

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ПРОБ ВОДЫ ИЗ ОТДЕЛЯЮЩИХСЯ ВОДОЕМОВ КАНДАЛАКШСКОГО ЗАЛИВА БЕЛОГО МОРЯ

Жильцова А.А.¹, Харчева А.В.¹, Пацаева С.В.¹,
Лунина О.Н.², Краснова Е.Д.³, Воронов Д.А.⁴

Отделяющиеся от Белого моря водоемы являются уникальными природными экосистемами, микробное сообщество которых представляет особый интерес для изучения. В хемоклине отделяющихся озер обитают анаэробные фототрофные микроорганизмы, зеленые серные бактерии (ЗСБ), являющиеся самыми древними фотосинтезирующими организмами, существующими в настоящее время [Горленко, Рожнов, 2011]. ЗСБ способны жить в анаэробных условиях при чрезвычайно низкой интенсивности света, недостаточной для фотосинтеза других фототрофов [Oostergetel, 2010]. Сообщество ЗСБ представляет собой естественный биологический фильтр, препятствующий проникновению сероводорода в верхние слои водоемов, и тем самым сохраняющий баланс между аэробными и анаэробными водами. Существуют доказательства, что анаэробные бактерии, образующие бактериохлорофиллы, появились прежде окислительных бактерий, образующих хлорофиллы [Горленко, 2010], что обуславливает значимость исследований данных микроорганизмов не только с практической точки зрения (для диагностики природной воды), но и для понимания процессов эволюции фотосинтеза в целом. В соответствии с имеющимися на сегодняшний день литературными данными анаэробные фототрофные бактерии были изучены в основном микроскопическими методами и в редких случаях методами абсорбционной спектроскопии [Blankenship, 2004; Bina, 2015]. Однако, проведение флуоресцентного анализа проб воды с ЗСБ, в совокупности с разработанным авторами методом, позволяет получить принципиально новую информацию.

Главной целью данной работы являлось подробное исследование флуоресцентных характеристик двух разновидностей зеленых серных

¹ Жильцова А.А., Харчева А.В., Пацаева С.В. — МГУ им. М.В. Ломоносова, физический факультет, Москва.

² Лунина О.Н. — Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Москва.

³ Краснова Е.Д. — МГУ им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва.

⁴ Воронов Д.А. — ИППИ РАН; Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Москва.

бактерий. Для этого из нескольких отделяющихся озёр Кандалакшского залива Белого моря (оз. Трёхцветное, оз. Большие Хрусломёны, оз. Еловое, Лагуна на Зелёном мысу и оз. Нижнее Ершовское) с разных глубин были отобраны образцы воды, а затем в лабораторных условиях измерены их спектры флуоресценции. Кроме того, в институте микробиологии из проб природной воды были выделены накопительных культуры бактерий, с которыми проведены аналогичные измерения. Спектры испускания флуоресценции для разных длин волн возбуждающего света и спектры возбуждения флуоресценции регистрировались на флуориметре Solar CM2203, для этого использовались стандартные кварцевые кюветы с длиной оптического пути 10 мм. Последующая за измерениями математическая обработка спектров производилась с помощью программного пакета Origin.

Флуоресценцией называют излучение, производимое молекулами, ионами и др. соединениями, которое возникает в результате электронного перехода в этих частицах при их возвращении из возбуждённого состояния в основное, за время τ . [Левшин, 1994]. Спектром флуоресценции называют зависимость интенсивности света, излучаемой образцом, от длины волны испускаемого света. Существуют две формы ЗСБ, отличающиеся фотосинтетическими пигментами, и, соответственно, спектральными характеристиками. Зеленоокрашенные формы бактерий содержат Бхл *d* и каротиноид хлоробактин, моноциклическое соединение с ароматическим кольцом. Коричневоокрашенные — Бхл *e* и каротиноид изорениератин, имеющий два ароматических кольца. Кроме того, обе формы ЗСБ содержат Бхл *a* [Olson, 1998].

