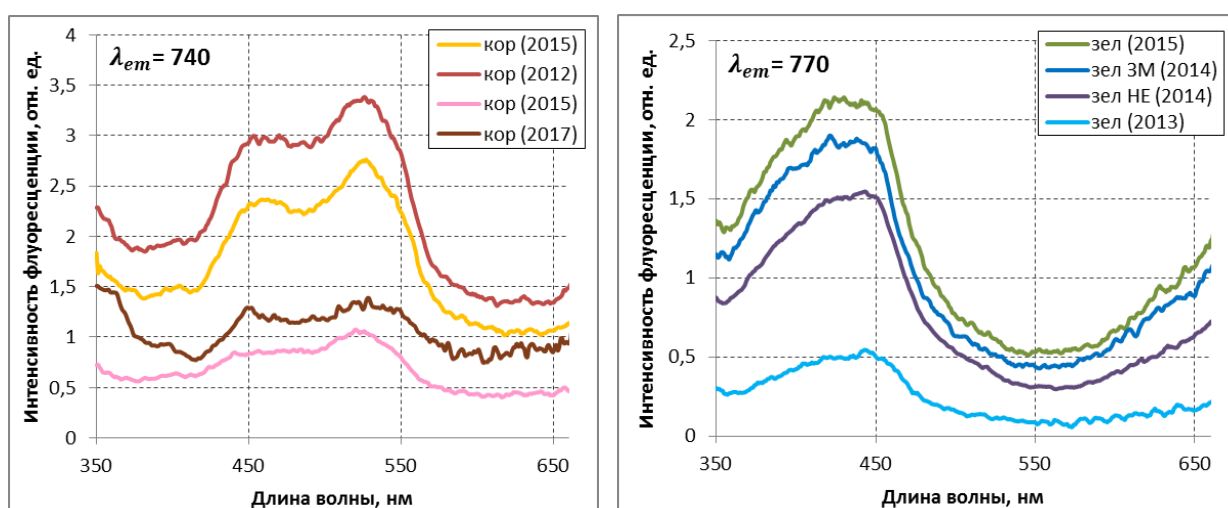


Рис. 11. Спектры возбуждения флуоресценции на $\lambda_{em}=740$ нм для образцов коричневоокрашенных (слева) и на $\lambda_{em}=770$ нм для зеленоокрашенных (справа) чистых культур ЗСБ.

Максимум испускания Бхл *a* в клетках обоих типов бактерий приходится на диапазон длин волн возбуждения 810-820 нм, поэтому для образцов чистых культур помимо выше описанных измерений были сняты спектры возбуждения флуоресценции на длине волны испускания $\lambda_{em} = 815$ нм.

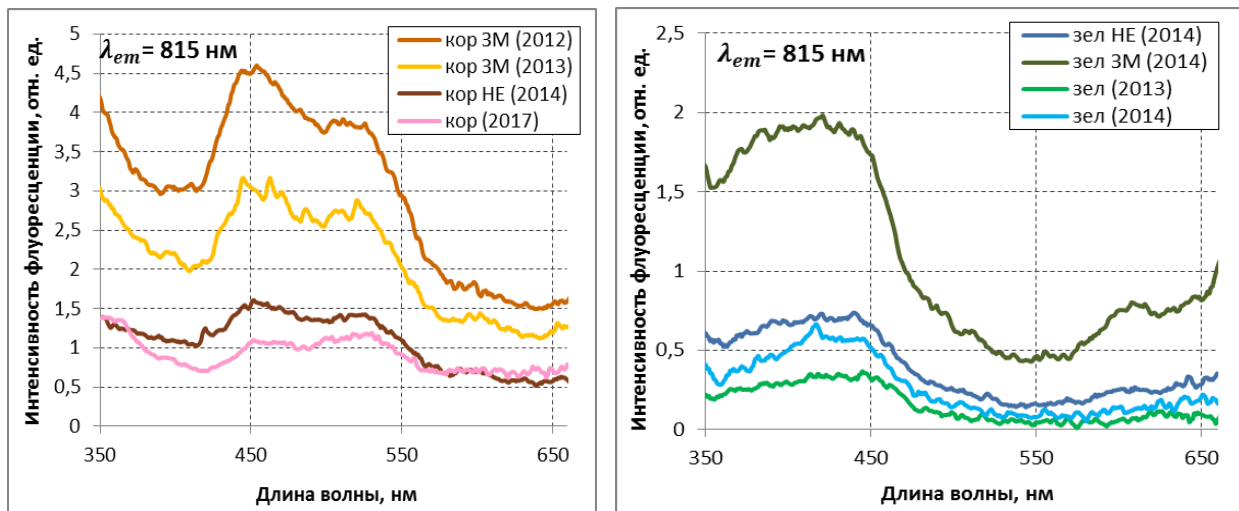


Рис. 12. Спектры возбуждения флуоресценции на $\lambda_{em}=815$ нм для образцов коричневоокрашенных (слева) и для зеленоокрашенных (справа) ЗСБ.

С помощью сравнения спектров возбуждения между собой была определена оптимальная длина волны возбуждения для обоих типов ЗСБ. На длине волны возбуждения 440 нм интенсивности флуоресценции всех фотосинтетических пигментов бактерий, Бхл *d*, Бхл *e* и Бхл *a*, максимальны.

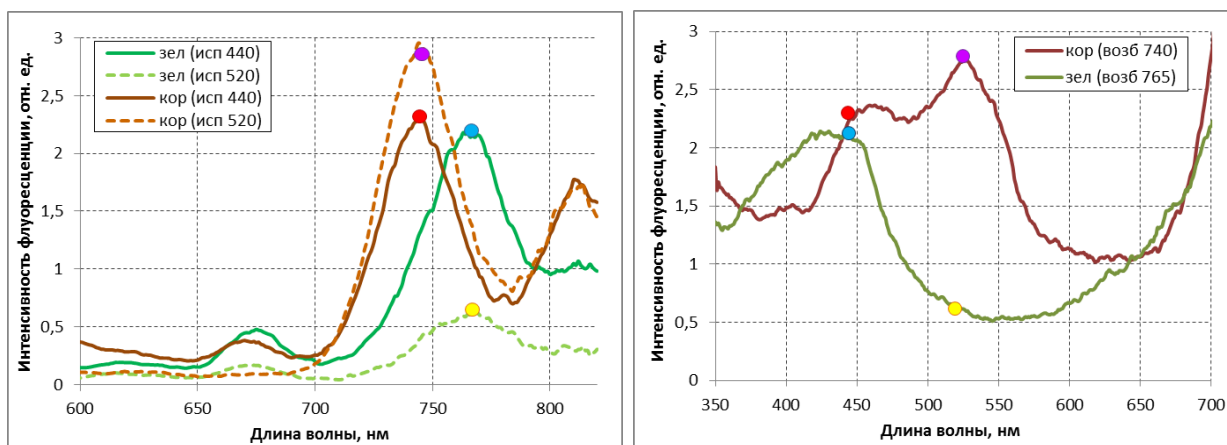


Рис. 13. Сравнение спектров испускания (слева) и возбуждения (справа) флуоресценции для образцов двух типов ЗСБ. Кружками одинакового цвета обозначены идентичные состояния образца.

3.3. Аппроксимация полос поглощения чистых культур зеленых серобактерий математическими функциями

Для выявления вида зависимости интенсивности флуоресценции Бхл от длины волны регистрации была сделана попытка аппроксимации спектров испускания флуоресценции чистых культур ЗСБ кривыми Гауссова и Лоренцева распределения.

Нормальное распределение Гаусса имеет вид: $y = y_0 + \frac{A}{w\sqrt{\pi/2}} e^{-2\frac{(x-x_c)^2}{w^2}}$,

где используемые параметры связаны с характеристиками кривой (полушириной w_1 , координатами максимума (x_c, y_c) и базовой линии y_0) следующими соотношениями: $y_c = y_0 + \frac{A}{w\sqrt{\pi/2}}$, $w = \frac{w_1}{\sqrt{\ln 4}}$.

Распределение Лоренца представимо в виде: $y = y_0 + \frac{2A}{\pi} \frac{w}{4(x-x_c)^2 + w^2}$,

где w – полуширина кривой, а координата максимума распределения выражается через площадь A и w : $y_c = y_0 + \frac{2A}{w\pi}$ (Рис. 14).

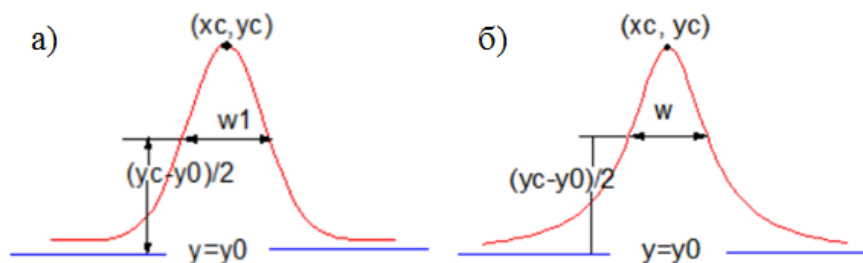


Рис. 14. Вид кривой распределения а) Гаусса и б) Лоренца.

Погрешность метода при аппроксимации экспериментальной кривой распределением Лоренца принимает большие значения, чем при использовании распределения Гаусса. По этой причине в качестве математических функций, задающих полосы флуоресценции бактериохлорофиллов, в дальнейших расчетах принимались кривые Гауссова распределения (Рис. 15). Анализ чистых культур ЗСБ показал различие полуширины полос флуоресценции для двух разных типов бактерий. Для

зеленоокрашенных ЗСБ параметр w принимал значения от 52.7 до 64.1 нм, для коричневоокрашенных ЗСБ значения w лежали в диапазоне от 45.5 до 49.0 нм. Таким образом, полосы испускания флуоресценции коричневоокрашенных культур примерно на 20% уже полос зеленоокрашенных ЗСБ.

