

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

ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
КАФЕДРА ОБЩЕЙ ФИЗИКИ

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ
«Флуоресценция хлоросомного бактериохлорофилла:
основные закономерности и влияние параметров среды»

Выполнила студентка
205М группы
Жильцова Анна Александровна

Научный руководитель:
доцент Пацаева С.В.

Допущена к защите «__» _____ 2019 г.

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

Москва
2019

Оглавление	
ВВЕДЕНИЕ.....	4
Глава 1. Оптические и энергетические характеристики бактериохлорофиллов, фотосинтетических пигментов ЗСБ (обзор литературы).....	7
1.1. Хлоросомные бактериохлорофиллы и их спектры поглощения	7
1.2. Строение фотосинтетического аппарата ЗСБ	10
1.3. Перенос энергии фотовозбуждения в клетке ЗСБ.....	12
1.3.1. Путь и время переноса энергии возбуждения	12
1.3.2. Передача энергии от каротиноидов на Бхл	14
1.3.3. Эффективность переноса энергии возбуждения	15
1.4. Физические основы флуоресценции бактериохлорофилла.....	16
1.5. Тушение флуоресценции Бхл	19
1.5.1. Дезактивации возбужденного состояния Бхл каротиноидами	20
1.5.2. Контроль флуоресценции Бхл хинонами	22
Глава 2. Объекты и методы исследования	24
2.1. Объекты изучения.....	24
2.2. Многошприцевой пробоотборник.....	24
2.3. Приборы гидрохимического анализа.....	25
2.4. Спектральное оборудование и методика спектральных измерений	25
2.5. Измерение концентрации бактериохлорофиллов методом абсорбционной спектроскопии ацетон-метаноловых экстрактов	27
Глава 3. Экспериментальные результаты для разных культур бактерий	28
3.1. Исследование культур зеленых серобактерий методами абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии.....	28
3.2. Аппроксимация полос флуоресценции накопительных культур зеленых серобактерий математическими функциями.....	32
Глава 4. Экспериментальные результаты для зеленых серобактерий природной воды.....	36
4.1. Флуоресценция Бхл фототрофных бактерий в природной воде и влияние внешних факторов.....	36

4.2. Оценка количества Бхл в клетке ЗСБ	42
Глава 5. Эксперименты с зелеными серобактериями природной воды в лабораторных условиях	44
5.1. Зависимость интенсивности флуоресценции Бхл от Eh	44
5.2. Тушение флуоресценции Бхл кислородом.....	44
5.3. Изменение флуоресценции Бхл в присутствии соединений-восстановителей	47
5.4. Влияние температуры на спектры испускания флуоресценции Бхл.....	48
5.5. Обсуждение полученных результатов	50
ЗАКЛЮЧЕНИЕ. ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ	53
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	57

ВВЕДЕНИЕ

Состояния молекул в возбужденном состоянии играют ключевую роль в фотобиологических процессах, фотохимии, цепных реакциях. Наиболее ярким примером является фотосинтез – фундаментальный природный процесс, обеспечивающий условия жизни на нашей планете. В основе фотосинтеза лежат превращения возбужденных молекул хлорофилла (Хл) в случае оксигенного фотосинтеза или бактериохлорофилла (Бхл) при аноксигенном фотосинтезе, благодаря которым энергия солнца преобразуется в энергию химических связей. В настоящее время изучение молекулярных процессов в биологических системах стало возможным благодаря методам оптической спектроскопии. Системы энергообеспечения клеток живых организмов быстрее всего реагируют на изменение состояния окружающей среды [1], а значит, по характерным спектрам поглощения и люминесценции ключевых ферментов и пигментов энергосистемы клетки можно определять изменения и реакции, происходящие в ней в зависимости от физико-химических условий и внешних факторов.

Оптические характеристики хлорофилла хорошо известны и широко используются в мониторинге физиологического состояния растений [2], биодиагностике [3] или для картирования фитопланктона в дистанционном зондировании [4,5,8], однако спектральные свойства бактериохлорофиллов, особенно так называемых «хлоросомных» бактериохлорофиллов (Бхл *c*, *d*, *e*) – фотосинтетических пигментов зеленых серных бактерий пока мало изучены, несмотря на то, что в некоторых вопросах фотобиологии и наномедицины имеют особую важность. Например, известно, что благодаря своим спектральным и фотофизическим характеристикам производные бактериохлорофилла являются перспективными соединениями для фотодинамической терапии рака (ФДТ). В последние годы на основе производных Бхл *a* и наночастиц золота происходит разработка наноструктурированных ИК-фотосенсибилизаторов для ФДТ [6,7]. Хлоросомные Бхл пока не рассматривались в качестве

фотосинтезизаторов из-за неизученности их оптических характеристик под действием облучения, хотя перспективность хлоросомных Бхл для ФДТ может заключаться в том, что в водных системах они поглощают свет в спектральном диапазоне промежуточном по сравнению с Хл *a* и Бхл *a*, производные которых используются для ФДТ в настоящее время. Продолжаются разработки в области искусственного фотосинтеза, где принципы самоорганизующихся хромофоров (в качестве которых могут выступать Бхл) используются для повышения эффективности устройств [9].

Кроме того, изучение люминесцентных характеристик Бхл важно и с точки зрения экологических исследований. В настоящее время актуальной задачей является мониторинг отделяющихся водоемов Кандалакшского залива Белого моря, как группы уникальных гидрологических объектов. Их возникновение и эволюция связаны с непрерывным подъемом берегов Белого моря со средней скоростью около 4 мм в год [10]. Общей отличительной чертой таких озер является устойчивое расслоение толщи воды на поверхностный опресненный, средний соленый и придонный анаэробный слой, которое объясняется наличием градиентов температуры, кислорода и солености в водоеме [11]. Накопленная в донных отложениях озер органика и повышающаяся с глубиной концентрация солей стимулирует процесс бактериальной сульфатредукции, что приводит к появлению сероводорода в придонной воде. На границе кислородного и сероводородного слоев образуется благоприятное место обитания для аноксигенных фототрофных микроорганизмов – зеленых серных бактерий (ЗСБ), содержащих фотосинтетические пигменты (Бхл).

Целью данной работы было изучение оптических свойств так называемых хлоросомных бактериохлорофиллов (Бхл *c*, *d*, *e*), главным образом их флуоресцентных характеристик и факторов, приводящих к тушению флуоресценции и изменению формы полос. Исследование проводилось как на образцах природной воды с микроорганизмами из меромиктических водоемов, так и на культурах, выращенных из образцов природной воды.

Стоит отметить, что целенаправленное изучение факторов, влияющих на флуоресценцию Бхл непосредственно в пробах природной воды с зелеными серобактериями, проводилось впервые.

Для достижения поставленной цели были поставлены и решены следующие задачи: измерить спектры поглощения и спектры флуоресценции чистых культур бактерий, выделенных из исследуемых озер; аппроксимировать полосы флуоресценции Бхл и определить их оптические характеристики; провести флуоресцентный анализ проб воды в области хемоклина из отделяющихся водоемов Белого моря; исследовать зависимость интенсивности флуоресценции и характеристики полос флуоресценции Бхл от различных факторов: концентрации кислорода и сероводорода в воде, температуры, редокс-потенциала, наличия соединений-восстановителей.

Глава 1. Оптические и энергетические характеристики бактериохлорофиллов, фотосинтетических пигментов ЗСБ (обзор литературы)

Бактериохлорофиллы являются фотосинтетическими пигментами ЗСБ, благодаря которым в клетках аноксигенных микроорганизмов протекают реакции фотосинтеза. Уникальность фотосинтетического аппарата позволяет ЗСБ развиваться при низкой освещенности. Бхл обладают особыми спектральными характеристиками, по которым становится возможным их обнаружение и анализ спектральными методами.

1.1. Хлоросомные бактериохлорофиллы и их спектры поглощения

Бхл поглощают свет определенного спектрального диапазона. Часть солнечного света, не поглощаемая пигментами, отражается и обуславливает видимую окраску клеток. Различают шесть видов Бхл: *a*, *b*, *c*, *d*, *e* и *g*, из которых выделяют так называемые хлоросомные бактериохлорофиллы (Бхл *c*, *d* и *e*) – пигменты светособирающей антенны фотосинтетического аппарата ЗСБ (Рис. 1б).

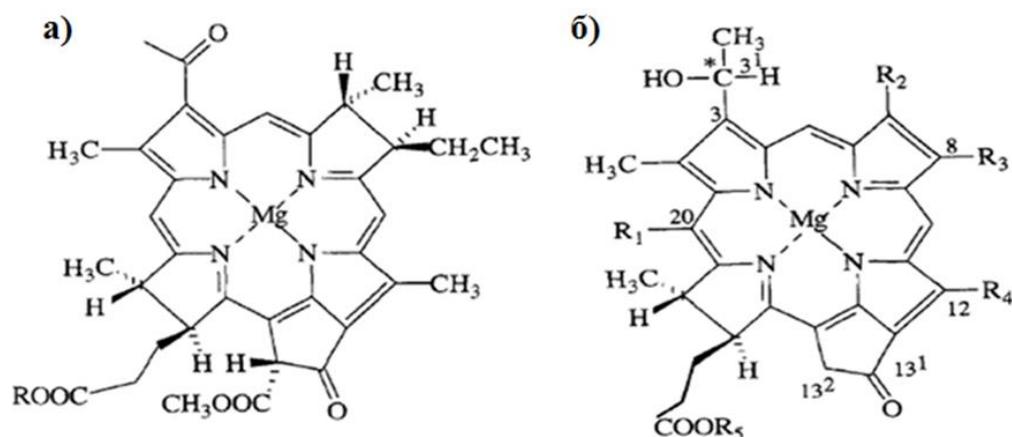


Рис.1. Структура молекул а) Бхл *a* и б) хлоросомных Бхл (Бхл *c*, *d* и *e*) [12].

Среди перечисленных выше фотосинтетических пигментов наиболее распространенным и наиболее изученным является Бхл *a*, он найден во всех типах ЗСБ (в меньшей концентрации, чем хлоросомные Бхл) и в большинстве пурпурных бактерий. Для Бхл *a* радикалом *R* является фитил. Другие типы пигментов – Бхл *c*, *d* и *e* – изучались не так интенсивно, как Бхл *a*; в клетках

бактерий они представляют собой смесь нескольких гомологов, радикалы которых представлены в таблице 1.

Табл. 1. Различные составляющие бактериохлорофиллов, характерные для ЗСБ [12].

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 (преимущественно)
<i>e</i>	-CH ₃	-CHO	-C ₂ H ₅ -C ₃ H ₇ -C ₄ H ₉	-C ₂ H ₅	фарнезил (преимущественно)

При прохождении света через вещество часть его поглощается. 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].

По сравнению с хлорофиллами растений, молекулы Бхл поглощают свет в более длинноволновой области (Табл. 2). Так, зеленые бактерии поглощают свет примерно до 850 нм.

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/синем) и длинноволновом (красном/инфракрасном) участках спектра (см. Табл. 2). Например, длинноволновый максимум поглощения мономерной формы Бхл *c*, наблюдаемый в органических растворах, приходится на 760 нм [12], а Бхл *a* – на 772 нм [15]. Однако внутри хлоросом молекулы Бхл 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 форм бактерий, в состав которых входит Бхл *d* и Бхл *e*, данное значение составляет 725-745 нм и 715-725 нм соответственно [16].

Табл. 2. Максимумы спектров поглощения хлорофиллов и Бхл (в клетках и в ацетоновых экстрактах) и максимумы спектров флуоресценции [16,17].

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>c</i>	457-460, 745-760	433,663	775
Бхл <i>d</i>	450, 725-745	425, 654	763
Бхл <i>e</i>	460-462, 715-725	459, 648	738

На рис. 2 представлены спектры поглощения хлоросом, выделенные из трех видов ЗСБ.

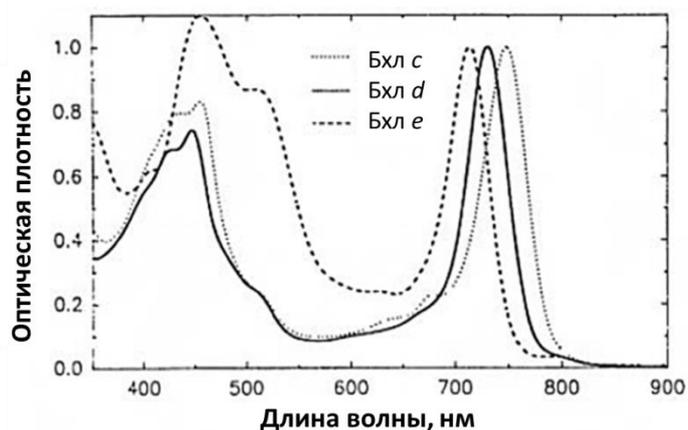


Рис. 2. Спектры поглощения хлоросом, выделенных из культур ЗСБ: *Chlorobium limicola* (Бхл *c*), *Chlorobium vibrioforme* (Бхл *d*) и *Pelodictyon phaeoclathratiforme* [12].

Считается, что молекулы Бхл со сдвинутым в длинноволновую область поглощением, относительно фотосинтетических пигментов растений – хлорофиллов, возникли в результате эволюции соответствующих микроорганизмов в ходе конкуренции за световые ресурсы [18]. Кроме бактериохлорофиллов, все фототрофные бактерии содержат пигменты каротиноиды, основной функцией которых является передача поглощенной солнечной энергии в синем и зеленом спектральном диапазоне на Бхл.

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 и поглощающий свет на длине волны 505 нм [16]). Присутствие того или иного типа микроорганизмов в среде зависит от ряда условий и может меняться в зависимости от состояния водоема и внешних факторов [19].

1.2. Строение фотосинтетического аппарата ЗСБ

В клетках бактерий Бхл располагаются в специальных светособирающих 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 (Рис. 3). В свою очередь ядро представляет собой 10-30 стержневых элементов, сформированных преимущественно из бактериохлорофиллов *c*, *d* или *e* в зависимости от штамма, а также содержащих каротиноиды, белки, гликолипиды [12] и хиноны [20]. Экспериментально было показано, что для культур бактерий, содержащих Бхл *c* (*Clorobium tepidum* и *Chloroflexus aurantiacus*) молярное соотношение общего количества хинонов к Бхл *c* и каротиноидов к Бхл *c* в хлоросомах составляет 1:11 и 1:10 соответственно [20]. В одной фотосинтетической единице ЗСБ может содержаться от 900 до 4500 хлоросом-хлорофилл молекул (в хлоросоме) и около 80-250 молекул Бхл *a*. Для сравнения, фотосинтетическая единица зеленой нитчатой бактерии содержит 100-200 молекул Бхл *c* в хлоросоме и около 10 молекул Бхл *a* [12,21]. Молекулы Бхл *a* передают энергию возбуждения через уникальный антенный комплекс, состоящий из

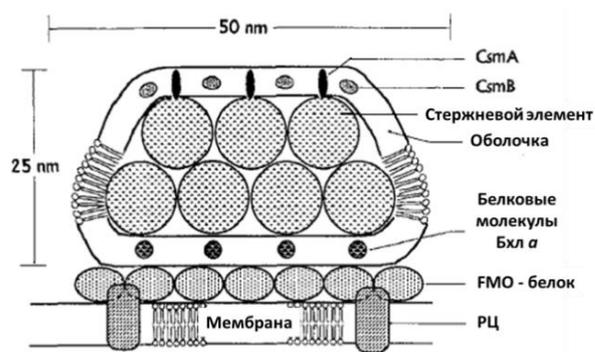


Рис. 3. Модель антенной системы ЗСБ [12].

нескольких белковых молекул Бхл *a*, называемых FMO-белками, на реакционный центр (РЦ), включенный в цитоплазматическую мембрану клетки. Описанные комплексы, хлоросома, FMO белок и РЦ, составляют фотосинтетический аппарат ЗСБ [21], благодаря которому бактерии способны жить в условиях чрезвычайно низкой освещенности, в том числе в глубоководных термальных источниках [22].

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 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) [14].

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 [23]. 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 [24,12]. 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 [24].

В отличие от светособирающих систем других форм фотосинтезирующих микроорганизмов, Бхл в хлоросомах не связываются с белками. Хлоросомы энергетически связаны с РЦ через белок базовой пластины и FMO-белок, оба из которых содержат Бхл *a*. Возбуждение мигрирует вниз по градиенту энергии от олигомеров Бхл к РЦ путем Фёрстеровского переноса энергии (диполь-дипольного переноса) [17].

1.3. Перенос энергии фотовозбуждения в клетке ЗСБ

1.3.1. Путь и время переноса энергии возбуждения

Процесс фотосинтеза в клетках ЗСБ начинается с поглощения солнечного света молекулами-хромофорами, в качестве которых выступают каротиноиды и молекулы Бхл (полоса поглощения Бхл *c/e* ~700 – 800 нм). Поглощенная хромофорами энергия перемещается к так называемой «базовой/основной пластинке», белку, соединяющему хлоросому с

мембраной, а затем через FMO-белок мигрирует к РЦ. Посредством многочисленных исследований было показано, что равновесие внутри одного стержневого элемента с Бхл происходит очень быстро, в течение 200-500 фс. Время передачи энергии между различными стержневыми элементами в хлоросоме занимает значительно больше времени ~2-5 пс. В итоге передача энергии от Бхл *c/d/e* к Бхл *a* в базовой пластинке происходит за время 20-50 пс (Рис. 4) [9].