Измерение спектров флуоресценции зеленоокрашенных и коричневоокрашенных накопительных культур ЗСБ производилось в двух режимах: испускания и возбуждения. Для образцов культур спектры испускания флуоресценции были зарегистрированы для длин волн возбуждения $\lambda_{\text{ex}} = 270, 355, 390, 440, 450$ и 525 нм. Общими для всех спектров испускания флуоресценции коричневоокрашенного вида ЗСБ являются два максимума испускания: в диапазоне от 743 до 747 нм, соответствующего флуоресценции Бхл *e*, и на 813 нм, возникающего за счёт флуоресценции Бхл *a*. Для зеленоокрашенного вида ЗСБ длины волн на которые приходятся общие для всех проб максимумы составляют 763–767 и 813 нм, обусловленные присутствием Бхл *d* и Бхл *a* соответственно (Рис. 1а).

На основе экспериментальных данных, полученных из измерений порядка десяти образцов накопительных культур каждой разновидности ЗСБ, рассчитаны средние значения длин волн, на которые приходится максимум флуоресценции бактериохлорофиллов (Табл. 1).

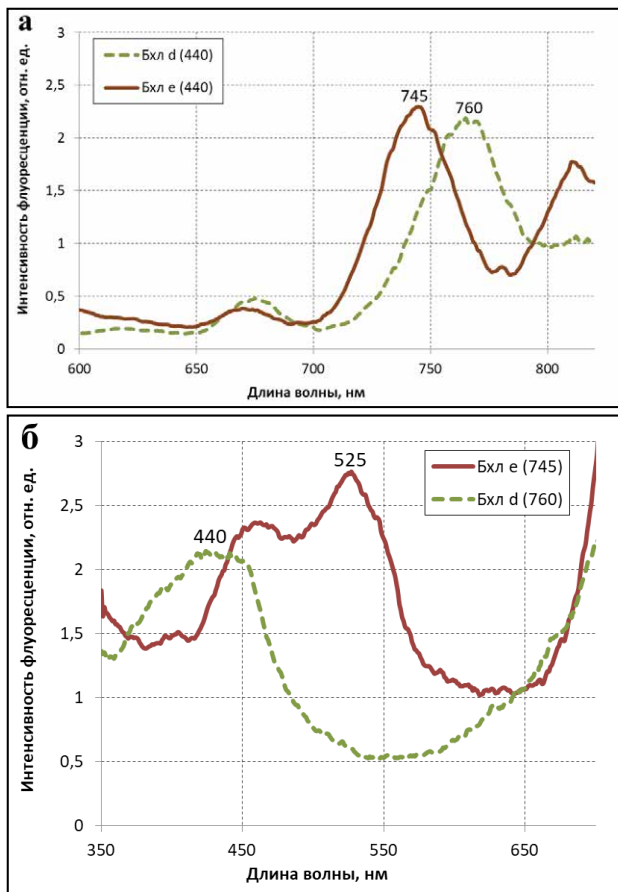


Рис. 1а. Спектры испускания флуоресценции двух типов Бхл при возбуждении светом, длиной волны 440 нм; 1б – Спектры возбуждения флуоресценции для Бхл d на длине волны регистрации 760 нм и Бхл e на длине волны регистрации 745 нм

Таблица 1.

Значения максимумов флуоресценции бактериохлорофиллов, определенные экспериментально на чистых культурах.

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

Посредством сравнения спектров возбуждения флуоресценции накопительных культур серобактерий каждой разновидности между собой, удалось установить оптимальную длину волны возбуждающего света, равную 440 нм, при которой флуоресценция Бхл *d* максимальна, а флуоресценция Бхл *e* имеет высокие значения. Показано, что лучше всего молекулы Бхл *d* флуоресцируют при облучении светом с длиной волны 525 нм (Рис. 16).

В качестве математических функций, задающих полосы флуоресценции бактериохлорофиллов, в дальнейших расчетах принимались кривые Гауссова распределения (Рис. 2). Анализ чистых культур ЗСБ показал различие полуширины полос флуоресценции для двух разных типов бактерий. Для зеленоокрашенных ЗСБ параметр полуширины пика w принимал значения от 44,7 до 54,3 нм, для коричневоокрашенных ЗСБ значения w лежали в диапазоне от 38,6 до 41,5 нм. Таким образом, полосы испускания флуоресценции коричневоокрашенных культур примерно на 20% уже полос зеленоокрашенных ЗСБ. Для дальнейших вычислений в качестве параметра w было взято среднее арифметическое от имеющегося набора данных. Для зеленоокрашенного типа $w=48,3\pm 1,4$ нм, для коричневоокрашенного $w=39,5\pm 0,5$ нм.