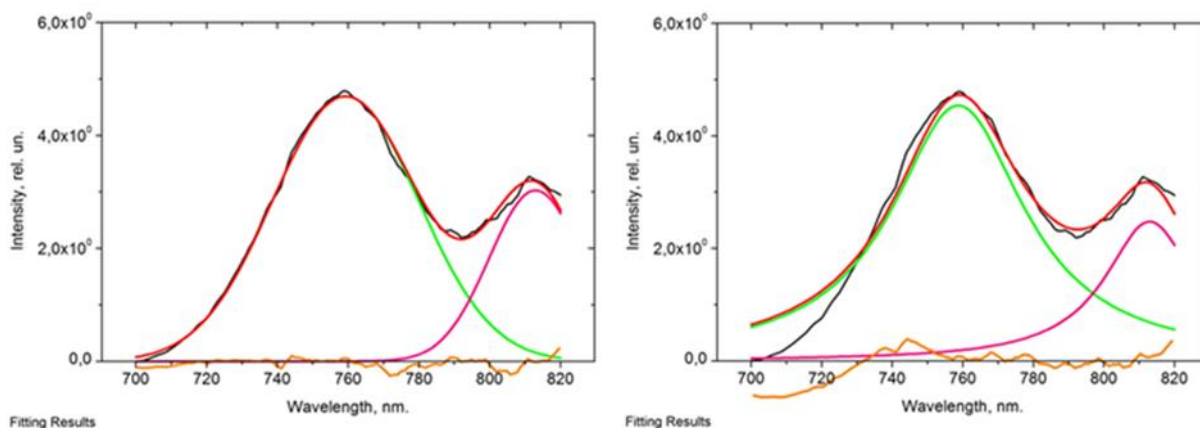


Рис. 15. Аппроксимация длинноволновой полосы поглощения Бхл d и Бхл a кривой распределения Гаусса (слева), Лоренца (справа). Кривая оранжевого цвета определяет отклонение аппроксимирующей кривой от экспериментальной.

Для дальнейших вычислений в качестве параметра w было взято среднее арифметическое от имеющегося набора данных. Для зеленоокрашенного типа $w = 56.9 \pm 1.5$ нм, для коричневоокрашенного $w = 46.5 \pm 0.6$ нм.

3.4. Исследование проб природной воды методом абсорбционной спектроскопии

В природной воде могут содержаться как зеленоокрашенные, так и коричневоокрашенные ЗСБ. Спектры поглощения проб воды из озер в большинстве случаев представляют собой суммарный спектр оптической плотности двух типов культур со всеми им свойственными полосами поглощения, что говорит об одновременном присутствии в воде молекул БХл d и e . Высота максимумов спектров зависит от концентрации клеток в растворе, соотношение полос поглощения меняется в зависимости от соотношения клеток серобактерий, имеющих зеленую или коричневую

окраску. Из-за наложения смещенных полос друг на друга спектр накопительной культуры имеет более широкую полосу поглощения в длинноволновой области, чем спектр какой-либо одной из культур.

Озеро Трехцветное

Спектры поглощения проб воды из озера Трехцветного регистрировались в диапазоне от 200 до 1100 нм. Образцы воды были взяты с шагом 2.5 см из толщи, начиная с 1.6 м от поверхности и заканчивая 2.15 м.

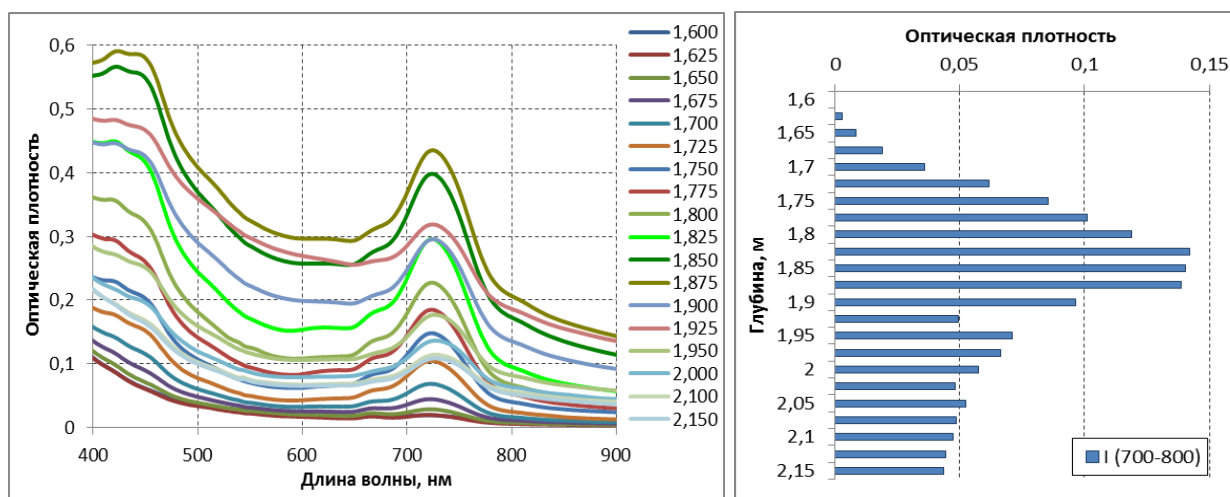


Рис. 16. Спектры поглощения проб из озера Трехцветное (слева), распределение величины длинноволнового максимума поглощения по глубине (справа)

На всех спектрах отчетливо наблюдаются два максимума поглощения, в области 420-450 нм и 720-730 нм, соответствующие поглощению света Бхл. Величина оптической плотности длинноволнового максимума монотонно возрастает до 1.85 м, затем ее значение убывает с глубиной. Для определения суммарной концентрации Бхл *d* и Бхл *e* в пробах были измерены спектры поглощения их экстрактов относительно раствора ацетона и метанола в соотношении 5:2 в спектральном диапазоне от 200 до 1100 нм.

Для спектров поглощения экстрактов, аналогично спектрам поглощения чистых культур, характерны две отчетливые полосы поглощения (на 400-440 и 650-670 нм), подтверждающие присутствие в клетках молекул бактериохлорофиллов. Сравнительный анализ полученных результатов со спектрами чистых культур двух типов ЗСБ не выявил присутствие в исследуемых слоях коричневоокрашенных ЗСБ.

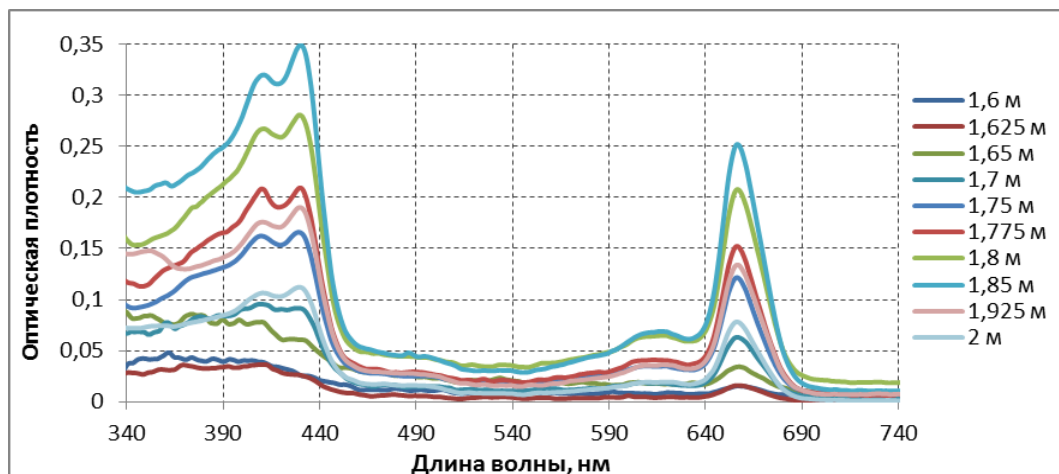


Рис. 17. Спектры поглощения ацетон-метаноловых экстрактов проб воды из озера Трехцветное.

Интенсивность флуоресценции пигментов в экстрактах значительно выше их флуоресценции в неповрежденных клетках, что свидетельствует о наличии механизма тушения флуоресценции в клетках ЗСБ. Концентрация Бхл *d* на глубине 1.85 м достигает своего максимального значения 3600 мг/м³, что говорит о содержании в нем наибольшего количество фототрофных микроорганизмов.

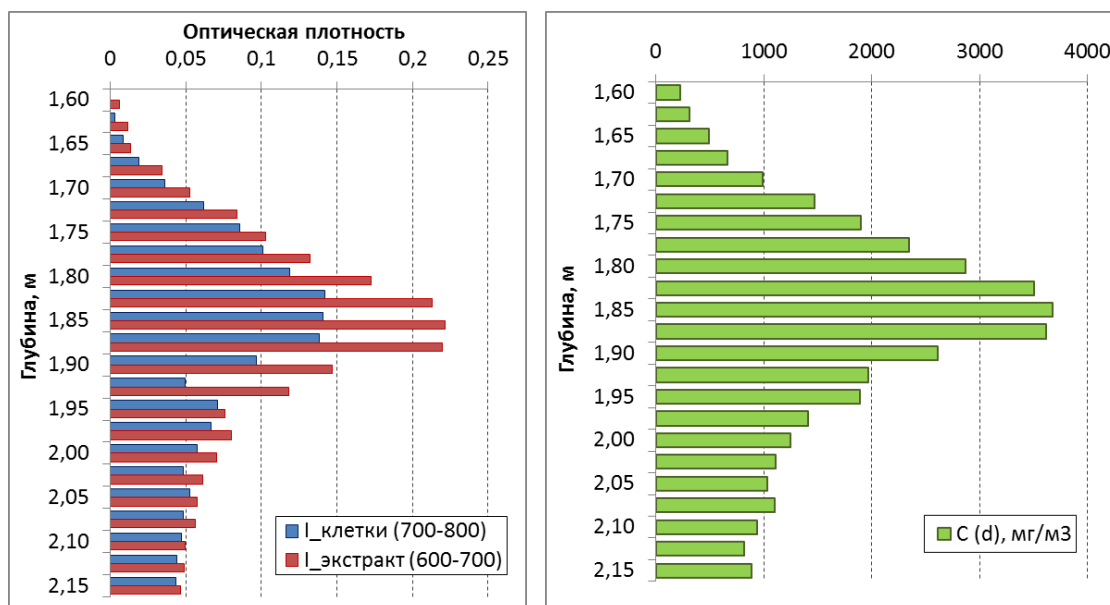


Рис. 18. Сравнение величины длинноволнового максимума поглощения проб природной воды озера Трехцветного и их экстрактов (слева); диаграмма распределения концентрации Бхл *d* по глубине.