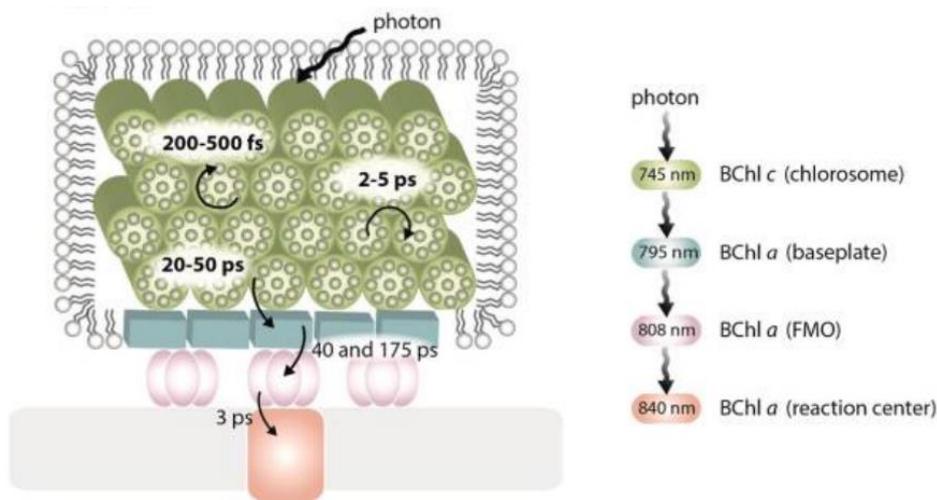
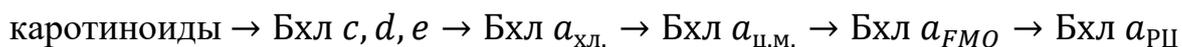


Рис. 4. Схематическое представление хлоросомы ЗСБ, иллюстрирующее пути и время передачи энергии [9].

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 или «базовой / основной пластинке», FMO белке и реакционном центре соответственно [16]. Спектры поглощения и флуоресценции (см. далее) всех перечисленных типов Бхл 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 [12].

Учитывая оптические свойства Бхл и их места расположения, схема пути переноса энергии возбуждения в клетке принимает следующий вид [9,17, 25]:

каротиноиды → Бхл *c, d, e* в хлоросоме (A710 – 750) →
 Бхл *a* в ц. м. (A795) → Бхл *a* в FMO белке (A810) → Бхл *a* в РЦ (A840)
 где численные значения в скобках соответствуют максимумам поглощения, описываемых пигментов.

1.3.2. Передача энергии от каротиноидов на Бхл

Каротиноиды являются многофункциональными хромофорами и жизненно важными компонентами биологических тканей. В фотосинтезирующих организмах каротиноиды поглощают свет в синезеленой области солнечного спектра и посредством синглет-синглетных переходов передают энергию возбуждения Бхл [9] (максимум поглощения которых сдвинут в красную область спектра). Механизмы передачи энергии от каротиноидов к Бхл не могут быть эффективно описаны с помощью теории переноса энергии Фёрстера, так как диполь-дипольное приближение является недействительным из-за территориальной близости пигментов. Переход энергии от каротиноидов на Бхл может происходить из двух низших возбужденных состояний каротиноидов, которые обозначены на рисунке 5, как S_2 и S_1 .

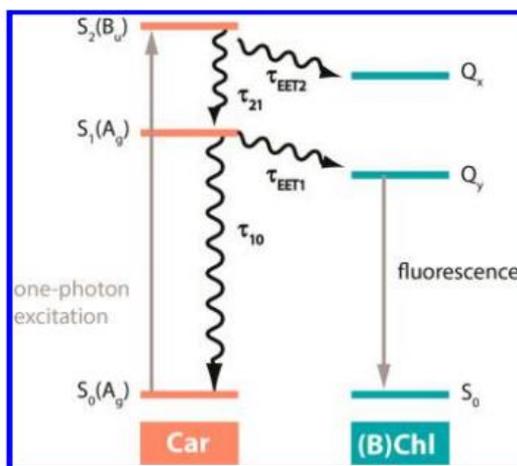


Рис. 5. Схема энергетических уровней каротиноидов и Бхл [26].

Каротиноиды в состоянии S_1 не способны к поглощению света (это состояние в литературе называется «темным» состоянием), поэтому участие состояния S_1 в переносе энергии может быть рассчитано только с учетом заимствования энергии из S_2 состояния. Между возбужденными состояниями

S_2 и S_1 было экспериментально продемонстрировано наличие дополнительного нижежащего возбужденного состояния каротиноидов. [27]. В некоторых ситуациях передача энергии на Бхл происходит только из состояния S_2 , в таком случае общая эффективность передачи энергии снижается до 60%. [9]

1.3.3. Эффективность переноса энергии возбуждения

Зеленые фотосинтезирующие микроорганизмы обладают одними из самых больших антенных комплексов. Благодаря этой особенности они способны расти в широком диапазоне интенсивностей света, адаптируясь к низким интенсивностям путем увеличения размера периферической Бхл *c/d/e*-антенны. Однако увеличение размера антенны неизбежно ведет за собой изменение ее структуры для сохранения высокой эффективности функционирования [28].

В 2012 г. было показано, что светособирающие антенны фотосинтетиков устроены таким образом, что захват световой энергии является максимальным как в условиях низкой, так и высокой интенсивности света. Однако размер антенны не оптимизирован для достижения высокой квантовой эффективности, так как существует слабая кинетическая связь между быстрым захватом фотона и более медленным процессом переноса фотосинтетических электронов, что приводит к потерям энергии до 50 %. Эффективность синглет-синглетного переноса энергии от каротиноидов к Бхл *d* в светособирающей системе 2 пурпурных бактерий в различных экспериментах варьировался от 50% до 100%, в зависимости от типа каротиноидов и светособирающего комплекса [32,33]. После поглощения энергия возбуждения мигрирует сначала среди молекул того же комплекса, затем от одного комплекса к другому, прежде чем попасть в фотохимический реакционный центр, где энергия преобразуется в состояние с разделенными зарядами с квантовой эффективностью более 90% [9]. Перенос энергии от Бхл *c* до Бхл *a* в хлоросоме происходит с эффективностью порядка 55%,

тогда как передача энергии внутри пигментно-белкового комплекса продолжается с эффективностью порядка 100%. Для определения общей эффективности в «базовой» пластине и среде ФМО белка, который соединяет внешнюю антенную систему (хлоросому/базовую пластинку) с комплексом РЦ ЗСБ, необходима более подробная информация о структуре, которой в данный момент наука не располагает [9].

1.4. Физические основы флуоресценции бактериохлорофилла

Процессы обмена, преобразования и перераспределения энергии определяют фотофизические свойства молекул [29]. Для характеристики возбужденных состояний вещества (величин энергий, времен жизни) часто исследуют его флуоресценцию – процесс свечения атомов, молекул или ионов, возникающий в результате электронного перехода в комплексах при их возвращении из возбужденного состояния в основное. Флуоресценция вещества происходит через время порядка $10^{-7} - 10^{-10}$ секунд после поглощения кванта возбуждающего света [13]. В соответствии со схемой энергетических уровней Теренина-Льюиса (Рис. 6) флуоресценция относится к излучательным переходам и происходит между уровнями одинаковой мультиплетности (синглет-синглетные переходы).

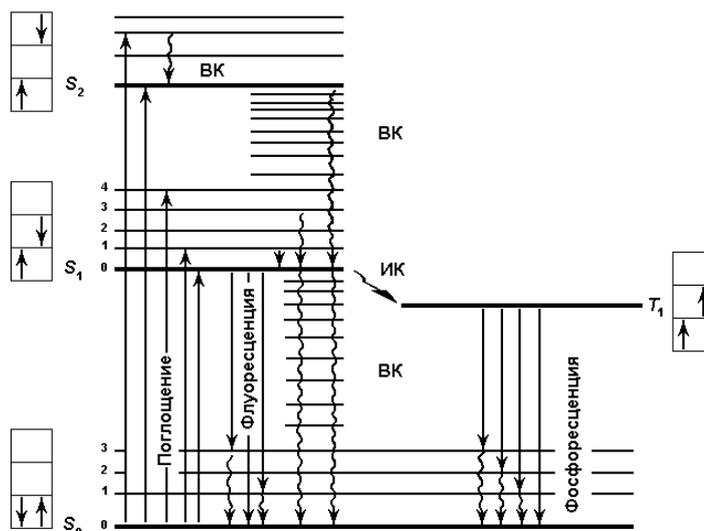


Рис. 6. Схема энергетических уровней синглетных и триплетных состояний молекул и переходов между ними [31].

После возбуждения светом молекулы вещества переходят на высшие синглетные уровни, откуда в соответствии с правилом Каша происходят быстрые безызлучательные переходы на нижний равновесный колебательный уровень первого разрешенного возбужденного электронного состояния S_1 (процесс внутренней конверсии). Для многих биологически важных соединений, в том числе и для молекул Бхл, переход из состояния S_1 в основное термически равновесное состояние осуществляется посредством отдачи молекулой избыточной колебательной энергии в виде испускания флуоресценции [13,30].

Безызлучательная дезактивация возбужденных молекул за счет молекулярных движений и колебаний ядер является конкурирующим процессом по отношению к флуоресценции, по этой причине флуоресценцию некоторых соединений удается наблюдать только при низких температурах порядка $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ [30]. Молекулы Бхл интенсивно флуоресцируют в растворах при комнатной температуре, что позволяет регистрировать в этих условиях их спектры флуоресценции.

Спектром флуоресценции вещества называют зависимость интенсивности испускаемого молекулами света, измеренной в относительных единицах, от длины волны испускания. Согласно правилу Стокса длина волны испускания флуоресценции больше соответствующих длин волн поглощения. Это объясняется превращением части энергии фотонов в тепловую энергию окружающих молекул [14], что приводит к уменьшению энергии квантов флуоресценции по сравнению с энергией поглощенных квантов.

Благодаря процессам внутренней конверсии спектры флуоресценции не зависят от длины волны возбуждающего света [13]. При регистрации интенсивности флуоресценции важен подбор концентрации изучаемого вещества, так как поглощение и флуоресценция света должна происходить равномерно по всей толщине раствора. Для этого при измерении пользуются разбавленными растворами, оптическая плотность которых не превышает 0,1 – 0,2. Интенсивность флуоресценции в разбавленных растворах прямо

пропорциональна концентрации вещества и возрастает с увеличением интенсивности возбуждающего света [13,30].

На рис. 5 представлены спектры флуоресценции хлоросом, выделенных из клеток трех видов ЗСБ.

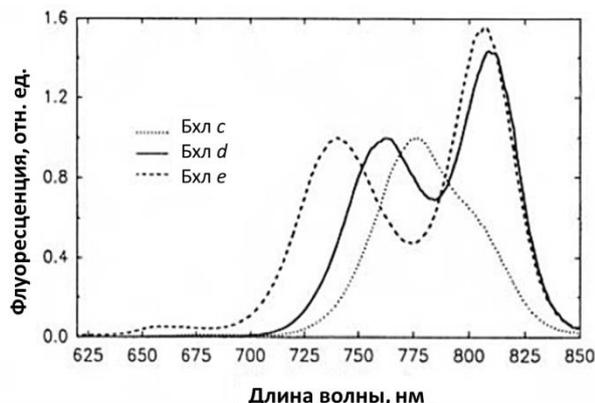


Рис. 7. Спектры флуоресценции хлоросом, выделенных из трех культур ЗСБ: *Chlorobium limicola* (Бхл с), *Chlorobium vibrioforme* (Бхл d) и *Pelodictyon phaeoclathratiforme* (Бхл e) [12].

В таблице 2 (Гл. 1 п. 1.1) приведены значения главных максимумов спектров поглощения бактериохлорофиллов (в клетках и в ацетоновых экстрактах) и максимумы спектров флуоресценции [17].

Параметры флуоресценции (интенсивность, квантовый выход, положение максимума спектра) могут указывать на изменение физико-химического состояния макромолекулы и микроокружения хромофора. По этой причине собственная флуоресценция органических соединений часто используется для изучения их химических превращений, переноса энергии, межмолекулярных взаимодействий [31].

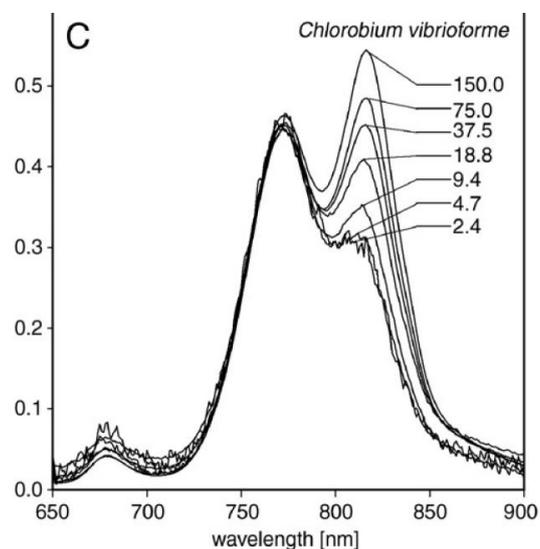


Рис. 8. Нормированные спектры флуоресценции при различных интенсивностях облучающего света [17].

Проводились исследования зависимости интенсивности флуоресценции ЗСБ от различных интенсивностей синего света (от 2,4 до 150 мкмоль фотонов/м²·с). Для ЗСБ *Chlorobium vibrioforme* графики зависимости флуоресценции приведены на рисунке 8. При высоких интенсивностях света выход флуоресценции FMO-белка выше, чем при низких интенсивностях света. В то же время выход флуоресценции, испущенной хлоросомными Бхл, остается постоянным при обоих условиях [17].

1.5. Тушение флуоресценции Бхл

Под тушением флуоресценции понимают уменьшение её интенсивности вследствие взаимодействия флуоресцирующего вещества с другим (тушителем) [30]. К тушению могут приводить различные процессы, в том числе реакции в возбужденном состоянии, перенос энергии, образование комплексов.

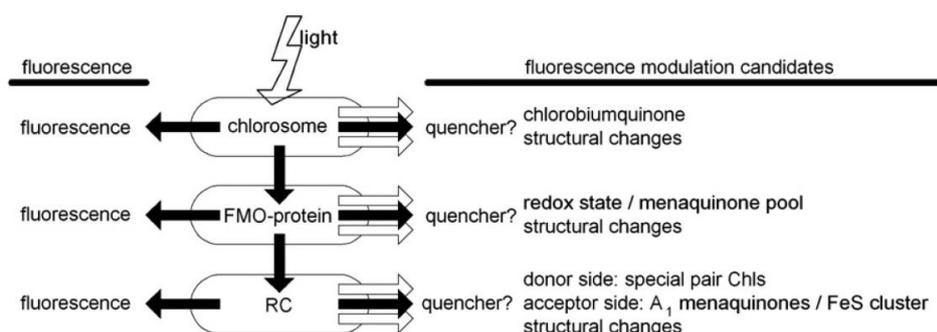


Рис. 9. Схематическое представление передачи возбуждения и потенциальные тушители возбуждения в ЗСБ [17].

Время жизни возбужденного состояния Бхл *c*, *d* или *e* зависит в значительной степени от окислительно-восстановительного потенциала (ОВП). При низком ОВП (которого можно достичь путем добавления в суспензию клеток дитионита ($S_2O_4^{2-}$)) время жизни возбужденного состояния составляет от 50 до 100 пс в зависимости от культуры. В этом случае доказан перенос энергии от Бхл *c*, *d* или *e* к Бхл *a* в «основной» пластинке. В окисленных условиях время жизни хлоросомных Бхл снижается до 10-15 пс. Аналогичная редокс-зависимая модуляция времени жизни возбужденного состояния Бхл характерна и для FMO-белка. При высоком

ОВП время жизни возбужденного состояния молекулы порядка 60 пс и около 2 нс при низком ОВП. Если наблюдают более короткие времена жизни возбужденного состояния молекулы, то говорят о процессах тушения внутри белка [16]. Таким образом, в клетках ЗСБ при формировании окисленных условий (например, в присутствии кислорода) наблюдается так называемое редокс-зависимое тушение, подавляющее дальнейшую передачу энергии на РЦ. Такой тип тушения служит защитным механизмом клеток от образования токсичных активных форм кислорода [9,16]. Если учесть тот факт, что в природе ЗСБ встречаются в различных средах, в том числе ниже хемоклина в стратифицированных водоемах на границе кислородной и бескислородной зон, то наличие такого защитного механизма не представляется удивительным. Защитная система позволяет ЗСБ пережить временное воздействие кислорода без нанесения ущерба клеткам и дает микроорганизмам колоссальное адаптивное преимущество [9]. Наибольшее влияние на тушение флуоресценции в клетках ЗСБ оказывают два класса биологических пигментов: каротиноиды и хиноны.

1.5.1. Дезактивации возбужденного состояния Бхл каротиноидами

Каротиноиды выполняют фотозащитную роль в клетках ЗСБ, они предупреждают появление в клетках активных форм кислорода. Синглетный кислород 1O_2 относится к высокоактивным соединениям и способен окислять пигменты, белки и липиды в мембране клеток, что делает его токсичным для живых тканей. Основное состояние кислорода это его триплетное состояние 3O_2 , таким образом, кислород может эффективно принимать энергию возбуждения от других молекул, если они также находятся в возбужденных триплетных состояниях. В присутствии возбужденного состояния Бхл ($^3\text{Бхл}$) синглетный кислород 1O_2 образуется из основного триплетного состояния кислорода 3O_2 по следующей схеме: $^3\text{Бхл} + ^3O_2 \rightarrow \text{Бхл} + ^1O_2$. Каротиноиды же способствуют дезактивации триплетного возбужденного состояния Бхл ($^3\text{Бхл}$) через триплет-триплетную

реакцию передачи энергии: ${}^3\text{Бхл} + \text{Кар} \rightarrow \text{Бхл} + {}^3\text{Кар}$. Этот переход возможен, так как энергетический уровень первого триплетного состояния каротиноидов лежит ниже, чем у Бхл, что разрешает дезактивацию этого триплетного состояния (Рис. 10) [9].

