

ОПТИКА И СПЕКТРОСКОПИЯ. ЛАЗЕРНАЯ ФИЗИКА

**Флуоресценция бактериохлорофиллов зеленых серных бактерий
в анаэробной зоне двух природных водоемов**

А. В. Харчева,^{1,а} А. А. Жильцова,¹ О. Н. Лунина,²
Е. Д. Краснова,³ Д. А. Воронов,^{4,5} А. С. Саввичев,² С. В. Пацаева¹

¹ Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, физический факультет, кафедра общей физики. Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 2.

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт микробиологии им. С. Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН.
Россия, 117312, Москва, проспект 60-летия Октября, д. 7, корп. 2.

³ Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова,
биологический факультет. Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12.

⁴ Институт проблем передачи информации им. А. А. Харкевича РАН.
Россия, 127994, Москва, Большой Каретный пер., д. 19.

⁵ Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова,
Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского.
Россия, 119992, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40.

Статья поступила 13.09.2017, подписана в печать 06.12.2017.

Исследованы спектры поглощения и флуоресценции бактериохлорофиллов живых клеток зеленых серных бактерий из анаэробной зоны двух меромиктических водоемов, отделившихся от Белого моря. Проведено сравнение спектрально-оптических свойств монокультур зеленоокрашенных и коричневоокрашенных видов зеленых серобактерий *Chlorobium phaeovibrioides*, а также оценено содержание молекул бактериохлорофилла в одной клетке бактерии каждого вида. Метод разделения вкладов разных групп зеленых серных бактерий по спектрам флуоресценции бактериохлорофилла применен для смеси двух видов бактерий разной пигментации. Построены распределения по глубине интенсивности флуоресценции бактериохлорофиллов и концентрации данных пигментов микроорганизмов озер Трехцветного и Елового Кандалакшского залива Белого моря.

Ключевые слова: спектры флуоресценции, спектры поглощения, бактериохлорофилл, зеленые серные бактерии, *Chlorobium phaeovibrioides*.

УДК: 535.372, 57.084. PACS: 33.50.Dq, 42.68.Xy.

ВВЕДЕНИЕ

Флуоресценция хлорофилла (Хл) широко используется в целях картирования распределения фитопланктона в водоемах [1, 2], мониторинга стрессорных воздействий окружающей среды на высшие растения [3, 4], биодиагностики водной среды [5, 6]. Однако спектральные свойства бактериохлорофиллов (Бхл) — фотосинтетических пигментов аноксигенных фототрофных бактерий — пока мало изучены [7] и совсем немного работ по мониторингу фототрофных бактерий непосредственно в среде обитания [8, 9].

Зеленые серные бактерии — аноксигенные фототрофные микроорганизмы, обитающие в области хемоклина при переходе от аэробных к анаэробным условиям и в анаэробной зоне меромиктических водоемов, отделившихся от Белого моря [10–12]. Данные микроорганизмы в качестве донора электронов используют сероводород нижнего слоя воды меромиктических озер или других доноров, например мо-

лекулярную серу и молекулярный водород. Зеленые серобактерии обитают на глубинах с низкой освещенностью [13–16] и имеют специфические антенные структуры — хлоросомы, содержащие громадное количество, до 250 тыс. молекул Бхл [17]. Морфологически схожие виды бактерий могут отличаться пигментами фотосинтетического аппарата клеток: одни имеют зеленую окраску, Бхл *c* и *d* и каротиноид хлоробактин, а другие — коричневую, Бхл *e* и каротиноид изорениератин [18, 19]. Пигменты зеленоокрашенных зеленых серных бактерий хлоробактин и Бхл *c*, *d* и *e* поглощают синий и красный свет. Изорениератин коричневых штаммов зеленых серных бактерий поглощает свет с длиной волны 500–550 нм, поэтому они доминируют на больших глубинах, куда проникает только зеленый свет [20, 21]. Оба вида серобактерий также содержат Бхл *a*, который функционирует в антеннах и реакционных центрах, и небольшое количество Хл *a* в реакционных центрах [22]. Сближенные и взаимноориентированные молекулы Бхл в составе антенны обеспечивают высокоэффективную направленную миграцию энергии [23].

^а E-mail: harcheva.anastasiya@physics.msu.ru

Для спектров поглощения Бхл *c*, *d* и *e* характерны две главные полосы поглощения: в синем участке спектра и длинноволновый максимум в дальней красной области [24, 25]. В неповрежденных клетках зеленых серных бактерий длинноволновые пики в спектрах поглощения расположены в диапазоне 745–755 нм (Бхл *c*), 715–745 нм (Бхл *d*), 710–725 нм (Бхл *e*) [26]. Отметим, что речь идет о поглощении света агрегатами Бхл большого размера, так как мономеры Бхл, например, в органическом растворителе, поглощают свет в области 600–700 нм [18].