Озеро Нижнее Ершовское

Спектры поглощения четырех проб воды из озера Нижнего Ершовского (с глубины 0.5, 1.25, 1.75 и 2 м) регистрировались в трехсантиметровой кварцевой кювете в диапазоне от 200 до 1100 нм.

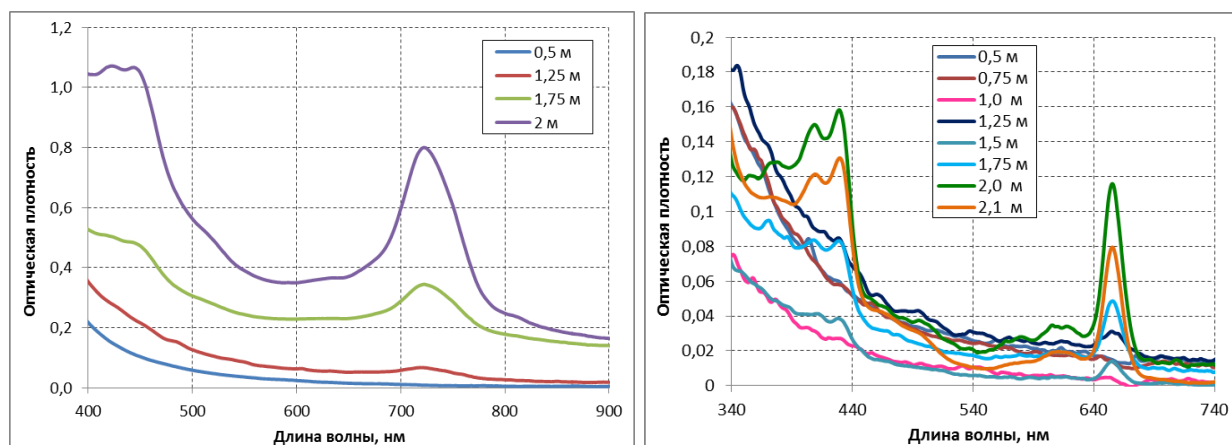


Рис. 19. Спектры поглощения проб из озера Нижнее Ершовское (слева); Спектры поглощения ацетон-метаноловых экстрактов проб воды из того же озера (справа).

По наличию максимумов значений оптической плотности в интервале длин волн 700-800 нм и 600-700 нм для левого и правого графиков соответственно, сделан вывод о присутствии Бхл в воде, начинающегося с глубины 1.25 м, и монотонно возрастающего до 2 м. В исследуемых пробах суммарная концентрация Бхл d и e принимает свое максимальное значение порядка 1800 мг/м^3 на глубине 2-х метров.

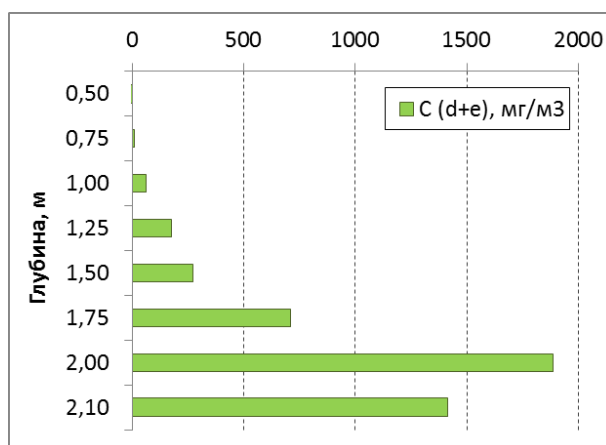


Рис. 20. Распределения концентраций смеси Бхл d и e по глубине в озере Нижнее Ершовское.

Лагуна на Зеленом мысу

Спектры поглощения семи проб воды из лагуны на Зеленом мысу (с глубин 0,5, 2, 3, 4, 4,5, 5,5 и 6 м) регистрировались в трехсантиметровой кварцевой кювете в диапазоне от 200 до 1100 нм.

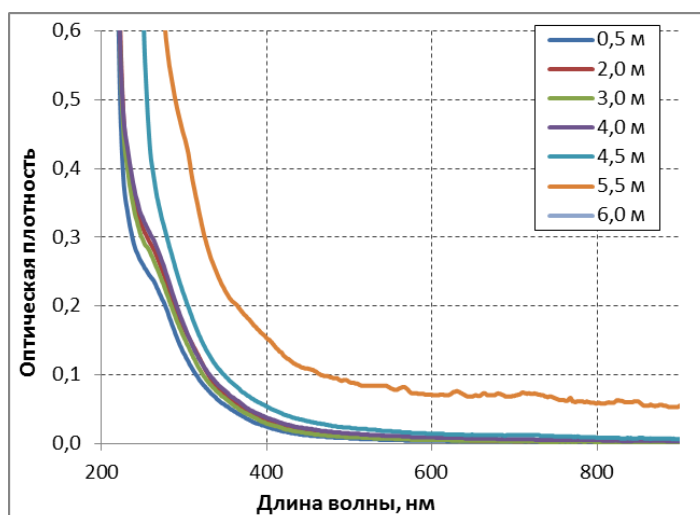


Рис. 21. Спектры поглощения проб воды из лагуны на Зеленом мысу.

Заметных максимумов поглощения на всем измеряемом диапазоне длин волн не наблюдается. Полученные спектры представляют собой типичные спектры поглощения растворенного органического вещества (РОВ) природной воды – бесструктурные с «плечом» при 270 нм [22]. Таким образом, методом абсорбционной спектроскопии установлено, что в исследуемых пробах нет клеток микроорганизмов (фитопланктона или фототрофных бактерий).

Озеро Большие Хрусломены

Девять проб из озера Большие Хрусломены был отобраны в диапазоне от 0,5 до 18 м по глубине. Спектры поглощения проб измерялись в стандартных условиях от 200 до 1100 нм.

По наличию длинноволнового максимума поглощения Бхл в области 740-770 нм в пробах определено присутствие в слоях воды ниже 3,25 м фотосинтетических пигментов, максимальная концентрация которых зафиксирована в слоях 4,25 и 5,5 м.

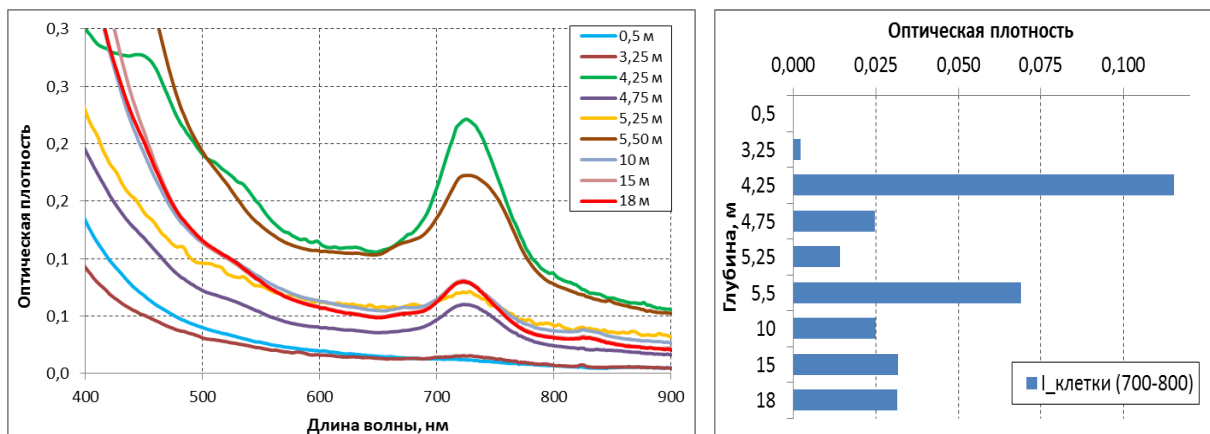


Рис. 22. Спектры поглощения проб из озера Б. Хрусломены (слева), распределение величины длинноволнового максимума поглощения по глубине (справа)

3.5. Исследование проб природной воды флуоресцентным методом

Спектры испускания флуоресценции проб озерной воды были зарегистрированы при возбуждении длинами волн $\lambda_{ex} = 270, 310, 355, 440$ и 525 нм. Спектры возбуждения флуоресценции были сняты на длинах волн испускания $\lambda_{em} = 740, 770$ и 820 нм. С помощью анализа спектров (проведенных аналогично 3.2.) выявлено оптимальное значение длины волны возбуждения - 440 нм, при которой полученные результаты имеют наиболее информативный характер. Для точности дальнейших расчетов спектры испускания флуоресценции корректировались на поглощение в соответствии с законом Бугера-Ламберта-Бера: $I_{корр} = I_{рег} \cdot 10^{0,5 \cdot (D_{ex} + D_{em})}$ (см. 1.4.), где $I_{корр}$ – скорректированная на поглощение интенсивность флуоресценции; $I_{рег}$ – интенсивность флуоресценции, регистрируемая флуориметром; D_{ex} и D_{em} – величины оптической плотности образца на длине волны возбуждения и испускания соответственно.

