

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

ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
КАФЕДРА ОБЩЕЙ ФИЗИКИ

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА
«СПЕКТРАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛОВ
d И *e* В ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЯХ»

Выполнила студентка
405 группы
Филиппова Ольга Алексеевна

Научные руководители:
аспирант Жильцова А. А.
к.ф.-м.н., доцент Пацаева С. В.

Допущена к защите « » _____ 2022 г.

Зав. кафедрой, профессор _____ А.М. Салецкий

Москва
2022

Оглавление

Введение	2
Глава 1. Спектральные свойства хлоросомных бактериохлорофиллов (обзор литературы).....	4
1.1. Аноксигенный фотосинтез и фотосинтетические пигменты зеленых серных бактерий (ЗСБ)	4
1.2. Хлоросомные бактериохлорофиллы и их спектры поглощения	5
1.5. Количественные измерения хлоросомных бактериохлорофиллов по спектрам поглощения и флуоресценции.....	14
Глава 2. Объекты и методы исследования.....	17
2.1. Образцы воды с зелеными серными бактериями и методика приготовления экстрактов....	17
2.2. Приготовление растворов бактериохлорофиллов в органических растворителях	18
2.3. Спектральная аппаратура и методы обработки спектров.....	18
Глава 3. Экспериментальные результаты	20
3.1. Концентрационная зависимость поглощения экстрактов Бхл <i>d</i> , приготовленных из бактерий, сконцентрированных на фильтре, в разных растворителях	20
3.2. Концентрационная зависимость поглощения экстрактов Бхл <i>e</i> , приготовленных из бактерий, сконцентрированных на фильтре, в разных растворителях	23
3.3. Спектры поглощения экстрактов Бхл <i>d</i> , приготовленных из проб природной воды	25
3.4. Положение максимума полос в спектрах поглощения в зависимости от растворителя	26
3.5. Расчет коэффициентов экстинкции Бхл <i>d</i> и <i>e</i> в различных растворителях.....	27
3.6. Флуоресценция экстрактов Бхл <i>d</i> , приготовленных из бактерий, сконцентрированных на фильтре, в разных растворителях	29
3.7. Флуоресценция экстрактов Бхл <i>e</i> , приготовленных из бактерий, сконцентрированных на фильтрах, в разных растворителях	31
3.8. Флуоресценция экстрактов Бхл <i>d</i> , приготовленных из проб природной воды	32
Глава 4. Обсуждение результатов	34
4.1. Сравнительный анализ характеристик спектров поглощения Бхл <i>d</i> и <i>e</i> в различных растворителях	34
4.2. Сравнительный анализ флуоресценции Бхл <i>d</i> и <i>e</i> в различных растворителях	37
4.3. Сравнение с известными величинами коэффициентов экстинкции Бхл <i>d</i> и <i>e</i> в различных растворителях	38
4.4. Применение найденных коэффициентов экстинкции для определения распределения концентрации Бхл <i>d</i> и <i>e</i> по глубине в водоемах	38
Заключение. Основные результаты и выводы.	40
Список использованных источников.....	42

Введение

Работа посвящена изучению спектральных характеристик бактериальных фотосинтетических пигментов – бактериохлорофиллов (Бхл) *d* и *e* – в различных органических растворителях. Бхл *d* и *e* называют «хлоросомными», поскольку в клетках зелёных серных бактерий (ЗСБ) они находятся в специализированных органеллах, хлоросомах, выполняющих роль светособирающей антенны при фотосинтезе [1] ЗСБ относятся к аноксигенным фототрофным бактериям, осуществляющим бескислородный фотосинтез. Так как ЗСБ могут существовать только в анаэробной среде [2] и при фотосинтезе используют сероводород, то присутствие ЗСБ в водной среде говорит о гипоксии и сероводородном заражении водоема. Расчет концентрации хлоросомных Бхл в слое воды позволяет выявить сероводородное заражение и сделать прогноз, что ждёт водоём в дальнейшем.

Одним из методов определения концентрации Бхл в воде является приготовление экстрактов пигмента в органическом растворителе, измерение спектров поглощения экстракта и последующий расчет концентрации Бхл через известный коэффициент экстинкции и оптические плотности [3]. Однако не для всех растворителей, используемых при экстрагировании Бхл, определены коэффициенты экстинкции. В настоящее время известны коэффициенты экстинкции для Бхл *d* в растворах ацетона и метанола, а также для Бхл *e* в растворах ацетона, метанола, этанола и ацетон:метанола в пропорции 7:2, определенные в работах [4,5]. Практическое применение спектрофотометрического метода определения хлоросомных Бхл при одновременном присутствии разных типов Бхл требует знания коэффициентов экстинкции разных Бхл во всех растворителях, используемых для экстрагирования пигментов. Например, для смеси ацетон:метанола в пропорции 7:2 известен коэффициент экстинкции только для Бхл *e*, но не для Бхл *d*, хотя именно этот вариант растворителя рекомендуется использовать для хроматографического выделения пигментов [4, 6].

Целью работы являлось изучение характеристик спектров поглощения и спектров флуоресценции Бхл *d* и *e* в различных растворителях. В работе ставилась задача измерить спектры поглощения для Бхл *d* и Бхл *e* в таких растворителях как ацетон, метанол, этанол, изопропанол, а также в смесях ацетона и метанола (взятых в соотношении 7 к 2) и ацетона и этанола (в соотношении 7 к 2). С помощью полученных данных были рассчитаны коэффициенты экстинкции для разных органических растворителей и определены концентрации фотосинтетических пигментов в пробах природной воды. При этом были уточнены спектрофотометрические формулы расчета концентрации хлоросомных бактериохлорофиллов – значение длины волны, для которой берется оптическая плотность и числовые коэффициенты. Другой задачей являлось измерение спектров испускания флуоресценции Бхл *d* и Бхл *e* в нескольких органических растворителях при разных длинах волн возбуждения и установление закономерностей изменения полосы флуоресценции при варьировании растворителя. Для приготовления экстрактов Бхл *d* и *e* были использованы пробы природной воды с зеленоокрашенными и коричневоокрашенными ЗСБ из меромиктических водоемов Кандалакшского залива Белого моря, озера Трёхцветное и Лагуны на Зелёном мысу, отобранные в ходе экспедиций на Белое море в 2021 году, а также пробы воды с зеленоокрашенными ЗСБ, отобранными из озера Трёхцветное в ходе зимней экспедиции в 2022 году.

Результаты дипломной работы важны как для применения спектральных методов для мониторинга водных экосистем Арктического региона, так и для одной из фундаментальных проблем спектроскопии – изучения спектрально-люминесцентных свойств сложных органических комплексов в различных условиях.

Глава 1. Спектральные свойства хлоросомных бактериохлорофиллов (обзор литературы)

1.1. Аноксигенный фотосинтез и фотосинтетические пигменты зеленых серных бактерий (ЗСБ)

ЗСБ относятся к аноксигенным фототрофным бактериям, в клетках которых протекает аноксигенный фотосинтез – процесс синтеза углеводов из неорганических веществ за счёт энергии солнца, происходящий без выделения кислорода. Донорами электронов в таком типе фотосинтеза чаще всего являются водород и сульфиды [7]. Формула аноксигенного фотосинтеза бактерий:

$2\text{H}_2\text{S} + \text{CO}_2 + \text{световая энергия} \rightarrow 2\text{S} + \text{H}_2\text{O} + [\text{CH}_2\text{O}]$, где $[\text{CH}_2\text{O}]$ - формула органического вещества, образуемого из CO_2 .

Аноксигенный фотосинтез возник около 3,7-3,8 млрд лет назад и эволюционно предшествовал кислородному фотосинтезу (с выделением кислорода), который появился только 2,7-2,8 млрд лет назад. К аноксигенному фотосинтезу также способны пурпурные бактерии и геликобактерии, а основным фотосинтетическим пигментом реакционного центра является, в отличие от кислородного фотосинтеза у растений, не хлорофилл (Хл), а бактериохлорофилл (Бхл) [7].

Фотосинтетическими пигментами ЗСБ являются хлоросомные Бхл *c*, *d*, *e*, а также Бхл *a*.

Хлоросомные Бхл внутри бактерий содержатся в агрегированной форме в специальных органеллах – хлоросомах, прикрепленных к клеточной мембране [8]. Все фототрофные бактерии содержат также вспомогательные пигменты каротиноиды. Основной функцией каротиноидов является прямая передача поглощенной солнечной энергии на Бхл в синем и зеленом спектральном диапазоне, также они выполняют антиоксидантные и фотопротекторные функции [9]. ЗСБ по окраске клеток делятся на два типа: зеленоокрашенные ЗСБ (пигментами являются Бхл *c*, *d* и каротиноид хлоробактин) и

коричневоокрашенные ЗСБ (пигментами являются Бхл *e* и каротиноид изорениератин) [10].

Хлоросомы ЗСБ состоят из ядра и оболочки толщиной 2-3 нм (Рис. 1). Ядро представляет собой 10-30 элементов в виде стержней или цилиндров, заполненных молекулами Бхл, а оболочка состоит в основном из галактолипидов и некоторого количества белковых молекул [10].

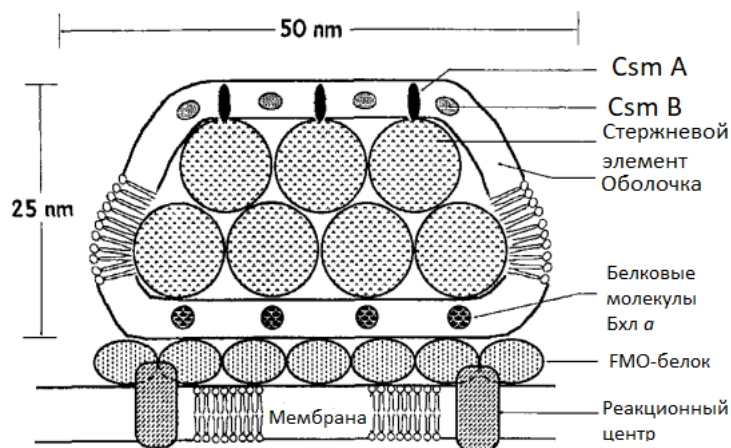


Рис. 1. Модель антенной системы ЗСБ [10].

1.2. Хлоросомные бактериохлорофиллы и их спектры поглощения

Молекулы Бхл, как и Хл, относятся к тетрапиррольным пигментам (порфириновым соединениям), которые синтезируются различными фотосинтезирующими организмами [11]. Бактериохлорофиллы, которые обнаружены в ЗСБ, делятся на два типа: хлоросомные бактериохлорофиллы (ранее в литературе назывались *chlorobium chlorophylls*) и Бхл *a*. Бхл *a* найден в большинстве пурпурных бактерий и во всех реакционных центрах ЗСБ [12]. Однако Бхл *a* в ЗСБ находится в меньшей концентрации, чем хлоросомные Бхл *c*, *d* и *e*. Так, например, фотосинтетическая единица ЗСБ может содержать 1000-2000 молекул хлоросомных Бхл и около 100 молекул Бхл *a* [10].

На Рис. 2 представлена общая химическая структура молекулы хлоросомных Бхл. Между собой структуры Бхл *c*, *d* и *e* различаются радикалами. Молекула Бхл *c* содержит $R_1 = CH_3 = R_2$, $R_3 = C_2H_5$ или $R_3 = C_3H_7$ или $R_3 = C_4H_9$, $R_4 = C_2H_5$ или $R_4 = CH_3$, R_5 – фарнезил или фитил. Молекула Бхл *d* содержит $R_1 = H$, $R_2 = CH_3$, $R_3 = C_2H_5$ или $R_3 = C_3H_7$ или $R_3 = C_4H_9$ или $R_3 = C_5H_{11}$, $R_4 = C_2H_5$ или $R_4 =$

CH₃, R₅ – фарнезил. Молекула Бхл *e* содержит R₁ = CH₃, R₂ = CHO, R₃ = C₂H₅ или R₃ = C₃H₇ или R₃ = C₄H₉, R₄ = C₂H₅, R₅ – фарнезил.

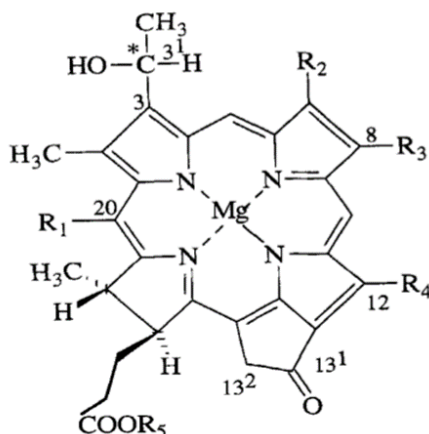


Рис. 2. Химическая структура молекул Бхл *c*, *d*, *e* [10].