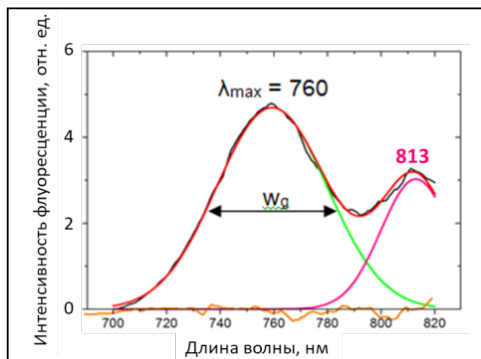


Рис. 2. Аппроксимация полос флуоресценции Бхл *d* и Бхл *a* распределением Гаусса

Так как в образцах природной воды могут присутствовать разные виды ЗСБ, то в зависимости от их соотношения максимум флуоресценции сдвигается от значений длин волн, определенных для зеленоокрашенных (763–770 нм) и коричневоокрашенных (740–750) видов в отдельности. Полученная экспериментальным путем информационные данные о полосах флуоресценции для каждой формы ЗСБ (а именно значения длины волны на которой флуоресценция максимальна и параметра w) легли в основу метода разделения двух раз-

новидностей ЗСБ в природной воде. Для определения процентного соотношения зеленоокрашенных и коричневоокрашенных ЗСБ в пробе максимум спектра испускания флуоресценции в области 740–770 нм раскладывался на две гауссианы со строго определенными параметрами, найденными выше (Рис. 3а).

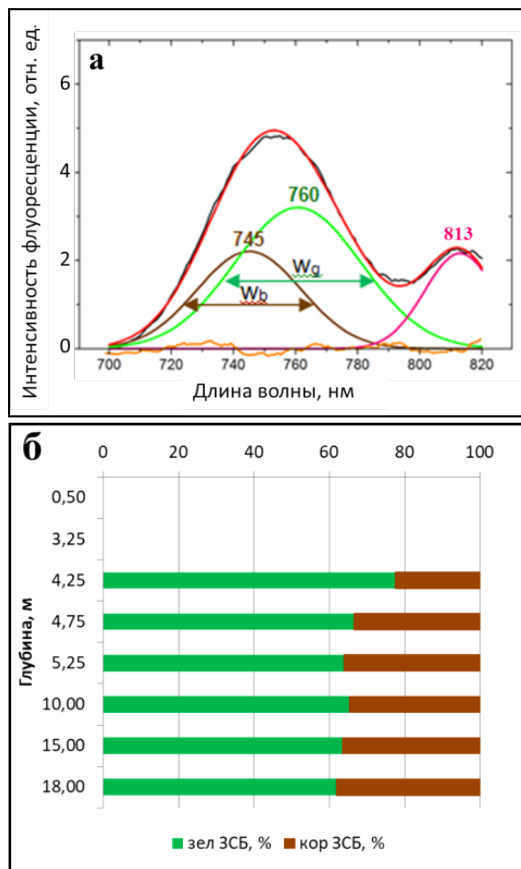


Рис. 3а. Разложение на три компоненты спектра флуоресценции пробы воды из оз. Б. Хрусломены с глубины 5,25 м (март 2017). 3б – Процентное содержание зеленоокрашенных ЗСБ в озере Большие Хрусломены в марте 2017 г.

Данный метод был применен для определения процентного соотношения двух разновидностей культур серобактерий на разной глубине для четырех отделяющихся озер Белого моря. Таким образом в марте 2017, с погрешностью не более 10%, показано содержание в лагуне на Зеленом

мысу года только коричневоокрашенного типа ЗСБ, а в озере Нижнее Ершовское — только зеленоокрашенного типа. В озере Трехцветное и Большие Хрусломены преобладала флуоресценция Бхл *d* (Рис. 36).

Еще одним интересным явлением, является эффект тушения флуоресценции, который был зарегистрирован, как в природной воде, так и в лабораторных условиях (Рис. 4).