Так как в образцах природной воды могут присутствовать разные виды ЗСБ, то в зависимости от их соотношения максимум флуоресценции сдвигается от значений длин волн, определенных для зеленоокрашенных ($763-770$ нм) и коричневоокрашенных ($740-750$) видов в отдельности. Этот факт позволяет разложением максимума спектра испускания флуоресценции в области $740-770$ нм на две гауссианы (с максимумами на длинах волн 745 и

760-765 нм) провести оценку относительной доли содержания зеленоокрашенных и коричневоокрашенных ЗСБ в озерах [23].

Озеро Трехцветное

Все спектры испускания флуоресценции регистрировались в диапазоне от 600 до 820 нм при длине волны возбуждения $\lambda_{ex} = 440$ нм. В спектрах обнаружены два длинноволновых максимума флуоресценции: в области 740-770 нм, соответствующий испусканию молекулами Бхл, и на длине волны 812-816 нм, соответствующий испусканию Бхл *a*.

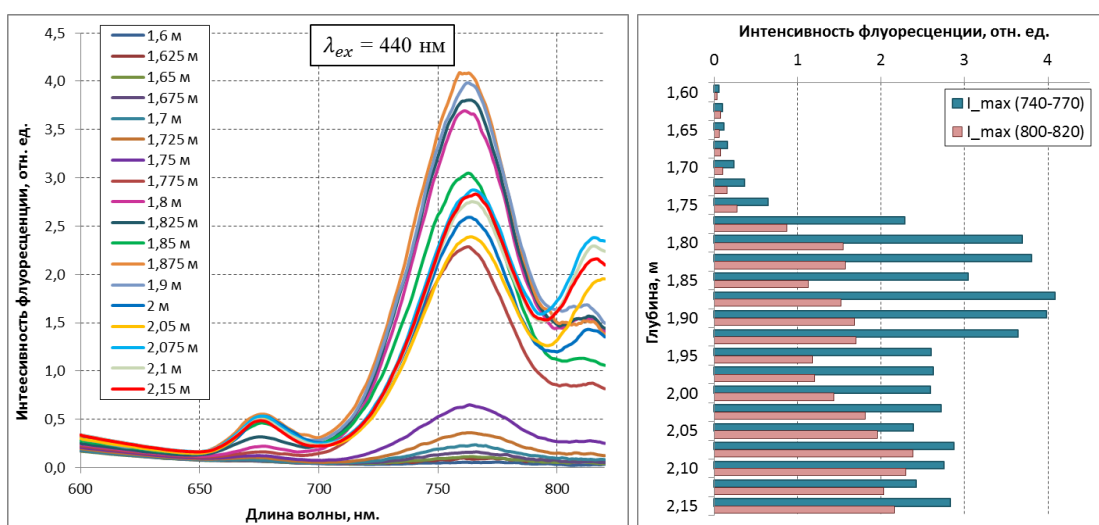


Рис. 23. Спектры испускания флуоресценции проб при $\lambda_{ex}=440$ нм из озера Трехцветное (слева); Изменение длинноволновых максимумов (скорректированной) интенсивности флуоресценции при $\lambda_{ex}=440$ нм с глубиной (справа).

Методом аппроксимации экспериментальных спектров кривыми гауссова распределения показано наличие только зеленоокрашенных ЗСБ в водоеме.

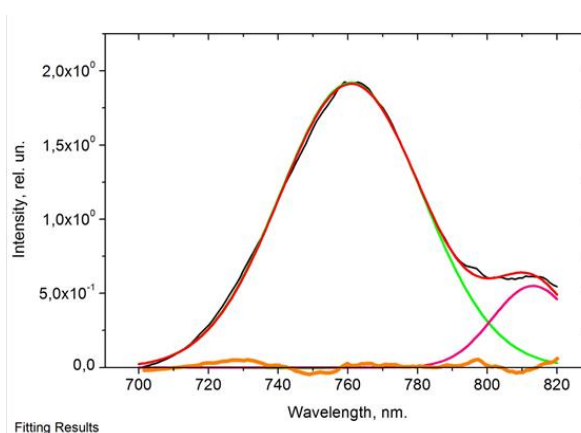


Рис. 24. Разложение спектра испускания флуоресценции пробы воды ($\lambda_{ex}= 440$ нм), взятой с глубины 1,825 м. озера Трехцветного, на три гауссианы.

Озеро Нижнее Ершовское

Все спектры испускания флуоресценции регистрировались в диапазоне от 600 до 820 нм при длине волны возбуждения $\lambda_{ex} = 440$ нм.

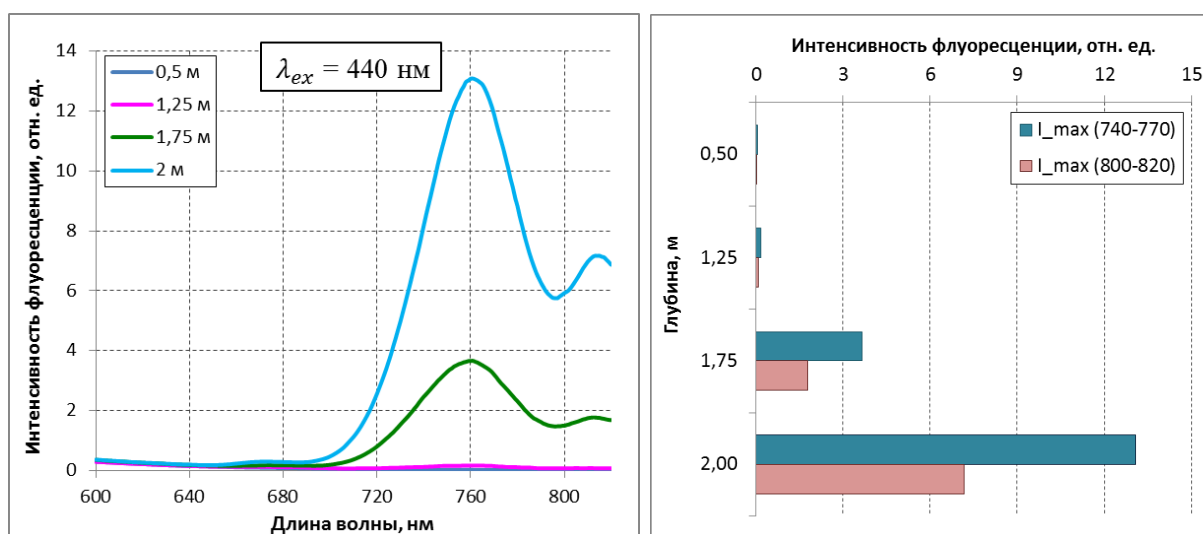


Рис. 25. Спектры испускания флуоресценции проб при $\lambda_{ex}=440$ нм из озера Нижнее Ершовское (слева); Изменение длинноволновых максимумов (скорректированной) интенсивности флуоресценции при $\lambda_{ex}=440$ нм с глубиной (справа).

На спектрах двух глубоководных проб отчетливо наблюдается около 760 нм максимум флуоресценции хлоросомальных Бхл-в, а на 815 нм – Бхл *a*. В соответствии с аппроксимацией спектров испускания флуоресценции кривыми гауссова распределения, с максимумами на 745 и 760 нм, коричневоокрашенных ЗСБ в озере не обнаружено.

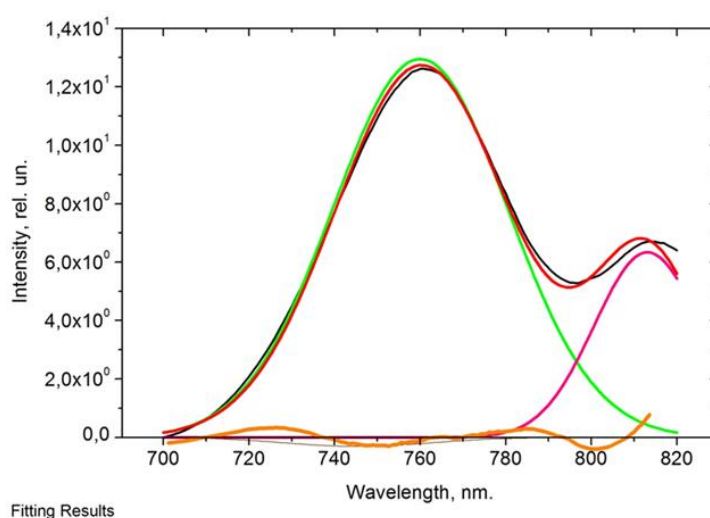


Рис. 26. Разложение спектра испускания флуоресценции пробы воды ($\lambda_{ex} = 440$ нм), взятой с глубины 2 м. озера Нижнего Ершовского, на три гауссианы.

Лагуна на Зеленом мысу

Регистрация спектров испускания флуоресценции производилась диапазоне от 600 до 820 нм при длине волны возбуждения $\lambda_{ex} = 440$ нм.

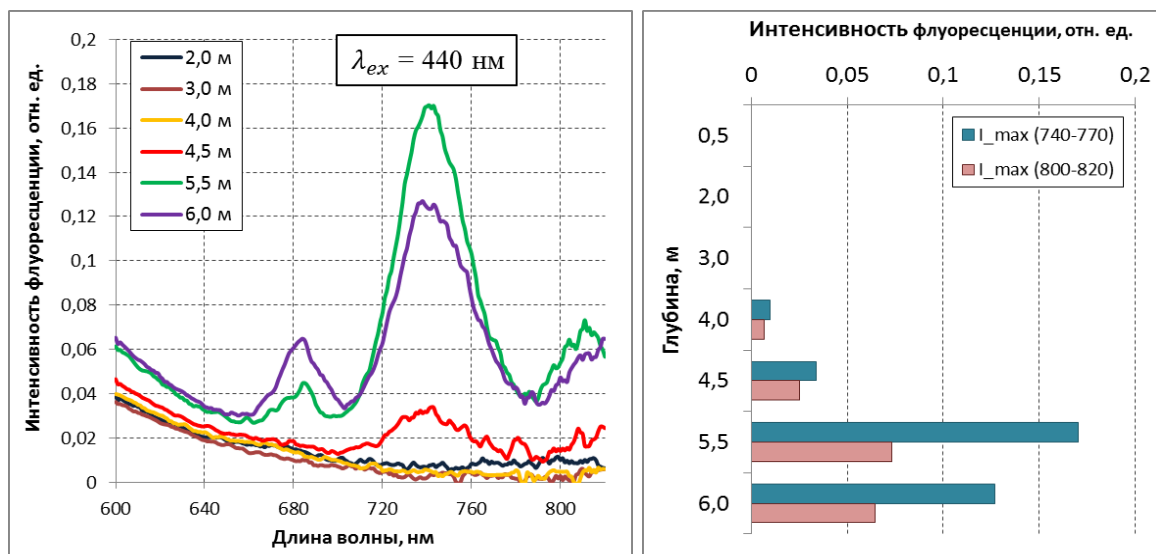


Рис. 27. Спектры испускания флуоресценции проб при $\lambda_{ex}=440$ нм из лагуны на Зеленом мысу (слева); Изменение длинноволновых максимумов (скорректированной) интенсивности флуоресценции при $\lambda_{ex}=440$ нм с глубиной (справа).