Для изучения спектральных характеристик Бхл производится измерение и анализ спектров поглощения Бхл – в клетках или экстрактах в органических растворителях. Спектры поглощения Бхл отличаются в зависимости от того, исследуются ли клетки бактерий или экстракты (Рис. 3), поскольку в экстрактах Бхл содержится в мономерной форме, а в клетках – в высоко агрегированной. В спектрах поглощения и экстрактов, и клеток хлоросомных Бхл *c*, *d* и *e* наблюдается два максимума – в длинноволновой и коротковолновой областях, однако для экстрактов максимумы сдвинуты в более коротковолновую область [13, 14].

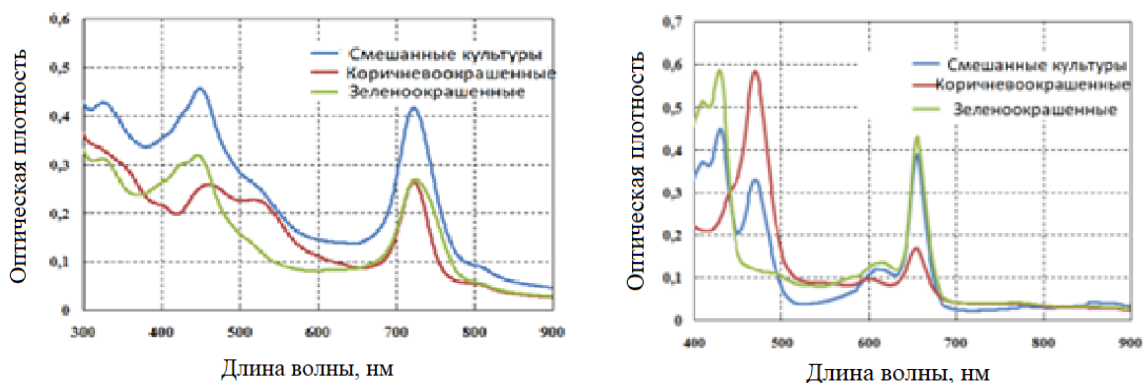


Рис. 3. Спектры поглощения Бхл культур зеленых серных бактерий в клетках (слева) и ацетон-метаноловых экстрактах (справа) [15].

На Рис. 4 представлен спектры поглощения хлоросом, выделенных из культур ЗСБ: Бхл *c*, *d* и *e*. Спектры поглощения на Рис. 4 похожи по форме и положению максимумов на спектры поглощения клеток.

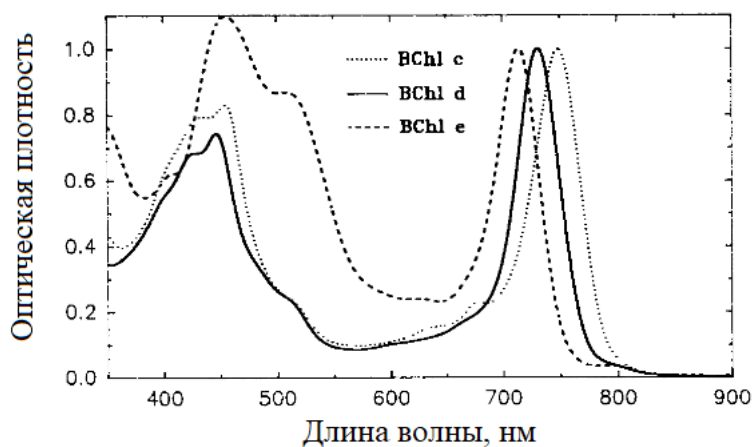


Рис. 4. Спектры поглощения хлоросом, выделенных из культур ЗСБ: Бхл *c*, Бхл *d* и Бхл *e*. [16].

В спектрах поглощениях клеток максимумы оптической плотности соответствуют следующим длинам волн: Бхл *d* – 450, 715-745 нм, Бхл *c* – 457-460, 745-760 нм, Бхл *e* – 460-462, 715-725 [13].

В работе [15] были исследованы спектры поглощения Бхл в клетках и установлено, что в клетках зеленоокрашенных форм ЗСБ максимум, обусловленный поглощением Бхл *d*, приходится на длину волны 450 нм, в то время как в коричневоокрашенных формах ЗСБ в коротковолновой области наблюдается два максимума – на длинах волн 465 нм (поглощение Бхл *e*) и 525 нм (поглощение каротиноидов). В работе [15] в спектрах поглощения ацетон-метаноловых экстрактов наблюдались максимумы на длинах волн 430 нм (в зеленоокрашенных формах ЗСБ) для Бхл *d* и на 470 нм (в коричневоокрашенных формах ЗСБ) для Бхл *e*.

Спектры поглощения экстрактов одних и тех же пигментов отличаются в зависимости от растворителя, в котором был растворен пигмент – так, в работе [5] для одного и того же штамма Бхл *d* максимумы пришлись на длины волн 406, 427, 530, 577,5, 612.5 и 654 нм в ацетоне и на 411, 427, 612.5, 659 нм в метаноле. Может различаться и количество пиков поглощения в зависимости от штамма

бактерий: для Бхл *c* (*Clorobium vibroforme f. Triosulfatophilum*, штамм NCIB 8346) в растворе ацетона в [17] наблюдалось 4 пика поглощения на длинах волн 661 нм, 629 нм, 431 нм и 412 нм, в то время как в [18] для штамма В в растворе ацетона было определено 3 пика на длинах волн 663 нм, 627 нм и 434 нм.

1.3. Коэффициенты экстинкции хлорофиллов и бактериохлорофиллов в различных растворителях

Коэффициент экстинкции является одной из величин, характеризующей поглощение. С помощью коэффициента экстинкции можно определить концентрацию поглощающего свет соединения в растворе, а для фотосинтетических пигментов, к которым относятся и Бхл, можно определить их концентрацию в экстрактах и затем рассчитать концентрацию в клетках микроорганизмов в толще воды отделяющихся водоемов. Измеренная концентрация хлоросомных Бхл в совокупности с данными о ее годовой динамике позволяет сделать выводы о степени отделения водоема от моря, а также наблюдать его эволюцию [19].

Различают молярный и удельный коэффициенты экстинкции. Эти коэффициенты экстинкции находятся из закона Бугера-Ламберта-Бера, записанного в виде экспоненты: $I_1 = I_0 e^{-\epsilon Cl}$, где I_0 - интенсивность падающего на образец света, I_1 - значение интенсивности после прохождения слоя толщиной l [см], C – концентрация раствора. При определении молярного коэффициента экстинкции концентрация выражена в [моль/л]. Молярный коэффициент экстинкции имеет размерность [л/моль · см] и принимает значения от 0 до 10^5 л/моль · см [20].

Существует также десятичный молярный коэффициент экстинкции, который входит в закон Бугера-Ламберта-Бера, записанный в виде степени 10: $I_1 = I_0 10^{-\epsilon_{10} Cl}$. Он связан с обычным соотношением $\epsilon_{10} \approx 0,4343\epsilon$. Десятичный молярный коэффициент экстинкции связан с оптической плотностью соотношением $D = \epsilon_{10} \cdot C \cdot l$, поэтому именно его наиболее удобно использовать при использовании данных из спектров поглощения.

При определении удельного коэффициента экстинкции концентрация выражена в [г/л]. Удельный коэффициент экстинкции ϵ выражается в [л/г · см] и связан с молярным $\epsilon_{\text{мол}}$ соотношением: $\epsilon \cdot M = \epsilon_{\text{мол}}$, где M – молекулярный вес пигмента.

Коэффициент экстинкции для Бхл d был определен экспериментально трудоемкими хроматографическими методами в 1960 году в работе [5] для таких растворителей как ацетон и метанол. Для выделения Бхл 5 г высушенных клеток штамма *thiosulfatophilum strain L* суспендировали в 20 мл воды. Полученную суспензию смешивали с 4 объемами метанола и центрифугировали, после чего осадок экстрагировали порциями 80%-го метанола и к данным метанольным экстрактам в делительной воронке был добавлен равный объем эфира, и пигменты переводились в эфир. Далее эфирный слой был несколько раз промыт, просушен, упарен и смешан в отношении 1:5 с петролейным эфиром. Основная масса пигмента выпадала в осадок, который собирали, промывали и растворяли в эфире. Полученный эфирный раствор доводился до нужного объема, смешивался с равным объемом петролейного эфира и адсорбировали на колонке с сахарной пудрой. В колонке было получено несколько полос, которые соответствовали разным пигментам, и в итоге были выделены три полосы, соответствующие Бхл. Таким же образом была приготовлена и разделена хроматографически еще одна партия пигмента, после чего они были смешаны и повторно разделены хроматографически, и в колонке была обнаружена одна широкая зеленая полоса, хорошо отделенная от мелких примесей, которые остались в верхней части колонны. Далее колонка была высушена и основная зеленая полоса элюирована эфиром. Полученный пигмент был растворен в ацетоне и метаноле, после чего были измерены спектры поглощения и определены коэффициенты экстинкции для каждой полосы поглощения.

Коэффициент экстинкции для Бхл e был определен экспериментально в 1998 году в работе [4] в таких растворителях как ацетон, метанол, этаноле и ацетон-метанол 7:2 не менее трудоемким способом, включающим в себя использование высокоэффективной жидкостной хроматографии, выделения чистого пигмента и

его взвешивания. Опишем эту процедуру подробнее. Для определения коэффициента экстинкции Бхл *e* была выращена культура из штамма *Chlorobium phaeobacteroides* CL1401. Чистый Бхл *e* был выделен с помощью центрифугирования и дополнительного очищения с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. После очистки чистый пигмент был взвешен на аналитических весах, и были приготовлены экстракты в органических растворителях. Для каждого экстракта были измерены спектры поглощения, и из значений оптической плотности, концентрации (определенной из массы пигмента и объема растворителя) были рассчитаны коэффициенты экстинкции.

Из описания методик измерения коэффициентов экстинкции Бхл *d* и *e* видно, что это достаточно трудоемкие процедуры. Известные на данный момент коэффициенты экстинкции хлоросомных Бхл представлены в Табл. 1.

Табл. 1. Известные из литературы коэффициенты экстинкции хлоросомных Бхл.

Бхл	Растворитель	Коэффициент экстинкции, л/г*см	Источник
Бхл <i>e</i>	ацетон	58,6	[4]
Бхл <i>e</i>	этанол	49	[4]
Бхл <i>e</i>	метанол	42,5	[4]
Бхл <i>e</i>	ацетон:метанол (7:2)	49,6	[4]
Бхл <i>d</i>	ацетон	98	[5]
Бхл <i>d</i>	метанол	82,3	[5]

К настоящему моменту опубликовано всего несколько работ, посвященных измерению коэффициента экстинкции хлоросомных Бхл, и всего в нескольких растворителях. Поэтому определение коэффициентов экстинкции является актуальной и важной задачей.

1.4. Флуоресценция хлоросомных бактериохлорофиллов

Спектры флуоресценции, как и спектры поглощения Бхл зависят от формы нахождения пигмента – в агрегированном состоянии в хлоросоме или клетке, или в мономерном состоянии в растворе или экстракте. В спектрах флуоресценции Бхл клеток ЗСБ наблюдаются две основные полосы: с максимумом в области 740–770 нм (Бхл *c*, *d* и *e*) и 810–815 нм (Бхл *a*) [21, 22, 23, 24]. Пики испускания могут сдвигаться в зависимости от вида бактерий, их пигментного состава [21].

Исследования спектров испускания и возбуждения флуоресценции клеток ЗСБ были проведены в работе [15]. При возбуждении длинами волн 390 и 440 нм в спектрах испускания флуоресценции были обнаружены два максимума – в области 740-770 и 815 нм соответственно, причем второй максимум наблюдался и для зеленоокрашенных, и для коричневоокрашенных ЗСБ. Первый максимум приходился на 765 нм для Бхл *d* и 745 нм для Бхл *e*. В спектрах возбуждения флуоресценции (при длинах волн испускания 770 и 815 нм) длинноволновый максимум располагался на 720 нм для обоих типов ЗСБ. Коротковолновый максимум для Бхл *d* был обнаружен на длине волны 450 нм в зеленоокрашенной форме ЗСБ, а в коричневоокрашенной форме наблюдалось два максимума – на 460 нм (обусловленный свечением Бхл *e*) и 530 нм (флуоресценция каротиноидов) соответственно.

В работе [21] были исследованы спектры испускания флуоресценции при различных соотношениях концентраций двух типов ЗСБ. Были обнаружены пики флуоресценции в области 740–770 нм, соответствующие испусканию света молекулами Бхл *c*, *d* и *e* (Рис. 5).

Номер спектра	% зеленоокрашенных	% коричневоокрашенных
1	100	0
2	75	25
3	60	40
4	45	55
5	0	100

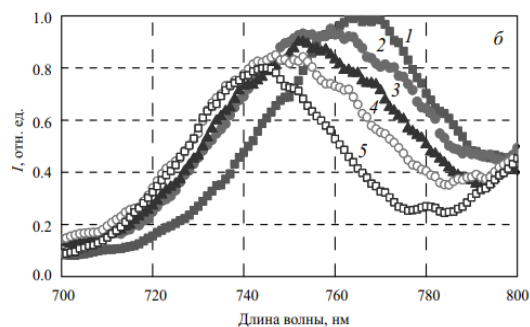


Рис. 5. Зависимость положения максимума флуоресценции Бхл от соотношения концентраций двух типов зеленых серных бактерий [21].