Скорость тушения ${}^3\text{Бхл}$ каротиноидами порядка нескольких наносекунд, это на три порядка больше, чем скорость бимолекулярной реакции столкновения с кислородом [34]. Механизм триплет-триплетного переноса энергии отличен от индуктивно-резонансного переноса энергии (Фёрстерского переноса), потому что переход из возбужденного триплетного состояния молекулы в невозбужденное синглетное состояние требует смены ориентации спина и является запрещенным. Более того, каротиноиды также могут преобразовывать ${}^1\text{O}_2$ напрямую: ${}^1\text{O}_2 + \text{Кар} \rightarrow {}^3\text{O}_2 + {}^3\text{Кар}$. Триплетный уровень каротиноидов $T_1(\text{Кар})$ расположен ниже по энергии, чем первый синглетный уровень кислорода $S_1(\text{O}_2)$, в противном случае сами каротиноиды могли бы выступать в роли сенсбилизаторов при производстве синглетного кислорода.

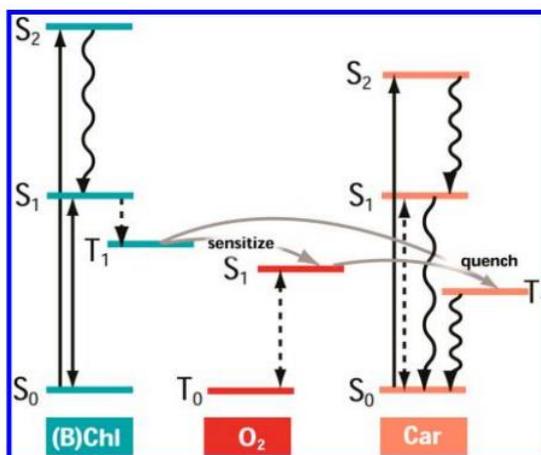


Рис. 10. Схематическая диаграмма иллюстрирующая переходы в Бхл, кислороде и каротиноидах. непрерывными прямыми стрелками обозначены разрешенные переходы, пунктирными – запрещенные, а волнистыми – внутренние преобразования [9,35].

Кроме тушения уже сформированных триплетных состояний Бхл, каротиноиды также могут предотвращать их образование. Фотохимические возможности систем ограничены в условиях высокой освещенности, и РЦ не

может использовать всю энергию возбуждения, поглощенную антенной, которая накапливается в фотосинтетических комплексах. Существует предположение, что аналогично растениям и водорослям, у фотосинтезирующих микроорганизмов возможно два режима работы фотосинтетического аппарата: ориентированного на эффективный сбор света в случае нормальной освещенности и стремящегося рассеять избыточную энергию, когда интенсивность света велика [36]. Механизм адаптивного теплового рассеяния энергии хлорофилла известен, как нефотохимическое тушение. Суть этого процесса заключается в поглощении избыточной энергии синглетного возбужденного хлорофилла молекулой-акцептором с последующим переходом этой молекулы при помощи процесса внутренней конверсии в основное энергетическое состояние. Благодаря внутренней конверсии избыточная энергия возбуждения рассеивается в виде тепла, то есть расходуется на молекулярные колебания посредством безызлучательных переходов. Нефотохимическое тушение есть почти у всех фотосинтезирующих эукариот (водорослей и растений) и цианобактерий. Оно защищает фотосинтетический аппарат в случаях, когда поглощается больше света, чем может быть непосредственно использовано в фотосинтезе [37].

1.5.2. Контроль флуоресценции Бхл хинонами

Хиноны играют значительную роль в контроле флуоресценции и в ингибировании передачи энергии в хлоросомах в аэробных условиях. При низких значениях ОВП (которые являются естественными для роста микроорганизмов) хлоросомы бактерий сильно флуоресцируют. В окисленных условиях флуоресценция тушится, так как нарушается передача энергии от Бхл *c*, *d* или *e* к Бхл *a* внутри хлоросомы [38].

Имеется экспериментальное доказательство тушения флуоресценции Бхл *c* хинонами, при добавлении их в агрегаты Бхл *c* значение интенсивности флуоресценции было минимальным в окисленных условиях (кислородных) и

максимальным в восстановленных (при добавлении в образец дитионата натрия $Na_2S_2O_6$) (Рис. 11) [20].

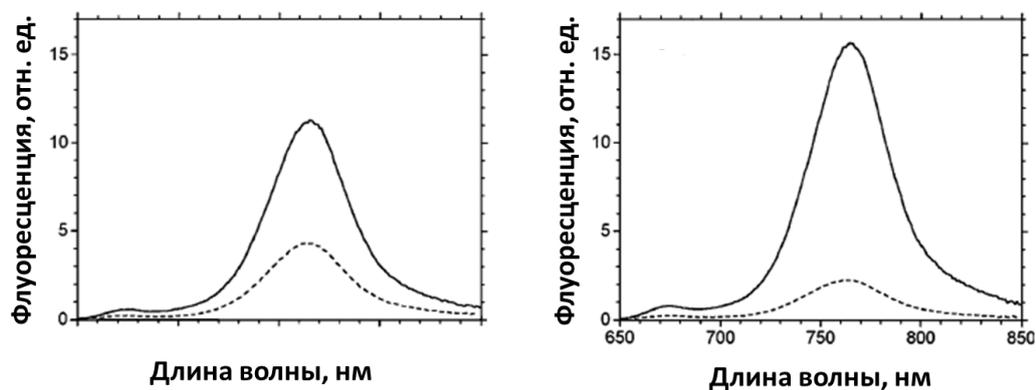


Рис. 11. Спектры флуоресценции в окисленных (пунктирная линия) и восстановленных (сплошная линия) условиях только для агрегатов Бхл *c* (слева) и для агрегатов Бхл *c* с добавлением хинонов [20].

Глава 2. Объекты и методы исследования

2.1. Объекты изучения

В работе исследованы образцы монокультур и накопительных культур микроорганизмов (зеленоокрашенных и коричневоокрашенных ЗСБ), выделенные из образцов природной воды в лаборатории Института микробиологии имени С.Н. Виноградского старшим научным сотрудником О.Н. Луниной. Проведены спектральные измерения проб воды с микроорганизмами из меромиктического озера Трехцветного (Кандалакшский залив Белого моря), отобранные в ходе нескольких экспедиций 2017, 2018 и 2019 гг. с разной глубины водоёма при помощи погружаемого насоса или многошприцевого пробоотборника.

2.2. Многошприцевой пробоотборник

В ходе экспедиций в марте 2017 и 2019 г. из оз. Трехцветного были отобраны пробы воды с интервалом по глубине 2,5 см (в диапазоне глубин 2,0-2,3 м и 1,60-2,15 м соответственно) с помощью оригинального пробоотборника, сконструированного Д.А. Вороновым. Пробоотборник состоит из металлической рамы, в которой закреплены N шприцов объемом 5 мл таким образом, чтобы входные отверстия находились на расстоянии 2,5 см друг от друга по глубине. Пробоотборник опускается под воду в строго вертикальном положении. Раскрытие шприцов обеспечивается гидравлическим приводом к двум краевым шприцам, к носикам которых прикреплены тонкие трубки, заполненные водой. При надавливании на поршни внешних шприцов давление через трубки передается внутрь цилиндров краевых шприцов пробоотборника, погруженного под воду, что создает усилие для раскрытия пустых шприцов, которые таким образом захватывают воду. Установка с заполненными шприцами поднимается из воды, носики вынутых из рамы шприцов немедленно закрываются запаянными крышечками, чтобы сохранить анаэробные условия внутри шприцов. С помощью

пробоотборника удалось получить 23 заполненных водой шприца из слоя протяженностью 50 см по глубине в 2017-м году и 13 шприцов из слоя протяженностью 30 см в марте 2019-го года.

2.3. Приборы гидрохимического анализа

Методом зондирования непосредственно в озере регистрировалось изменение с глубиной физико-химических характеристик воды: температуры (на анализаторе Эксперт-009), солености (с помощью кондуктометра WTW Cond 315i) и окислительно-восстановительного потенциала Eh (для определения использовался Eh-метр WaterLiner WMM-73). Концентрация растворенного в воде сероводорода была определена сотрудниками ФГБУН Федерального исследовательского центра комплексного изучения Арктики РАН и осуществлялась стандартным фотометрическим методом по РД 52.24.450-2010 на фотометре Эксперт 003. В лаборатории кафедры общей физики Физического факультета МГУ проведены дополнительные исследования значений Eh некоторых образцов с помощью Eh-метра WaterLiner WMM-73.

2.4. Спектральное оборудование и методика спектральных измерений

В лабораторных условиях измерены спектры оптической плотности проб при помощи спектрофотометра Solar PB2201 в спектральном диапазоне от 200 до 1100 нм. 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. В экспериментах использовали стандартные кварцевые кюветы с длиной оптического пути 10 и 30 мм для измерения спектров поглощения. Спектры испускания и возбуждения флуоресценции регистрировали на двух флуориметрах Solar CM2203; один из которых позволяет измерять спектры в диапазоне длин волн от 220 до 820 нм, а другой – от 220 до 870 нм (источник - импульсная ксеноновая лампа). Прибор с расширенным в ИК область спектральным диапазоном имеет

термостатируемое кюветное отделение, позволяющее регистрировать спектральные характеристики образцов в различных температурных диапазонах. Измерения спектров флуоресценции проводили в кюветах для флуориметрии – в разных экспериментах использовали либо стандартную кювету для флуориметрии без крышки, либо специальную кювету для флуориметрии с герметичной тefлоновой крышкой. После измерений проводили коррекцию графиков испускания флуоресценции на поглощение по формуле $I_{\text{corr}}=I \cdot 10^{0,5 \cdot (D_{\text{ex}}+D_{\text{em}})}$, где I_{corr} – скорректированное значение интенсивности флуоресценции, I – приборное значение интенсивности флуоресценции, D_{ex} и D_{em} – значения оптической плотности образца на длине волны возбуждения и испускания соответственно. Для оценки погрешностей проводимых измерений использовались формулы [39]:

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 Solar PB2201	Пределы допускаемой абсолютной погрешности при измерении оптической плотности, %	±1
	Пределы допускаемой абсолютной погрешности установки длин волн, нм.	±2,0
флуориметр Solar CM2203	Точность фотометрирования, %	< 3
	Точность установки длины волны, нм.	±0,2

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

Для получения ацетон-метаноловых экстрактов пигментов ЗСБ к 1 мл пробы воды добавляли 4 мл смеси ацетона с метанолом (7:2). Таким же образом из дистиллированной воды и смеси ацетона с метанолом (7:2) готовили стандарт для вычитания базовой линии спектрофотометра.

С помощью значений, полученных при измерении спектров поглощения экстрактов, рассчитана суммарная концентрация бактериохлорофиллов d и e (мг/м³) по формуле из работы [40]:

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

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 (после вычитания величины светорассеяния при 850 нм E_{850}),

$v = 5$ мл – объем ацетон-метанолового экстракта,

$V = 1$ мл – объем пробы воды с микроорганизмами,

$d = 1$ см – длина кюветы,

ε – коэффициент экстинкции ($\varepsilon \cdot \text{Бхл } d = 98$ мг/см, $\varepsilon \cdot \text{Хл } a = 84$ л/(г·см)) [40].

Глава 3. Экспериментальные результаты для разных культур бактерий

3.1. Исследование культур зеленых серобактерий методами абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии

За все время работы был проведен спектральный анализ накопительных культур 24 образцов зеленоокрашенных ЗСБ и 21 образца коричневоокрашенных ЗСБ, культивированных из разных озер Кандалакшского залива Белого моря. Типичные спектры поглощения зеленоокрашенных и коричневоокрашенных культур имеют две ярко выраженные полосы в коротковолновой (соответствующие поглощению света молекулами Бхл *d*, *e* и каротиноидами) и длинноволновой областях спектра (где поглощают свет молекулы Бхл *d*, *e* и Бхл *a*) (Рис. 12). Высота максимумов поглощения зависит от концентрации клеток серобактерий в культуре.

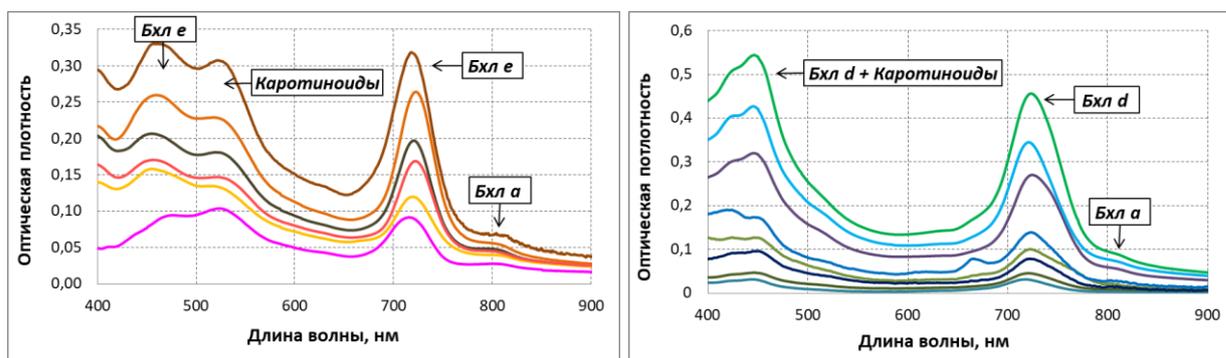


Рис. 12. Спектры поглощения коричневоокрашенных (слева) и зеленоокрашенных (справа) культур ЗСБ.

Для коричневоокрашенных ЗСБ в коротковолновой области наблюдается широкая полоса поглощения пигментов и каротиноидов со двоянными максимумами, приходящимися на длины волн 455-469 нм и 518-526 нм. Длинноволновый максимум поглощения Бхл *e* принадлежит интервалу от 716 до 726 нм. Максимумы коротковолновой полосы поглощения зеленоокрашенного типа ЗСБ приходятся на длины волн 426 и 446 нм, а длинноволновой – на 718-729 нм, что соответствует поглощению света Бхл *d* (Гл. 1 п. 1.1. Табл. 2). Для всех образцов в районе 800 нм

присутствует небольшой максимум, соответствующий поглощению света Бхл *a*. При сравнении полученных данных со спектрами поглощения Бхл *c*-содержащих хлоросом, приведенных в литературе (Гл. 1. п. 1.1. Рис. 2), 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*.

Для уменьшения фона рассеяния света на клетках микроорганизмов и более точного выделения полос Бхл были приготовлены ацетон-метаноловые экстракты двух типов культур и измерены их спектры поглощения в диапазоне от 200 до 1000 нм. В экстрактах под воздействием органического растворителя в клетках бактерий происходит разрушение плотно упакованных хлоросом с расположенными внутри фотосинтетическими пигментами. Сдвиг пиков поглощения Бхл *e* и *d* в коротковолновую область спектра на величину порядка 70 нм свидетельствует о переходе Бхл из высоко агрегированной формы в хлоросомах живых клеток к мономерной в экстракте (Рис. 13).

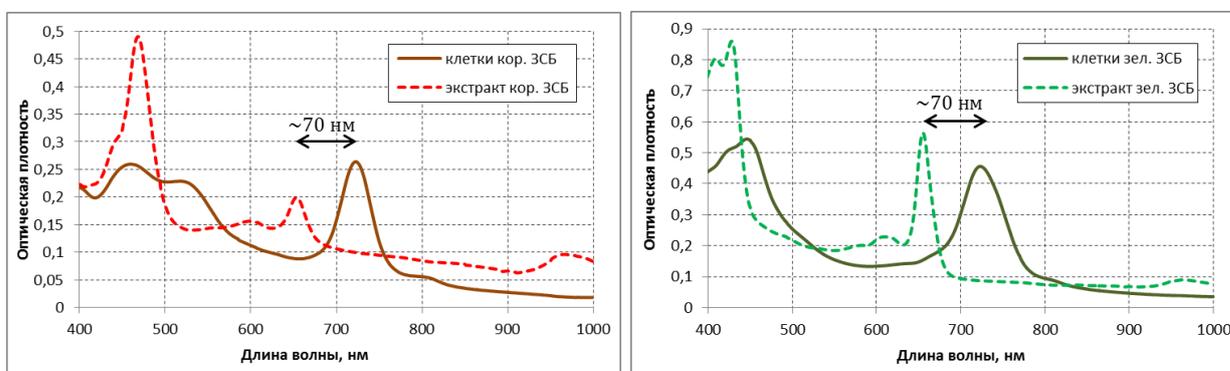


Рис. 13. Сравнение спектров поглощения неповрежденных клеток монокультур ЗСБ с ацетон-метаноловыми экстрактами.

Для всех имеющихся образцов зеленоокрашенных и коричневоокрашенных ЗСБ были измерены спектры испускания флуоресценции в диапазоне от 650 до 870 нм, полученные при возбуждении светом с длиной волны 440 нм (примеры спектров приведены на Рис. 14). На графиках присутствуют три ярко выраженные полосы флуоресценции: в диапазоне от 730 до 770 нм (соответствующие флуоресценции

хлоросомальных Бхл *d* или *e*), в районе 813 нм (флуоресценция Бхл *a*) и около 670-675 нм.