Были зафиксированы максимумы испускания флуоресценции для проб, взятых с глубины 4.5, 5.5 и 6 м, на длинах волн 745 нм и на 812-814 нм. В отличие от метода абсорбционной спектроскопии флуоресцентный метод показал наличие в озере ЗСБ. Пики флуоресценции аппроксимируются кривой гауссова распределения (с максимумом на длине волны 745 нм) с погрешностью не более 10 %, таким образом, показано содержание в лагуне на Зеленом мысу только коричневоокрашенного типа ЗСБ.

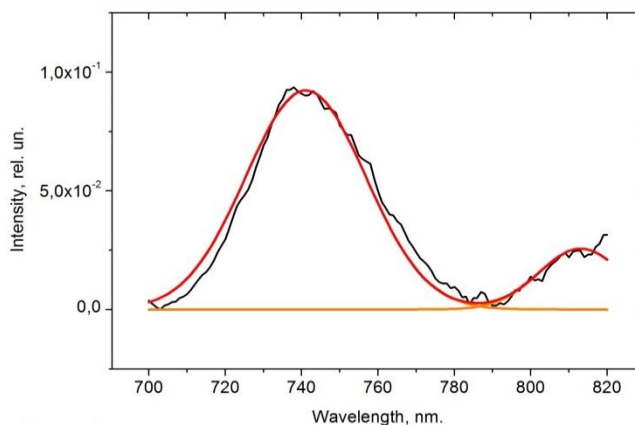


Рис. 28. Аппроксимация спектра испускания флуоресценции пробы воды ($\lambda_{ex} = 440$ нм), взятой из лагуны на Зеленом мысу с глубины 6 м, двумя гауссианами.

Озеро Большие Хрусломены

Все спектры испускания флуоресценции регистрировались в диапазоне от 600 до 820 нм при длине волны возбуждения $\lambda_{ex} = 440$ нм.

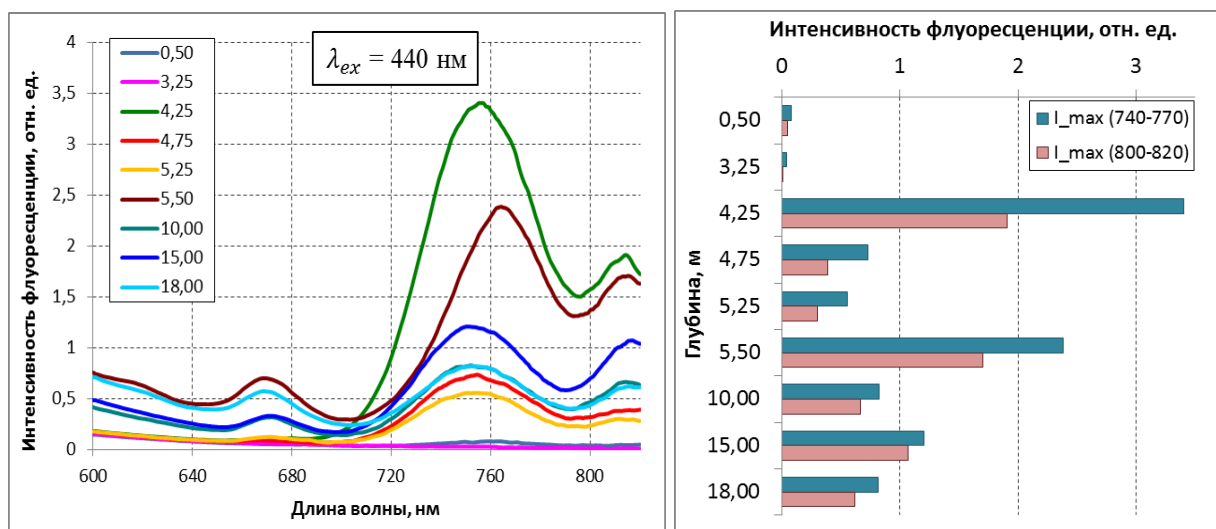


Рис. 29. Спектры испускания флуоресценции проб при $\lambda_{ex}=440$ нм из озера Большие Хрусломены (слева); Изменение длинноволновых максимумов (скорректированной) интенсивности флуоресценции при $\lambda_{ex}=440$ нм с глубиной (справа).

Начиная с глубины 4,25 м на спектрах наблюдались две ярко выраженные полосы флуоресценции в длинноволновой области (на длинах волн 740-770 нм и 815 нм), соответствующие максимумам флуоресценции Бхл *d*, *e* и Бхл *a* соответственно.

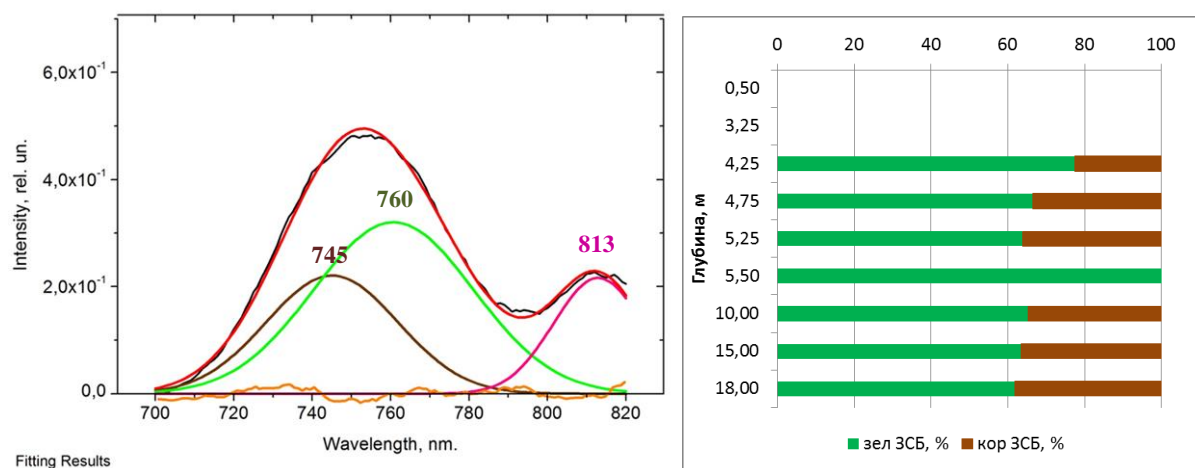


Рис. 30. Разложение спектра испускания флуоресценции пробы воды ($\lambda_{ex} = 440$ нм), взятой с глубины 5,25 м. озера Большие Хрусломены, на три гауссианы (слева); Процентное содержание зеленоокрашенных ЗСБ в озере Большие Хрусломены.

**Табл.5. Процентное содержание зеленоокрашенных и коричневоокрашенных ЗСБ
в озере Большие Хрусломены**

<i>глубина, м.</i>	0,50	3,25	4,25	4,75	5,25	5,50	10,00	15,00	18,00
зел. ЗСБ,%	0,00	0,00	77	66,4	63,8	100	65	63,5	61,9
кор. ЗСБ,%	0,00	0,00	23	33,6	36,2	0	35	36,5	38,1
$\sigma_{\text{сист}}^{\text{зел}}$, %	0,00	0,00	3	2,9	2,8	4	3	2,8	2,7

3.6. Сравнение результатов, полученных спектральными методами, с физико-химическими характеристиками водоемов

В зависимости от распределения гидрохимических параметров озерной воды по глубине, может меняться местоположение аноксигенного слоя фототрофов [27]. Сопоставим распределения физико-химических параметров воды - растворенного кислорода, содержания солей (S), сульфид-анионов (S²⁻), значений окислительно восстановительного потенциала Eh и водородного показателя pH - с полученными результатами.

Озеро Трехцветное

Озеро Трехцветное расположено в Пеккелинской губе, его максимальная глубина составляет 7,75 м. Из-за практически полного отделения от моря, озеро Трехцветное относят к стабильным меромиктическим водоемам. Вертикальная стратификация в нем сохраняется в течение года [28]. Согласно полученным данным (см. 3.4.) максимальная концентрация Бхл *d* (порядка 3700 мг/м³) в озере Трехцветное обнаружена в слое на глубине 1,85 м. На этом уровне с точки зрения гидрохимических характеристик наблюдаются: резкое падение концентрации кислорода, повышение в несколько раз солености воды, изменение знака окислительно-восстановительного потенциала (ОВП).