В работе [13] были исследованы спектры флуоресценции ЗСБ и установлено, что максимумы для Бхл *d* и *e* приходятся на 763 и 738 нм соответственно. Также было обнаружено, что пигменты ЗСБ обладают переменной флуоресценцией, которая может регулироваться воздействием света.

В экстрактах, в отличие от клеток, Бхл находятся в мономерной форме, что обуславливает различия в их спектрах флуоресценции. Спектры флуоресценции экстрактов Бхл характеризуются смещением полос в более коротковолновую область спектра по сравнению со спектрами флуоресценции водных растворов клеток [25].

Существует несколько работ по исследованию спектров флуоресценции Бхл в экстрактах. В работе [24] были представлены спектры испускания флуоресценции экстрактов Бхл *d*. Спектры испускания флуоресценции Бхл в экстрактах имеют два максимума: главный на длине волны примерно 660 нм и второй, с меньшей интенсивностью, на длине волны около 725 нм (Рис. 6).

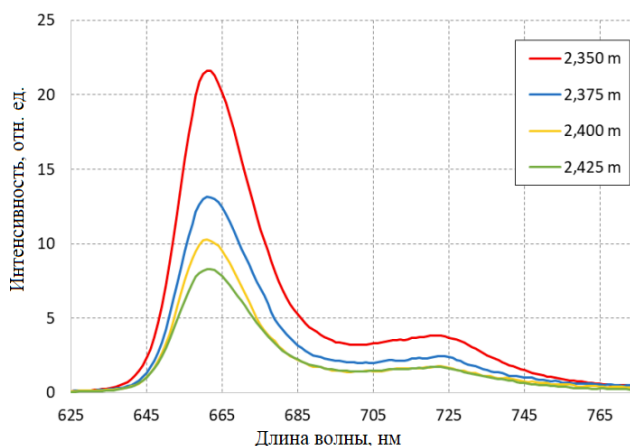


Рис. 6. Спектр испускания флуоресценции экстракта Бхл *d* [24].

В работе [25] была также исследована флуоресценция Бхл *d*, но уже в трех различных растворителях при одинаковой концентрации. Было обнаружено, что интенсивность испускания флуоресценции Бхл *d* в метаноле значительно выше, чем в воде, насыщенной гексанолом, что указывает на сильное тушение (уменьшение интенсивности из-за взаимодействия флуоресцирующего вещества с другим веществом) во втором случае. Длина волны, соответствующая максимальной интенсивности, составила 669 и 671 нм для растворов в метаноле и насыщенной гексанолом воде и 747 нм для Бхл *d* в воде. Этот сдвиг в более длинноволновую область обусловлен тем, что в воде Бхл *d* содержался в агрегированной форме в хлоросомах живых клеток, а в экстрактах – в мономерной (Рис. 7). Такое же различие наблюдалось в работе [26] при изучении флуоресценции Бхл *c*.

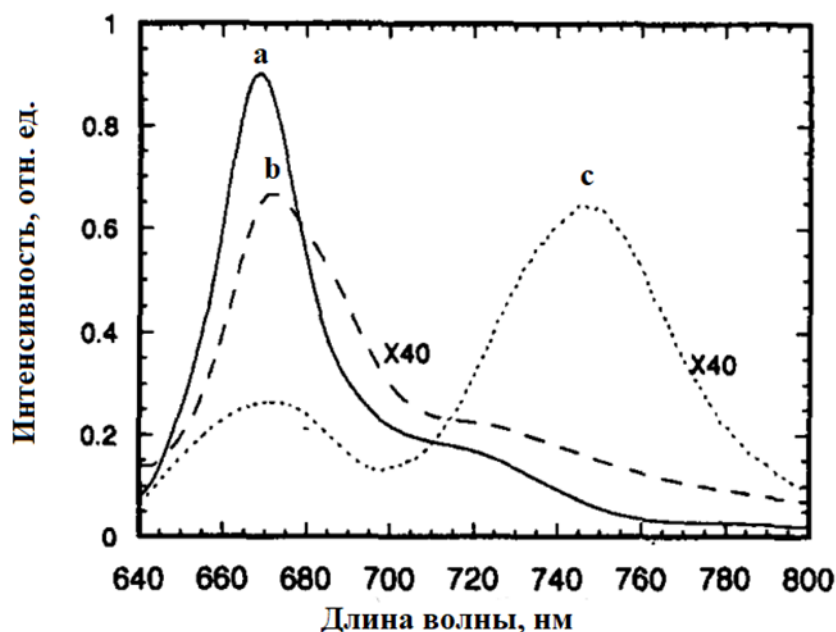


Рис. 7. Спектры испускания флуоресценции Бхл *d* в (а) метаноле, (б) насыщенной гексанолом воде, (с) воде [25].

В работе [27] были исследованы спектральные характеристики экстрактов хлоросомного Бхл *c*, присутствующего в зеленоокрашенных формах ЗСБ. В частности, были построены спектры испускания флуоресценции экстракта мономерной формы Бхл *c* в этаноле и Бхл *c* в агрегированной форме (Рис. 8).

Агрегированная форма Бхл была приготовлена двумя способами: первый метод, названный «быстрым» методом, заключался в быстром введении смеси пигментов в водный буферный раствор и энергичном встряхивании. Второй, «медленный», метод был основан на медленном добавлении буферного раствора в смесь пигментов. Спектры испускания флуоресценции были использованы для сравнения квантовых выходов флуоресценции (показателей, равных отношению количества испускаемых фотонов к числу поглощаемых) для двух форм Бхл с. Было установлено, что агрегация приводит к существенному уменьшению квантового выхода флуоресценции, примерно на два порядка.

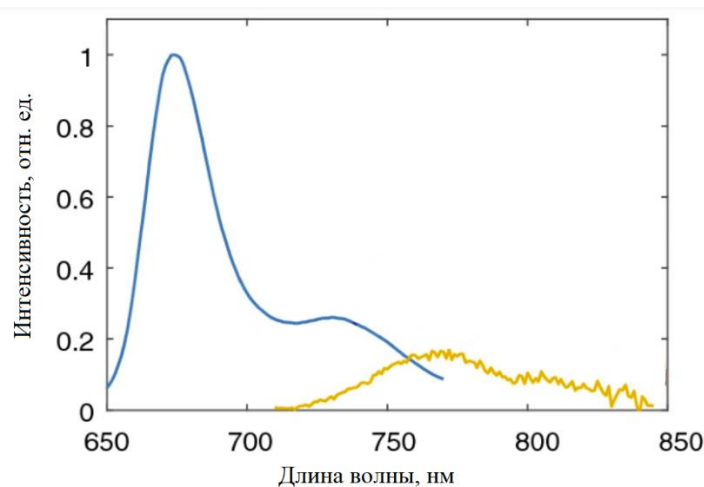


Рис. 8. Спектр флуоресценции экстракта Бхл с в этаноле при длине волны возбуждения 425 нм (кривая синего цвета); спектр испускания агрегированного Бхл с при длине волны возбуждения 700 нм (кривая желтого цвета) [27].

1.5. Количественные измерения хлоросомных бактериохлорофиллов по спектрам поглощения и флуоресценции

На данный момент существует три способа определения концентрации Бхл *d* и *e* по спектрам поглощения и флуоресценции. Первый метод вычисления концентраций основан на формулах, полученных из закона Бугера-Ламберта-Бера, для спектров поглощения экстрактов [3]

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

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

где D_{655} — оптическая плотность ацетон-этанолового (7:2) экстракта на длине волн 655 нм, откорректированная на рассеяние (корректировка на рассеяние

проводится путем вычитания минимума оптической плотности в длинноволновой области спектра, отвечающего за рассеяние); $\varepsilon_{Bchl\ d}$ — коэффициент экстинкции Бхл $d = 98,0 \text{ мл} \cdot (\text{мг} \cdot \text{см})^{-1}$; $\varepsilon_{Bchl\ e}$ — коэффициент экстинкции Бхл $e = 49,6 \text{ мл} \cdot (\text{мг} \cdot \text{см})^{-1}$ [14]; l — длина оптического пути кюветы (см); v — объем ацетон-метанолового экстракта (мл); V — объем воды в экстракте (или отфильтрованной воды) (мл); θ — доля фильтра, использованного для приготовления экстракта (при отсутствии фильтрации $\theta = 1$).

Однако эти формулы не позволяют рассчитать концентрацию в случае присутствия обоих пигментов в водоёме, поэтому в работе [3] данная проблема была решена путем введения эффективного коэффициента экстинкции

$$\varepsilon_{eff} = \frac{\varphi_{Bchl\ d}}{\varepsilon_{Bchl\ d}} + \frac{\varphi_{Bchl\ e}}{\varepsilon_{Bchl\ e}}, \text{ где } \varphi_{Bchl\ d} \text{ и } \varphi_{Bchl\ e} \text{ — доли Бхл } d \text{ и Бхл } e \text{ в смеси.}$$

С учетом введенного коэффициента экстинкции была введена формула для расчета суммарной концентрации в случае присутствия обеих форм ЗСБ:

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

Второй метод вычисления концентраций Бхл позволяет делать расчеты по спектрам поглощения непосредственно в воде. В работе [3] была обнаружена пропорциональная зависимость между площадью длинноволновой полосы в спектрах поглощения Бхл в пробах воды с вычтенным пьедесталом рассеяния и концентрациями, рассчитанными по формулам для концентраций Бхл d и Бхл e , причем коэффициент A , связывающий две величины, оказался близким для всех серий измерений, и итоговый эмпирический коэффициент был определен как среднее значение из девяти измерений и оказался равен $A = 336 \pm 9 \text{ мг}/(\text{нм} \cdot \text{м}^3)$. Таким образом, итоговая формула для расчета концентраций во втором методе оказалась следующей: $C (\text{Бхл } d, e) = 336 \cdot \Sigma D$.

Третий метод расчета концентраций был описан в работе [24] и позволяет делать расчеты по спектрам флуоресценции экстрактов:

$$C (\text{Бхл } d, e) = Fl \cdot \frac{C_{max}}{Fl_{max}}, \text{ где } C_{max} \text{ — максимальная концентрация Бхл, } Fl_{max} \text{ —}$$

соответствующая ей максимальная концентрация. Сравнение трех методов было

проведено в работе [28] для определения концентрации Бхл d на примере воды из озера Трёхцветное. Было установлено, что все три метода можно применять для расчета концентраций, при этом третий метод определения концентраций по спектрам флуоресценции экстрактов применим в случае маленьких концентраций Бхл, однако для построения спектров флуоресценции требуется флуориметр в отличие от первых двух способов. Второй метод определения концентраций по спектрам поглощения воды менее точный чем первый метод по спектрам поглощения экстрактов, но при этом он не требует дополнительной обработки проб воды. Сравнение концентраций, рассчитанных по трем методам, доказало состоятельность каждого из них.

Глава 2. Объекты и методы исследования

В ходе выполнения работы были исследованы пробы воды, отобранные в ходе экспедиций на Белое море в августе-сентябре 2021 года, а также в марте 2022 года. Образцы воды были отфильтрованы с целью осаждения клеток ЗСБ на фильтре. Вода для фильтров с коричневоокрашенными ЗСБ была взята из Лагуны на Зеленом мысе с глубины 5,3 м, для зеленоокрашенных – из озера Трёхцветное с глубины 2,2 м. Для осаждения бактерий был использован стекловолоконный фильтр с размером пор 2 микрометра. Далее были приготовлены экстракты и измерены их спектры поглощения, испускания и возбуждения флуоресценции.

Также в работе были исследованы экстракты, приготовленные из проб воды, отобранной в ходе экспедиции на Белое море в марте 2022 года, из озера Трёхцветное с помощью многошприцевого пробоотборника, позволившего отобрать 23 пробы воды с интервалом по глубине 2,5 см (от глубины 1,8 м до 2,4 м с двумя пропущенными горизонтами, на которых находились рабочие механизмы для приведения пробоотборника в действие).

2.1. Образцы воды с зелеными серными бактериями и методика приготовления экстрактов

Для исследований были взяты четыре органических растворителя (ацетон, метанол, изопропанол и этанол) и приготовлены два новых смешанных растворителя – ацетон:этанол (7:2), ацетон:метанол (7:2). Данные соотношения были взяты, поскольку смесь ацетона и метанола в соотношении 7 к 2 была удачно использована в качестве растворителя в экстрактах Бхл, и в работе [4] был определен коэффициент экстинкции для Бхл e в ацетон:метаноле (7:2). Однако ввиду токсичности и труднодоступности метанола также был исследован растворитель, содержащий вместо метанола – этанол в той же пропорции.

Для приготовления 100%-ных экстрактов Бхл из клеток бактерий, осажденных на фильтрах, которые в дальнейшем были разбавлены, использовалась следующая методика: было приготовлено два концентрированных раствора из 5 мл ацетона и 2,5 фильтров (с

зеленоокрашенными и коричневоокрашенными ЗСБ соответственно), после чего для каждого из шести органических растворителей были приготовлены экстракты, содержащие 8 мл растворителя и 0,16 мл концентрированного раствора.