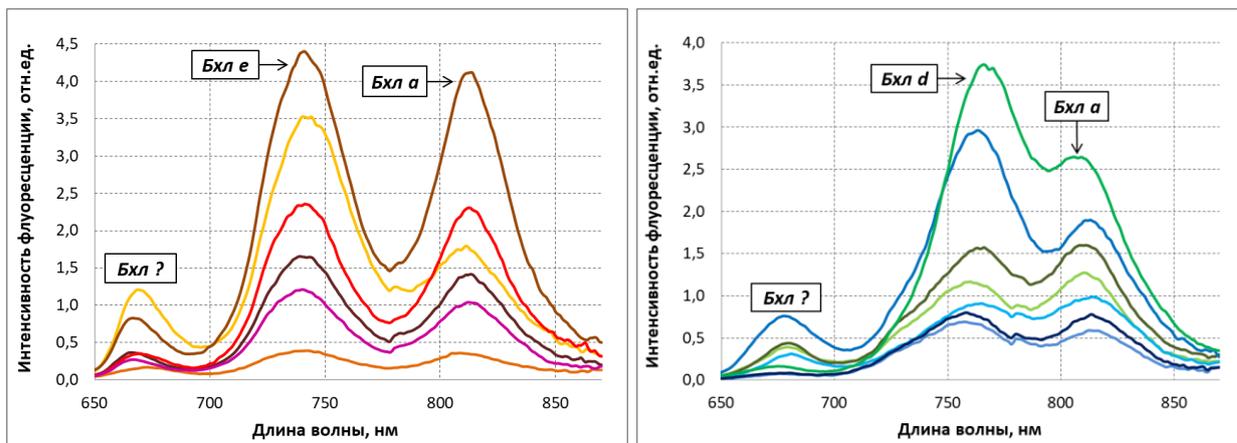


Рис. 14. Спектры испускания флуоресценции монокультур коричневоокрашенных ЗСБ (слева) и зеленоокрашенных ЗСБ (справа) при $\lambda_{ex}=440$ нм.

Природа последней полосы не освещена в литературных источниках, однако существует предположение, что данный максимум является испусканием мономерной формы Бхл [20].

Максимум флуоресценции, соответствующий флуоресценции хлоросомных Бхл *d* или *e* сдвинут в длинноволновую область спектра по отношению к максимуму поглощения молекул Бхл. В проделанных измерениях среднее значение стоксова сдвига (разница длин волн максимумов поглощения и флуоресценции) для 21 образца, содержащего пигмент Бхл *e*, равнялось $21,0 \pm 1,3$ нм, что почти в два раза превышает стоксов сдвиг для 24 образцов, содержащих Бхл *d*, равный $36,8 \pm 1,1$ нм (коэффициент доверия $\alpha = 0,95$) (Рис. 15).

На основе полученных результатов можно предположить, что разность энергий для уровня, на который перешла возбужденная молекула вследствие поглощения ею кванта света, и уровня, с которого произошло испускание флуоресценции, больше для молекул Бхл *d*, чем для молекул Бхл *e*. А это значит, что в клетках зеленоокрашенных ЗСБ больше потери энергии поглощенного света (идущей на увеличение колебательной энергии молекулы и развитие безызлучательных переходов).

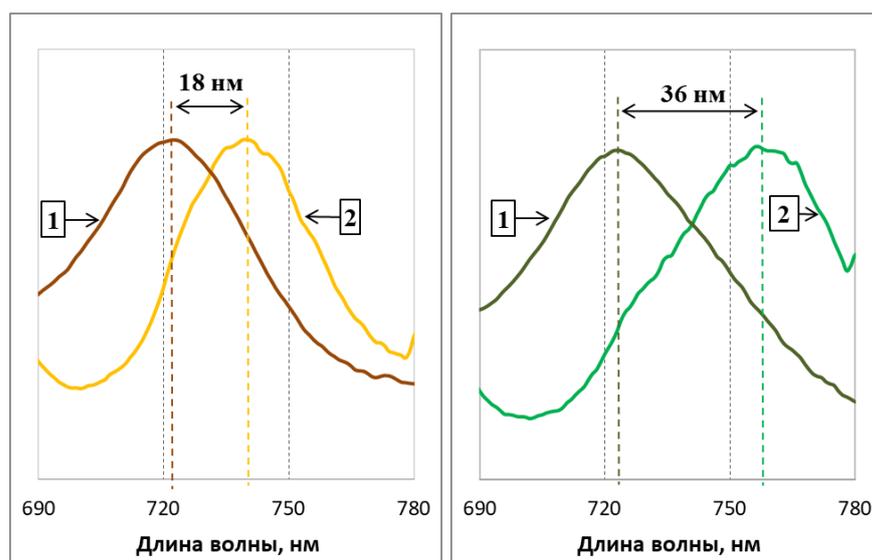


Рис. 15. Нормированные спектры поглощения (1) и флуоресценции (2) коричневоокрашенных (слева) и зеленоокрашенных ЗСБ (справа) с указанием величины Стоксова сдвига.

Если в пробе присутствуют оба вида бактерий, то полосы поглощения двух различных бактериохлорофиллов перекрываются, и однозначно установить содержание того или иного типа Бхл по спектрам поглощения клеток в среде не представляется возможным. Однако максимумы флуоресценции молекул Бхл *d* и *e* сдвинуты друг относительно друга (Рис. 16), что позволяет использовать их в качестве оценочных кривых для каждого вида молекул. Флуоресцентный метод является более чувствительным по сравнению с методом абсорбционной спектроскопии и позволяет не только детектировать наличие тех или иных фотосинтетических пигментов в среде, но и следить за химическими превращениями и переносом энергии в клетке.

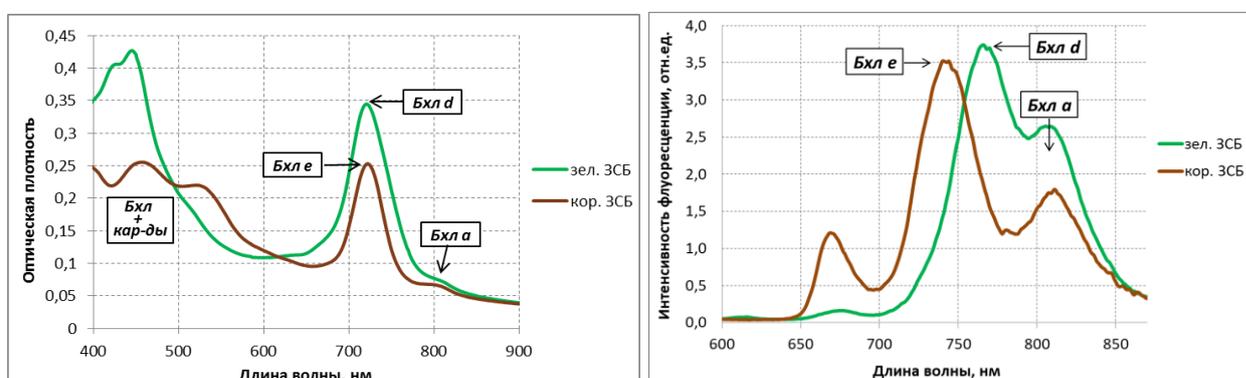


Рис. 16. Сравнение спектров поглощения (слева) и спектров испускания флуоресценции при $\lambda_{ex}=440$ нм (справа) двух типов монокультур ЗСБ.

3.2. Аппроксимация полос флуоресценции накопительных 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.17).

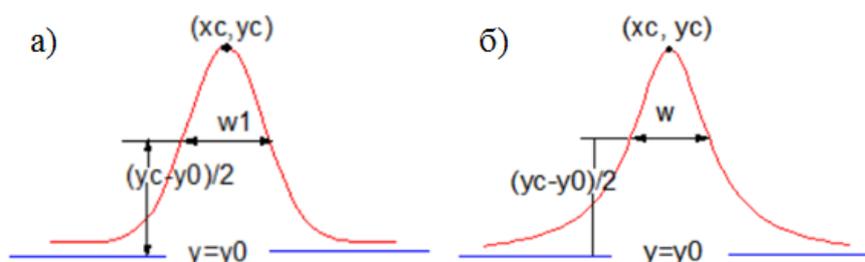


Рис. 17. Вид кривой распределения а) Гаусса и б) Лоренца.

В бакалаврской работе 2017-го года [41] было показано, что погрешность метода при аппроксимации экспериментальной кривой распределением Лоренца больше, чем при использовании распределения Гаусса. По этой причине в качестве математических функций, задающих полосы флуоресценции бактериохлорофиллов, в дальнейших расчетах принимались кривые Гауссова распределения.

В работе 2017 г. был сделан флуоресцентный анализ накопительных культур бактерий в спектральном диапазоне от 700 до 820 нм, и предложен

метод разложения максимума флуоресценции хлоросомального Бхл на две кривые гауссова распределения с максимумами на длинах волн флуоресценции Бхл d и Бхл e . В данной работе для 9 образцов культур каждого типа были зарегистрированы спектры испускания флуоресценции в диапазоне от 650 до 870 нм и найдены спектральные характеристики трех кривых гауссова распределения, аппроксимирующие ярко выраженные полосы флуоресценции. Полученные значения приведены в таблицах 4 и 5, где $\lambda_{\text{макс}}$ – длина волны, на которой приходится максимум полосы флуоресценции, w – параметр (см. п. 3.2), σw – погрешность метода.

В клетках коричневоокрашенных ЗСБ максимум Бхл e находился между длинами волн 736 и 742 нм, а параметр w принимал значения от 38,5 до 44. Максимум Бхл a располагался на длинах волн от 810 до 814 нм с параметром w от 41 до 58 (Табл. 4).

Табл. 4. Параметры кривых гауссова распределения, аппроксимирующих три полосы флуоресценции в клетках коричневоокрашенных ЗСБ.

номер образца кор. ЗСБ	1	2	3	4	5	6	7	8	9
$\lambda_{\text{макс}}(670 \text{ нм})$	672	673	675	672	669	672	670	670	672
w	25,5	25,8	20,0	23,2	22,04	22,5	23,1	27,3	27,2
σw	0,6	0,7	0,3	0,4	1,07	1,9	1,2	1,2	0,7
$\lambda_{\text{макс}}(\text{Бхл } e)$	742	741	740	736	741	741	742	740	738
w	42,1	43,4	38,5	40,6	41,75	42,0	43,22	43,5	43,9
σw	0,3	0,3	0,3	0,4	0,29	0,3	0,28	0,3	0,3
$\lambda_{\text{макс}}(\text{Бхл } a)$	810	810	813	810	812	812	813	811	813,7
w	57,7	40,7	48,6	45,8	44,3	43,7	41,5	43,2	45,3
σw	0,9	0,4	0,5	0,3	0,4	0,4	0,3	0,3	0,4

В клетках зеленоокрашенных ЗСБ максимум флуоресценции Бхл d был обнаружен в диапазоне длин волн от 755 до 762 нм с параметром w принадлежащим промежутку от 50 до 63. Максимум Бхл a равнялся от 813 до 816 нм, а его параметр w – от 37,3 до 42,6 (Табл. 5).

Табл. 5. Параметры кривых гауссова распределения, аппроксимирующих три полосы флуоресценции в клетках зеленоокрашенных ЗСБ.

номер образца зел. ЗСБ	1	2	3	4	5	6	7	8	9
$\lambda_{\text{макс}}$ (670 нм)	675	680	680	681	-	680	681	-	673
w	33,81	29,82	28,26	29,2	-	37,8	28,9	-	32,21
σw	1,03	0,81	1,09	0,5	-	1,3	0,6	-	0,98
$\lambda_{\text{макс}}$ (Бхл d)	759	758	761	756	755	761	762	757	755
w	52,8	55,5	60,0	62,9	49,9	48,7	62,4	51,4	54,3
σw	0,5	0,6	0,9	0,8	0,6	0,5	0,6	0,4	0,7
$\lambda_{\text{макс}}$ (Бхл a)	815	813	814	815	814	816	816	815	816
w	37,3	38,1	37,3	42,4	42,6	40,3	39,4	37,6	41,63
σw	0,7	0,4	0,6	0,4	0,8	0,8	0,4	0,4	0,6

Для дальнейшего анализа и расчетов были взяты средние значения полученных величин, представленные в таблице 6.

Табл. 6. Усредненные параметры кривых гауссова распределения, аппроксимирующих три полосы флуоресценции Бхл в клетках ЗСБ.

Кор. ЗСБ	Бхл e	Бхл a	Полоса ~670 нм
λ_{max} , нм	$740,1 \pm 0,8$	$811,6 \pm 0,7$	$671,7 \pm 0,4$
w_1 , нм	$49,7 \pm 1,2$	$53,9 \pm 2,1$	$28,4 \pm 1,6$
Зел. ЗСБ	Бхл d	Бхл a	Полоса ~670 нм
λ_{max} , нм	$758,2 \pm 1,1$	$814,9 \pm 2,3$	$678,6 \pm 1,3$
w_1 , нм	$65,2 \pm 2,3$	$46,8 \pm 1,2$	$37,1 \pm 1,9$

Анализ спектров флуоресценции накопительных культур выявил различие ширины полос испускания «хлоросомного» хлорофилла для двух типов бактерий. Полоса испускания Бхл e коричневоокрашенных культур оказались примерно на 20% уже полосы Бхл d зеленоокрашенных ЗСБ (Рис. 18). Это может свидетельствовать о большем количестве молекул бактериохлорофилла в хлоросомах зеленоокрашенной формы бактерий по сравнению с коричневоокрашенными, либо о меньшей упорядоченности их расположения в хлоросоме.

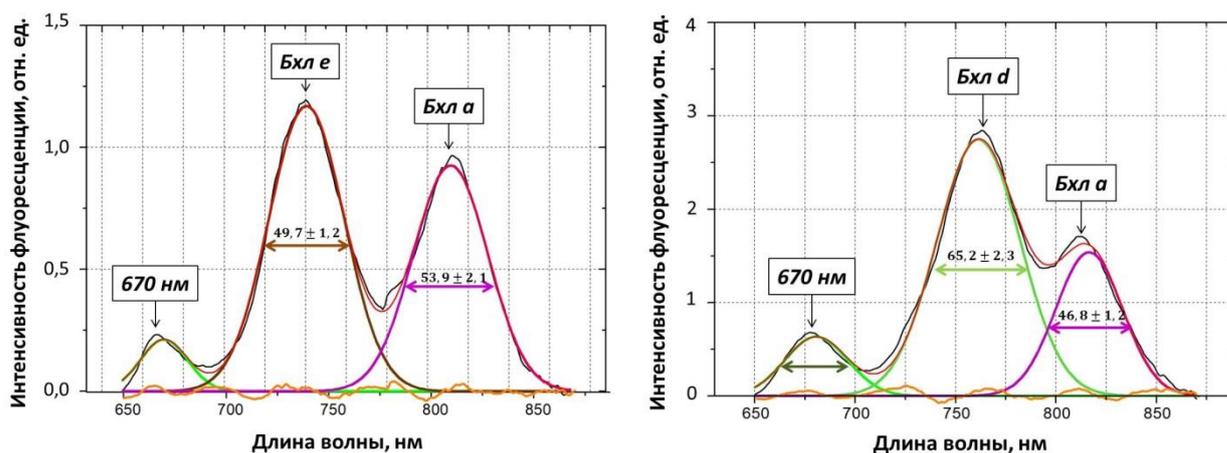


Рис. 18. Аппроксимация трех полос флуоресценции Бхл распределениями Гаусса для коричневоокрашенных ЗСБ (слева) и зеленоокрашенных (справа). Кривая оранжевого цвета определяет отклонение аппроксимирующей кривой от экспериментальной.

Анализ спектров флуоресценции накопительных культур выявил различие ширины полос испускания «хлоросомного» хлорофилла для двух типов бактерий. Полоса испускания Бхл *e* коричневоокрашенных культур оказались примерно на 20% уже полосы Бхл *d* зеленоокрашенных ЗСБ. Это может свидетельствовать о большем количестве молекул бактериохлорофилла в хлоросомах зеленоокрашенной формы бактерий по сравнению с коричневоокрашенными, либо о меньшей упорядоченности их расположения в хлоросоме. В работе [42] с помощью спектров поглощения экстрактов чистых культур ЗСБ оценено количество молекул Бхл в клетке каждого типа бактерий: 250 000 молекул Бхл *d* и 73 000 молекул Бхл *e*. Таким образом, фотосинтетический аппарат зеленоокрашенных ЗСБ содержит большее количество молекул Бхл, что дополнительно подтверждается разницей в ширине полос флуоресценции соответствующих пигментов в спектрах живых клеток. Однако ширина полосы Бхл *a* для всех изученных проб коричневоокрашенных ЗСБ имела большие значения по сравнению с полосой Бхл *a* в клетках зеленоокрашенных культур. Возможно, это связано с различной организацией молекул Бхл *a* в светособирающем комплексе разных форм ЗСБ.

Глава 4. Экспериментальные результаты для зеленых серобактерий природной воды

4.1. Флуоресценция Бхл фототрофных бактерий в природной воде и влияние внешних факторов

Благоприятными местами обитания зеленых серных бактерий являются прибрежные отделяющиеся водоемы, в том числе меромиктическое озеро Трехцветное. Отличительной чертой меромиктических озер, является высокая концентрация сероводорода в придонных слоях [43] и наличие на границе кислородной и сероводородной областей тонкого цветного слоя («бактериальной пластины») с массовым развитием зеленых серных бактерий [44, 45, 46], которые используют при фотосинтезе сероводород, поступающий снизу из анаэробной водной массы.

В сентябре и марте 2018 г. был проведен сравнительный спектральный и химический анализ 13 образцов воды из оз. Трехцветного, отобранных шприцевым батометром в слое воды толщиной 30 см от 1,75 до 2,05 м. Согласно полученным результатам, в зависимости от времени года распределение по глубине температуры воды и значений окислительно-восстановительного потенциала в озере меняется. В сентябре концентрация кислорода в верхних слоях водоемов была больше, об этом свидетельствуют диаграммы изменения параметра E_h с глубиной. Однако соленость воды в сентябрьских образцах воды практически не изменилась по сравнению с мартовскими пробами. Концентрация сероводорода достигала значений более 900 мг/л и не зависела от сезона (Рис.19).