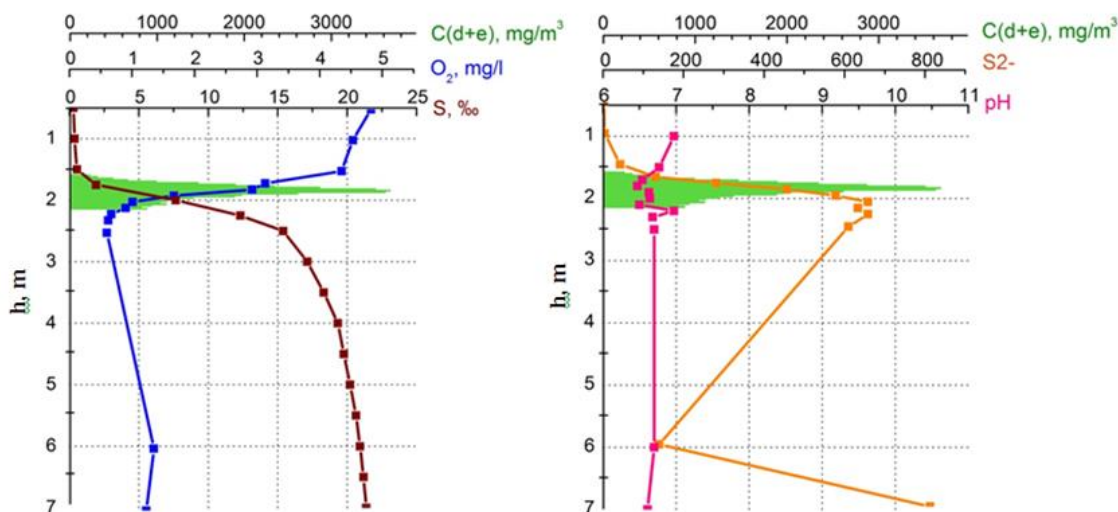


Рис. 29. Вертикальное распределение физико-химических характеристик воды в озере Трехцветное.

Зарегистрированное в лабораторных условиях количество сульфидов в пробах воды составило более 600 мг/л в верхних слоях, и около 800 мг/л в придонной толще озерной воды. Максимальная концентрация углеводородов достигала значений 0,12 мг в литре воды.

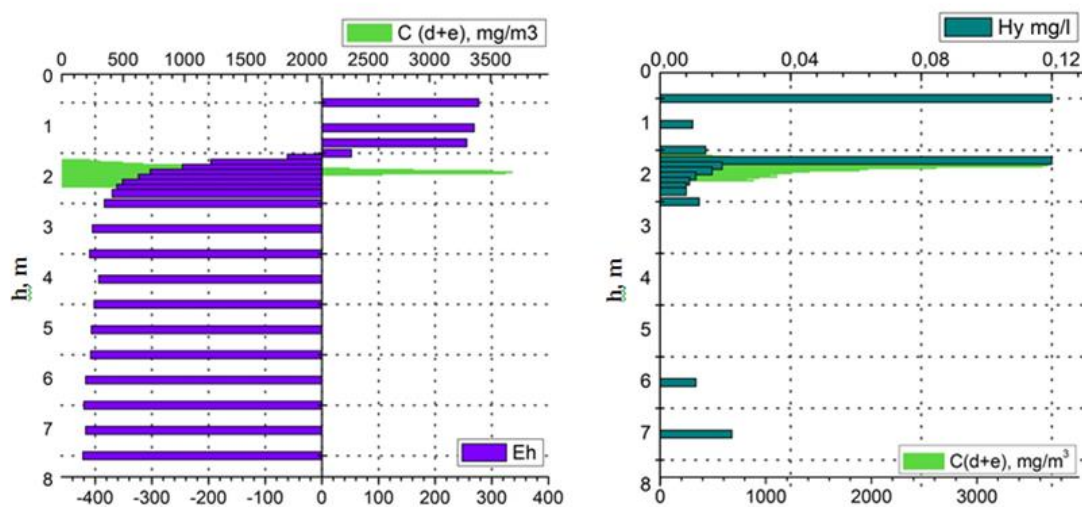


Рис. 30. Диаграмма распределения физико-химических характеристик воды в озере Трехцветное.

Озеро Нижнее Ершовское

Озеро Нижнее Ершовское – нижнее из двух озер, образовавшихся на месте древнего морского пролива, оно соединено с Верхним Ершовским озером, из которого получает пресную воду, доступа к морской воде у озера нет. Максимальная глубина водоема составляет 2,75 м [28].

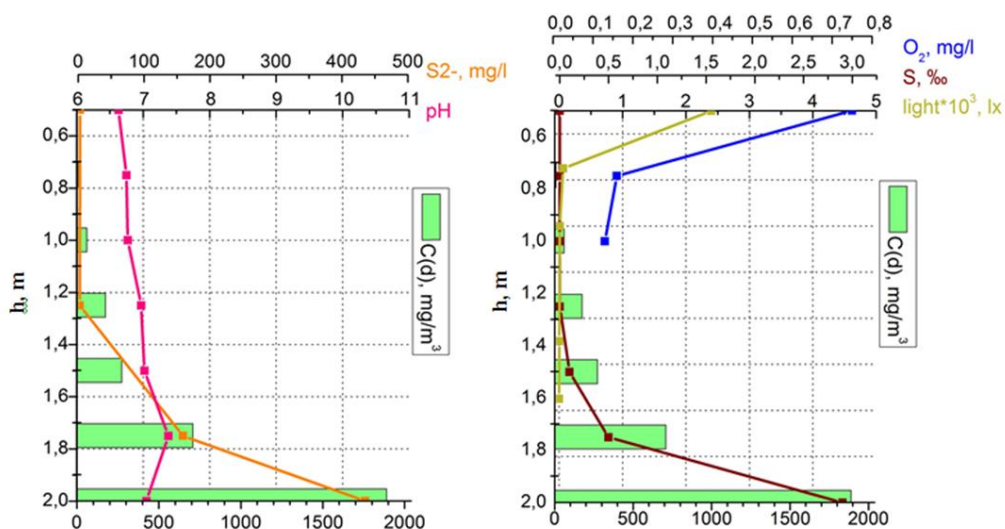


Рис. 31. Вертикальное распределение физико-химических характеристик воды в озере Нижнее Ершовское.

По спектрам испускания флуоресценции установлено присутствие в озере только зеленоокрашенного типа ЗСБ. Максимальная концентрация Бхл *d* (порядка 1800 мг/м³) приходится на придонный слой озера Нижнее Ершовское (см. 3.4.). В слоях с градиентом кислорода, солености и отрицательных значений ОВП спектральными методами зафиксировано наличие бактериохлорофиллов, а значит и ЗСБ. Значения рН в исследуемой зоне варьируются от 6,5 до 7, температура повышается по направлению ко дну от нуля до четырех градусов. Количество сульфидов в пробах воды возрастало с глубиной, начиная с 1.2 м. Максимальное зарегистрированное значение сульфид-анионов составило около 450 мг/л.

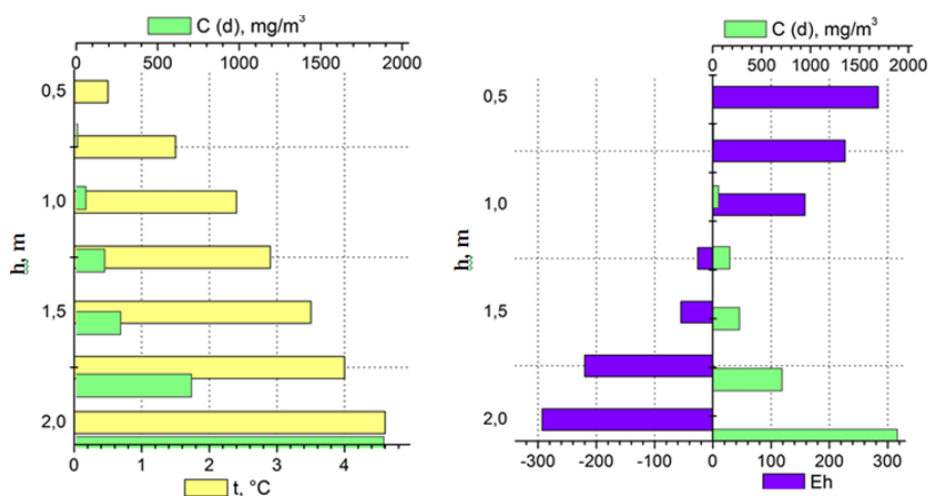


Рис. 32. Вертикальное распределение физико-химических характеристик воды в озере Нижнее Ершовское.

Лагуна на Зеленом мысу

Лагуна на Зеленом мысу – наименее отделенный от моря водоем из всех изученных. В лагуну через порог во время прилива поступает морская вода из Кислой губы. Глубина водоема 6,5 м, амплитуда приливных колебаний около 10 см. Образцы воды, имеющие наибольшее значение интенсивности флуоресценции, были взяты из зоны отрицательного ОВП и положительной температуры (около 0.4 градуса).

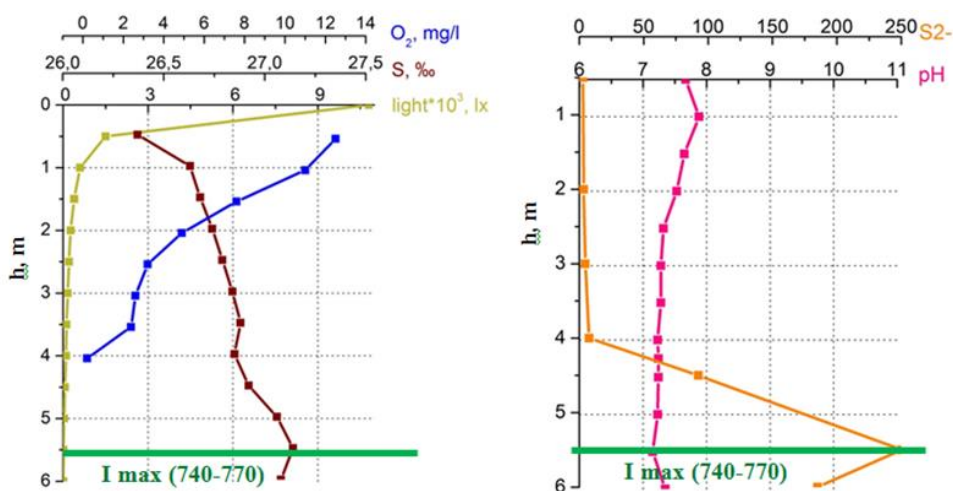


Рис. 33. Вертикальное распределение физико-химических характеристик воды в лагуне на Зеленом мысу.