Для приготовления экстрактов из проб природной воды было взято по 4 мл растворителя и 1 мл природной воды из каждого шприца. Для избавления от избыточного рассеяния и уменьшения шумов в спектрах поглощения взвешенные частицы в полученных экстрактах были осаждены с помощью центрифугирования (центрифугирование было осуществлено с помощью центрифуги Elmi CM-50, осуществлявшей осаждение со скоростью 13000 оборотов/мин в течение 5 минут).

2.2. Приготовление растворов бактериохлорофиллов в органических растворителях

Для приготовления разбавленных экстрактов с различной концентрацией были взяты экстракты, приготовленные из бактерий, сконцентрированных на фильтрах, и растворители в количестве, приведенном в Таблице 2.

Табл. 2. Объемы растворителя и исходного экстракта для приготовления разбавленных растворов с различной концентрацией пигмента.

Относительная концентрация раствора	Кол-во растворителя (мл)	Кол-во исходного экстракта (мл)
100%	0	4
50%	2	2
25%	3	1
15%	3,4	0,6

2.3. Спектральная аппаратура и методы обработки спектров.

Спектры оптической плотности экстрактов были измерены при помощи спектрофотометра Solar PB2201 в спектральном диапазоне от 300 до 800 нм. Спектры поглощения экстрактов регистрировали по отношению к нулевой

линии, измеренной из растворителя или смеси растворитель-вода. Спектры испускания и возбуждения флуоресценции были зарегистрированы на флуориметре Solar CM2203 при различных длинах волн возбуждения и испускания. Для спектров поглощения были использованы стандартные кварцевые кюветы с длиной оптического пути 1 и 3 см, для спектров флуоресценции – герметичная кювета с крышкой с длиной оптического пути 1 см. Спектры испускания флуоресценции были скорректированы на поглощение по формуле $I_{\text{corr}}=I \cdot 10^{0,5 \cdot (D_{\text{ex}}+D_{\text{em}})}$, где I_{corr} – скорректированное значение интенсивности флуоресценции, I – приборное значение интенсивности флуоресценции, D_{ex} и D_{em} – значения оптической плотности образца на длине волны возбуждения и испускания соответственно.

Глава 3. Экспериментальные результаты

3.1. Концентрационная зависимость поглощения экстрактов Бхл *d*, приготовленных из бактерий, сконцентрированных на фильтре, в разных растворителях

Были построены спектры поглощения экстрактов Бхл *d* различной концентрации (с относительной концентрацией 15%, 25%, 50%, 100%) в шести органических растворителях. Для расчета абсолютной концентрации экстрактов был взят спектр поглощения Бхл *d* в ацетоне. Максимум оптической плотности в длинноволновой области, приходящийся на длину волны 655 нм и обусловленный поглощением Бхл *d*, связан с концентрацией экстракта с помощью закона Бугера-Ламберта-Бера: $D = \varepsilon_{10} \cdot C \cdot l$, где D – оптическая плотность (безразмерная величина), ε_{10} – десятичный молярный коэффициент экстинкции [литр/(моль·см)], C – концентрация [моль/л], l – длина оптического пути [см]. Десятичный молярный коэффициент экстинкции связан с обыкновенным соотношением $\varepsilon_{10} \approx 0,4343\varepsilon_{\text{мол}}$. Таким образом, $D = 0,4343 \cdot \varepsilon_{\text{мол}} \cdot C \cdot l$, и при переходе к удельному коэффициенту экстинкции ε [л/г·см] и концентрации с размерностью [г/л] получаем окончательную формулу для расчета концентрации: $C = D/0,4343\varepsilon \cdot l$.

Взяв оптическую плотность для 100%-ного экстракта $D = 0,66$, длину оптического пути $l = 1$ см и коэффициент экстинкции из [2] $\varepsilon = 98$ л/г·см, получаем, что концентрация 100%-ного экстракта равна 0,016 г/л или 16 мг/л. 50%-ный, 25%-ный и 15%-ный экстракты, таким образом, имеют концентрации 8 мг/л, 4 мг/л и 2,4 мг/л соответственно. Полученные спектры поглощения растворов Бхл *d* разной концентрации в различных органических растворителях представлены на Рис. 9.

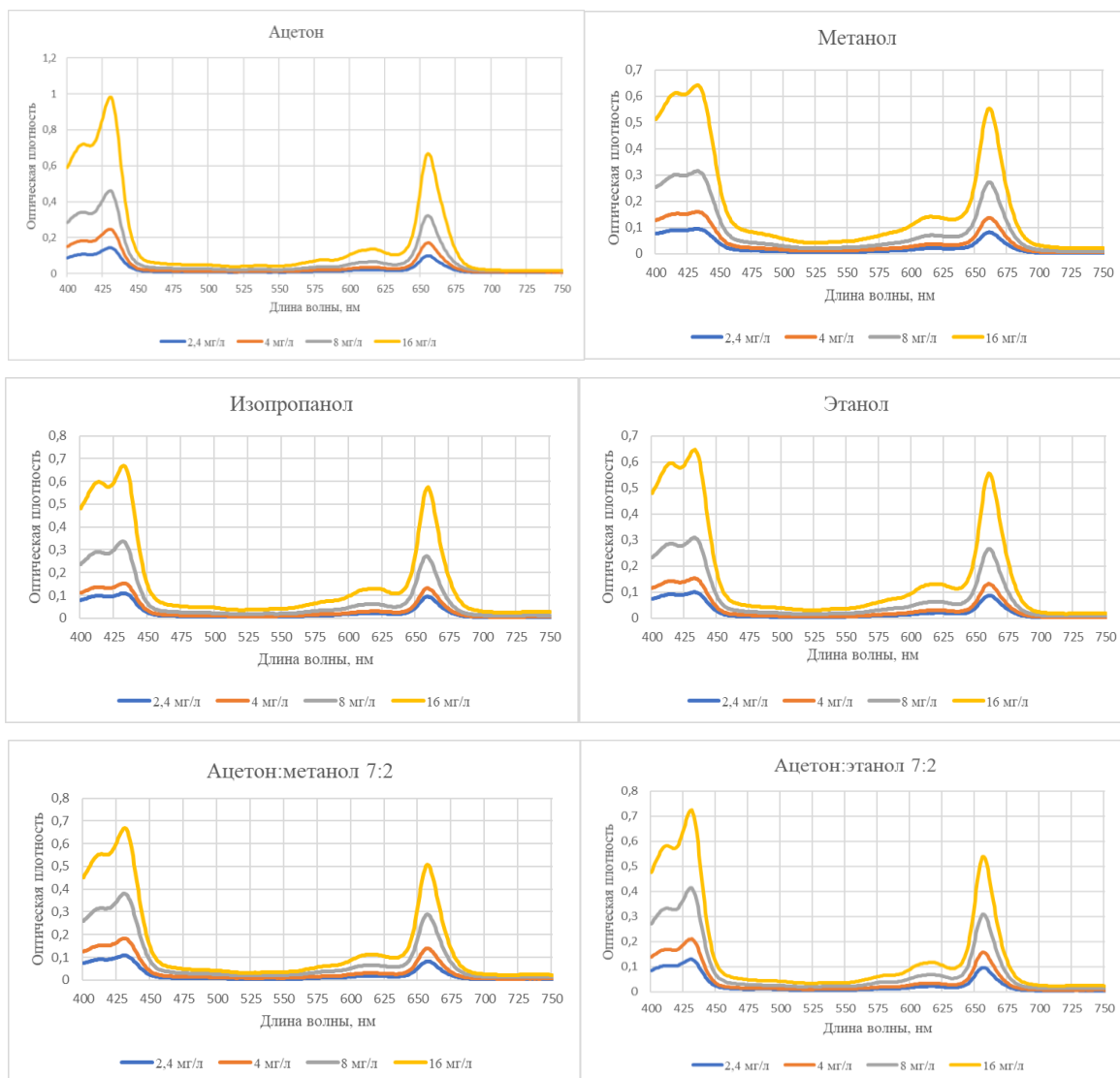


Рис. 9. Спектры поглощения экстрактов Бхл *d* в шести органических растворителях.

В представленных на Рис. 5 спектрах поглощения наблюдаются три основные полосы поглощения – широкая полоса в коротковолновой области (400-450 нм) с двумя максимумами оптической плотности, обусловленными поглощением Бхл *d* и каротиноидов, а также две полосы поглощения Бхл *d* в длинноволновой области: 650-670 нм и полоса с более пологим максимумом в диапазоне 600-625 нм. Также заметно, что соотношение оптических плотностей в двух максимумах в коротковолновой области (на длинах волн 400-440 нм) отличается для различных растворителей. В экстрактах, содержащих ацетон или его смеси в качестве растворителя, значительно больше оптическая плотность у пика, смещенного в более длинноволновую область (с максимумом на длине волны 654 нм). В этаноловых и изопропаноловых экстрактах также два максимума в

этой полосе различимы, но в метаноловом экстракте два максимума имеют очень близкие значения максимумов оптической плотности.

Для каждой серии спектров были построены зависимости максимума оптической плотности длинноволновой полосы поглощения, соответствующей Бхл d , в спектрах поглощения экстрактов от концентрации (Рис. 10), которые оказались линейными, что подтвердило выполнение закона Бугера-Ламберта-Бера.

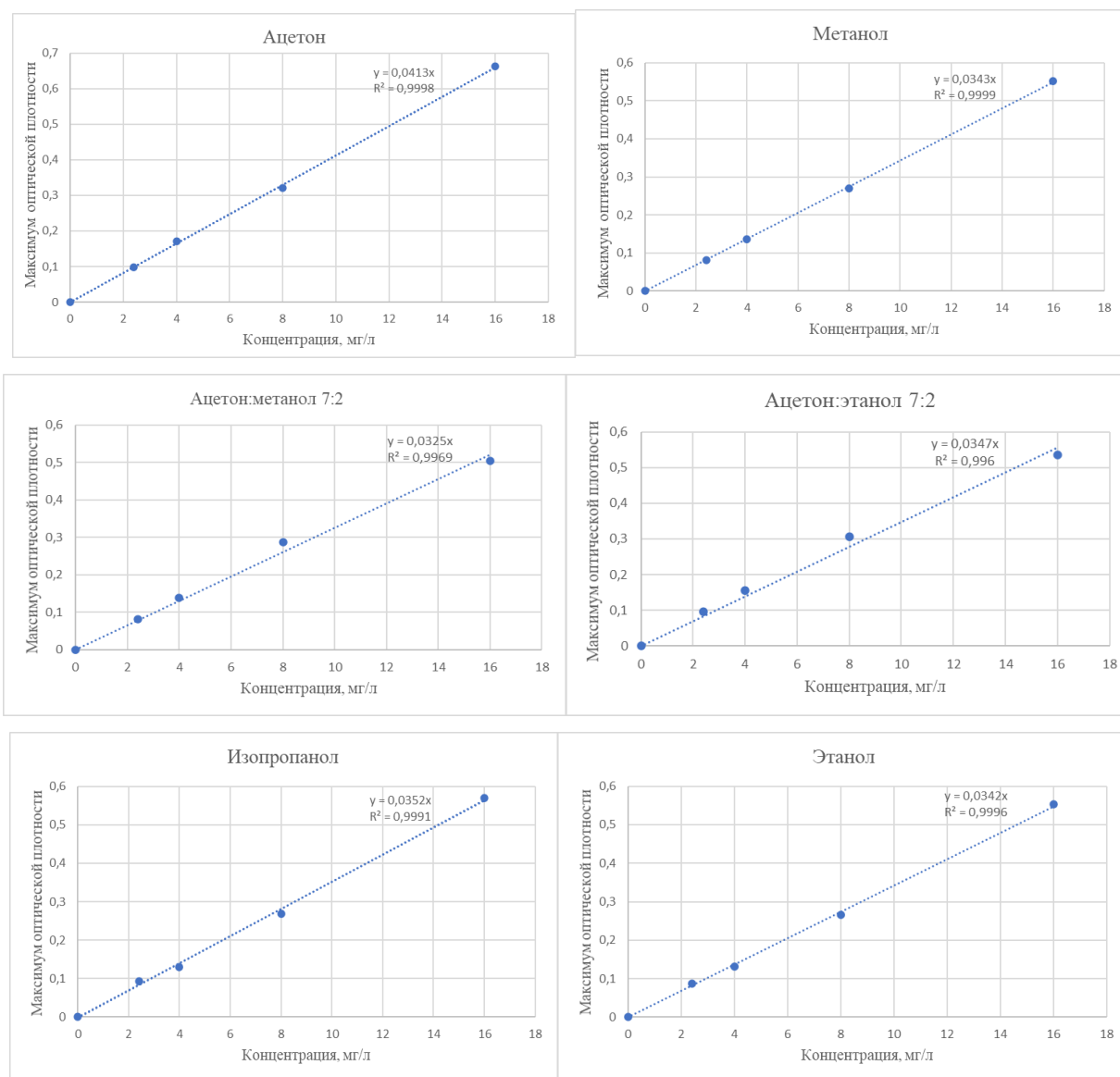


Рис. 10. Зависимости максимума оптической плотности длинноволновой полосы поглощения, соответствующей Бхл d , от концентрации в органических растворителях.

