

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

---

ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ  
Кафедра общей физики

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

Спектры поглощения хлоросомного бактериохлорофилла в клетках бактерий и экстрактах

Выполнил студент  
405 группы  
Емельянцеv Павел Сергеевич

---

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

---

Допущен к защите «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2019 г.

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

---

Москва  
2019 г.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
1. Аноксигенные фототрофные бактерии, спектральные способы измерения концентрации бактериохлорофиллов зеленых серных бактерий (обзор литературы) .....	6
1.1 Зеленые серные бактерии, структура и пигментный состав фотосинтетического аппарата .....	7
1.2. Бактериохлорофиллы <i>d</i> и <i>e</i> , структура и спектры поглощения .....	9
1.3. Методы определения концентрации бактериохлорофиллов, коэффициент экстинкции .....	12
1.4. Применение формул для расчета концентраций бактериохлорофиллов в пробах природной воды .....	20
2. Объекты и методы исследования.....	22
2.1. Объекты изучения .....	22
2.2. Спектральная аппаратура .....	22
2.3. Приготовление экстрактов .....	23
2.4. Спектрометрические формулы и расчет погрешностей.....	23
3. Экспериментальные результаты и их обсуждение .....	27
3.1. Спектры поглощения зеленых серных бактерий в воде .....	27
3.2. Спектры поглощения бактериохлорофиллов в экстрактах .....	28
3.3. Определение коэффициентов экстинкции бактериохлорофиллов <i>d</i> и <i>e</i> в различных растворителях .....	30
3.4. Расчет концентрации бактериохлорофиллов по спектрам поглощения экстрактов.....	36
3.5. Вычисление площади под длинноволновым пиком поглощения в воде – учет рассеяния света на частицах, аппроксимация базовой линии .....	38
3.6. Корреляция площади под длинноволновым пиком поглощения бактериохлорофиллов в воде и концентрации бактериохлорофиллов, рассчитанной по спектрам поглощения бактериохлорофиллов в экстрактах.....	39
3.7. Определение коэффициента <i>K</i> для разных серий проб .....	41
3.8. Расчет концентрации Бхл новым методом и построение вертикальных распределений Бхл в разных водоемах.....	43
3.9. Обсуждение полученных результатов .....	45
ЗАКЛЮЧЕНИЕ. ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ .....	48
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	51

## ВВЕДЕНИЕ

Дипломная работа посвящена разработке и апробации нового спектрального метода определения концентрации бактериохлорофилла (Бхл) зеленых серобактерий в пробах воды без экстрагирования пигментов. На сегодняшний день в океанографических и лимнологических исследованиях спектрально-оптические методы широко используются для экологического мониторинга окружающей среды. Такие преимущества спектроскопии, как быстрота, высокая точность и возможность применения непосредственно в среде (*in situ*) делают задачу изучения оптических характеристик водных микроорганизмов особенно актуальной. Спектральные характеристики водных организмов, содержащих хлорофилл (Хл), довольно хорошо изучены. К таким организмам относят, например, водоросли и цианобактерии, обитающие в насыщенном кислородом верхнем слое воды. В то время как фотосинтетические пигменты аноксигенных фототрофных бактерий – бактериохлорофиллы - пока плохо изучены из-за трудности процесса отбора проб воды, их транспортировки в лабораторию, сложности культивирования аноксигенных фототрофов, отличия культивируемых штаммов от природных.

Известно, что в водоемах с сильной стратификацией на границе между верхним кислородным и нижним бескислородным слоями создаются благоприятные условия для существования специфических микроорганизмов, таких как зеленые серные бактерии (ЗСБ). ЗСБ обитают в бескислородном слое ниже хемоклина, но на такой глубине, на которую все еще проникает свет. Они являются облигатными анаэробами, что означает, что для таких микроорганизмов кислород губителен. ЗСБ являются фототрофами, свет им необходим для осуществления процесса аноксигенного фотосинтеза, при котором бактерии поглощают сероводород и выделяют молекулярную серу. Основными фотосинтетическими пигментами ЗСБ являются так называемые «хлоросомные бактериохлорофиллы» (Бхл *c*, Бхл *d* и Бхл *e*). Бхл внутри бактерий содержится в агрегированной форме в специальных органеллах – хлоросомах, прикрепленных к клеточной мембране.

В связи со специфическими условиями, необходимыми для жизни ЗСБ, их присутствие в воде говорит о наличии сероводородного заражения водоема. Сероводород очень токсичен для людей, и сероводородное заражение водоемов является серьезной экологической проблемой. Этот факт делает актуальными исследования в области разработки физических методов исследования водных экосистем. В частности, измерение концентраций Бхл на различных глубинах меромиктических водоемов в различные временные периоды позволяет построить для этих водоемов сероводородные циклы. Информация о динамике изменения положения сероводородного слоя в водоеме позволяет делать прогнозы о том, что будет с этим водоемом в будущем даже через десятки лет.

Различные природные факторы, такие как освещение, температура, соленость и рН воды, концентрация растворенного кислорода и сероводорода, наличие биогенных элементов влияют не только на распределение аноксигенных фототрофных микроорганизмов по глубине, но и на количественный состав фотосинтетических пигментов у фототрофных бактерий, что делает трудным, а иногда и невозможным изучение природных сообществ аноксигенных фототрофов в природе без применения методов исследования пигментов *in situ*, то есть в естественной среде обитания микроорганизмов. Только сейчас исследователи начинают изучать микробные сообщества меромиктических водоемов в полевых условиях (через небольшое время после отбора проб), но такие работы пока малочисленны. Изучение пигментов фототрофных бактерий в лабораторных условиях традиционными спектральными методами – с экстрагированием пигментов органическими растворителями – также сопряжено с определенными сложностями из-за перекрывания длинноволновых пиков поглощения разных видов Бхл. Из сказанного вытекает актуальность разработки простого и надежного оптического метода измерения концентрации фотосинтетических пигментов аноксигенных фототрофов, который можно применять в полевых условиях – в лаборатории сразу после отбора проб или с помощью погружаемого спектрометра *in situ*.

Данная работа посвящена разработке и апробации нового метода определения концентрации Бхл непосредственно в пробах воды, без экстрагирования пигментов. В настоящее время для определения концентраций хлоросомных Бхл широко используется эмпирическая формула [1], полученная Й. Оверманном и М. Тилзером в 1989 году. В эту формулу входят значения оптической плотности на 651 и 663 нм в спектре поглощения Бхл в ацетон-метаноловом экстракте. Однако изготовление экстрактов с пробами воды с ЗСБ затруднено с технической точки зрения. Сначала клетки бактерий необходимо сконцентрировать, то есть центрифугировать или отфильтровать пробы воды для повышения концентрации пигментов. Затем нужно приготовить экстракт с использованием токсичных органических растворителей (ацетон и метанол). Экстракт необходимо не менее суток выдерживать в холодном и темном месте для предотвращения разрушения пигментов Бхл. Также рекомендуется центрифугировать экстракты перед измерением спектров поглощения для осаждения рассеивающих частиц.

Данная работа нацелена на упрощение измерения концентраций Бхл, сокращение затрачиваемого на измерения времени и снижение сопутствующей опасности, связанной с использованием токсичных растворителей. Новый метод позволяет пропустить ряд традиционных операций, поскольку он заключается в определении концентраций Бхл  $d$  и  $e$  по площади под длинноволновым пиком в спектрах поглощения проб воды.

Для выполнения поставленной цели были решены следующие задачи: измерить спектры поглощения проб воды с ЗСБ из ряда водоемов, отделяющихся от акватории Белого моря; приготовить ацетон-метаноловые экстракты из этих проб, измерить их спектры поглощения, рассчитать концентрации Бхл  $d$  и  $e$  в экстрактах, измерить площади под длинноволновым пиком в спектрах поглощения проб воды, построить линейные зависимости между концентрациями, рассчитанными по спектрам поглощения экстрактов и измеренными площадями в спектре поглощения воды, найти соответствующие коэффициенты линейной регрессии, и в итоге создать рабочую формулу для расчета концентрации Бхл, в которую входят полученные коэффициенты линейной регрессии и измеренные площади под длинноволновым пиком в спектре поглощения проб воды.

Следствием работы должно стать практическое применение нового метода измерения концентрации Бхл в пробах воды без экстрагирования пигментов для построения вертикальных распределений концентрации Бхл в меромиктических водоемах.

## 1. Аноксигенные фототрофные бактерии, спектральные способы измерения концентрации бактериохлорофиллов зеленых серных бактерий (обзор литературы)

Сероводородное заражение свойственно некоторым участкам океанского или морского дна, а также некоторым специфическим озерам и прибрежным лагунам, находящимся на разной стадии отдаления от акватории моря или океана. В таких водоемах, называемых меромиктическими, присутствует устойчивая стратификация воды по плотности, без циркуляции воды между слоями. В самом верхнем слое меромиктического водоема обычно находится пресная вода, насыщенная кислородом. Ниже расположен слой более тяжелой насыщенной кислородом соленой воды. Дальше находится хемоклин, слой с резким изменением химических свойств воды, ниже которого до самого дна водоема располагается слой соленой воды, насыщенной сероводородом, в котором полностью отсутствует кислород. В верхней части этого бескислородного слоя на такой глубине, на которую все еще проникает свет, обитают анаэробные фототрофные бактерии.

Анаэробные фототрофы, к которым относятся и ЗСБ, способны к аноксигенному фотосинтезу, при котором, в отличие от кислородного фотосинтеза растений и цианобактерий, не происходит образования молекулярного кислорода. Формула для аноксигенного фотосинтеза бактерий, использующих в качестве донора электронов сероводород, выглядит следующим образом:



где  $[\text{CH}_2\text{O}]$  – обобщенная формула органического вещества, образуемого из  $\text{CO}_2$ . Таким образом ЗСБ, как и множество других организмов на Земле, участвуют в глобальном цикле углерода, что вызывает дополнительный интерес для изучения экологии меромиктических водоемов. В клетках ЗСБ присутствуют специфические светособирающие антенные комплексы – хлросомы, содержащие фотосинтетические пигменты – Бхл *c*, *d* и *e*. Такие Бхл называют хлросомными.

В соответствии с имеющимися на сегодняшний день литературными данными, поглощение хлросомных Бхл меньше изучено по сравнению с Хл растений и цианобактерий. Фотосинтетические пигменты аноксигенных фототрофных бактерий плохо изучены из-за трудности процесса отбора проб воды без доступа кислорода, их транспортировки в лабораторию, сложности культивирования аноксигенных фототрофов, для которых кислород токсичен, отличия культивируемых штаммов от природных. В то же время ЗСБ являются одними из самых древних организмов, и изучение их спектральных характеристик носит не только прикладной характер, но и помогает фундаментальному пониманию эволюции фотосинтеза на Земле.

## 1.1 Зеленые серные бактерии, структура и пигментный состав фотосинтетического аппарата

Зеленые серные бактерии (ЗСБ) [2] – это специфичные овальные или изогнутые палочковидные бактерии, размножающиеся делением. Свое название получили от наиболее распространенной своей разновидности – зеленоокрашенных ЗСБ. Размер порядка  $0.7–1 \times 0.8–1.6$  мкм. В зависимости от содержания пигментов ЗСБ могут быть зеленоокрашенными, содержащими Бхл *d*, или коричневоокрашенными, содержащими Бхл *e*. Биологическая гибкость ЗСБ очень мала, они являются облигатными анаэробами и могут существовать только в строго бескислородной среде. Чувствительность к кислороду варьируется у различных видов ЗСБ, однако общей чертой является то, что в присутствии кислорода ЗСБ хуже размножаются и вырабатывают Бхл. При осуществлении своего анаэробного фотосинтеза ЗСБ могут использовать сероводород в качестве донора электронов. При наличии диоксида углерода ЗСБ выделяют несколько простых соединений органического углерода. ЗСБ – типично водные микроорганизмы, выделяющиеся своей способностью жить при чрезвычайно низкой интенсивности света, недоступной большинству других фотосинтезирующих организмов, что является причиной их широкого распространения на Земле.

Видимые скопления фототрофных серных бактерий [3] наблюдаются в анаэробных частях небольших пресных водоемов, таких как мелкие канавы и рвы, пруды, застойные водоемы в лесах и т.д. В таких условиях развитие ЗСБ происходит в основном летом и осенью, когда сероводород образуется в результате процессов метаболизма сульфатредуцирующих бактерий при разложении растительного материала или из-за органического загрязнения. Самыми большими и значительными местами обитания ЗСБ являются озера как водоемы с наиболее устойчивой стратификацией. В озерах содержащий ЗСБ слой воды находится в области ниже хемоклина. При этом ЗСБ детектируются оптическими методами посредством отбора проб с разной глубины. Хотя фототрофные серные бактерии обитают в слое более или менее фиксированной глубины, значительные колебания плотности популяции возникают в ответ на сезонные различия в интенсивности солнечного света.

Фотосинтетический аппарат ЗСБ [2] имеет особую молекулярную организацию. Светособирающие пигменты – это хлоросомные Бхл *c*, *d* или *e*, а также основные каротиноиды хлоробактин и изорениератин. Зеленоокрашенные ЗСБ содержат Бхл *c* и *d*, а также небольшое количество хлоробактина, в то время как цвет коричневоокрашенных ЗСБ обусловлен наличием Бхл *e* и существенного количества изорениератина. Содержание

каротиноидов в коричневоокрашенных ЗСБ почти в 4 раза превышает таковое в зеленоокрашенных.

Светособирающие пигменты содержатся в специальных антенных комплексах – хлоросомах (Рис. 1). Последние представляют собой овальные структуры 70–180 нм длиной и 30–60 нм шириной, которые прижаты к цитоплазматической стороне плазматической мембраны. Антенные пигменты в хлоросомах отделены от цитоплазмы оболочкой толщиной 2–3 нм, состоящей из монослоя моногалактозил диглицерида, а также нескольких белков, функциональная роль которых еще до конца не изучена.

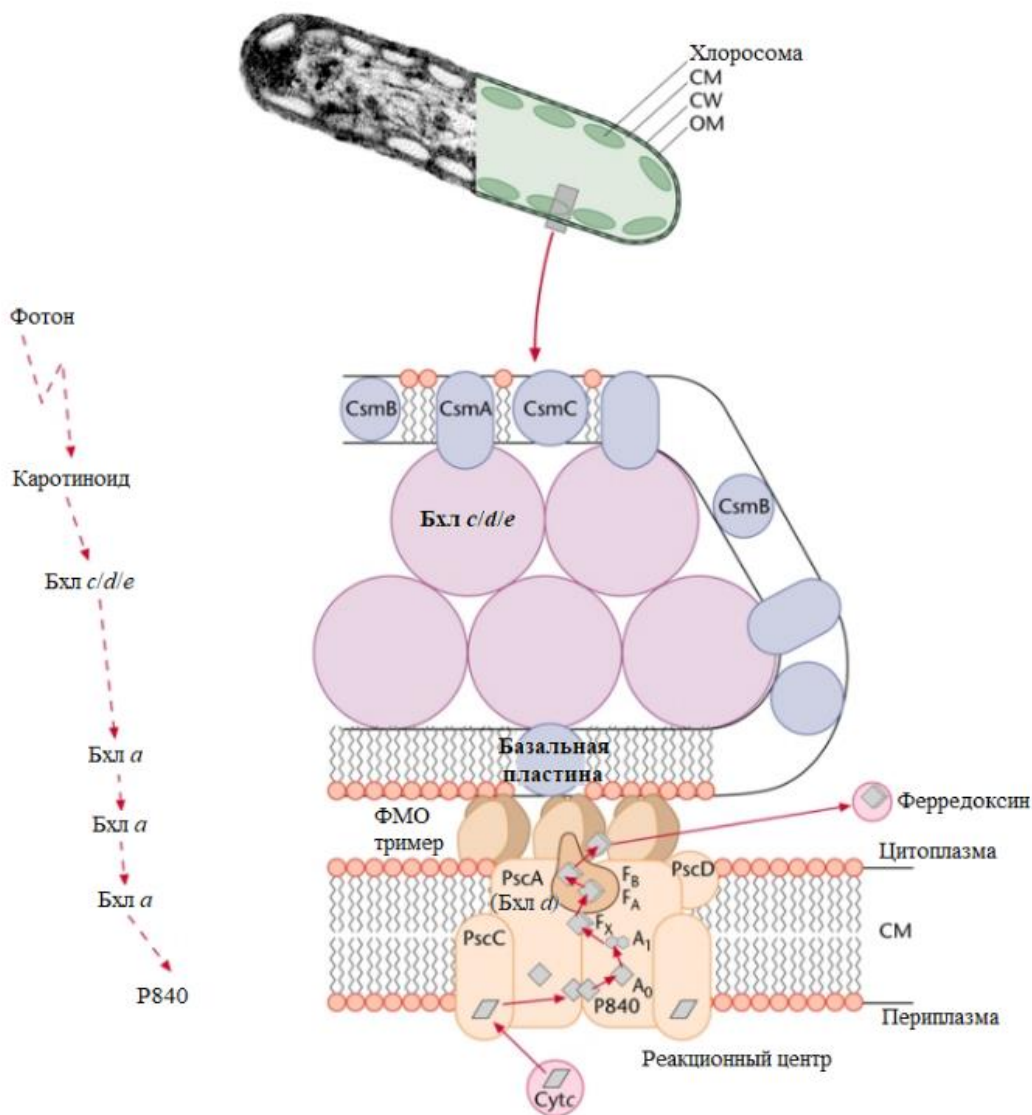


Рис. 1. Строение фотосинтетического аппарата ЗСБ. [2] СМ – цитоплазматическая мембрана; СW – клеточная стенка; ОМ – наружная мембрана; CytC – белок цитохром с; PscA, PscC, PscD – белковые субъединицы реакционного центра фотосинтетического аппарата ЗСБ.



Уникальный для зеленых серных бактерий водорастворимый белок Фенна-Мэтьюза-Ольсона (ФМО) расположен между хлоросомой и фотосинтетическим реакционным центром. Предполагается, что белок ФМО передает энергию возбуждения от хлоросомы к реакционным центрам. Белок ФМО состоит из трех субъединиц, каждая из которых содержит семь молекул Бхл *a*. Хлоросомы содержат агрегированные бактериохлорофиллы *c*, *d* и *e* (образующие палочковидную структуру) и отделены от цитоплазмы монослоем моногалактозил диглицерида. Считается, что последний содержит различные хлоросомные белки (CsmA, CsmB, CsmC). Хлоросомы связаны с реакционным центром фотосинтеза в цитоплазматической мембране через небольшие тримерные белки ФМО. Сплошные стрелки в реакционном центре указывают пути переноса электрона, который инициируется возбуждением первичного донора P840. Пунктирные стрелки обозначают передачу возбуждения от антенны каротиноидов и бактериохлорофиллов *c*, *d* и *e* в сторону P840.