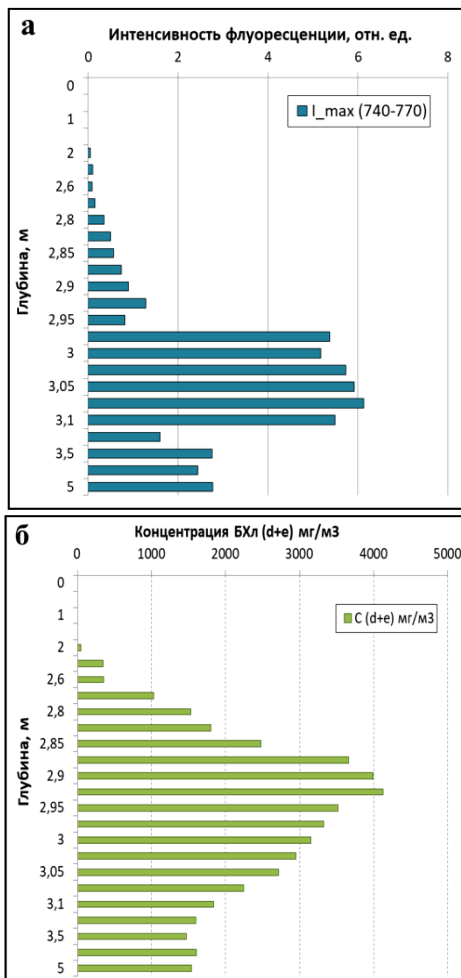


Рис. 4а. Диаграмма распределения концентрации Бхл [Overmann, 1989] по глубине в оз. Еловое. 4б - Диаграмма распределения интенсивности флуоресценции по глубине в оз. Еловое в марте 2016 г.

В верхних слоях водоема рассчитанная по эмпирической формуле концентрация Бхл [Overmann, 1989] высока, однако интенсивность флуоресценции незначительна. На глубинах ниже хемоклина при той же концентрации интенсивность флуоресценции возрастает. Эффект тушения флуоресценции планируется более детально изучать в дальнейшем.

Таким образом, в ходе выполнения работы были изучены флуоресцентные характеристики фотосинтетических пигментов ЗСБ – бактериохлорофиллов. С помощью анализа спектров образцов накопительных культур показана возможность аппроксимации полосы испускания флуоресценции бактериохлорофиллов кривой распределения Гаусса и определены параметры этого распределения для клеток бактерий, содержащих Бхл *d* и Бхл *e*. Предложен метод разделения вкладов двух разновидностей серобактерий в водоеме, с помощью которого определено процентное соотношение зеленоокрашенных и коричневоокрашенных культур бактерий на разной глубине для четырех отделяющихся озер Белого моря.

Работа поддержана РФФИ (гранты №16-05-00548-а и 17-04-01263а).

Литература

- [1] Проблемы ранней эволюции фотосинтеза / Отв. ред. В.М. Горленко, С.В. Рожнов. Серия «Геобиологические процессы в прошлом». – М.: ПИН РАН. – 218 с., 2011.
- [2] *Oostergetel G., van Amerongen H., Boekema E.* The chlorosome: a prototype for efficient light harvesting in photosynthesis // *Photosynth Research* 104. – P. 245–255, 2010.
- [3] *Горленко В.М.* Аноксигенные фототрофные бактерии // Труды Института микробиологии имени С.Н. Виноградского. Фотосинтезирующие микроорганизмы / Отв. ред. В.Ф. Гальченко. Вып. 15. Ин-т микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН. – М.: Макс пресс. – С. 133–175, 2010.
- [4] *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria* / Edited by R. E. Blankenship, M. T. Madigan and C. E. Bauer. Netherlands: Kluwer Academic Publishers. – 1331 p., 2004.
- [5] *Bína D., Zdenko G., František V., Radek L.* Native FMO-reaction center supercomplex in green sulfur bacteria: an electron microscopy study // *Photosynthesis research*. – P. 93–100, 2015.

- [6] *Левшин Л.В., Салецкий А.М.* Оптические методы исследования молекулярных систем Ч.1. Молекулярная спектроскопия. — М.: Изд-во МГУ. — С. 135, 1994.
- [7] *Olson J.M.* Chlorophyll Organization and Function in Green Photosynthetic Bacteria // Photochemistry and Photobiology 67(1). — P. 61–75, 1998.
- [8] *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 V. 51. №4. — P. 261–278, 1989.