3.2. Концентрационная зависимость поглощения экстрактов Бхл *e*, приготовленных из бактерий, сконцентрированных на фильтре, в разных растворителях

Аналогично с п. 3.1. были построены спектры поглощения экстрактов Бхл *e* в шести органических растворителях с относительной концентрацией 15%, 25%, 50% и 100% (Рис. 11). Абсолютные концентрации экстрактов равны 2,1 мг/л, 3,5 мг/л, 7 мг/л и 14 мг/л.

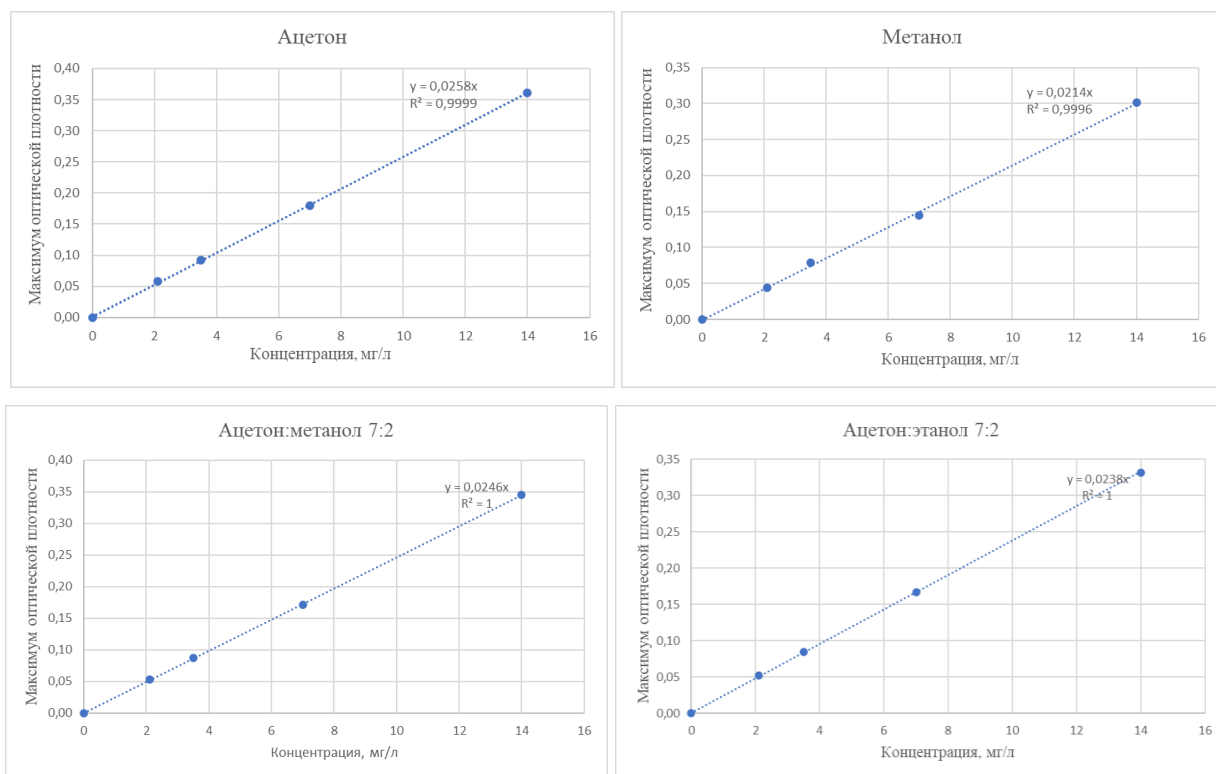


Рис. 11. Спектры поглощения экстрактов Бхл *e* в шести органических растворителях.

В представленных на Рис. 11 спектрах поглощения наблюдаются три основные полосы поглощения – широкая полоса в коротковолновой области (400-490 нм) с двумя максимумами оптической плотности, обусловленными

поглощением Бхл *e* (правее) и каротиноидов (левее), а также поглощения Бхл *e* в длинноволновой области в районе 650-670 нм и полоса, заметная в спектрах ацетоновых и ацетон:метаноловых экстрактов на длинах волн 710-730 нм и соответствующая поглощению Бхл *a*. Из спектров поглощения следует, что соотношение двух максимумов в коротковолновой области отличается для различных растворителей: в экстрактах, содержащих ацетон или его смеси в качестве растворителя, значительно больше оптическая плотность у пика, смещенного в более коротковолновую область.

Также были построены зависимости максимальной оптической плотности в длинноволновой полосе поглощения Бхл *e* от концентрации, что также подтвердило корректность измерений и выполнение закона Бугера-Ламберта-Бера (Рис. 12).



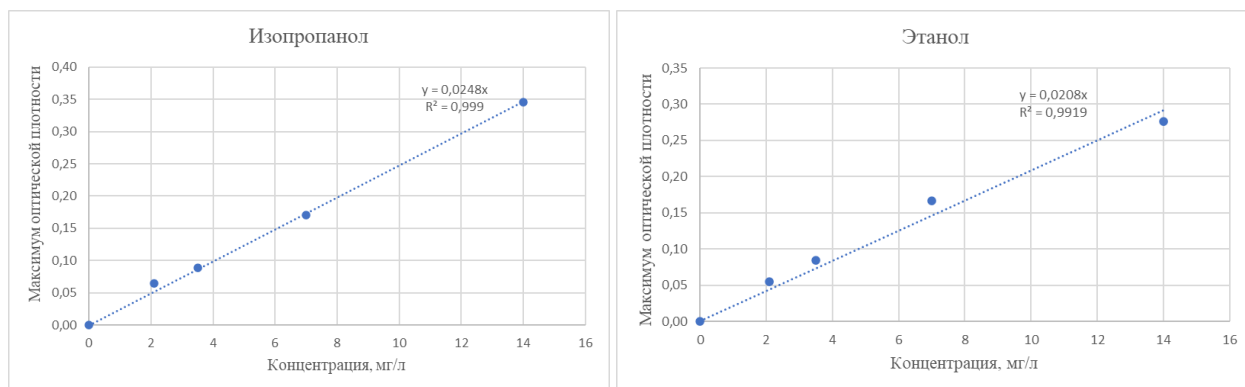


Рис. 12. Зависимости максимумов оптической плотности от концентрации для Бхл *e* в органических растворителях.

3.3. Спектры поглощения экстрактов Бхл *d*, приготовленных из проб природной воды

Были построены спектры поглощения экстрактов Бхл *d*, приготовленных из проб природной воды, отобранной с разных глубин из озера Трёхцветное. Пробы отбирались, начиная с глубины 1,8 м с шагом 2,5 см (Рис. 13). В полученных спектрах наблюдалось две полосы – полоса со сдвоенным максимумом в диапазоне 400-450 нм, обусловленная поглощением Бхл *d* и каротиноидов, и полоса в длинноволновой области 650-675 нм, обусловленная поглощением Бхл *d*. Максимальная оптическая плотность соответствует экстракту, приготовленному из воды, отобранной с глубины 2,175 м.

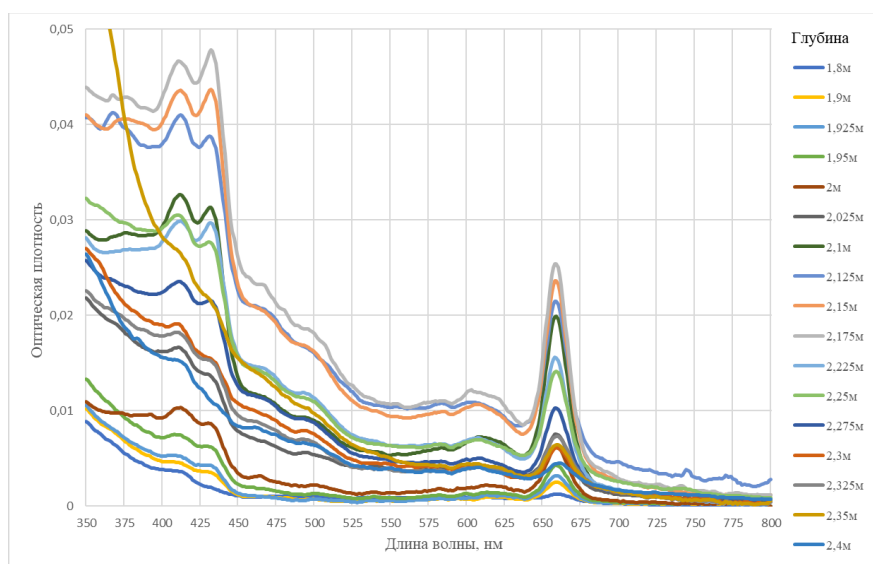


Рис. 13. Спектры поглощения экстрактов Бхл *d*, приготовленных из проб природной воды: глубины с 1,8 м до 2,4 м (некоторые спектры убраны для облегчения восприятия графика).

3.4. Положение максимума полос в спектрах поглощения в зависимости от растворителя

На рис. 14 представлены спектры поглощения экстрактов Бхл *d* и Бхл *e* одинаковой концентрации (16 мг/л для экстрактов Бхл *d* и 14 мг/л для экстрактов Бхл *e*), приготовленных из фильтров.

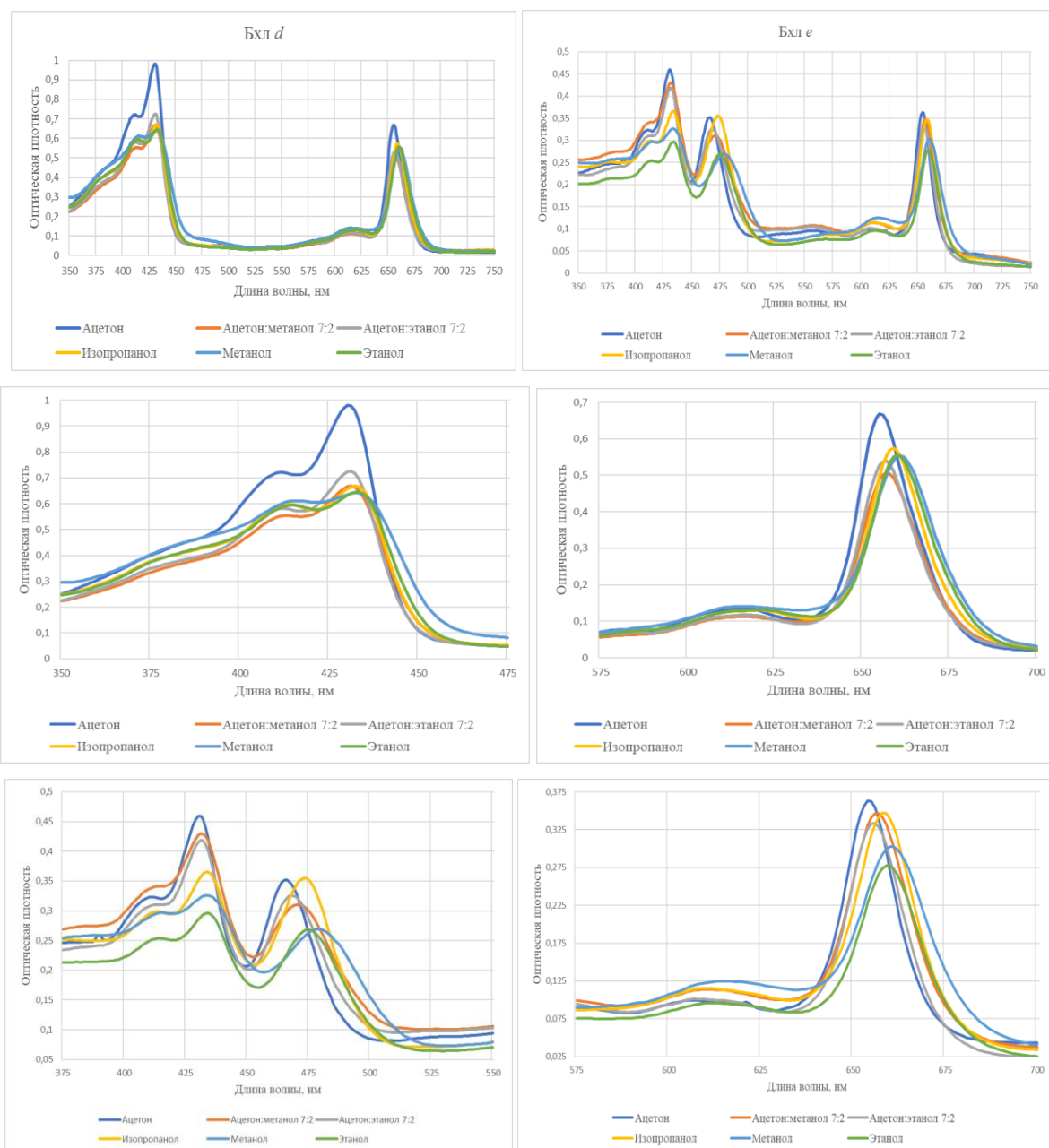


Рис. 14. Спектры поглощения экстрактов Бхл *d* и Бхл *e* в разных растворителях; полосы Бхл *d* и Бхл *e* в увеличенном масштабе.