Размер фотосинтетической антенны зеленых серных бактерий значительно превосходит размеры таковой у других фототрофных организмов. Каждая хлоросома содержит десятки тысяч молекул Бхл и энергетически связана с 5–10 реакционными центрами. Таким образом, одна фотосинтетическая единица содержит 1000–2000 молекул Бхл *c*, *d* или *e* и около 100 молекул Бхл *a*, которые подают энергию фотовозбуждения в единственный реакционный центр. Реакционный центр встроен в плазматическую мембрану и получает энергию возбуждения через дополнительные молекулы Бхл *a*. При возбуждении цитохром *c*, содержащийся между цитоплазматической мембраной и клеточной стенкой, окисляется, а растворимый ферредоксин восстанавливается, превращая тем самым энергию возбуждения в химическую энергию разделения заряда.

В присутствии молекулярного кислорода восстановление ферредоксина может привести к образованию супероксида и других активных форм кислорода, оказывающих разрушительное воздействие на клетку ЗСБ. Наблюдалось, что эффективность переноса энергии между Бхл *c*, *d* и *e* и Бхл *a* в хлоросоме падает в 10 раз при увеличении окислительно-восстановительного потенциала, как, например, под действием кислорода. Этот механизм может частично защитить клетки от летальных реакций фотоокисления и, таким образом, повысить шансы на выживание при кратковременном нахождении клетки в среде, содержащей кислород.

## 1.2. Бактериохлорофиллы *d* и *e*, структура и спектры поглощения

Бхл *d* и *e* – принятые названия для пигментов, названных изначально «хлоробий хлорофиллы» в работе [4]. На сегодняшний день известно более девяти химически различных Бхл серии *d* с практически идентичными спектрами поглощения. На Рис. 2 изображен вид химической структуры хлоросомных Бхл *c*, *d* и *e*. Обозначения на рисунке:

для бактериохлорофилла *d*: R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = метил, R<sub>3</sub> = этил, *n*-пропил, изобутил или неопентил, R<sub>4</sub> = метил или этил и R<sub>5</sub> = фарнезил. Для бактериохлорофилла *e*: R<sub>1</sub> = метил, R<sub>2</sub> = формил, R<sub>3</sub> = этил, *n*-пропил или изобутил, R<sub>4</sub> = этил и R<sub>5</sub> = фарнезил. Для бактериохлорофилла *c*: R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = метил, R<sub>3</sub> = этил, *n*-пропил или изобутил, и R<sub>4</sub> = этил или метил и R<sub>5</sub> = фарнезил.

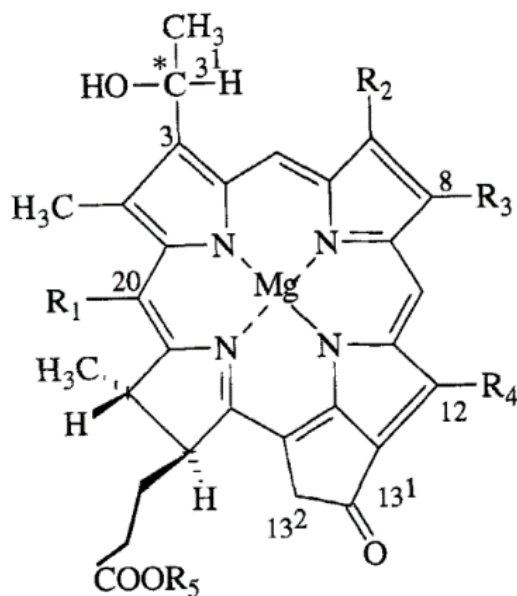


Рис. 2. Структура молекулы Бхл *c*, *d* и *e*. [5], пояснения в тексте.

Бактериохлорофиллы [6] поглощают световые кванты определенных энергий. Как следствие, они проявляют характерные поглощательные свойства как внутри клеток в природной среде, так и в органических растворителях. Бхл *d* и *e* в клетках имеют два пика поглощения: в коротковолновой (440 – 460 нм) и длинноволновой (730 – 750 нм) областях. Коротковолновый пик поглощения в спектре поглощения в воде обычно слабо различим из-за того, что он сильно перекрывается со спектром поглощения каротиноидов, а также из-за высокого влияния рассеяния в коротковолновой области.

Оптические свойства Бхл в пробах воды и в экстрактах различаются. Как видно из Рис. 3, длинноволновой пик поглощения смещается в более коротковолновую область при экстрагировании. Это связано с тем, что внутри хлоросом Бхл находятся в виде агрегатов, состоящих из большого числа молекул Бхл. При экстрагировании органическим растворителем клетки ЗСБ и хлоросомы разрушаются, и в экстракте пигменты находятся в мономерной форме в виде отдельных молекул. Длинноволновые пики поглощения Бхл *d* и *e* перекрываются (пик Бхл *e* немного более коротковолновый) и в спектрах поглощения визуально неразличимы. Примеры спектров поглощения в естественной среде и в ацетон-

метаноловых экстрактах чистых культур ЗСБ, содержащих Бхл *d* и *e*, а также смешанной культуры с теми же пигментами приведены на Рис. 3

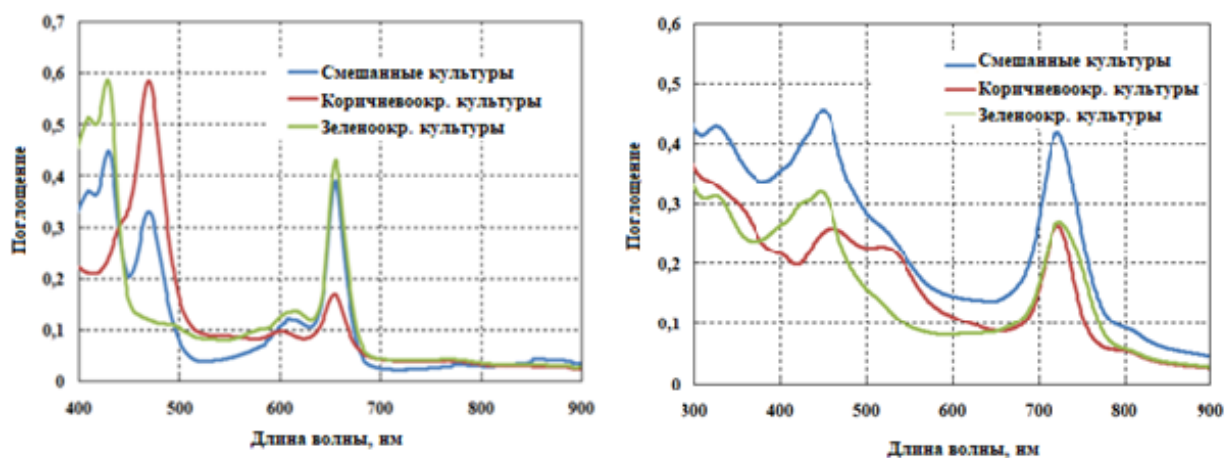


Рис. 3. Спектры поглощения бактериохлорофиллов культур зеленых серных бактерий в ацетон-метаноловых экстрактах (слева) и в клетках (справа). [7]

Положения пиков поглощения хлоросомных Бхл могут различаться для разных штаммов. В работе [6] представлены положения пиков поглощения для нескольких штаммов ЗСБ. Для *Clorobium Triosulfatophilum* (штамм L1), содержащих Бхл *d*, пики поглощения в ацетоновом экстракте: 651, 605, 577, 425, 406 нм [8]. Для *Clorobium vibrioforme* (штамм 6030. DSM-№ 260), содержащих Бхл *d*, пики поглощения в ацетоновом экстракте: 654, 608, 424, 408 нм [9]. Для *Clorobium phaeobacteroides* (штамм 2430), содержащих Бхл *e*, пики поглощения в ацетоновом экстракте: 647, 594, 545, 456, 338 нм [9]. Для *Clorobium phaeobacteroides* (штамм 2631), содержащих Бхл *e*, пики поглощения в ацетоновом экстракте: 646, 589, 550, 458, 338 нм [9]. Для *Clorobium vibrioforme* f. *Triosulfatophilum* (штамм NCIB 8346), содержащие Бхл *c*, пики поглощения в ацетоновом экстракте: 661, 629, 431, 412 нм [8]. Для *Clorobium vibrioforme* f. *Triosulfatophilum* (штамм В), содержащие Бхл *c*, пики поглощения в ацетоновом экстракте: 663, 627, 434 нм [10]. Для некоторых штаммов одного и того же вида ЗСБ количество пиков поглощения различно в одном и том же растворителе. Это может быть связано как с различными условиями культивирования бактерий, так и с использованием различного спектроскопического оборудования.

Бхл могут быть экстрагированы из клеток бактерий с помощью органических растворителей. Для этой цели в более ранних работах [4, 9, 11, 12], связанных с изучением аноксигенных фототрофов, использовались метанол, ацетон и пиридин, а также растворители в комбинации друг с другом, или с диэтиловым эфиром, петролейным эфиром

или тетрахлорметаном (CCl<sub>4</sub>). Также использовались гексан, циклогексан, этиловый эфир и хлороформ (CHCl<sub>3</sub>).

На положение пиков поглощения в экстрактах влияет выбор растворителя для экстрагирования. В работах [12] и [4] представлены различия в оптических свойствах хлоросомных Бхл в различных растворителях. Перечислим пики поглощения Бхл *c* (в скобках указан использованный растворитель): 430, 452, 710, 748 нм (гексан); 432, 674, 706 нм (циклогексан); 430, 662, 704 нм (99% гексан, 1% метанол); 434, 670 нм (CCl<sub>4</sub>); 432, 658 нм (CHCl<sub>3</sub>); 660, 662, 432, 412 нм (этиловый эфир); 662.5, 625, 433, 413 (ацетон); 670, 620, 435, 419 нм (метанол). Пики поглощения Бхл *d*: 426, 442, 728 нм (гексан); 428, 662, 694 нм (циклогексан); 426, 656 нм (99% гексан, 1% метанол); 428, 656, 700 нм (CCl<sub>4</sub>); 426, 658 нм (CHCl<sub>3</sub>); 650, 612, 575, 530, 425, 406 нм (этиловый эфир); 654, 612.5, 577.5, 530, 427, 406 нм (ацетон); 659, 612.5, 427, 411 нм (метанол). Пики поглощения Бхл *e*: 448, 520, 708 нм (гексан); 454, 662, 682 нм (циклогексан); 468, 600, 648 нм (99% гексан, 1% метанол); 460, 660, 700 нм (CCl<sub>4</sub>); 464, 658 нм (CHCl<sub>3</sub>).

Также, как видно в том числе из Рис. 3, что на положение пиков поглощения Бхл влияет то, в насколько агрегированном состоянии находятся пигменты. В работе [12] приведены длинноволновые пики поглощения Бхл *d* в мономерной и агрегированной формах: 656 нм (мономер); 672 нм (димер); 730 нм (12-14 олигомер).

Как показано в работе [13], различные составные части фотосинтетического аппарата ЗСБ имеют различные оптические свойства. Для культуры *Cb. tepidum* положение пика поглощения для олигомеров Бхл *c*: 745 – 755 нм; для ФМО-протеина (содержит Бхл *a*): 810 нм. Для культуры *Cb. vibrioforme* положение пика поглощения для олигомеров Бхл *c* и/или Бхл *d*: 715 – 745 нм; для ФМО-протеина (содержит Бхл *a*): 810 нм. Для культуры *Pd. phaeum* положение пика поглощения для олигомеров Бхл *e*: 710 – 725 нм; для ФМО-протеина (содержит Бхл *a*): 805 нм. Для зеленых серных бактерий пик поглощения базальной пластины фотосинтетического аппарата ЗСБ: ~795 нм; для реакционного центра: ~840 нм.

### **1.3. Методы определения концентрации бактериохлорофиллов, коэффициент экстинкции**

В соответствии с литературными данными, для определения концентрации фотосинтетических пигментов использовались различные методы и подходы. Иногда важно знать, какие именно пигменты содержатся в отобранных пробах. Для таких целей используются методы хроматографии. Например, применение высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с обращенной фазой было расширено на идентификацию Бхл *a*, *b*, *c*, *d* и *e* в работе [14]. В работе использовались чистые культуры

бактерий. Метод был использован для идентификации Бхл анаэробных бактерий, обитающих в олиготрофно-мезотрофных озерах в северном Висконсине. В обоих озерах (Little Rock Lake и Palette Lake) ранее не обнаруженные слои фототрофных бактерий были идентифицированы на основе их пигментных составов. Были использованы хроматограммы, определенные при 440 нм (Рис.4) для облегчения сравнения с предыдущими исследованиями [15]. С экстрактами, содержащими Бхл *c*, *d* или *e*, на хроматограммах видны множественные пики, возможно, из-за незначительных различий в алломеризации (совокупность процессов окисления пигмента под действием кислорода воздуха) или эпимеризации (различия по пространственному расположению частей молекулы относительно несимметричного атома углерода). Подобные множественные пики, наблюдаемые для Бхл *e*, идентифицированы как этильные, бутильные и пропиловые гомологи с помощью масс-спектрометрии. Подобные гомологи могут присутствовать и в образцах, содержащих Бхл *c* и *d*. Пять отчетливых пиков элюирования наблюдались с Бхл *d*; четыре наблюдались с Бхл *c* и *e*. Хотя время удерживания может широко варьироваться для разных хроматографических пиков от данного Бхл, спектр поглощения каждого хроматографического пика является надежной диагностикой для конкретного пигмента.

В результате были идентифицированы различные гомологи хлоросомных Бхл, а также Бхл *a*. Разные гомологи Бхл *c*, *d* и *e* имели практически идентичные спектры поглощения и одинаковое расположение длинноволнового пика поглощения: 658.472 нм для четырех (пики А, В, С, N на Рис. 4) гомологов Бхл *e* (культура *Chlorobium phaeobacteroides*); 658.427 нм для пяти (пики D, F, H, J, K на Рис. 4) гомологов Бхл *d* (*Chlorobium thiosulfntiophilum*, штамм 8327); 670.430 нм для четырех (пики Е, G, М, Р на Рис. 4) гомологов Бхл *c* (термофильный штамм *Chlorobium NZC*).

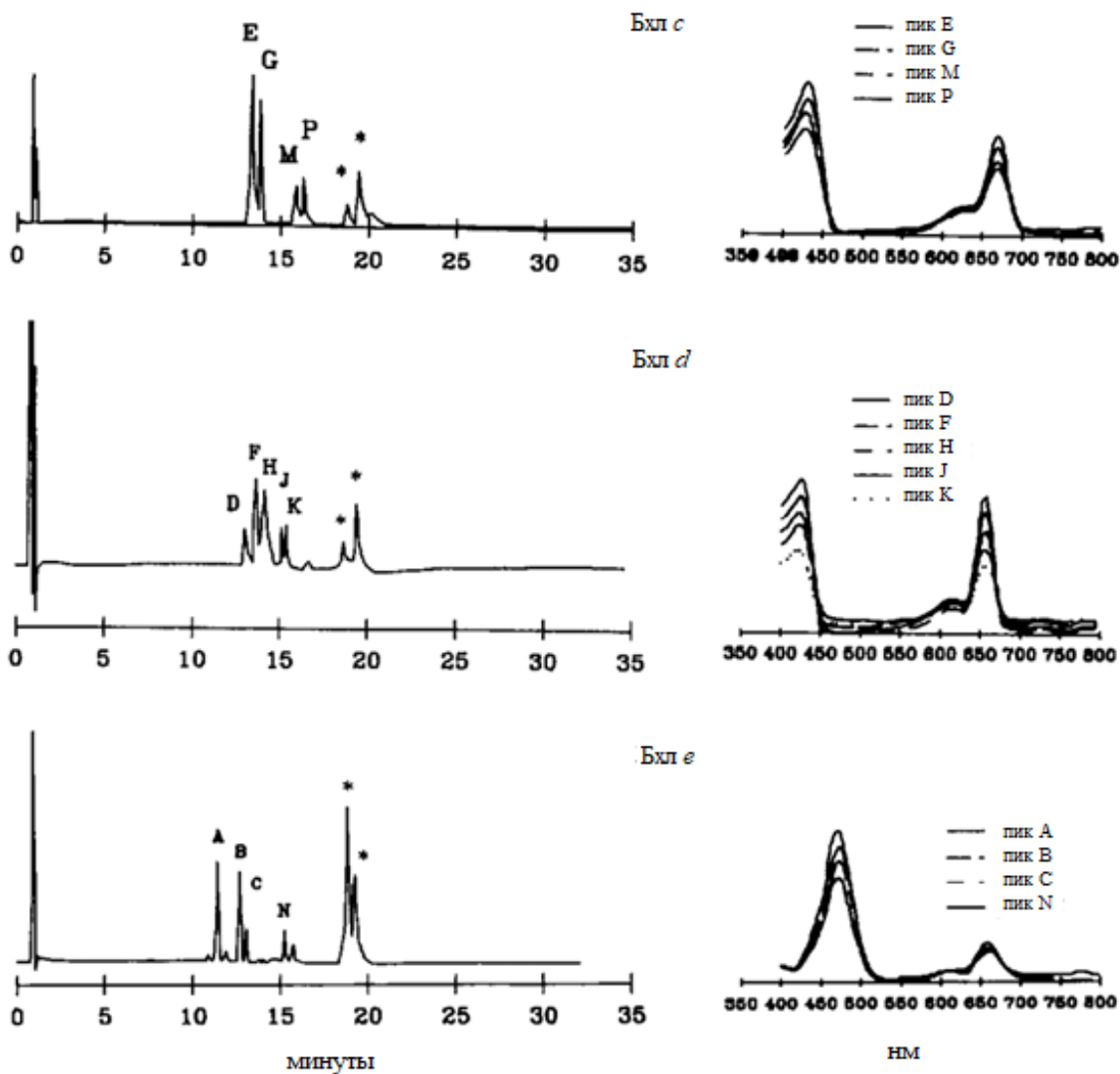


Рис. 4. Хроматограммы и спектры поглощения (действующие условия ВЭЖХ: 80% метанол, 20% ацетон) для бактериохлорофиллов, выделенных из чистой культуры с экстракцией с 90% ацетона и 10% этанола и разделением ВЭЖХ с обращенной фазой. Бактериальные каротиноиды отмечены звездочками. [14]

Помимо упомянутых выше культур и штаммов ЗСБ, были также изучены культура пурпурных несерных бактерий *Rhodobucfer sphaeroides* (пик поглощения Бхл *a* на 770.365 нм; пик *О* на Рис. 4) и штамм DSM 133 пурпурных несерных бактерий *Rhodapseudomonas viridis* (пик поглощения Бхл *b* на 683.446 нм; пик *I* на Рис. 4). Хроматографический пик *L*, по-видимому, является Бхл, производным от культуры *R. Viridis*. Не известно, присутствует ли он в культуре или штамм не был чистым.