По эмпирической формуле [40] рассчитана концентрация Бхл, исходя из которой было показано, что в образцах воды отобранных в сентябре 2018 г., цветной слой воды с ЗСБ имел более четкие границы и содержал в несколько раз большую концентрацию пигментов по сравнению с ситуацией в марте 2018 г.

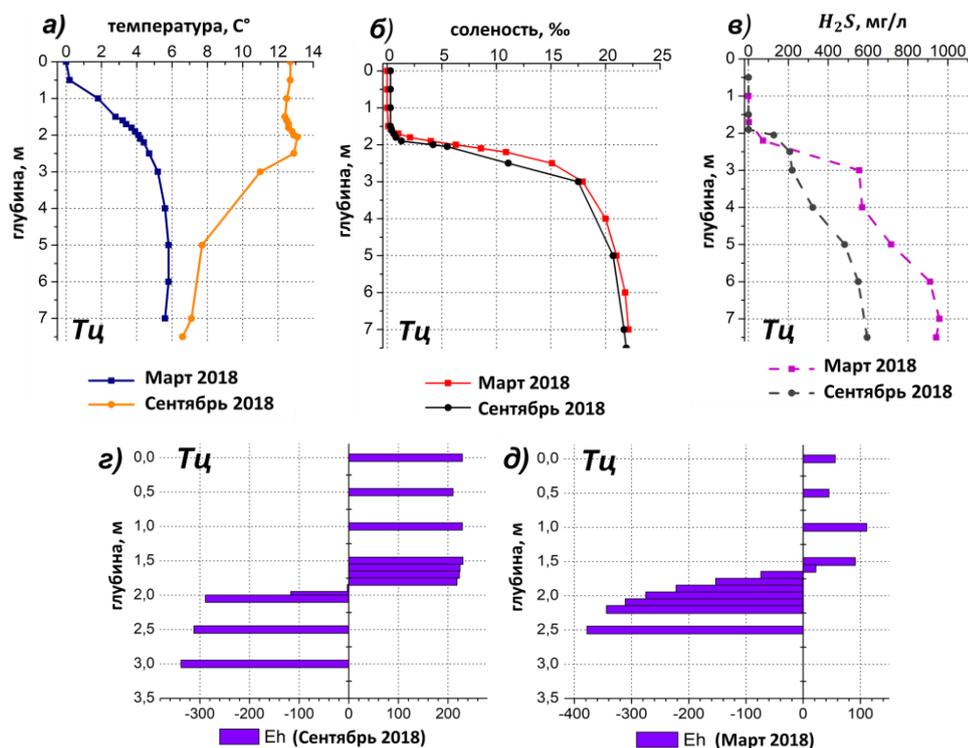


Рис. 19. Изменение гидрохимических параметров воды с глубиной в разные сезоны для оз. Трехцветного (температуры (а), солености (б), концентрации растворенного сероводорода (в) и значений окислительно-восстановительного потенциала (г, д)).

Обнаружено явление, показывающее тонкую стратификацию фототрофных бактерий в хемоклине в соответствии с их физиологическим состоянием (возможно связанным с различной фотосинтетической активностью клеток в разных стратах микроорганизмов). Было продемонстрировано явление тушения флуоресценции в верхних слоях хемоклина, выраженное для озера Трехцветного в марте 2018 г. (Рис. 20).

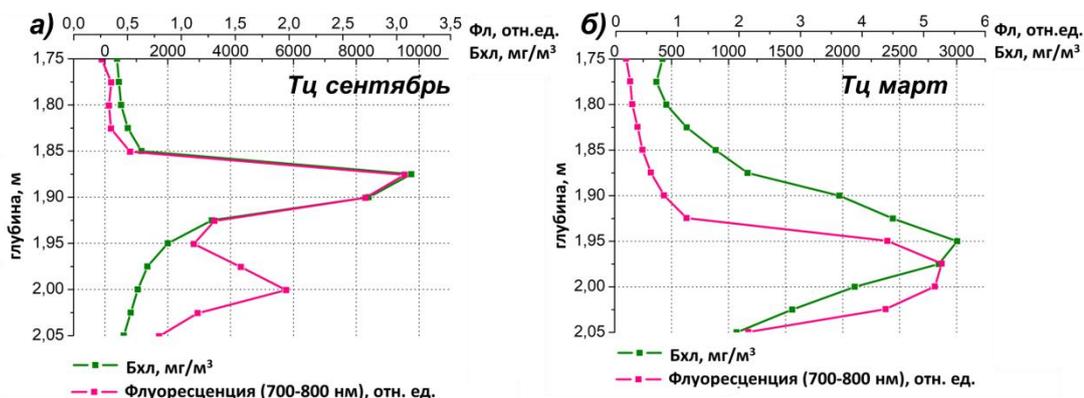


Рис. 20. Сравнение концентрации бактериохлорофиллов в воде и флуоресценции проб воды в сентябре и марте 2018 г. для озера Трехцветного.

Во время научной экспедиции на стратифицированные озера Кандалакшского залива Белого моря в марте 2019 г. из оз. Трехцветное с помощью многошприцевого батометра были отобраны 13 образцов воды с глубины от 2 до 2,3 м с интервалом в 2,5 см. В лабораторных условиях регистрировали спектры поглощения и испускания флуоресценции образцов для разных длин волн возбуждающего света $\lambda_{ex}=270, 390, 440$ и 525 нм. Также проводился анализ спектров возбуждения флуоресценции на длинах волн регистрации близких к полосам флуоресценции Бхл *d/e* $\lambda_{em}=765$ и 670 нм.

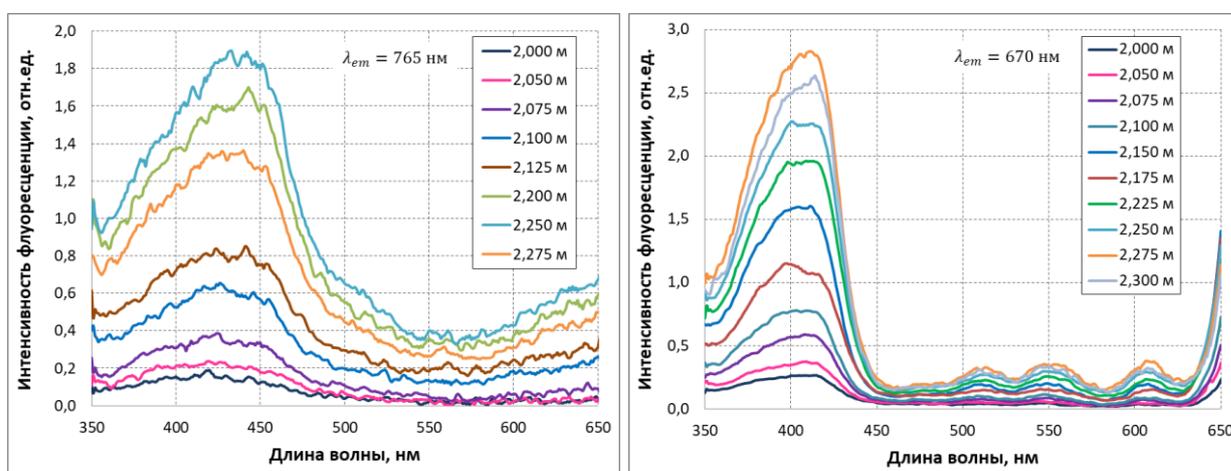


Рис. 21. Спектры возбуждения флуоресценции образцов природной воды из оз. Трехцветного на длинах волн регистрации $\lambda_{em}=765$ нм (слева) и $\lambda_{em}=670$ (справа).

Все спектры возбуждения флуоресценции на $\lambda_{em} = 765$ нм имели широкую полосу в диапазоне от 400 до 470 нм с максимумом в районе 440 нм, что свидетельствует о максимальном свечении образцов при возбуждении светом длиной волны 440 нм. Для данной линейки проб интенсивность испускания флуоресценции полосой на 670 нм принимала наибольшие значения при облучении светом длиной волны 390-425 нм (Рис. 21). Так как в дальнейшем больший интерес для изучения представляла флуоресценция хлоросомального бактериохлорофилла, на основе полученных данных для дальнейшего исследования была выбрана длина волны возбуждающего света равная 440 нм.

Флуоресценция Бхл проб природной воды была зарегистрирована в диапазоне длин волн испускания от 650 до 820 нм. На спектрах наблюдаются три полосы флуоресценции с максимумами в районе 670 нм, между 750 и 770 нм (хлоросомальный Бхл) и около 812 нм (Бхл *a*). Максимум свечения хлоросомального Бхл приходится на длины волн 761-766 нм и хорошо аппроксимируется кривой распределения гаусса с параметрами, определенными для накопительных культур зеленоокрашенного типа (см. 3.2.). На основе полученной информации был сделан вывод о присутствии в образцах только молекул Бхл *d* (Рис. 22).

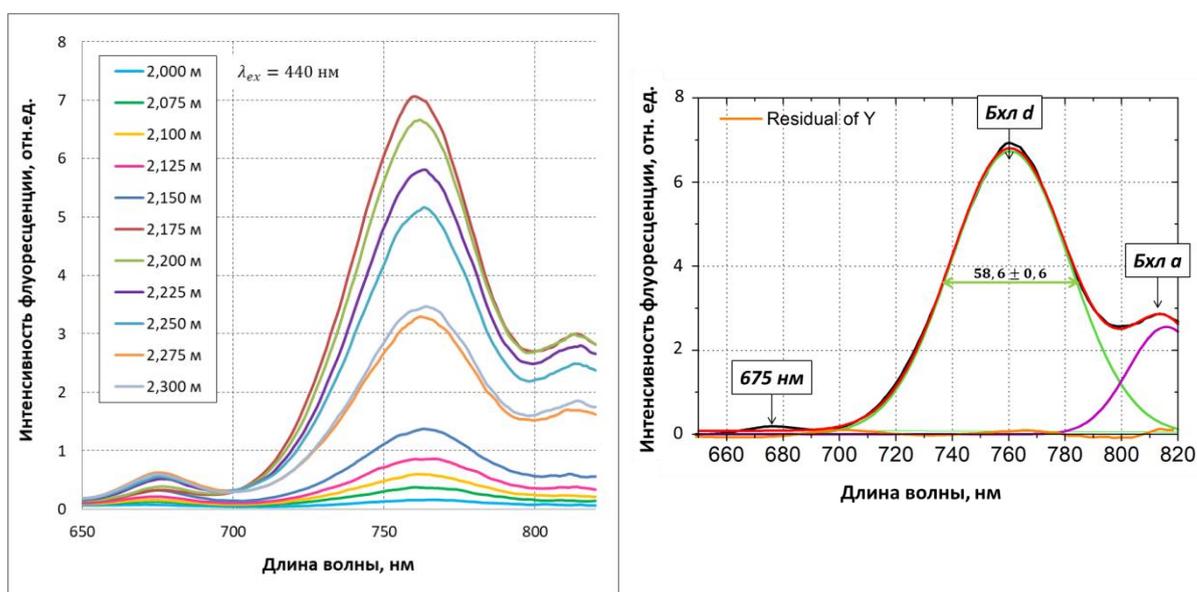


Рис. 22. Спектры испускания флуоресценции образцов природной воды из оз. Трехцветное, зарегистрированные при возбуждении светом $\lambda_{ex}=440$ нм (слева); Аппроксимация полосы флуоресценции образца с глубины 2,175 м кривыми гауссова распределения (справа).

Спектры испускания флуоресценции при длине волны возбуждающего света 440 нм регистрировали дважды – в начале цикла измерений и после облучения в течение 30 минут (на рис. 23 соответствующие интенсивности в спектре испускания Бхл обозначены как «до измерений» и «после измерений»). Стоит отметить, что во время проведения измерений температура в кюветном отделении не фиксировалась (в связи с техническими особенностями прибора), а контроль над отсутствием кислорода не проводился. Было отмечено, что после проведения измерений с

образцом воды, содержащим аноксигенными фототрофные бактерии, интенсивность флуоресценции Бхл *d* может заметно уменьшаться.

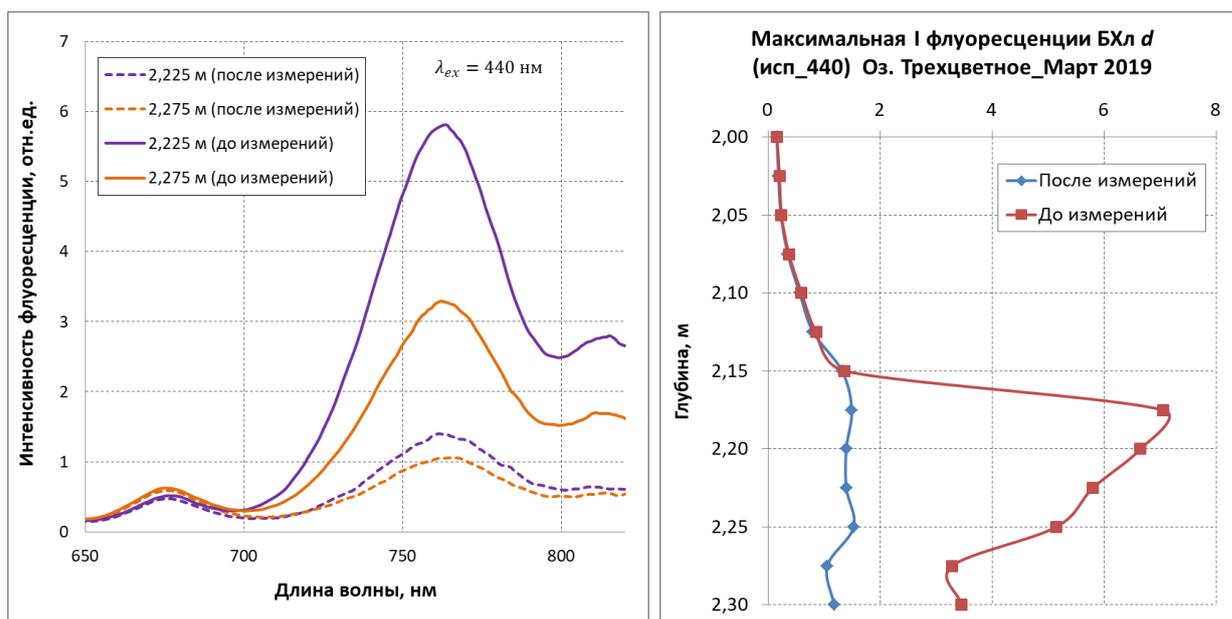


Рис. 23. Спектры испускания флуоресценции образцов природной воды из оз. Трехцветное до и после измерений ($\lambda_{ex}=440$ нм) (слева); Профили распределения по глубине интенсивности флуоресценции Бхл *d* (справа).

Большое рассеяние света клетками не всегда позволяет сделать выводы о концентрации Бхл *d* по спектрам поглощения образцов воды. Поэтому для её определения проводились измерения спектров поглощения ацетон-метаноловых экстрактов образцов (Рис. 24).

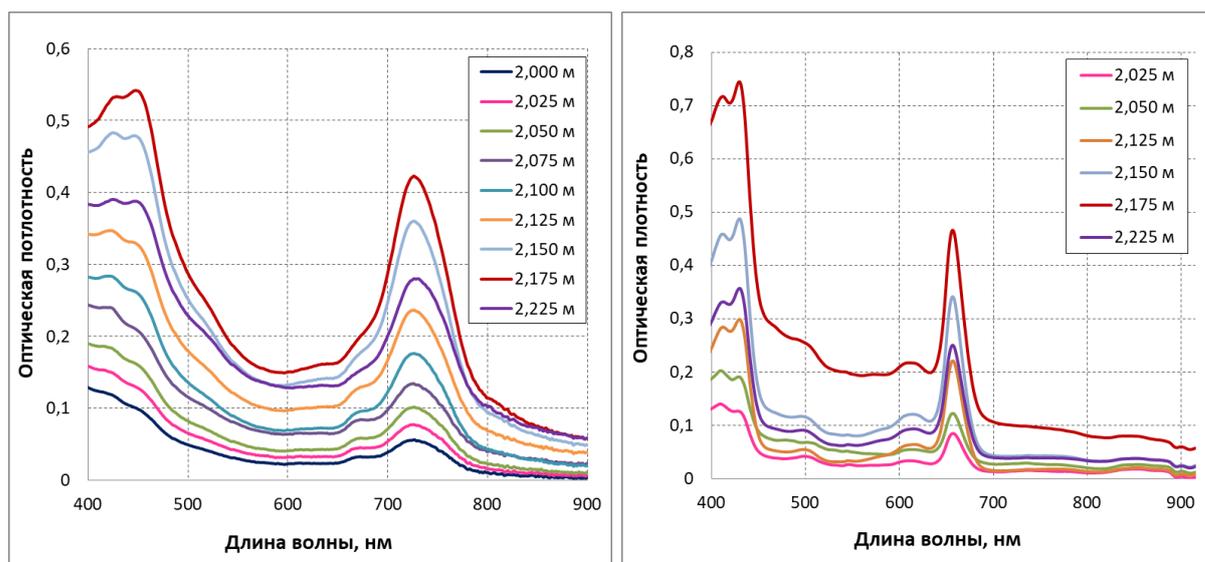


Рис. 24. Спектры поглощения образцов природной воды из оз. Трехцветное (слева) и их экстрактов (справа). [Для наглядности показаны только выборочные образцы].

На всех спектрах поглощения присутствуют максимумы поглощения хлоросомального Бхл, сдвинутые в случае спектров поглощения экстрактов в коротковолновую область ~660 нм. Наибольшую величину оптической плотности $D=0,47$ имел образец воды с глубины 2,175 м. Используя эмпирическую формулу [40] были произведены расчеты концентрации Бхл d , представленные на рис. 25.