В Таблице 3 представлены длины волн максимумов, определенные экспериментально, и их сравнение с табличными данными.

Табл. 3. Длины волн максимумов оптической плотности в длинноволновой области для экстрактов, приготовленных из бактерий, сконцентрированных на фильтре.

Пигмент	Растворитель	λ эксперимент, нм	λ табличная, нм	Источник
Бхл <i>d</i>	Метанол	661	657	[5]
Бхл <i>e</i>	Метанол	661	660	[4]
Бхл <i>d</i>	Ацетон:метанол 7:2	657		
Бхл <i>e</i>	Ацетон:метанол 7:2	657	651	[4]
Бхл <i>d</i>	Ацетон:этанол 7:2	657		
Бхл <i>e</i>	Ацетон:этанол 7:2	656		
Бхл <i>d</i>	Изопропанол	659		
Бхл <i>e</i>	Изопропанол	658		
Бхл <i>d</i>	Этанол	660		
Бхл <i>e</i>	Этанол	659	654	[4]
Бхл <i>d</i>	Ацетон	655	654	[5]
Бхл <i>e</i>	Ацетон	654	649	[4]

Для спектров поглощения экстрактов, приготовленных из проб воды, содержащей Бхл *d*, и ацетон:этанола 7:2, максимум оптической плотности приходился на длины волн в диапазоне 659-662 нм.

3.5. Расчет коэффициентов экстинкции Бхл *d* и *e* в различных растворителях

Поскольку экстракты из фильтров были приготовлены так, что концентрация для различных экстрактов одного типа Бхл была одинаковой, и длина оптического пути также совпадала, разные оптические плотности для экстрактов разных растворителей были обусловлены только коэффициентом экстинкции ввиду закона Бугера-Ламберта-Бера. Таким образом, если коэффициент экстинкции и угловой коэффициент в зависимости максимумов оптической плотности от концентрации в растворителе 1 равны ε_1 и k_1 соответственно, в растворителе 2 – ε_2 и k_2 , можно записать, что их пропорции будут равны друг другу: $\frac{\varepsilon_1}{k_1} = \frac{\varepsilon_2}{k_2}$, следовательно $\varepsilon_1 = \varepsilon_2 \cdot \frac{k_1}{k_2}$. Таким образом, зная коэффициент экстинкции для пигмента в растворителе 2 и угловые коэффициенты в графиках зависимостей максимумов оптической плотности от концентраций в

растворителях 1 и 2, можно определить коэффициент экстинкции для этого пигмента в 1 растворителе. Подставив известные коэффициенты экстинкции из Таблицы 1 и угловые коэффициенты из графиков Рис. 10, 12, были определены коэффициенты для других растворителей (Табл. 4,5).

Погрешности для угловых коэффициентов были рассчитаны с помощью МНК, а погрешности для коэффициента экстинкции были определены по формуле стандартного отклонения:

$$\sigma_{\varepsilon_1} = \sqrt{\left(\frac{\partial \varepsilon_1}{\partial k_1}\right)^2 \cdot S_{k_1}^2 + \left(\frac{\partial \varepsilon_1}{\partial k_2}\right)^2 \cdot S_{k_2}^2} = \sqrt{\left(\frac{\varepsilon_2}{k_2}\right)^2 \cdot S_{k_1}^2 + \left(-\frac{\varepsilon_2 \cdot k_1}{k_2^2}\right)^2 \cdot S_{k_2}^2}$$

Табл. 4. Результаты расчета коэффициентов экстинкции Бхл *d* и сравнение с табличной величиной.

Растворитель	Угловой коэффициент, л/мг	Коэффициент экстинкции (расчет через известный коэффициент в ацетоне), л/г·см	Табличное значение коэффициента экстинкции, л/г·см
Ацетон	0,0413 ± 0,0016	98	98
Метанол	0,0343 ± 0,0007	81,5 ± 3,6	82,3
Этанол	0,0342 ± 0,0018	81,3 ± 5,3	
Изопропанол	0,0352 ± 0,003	83,6 ± 7,8	
Ацетон:метанол 7:2	0,0325 ± 0,005	77,3 ± 12,2	
Ацетон:этанол 7:2	0,0347 ± 0,0061	82,5 ± 14,8	

Табл. 5. Результаты расчета коэффициентов экстинкции Бхл *e* и сравнение с табличной величиной.

Растворитель	Угловой коэффициент, л/мг	Коэффициент экстинкции (расчет через известный коэффициент в ацетоне), л/г·см	Табличное значение коэффициента экстинкции, л/г·см
Ацетон	0,02581 ± 0,00078	58,6	58,6
Метанол	0,0214 ± 0,0011	48,6 ± 2,9	42,5
Этанол	0,0208 ± 0,0049	47,3 ± 11,2	49
Изопропанол	0,0248 ± 0,0021	56,2 ± 5,1	
Ацетон:метанол 7:2	0,02463 ± 0,00028	55,9 ± 1,8	49,6
Ацетон:этанол 7:2	0,02376 ± 0,00041	54,0 ± 1,9	

3.6. Флуоресценция экстрактов Бхл *d*, приготовленных из бактерий, сконцентрированных на фильтре, в разных растворителях

При длине волны возбуждения 425 нм (ранее было установлено, что при такой длине волне возбуждения достигается максимальная интенсивность излучения в спектрах испускания флуоресценции для Бхл *d* и *e*) были измерены спектры испускания флуоресценции экстрактов с наименьшей концентрацией (2,4 мг/л для экстрактов Бхл *d* и 2,1 мг/л для экстрактов Бхл *e*) приготовленных в разных растворителях (Рис. 15).

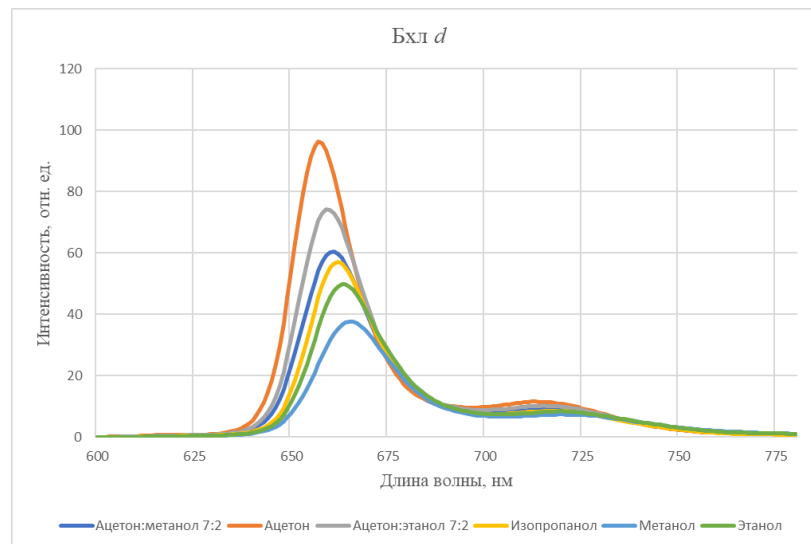


Рис. 15. Спектры испускания флуоресценции экстрактов Бхл *d*, приготовленных из фильтров.

В полученных спектрах флуоресценции наблюдался максимум интенсивности в области 650-660 нм. Далее был измерен спектр возбуждения флуоресценции на этой длине волны максимума. Для ацетона максимум интенсивности пришелся на длину волны 657 нм, поэтому спектр возбуждения экстракта Бхл *d* в ацетоне был измерен на такой длине волны испускания (Рис. 16). В полученном спектре в коротковолновой области наблюдалось два максимума в области 390-440 нм и маленький пик с максимумом между 610 и 620 нм. Один из максимумов находится на длине волны, совпадающей (или очень близкой) с 425 нм. Второй максимум сдвинут в более коротковолновую область. Эти максимумы совпадают с максимумами в спектрах поглощения. Также было замечено, что со временем флуоресценция экстрактов уменьшается и растворы обесцвечиваются. Это объясняется деградацией пигментов под действием света.

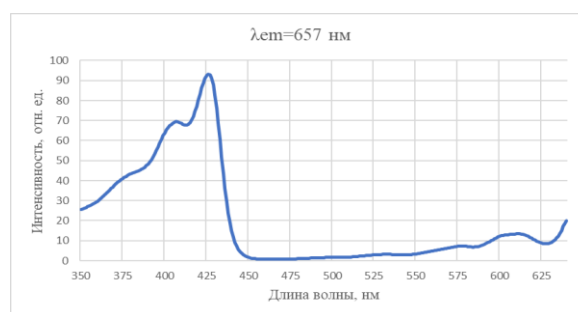


Рис. 16. Спектр возбуждения флуоресценции экстракта Бхл *d*, приготовленного из бактерий, сконцентрированных на фильтре, в ацетоне.

3.7. Флуоресценция экстрактов Бхл *e*, приготовленных из бактерий, сконцентрированных на фильтрах, в разных растворителях

Аналогично с п. 3.6. были построены спектры испускания и возбуждения флуоресценции для экстрактов Бхл *e* (Рис. 17, 18). Однако в отличие от спектров Бхл *d* в спектрах возбуждения флуоресценции наблюдался дополнительный максимум в диапазоне 460-470 нм, поэтому второй спектр испускания флуоресценции регистрировался на длине волны возбуждения, соответствующей этому максимуму.

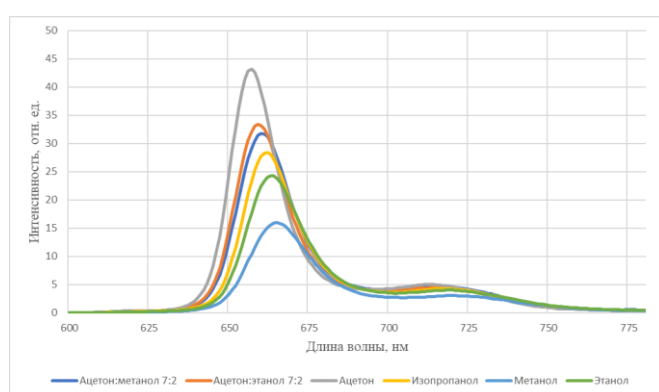


Рис. 17. Спектры испускания флуоресценции экстрактов Бхл *e* в различных растворителях при длине волны возбуждения 425 нм.

На Рис. 18 представлен спектр возбуждения флуоресценции для Бхл *e* в ацетоне.

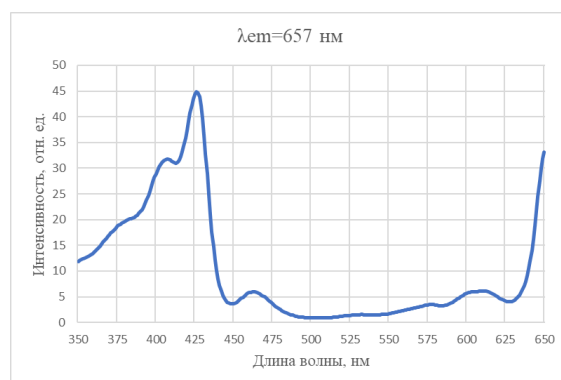


Рис. 18. Спектр возбуждения флуоресценции экстрактов Бхл *e*, приготовленных из бактерий, сконцентрированных на фильтрах, в ацетоне.

В полученных спектрах возбуждения флуоресценции наблюдалось три полосы: полоса со сдвоенным максимумом в районе 400-440 нм, полоса с

меньшей интенсивностью 450-475 нм и маленький пик с максимумом между 600 и 620 нм, что также соответствует максимумам в спектрах поглощения.

3.8. Флуоресценция экстрактов Бхл *d*, приготовленных из проб природной воды

В ходе выполнения дипломной работы также были исследованы спектры флуоресценции экстрактов, приготовленных из проб природной воды, отобранной из озера Трехцветного с глубин от 1,8 м до 2,4 м с шагом 2,5 см и содержащей Бхл *d*. Изначально были построены спектры испускания флуоресценции в диапазоне 600-800 нм при длине волны возбуждения 425 нм (Рис. 19). В полученных спектрах испускания экстрактов Бхл *d* наблюдалось две полосы: 650-675 нм с максимумами в районе 660-665 нм и 710-740 нм с максимумами в районе 720-725 нм. Максимальная интенсивность флуоресценции приходилась на глубину 2,175 м.