Для разделения хлоросомных Бхл в клетках в суспензии или в природной воде также может использоваться флуоресцентный анализ пигментов. В то время как флуоресцентные методы широко применяются в настоящее время для обнаружения и характеристики

сообществ фитопланктона, методы обнаружения, распознавания и дифференциации аноксигенных фототрофов, таких как ЗСБ, считаются сложными. В работе [7] описывается новая методика определения количественного соотношения двух форм зеленых серных бактерий непосредственно в воде с использованием флуоресценции бактериохлорофилла без выделения пигмента. В ходе работы были получены спектры испускания и возбуждения флуоресценции Бхл, а также спектры поглощения Бхл в клетках и в экстрактах (Рис. 3). Образцы воды с ЗСБ продемонстрировали два отчетливых пика флуоресценции Бхл с максимумом на длине волны  $\lambda = 740-770$  нм, что соответствует эмиссии Бхл *d* или *e* и на  $\lambda = 820$  нм, что соответствует эмиссии Бхл *a*. Положение максимума эмиссии первого пика бактериохлорофилла постепенно смещается с изменением соотношения двух бактериальных форм с различной пигментацией. На основании полученных данных авторы предлагают следующий алгоритм расчета относительного соотношения зеленоокрашенных и коричневоокрашенных ЗСБ в воде. Чтобы разделить вклады различных групп фототрофных бактерий, необходимо разделить полосу флуоресценции в 740-770 нм на две составляющие и рассчитать отношение интегральных интенсивностей для различных бактериохлорофиллов. Это отношение интегральных интенсивностей будет равно отношению между концентрациями Бхл *d* и *e* в образце.

Обсудим методы определения концентрации Бхл. Одной из основных работ, посвященных этому вопросу, является лимнологическое исследование за авторством Оверманна и Тилзера 1989 года [1]. Авторами были получены эмпирические формулы, позволяющие рассчитать в одних и тех же пробах воды концентрацию Хл *a* водорослей и цианобактерий и суммарную концентрацию Бхл *d* и *e* фототрофных бактерий.

$$C(\text{Бхл } (d+e)) = (1.315 \cdot D_{651} - 0.643 \cdot D_{663} + 0.005) \cdot v \cdot 10^6 / (V \cdot d \cdot \epsilon_{\text{Бхл } d}) \quad (1)$$

$$C(\text{Хл } a) = (1.315 \cdot D_{663} - 0.643 \cdot D_{651} + 0.005) \cdot v \cdot 10^6 / (V \cdot d \cdot \epsilon_{\text{Хл } a}) \quad (2)$$

где:

$C(\text{Бхл } (d+e))$ : суммарная концентрация бактериохлорофиллов *d* и *e* ( $\text{мг} \cdot \text{м}^{-3}$ )

$C(\text{Хл } a)$ : концентрация хлорофилла *a* ( $\text{мг} \cdot \text{м}^{-3}$ )

$D_{651}, D_{663}$ : оптическая плотность ацетонового экстракта на длинах волн 651 и 663 нм, откорректированные на рассеяние (после вычитания  $D_{850}$ )

$v$ : объем ацетонового экстракта (мл)

$V$ : объем отфильтрованной воды (мл)

$d$ : длина оптического пути кюветы (см)

$\epsilon_{\text{Бхл } d}$ : коэффициент экстинкции Бхл *d* =  $98.0 \text{ мл} \cdot (\text{мг} \cdot \text{см})^{-1}$  [4]

$\epsilon_{\text{Хл } a}$ : коэффициент экстинкции Хл *a* =  $84.0 \text{ мл} \cdot (\text{мг} \cdot \text{см})^{-1}$  [16]

Метод Оверманна-Тилзера до сих пор применяется в спектроскопическом анализе фотосинтезирующих организмов. Однако эти формулы являются не единственными эмпирическими формулами для определения концентрации фотосинтетических пигментов бактерий. В других исследованиях они подвергались модификациям. В Таблице 1 приведены предыдущие и последующие [17, 18, 19, 20] формулы, по которым рассчитываются концентрации Бхл  $d$  и  $e$ , а также Хл  $a$  для модификаций формулы Оверманна-Тилзера.

В работе [19] формула Оверманна-Тилзера была модифицирована для случая использования ацетон-метаноловых экстрактов. В оригинальную формулу Оверманна-Тилзера входят значения оптической плотности на 651 и 663 нм, которые являются оптическими плотностями в пиках поглощения в ацетоновых экстрактах Бхл  $d$  или  $e$  и Хл  $a$  соответственно. В эту формулу для случая ацетон-метаноловых экстрактов вошли оптические плотности на 655 и 667 нм. Такие отличия связаны с тем, что экстракты Бхл и Хл имеют различные оптические свойства при использовании различных растворителей. Пики поглощения Бхл  $d$  и  $e$  и Хл  $a$  более длинноволновые в ацетон-метаноловых экстрактах, чем пики поглощения тех же пигментов в ацетоновых экстрактах.

В данной работе для определения суммарной концентрации Бхл  $d$  и  $e$  используется модифицированная формула из работы [21]:

$$C(\text{Бхл } (d+e)) = (1.315 \cdot D_{655} - 0.643 \cdot D_{667}) \cdot v \cdot 10^6 / (V \cdot d \cdot \epsilon_{\text{Бхл } d}) \quad (3)$$

где:

- $D_{655}, D_{667}$ : оптическая плотность ацетон-метанолового (7 : 2) экстракта на длинах волн 655 и 667 нм, откорректированные на рассеяние (минус  $E_{850}$ )
- $v$ : объем ацетон-метанолового экстракта (мл)
- $V$ : объем отфильтрованной воды (мл)
- $d$ : длина оптического пути (см)
- $\epsilon_{\text{Бхл } d}$ : коэффициент экстинкции Бхл  $d = 98.0 \text{ мл} \cdot (\text{мг} \cdot \text{см})^{-1}$  [4]

Константа 0,005, связанная с калибровкой базовой линии прибора, была представлена в исходной формуле Оверманна-Тилзера и в модифицированной версии этой формулы в работе Луниной. Формула была преобразована [21], чтобы соответствовать смещению нулевой базовой линии.



Таблица 1. Формулы для спектрофотометрического определения фотосинтетических пигментов. ( $v$ : объем ацетона в мл, добавленный для экстракции,  $V$ : общий объем воды в л, отфильтрованный для экстракции пигмента). Здесь  $DO$  – оптические плотности с вычтенным рассеянием.

Источник	Пигмент и растворитель	Формула
[17]	Бхл $d$ (ацетон)	$C \text{ [мкг/л]} = 10.2 \cdot DO_{654} \cdot ((DO_{663}/DO_{654} \cdot (-0.99) + 1.55)) \cdot (v \text{ [мл]}/V \text{ [л]})$
[1]	Хл $a$ (этанол)	$C \text{ [мкг/л]} = (1.315 \cdot DO_{663} - 0.643 \cdot DO_{651} + 0.005) \cdot v \text{ [мл]} \cdot 10^3 / (V \text{ [л]} \cdot d \cdot \epsilon_{Chla})$
	Бхл $d + e$ (ацетон)	$C \text{ [мкг/л]} = (1.315 \cdot DO_{651} - 0.643 \cdot DO_{663} + 0.005) \cdot v \text{ [мл]} \cdot 10^3 / (V \text{ [л]} \cdot d \cdot \epsilon_{Bchld})$
[18]	Бхл $d$ (ацетон)	$C \text{ [мкг/л]} = 10.2 \cdot DO_{654} \cdot (v \text{ [мл]}/V \text{ [л]})$
	Бхл $e$ (ацетон)	$C \text{ [мкг/л]} = 10.2 \cdot DO_{652} \cdot (v \text{ [мл]}/V \text{ [л]})$
[19]	Хл $a$ (цетон и метанол, 7:2)	$C \text{ [мкг/м}^3\text{]} = (1.315 \cdot DO_{667} - 0.643 \cdot DO_{655} + 0.005) \cdot v \text{ [мл]} \cdot 10^6 / (V \text{ [мл]} \cdot d \cdot \epsilon_{Chla})$
	Бхл $d + e$ (цетон и метанол, 7:2)	$C \text{ [мкг/м}^3\text{]} = (1.315 \cdot DO_{655} - 0.643 \cdot DO_{667} + 0.005) \cdot v \text{ [мл]} \cdot 10^6 / (V \text{ [мл]} \cdot d \cdot \epsilon_{Bchld})$

Стоит пояснить, откуда в принципе берутся такие зависимости. Проанализируем [20] порядок расчета. В соответствии с законом Бугера-Ламберта-Бера, поглощение  $A$  раствора при прохождении через него монохроматического света пропорционально концентрации  $C$  поглощающего вещества в растворе и длине оптического пути  $L$ :

$$A = \epsilon \cdot C \cdot L, \quad (4)$$

где  $\epsilon$  обозначает коэффициент поглощения, постоянную, которая характеризует поглощение вещества на данной длине волны. Выражается в  $\text{л} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  (удельный коэффициент поглощения). Он соответствует части света, поглощенной 1 г вещества, растворенного в 1 л растворителя, при прохождении через кювету толщиной 1 см. Если концентрация раствора выражается в  $\text{моль} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ , а длина пути в см, то коэффициент  $\epsilon$  обозначается как  $\epsilon^{\text{мол}}$  и называется молярным коэффициентом поглощения. Эти два

коэффициента связаны формулой:

$$\varepsilon [\text{л} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}] \cdot M [\text{г} \cdot \text{моль}^{-1}] = \varepsilon^{\text{мол}} [\text{л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}] \quad (5)$$

где  $M$  – молекулярный вес пигмента. Как следует из уравнения (4),

$$C = A / (\varepsilon \cdot L). \quad (6)$$

Для расчета концентрации в образце,  $C$  следует умножить на объем растворителя  $v$ :

$$C (\text{в образце}) = (A \cdot v) / (\varepsilon \cdot L). \quad (7)$$

Рассеяние при 750 нм (Хл) или 850 нм (Бхл) ( $A_{\text{фон}}$ ) вычитается из измеренного поглощения ( $A_{\text{изм}}$ ). Таким образом, окончательная формула для концентрации, измеряемой в мкг на образец, выглядит как:

$$C [\text{мкг/образец}] = ((A_{\text{изм}} - A_{\text{фон}}) \cdot v \cdot [\text{мл}] \cdot 1000 / \varepsilon [\text{л} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}] \cdot L [\text{см}])) \quad (8)$$

Коэффициент 1000 используется для пересчета с частей миллиграммов до десятков микрограммов. В формуле Оверманна-Тилзера концентрация выражается в  $\text{мг}/\text{м}^3$ , и поэтому в формуле для пересчета в нужных единицах присутствует безразмерный множитель  $10^6$ . Формула может использоваться при отсутствии значительных количеств продуктов разложения, а также при наличии в образце единственного пигмента.

Удельный коэффициент поглощения или экстинкция  $\varepsilon$  для одного и того же вещества, как и положение пиков поглощения, различается в экстрактах с различными растворителями. В Таблице 2 приведены значения экстинкции различных Хл и Бхл с указанием растворителя. Эта таблица составлена по данным работы [20], но дополнена недостающими значениями молярных и удельных коэффициентов экстинкции путем пересчета через молекулярные веса пигментов.

Таблица 2. Коэффициенты экстинкции хлорофиллов и бактериохлорофиллов. В скобках после названий пигментов стоят соответствующие этим пигментам молекулярные веса в г/моль.

Пигмент	Растворитель	Длина волны максимума, нм	$\epsilon$ , л·г <sup>-1</sup> ·см <sup>-1</sup>	$\epsilon^{\text{мол}}$ , л·моль <sup>-1</sup> ·см <sup>-1</sup>	Ссылка
Хл <i>a</i> (893.5)	Этанол	665	83.4	74.5	[22]
	Метанол	665	79.95	71.43	[23]
	Ацетон (80%)	663	85.95	76.79	[23]
Хл <i>b</i> (907.5)	Метанол	652	42.48	38.55	[23]
	Ацетон (80%)	646	51.84	47.04	[23]
Бхл <i>a</i> (911.5)	Метанол	771	60	54.8	[24]
	Ацетон (80%)	770	76	69.3	[24]
	Этанол	774	65.4	59.6	[24]
	Ацетон-метанол (7:2)	771	71.6	65.3	[6]
	Диэтиловый эфир	773	105	95.7	[25]
Бхл <i>b</i>	Диэтиловый эфир	791		106	[6]
Бхл <i>c</i> (895.5)	Ацетон-метанол (7:2)	666	86	74	[11]
	Метанол	667	86.0	69.7	[26]
	Ацетон (80%)	662	92.6	82.9	[4]
Бхл <i>d</i>	Метанол	657	82.3	66	[26]
	Ацетон (80%)	654	98		[4]
Бхл <i>e</i> (834.5)	Ацетон (80%)	649	58.6	48.9	[27]
	Ацетон-метанол (7:2)	651	49.6	41.4	[27]
	Метанол	660	42.5	35.5	[27]
	Этанол	654	49	41	[27]
Бхл <i>g</i> (819.5)	Метанол	762	92.7	76	[28]

В работе [27] для определения коэффициента экстинкции Бхл *e* высушенные пленки чистого пигмента взвешивались на аналитических весах HR60. Затем пленки растворяли в ацетоне и других растворителях и делали несколько разведений. Таким образом, для каждого из разведений были известны масса растворенного пигмента и объем растворителя, а значит и концентрация Бхл *e*. Путем сравнения концентраций Бхл *e* для различных разведений с оптическими плотностями в коротковолновом и длинноволновом пиках в

спектрах поглощения этих разведений, были получены значения коэффициентов экстинкции для Бхл  $e$  при использовании различных растворителей.

#### **1.4. Применение формул для расчета концентраций бактериохлорофиллов в пробах природной воды**

Описанные выше спектроскопические формулы для расчета концентрации Бхл используются в нескольких лимнологических исследованиях. В работе [29] представлено вертикальное распределение фракций фосфора в трех гуминовых озерах, расположенных в Дравенском национальном парке в Польше. При этом концентрации минеральных форм фосфора (фосфатов и полифосфатов) были самыми низкими во время максимального развития фитопланктона, особенно бактериопланктона, вблизи дна озера с невысокой концентрацией гуминовых веществ. В водной среде большая часть фосфора представлена в виде частиц органических форм в живом и мертвом материале. Мелкие фракции обнаруживаются в виде растворимых органических или неорганических форм. Концентрации Бхл  $d$  и  $e$  определялись по формуле Оверманна-Тилзера с целью установления закономерности между содержанием фосфатов и содержанием ЗСБ в пробах озерной воды.

В работе [30] измерялись вертикальные распределения бактерий и водорослей в сильно стратифицированном озере в течение 24-часовых периодов летом. Наибольшая плотность бактерий и водорослей, а также биомассы были зафиксированы в нижнем бескислородном слое воды. Бактериальная биомасса состояла в основном из фотосинтезирующих зеленых серных бактерий, которые обитали при очень низкой освещенности. Количество и биомасса бактерий, как в эпилимнионе (теплый и богатый кислородом верхний слой воды в водоеме), так и в гиполимнионе (характерный для глубоких озер холодный, бедный кислородом слой воды, лежащий ниже зоны быстрого перепада температуры), были в основном выше ночью, чем днем, что указывает на возможную асинхронность между продукцией и гибелью бактерий. Для определения концентрации Бхл  $d$  использовалась формула Такаяши [18], в которую входит значение оптической плотности на 654 нм в спектре поглощения ацетонового экстракта. Примеры полученных профилей распределения ЗСБ по глубине приведены на Рис. 5. Помимо этих профилей, в работе были получены профили распределения по глубине для водорослей и зоопланктона. Сама работа была нацелена на изучение влияния ракообразного *Daphnia longispina* на экосистему водоема.

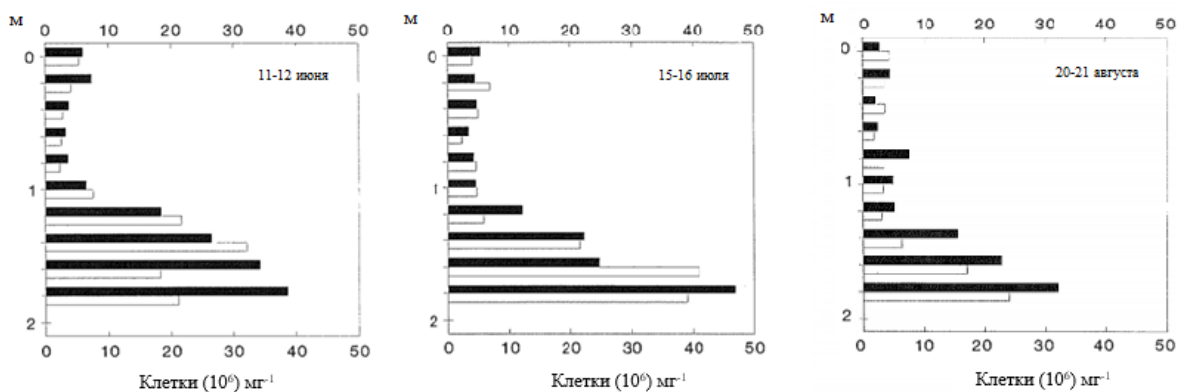


Рис. 5. Дневные (белые полоски) и ночные (черные полоски) распределения числа зеленых серных бактерий в течение периодов исследования [30].