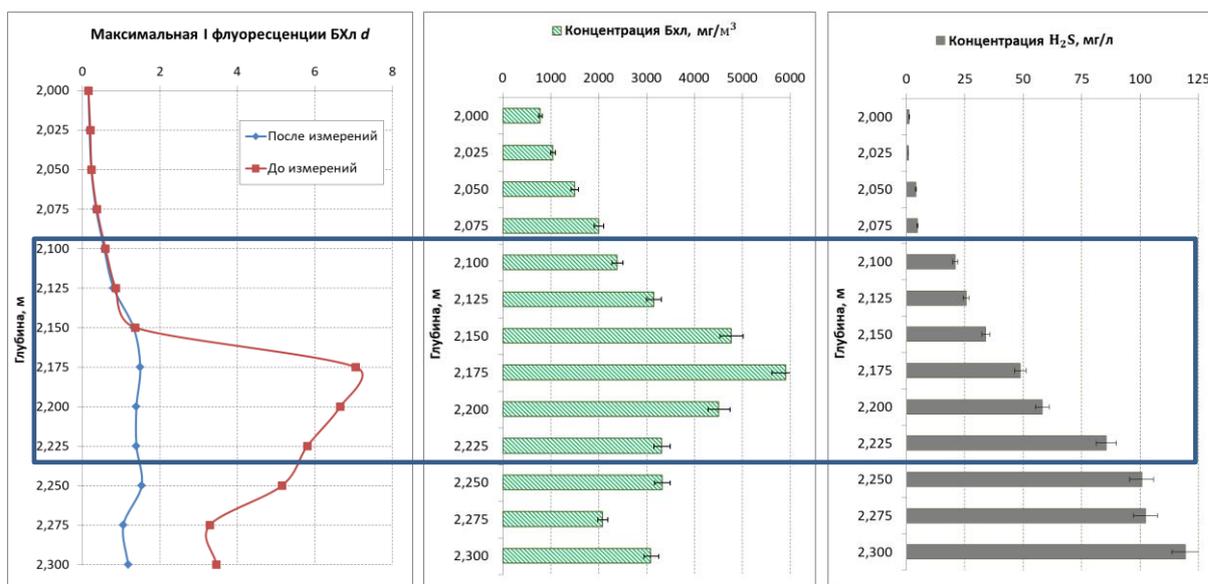


Рис. 25. Профили интенсивности флуоресценции Бхл d (до и после измерений), концентрации Бхл d и концентрации сероводорода в оз. Трехцветное в марте 2019 г.

В пробах с максимальной концентрацией пигмента интенсивность флуоресценции Бхл в клетках зеленых серобактерий также была максимальной. Однако распределение по глубине интенсивности флуоресценции Бхл разительным образом отличалось от распределения концентрации пигмента: выше слоя с максимумом Бхл наблюдалось тушение флуоресценции Бхл. Ниже слоя с максимумом Бхл сероводород в концентрации более 50 мг/л служил «консервантом» и тушение флуоресценции Бхл в клетках, предварительно адаптированных к темноте, не наблюдалось.

Для 23 образцов воды из оз. Трехцветного, отобранных шприцевым батометром в слое воды толщиной 50 см от 1,60 до 2,15 м с интервалом в 2,5 см в марте 2017-го года, расчет концентрации сероводорода

непосредственно в образцах не производился. Однако и в этом случае наблюдалась разная реакция образцов воды на внешнее воздействие (облучение в присутствии кислорода).

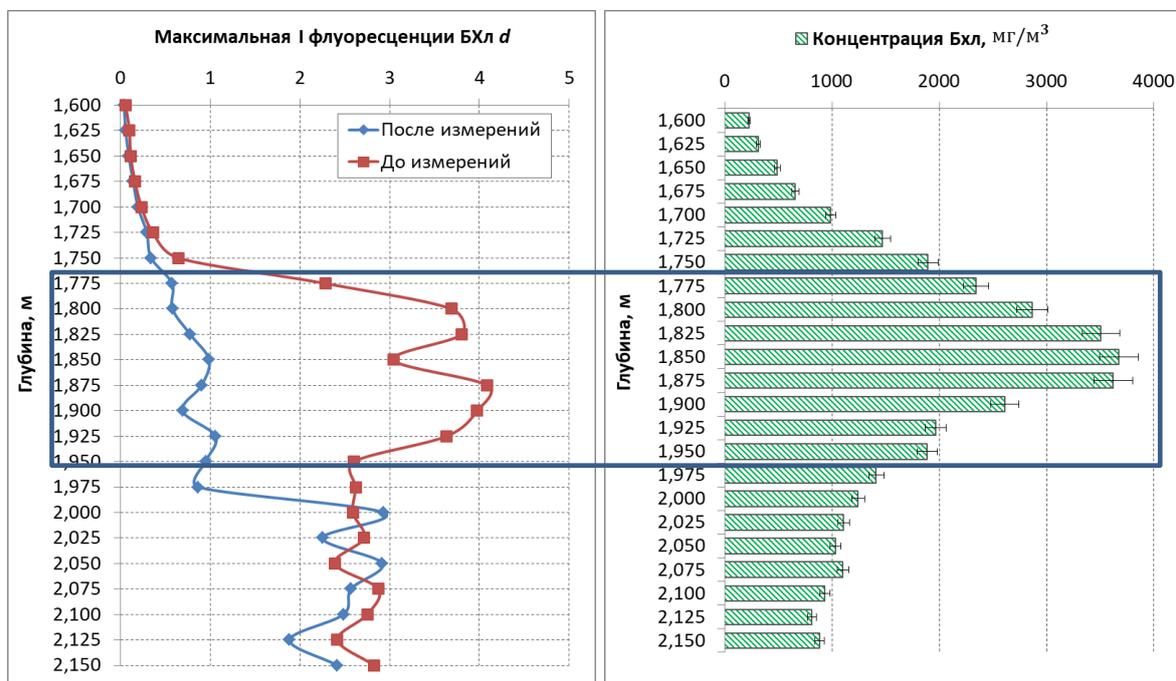


Рис. 26. Профили интенсивности флуоресценции Бхл *d* (до и после облучения пробы) и концентрации Бхл *d* в оз. Трехцветное в марте 2019 г.

Спектральный анализ образцов, содержащих фотосинтетические пигменты бактерий, делает возможным наблюдение за состоянием аноксигенных микроорганизмов и влиянием на них внешних факторов.

4.2. Оценка количества Бхл в клетке ЗСБ

Для серии из 13 образцов воды для оз. Трехцветного (отобранных в марте 2019 года) в институте микробиологии им. Виноградского был произведен счет численности клеток и подсчет общей микробной биомассы для данных проб. Из полученных данных и концентрации Бхл, определенной по спектрам поглощения, удалось оценить количество Бхл на клетку, приведенное на рис. 27 (а).

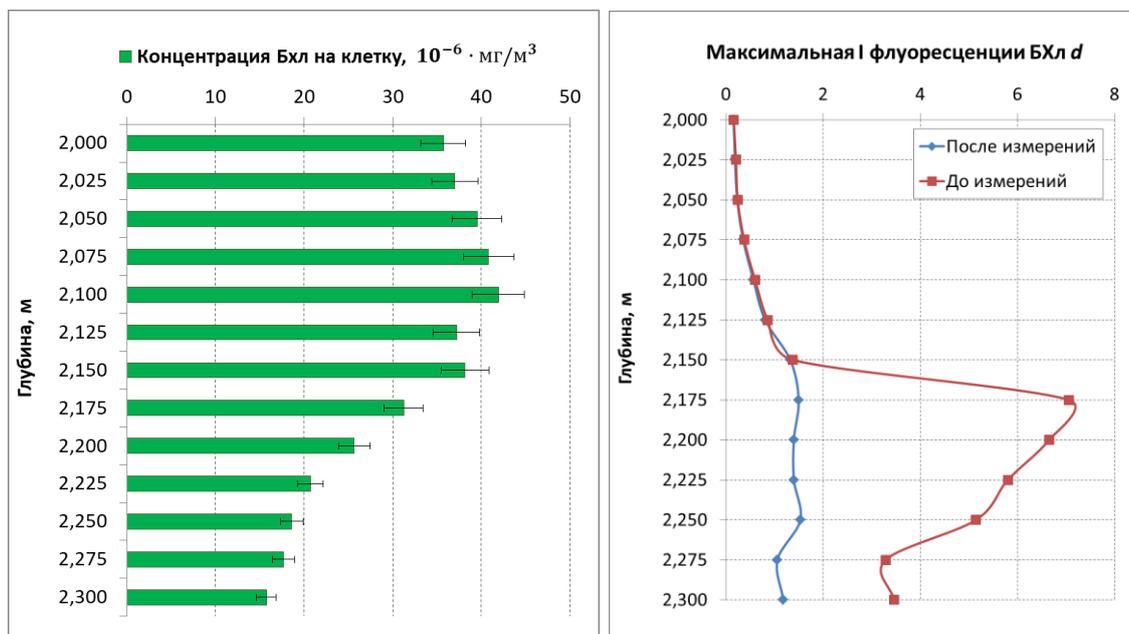


Рис. 27. Распределение по глубине концентрации Бхл на клетку фотосинтетиков (слева) и профили интенсивности флуоресценции Бхл d (до и после измерений) (справа).

С увеличением глубины доленое содержание Бхл уменьшается, что может быть связано как с понижением эффективности фотосинтеза. От 2 м до 2,15 м в озере интенсивность флуоресценции "до"/"после облучения" не изменяется, и на тех же глубинах содержание Бхл в одной клетке постоянно. Начиная с глубины 2,175 м уменьшается отношение Бхл на клетку и одновременно сильно возрастает интенсивность флуоресценции Бхл, при этом отношение "до"/"после облучения" сильно возрастает. Таким образом, в данной ситуации можно говорить о разнице восстановленного и окисленного состояния фотосинтетического аппарата бактерий.

Глава 5. Эксперименты с зелеными серобактериями природной воды в лабораторных условиях

5.1. Зависимость интенсивности флуоресценции Бхл от Eh

Были проведены измерения спектров испускания флуоресценции образца зеленоокрашенных ЗСБ, культивированного из оз. Большие Хрусломены (дата посева: 01.03.19) с одновременным измерением его окислительно-восстановительного потенциала. Измерения проводились в закрытой кювете при $T=10\text{ }^{\circ}\text{C}$.

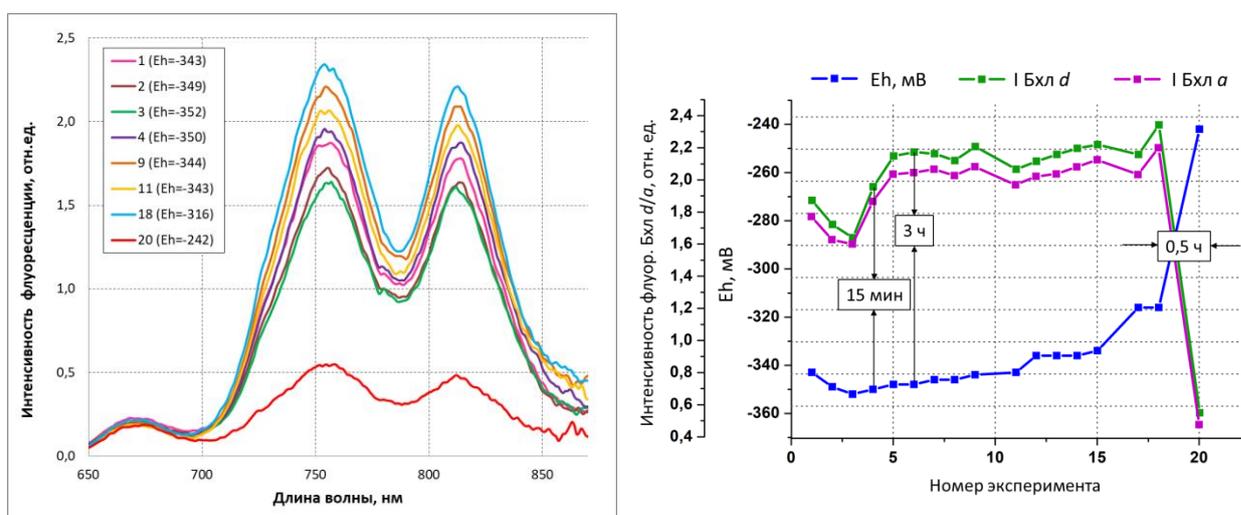


Рис. 28. Спектры испускания флуоресценции образца в зависимости от величины Eh (слева), кривые изменения интенсивности флуоресценции Бхл в главных максимумах и значения Eh (справа).

После того, как образец помещался в кюветное отделение, его значение Eh уменьшалось, что может быть связано с частичным попаданием кислорода в кювету. Однако после 15 минут бескислородной адаптации система приходила в стабильное состояние, интенсивность флуоресценции принимала максимальное значение, а значение Eh оставалось постоянным. После воздействия кислорода в течение получаса, Eh образца уменьшился до -240 мВ, а интенсивность флуоресценции упала почти в 4 раза.

5.2. Тушение флуоресценции Бхл кислородом

Для нескольких образцов накопительных культур бактерий в присутствии кислорода были зарегистрированы графики зависимости интенсивности флуоресценции от времени в трех главных максимумах (полоса Бхл d/e,

полоса Бхл *a* и полоса в районе 670 нм). Измерения проводились для образцов со стабильной флуоресценцией (флуоресценция которых не изменялась в течение часа). Доступ кислорода к изучаемым растворам Бхл происходил посредством открывания крышки кюветы в начале измерений.

Исследовались Бхл *e* и Бхл *d* содержащие накопительные культуры, культивированные из отделяющегося водоема – озера Большие Хрусломены, дата посева 01.03.19 (зел. БХр (01.03.19)) и озера Трехцветного, дата посева 13.09.18 (кор. ТЦ (13.09.18)). Спектры регистрировались при возбуждении светом длиной волны 440 нм при температуре 15 °С. Оптическая плотность исследуемых образцов в длинноволновом максимуме поглощения была одинаковой и равнялась 0,13 (Рис. 29).

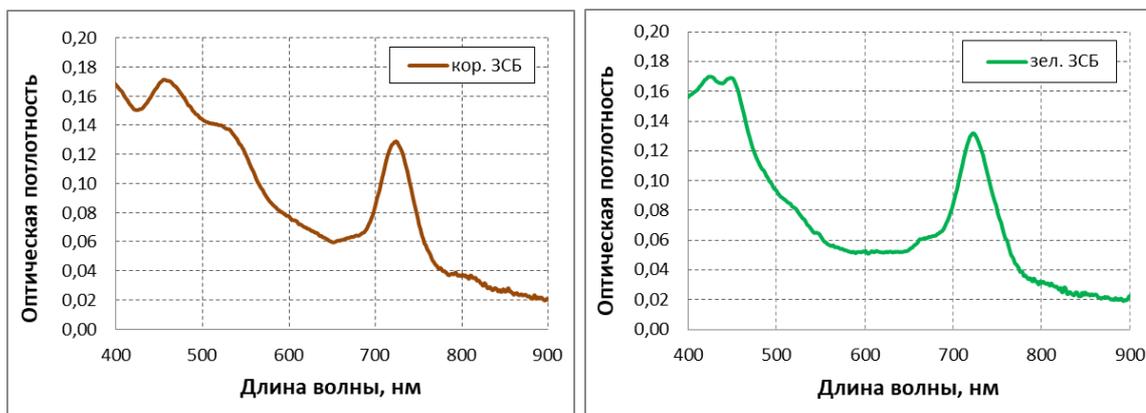


Рис. 29. Спектры поглощения изучаемых коричневоокрашенной (слева) и зеленоокрашенной (справа) культур, используемых в эксперименте.

За 1 час кислородного воздействия флуоресценция Бхл *e* уменьшилась на величину ~50%, а Бхл *a* – на ~70%, изменение флуоресценции на длине волны 670 нм было порядка ~10% (Рис. 30). В начале измерений скорость уменьшения интенсивности флуоресценции Бхл *a* была больше скорости тушения флуоресценции Бхл *e*, однако через 30 минут после открытия крышки кюветы интенсивности обоих Бхл стали изменяться пропорционально друг другу. В конце регистрации изменения интенсивности флуоресценции Бхл *a* и Бхл *e* приняли равные значения (зависимости интенсивности флуоресценции от времени приведены на Рис. 30).

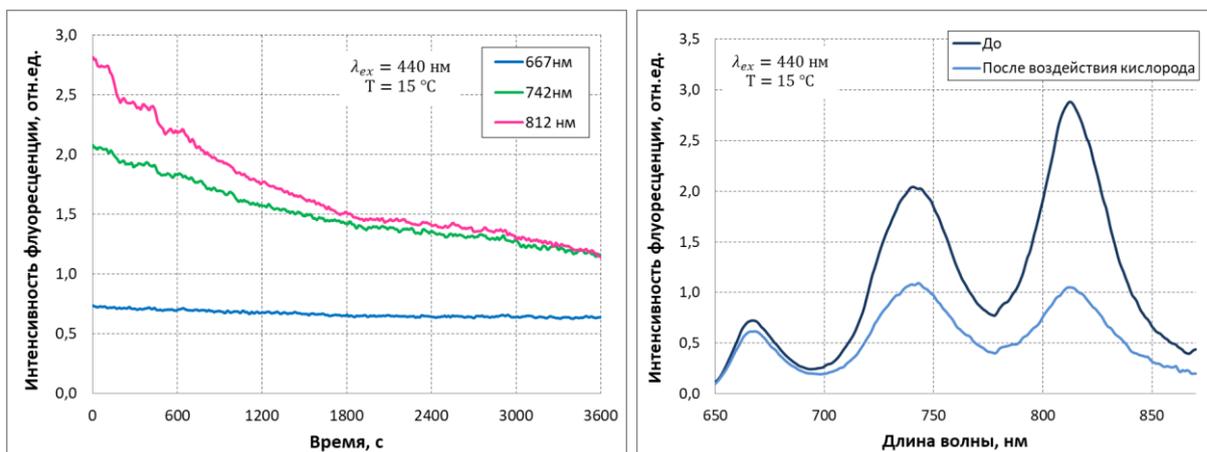


Рис. 30. Тушение флуоресценции в главных максимумах на длинах волн 667 нм, 742 нм и 812 нм (слева) и спектры испускания флуоресценции образца кор. ЗСБ при $\lambda_{ex}=440$ нм до и после часового воздействия кислорода (справа).