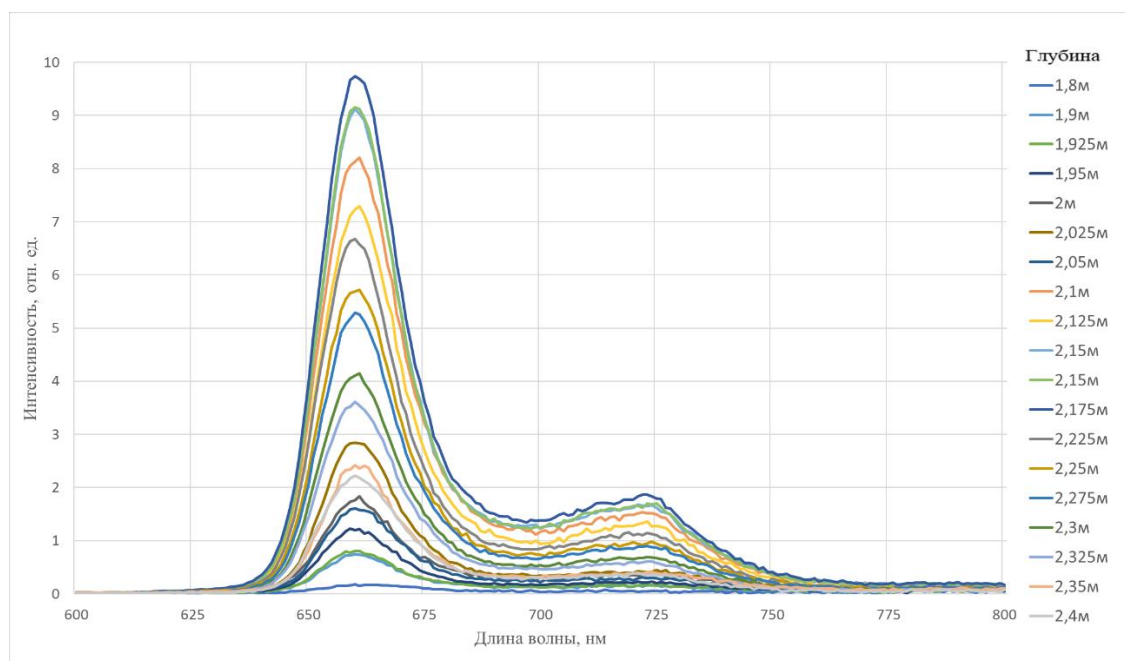


Рис. 19. Спектры испускания флуоресценции экстрактов Бхл *d*, приготовленных из проб природной воды, при длине волны возбуждения 425 нм: глубины с 1,8 м до 2,4 м (некоторые спектры убраны для облегчения восприятия графика).

Затем был зарегистрирован спектр возбуждения флуоресценции для экстракта, приготовленного из пробы природной воды, отобранной с глубины

2,15 м в диапазоне 350-700 нм при длине волны регистрации 721 нм, примерно соответствующей длинноволновой длине волны максимума в спектрах испускания (Рис. 20). Полученные спектры имели две основные полосы: в коротковолновой области на длинах волн 371-428 нм со двоянным максимумом и в длинноволновой области максимум с большей интенсивностью излучения на 658 нм и с меньшей на 607 нм.

Максимумы в длинноволновой области соответствуют и совпадают с максимумами в спектрах поглощения, по сравнению с коротковолновой областью спектров поглощения они немного сдвинуты в более коротковолновую область.

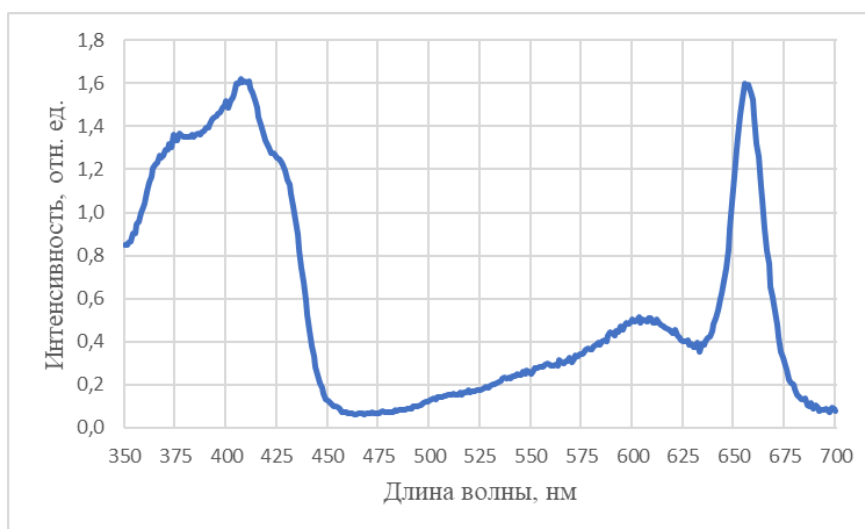


Рис. 20. Спектр возбуждения флуоресценции экстракта Бхл *d*, приготовленного из пробы природной воды, взятой с глубины 2,15 м, при длине волны испускания 721 нм.

Глава 4. Обсуждение результатов

4.1. Сравнительный анализ характеристик спектров поглощения Бхл *d* и *e* в различных растворителях

В ходе выполнения работы были построены спектры поглощения экстрактов Бхл *d* и *e* в шести органических растворителях (в качестве которых использовались: ацетон, этанол, метанол, изопропанол, ацетон:этанол (7:2), ацетон:метанол (7:2)), клетки для которых были осаждены с помощью фильтра. Также были построены спектры поглощения экстрактов Бхл *d* в растворе ацетон:этанола (7:2) для проб природной воды, отобранной с помощью многошприцевого пробоотборника с глубины от 1,8 м до 2,4 м с шагом 2,5 см.

В экстрактах Бхл *d* наблюдалось три основных максимума оптической плотности — два в коротковолновой области (400-440 нм) и один в длинноволновой области (650-670 нм). В экстрактах Бхл *e* помимо максимумов, свойственных для Бхл *d*, также были зарегистрированы полосы поглощения с максимумами оптической плотности, приходящимися на длины волны 460-470 нм.

В Таблице 6 представлены длины волн, соответствующие максимумам оптической плотности для экстрактов Бхл *d*, приготовленных из клеток, осажденных на фильтре, для различных концентраций и растворителей. Также было обнаружено, что в спектрах поглощения экстрактов Бхл *d* в метаноле один из максимумов отсутствует в сравнении с другими растворителями. Из таблицы также видно, что максимумы остаются практически неизменными для различных концентраций экстрактов одного растворителя, и в целом все максимумы очень близки для всех шести растворителей.

Табл. 6. Длины волн, соответствующие максимумам оптической плотности для экстрактов Бхл *d*, приготовленных из клеток, осажденных на фильтре, для различных концентраций и растворителей

Растворитель	Концентрация (мг/л)	Длина волны максимума, нм
Ацетон	2,4	655, 615, 430, 412
Ацетон	4	655, 616, 430, 411
Ацетон	8	655, 616, 430, 411
Ацетон	16	655, 616, 430, 411
Этанол	2,4	660, 622, 433, 415
Этанол	4	660, 622, 433, 415
Этанол	8	660, 620, 433, 414
Этанол	16	660, 620, 433, 414
Метанол	2,4	661, 613, 433
Метанол	4	661, 615, 433
Метанол	8	661, 616, 432
Метанол	16	661, 615, 432
Изопропанол	2,4	659, 617, 432, 413
Изопропанол	4	659, 618, 432, 413
Изопропанол	8	658, 618, 432, 413
Изопропанол	16	659, 621, 432, 414
Ацетон:этанол 7:2	2,4	657, 617, 431, 412
Ацетон:этанол 7:2	4	657, 615, 431, 412
Ацетон:этанол 7:2	8	657, 617, 431, 412
Ацетон:этанол 7:2	16	657, 617, 431, 412
Ацетон:метанол 7:2	2,4	657, 616-617, 431, 413
Ацетон:метанол 7:2	4	657, 616, 431, 413
Ацетон:метанол 7:2	8	657, 615, 431, 413
Ацетон:метанол 7:2	16	657, 616, 431, 413

В таблице 7 представлены длины волн, соответствующие максимумам оптической плотности для экстрактов Бхл *e*, приготовленных из клеток, осажденных на фильтре, для различных растворителей и с одинаковой концентрацией 14 мг/л.

Табл. 7. Длины волн, соответствующие максимумам оптической плотности для экстрактов Бхл *e*, приготовленных из клеток, осажденных на фильтре, для различных растворителей и с одинаковой концентрацией 14 мг/л.

Растворитель	Длина волны максимума, нм
Ацетон	655, 615, 430, 412
Этанол	659, 612, 475, 434, 414
Метанол	661, 615, 433
Изопропанол	659, 618, 432, 413
Ацетон:этанол 7:2	657, 617, 431, 412
Ацетон:метанол 7:2	657, 616, 431, 413

Спектры поглощения экстрактов, приготовленных из природной воды, отличаются от спектров экстрактов Бхл *d*, приготовленных из фильтров, пьедесталом, на который они подняты. Этот пьедестал может быть обусловлен поглощением растворенного органического вещества (РОВ). Гуминовые вещества, которые относятся к РОВ, поглощают свет в коротковолновой области [29], и далее их оптическая плотность экспоненциально убывает. Также могло повлиять рассеяние частиц, которое хоть и было снижено с помощью центрифугирования, но могло внести свой вклад.

В спектрах поглощения экстрактов наблюдались две полосы поглощения: в коротковолновой области с двумя максимумами примерно на 410 и 433 нм и в длинноволновой области с максимумом примерно на 659 нм. Полосы поглощения ярко выражены для глубин с 2 м и до 2,325 м и практически неразличимы для глубин с 1,8 м до 1,975 м и с 2,35 м до 2,4 м, что можно объяснить низкими концентрациями пигмента.

Длины волн, соответствующие максимумам оптической плотности в длинноволновой области, лежат в диапазоне 659-662 нм и не зависят от глубины, с которой была отобрана вода. Эти длины волн совпадают с длинами волн для экстрактов, приготовленных с помощью фильтров.

Пики в коротковолновой области, соответствующие поглощению Бхл и каротиноидов, смещаются в более длинноволновую область по мере уменьшения поглощения, а также имеют изменяющееся соотношение высот: по мере уменьшения концентрации Бхл коротковолновый пик становится выше.

4.2. Сравнительный анализ флуоресценции Бхл *d* и *e* в различных растворителях

Были построены спектры испускания и возбуждения флуоресценции экстрактов Бхл *d* и *e* в шести органических растворителях (в качестве которых использовались: ацетон, этанол, метанол, изопропанол, ацетон:этанол (7:2), ацетон:метанол (7:2)), клетки для которых были осаждены с помощью фильтра. Изначально были построены спектры испускания флуоресценции при длине волны возбуждения 425 нм в диапазоне длин волн испускания 600-800 нм, для обоих видов Бхл наблюдалось два пика: с большей интенсивностью в полосе 650-670 нм, обусловленный излучением Бхл, и с меньшей в полосе 700-725 нм. Наибольшей интенсивностью флуоресценции обладали экстракты Бхл в ацетоне, а также в смесях ацетона и других органических растворителей, наименьшей – экстракты в метаноле. Было установлено, что длина волны, соответствующая более коротковолновому максимуму, сдвигается в зависимости от растворителя, но не зависит от типа Бхл. При этом длина волны максимума сдвигалась в более коротковолновую область для спектров с меньшей интенсивностью флуоресценции. Также было обнаружено, что интенсивность в спектрах флуоресценции экстрактов Бхл *d* примерно в два раза выше чем в спектрах флуоресценции экстрактов Бхл *e*.

Затем были построены спектры возбуждения флуоресценции: в качестве длины волны излучения бралась длина волны, на которую приходилось максимальное значение интенсивности в спектре испускания флуоресценции. В спектрах возбуждения флуоресценции экстрактов Бхл *d* наблюдалась полоса с сдвоенным максимумом в диапазоне 390-440 нм, соответствующая флуоресценции Бхл и каротиноида. В спектрах возбуждения флуоресценции экстрактов Бхл *e* помимо двух указанных максимумов наблюдался небольшой максимум интенсивности в полосе 450-470 нм.

В заключении были повторно измерены спектры испускания флуоресценции. Для Бхл *d* в качестве длины волны возбуждения света была взята вторая длина волны, соответствующая второму пику из полосы с сдвоенными максимумами,

а для Бхл e – длина волны, соответствующая максимуму, из диапазона 450-470 нм. Полученные спектры повторили по форме исходные спектры испускания.

Далее были исследованы спектры флуоресценции экстрактов, приготовленные из проб природной воды из озера Трёхцветное. Пробы воды, отобранные с глубины 1,8 м до 2,4 м с шагом 2,5 см, содержали только Бхл d , экстракты были приготовлены в растворе ацетон:этанола (7:2). В спектрах испускания флуоресценции при длине волны возбуждения света 425 нм наблюдалось две полосы максимальной интенсивности: 650-670 нм в коротковолновой области и 710-730 нм в длинноволновой области. Полосы максимальной интенсивности совпадают с полосами, определенными для экстрактов, приготовленных с помощью фильтров.