Автор работы [30] приходит к выводу, что помимо таких условий окружающей среды, как освещенность, присутствие кислорода и наличие насыщенного сероводородом нижнего слоя воды, на популяцию ЗСБ могут влиять такие факторы, как биологическая конкуренция и отношения хищник-жертва. Было показано, что *Daphnia longispina* может поглощать живущих в бескислородном слое фототрофных бактерий. Таким образом, был сделан вывод, что суточные колебания числа ЗСБ в изучаемом озере вызваны асинхронностью между продукцией и гибелью бактерий.

В работе [31] изучалась микробная популяция в оз. Трехцветном, меромиктическом водоеме, отделяющемся от акватории Белого моря. Сильная стратифицированность озера, чрезвычайно плотная микробная популяция, высокая скорость фотосинтеза и влияние бактериофагов на популяцию ЗСБ делают экосистему озера Трехцветного ценной моделью для изучения процессов регуляции и эволюции в природных микробных системах высокой плотности. Для получения профилей распределения по глубине Бхл *d*, содержащегося в бактериях *Chlorobium phaeovibrioides*, в работе была использована формула Оверманна-Тилзера.

В работе [32] изучалась продукция фитопланктона в шести слабо минерализованных карстовых озерах Владимирской области. Среди прочих параметров в исследовании измерялось распределение концентрации фотосинтезирующих микроорганизмов по глубине. Концентрация Бхл *d* и Хл *a* определялись по формулам Оверманна-Тилзера с целью установления связи между скоростью фотосинтеза и различными химическими параметрами водоема. Зависимость скорости фотосинтеза от общего азота оказалась выше, чем от общего фосфора. Также обнаружилась корреляция между скоростью фотосинтеза и биохимическим спросом на кислород.

## 2. Объекты и методы исследования

### 2.1. Объекты изучения

При разработке метода в качестве образцов выбраны пробы воды, отобранные в марте 2018 г. с различной глубины из трех меромиктических водоемов: Лагуны на Зеленом мысе, оз. Большие Хрусломены и оз. Трехцветного, содержащие зеленоокрашенные и коричневоокрашенные ЗСБ. Изучаемые водоемы расположены на побережье Белого моря и находятся на разной степени изоляции от него. Также при разработке метода были выбраны зеленоокрашенные и коричневоокрашенные чистые культуры ЗСБ, выращенные в лаборатории Института микробиологии имени С.Н. Виноградского РАН сотрудником Института Ольгой Николаевной Луниной. Для апробации метода использовались пробы из перечисленных выше водоемов, а также оз. Елового (побережье Белого моря) и из оз. Могильного (о-в Кильдин в Баренцевом море), отобранные в разные сезоны 2018-2019 гг. Для эксперимента с расчетом коэффициентов экстинкции  $B_{\lambda}$   $d$  и  $e$  для разных растворителей были выбраны четыре чистые культуры ЗСБ (две коричневоокрашенные и две зеленоокрашенные), выращенные в лаборатории Института микробиологии имени С.Н. Виноградского РАН.

Пробы воды отбирали погружаемым насосом и многошприцевым пробоотборником. Разрешение по глубине в случае многошприцевого пробоотборника составляло 25 мм при точности позиционирования иглы шприца 2 мм.

### 2.2. Спектральная аппаратура

Спектры оптической плотности проб измерялись при помощи спектрофотометров фирмы Solar PB2201 и PV 1251. Погрешности приборов приведены в Таблице 3.

Таблица 3. Погрешности используемых приборов

Спектрофотометр Solar PB 2201	Точность установки длины волны	не более $\pm 0,5$ нм
	Ошибка фотометрирования	менее 1%
Спектрофотометр Solar PV 1251	Точность установки длины волны	$\pm 1$ нм
	Ошибка фотометрирования	1%
Кварцевая кювета	Погрешность длины оптического пути	не более $\pm 0,01$ мм

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. Для измерения спектров поглощения использовались стандартные кварцевые кюветы с длиной оптического пути 10 мм или 30 мм. Погрешности длины оптического пути кювет приведены в Таблице 3.

### 2.3. Приготовление экстрактов

Для определения концентраций Бхл с помощью спектрометрических формул из отобранных проб воды с ЗСБ были приготовлены экстракты. В качестве растворителя была выбрана смесь ацетона и метанола в пропорции 7 к 2. Принцип приготовления экстрактов таков: в пробирке объемом 5 мл смешивали 1 мл изучаемой пробы и 4 мл растворителя. Часть проб воды была предварительно отфильтрована с использованием мембранных фильтров. В этом случае весь фильтр или его часть помещались в пробирку и заливались 5 мл растворителя. Полученные смеси выдерживались не менее суток для полного экстрагирования пигментов, при этом они помещались в холодильник для предотвращения разрушения Бхл.

### 2.4. Спектрометрические формулы и расчет погрешностей

Для определения концентрации хлоросомных Бхл  $d$  и  $e$  в экстрактах часто используется эмпирическая формула Оверманна-Тилзера или ее модификации [1, 19, 20]:

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

Где

$D_{655}, D_{667}$ : оптическая плотность ацетон-метанолового (7:2) экстракта на длинах волн 655 и 667 нм, откорректированные на рассеяние (после вычитания  $D_{850}$ )

$v$ : объем ацетон-метанолового экстракта (мл)

$V$ : объем отфильтрованной воды (мл)

$d$ : длина оптического пути кюветы (см)

$\epsilon_{\text{Бхл } d}$ : коэффициент экстинкции Бхл  $d = 98.0 \text{ мл} \cdot (\text{мг} \cdot \text{см})^{-1}$  [4]

Однако формула Оверманна-Тилзера имеет ряд недостатков. Коэффициенты 1.315 и 0.643 эмпирически получены для ацетоновых экстрактов, а не для ацетон-метаноловых, использованных в данной работе для более полного экстрагирования пигментов. Формула Оверманна-Тилзера для определения суммарной концентрации Бхл  $d$  и  $e$  была получена одновременно с формулой для определения концентрации Хл  $a$ , и в обе эти формулы входят оптические плотности на 655 нм (оптическая плотность в длинноволновом пике поглощения Бхл  $d$  и  $e$ ) и на 667 нм (оптическая плотность в длинноволновом пике поглощения Хл  $a$ ). Второе слагаемое ( $- 0.643 \cdot D_{667}$ ) может вносить существенный вклад в полученные значения концентрации Бхл  $d$  и  $e$ , при том, что концентрация Хл  $a$  на таких глубинах, на которых обитают ЗСБ, ничтожно мала. К тому же коэффициент экстинкции  $\epsilon_{\text{Бхл } d}$  получен для ацетоновых экстрактов, а не для ацетон-метаноловых.

Поэтому мы считаем, что для определения концентраций Бхл  $d$  и Бхл  $e$  наиболее целесообразно использовать следующие формулы, полученные из закона Бугера-Ламберта-Бера ослабления света при прохождении через слой вещества и определения оптической плотности:

$$C(\text{Бхл } d) = \frac{D_{655}}{\varepsilon_{\text{Бхл } d} \cdot d} \cdot \frac{v}{V} \cdot \frac{1}{\theta} \cdot 10^6$$

$$C(\text{Бхл } e) = \frac{D_{655}}{\varepsilon_{\text{Бхл } e} \cdot d} \cdot \frac{v}{V} \cdot \frac{1}{\theta} \cdot 10^6$$

где

$D_{655}$ : оптическая плотность ацетон-метанолового (7:2) экстракта на длине волн 655 нм, откорректированная на рассеяние.

$\varepsilon_{\text{Бхл } d}$ : коэффициент экстинкции Бхл  $d = 98,0 \text{ мл} \cdot (\text{мг} \cdot \text{см}^{-3})$  [4]

$\varepsilon_{\text{Бхл } e}$ : коэффициент экстинкции Бхл  $e = 49,6 \text{ мл} \cdot (\text{мг} \cdot \text{см}^{-3})$  [27]

$d$ : длина оптического пути кюветы (см)

$v$ : объем ацетон-метанолового экстракта (мл)

$V$ : объем воды в экстракте (или отфильтрованной воды) (мл)

$\theta$ : доля фильтра, использованного для приготовления экстракта (если не было фильтрации, то  $\theta = 1$ ).

Корректирование на рассеяние осуществляется посредством вычитания из оптической плотности на 655 нм минимума оптической плотности в диапазоне от 700 до 850 нм, отвечающего за рассеяние.

Концентрации, рассчитанные по формуле Оверманна-Тилзера, как и значения экстинкций Бхл  $d$  и  $e$ , мы принимаем без погрешностей, поскольку не представляется возможным узнать, какие погрешности были изначально заложены в эту формулу, в т.ч. погрешности безразмерных коэффициентов. Для формул, полученных из закона Бугера, погрешности определения концентраций можно вычислить, используя формулу для стандартного отклонения систематических ошибок для оценки истинного значения величины [33]:

если  $u = f(x_1, x_2, \dots, x_N)$ , то

$$\sigma_u = \sqrt{\sum_{i=1}^N \left( \frac{\partial f}{\partial x_i} \right)^2 \cdot \sigma_{x_i}^2}$$

Таким образом, для погрешностей определения концентраций получаем:

$$\sigma_{C_{\text{Бхл } d, e}} = \left[ \left( \frac{10^6 v}{\varepsilon_{\text{Бхл } d, e} \cdot d \cdot V \cdot \theta} \right)^2 \cdot \sigma_{D_{655}}^2 + \left( \frac{D_{655} \cdot v \cdot 10^6}{\varepsilon_{\text{Бхл } d, e} \cdot V \cdot d^2 \cdot \theta} \right)^2 \cdot \sigma_d^2 + \left( \frac{D_{655} \cdot 10^6}{\varepsilon_{\text{Бхл } d, e} \cdot V \cdot d \cdot \theta} \right)^2 \cdot \sigma_v^2 + \left( \frac{D_{655} \cdot 10^6}{\varepsilon \cdot d \cdot V^2 \cdot \theta} \right)^2 \cdot \sigma_V^2 \right]^{\frac{1}{2}}$$



Для погрешности объемов считаем существенной только погрешность округления:  
 $\sigma_v = \frac{\omega_v}{\sqrt{12}}$ ,  $\sigma_V = \frac{\omega_V}{\sqrt{12}}$ . Здесь  $\omega_v = 0.001$  мл – цена деления пипеточного дозатора, которым отмерялись объемы растворителя при приготовлении экстрактов ( $\sigma_v = 0.0003$  мл). Также в случаях, когда экстракты готовились из 1 мл воды и 4 мл растворителя, объемы воды также отмерялись с помощью дозатора, и тогда  $\omega_V = 0.001$  мл ( $\sigma_V = 0.0003$  мл). В тех случаях, когда объем воды отфильтровывался с помощью мембранных фильтров, считаем, что  $\omega_V = 1$  мл (цена деления мерной посуды). Тогда  $\sigma_V = 0.2887$  мл. Предельная погрешность длины оптического пути  $\Delta_d$  пред для кварцевых кювет указана в Таблице 3. Тогда  $\sigma_d = \frac{\Delta_d \text{ пред}}{3} \approx 0.0003$  см. Погрешности  $\sigma_{D_{655}}$  рассчитывается, согласно Таблице 3, как 1% от оптической плотности на 655 нм.

Осложнения в определении концентрации какого-то одного пигмента (Бхл *d* или Бхл *e*) возникают, когда в водоеме присутствуют обе разновидности ЗСБ, и зеленоокрашенные, и коричневоокрашенные. При этом длинноволновые пики обоих пигментов перекрываются, и определить концентрацию отдельно для Бхл *d* или Бхл *e* по спектрометрическим формулам, полученных из закона Бугера, не представляется возможным. В этом случае нужно определить соотношение между содержанием Бхл *d* и Бхл *e* либо по коротковолновым пикам поглощения в экстрактах, различных для этих пигментов (440 нм для Бхл *d* и 470 нм для Бхл *e*), либо с использованием флуоресцентного анализа. Это является отдельной спектрометрической задачей, и в рамках данной работы она не рассматривается. Поэтому для озер Большие Хрусломены и Елового оценки соотношения содержания зеленоокрашенных и коричневоокрашенных ЗСБ были взяты из литературы: 73% зеленоокрашенных и 27% коричневоокрашенных для оз. Большие Хрусломены [34]; 60% коричневоокрашенных и 40% зеленоокрашенных для оз. Еловое [7]. Тогда с учетом этих соотношений расчетные формулы для концентраций Бхл *d*, Бхл *e* и для суммарных концентраций примут вид:

$$C(\text{Бхл } d) = \varphi_{\text{Бхл } d} \cdot \frac{D_{655}}{\varepsilon_{\text{Бхл } d} \cdot d} \cdot \frac{v}{V} \cdot \frac{1}{\theta} \cdot 10^6$$

$$C(\text{Бхл } e) = \varphi_{\text{Бхл } e} \cdot \frac{D_{655}}{\varepsilon_{\text{Бхл } e} \cdot d} \cdot \frac{v}{V} \cdot \frac{1}{\theta} \cdot 10^6$$

$$C(\text{Бхл } d + e) = D_{655} \cdot \left( \frac{\varphi_{\text{Бхл } d}}{\varepsilon_{\text{Бхл } d}} + \frac{\varphi_{\text{Бхл } e}}{\varepsilon_{\text{Бхл } e}} \right) \cdot \frac{v}{V \cdot d} \cdot \frac{1}{\theta} \cdot 10^6$$

где  $\varphi_{\text{Бхл } d}$  и  $\varphi_{\text{Бхл } e}$  – доли Бхл *d* и Бхл *e* в смеси для определенного водоема. Сделаем следующую замену:  $\left( \frac{\varphi_{\text{Бхл } d}}{\varepsilon_{\text{Бхл } d}} + \frac{\varphi_{\text{Бхл } e}}{\varepsilon_{\text{Бхл } e}} \right)^{-1} = \varepsilon_{\text{эфф}}$  – эффективный коэффициент экстинкции для

определенного водоема. В этом случае погрешности определения суммарных концентраций Бхл  $d$  и  $e$ :

$$\sigma_{C_{\text{Бхл } d+e}} = \left[ \left( \frac{10^6 \nu}{\varepsilon_{\text{эфф}} \cdot d \cdot V \cdot \theta} \right)^2 \cdot \sigma_{D_{655}}^2 + \left( \frac{D_{655} \cdot \nu \cdot 10^6}{\varepsilon_{\text{эфф}} \cdot V \cdot d^2 \cdot \theta} \right)^2 \cdot \sigma_d^2 + \left( \frac{D_{655} \cdot 10^6}{\varepsilon_{\text{эфф}} \cdot V \cdot d \cdot \theta} \right)^2 \cdot \sigma_\nu^2 + \left( \frac{D_{655} \cdot 10^6}{\varepsilon_{\text{эфф}} \cdot d \cdot V^2 \cdot \theta} \right)^2 \cdot \sigma_V^2 \right]^{\frac{1}{2}}$$

### 3. Экспериментальные результаты и их обсуждение

#### 3.1. Спектры поглощения зеленых серных бактерий в воде

В ходе работы измерены спектры поглощения нескольких серий проб воды с ЗСБ, отобранных с разной глубины из меромиктических водоемов, отделяющихся от акватории Белого моря. Пробы отбирались в различные сезоны 2018-2019 гг. На Рис. 6-7 в качестве примера показаны спектры поглощения проб воды из оз. Трехцветного и оз. Большие Хрусломены.

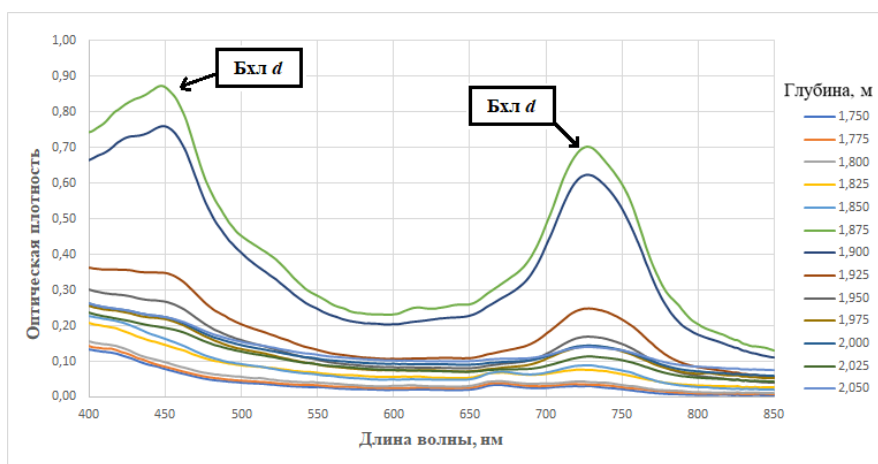


Рис. 6. Спектры поглощения проб воды из оз. Трехцветного с зелеными серными бактериями (отбор проб многошприцевым пробоотборником с различной глубины, сентябрь 2018 г.)

На Рис. 6 изображены спектры поглощения серии проб воды из оз. Трехцветного, в котором содержится зеленоокрашенная разновидность ЗСБ. В спектрах присутствуют два ярко выраженных пика поглощения Бхл *d*: в коротковолновой области на 445-455 нм и в длинноволновой на 725-735 нм. В зеленоокрашенных ЗСБ достаточно низкое содержание каротиноида хлоробактина (почти в 4 раза меньше, чем содержание каротиноида изорениератина у коричневоокрашенных ЗСБ), поэтому в спектрах поглощения в воде пик, отвечающий за поглощение хлоробактина, практически не наблюдается.