За 30 минут кислородного воздействия флуоресценция Бхл *d* и Бхл *a* уменьшилась на величину $\sim 80\%$, изменение флуоресценции на длине волны 670 нм было порядка $\sim 10\%$ (Рис. 31).

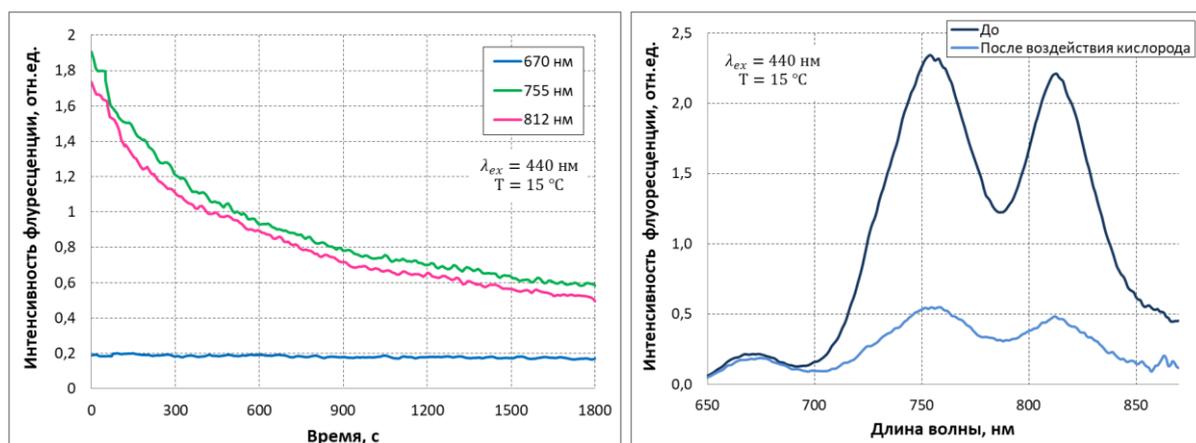


Рис. 31. Тушение флуоресценции в главных максимумах на длинах волн 670 нм, 755 нм и 812 нм (слева) и спектры испускания флуоресценции образца зел. ЗСБ при $\lambda_{ex}=440$ нм до и после получасового воздействия кислорода (справа).

Так как оптическая плотность образцов двух изучаемых образцов была одинаковой, а изменение интенсивности флуоресценции происходило в одинаковых условиях, то можно сделать вывод о большей устойчивости к воздействию кислорода фотосинтетического аппарата коричневоокрашенных ЗСБ по сравнению с зеленоокрашенными.

Временной ход флуоресценции за счет частичного тушения флуоресценции атмосферным кислородом, вследствие ее контакта с

воздухом, был описан экспоненциальной функцией с параметром постоянной времени вида $y = y_0 + Ae^{-\frac{x}{t}}$.

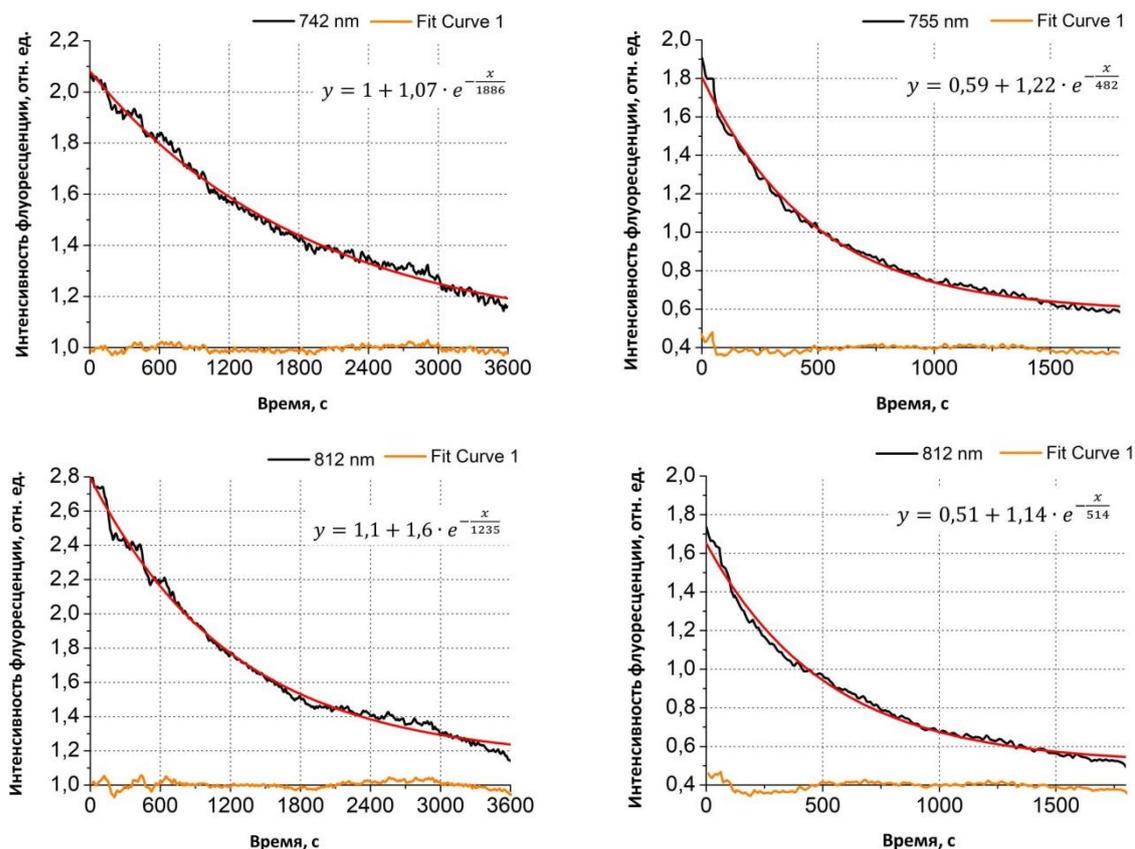


Рис. 32. Аппроксимация временного хода флуоресценции за счет ее частичного тушения кислородом для кор. ЗСБ (слева) и зел. ЗСБ (справа).

В процессе аппроксимации определена величина времени τ , за которое начальная интенсивность флуоресценции уменьшается в 2 раза. Для коричневоокрашенных ЗСБ: $\tau_{742}^{\text{кор}} = 68 \pm 3$ мин, $\tau_{812}^{\text{кор}} = 38,2 \pm 2,5$ мин. Для зеленоокрашенных ЗСБ: $\tau_{755}^{\text{зел}} = 10,9 \pm 1,1$ мин, $\tau_{812}^{\text{зел}} = 11,0 \pm 1,2$ мин.

5.3. Изменение флуоресценции Бхл в присутствии соединений-восстановителей

В образец кор. ЗСБ, исследованный в п. 5.2 (кор. ТЦ (13.09.18) после часового кислородного воздействия были добавлены растворы сульфида натрия Na_2S и гидрокарбоната натрия NaHCO_3 в соотношениях 0,5 мл 10 % раствора на 100 мл культуральной среды и 1,5 мл 10 % раствора на 100 мл среды соответственно.

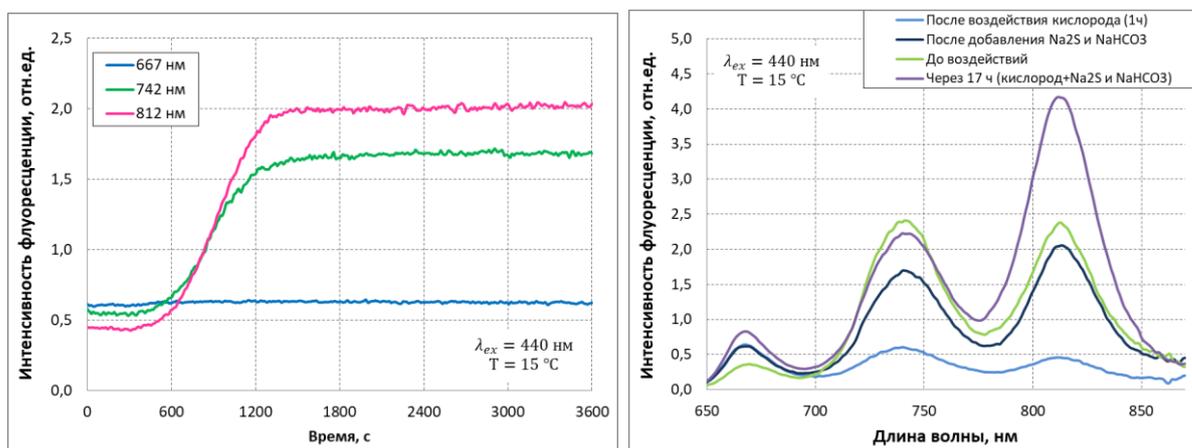


Рис. 33. Временной ход флуоресценции в главных максимумах на длинах волн 667 нм, 745 нм и 812 нм (слева) и спектры испускания флуоресценции образца кор. ЗСБ при $\lambda_{ex}=440$ нм до и после добавления растворов Na_2S и NaHCO_3 (справа).

Изменения в интенсивности флуоресценции наблюдались уже через 6 минут после добавления вышеупомянутых веществ, через 20 минут флуоресценция хлоросомных Бхл восстановилась практически до первоначального уровня. Следующий спектр испускания флуоресценции того же образца был зарегистрирован через 17 часов, при этом кювета, в которой находился образец, все это время оставалась открытой. Несмотря на воздействие кислорода тушения флуоресценции в присутствии Na_2S и NaHCO_3 происходило, интенсивность флуоресценции Бхл *a* почти в два раза превысило интенсивность Бхл *e*.

5.4. Влияние температуры на спектры испускания флуоресценции

Бхл

Для изучения температурной зависимости флуоресценции была взята культура, содержащая Бхл *d* (зел Бхр (01.03.19)) с оптической плотностью в длинноволновом максимуме поглощения 0,13. Были измерены спектры испускания флуоресценции при возбуждении светом длиной волны 440 нм в диапазоне температур от 10 до 60°C (Рис. 34). Для низкотемпературных спектров (до 30°C) после регистрации спектра флуоресценции на определенной температуре производилось измерение временного хода флуоресценции на этой же температуре в течение 30 минут для трех максимумов ($\lambda_{рег}=675, 756$ и 812 нм). Сохранение интенсивности

флуоресценции в указанной промежуток времени, позволяло определить стабильность флуоресценции образца.

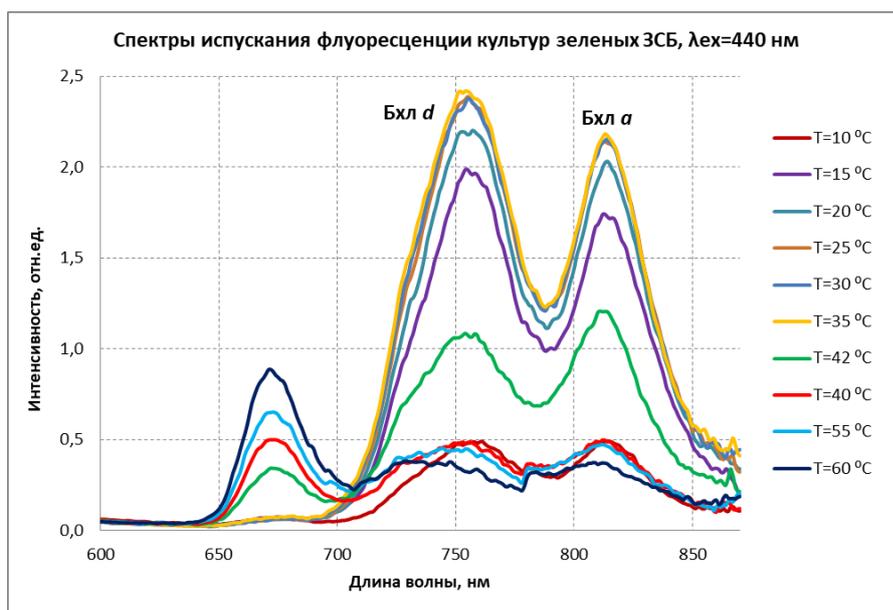


Рис. 34. Спектры испускания флуоресценции зел. ЗСБ, зарегистрированные при разных температурах образца.

При $T=10$ °C интенсивности полос флуоресценции Бхл *d* и Бхл *a* были равными и составляли порядка 0,5 отн. ед., однако при дальнейшем повышении температуры до 35°C значения флуоресценции двух полос выросли более чем в 4 раза и соотношение между ними изменилось. Для измерений при $T=15, 20, 25, 30$ и 35 °C флуоресценция Бхл *a* на 10 % меньше флуоресценции Бхл *d*. После 25°C. Интенсивность флуоресценции двух полос не изменялась и оставалась постоянной до 35°C. При 42°C наблюдалось резкое падение флуоресценции в 2,5 раза, в тоже время появился максимум на 675 нм. При 42°C полоса флуоресценции Бхл *a* стала на 10% интенсивнее флуоресценции Бхл *d*.

При дальнейшем увеличении температуры происходили необратимые изменения флуоресценции образцов, продолжался рост коротковолновой полосы флуоресценции на длине волны 675 нм. Полосы флуоресценции Бхл при температуре до 35°C хорошо аппроксимировались кривыми гауссова распределения с параметрами λ_{max} (Бхл *d*) = 756 нм; λ_{max} (Бхл *a*) = 815 нм; λ_{max} (~670) = 674 нм и соответствующими значениями полуширин

w_1 (Бхл d) = $63,7 \pm 0,5$; w_1 (Бхл a) = $42,4 \pm 0,4$; w_1 (~ 670) = $27,4 \pm 2,5$ (см. Гл. 3. п. 3.2). После 42°C наблюдался сдвиг максимума флуоресценции Бхл d в коротковолновую область и значительное уширение полосы испускания Бхл d . При $T=60^\circ\text{C}$ $\lambda_{max}^{60^\circ\text{C}}$ (Бхл d)=739 нм, а полуширина соответствующей кривой гауссова распределения увеличилась почти в 2 раза $w_1^{60^\circ\text{C}}$ (Бхл d)= 106 ± 3 . Параметры остальных полос флуоресценции практически не изменились: $\lambda_{max}^{60^\circ\text{C}}$ (Бхл a)=739 нм; $w_1^{60^\circ\text{C}}$ (Бхл a)= $41,3 \pm 0,3$; и $\lambda_{max}^{60^\circ\text{C}}$ (~ 670)=672 нм; $w_1^{60^\circ\text{C}}$ (~ 670)= $30,6 \pm 0,4$ нм (Рис. 35).

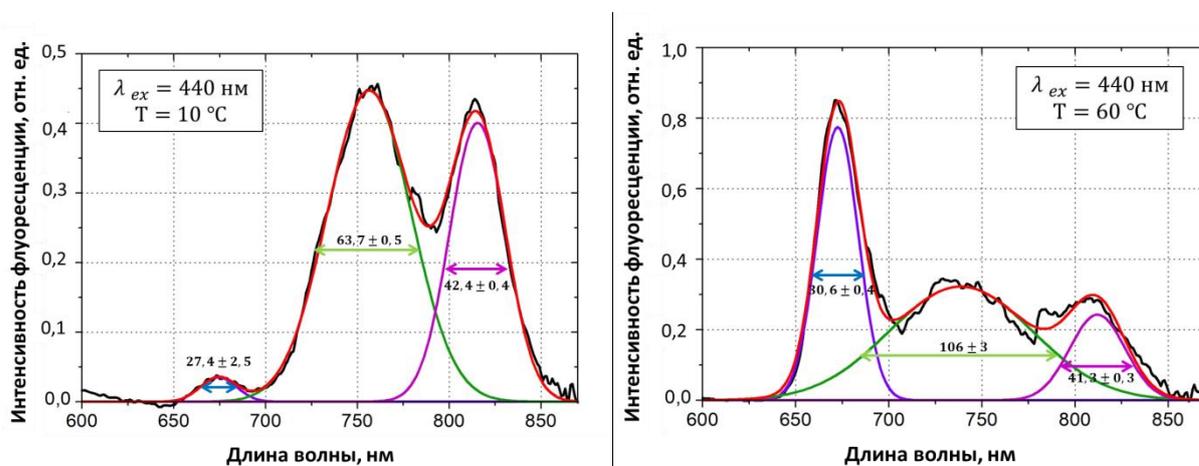


Рис. 35. Аппроксимация спектров испускания флуоресценции зел. ЗСБ кривыми гауссова распределения при $T=10^\circ\text{C}$ (слева) и $T=60^\circ\text{C}$ (справа).

Уширение полос флуоресценции и сдвиг максимума флуоресценции может быть следствием разрушения агрегатов Бхл. При температуре более 40°C защитная система фотосинтетического аппарата ЗСБ не может справиться с поступающей в виде тепла энергией и происходит разрушение фотосинтетических единиц.

5.5. Обсуждение полученных результатов

В результате проведенных исследований было установлено, что Бхл d и e (культур зеленоокрашенных и коричневоокрашенных ЗСБ соответственно) имеют полосы флуоресценции с близко расположенными к друг другу максимумами, однако различающиеся по своим спектральным характеристикам. Максимум флуоресценции хлоросомных Бхл находится в диапазоне длин волн от 730 до 770 нм, то есть занимает промежуточное

положение между максимумом флуоресценции хлорофиллов (~680 нм) и Бхл *a* (~815 нм). Это преимущество дает возможность рассматривать Бхл *d* и *e* в качестве потенциальных фотосенсибилизаторов (уже сейчас на основе производных Бхл *a* и наночастиц золота происходит разработка наноструктурированных ИК-фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии рака [6,7]).