Обнаруженные на глубине 5.5 м спектральными методами коричневоокрашенные ЗСБ обитали в полностью аноксигенной зоне, без доступа солнечного света, при отрицательном ОВП. Значения рН в среде составляли 7.2, соленость принимала значения порядка 27 ‰, а содержание сульфидов, измеренное в лаборатории, равнялось 240 мг/л.

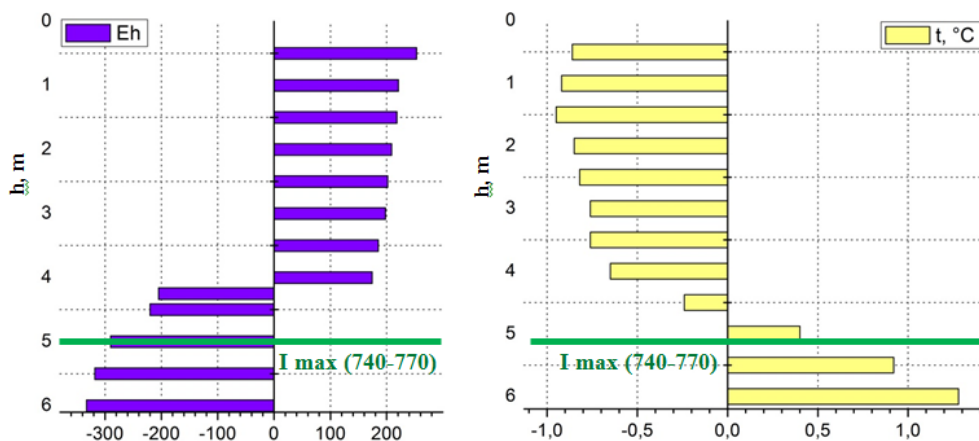


Рис. 34. Вертикальное распределение физико-химических характеристик воды в лагуне на Зеленом мысу.

Озеро Большие Хрусломены

Озеро Большие Хрусломены - самый большой из обнаруженных на сегодняшней день отделяющихся водоемов Белого моря. Длина озера 1000 м, ширина в узком месте 280 м, наибольшая глубина 21 м [28]. Озеро сообщается с морем, во время прилива в него непродолжительное время через проток поступает морская вода, но большую часть времени течение направлено из озера в море, и по ручью стекает опресненная вода. Приливные колебания около 0,2 м.

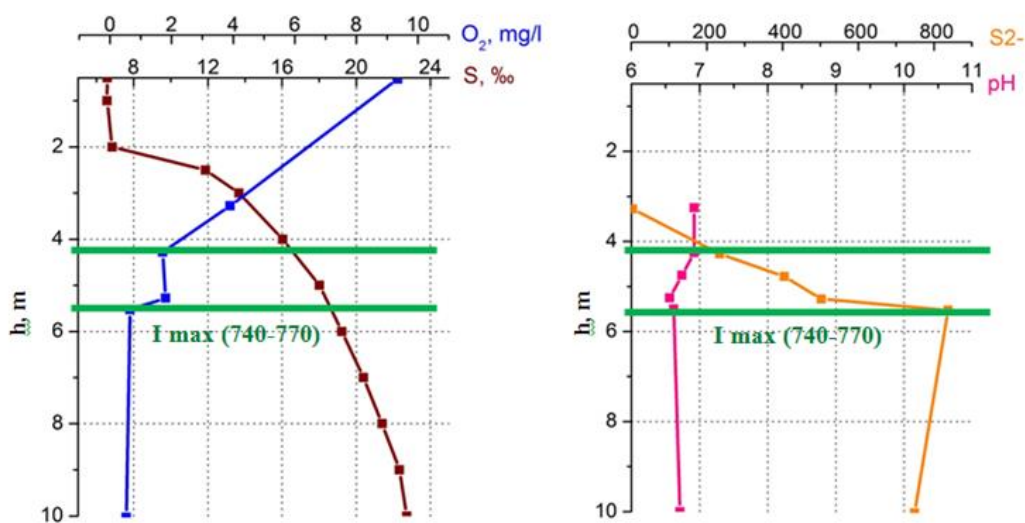


Рис. 35. Вертикальное распределение физико-химических характеристик воды в озере Большие Хрусломены.

Присутствие как зеленоокрашенных, так и коричневоокрашенных серобактерий обнаружено, начиная с глубины 4 м. Концентрация кислорода в слоях с ЗСБ варьировалась от 1 до 2 мг на литр воды, соленость принимала значения порядка 18 ‰, а содержание сульфидов превысило значение 800 мг/л. Проба с глубины 4,5, имеющая максимальное значение интенсивности флуоресценции, располагалась в области отрицательного значения ОВП и температуры порядка 5 градусов. С увеличением глубины значения температуры и солености росли.

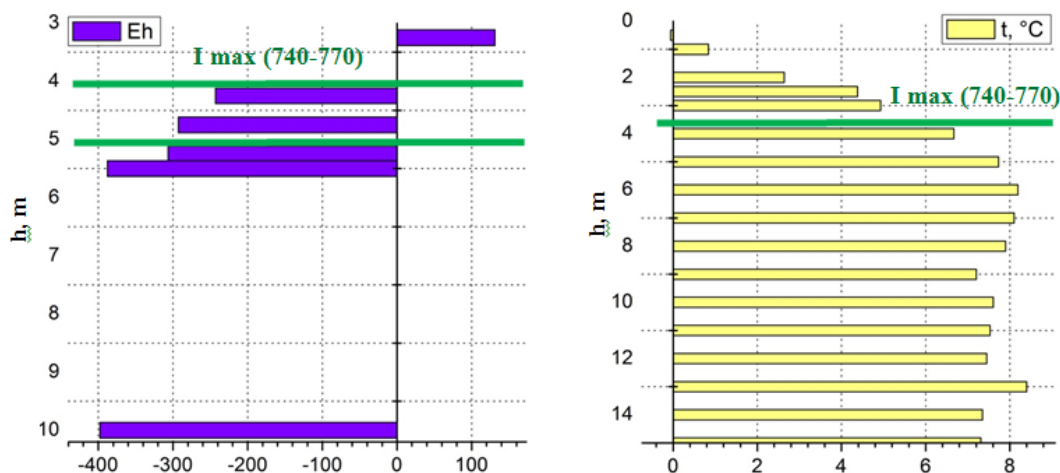


Рис. 36. Вертикальное распределение физико-химических характеристик воды в озере Большие Хрусломены.

3.7. Оценка количества бактериохлорофилла в одной клетке зеленых серобактерий разного типа

Концентрацию смеси Бхл ($d + e$) в воде озер рассчитывали, основываясь на полученных спектрах поглощения ацетоновых экстрактов проб природной воды, количество клеток в образцах – микроскопическими методами. Данные измерения позволили вычислить содержание Бхл в клетке каждого из типов бактерий. Так, в одной клетке зеленоокрашенных ЗСБ содержание Бхл d в среднем составило $4,5 \cdot 10^{-10}$ мг что составляет порядка 250 000 молекул, а в клетке коричневоокрашенных ЗСБ обнаружено $1,3 \cdot 10^{-10}$ мг или примерно 73 000 молекул Бхл e .

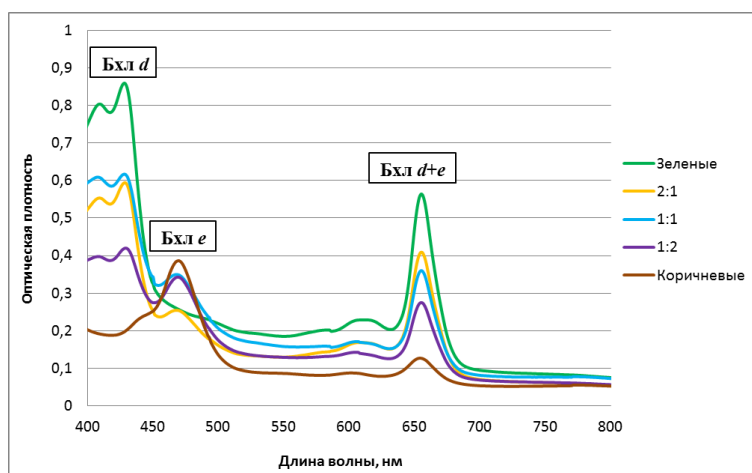


Рис.37. Спектры поглощения ацетон-метаноловых экстрактов чистых культур ЗСБ

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

В работе изучены спектральные характеристики зеленых серных бактерий – аноксигенных фототрофных микроорганизмов, обитающих в отделяющихся водоемах Кандалакшского залива Белого моря с высоким уровнем стратификации воды и уникальными гидрохимическими параметрами.

1. Для двух типов исследуемых микроорганизмов, зеленоокрашенных и коричневоокрашенных серобактерий, измерены спектры поглощения, испускания и возбуждения флуоресценции. Установлены характерные максимумы полос поглощения и флуоресценции чистых культур в диапазоне от 400 до 820 нм (Табл. 6). По спектрам поглощения и флуоресценции культур определен основной пигмент зеленоокрашенных ЗСБ – Бхл *d*, коричневоокрашенных – Бхл *e*.

Табл. 6. Характерные спектральные максимумы чистых культур двух типов ЗСБ (зел. – зеленоокрашенный и кор. – коричневоокрашенный тип бактерий) в воде или экстракте в смеси ацетона и метанола (5:2).