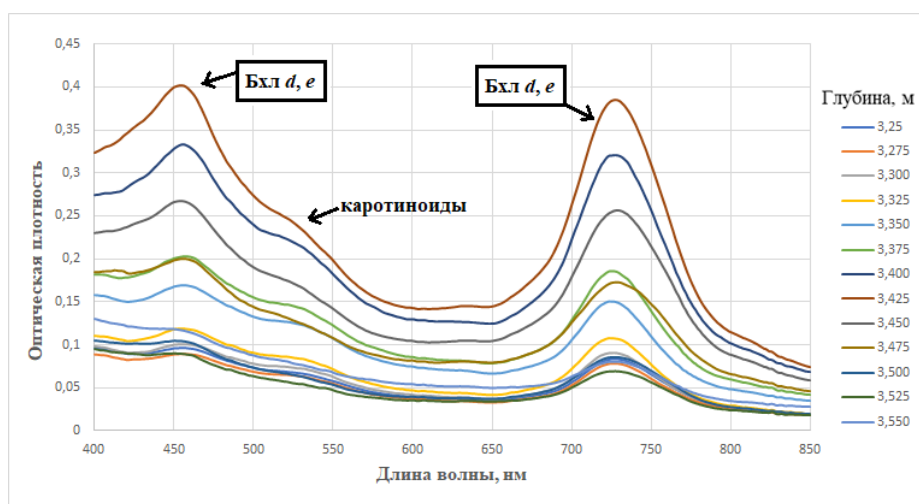


Рис. 7. Спектры поглощения проб воды из оз. Большие Хрусломены с зелеными серными бактериями (отбор проб многошприцевым пробоотборником, сентябрь 2018 г.)

На Рис. 7 изображены спектры поглощения серии проб воды из оз. Большие Хрусломены, в котором содержатся и зеленоокрашенная, и коричневоокрашенная разновидности ЗСБ, однако большая часть (порядка 70 %) ЗСБ относятся к коричневоокрашенным. Для этой серии проб наблюдаются два пика поглощения Бхл *d* и *e* на 443-453 и на 722-732 нм, а также заметен пик, отвечающий за поглощение каротиноидов (в большей степени за поглощение изорениератина) на 520-530 нм. В спектрах поглощения всех серий проб воды пики поглощения каротиноидов плохо различимы из-за наличия рассеяния, которое дает взвешенная в воде органика, а также само вещество клеток ЗСБ. Интенсивность рассеяния увеличивается с уменьшением длины волны, поэтому его вклад в длинноволновый пик поглощения заметно меньше, чем в коротковолновый.

В случае, когда в пробе содержатся и коричневоокрашенная, и зеленоокрашенная формы ЗСБ, полосы поглощения Бхл *d* и *e* перекрываются в длинноволновой области. Таким образом, не представляется возможным однозначно установить содержание того или иного пигмента по спектрам поглощения клеток по длинноволновому пику.

### 3.2. Спектры поглощения бактериохлорофиллов в экстрактах

В ходе работы из отобранных проб были приготовлены ацетон-метаноловые экстракты Бхл и измерены их спектры поглощения в диапазоне от 340 до 850 нм.

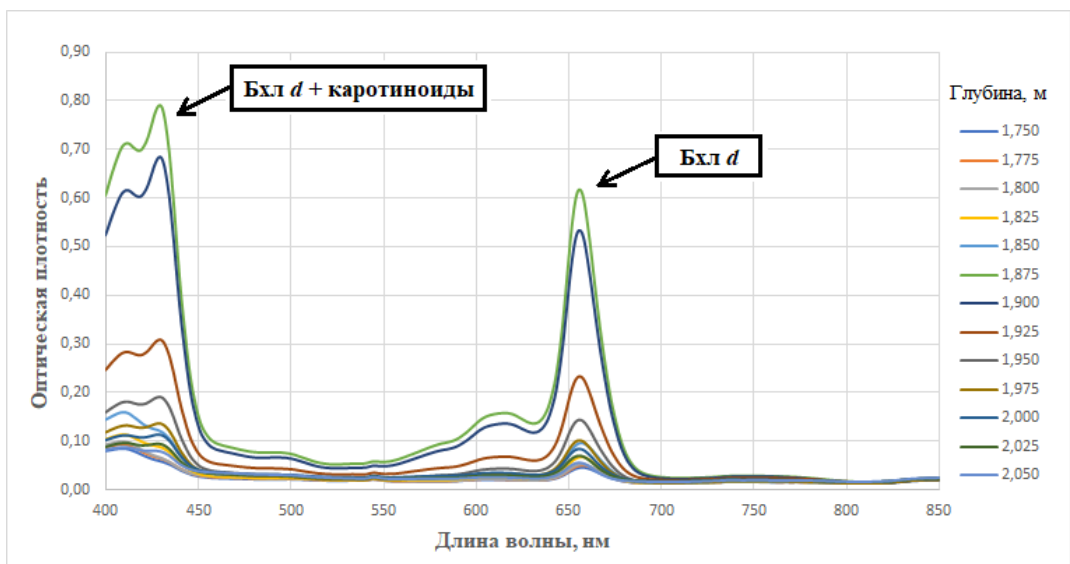


Рис. 8. Спектры поглощения экстрактов проб из оз. Трехцветное с зелеными серными бактериями (отбор проб многошприцевым пробоотборником с различной глубины, сентябрь 2018 г.)

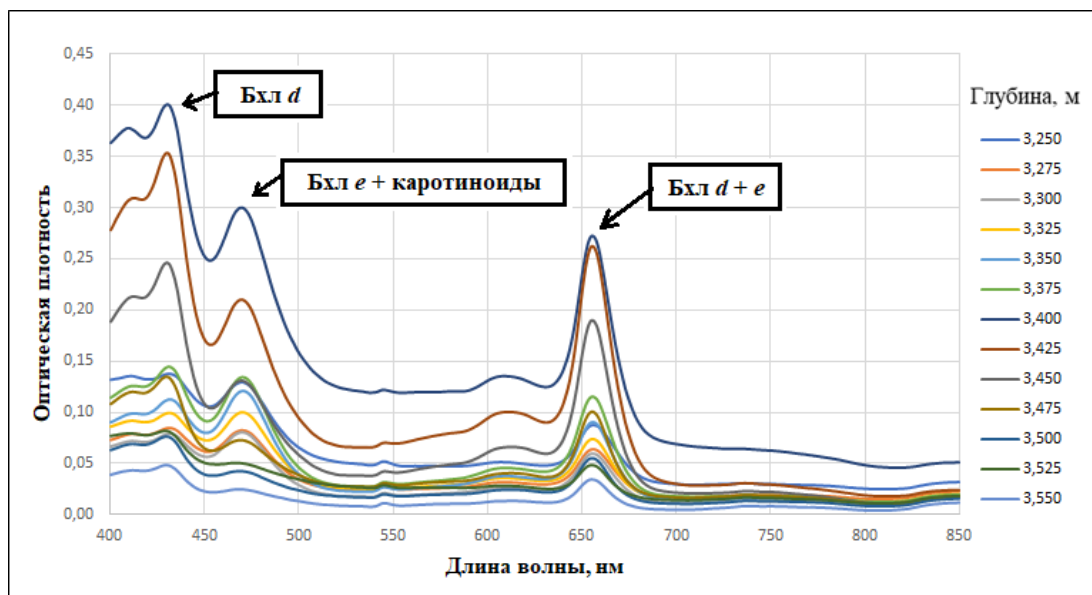


Рис. 9. Спектры поглощения экстрактов проб из оз. Большие Хрусломены с зелеными серными бактериями (отбор проб многошприцевым пробоотборником с различной глубины, сентябрь 2018 г.)

В спектрах поглощения экстрактов Бхл, так же, как и в спектрах поглощения клеток ЗСБ, присутствуют две основные полосы поглощения. Для экстрактов серии проб из оз. Трехцветное, содержащих Бхл *d*, это полосы на 427-432 нм и на 654-658 нм. Для экстрактов серии проб из оз. Большие Хрусломены, содержащих Бхл *d* и *e*, это полосы на 426-431 нм и на 652-656 нм. Также в спектрах поглощения проб из Больших Хрусломен присутствует ярко выраженный пик поглощения каротиноидов на 468-475 нм.

В ацетон-метаноловом экстракте под воздействием растворителя на клетку происходит разрушение структуры хлоросом, содержащих высоко агрегированные пигменты Бхл. Как видно из Рис. 10, при экстрагировании происходит сдвиг максимума поглощения Бхл в более коротковолновую область примерно на 70 нм. Это свидетельствует о переходе Бхл от агрегированной формы к мономерной.

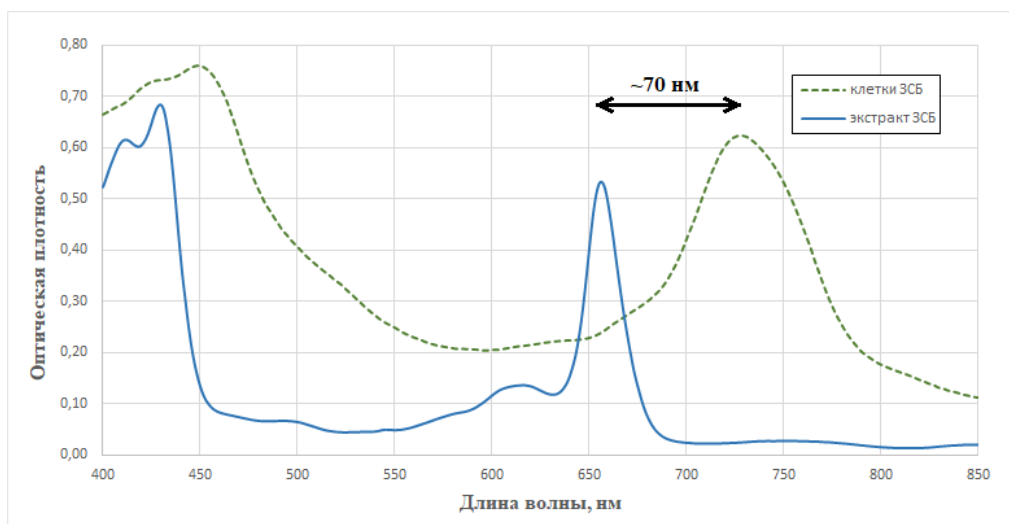


Рис. 10. Сравнение спектров поглощения ацетон-метанолового экстракта и спектра поглощения клеток для одной пробы с зеленоокрашенными ЗСБ из оз. Трехцветного (проба с глубины 1.9 м, отбор проб многошприцевым пробоотборником, сентябрь 2018).

### 3.3. Определение коэффициентов экстинкции бактериохлорофиллов $d$ и $e$ в различных растворителях

Коэффициенты экстинкции Бхл  $d$  известны из литературы только для ацетоновых [4] и метаноловых [26] экстрактов, а коэффициенты экстинкции Бхл  $e$  – для ацетоновых, ацетон-метаноловых (7:2), метаноловых и этаноловых экстрактов [27]. Как видно из Таблицы 2, коэффициенты экстинкции могут сильно отличаться для различных растворителей. Также в ряде случаев, например, при экстрагировании проб, отобранных многошприцевым пробоотборником, экстракты готовятся из 1 мл воды с бактериями и 4 мл растворителя. Таким образом, в качестве растворителя выступает смесь ацетона, метанола и воды (28:8:9), и коэффициенты экстинкции Бхл  $d$  и  $e$  в таком растворителе могут отличаться от таковых в смеси ацетона и метанола (7:2). В связи с этим возникает необходимость получить коэффициент экстинкции Бхл  $d$  для ацетон-метаноловых экстрактов и коэффициенты экстинкции Бхл  $d$  и  $e$  для экстрактов со смесью ацетон-метанол-вода, используемых в данной работе, а также для ацетон-этаноловых экстрактов, которые потенциально можно использовать вместо ацетон-метаноловых.

В эксперименте были использованы две зеленоокрашенные и две коричневоокрашенные культуры ЗСБ. Для каждой культуры были сделаны разведения с 1 мл культуры и 20 мл физраствора (NaCl 0,9%). Были измерены спектры поглощения каждого разведения относительно физраствора (Рис. 12) Также были приготовлены экстракты из 1 мл разведенной культуры и 4 мл смеси ацетона и метанола (7:2). Полученные разведения были отфильтрованы с помощью фильтрационной установки (Рис. 11) с использованием ацетат-целлюлозных мембранных фильтров с диаметром пор 0.45 мкм. Названия культур, даты выделения и объемы отфильтрованной воды приведены в Таблице 4.



Рис. 11. Вид фильтрационной установки.

Таблица 4. Используемые в эксперименте культуры и объемы отфильтрованной воды.

Зеленоокрашенные культуры		
Название	Дата посева	Объем отфильтрованной воды, мл
зел НЕ-12	1.03.19	20
ТЦв зел	19.01.18	19
Коричневоокрашенные культуры		
Название	Дата посева	Объем отфильтрованной воды, мл
кор НЕ-12	1.03.19	20
кор ТЦв	31.10.18	19.5

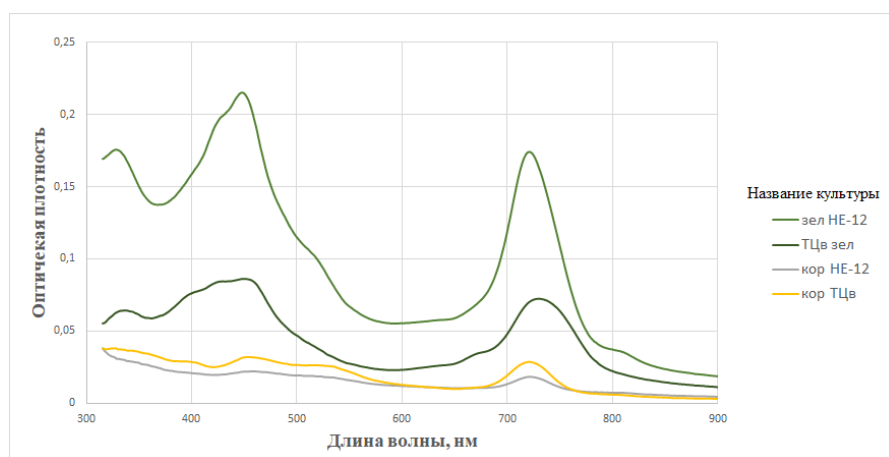


Рис. 12. Спектры поглощения четырех культур зеленых серных бактерий в воде.

Каждый из полученных фильтров был разрезан на четыре части, которые были помещены в четыре различных растворителя: ацетон, смесь ацетона и метанола (7:2), смесь ацетона, метанола и воды (28:8:9) и смесь ацетона и этанола (7:2). Были измерены спектры поглощения каждого из экстрактов относительно ацетона.

Как видно из Рис. 13–14, пики поглощения Бхл *d* и *e* в различных растворителях не одинаковы. Поэтому в расчетные формулы для определения неизвестных коэффициентов экстинкции должны входить оптические плотности в длинноволновых максимумах поглощения  $D_{max}$  в каждом из растворителей. Также необходимо учесть наличие рассеяния в каждом из исследуемых образцов. Для этого из спектров поглощения в воде и в экстрактах вычиталась прямая линия, построенная по двум точкам, выбранным для каждого спектра вручную. Положения длинноволновых максимумов поглощения для разных экстрактов приведены в Таблице 5.

Таблица 5. Положения длинноволновых пиков поглощения для четырех культур в различных растворителях.

Название культуры	Растворитель	Положение пика поглощения $D_{max}$ , нм
зел HE-12	ацетон	653
	ацетон:метанол 7:2	655
	ацетон:метанол:вода	657
	ацетон:этанол 7:2	655
	ацетон:метанол:вода (без фильтрации)	657
ТЦв зел	ацетон	654
	ацетон:метанол 7:2	657



	ацетон:метанол:вода	658
	ацетон:этанол 7:2	656
	ацетон:метанол:вода (без фильтрации)	660
кор НЕ-12	ацетон	653
	ацетон:метанол 7:2	654
	ацетон:метанол:вода	658
	ацетон:этанол 7:2	652
	ацетон:метанол:вода (без фильтрации)	657
кор ТЦв	ацетон	656
	ацетон:метанол 7:2	655
	ацетон:метанол:вода	657
	ацетон:этанол 7:2	653
	ацетон:метанол:вода (без фильтрации)	657

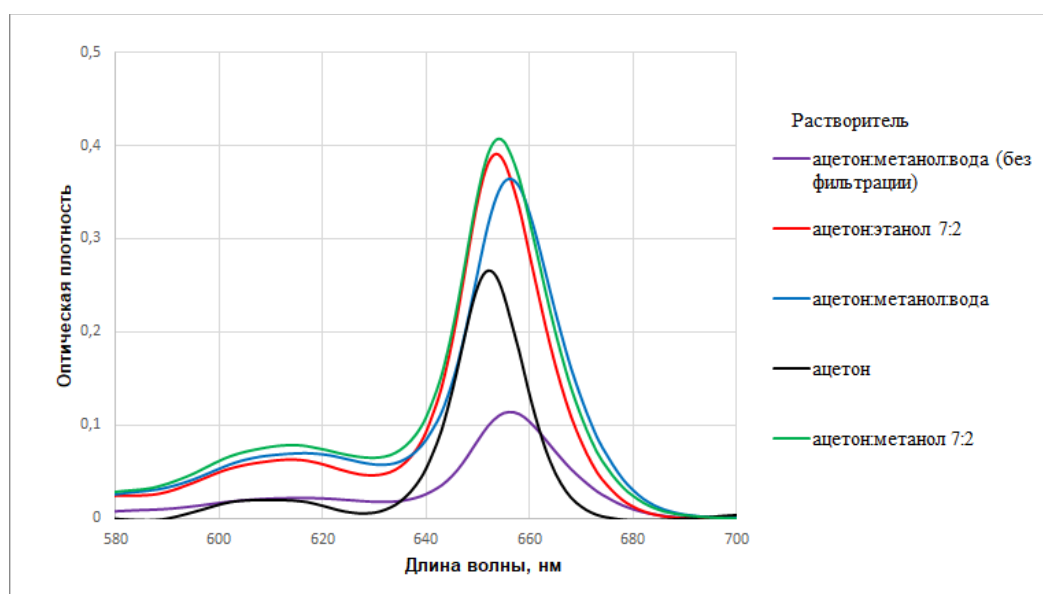


Рис. 13. Спектры поглощения экстрактов культуры «зел НЕ-12» в различных растворителях;

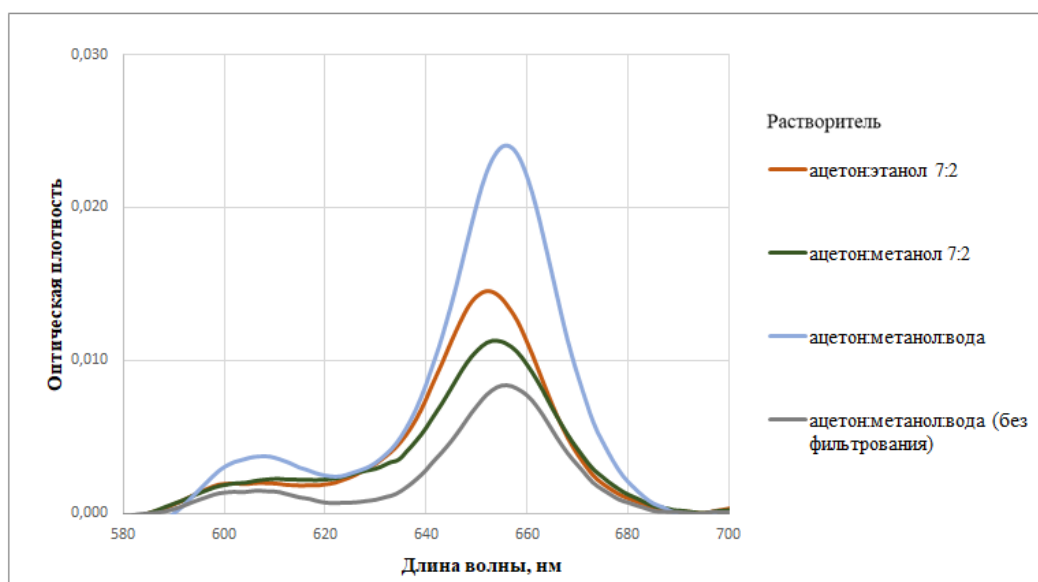


Рис. 14. Спектры поглощения экстрактов культуры «кор ТЦВ» в различных растворителях.