В работе найдены величины стоксова сдвига для длинноволновых полос флуоресценции Бхл, что позволяет сделать выводы о различиях в представлении молекул Бхл *d* и *e*, как систем энергетических уровней. Найденные параметры аппроксимационных кривых гауссова распределения делают возможным наблюдение за изменением агрегированного состояния вещества, переходами их в мономерную форму, а также переносом энергии возбуждения в клетках. Полученная информация важна для исследования процессов миграции энергии внутри фотосинтетического аппарата бактерий, как органической машины высокой эффективности (передача энергии внутри пигментно-белкового фотосинтетического комплекса происходит с эффективностью порядка 100% [9]).

В работе впервые найдены зависимости интенсивности флуоресценции Бхл от гидрохимических параметров природной воды с разрешением в 2,5 см, на основе которых возможен мониторинг воды отделяющихся водоемов с развитым сероводородным заражением. При одной и той же концентрации Бхл в разных условиях (с разной концентрацией растворенного в среде сероводорода) флуоресцентные характеристики образцов под действием кислорода ведут себя по-разному. Тушение флуоресценции кислородом происходит в меньшей степени в условиях повышенного содержания сероводорода в среде ~50 мг/л. Экспериментально показано на накопительных культурах, что в окисленных условиях флуоресценция Бхл *d, e* и *a* тушится с разной скоростью, причем скорость тушения флуоресценции Бхл *a* при разной начальной интенсивности флуоресценции больше, чем Бхл *e*. Таким образом, наличие кислорода препятствует

переносу энергии на FMO-белок фотосинтетической антенны. Исследования взаимодействий кислорода с хлоросомными Бхл могут в дальнейшем способствовать созданию датчиков кислорода на их основе (в водной среде или в почве). Сенсоры датчиков разрабатываются на металлопорфиринах - родственных хлорофиллам соединениях [47]. Окисленные условия не влияют на флуоресценцию полосы с длиной волны в максимуме порядка 670 нм, однако при высоких температурах обнаружен резкий рост ее интенсивности, что может свидетельствовать о переходе высоко агрегированной формы Бхл в мономерную.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

В работе исследованы флуоресцентные характеристики бактериохлорофиллов (Бхл *d*, *e* и *a*) клеток зеленых серобактерий в культурах и в образцах природной воды.

1) Для зеленоокрашенных и коричневоокрашенных ЗСБ измерены спектры испускания флуоресценции. Показана возможность аппроксимации полос испускания распределениями Гаусса и найдены (усредненные по серии из 9 монокультур каждого типа) параметры главных полос флуоресценции Бхл: полосы Бхл *e* (длина волны максимума $740,1 \pm 0,8$ нм, ширина полосы $49,7 \pm 1,2$ нм) и полосы Бхл *a* (длина волны максимума $811,6 \pm 0,7$, ширина полосы $53,9 \pm 2,1$) для коричневоокрашенных ЗСБ и полосы Бхл *d* (длина волны максимума $758,2 \pm 1,1$ нм, ширина полосы $65,2 \pm 2,3$ нм) и полосы Бхл *a* (длина волны максимума $814,9 \pm 2,3$, ширина полосы $46,8 \pm 1,2$) для зеленоокрашенных ЗСБ.

2) Определены средние значения стокового сдвига флуоресценции Бхл для разных монокультур ЗСБ: стоковый сдвиг для образцов с Бхл *e* равен $21,0 \pm 1,3$ нм, что почти в два раза превышает значение стокового сдвига для образцов с Бхл *d*, равного $36,8 \pm 1,1$ нм (коэффициент доверия $\alpha=0,95$).

3) Впервые с разрешением по глубине в 2,5 см проведен флуоресцентный и гидрохимический анализ проб воды в меромиктическом водоеме в зоне бактериальной пластины (толщина пластины около 15 см). На основании спектрально-оптических характеристик природной воды и экстрактов пигментов получены распределение по глубине концентрации Бхл и интенсивности флуоресценции. Выявлены заметные различия тушения флуоресценции Бхл в верхней и нижней части бактериальной пластины, обусловленные различием в концентрации сероводорода, а также различная реакция фотосинтетического аппарата бактерий на совместное влияние кислорода и облучения, регистрируемая по уровню сигнала флуоресценции Бхл.

4) С учетом оптических характеристик Бхл в ацетон-метаноловом растворителе рассчитано значение концентрации Бхл на клетку, которое в условиях небольшой концентрации сероводорода в воде (менее 30 мг/л) было порядка $40 \cdot 10^{-6}$ мг/м³ и уменьшалось с увеличением концентрации растворенного сероводорода. При значениях сероводорода равных около 125 мг/л на клетку приходилось $16 \cdot 10^{-6}$ мг/м³.

5) Экспериментально обнаружено тушение флуоресценции Бхл при взаимодействии ЗСБ с атмосферным кислородом. Показана возможность аппроксимации временного хода интенсивности флуоресценции Бхл за счет её тушения кислородом экспоненциальной функцией. Определены времена τ , за которые начальная интенсивность флуоресценции уменьшалась в 2 раза для каждой полосы испускания и разных типов ЗСБ. Для зеленоокрашенных ЗСБ обе полосы флуоресценции Бхл уменьшались синхронно: $\tau_{755}^{зел} = 10,9 \pm 1,1$ мин, $\tau_{812}^{зел} = 11,0 \pm 1,2$ мин. Для коричневоокрашенных ЗСБ полосы свечения Бхл *e* и Бхл *a* уменьшались за существенно разные времена: $\tau_{742}^{кор} = 68 \pm 3$ мин, $\tau_{812}^{кор} = 38,2 \pm 2,5$ мин.

6) Впервые экспериментально измерена температурная зависимость формы полосы испускания и интенсивности флуоресценции Бхл для зеленых серобактерий в диапазоне температур 20-60°C. Наблюдались сдвиг максимума флуоресценции Бхл *d* в коротковолновую область при нагреве выше 42°C и значительное уширение (почти в 2 раза) полосы испускания Бхл *d*. Найденные при T=60°C значения длины волны максимума и ширины соответствующей кривой гауссова распределения составили соответственно $\lambda_{max}^{60°C}(\text{Бхл } d) = 739$ нм и $w_1^{60°C}(\text{Бхл } d) = 106 \pm 3$ нм.

7) Обнаружен эффект восстановления интенсивности флуоресценции Бхл в предварительно окисленной атмосферным кислородом пробе при добавлении сульфида натрия Na₂S и гидрокарбоната натрия NaHCO₃. При температуре выше 40°C данного эффекта не наблюдается, что говорит о

необратимых изменениях фотосинтетического аппарата бактерий при тепловом воздействии.

Таким образом, флуоресцентные методы исследования позволяют не только детектировать наличие фотосинтетических пигментов в изучаемых образцах, но и наблюдать за изменениями, происходящими с пигментами внутри клеток микроорганизмов непосредственно в среде обитания. Данная особенность делает изучение флуоресцентных характеристик Бхл важным процессом не только с фундаментальной точки зрения, но и для дальнейшего практического применения.

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 **Лосюк Галину Николаевну** и **Кокрятскую Наталью Михайловну** – сотрудников ФГБУН Федерального исследовательского центра комплексного изучения Арктики РАН за определение концентрации сероводорода в пробах природной воды и линейке шприцов. Также благодарю сотрудников Института микробиологии им. С.Н. Виноградского: кандидата биологических наук, младшего научного сотрудника **Лунину Ольгу Николаевну** за предоставленные для спектральных измерений образцы чистых и накопительных культур зеленых серных бактерий; младшего научного сотрудника **Веслопову Елену Федоровну** за подсчет клеток в образцах природной воды, 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 кандидату физико-математических наук младшему научному сотруднику **Харчевой Анастасии Витальевне**.

Работа поддержана грантом РФФИ №19-05-00377 и фондом развития теоретической физики и математики «БАЗИС».

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Карнаухов В.Н. Спектральный анализ в клеточном мониторинге состояния окружающей среды. М.: Наука, 2001. 186 с.
2. Mishanin V.I., Trubitsin B.V., Patsaeva S.V., Ptushenko V.V., Solovchenko A.E., Tikhonov A.N. Acclimation of shade-tolerant and light-resistant tradescantia species to growth light: chlorophyll *a* fluorescence, electron transport, and xanthophyll content // *Photosynthesis Research*. 2017. Vol. 133. Iss. 1–3. DOI: 10.1007/s11120-017-0339-1. P. 87–102.
3. Terekhova, V.A., Gladkova, M.M. Engineered nanomaterials in soil: Problems in assessing their effect on living organisms // *Eurasian Soil Science*. 2013. Vol. 46. № 12. P. 1203–1210.
4. Pelevin V., Zlinszky A., Khimchenko E., Toth V. Ground truth data on chlorophyll-*a*, chromophoric dissolved organic matter and suspended sediment concentrations in the upper water layer as obtained by LIF lidar at high spatial resolution // *International Journal of Remote Sensing*. 2017. Vol. 38. Iss. 7. P. 1967-1982.
5. Суторихин И.А., Букатый В.И., Акулова О.Б. Сезонные изменения спектральной прозрачности и концентрации хлорофилла *a* в разнотипных озерах // *Оптика атмосферы и океана*. 2014. Т. 27. № 09. С. 801-806.
6. Пантюшенко И.В., Рудаковская П.Г., Старовойтова А.В., Михайловская А.А., Абакумов М.А., Каплан М.А., Цыганков А.А., Мажуга А.Г., Грин М.А., Миронов А.Ф. Разработка наноструктурированных ИК-фотосенсибилизаторов на основе производных бактериохлорофилла *a* и наночастиц золота для фотодинамической терапии рака // *Биохимия*. 2015. Т. 80. № 6. С. 891-902.
7. Грин М.А., Суворов Н.В., Островерхов П.В., Каплан М.А., Мажуга А.Г., Миронов А.Ф. Разработка таргетных наноструктурированных фотосенсибилизаторов на основе бактериохлорофилла *a* для фотодинамической терапии рака // *Российский биотерапевтический журнал*. 2017. № 16 (S1).

8. Соловьев А.Н. Вертикальное распределение флуоресценции фотосинтетических пигментов в Калининградском заливе Балтийского моря // *Океанология*. 2010. Т. 50. № 6. С. 958-963.
9. Mirkovic Tihana, Ostroumov Evgeny E., Jessica M. Anna, Rienk van Grondelle, Govindjee and Gregory D. Scholes. Light Absorption and Energy Transfer in the Antenna Complexes of Photosynthetic Organisms // *Chemical Reviews*. 2017. № 117(2).
10. Романенко Ф.А., Шилова О.С. Послеледниковое поднятие Карельского берега Белого моря по данным радиоуглеродного и диатомового анализов озёрно-болотных отложений полуострова Киндо // *Доклады Академии наук*. 2012. Т. 442. № 4. С. 544–548.
11. Краснова Е.Д., Пантюлин А.Н. Кисло-сладкие озера, полные чудес // *Природа*. 2013. №2. С. 39-48.
12. Olson J.M. Chlorophyll Organization and Function in Green Photosynthetic Bacteria // *Photochemistry and Photobiology* 67(1). 1998. P. 61-75.
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. 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.
17. M.F. Hohmann-Marriott, R.E. Blankenship. Variable fluorescence in green sulfur bacteria, *Biochimica et Biophysica Acta* 1767: 106-113, 2007.

18. Проблемы ранней эволюции фотосинтеза / Отв. ред. В.М. Горленко, С.В. Рожнов. Серия «Геобиологические процессы в прошлом». 2011. М.: ПИН РАН. 218 с.
19. 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.
20. N.-U. Frigaard, Shinichi Takaichi, Masamitsu Hirota, Keizo Shimada, Katsumi Matsuura. Quinones in chlorosomes of green sulfur bacteria and their role in the redox-dependent fluorescence studied in chlorosome-like bacteriochlorophyll c aggregates. Arch Microbiol. 1997. Vol. 167. P. 343-349.
21. 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.
22. Beatty, J. T.; Overmann, J.; Lince, M. T.; Manske, A. K.; Lang, A. S.; Blankenship, R. E.; Van Dover, C. L.; Martinson, T. A.; Plumley, F. G. (2005). An Obligately Photosynthetic Bacterial Anaerobe from a Deep-Sea Hydrothermal Vent. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2005, №102. P. 9306-9310.
23. 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.
24. 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.
25. 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.

26. Scholes G.D., Fleming G.R. Energy Transfer and Photosynthetic Light Harvesting. *Adv // Chem. Phys.* 2005. № 13. P. 57-129.
27. Ostroumov E.E., Mulvaney R.M., Cogdell R.J., Scholes G.D. Broadband 2D Electronic Spectroscopy Reveals a Carotenoid Dark State in Purple Bacteria. *Science.* 2013. V. 340. P. 52-56
28. Таисова А.С., Яковлев А.Г., Фетисова З.Г. Вариабельность размера единичного строительного блока периферических светособирающих антенн, как стратегия эффективного функционирования антенн переменного размера, контролируемого *in vivo* интенсивностью света // *Биохимия.* 2014. Т. 79, № 3. С. 328–337.
29. Возбужденные молекулы: Кинетика превращений. Сборник статей / Отв. ред.: Красновский А.А. Л.: Наука. Ленингр. отд-ние. 1982. 260 с.
30. Введение в фотохимию органических соединений / Под ред. Беккера Г.О., Ельцова А.В. Л.: Химия. 1976. 384 с.
31. Шейко Л.М., Бокуть С.Б. Практикум по медицинской и биологической физике. Раздел «Биологическая физика»: Методы биофизических исследований. Минск: МГЭУ им. А.Д. Сахарова. 2011. 64 с.
32. Angdellhofer A., Cogdell R.J., Hipkins M.F. A Spectral Characterization of the Light-Harvesting Pigment-Protein Complexes from *Rhodospseudomonas acidophila* // *Biochim. Biophys. Acta. Bioenerg.* 1986. V. 848. P. 333-341.
33. Cogdell R.J., Hipkins M.F., MacDonald W., Truscott T.G. Energy Transfer Between the Carotenoid and Bacteriochlorophyll Within the B800-850 Light-Harvesting Pigment-Protein Complex of *Rps. Sphaeroides*. *Biochim. Biophys. Acta. Bioenerg.* 1981, 634, 191-202.
34. Robert Bittl, Eberhard Schlodder, Irene Geisenheimer, Wolfgang Lubitz, and Richard J. Cogdell. Transient EPR and Absorption Studies of Carotenoid Triplet Formation in Purple Bacterial Antenna Complexes // *J. Phys. Chem. B.* 2001. 105 (23). P. 5525–5535.

35. Fiedor J., Fiedor L., Haessner R., Sheer H. Cyclic Endoperoxides of β -Carotene, Potential Pro-Oxidants as Products of Chemical Quenching of Single Oxygen // *Biochim. Biophys. Acta. Bioenerg.* 2005. V. 1709. P. 1-4.
36. Jahns P., Alfred Holzwarth A.R. The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics.* Volume 1817, Issue 1. 2012. P. 182-193.
37. Krishna K. Niyogi, Xiao-Ping Li, Patricia Müller (2001-04). “Update on Photosynthesis: Non-Photochemical Quenching. A Response to Excess Light Energy” // *Plant Physiol.* 125 (4). P. 1558—1566
38. Blankenship R.E., Cheng P., Causgrove T.P., Brune D.C. Redox regulation of energy transfer efficiency in antennas of green photosynthetic bacteria // *Photochem Photobiol.* 1993. V. 57. P. 103-107.
39. Митин И.В., Русаков В.С. Анализ и обработка экспериментальных данных. Учебно-методическое пособие для студентов младших курсов. М: Изд-во НЭВЦ ФИПТ. 1998. 48 с.
40. Overmann J., Tilzer M.M. Control of primary productivity and the significance of photosynthetic bacteria in a meromictic kettle lake Mittlerer Buchensee, West-Germany // *Aquatic Sciences.* 1989. Vol. 51. P. 261-278.
41. Жильцова А.А. Спектральное исследование аноксигенных фотосинтезирующих бактерий в стратифицированных водоемах. Выпускная бакалаврская работа. Физический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова. 2017.
42. Харчева А.В., Жильцова А.А., Лунина О.Н. и др. Флуоресценция бактериохлорофиллов зеленых серных бактерий в анаэробной зоне двух природных водоемов // *Вестник Московского университета. Серия 3: Физика, астрономия.* 2018. № 4. С. 40–45.
43. Losyuk G., Kokryatskaya N., Krasnova E. Formation of hydrogen sulfide in isolated basins at the Karelian of the White Sea coast // *EARSel eProceedings.* 2015. Vol. 14. P. 49-54.

44. Жильцова А.А., Харчева А.В., Краснова Е.Д. и др. Спектральное исследование зеленых серных бактерий в стратифицированных водоемах Кандалакшского залива Белого моря // Оптика атмосферы и океана. 2018. Т. 31, № 3. С. 233–239.
45. 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. 9917:99170Q–1–99170Q–16.
46. Krasnova E.D., Kharcheva A.V., Milyutina I.A., Voronov D.A., Patsaeva S.V. Study of microbial communities in redox zone of meromictic lakes isolated from the White Sea using spectral and molecular methods // Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom. 2015. Vol. 95. № 8. P. 1579-1590.
47. Xu-dong Wang, Otto S. Wolfbeis. Optical methods for sensing and imaging oxygen: materials, spectroscopies and applications // Chem. Soc. Rev. 2014, 43.