4.3. Сравнение с известными величинами коэффициентов экстинкции Бхл d и e в различных растворителях

Определенные коэффициенты экстинкции оказались близки к табличным значениям. Так, для Бхл e помимо коэффициента экстинкции в ацетоне ранее был определен лишь для метанола, но полученные значения совпали в пределах погрешности.

Для Бхл d коэффициенты экстинкции были определены ранее в четырех растворителях. Полученные значения оказались близки, но не совпали в пределах погрешности для двух растворителей, что можно объяснить отличающимися пигментами и растворителями.

4.4. Применение найденных коэффициентов экстинкции для определения распределения концентрации Бхл d и e по глубине в водоемах

С помощью определенного в дипломной работе коэффициента экстинкции Бхл d в растворителе ацетон:этанола (7:2) были рассчитаны концентрации Бхл d в пробах воды из озера Трёхцветного, отобранных с 1,8 м до 2,4 м с шагом 2,5 см (Рис. 21). Наибольшая концентрация Бхл d приходится на глубину 2,175 м. Это

соответствует тому, что проба воды для спектра поглощения с максимальным значением оптической плотности также была отобрана с глубины 2,175 м.

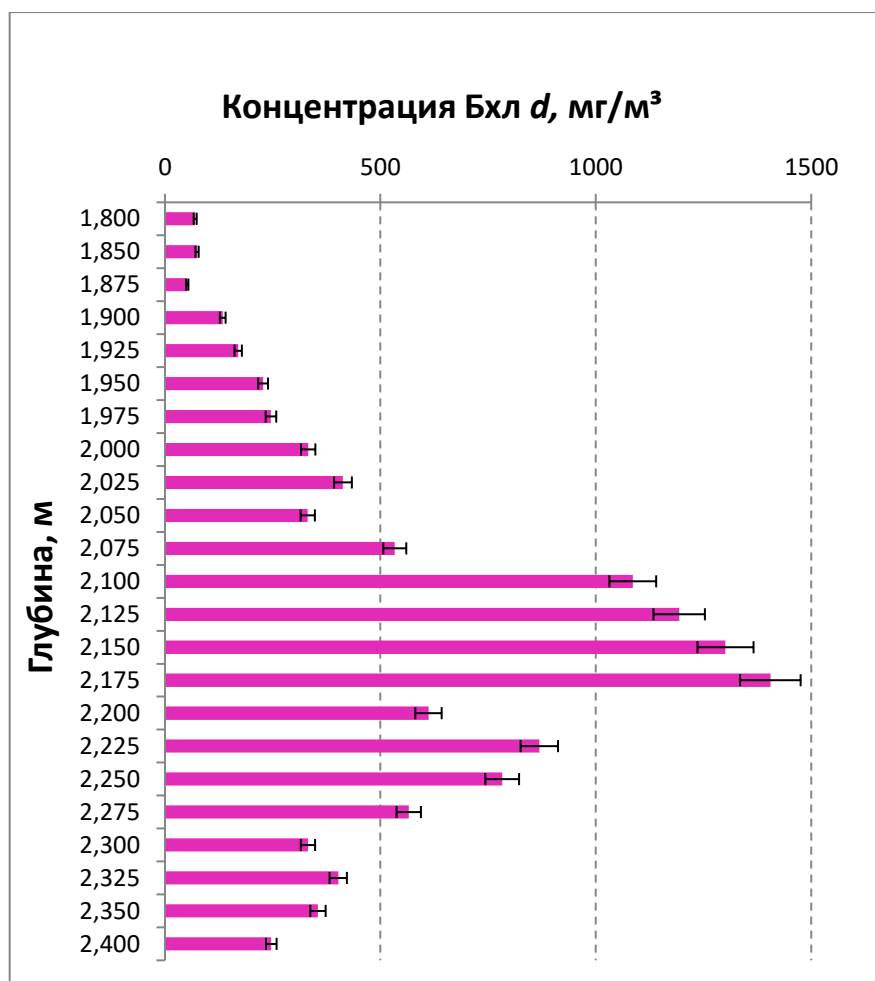


Рис. 21. Распределение концентрации Бхл *d* по глубине для проб воды из озера Трёхцветное.

Заключение. Основные результаты и выводы.

В работе изучены спектральные характеристики бактериальных фотосинтетических пигментов Бхл *d* и Бхл *e* – хлоросомных Бхл, встречающихся у зеленоокрашенной и коричневоокрашенной формы ЗСБ соответственно. Были приготовлены экстракты в шести органических растворителях из бактерий, осажденных на фильтрах и содержащих Бхл *d* и *e*. Для полученных экстрактов измерены спектры поглощения, испускания и возбуждения флуоресценции. Определены концентрации экстрактов и построены зависимости оптической плотности экстрактов в максимуме полосы поглощения от концентрации, которые оказались линейными, что подтвердило выполнение закона Бугера-Ламберта-Бера. Получены следующие основные результаты и выводы:

1. Установлено, что положение максимумов оптической плотности в длинноволновой области спектров поглощения в экстрактах Бхл *d* и *e* зависит только от растворителя и не зависит от типа пигмента. Установлены длины волн максимумов в спектрах поглощения экстрактов Бхл *d* и *e* в разных растворителях.
2. По измеренным спектрам поглощения рассчитаны коэффициенты экстинкции для Бхл *d* и *e* в таких растворителях как ацетон, этанол, метанол, этанол, изопропанол, ацетон:метанола 7:2, ацетон:этанол 7:2, при этом большая часть коэффициентов ранее не была известна.
3. Обнаружено, что положение максимумов в спектрах испускания флуоресценции в полосе 650-670 нм Бхл *d* и *e* при длине волны возбуждения 425 нм зависит только от растворителя и не зависит от типа пигмента. Определены длины волн максимумов в спектрах поглощения экстрактов Бхл *d* и *e* в разных растворителях.
4. Из проб природной воды с различной глубины озера Трёхцветного, содержащей зеленоокрашенную форму ЗСБ, приготовлены ацетон-этаноловые экстракты и для них измерены спектры поглощения, испускания и возбуждения флуоресценции. Рассчитаны концентрации Бхл *d* в воде на различной глубине с применением новых коэффициентов экстинкции.

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 и отбор проб для исследований.

Особую благодарность автор выражает научным руководителям – кандидату физико-математических наук, доценту физического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова **Пацаевой Светлане Викторовне** и аспирантке физического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова **Жильцовой Анне Александровне** за всестороннюю помощь и поддержку в процессе подготовки дипломной работы.

Список использованных источников.

1. Orf G. S., Blankenship R. E. Chlorosome antenna complexes from green photosynthetic bacteria // *Photosynthesis Research*. 2013. V. 116 (2-3). P. 315-331.
2. Oostergetel G., van Amerongen H., Boekema E. The chlorosome: A prototype for efficient light harvesting in photosynthesis // *Photosynth. Res.* 2010. V. 104 (2–3). P. 245–255.
3. Емельянец П.С., Жильцова А.А., Краснова Е.Д., Воронов Д.А., Рымарь В.В., Пацаева С.В. Определение концентрации хлоросомных бактериохлорофиллов по спектрам поглощения клеток зелёных серных бактерий в пробах природной воды // *Вестник Московского университета. Серия 3: Физика, астрономия*. 2020. № 2. С.25–30.
4. Borrego C. M., Arellano J. B., Abella C. A., Gillbro T., Garcia-Gil L. J. The Molar Extinction Coefficient of Bacteriochlorophyll *e* and the Pigment Stoichiometry in *Chlorobium phaeobacteroides* // *Photosynth. Res.* 1999. V. 60. P. 257–264.
5. Stanier R. Y., Smith J. H. C. The chlorophylls of green bacteria // *Biochim Biophys Acta*. 1960. V. 41. P. 478–484.
6. Overmann J., Tilzer M. M. Control of primary productivity and the significance of photosynthetic bacteria in a meromictic kettle lake Mittlerer Buchensee, West-Germany // *Aquatic Sciences*. 1989. V. 51. P. 261-278.
7. Горленко В. М. Аноксигенные фототрофные бактерии (Труды Института микробиологии имени С.Н. Виноградского. Фотосинтезирующие микроорганизмы / Отв. ред. В.Ф. Гальченко) 2010. Вып. 15. Ин-т микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН. М.: Макс пресс. С. 133-175
8. Гусев М.В., Минеева Л.А., *Микробиология: Учебник для студ. биол. специальностей вузов / 2003. ИЦ «Академия». 58 с.*
9. Cogdell R. J., Gardiner A. T. Functions of carotenoids in photosynthesis // *Methods in Enzymology*. 1993. V. 214. P. 185-193.
10. Olson J. M. Chlorophyll Organization and Function in Green Photosynthetic Bacteria // *Photochemistry and Photobiology*. 1998. V. 67(1). P. 61-75.

11. Doi M., Tamiaki H. Synthesis of Sedimentary Porphyrin-like Chlorophyll-a Derivatives Lacking the 3-Substituent // *Chemistry letters*. 2020. V. 49. № 3. P. 287-289.
12. Thweatt J. L., Canniffe D. P., Bryant D.A. Biosynthesis of chlorophylls and bacteriochlorophylls in green bacteria // *Advances in Botanical Research*. 2019. V. 90. P. 35–89.
13. Hohmann-Marriott M.F., Blankenship R.E. Variable fluorescence in green sulfur bacteria // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2007. V. 1767 (1). P. 106–113.
14. Blankenship R.E., Olson J.M., Miller M. Antenna Complexes from Green Photosynthetic Bacteria // *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*. 2004. C. 20. P. 399-435.
15. Kharcheva A.V., Zhiltsova A.A., Lunina O.N., Savvichev A.S., Patsaeva S.V. 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)*. 2016. 99170P.
16. Causgrove T. P., Brune D. C., Blankenship R. E. Förster energy transfer in chlorosomes of green photosynthetic bacteria // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 1992. V. 15 (1-2). P. 171-179.
17. Jensen A., Aasmundrud O., Eimjhellen K. E. Chlorophylls from photosynthetic bacteria // *Biochem Biophys*. 1964. V. 88 (3). P. 466–479.
18. Pierson B. K., Castenholz R. W. Studies of pigments and growth in *Chloroflexus aurantiacus*, a phototrophic filamentous bacterium // *Archives of Microbiology*. 1974. V. 100(1). P. 283–305.
19. Краснова Е. Д., Мардашова М. В. Как морской залив превращается в озеро // *Природа*. 2020. № 1. С. 16–27.
20. Электронные спектры сложных молекул / Сост. Пацаева С.В., Южаков В.И. 2010. М. 34 с.
21. Харчева А.В., Жильцова А.А., Лунина О.Н. и др. Флуоресценция бактериохлорофиллов зеленых серных бактерий в анаэробной зоне двух

- природных водоемов // Вестник Московского университета. Серия 3: Физика, астрономия. 2018. № 4. С. 40–45.
22. Orf G. S., Tank M., Vogl K. et al. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*. 2013. V. 1827. P. 493-501.
23. Harada J., Mizoguchi T., Satoh S. et al. Specific Gene *bciD* for C7-Methyl Oxidation in Bacteriochlorophyll *e* Biosynthesis of Brown-Colored Green Sulfur Bacteria // *PLoS ONE*. 2013. V. 8. № 4. P. 1.
24. Zhiltsova A.A., Rymar V.V., Krasnova E.D., Voronov D.A., Patsaeva S.V. Fluorescence of chlorosomal bacteriochlorophylls extracted by organic solvents applied for pigment quantification in natural water samples // *Proc. SPIE*. 2021. V. 11845. P. 118450H.
25. Zhu Y., Lin S., Ramakrishna B. L., Van Noort P. I., Blankenship R. E. Self quenching of chlorosome chlorophylls in water and hexanol-saturated water // *Photosynthesis Research*. 1996. V. 47. P. 207-218.
26. Matsuura K., Olson J. M. Reversible conversion of aggregated bacteriochlorophyll *c* to the monomeric form by 1-hexanol in chlorosomes from *Chlorobium* and *Chloroflexus* // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*. 1990. V. 1019 (3). P. 233-238.
27. Tomáš Malina, Rob Koehorst, David Bína, Jakub Pšenčík, Herbert van Amerongen. Superradiance of bacteriochlorophyll *c* aggregates in chlorosomes of green photosynthetic bacteria // *Scientific Reports*. 2021. Vol. 11. DOI: 10.1038/s41598-021-87664-3.
28. Жильцова А. А., Филиппова О. А., Краснова Е. Д., Воронов Д. А., Пацаева С. В. Сравнительный анализ спектральных методов определения концентрации бактериохлорофилла *d* зеленых серных бактерий в воде // *Оптика атмосферы и океана*. 2022. Т. 35. № 04. С. 312–318.

29. Жильцова А.А., Краснова Е.Д., Воронов Д.А., Пацаева С. В. Оптические свойства гуминовых веществ воды отделяющихся водоемов Кандалакшского побережья Белого моря // Труды IX Международной научно-практической конференции Морские исследования и образование (MARESEDU-2020) Том I (III): [сборник]. 2020. Т. 1. С. 344–347.