Введем формулу для пересчета коэффициентов экстинкции для различных растворителей. Известными коэффициентами экстинкции являются экстинкция в ацетон-метаноловом экстракте (7:2) для Бхл  $e$  [27] и экстинкция в ацетоновом экстракте для Бхл  $d$  [4]. Считаем, что после фильтрации мембранные фильтры разрезались на четыре части поровну, и для одной культуры концентрация Бхл в каждом из экстрактов, приготовленных из фильтров, одинакова. Тогда будет верно равенство (см. 2.4):

$$\frac{D_{max}^0}{\varepsilon_{Бхл}^0 \cdot d^0} \cdot \frac{v^0}{V^0} \cdot \frac{1}{\theta^0} = \frac{D_{max}}{\varepsilon_{Бхл} \cdot d} \cdot \frac{v}{V} \cdot \frac{1}{\theta}$$

где  $\varepsilon_{Бхл}^0$  – известный коэффициент экстинкции,  $d^0$ ,  $v^0$ ,  $V^0$ ,  $E_{max}^0$ ,  $\theta^0$  – длина оптического пути, объем экстракта, объем отфильтрованной воды, оптическая плотность в длинноволновом максимуме в спектре поглощения, откорректированном на рассеяние, и доля фильтра, соответствующие измерению спектра поглощения в экстракте, в котором известен коэффициент экстинкции Бхл. В правой части уравнения  $\varepsilon_{Бхл}$  – искомый коэффициент экстинкции,  $d$ ,  $v$ ,  $V$ ,  $E_{655}$ ,  $E_{min}$ ,  $\theta$  – длина оптического пути, объем экстракта, объем отфильтрованной воды, оптическая плотность в длинноволновом максимуме в спектре поглощения, откорректированном на рассеяние, и доля фильтра, соответствующие измерению спектра поглощения в экстракте, в случае которого коэффициент экстинкции Бхл неизвестен. Тогда формула для расчета искомого коэффициента экстинкции будет выглядеть следующим образом:

$$\varepsilon_{Бхл} = \varepsilon_{Бхл}^0 \cdot \frac{d^0}{d} \cdot \frac{v^0}{V} \cdot \frac{\theta^0}{\theta} \cdot \frac{v}{v^0} \cdot \frac{D_{max}}{D_{max}^0}$$

Обозначим относительные изменения параметров, входящие в уравнение выше, следующим образом:  $\delta d = \frac{d^0}{d}$ ,  $\delta V = \frac{V^0}{V}$ ,  $\delta \theta = \frac{\theta^0}{\theta}$ ,  $\delta v = \frac{v}{v^0}$ ,  $\delta D = \frac{D_{max}}{D_{max}^0}$ . Тогда уравнение запишется в виде:

$$\varepsilon_{\text{Бхл}} = \varepsilon_{\text{Бхл}}^0 \cdot \delta d \cdot \delta V \cdot \delta \theta \cdot \delta v \cdot \delta D$$

Рассчитаем погрешность определения искомого коэффициента экстинкции. Для этого используем формулу для стандартного отклонения систематических ошибок для оценки истинного значения величины [33]. В результате получим следующую формулу:

$$\sigma_{\varepsilon_{\text{Бхл}}} = \varepsilon_{\text{Бхл}}^0 \cdot \delta \theta \cdot \left[ \left( \left( \frac{1}{d} \cdot \delta V \cdot \delta v \cdot \delta D \right)^2 + \left( \frac{\delta d}{d} \cdot \delta V \cdot \delta v \cdot \delta D \right)^2 \right) \cdot \sigma_d^2 + \left( \left( \frac{1}{V} \cdot \delta d \cdot \delta v \cdot \delta D \right)^2 + \left( \frac{\delta V}{V} \cdot \delta d \cdot \delta v \cdot \delta D \right)^2 \right) \cdot \sigma_V^2 + \left( \left( \frac{1}{v^0} \cdot \delta d \cdot \delta V \cdot \delta D \right)^2 + \left( \frac{\delta v}{v^0} \delta d \cdot \delta V \cdot \delta D \right)^2 \right) \cdot \sigma_v^2 + \left( \frac{1}{D_{max}^0} \cdot \delta d \cdot \delta V \cdot \delta v \right)^2 \cdot \sigma_{D_{max}}^2 + \left( \frac{\delta E}{D_{max}^0} \cdot \delta d \cdot \delta V \cdot \delta v \right)^2 \cdot \sigma_{D_{max}^0}^2 \right]^{\frac{1}{2}}$$

Здесь  $\sigma_d$ ,  $\sigma_V$ ,  $\sigma_v$  – погрешности длины оптического пути, объема отфильтрованной воды и объема экстракта, определяемые согласно 2.4.  $\sigma_{D_{max}}$  и  $\sigma_{D_{max}^0}$  – погрешности определения оптической плотности в двух разных экстрактах, для первого из которых неизвестен коэффициент экстинкции Бхл, а для второго – известен. Рассчитываются эти погрешности как 1% от соответствующей оптической плотности (см. Таблицу 3). Полученные коэффициенты экстинкции Бхл в различных растворителях приведены в Таблице 6.

Таблица 6. Рассчитанные коэффициенты экстинкции Бхл  $d$  и  $e$  для различных растворителей.

Бхл $d$		
Название культуры:	зел НЕ-12	ТЦв зел
Растворитель	$\varepsilon_{\text{Бхл } d}$ , мл · (мг · см <sup>-3</sup> )	
ацетон	<b>98</b> [4]	<b>98</b> [4]
ацетон:метанол 7:2	150±4	149±4
ацетон:метанол:вода	134±3	126±3
ацетон:этанол 7:2	144±4	143±4
ацетон:метанол:вода (без фильтрации)	211±3	187±3
Бхл $e$		
Название культуры:	кор НЕ-12	кор ТЦв
Растворитель	$\varepsilon_{\text{Бхл } e}$ , мл · (мг · см <sup>-3</sup> )	

ацетон	–	–
ацетон:метанол 7:2	<b>49.6</b> [27]	<b>49.6</b> [27]
ацетон:метанол:вода	79.4±0.5	105.8±0.7
ацетон:этанол 7:2	25.64±0,15	63.9±0.4
ацетон:метанол:вода (без фильтрации)	81±5	179±10

Как видно из таблицы, полученные коэффициенты экстинкции показали большой разброс значений и сильно отличаются от известных в литературе. Это может быть обусловлено следующими факторами: (1) частичное пропускание фильтром бактерий или их частей, содержащих Бхл, (2) наличие в воде Бхл в виде растворенных молекул вне клеток бактерий, (3) неполное растворение ацетоном Бхл из клеток. Поэтому эти коэффициенты экстинкции в дальнейшем не использовались.

### 3.4. Расчет концентрации бактериохлорофиллов по спектрам поглощения экстрактов

Расчет концентраций Бхл *d* и *e* по спектрам поглощения экстрактов производился по формуле Оверманна-Тилзера, а также по формулам, полученным из закона Бугера-Ламберта-Бера. Формулы и расчет погрешностей определения концентраций приведены в разделе 2.4.

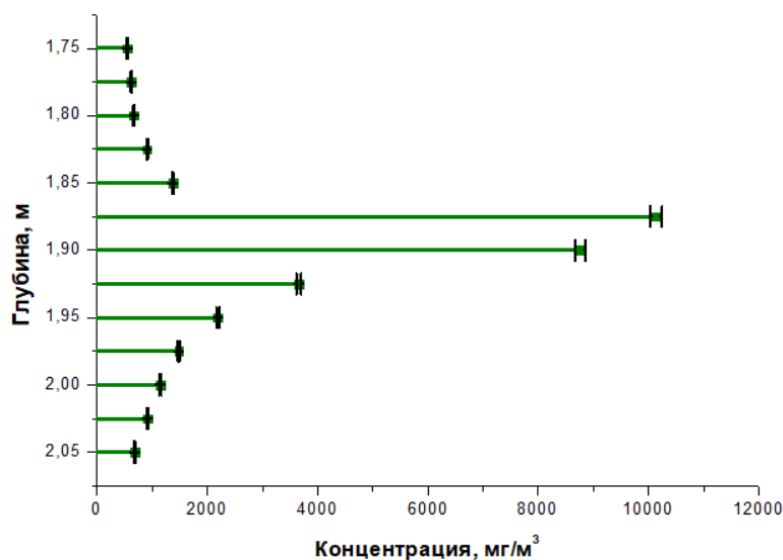


Рис. 15. Профиль распределения концентрации Бхл по глубине в оз. Трехцветное (отбор проб многошприцевым пробоотборником, сентябрь 2018)

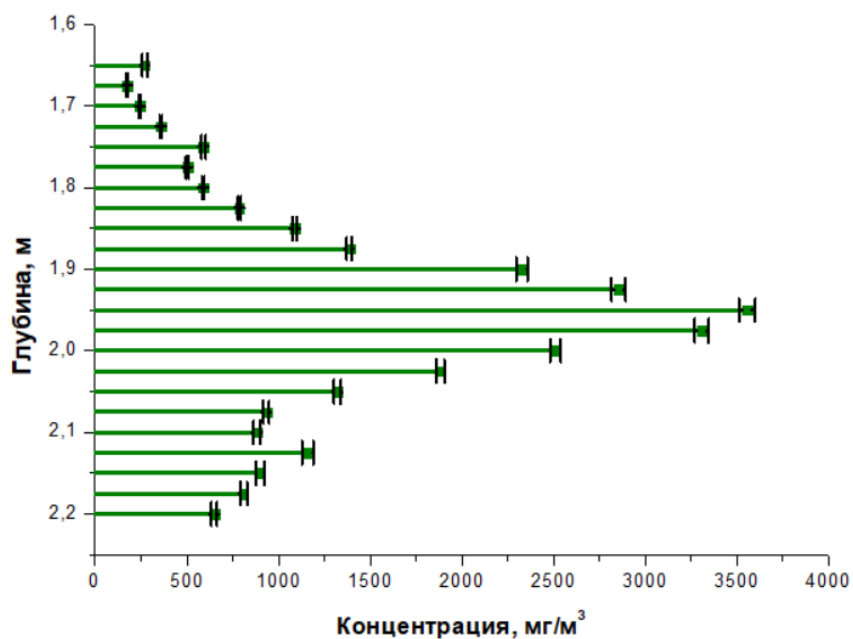


Рис. 16. Профиль распределения концентрации Бхл по глубине в оз. Трехцветное (отбор проб многоразовым пробоотборником, март 2018)

На Рис. 15–16 изображены вертикальные профили распределения по глубине концентраций Бхл в озере Трехцветном, в котором обитает зеленоокрашенная разновидность ЗСБ, содержащая Бхл *d*. Для расчета концентраций была использована формула для концентрации Бхл *d*, полученная из закона Бугера.

На Рис. 17 изображен вертикальный профиль распределения по глубине концентраций Бхл в лагуне на Зеленом мысе, в которой обитают коричневоокрашенные ЗСБ. Для расчета концентраций была использована формула для концентрации Бхл *e*, полученная из закона Бугера.

На Рис. 18 изображен вертикальный профиль распределения по глубине концентраций Бхл в озере Еловом, в котором обитают обе разновидности ЗСБ. Концентрации определялись по формуле для суммарной концентрации Бхл *d* и *e*, полученной из закона Бугера и соотношений между содержанием зеленоокрашенных и коричневоокрашенных ЗСБ в этом озере.

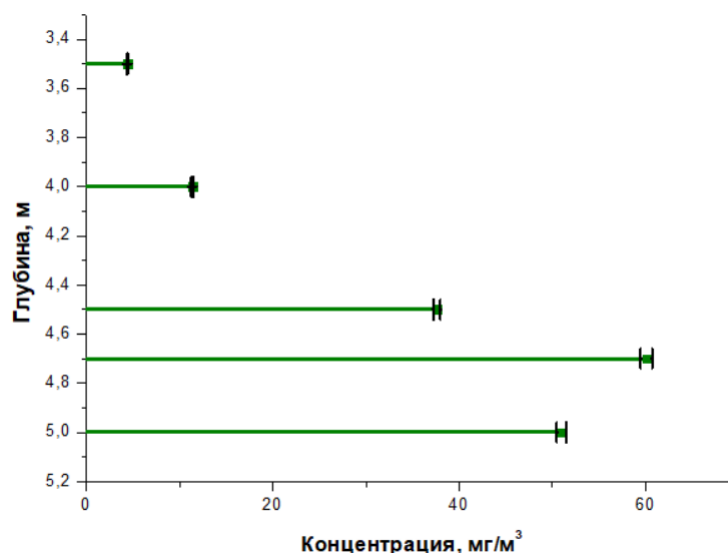


Рис. 17. Профиль распределения концентрации Бхл по глубине в лагуне на Зеленом мысе (отбор проб погружаемым насосом, март 2018)

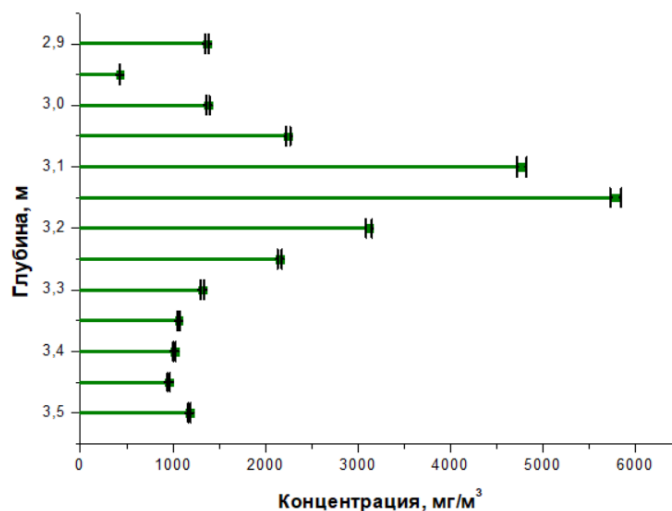


Рис. 18. Профиль распределения концентрации Бхл по глубине в оз. Еловое (отбор проб многошприцевым пробоотборником, сентябрь 2018)

### 3.5. Вычисление площади под длинноволновым пиком поглощения в воде – учет рассеяния света на частицах, аппроксимация базовой линии

Для реализации метода определения концентраций Бхл в естественной среде были рассчитаны площади под длинноволновым пиком в спектрах поглощения Бхл в клетках. Для расчета площади выбран интервал длин волн от 650 до 800 нм. Площадь вычисляется в нм с помощью метода прямоугольников, т.е. суммированием оптических плотностей в

выбранном диапазоне длин волн. Пьедестал рассеяния приближенно аппроксимируется трапецией. Метод проиллюстрирован на Рис. 13.

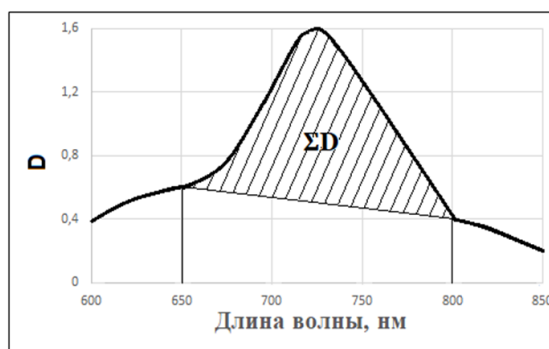


Рис. 19. Иллюстрация способа определения площади длинноволнового пика поглощения Бхл.

Погрешность  $\sigma_{\Sigma D}$  определения площади длинноволнового пика поглощения Бхл  $\Sigma D$  с учетом погрешности фотометрирования прибора (см. Таблицу 3), составляющей 1% от измеряемой оптической плотности, выглядит следующим образом:

$$\sigma_{\Sigma D} = \sum_{i=655}^{800} \frac{1}{100} \cdot (D_i - D_i^{\text{pacc}}) = \frac{1}{100} \cdot \sum_{i=655}^{800} (D_i - D_i^{\text{pacc}}) = \frac{1}{100} \Sigma D$$

где  $D_i$  – оптическая плотность в спектре поглощения на  $i$ -ой длине волны,  $D_i^{\text{pacc}}$  – значение рассеяния в спектре поглощения на  $i$ -ой длине волны (значение  $D$  на верхней грани пьедестала рассеяния). Таким образом, погрешность  $\sigma_{\Sigma D}$  составляет 1% от площади  $\Sigma D$  под длинноволновым пиком поглощения Бхл.