Тип бактерий и среда		Длина волны максимума полос поглощения, нм	Длина волны максимума полос флуоресценции, нм
зел. ЗСБ	в воде	455-469, 518-526, 716-724, 800	763-767, 810-815
	в экстракте	432-436, 604, 653-657	
кор. ЗСБ	в воде	426-428, 442-448, 719-728, 800	743-747, 810-815
	в экстракте	468-471, 599-604, 653-655	

2. Выбрана оптимальная длина волны возбуждения флуоресценции для проведения экспериментов с клетками обоих типов ЗСБ. При длине волны возбуждения 440 нм (спектральные щели 5 нм) интенсивности флуоресценции всех фотосинтетических пигментов бактерий, Бхл *d*, Бхл *e* и Бхл *a*, дающих характерные спектральные максимумы, максимальны.

3. С помощью анализа спектров образцов чистых культур показана возможность аппроксимации полос испускания флуоресценции микроорганизмов кривой распределения Гаусса в области свечения бактериохлорофилла. При таком приближении средние значения ширины функции на половине амплитуды для зеленоокрашенных серобактерий равны $(56,9 \pm 1,5)$ нм, а для коричневоокрашенных $(46,5 \pm 0,6)$ нм. Более узкие полосы флуоресценции клеток бактерий, содержащих Бхл *e*, по сравнению с клетками, имеющими главным фотосинтетическим пигментом Бхл *d*, свидетельствуют о меньшем количестве молекул пигмента в светособирающем комплексе коричневоокрашенного типа бактерий по сравнению с зеленоокрашенным. Амплитуда распределения Гаусса зависит от суммарной концентрации пигмента в клетках серобактерий.

4. С помощью спектров поглощения экстрактов чистых культур ЗСБ оценено количество молекул бактериохлорофилла в клетке каждого типа бактерий: 250 000 молекул Бхл *d* и 73 000 молекул Бхл *e*. Фотосинтетический аппарат зеленоокрашенных ЗСБ содержит большее количество молекул бактериохлорофилла, что дополнительно подтверждается разницей в ширине полос флуоресценции соответствующих пигментов в спектрах живых клеток.

5. Предложен метод разделения вкладов двух типов бактерий в водоеме, заключающийся в разложении полос испускания флуоресценции баткриохлорофилла на три кривых гауссовой формы с максимумами на 745, 760 и 813 нм (испускание Бхл *e*, *d* и *a* соответственно). Данным методом определено процентное соотношение двух типов культур бактерий на разной глубине для четырех отделяющихся озер Белого моря.

6. Заключительным этапом исследования являлось сравнение полученных спектральными методами данных о концентрации пигментов с физико-химическими параметрами воды в озерах. Это дало возможность выявить наиболее благоприятные условия обитания ЗСБ. На верхней границе слоя воды с микроорганизмами наблюдалось резкое падение концентрации

кислорода, увеличение градиента солености, смена знака окислительно-восстановительного потенциала на положительный.

Таким образом, примененные в работе спектральные методы изучения проб природной воды позволили не только детектировать наличие определенного вида микроорганизмов в каждом слое воды с разной глубины из нескольких водоемов, но и с помощью математической обработки спектров сделать выводы сразу о двух типах бактерий с различной пигментацией, их парциальных концентрациях непосредственно в среде обитания. Влияние внешних условий на живой организм, в качестве которого выступают зеленые серные бактерии, отражается в изменении его физических характеристик, в том числе спектральных свойств, регистрация которых делает доступным мониторинг экологического состояния уникальных объектов природы - стратифицированных водоемов.

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 организацию экспедиционных работ в Кандалакшском заливе Белого моря.

Благодарю старшего научного сотрудника географического факультета МГУ **Горшкову Ольгу Михайловну** за организацию измерений гидрохимических характеристик озер в лабораторных условиях, сотрудников Института микробиологии им. С.Н. Виноградского: кандидата биологических наук, младшего научного РАН **Лунину Ольгу Николаевну** за предоставленные для спектральных измерений образцы чистых и накопительных культур зеленых серных бактерий; докторов биологических наук **Саввичева Александра Сергеевича** и **Горленко Владимира Михайловича** за консультации по микробиологии и полезные советы.

Автор выражает глубокую признательность за всестороннюю помощь в процессе подготовки дипломной работы научному руководителю – кандидату физико-математических наук **Пацаевой Светлане Викторовне** и аспирантке **Харчевой Анастасии Витальевне**.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Система Белого моря. Водная толща и взаимодействующие с ней атмосфера, криосфера, речной сток и биосфера / Отв. ред. Лисицын А.П. 2012. Том II. М.: Научный мир. С. 433-579.
2. Краснова Е.Д., Пантюлин А.Н. Кисло-сладкие озера, полные чудес // Природа. 2013. № 2. С. 39-48.
3. Труды Института микробиологии имени С.Н. Виноградского. Фотосинтезирующие микроорганизмы / Отв. ред. В.Ф. Гальченко. 2010. Вып. 15. Ин-т микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН. М.: Макс пресс. С. 133-175.
4. Проблемы ранней эволюции фотосинтеза / Отв. ред. В.М. Горленко, С.В. Рожнов. Серия «Геобиологические процессы в прошлом». 2011. М.: ПИН РАН. 218 с.
5. Hans Van Gemerden and Jordi Mas. Ecology of Phototrophic Sulfur Bacteria. 1995. Department of Microbiology, University of Groningen, The Netherlands. Department of Genetics and Microbiology, Autonomous University of Barcelona, Spain.
6. Kharcheva A. V., Zhiltsova A. A. Studies of green sulphur bacteria using spectral methods: Comparison of fluorescence and absorption characteristics in winter and summer // WDS'16 Proceedings of Contributed Papers - Physics. 2016. Matfyzpress Prague. P. 214–218.
7. Olson J.M. Chlorophyll Organization and Function in Green Photosynthetic Bacteria // Photochemistry and Photobiology 67(1). 1998. P. 61-75.
8. Blankenship R.E., Olson J.M., Miller M. Antenna Complexes from Green Photosynthetic Bacteria. 1995. In Anoxygenic Photosynthetic Bacteria. Chapter 20 (Edited by R. E. Blankenship, M. T. Madigan and C. E. Bauer). 2004. P. 399-435.
9. Feiler Ute, Hauska Gunter. The reaction center from Green Sulfur Bacteria. 1995. In Anoxygenic Photosynthetic Bacteria. Chapter 30 (Edited by R. E. Blankenship, M. T. Madigan and C. E. Bauer). 2004. P. 665-685.

10. Orf, G. S., Blankenship, R. E. Chlorosome antenna complexes from green photosynthetic bacteria // *Photosynthesis research*. 2013. P. 315-331.
11. Bina D., Zdenko G., František V., Radek L. Native FMO-reaction center supercomplex in green sulfur bacteria: an electron microscopy study // *Photosynthesis research*. 2015. P. 93-10.
12. Кондратьева Е.Н. Фотосинтезирующие бактерии и бактериальный фотосинтез. 1972. М.: Изд-во Моск. ун-та. 76 с.
13. Левшин Л.В., Салецкий А.М. Оптические методы исследования молекулярных систем Ч.1. Молекулярная спектроскопия. 1994. М.: Изд-во МГУ. 83 с.
14. Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В. Лекции по медицинской биофизике. 2007. М.: Изд-во МГУ. 432 с.
15. Zuber H., Cogdell R.J. Structure and organization of purple bacterial antenna complexes. 1995. In *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*. Chapter 16 (Edited by R. E. Blankenship, M. T. Madigan and C. E. Bauer). 2004. P. 315-348.
16. Oelze J., Golecki J.R. Membranes and chlorosomes of green bacteria: Structure, composition, and development. 1995. In *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria* (Edited by R. E. Blankenship, M. T. Madigan and C. E. Bauer). 2004. P. 259–278.
17. Зобова А. В., Фетисова З. Г. Оптимальное сопряжение субантенн как стратегия эффективного функционирования светособирающих антенн фотосинтезирующих организмов. Модельные расчеты // *Доклады Академии наук*. 2007. Т. 416, № 5. С. 693–696.
18. Hohmann-Marriott M.F., Blankenship R.E.. Variable fluorescence in green sulfur bacteria // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2007. P. 106–113.
19. 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 // *Межд. заоч. научно-практ. конф. «Наука, образование, общество: тенденции и перспективы»*. 2014. С. 100-104.

20. Горшкова О.М., Зайцев Н.К., Слипечук М.В., Шорин С.В. Оперативность и точность. Использование ионселективных электродов для определения некоторых гидрохимических параметров пресной воды // Вода magazine. 2014. №8(84). С. 36-41.
21. Paul Schlyter. Radiometry and photometry in astronomy FAQ. 2006.
22. Горшкова О. М., Пацаева С. В., Федосеева Е. В. и др. Флуоресценция растворенного органического вещества природной воды // Вода: химия и экология. 2009. № 11. С. 31–37.
23. Kharcheva A. V., Zhiltsova A. A., Lunina O. N. et al. Quantification of two forms of green sulfur bacteria in their natural habitat using bacteriochlorophyll fluorescence spectra // Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering. 2016. Vol. 9917. P. 99170P–1–99170P–8.
24. Митин И.В., Русаков В.С. Анализ и обработка экспериментальных данных. Учеб.-метод. пособие. 1998. М. 48 с.
25. Электронные спектры сложных молекул / Сост. Пацаева С.В., Южаков В.И. 2010. М. 34 с.
26. Лунина О.Н., Саввичев А.С. и др. Аноксигенные фототрофные бактерии стратифицированного озера Кисло-Сладкое (Кандалакшский залив Белого моря) // Микробиология, 2014. Т. 83, №1. С. 90–108
27. Kharcheva A. V., Krasnova E. D., Gorlenko V. M., Lunina O. N., Savvichev A. S., Voronov D. A., Zhiltsova A. A., Patsaeva S. V. Depth profiles of spectral and hydrological characteristics of water and their relation to abundances of green sulfur bacteria in the stratified lakes of the white sea // Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering. 2016. Vol. 9917. P. 99170Q–1–99170Q–16.
28. Krasnova E.D., Voronov D.A. et al. Salt lakes separated from the white sea // EARSeL eProceedings. 2015. Vol. 14. P. 8–22.