### 3.6. Корреляция площади под длинноволновым пиком поглощения бактериохлорофиллов в воде и концентрации бактериохлорофиллов, рассчитанной по спектрам поглощения бактериохлорофиллов в экстрактах

Для всех исследуемых серий проб была обнаружена пропорциональная зависимость между  $\Sigma D$  (площадью длинноволнового пика в спектрах поглощения Бхл в пробах воды с вычтенным пьедесталом рассеяния) и концентрациями, рассчитанными по формулам для концентраций Бхл  $d$  и Бхл  $e$ , полученных из закона Бугера. Для аппроксимации линейной зависимости  $\Sigma D$  от рассчитанных концентраций использован метод наименьших квадратов (МНК). Исходя из идеи, что нулевая концентрация Бхл должна соответствовать нулевой площади под длинноволновым пиком поглощения Бхл в воде, для аппроксимации набора точек  $[C(\text{Бхл } d, e)_i, \Sigma D_i]$  (обозначим для удобства как  $[x_i, y_i]$ ) выбрана функция вида  $y = K \cdot x$  (пропорциональная зависимость), где  $K$  – коэффициент линейной регрессии. Измеренные значения  $y_i$  не могут точно лечь на теоретическую прямую из-за ошибок

измерения, всегда присущих реальному эксперименту. Поэтому линейное уравнение, нужно представить системой уравнений:  $y_i = K \cdot x_i + \varepsilon_i$ , где  $\varepsilon_i$  – неизвестная ошибка измерения  $y$  в  $i$ -ом эксперименте. Такую зависимость называют регрессией, т.е. зависимость двух величин друг от друга со статистической значимостью. Задачей МНК является восстановление зависимости путем нахождения коэффициента  $K$  по набору экспериментальных точек  $[x_i, y_i]$ . Перепишем регрессию в виде:  $\varepsilon_i = y_i - K \cdot x_i$ , тогда сумма квадратов ошибок будет:  $\Phi = \sum_{i=1}^n \varepsilon_i^2 = \sum_{i=1}^n (y_i - K \cdot x_i)^2$ . Принципом МНК является минимизация этой суммы относительно параметра  $K$ . Минимум достигается, когда частная производные от  $\Phi$  по коэффициенту  $K$  равна нулю:

$$\frac{\partial \Phi}{\partial K} = \frac{\partial \sum_{i=1}^n (y_i - K \cdot x_i)^2}{\partial K} = \frac{\partial \sum_{i=1}^n (y_i^2 - 2 \cdot K \cdot y_i \cdot x_i + K^2 \cdot x_i^2)}{\partial K}$$

Раскрывая эту производную, получаем выражение для расчета  $K$ :

$$K = \frac{\sum_{i=1}^n y_i \cdot x_i}{\sum_{i=1}^n x_i^2}$$

Среднеквадратичная ошибка определения величины  $K$  при этом равна:

$$S_k = \sqrt{\frac{1}{(n-1)} \cdot \left( \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - K \cdot x_i)^2}{\sum_{i=1}^n x_i^2} \right)}$$

Оценку дисперсии  $y$  при этом рассчитываем по формуле:

$$S_y^2 = S_{y, \text{ост}}^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - K \cdot x_i)^2}{n-1}$$

Делитель  $n - 1$  появляется потому, что у нас снизилось число степеней свободы из-за расчета одного коэффициента по этой же выборке экспериментальных данных. Такую погрешность называют остаточной дисперсией относительно линии регрессии  $S_{y, \text{ост}}^2$ .

Примеры полученных линейных корреляций представлены на Рис. 21–22.

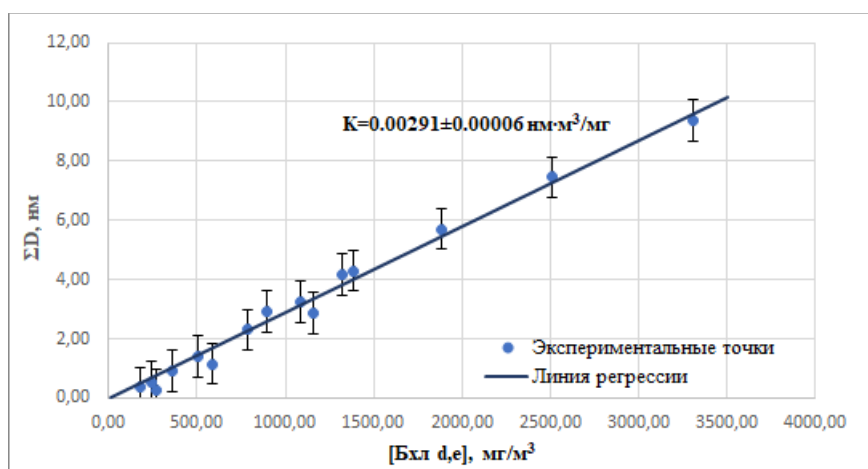


Рис. 20. Корреляция между площадью под длинноволновым пиком поглощения в воде и концентрацией Бхл, рассчитанной по формуле из закона Бугера для экстрактов. Данные для оз. Трехцветное (отбор проб многошприцевым пробоотборником, март 2018 г.).



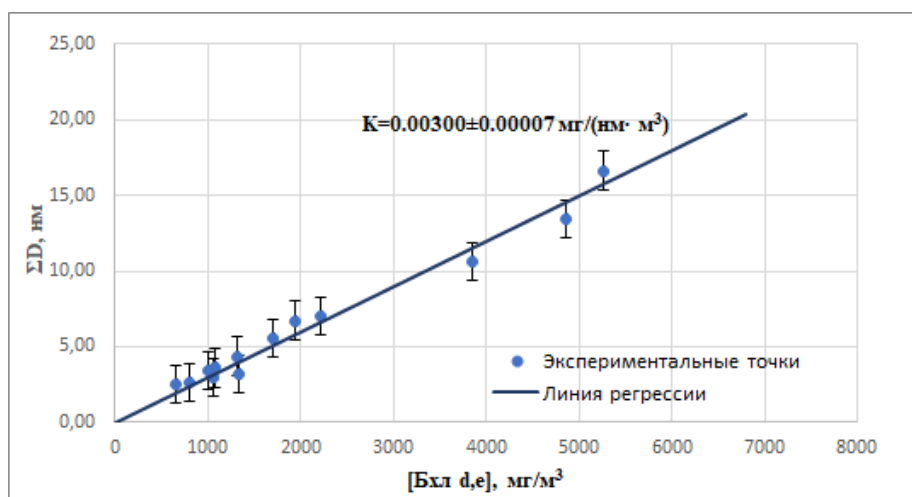


Рис. 21. Корреляция между площадью под длинноволновым пиком поглощения в воде и концентрацией Бхл, рассчитанной по формуле из закона Бугера для экстрактов. Данные для оз. Большие Хрусломены (отбор проб многосприцевым пробоотборником, сентябрь 2018 г.).

Из такой пропорциональной зависимости следует расчетная формула для определения концентрации Бхл в клетках:

$$C (\text{Бхл } d, e) = \frac{\Sigma D}{K}$$

где  $K$  – коэффициент линейной регрессии для конкретного вида Бхл и/или для конкретного водоема. Для удобства вычислений можно сделать замену  $A = \frac{1}{K}$ , и тогда расчетная формула примет вид:

$$C (\text{Бхл } d, e) = A \cdot \Sigma D$$

Тогда погрешности для коэффициентов  $A$  будут пересчитываться по формуле:

$$S_A = \sqrt{\left(\frac{1}{K^2}\right)^2 \cdot S_K^2} = \frac{S_K}{K^2}$$

### 3.7. Определение коэффициента $K$ для разных серий проб

Для всех исследованных серий проб были получены коэффициенты линейной регрессии  $K$  для пропорциональных зависимостей  $\Sigma D$  от концентраций Бхл, полученных по фотометрическим формулам для экстрактов. Рассчитанные коэффициенты приведены в Таблице 7.

Таблица 7. Значения коэффициентов линейной регрессии К и коэффициентов А для проб, содержащих разные типы ЗСБ

Тип ЗСБ	Серия проб	К, нм·м <sup>3</sup> /мг	А, мг/(нм· м <sup>3</sup> )
зеленоокрашенные	оз. Трехцветное (отбор проб многошприцевым пробоотборником (23 шприца), март 2018 г.)	0.00291±0.00006	344±7
	оз. Трехцветное (отбор проб многошприцевым пробоотборником (13 шприцов), сентябрь 2018 г.)	0.00320±0.00005	312±5
коричневоокрашенные	оз. Могильное (отбор проб погружаемым насосом, октябрь 2018 г.)	0.0028±0.0001	351±15
	культуры	0.0032±0.0004	312±43
	культуры, штамм ЗМ-2014	0.00295±0.00020	339±24
смешанные	оз. Большие Хрусломены (отбор проб погружаемым насосом, март 2018 г.)	0.00344±0.00007	291±6
	оз. Большие Хрусломены (отбор проб многошприцевым пробоотборником (13 шприцов), сентябрь 2018 г.)	0.00300±0.00007	334±8
	оз. Еловое (отбор проб погружаемым насосом, сентябрь 2018 г.)	0.00252±0.00012	397±19
	оз. Еловое (отбор проб многошприцевым пробоотборником (13 шприцов), сентябрь 2018 г.)	0.0029±0.0005	348±60

### 3.8. Расчет концентрации Бхл новым методом и построение вертикальных распределений Бхл в разных водоемах

Новый метод определения концентрации Бхл по спектрам поглощения в природной среде был опробован на сериях проб из нескольких меромиктических водоемов. Как было показано в 3.6, расчет концентрации Бхл  $d$  и/или  $e$  производился по формуле:

$$C (\text{Бхл } d, e) = A \cdot \Sigma D$$

где  $\Sigma D$  [нм] – площадь под длинноволновым пиком поглощения в воде с вычтенным пьедесталом рассеяния,  $A$  [мг/(нм·м<sup>3</sup>)] – коэффициент пропорциональной зависимости между концентрацией  $C$  [мг/м<sup>3</sup>] и площадью под длинноволновым пиком (см. Таблицу 7).

Формула для погрешности определения концентрации  $C$  запишется в следующем виде:

$$\sigma_C = \sqrt{A^2 \cdot \sigma_{\Sigma D}^2 + (\Sigma D)^2 \cdot S_A^2}$$

Здесь  $\sigma_{\Sigma D}$  – погрешность определения площади под длинноволновым пиком поглощения Бхл, определенная в 3.5;  $S_A$  – погрешность коэффициента  $A$ , определенная в 3.6.

Для всех исследованных серий проб коэффициенты  $K$  и  $A$  получились довольно близкими. Можно пренебречь тем, что некоторые из полученных коэффициентов  $A$  не совпадают в пределах погрешностей, и выбрать для расчета концентраций Бхл  $e$  коэффициент  $A$ , равный среднему арифметического от этих коэффициентов:

$$A = \frac{\sum_{i=1}^n A_i}{n}$$

Погрешность среднего арифметического запишется в виде:

$$\sigma_A = \frac{1}{n} \sqrt{\sum_{i=1}^n \sigma_{A_i}^2}$$

Здесь за  $A_i$  обозначены коэффициенты  $A$  для исследованных серий проб из Таблицы 7,  $\sigma_{A_i}$  – погрешности коэффициентов  $A_i$ ,  $n$  – число этих коэффициентов. Тогда коэффициент  $A$  для расчета концентраций Бхл по спектрам поглощения в воде будет равен:  $A = 336 \pm 9$  мг/(нм·м<sup>3</sup>). Таким образом, расчетная эмпирическая формула для определения концентрации Бхл в мг/м<sup>3</sup> по новому методу будет выглядеть следующим образом:

$$C (\text{Бхл } d, e) [\text{мг/м}^3] = 336 [\text{мг}/(\text{нм} \cdot \text{м}^3)] \cdot \Sigma D [\text{нм}].$$

На Рис. 22–24 изображены профили распределения по глубине концентраций Бхл, рассчитанных по спектрам поглощения клеток в природной среде, для различных озер.

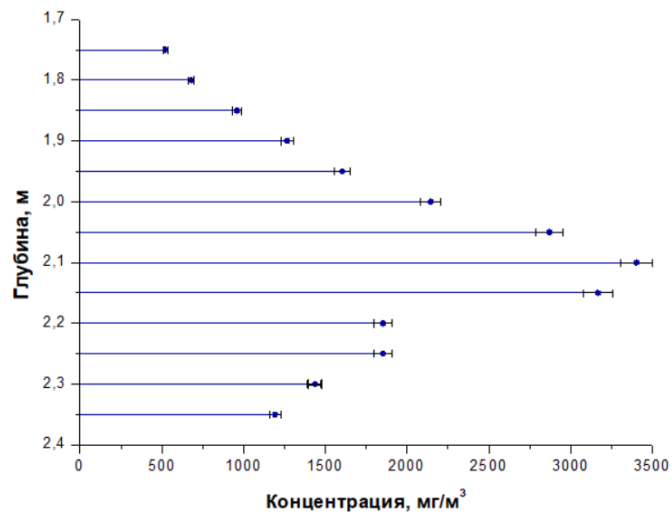


Рис. 22. Профиль распределения концентрации Бхл по глубине в оз. Трехцветное (отбор проб многошприцевым пробоотборником, март 2018), рассчитанной по спектрам поглощения в воде.

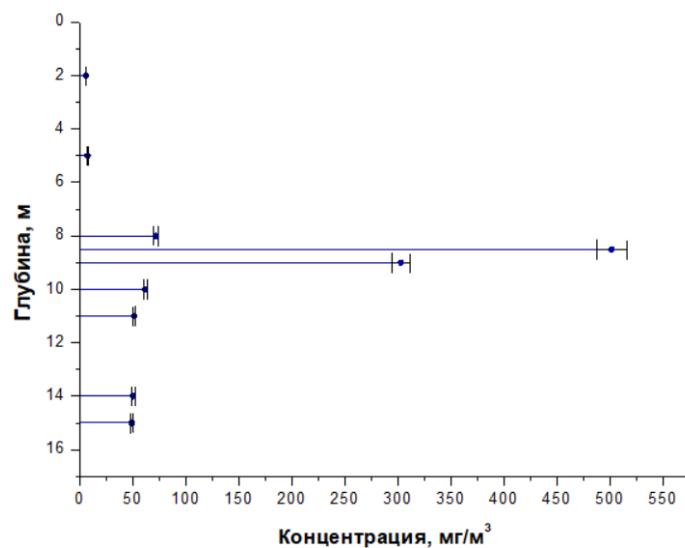


Рис. 23. Профиль распределения концентрации Бхл по глубине в оз. Могильное (отбор проб погружаемым насосом, октябрь 2018), рассчитанной по спектрам поглощения в воде.

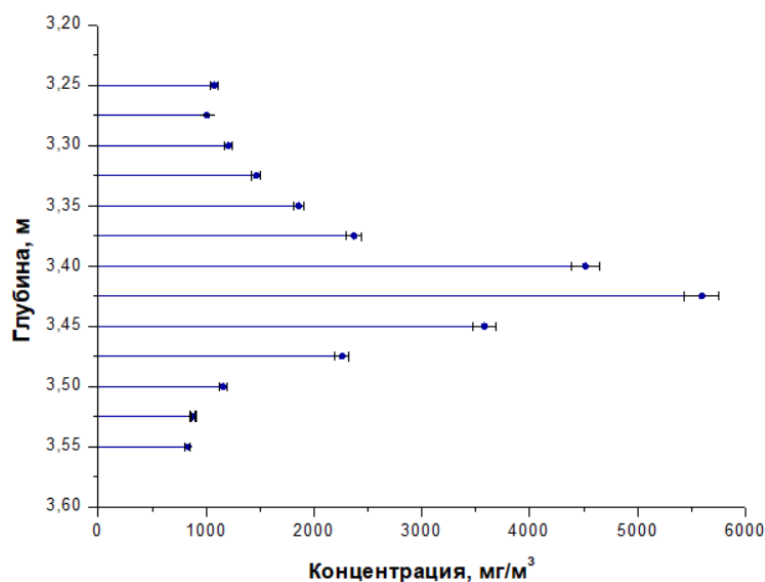


Рис. 24. Профиль распределения концентрации Бхл по глубине в оз. Большие Хрусломены (отбор проб многошприцевым пробоотборником, сентябрь 2018), рассчитанной по спектрам поглощения в воде.

### 3.9. Обсуждение полученных результатов

В ходе работы были построены профили распределения концентраций Бхл, полученных для каждой серии проб тремя способами: по формуле Оверманна-Тилзера и по формуле, полученной из закона Бугера, по спектрам поглощения экстрактов, а также новым методом по спектрам поглощения бактерий в воде. На Рис. 25–27 изображены профили распределения концентрации Бхл, полученные этими тремя способами.

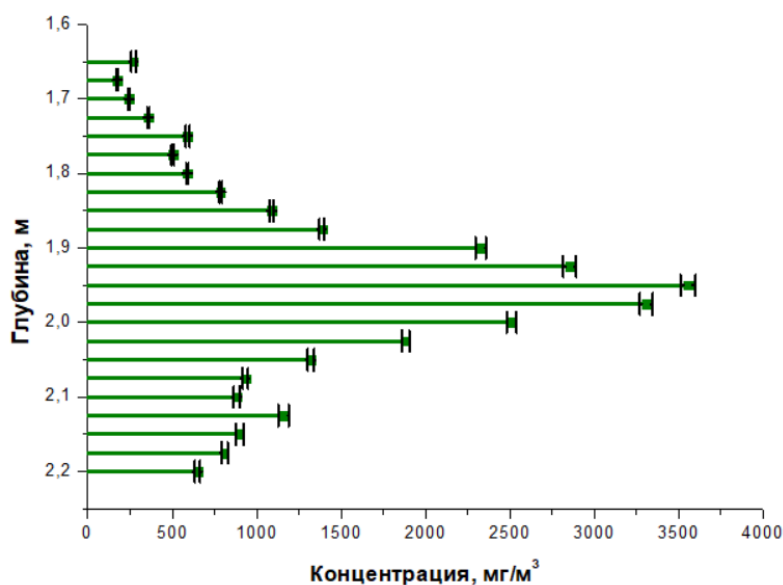


Рис. 25. Профиль распределения концентрации Бхл по глубине в оз. Трехцветное (отбор проб многошприцевым пробоотборником, сентябрь 2018), рассчитанной по формуле, полученной из закона Бугера.

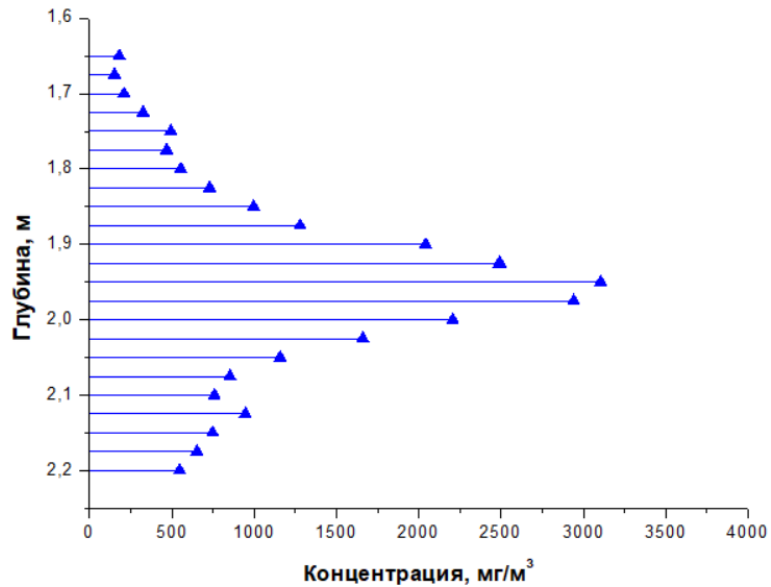


Рис. 26. Профиль распределения концентрации Бхл по глубине в оз. Трехцветное (отбор проб многошприцевым пробоотборником, сентябрь 2018), рассчитанной по формуле Оверманна-Тилзера.

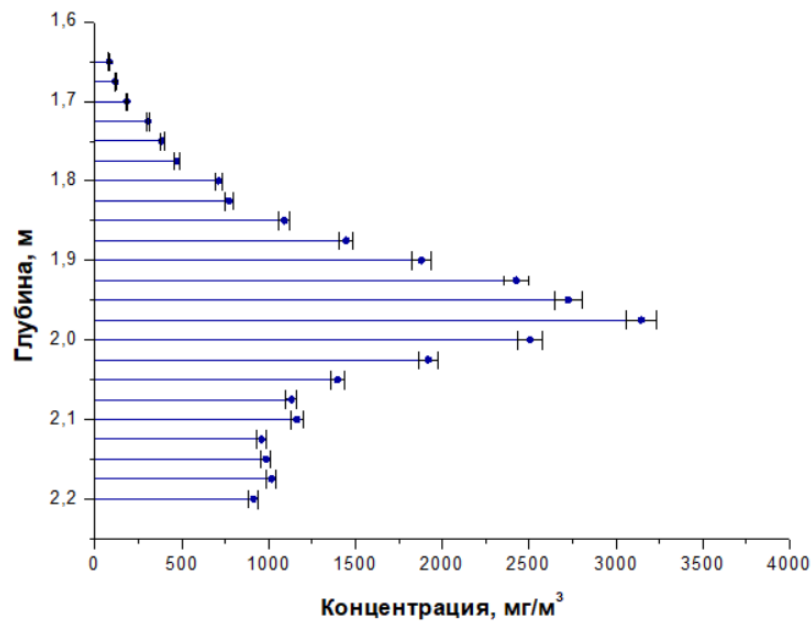


Рис. 27. Профиль распределения концентрации Бхл по глубине в оз. Трехцветное (отбор проб многошприцевым пробоотборником, сентябрь 2018), рассчитанной по спектрам поглощения в воде.

Можно увидеть, что форма профилей практически одинакова во всех трех случаях. Форма профиля распределения с концентрациями, рассчитанными по спектрам поглощения в воде, более сглаженная при низких концентрациях. Концентрации, рассчитанные по новому методу, близки к концентрациям, рассчитанным по формуле, полученной из закона

Бугера, и концентрациями, полученным по формуле Оверманна-Тилзера, однако на больших концентрациях значения и расположение точек отличаются. Такие различия могут быть вызваны большим влиянием рассеяния в спектрах поглощения Бхл в клетках и грубостью аппроксимации пьедестала рассеяния трапецией. Это говорит о необходимости модификации разработанного метода определения концентрации Бхл, в частности, о необходимости выбора более точного способа аппроксимации пьедестала рассеяния.

Разработанный метод позволяет без экстрагирования пигментов определить качественную картину распределения ЗСБ по глубине в меромиктических водоемах. Однако для точного количественного определения концентрации Бхл в пробах воды требуются дальнейшие уточнения и модификации метода. Также существует проблема разделения вкладов зеленоокрашенных и коричневоокрашенных ЗСБ в общую картину поглощения. Эту проблему можно решить либо с помощью флуоресцентного анализа пигментов, либо путем изучения коротковолновой области в спектрах поглощения экстрактов.

Также в ходе работы определены коэффициенты экстинкции Бхл  $d$  и  $e$  в различных растворителях. Как видно из Таблицы 6, коэффициенты экстинкции Бхл  $d$  для ацетон-метаноловых и ацетон-этаноловых экстрактов совпали в пределах погрешностей. Для смеси ацетон-метанол-вода для обеих зеленоокрашенных культур в случаях, когда производилась и не производилась фильтрация, коэффициенты экстинкции не совпали. Для случая, когда фильтрация производилась, коэффициенты экстинкции двух зеленоокрашенных культур близки по значению, но не совпадают в пределах погрешностей. Для коричневоокрашенных культур коэффициенты экстинкции Бхл  $e$  совпали только по порядку для ацетон-этаноловых экстрактов. Для остальных растворителей коэффициенты экстинкции сильно разнятся. Это может быть связано с очень низкой концентрацией Бхл  $e$  в исследованных пробах.

Положительные результаты для коэффициентов экстинкции Бхл  $d$  в ацетон-метаноловых и ацетон-этаноловых экстрактах говорят о необходимости повторных экспериментов в этой области для точного определения коэффициентов экстинкции Бхл  $d$  и  $e$  в различных растворителях.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ. ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

В ходе работы проведены измерения спектров поглощения суспензий фототрофных бактерий в воде и экстрактов фотосинтетических пигментов в органических растворителях и на основании спектральных измерений разработан метод определения концентраций хлоросомных бактериохлорофиллов непосредственно по спектрам поглощения в водной среде. В качестве образцов использованы пробы воды с бактериями, отобранные автором работы в разные сезоны 2018 г. с различной глубины из нескольких меромиктических водоемов, отделяющихся от акватории Белого моря, и монокультуры зеленых серных бактерий, выращенные в лаборатории Института микробиологии имени С.Н. Виноградского РАН.

1. По спектрам поглощения экстрактов определены концентрации бактериохлорофиллов по двум формулам: эмпирической формуле Оверманна-Тилзера и по формуле, полученной из закона ослабления света Бугера-Ламберта-Бера и из определения оптической плотности, в которую в случае зеленоокрашенных бактерий входит коэффициент экстинкции  $B_{\text{хл}} d$ , в случае коричневоокрашенных – коэффициент экстинкции  $B_{\text{хл}} e$ . В случаях, когда в водоеме обитают обе разновидности бактерий, в формулу входит эффективный коэффициент экстинкции  $\varepsilon_{\text{эфф}}$ , при расчете которого учитывалось относительное содержание зеленоокрашенных и коричневоокрашенных бактерий, известное из литературы. Такой подход для смешанных культур применен впервые.

2. Рассчитаны площади под длинноволновыми пиками поглощения  $B_{\text{хл}}$  в спектрах поглощения бактерий в водной среде. Площади вычислялись в диапазоне длин волн от 650 до 800 нм, линия светорассеяния аппроксимировалась прямой линией, а площадь под ней – трапецией. Построенные зависимости между площадями под длинноволновыми пиками в спектрах поглощения  $B_{\text{хл}}$  в клетках ЗСБ и концентрациями, рассчитанными по спектрам поглощения экстрактов пигментов, оказались пропорциональными. Для зависимостей получены коэффициенты линейной регрессии  $K$  [ $\text{нм}\cdot\text{м}^3/\text{мг}$ ] и рассчитаны коэффициенты  $A = 1/K$  [ $\text{мг}/\text{нм}\cdot\text{м}^3$ ] для эмпирической формулы расчета концентрации  $B_{\text{хл}}$

$$C (B_{\text{хл}} d, e) = A \cdot \Sigma D$$

3. Значения коэффициента  $A$  для зеленоокрашенных, коричневоокрашенных бактерий и проб воды с обеими разновидностями бактерий оказались близкими, среднее значение  $A = 336 \pm 9$   $\text{мг}/\text{нм}\cdot\text{м}^3$ . Это позволяет определять концентрацию  $B_{\text{хл}}$  по спектрам поглощения воды для любой формы зеленых серобактерий или их смеси без необходимости предварительной идентификации.



4. По новой эмпирической формуле рассчитаны концентрации Бхл, и для каждой серии проб построены вертикальные профили распределения Бхл по глубине. Сравнительный анализ распределений концентрации Бхл по глубине, рассчитанных тремя способами - по формуле Овермана-Тилзера, по формуле, полученной из закона Бугера и по новой эмпирической формуле – показал, что форма распределения и глубина с максимальной концентрацией пигмента во всех трех случаях одинаковы. Однако численно эти распределения отличаются, так как в формуле Овермана-Тилзера не учитывается существенная разница в коэффициентах экстинкции для двух бактериохлорофиллов (Бхл *d* и Бхл *e*).

Преимущество нового метода заключается в отсутствии необходимости экстрагирования пигментов фотосинтезирующих бактерий для определения их концентраций в пробах воды. Метод позволяет значительно ускорить и упростить процесс определения концентраций Бхл и построения вертикальных профилей распределения Бхл по глубине в меромиктических водоемах. Разработанный метод потенциально может применяться для определения концентраций Бхл непосредственно в водоеме без отбора проб при наличии погружаемого спектрофотометра.

Выражаю благодарность сотруднику Института микробиологии им. С.Н. Виноградского кандидату биологических наук, младшему научному сотруднику РАН **Луниной Ольге Николаевне** за предоставленные для спектральных измерений образцы чистых культур зеленых серных бактерий.

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 студентов физического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова **Жильцову Анну Александровну, Фрейдкина Михаила Петровича и Харитонову Дмитрия Андреевича** за помощь в отборе проб и проведении измерений во время экспедиционных работ в Кандалакшском заливе Белого моря.

Особую благодарность автор выражает научному руководителю – кандидату физико-математических наук, доценту физического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова **Пацаевой Светлане Викторовне** за всестороннюю помощь в процессе подготовки дипломной работы.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Overmann J., Tilzer M., 1989. Control of primary productivity and the significance of photosynthetic bacteria in a meromictic kettle lake Mittlerer Buchensee, West-Germany. *Aquatic Sciences*, 51(4), 261–278.
2. Overmann J., 2001. Green Sulfur Bacteria. *Encyclopedia of Life Sciences*.
3. Pfennig N., & Trüper H. G., 1981. Isolation of Members of the Families Chromatiaceae and Chlorobiaceae. *The Prokaryotes*, 279–289.
4. Stanier R. Y., Smith J. H. C., 1960. The chlorophylls of green bacteria. *Biochim Biophys Acta* 41, 478–484.
5. Olson J. M., 1998. Chlorophyll Organization and Function in Green Photosynthetic Bacteria. *Photochemistry and Photobiology*, 67(1), 61–75.
6. Oelze J., 1985. 9 Analysis of Bacteriochlorophylls. *Methods in Microbiology*, 257–284.
7. Kharcheva A. V., Zhiltsova A. A., Lunina O. N., Savvichev A. S., Patsaeva S. V., 2016. Quantification of two forms of green sulfur bacteria in their natural habitat using bacteriochlorophyll fluorescence spectra. *Saratov Fall Meeting 2015: Third International Symposium on Optics and Biophotonics and Seventh Finnish-Russian Photonics and Laser Symposium (PALS)*, 99170P (2016).
8. Jensen A, Aasmundrud O. and Eimjhellen K. E., 1964. Chlorophylls from photosynthetic bacteria. *Biochem Biophys Acta* 88, 466–479.
9. Gloe A., Pfennig N., Brockmann H., Trowitzsch W., 1975. A new bacteriochlorophyll from brown-colored chlorobiaceae. *Archives of Microbiology*, 102(1), 103–109.
10. Pierson B. K., Castenholz R. W., 1974. Studies of pigments and growth in *Chloroflexus aurantiacus*, a phototrophic filamentous bacterium. *Archives of Microbiology*, 100(1), 283–305
11. Feick R. G., Fitzpatrick M., Fuller R. C., 1982. Isolation and Characterization of Cytoplasmic Membranes and Chlorosomes from the Green Bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. *J. Bacteriol.*, 1982, vol. 150, 905–915.
12. Bobe F. W., Pfennig N., Swanson K. L., Smith K. M., 1990. Red shift of absorption maxima in Chlorobiaceae through enzymic methylation of their antenna bacteriochlorophylls. *Biochemistry*, 29(18), 4340–4348.
13. Hohmann-Marriott M. F., Blankenship R. E., 2007. Hypothesis on chlorosome biogenesis in green photosynthetic bacteria. *FEBS Letters*, 581(5), 800–803.
14. Hurley J. P., Watras C. J., 1991. Identification of bacteriochlorophylls in lakes via reverse-phase HPLC. *Limnology and Oceanography*, 36(2), 307–315.

15. Mantoura R. F. C., Llewellyn C. A., 1983. The rapid determination of algal chlorophyll and carotenoid pigments and their breakdown products in natural waters by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 151, 297–314.
16. Nusch E. A., 1980. Comparison of methods for chlorophyll and phaeopigment determination. *Arch. Hydrobiol. Beih., Ergebn. Limnol.* 14, 14–36.
17. Parkin T. B., Brock T. D., 1981. The role of phototrophic bacteria in the sulfur cycle of a meromictic lake. *Limnology and Oceanography*, 26(5), 880–890.
18. Takahashi M., Ichimljra S., 1970. Phototrophic sulfur bacteria in two Spanish lakes: Vertical distribution and limiting factors. *Limnol. Oceanogr.* 30, 919-931.
19. Lunina O. N., Savvichev A. S., Kuznetsov B. B., Pimenov N. V., Gorlenko V. M., 2013. Anoxygenic phototrophic bacteria of the Kislo-Sladkoe stratified lake (White Sea, Kandalaksha Bay). *Microbiology*, 82(6), 815–832.
20. Namsaraev Z. B., 2009. Application of extinction coefficients for quantification of chlorophylls and bacteriochlorophylls. *Microbiology*, 78(6), 794–797.
21. Kharcheva A., Zhiltsova A., Emelyantsev P., Lunina O., Krasnova E., Voronov D., Savvichev A., Patsaeva S., 2018. Spectrophotometric quantification of chlorosomal bacteriochlorophyll in intact cells of green sulphur bacteria: Monocultures and natural water. *EARSeL eProceedings*, 17(1), 7–15.
22. Wintermans J. F. G. M., DeMots A., 1965. Spectrophotometric Characteristics of Chlorophylls a and b and Their Pheophytins in Ethanol. *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 109, 448 – 453.
23. Porra R. J., Thompson W. A., Kriedemann P. E., 1989. Determination of Accurate Extinction Coefficients and Simultaneous Equations for Assaying Chlorophylls a and b Extracted with Four Different Solvents: Verification of the Concentration of Chlorophyll Standards by Atomic Absorption Spectrometry. *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 975, pp. 384–394.
24. Permentier H. P., Schmidt K. A., Kobayashi M., Akiyama M., Hager-Braun C., Neerken S., Miller M., Amesz J., 2000. Composition and Optical Properties of Reaction Centre Core Complexes from the Green Sulfur Bacteria *Prosthecochloris aestuarii* and *Chlorobium tepidum*, *Photosynth. Res.*, vol. 64, 27–39.
25. Clayton R. K., 1963. Absorption Spectra of Photosynthetic Bacteria and Their Chlorophylls, in *Bacterial Photosynthesis. Symp. on Bacterial Photosynthesis*, Yellow Springs, Ohio, March 18–20, Gest H., San Pietro A., and Vernon L. P., Eds., Ann Arbor: Edwards Brothers, 495–500.

26. Maresca J. A., Chew A. G. M., Ponsatí M. R., Frigaard N.-U., Ormerod J. G., Bryant D.A., 2004. The *bchU* Gene of *Chlorobium tepidum* Encodes the C-20 Methyltransferase in Bacteriochlorophyll *c* Biosynthesis. *J. Bacteriol.*, vol. 186, 2558–2566.
27. Borrego C. M., Arellano J. B., Abella C. A., Gillbro T., Garcia-Gil L. J., 1999. The Molar Extinction Coefficient of Bacteriochlorophyll *e* and the Pigment Stoichiometry in *Chlorobium phaeobacteroides*. *Photosynth. Res.*, vol. 60, pp. 257–264.
28. Van de Meent E., Kobayashi M., Erkelens C., van Veelen P. A., Amesz J., Watanabe T., 1991. Identification of 81-Hydroxychlorophyll *a* as a Functional Reaction Center Pigment in Heliobacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1058, pp. 356–362.
29. Joniak T., 2010. The structure of phosphorus compounds in mid-forest humic lakes. *Oceanological and Hydrobiological Studies*, vol. 39, Issue 2, 105–112.
30. Arvola L., Salonen K., Kankaala P., Lehtovaara A., 1992. Vertical distributions of bacteria and algae in a steeply stratified humic lake under high grazing pressure from *Daphnia longispina*. *Hydrobiologia*, 229(1), 253–269.
31. Savvichev A., Babenko V., Lunina O., Letarova M., Boldyreva D., Weslopolova E., Demidenko N., Kokryatskaya N., Krasnova E., Gaysin V., Kostryukova E., Gorlenko V., Letarov A., 2018. Sharp water column stratification with an extremely dense microbial population in a small meromictic lake Trekhtzvetnoe. *Environ. Microbiol.*, vol. 20, no. 10, 3784–3797.
32. Gusev E. S., 2008. Phytoplankton primary production in several karst lakes in central Russia. *Inland Water Biology*, 1(4), 356–361.
33. Митин И. В., Русаков В. С. Анализ и обработка экспериментальных данных. Учеб.-метод. пособие. 1998. М. 48 с.
34. Zhiltsova A. A., Kharcheva A. V., Krasnova E. D., Lunina O. N., Voronov, D. A., Savvichev A. S., Gorshkova O. M., Patsaeva S. V., 2018. Spectroscopic Study of Green Sulfur Bacteria in Stratified Water Bodies of the Kandalaksha Gulf of the White Sea. *Atmospheric and Oceanic Optics*, 31(4), 390–396.