Для спектров флуоресценции Бхл клеток зеленых серных бактерий характерны две основные перекрывающиеся полосы: с максимумом в области 740–770 нм (Бхл *c*, *d* и *e*) и 810–815 нм (Бхл *a*). В зависимости от вида бактерий и их пигментов пики испускания могут сдвигаться. Коричневоокрашенные формы, содержащие в своем пигментном составе Бхл *e*, имеют максимум на длине волны 740 нм [27]. Для зеленоокрашенных форм с Бхл *c* и *d* характерен пик на длине волны 770 нм [26]. Второй максимум флуоресценции соответствует испусканию света молекулами Бхл *a*. Часто две формы аноксигенных бактерий присутствуют в водоемах одновременно на одних и тех же глубинах, поэтому при проведении экспресс-анализа природной воды с зелеными серными бактериями пики Бхл *c*, *d* и *e* сливаются в единую полосу. Длина волны испускания в максимуме огибающей полосы зависит от соотношения концентраций бактерий разного вида, поэтому по положению данного максимума можно оценить относительный вклад двух групп бактерий путем разбиения спектра на две компоненты гауссовой формы с максимумами на длинах волн 740 и 770 нм [14].

1. МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Образцы природной воды из озер Трехцветного и Елового, находящихся на разных стадиях изоляции от Белого моря, были отобраны в июле 2016 г. с разных горизонтов при помощи погружаемого насоса с шагом 50 см по глубине, а в области хемоклина — при помощи многоспринцевого пробоотборника с интервалом 2.5 см.

Для определения спектрально-флуоресцентных характеристик Бхл разных типов серобактерий использовали монокультуры зеленоокрашенных *Chlorobium phaeovibrioides* с плотностью клеточной суспензии $C = 5.8 \cdot 10^7$ кл/мл, коричневоокрашенных бактерий *Ch. phaeovibrioides* ($C = 3.1 \cdot 10^7$ кл/мл) и их смеси в разных пропорциях. Счет клеток под микроскопом осуществляли стандартным способом в камере Горяева. Для определения концентрации Бхл в культурах и образцах природной воды готовили ацетон-метаноловые (7:2) экстракты по методике, описанной в [28, 29].

Спектры флуоресценции культур зеленых серных бактерий и образцов воды измеряли на флуори-

метре Solar CM2203 при возбуждении длиной волны $\lambda_{ex} = 440$ нм. Спектры поглощения экстрактов культур и образцов воды регистрировали на спектрофотометре Unicо в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

2.1. Спектральные исследования монокультур зеленых серных бактерий

В спектрах испускания флуоресценции монокультур зеленых серных бактерий и их смесей обнаружен пик флуоресценции в области 740–770 нм, соответствующий испусканию света молекулами Бхл *c*, *d* и *e* (рис. 1, *a*). Для определения положения данного максимума в зависимости от соотношения концентраций разных видов бактерий были приготовлены смеси с различным процентным содержанием монокультур двух типов бактерий: 1) только зеленоокрашенные культуры, 2) 75% зеленоокрашенной и 25% коричневоокрашенной культур от объема пробы, 3) 60% зеленоокрашенной и 40% коричневоокрашенной культур, 4) 45% зеленоокрашенной и 55% коричневоокрашенной культур, 5) только коричневоокрашенные культуры. Полоса флуоресценции Бхл *c*, *d* и *e* аппроксимирована двумя компонентами гауссовой формы с максимумами на длинах волн 745 и 765 нм. Рассчитанное отношение площадей S_{765}/S_{745} под соответствующими кривыми хорошо согласовалось с процентным соотношением концентраций двух видов бактерий в объеме пробы. Предложенный метод может быть использован для разделения вкладов различных видов бактерий в образцах природной воды.

Для количественного определения содержания Бхл в культурах зеленых серных бактерий приготовлены ацетон-метаноловые экстракты и зарегистрированы их спектры оптической плотности в спектральном диапазоне 200–1000 нм относительно раствора ацетона и метанола (7:2) (рис. 1, *b*). Использование методов счета клеток бактерий под микроскопом и расчет концентрации Бхл с помощью спектроскопии поглощения экстрактов [28, 29] позволили нам рассчитать среднее содержание молекул Бхл в одной клетке бактерии: в зеленоокрашенной зеленой серной бактерии содержалось $25.0 \cdot 10^4$ молекул Бхл *d*, в коричневоокрашенной — $7.3 \cdot 10^4$ молекул Бхл *e*.

2.2. Спектральные исследования образцов природной воды

Исследуемые озера состоят из трех слоев воды, имеющих принципиальное различие в спектрально-флуоресцентных и физико-химических характеристиках [30, 31]: прозрачный поверхностный слой с оксигенными фототрофными микроорганизмами (водо-

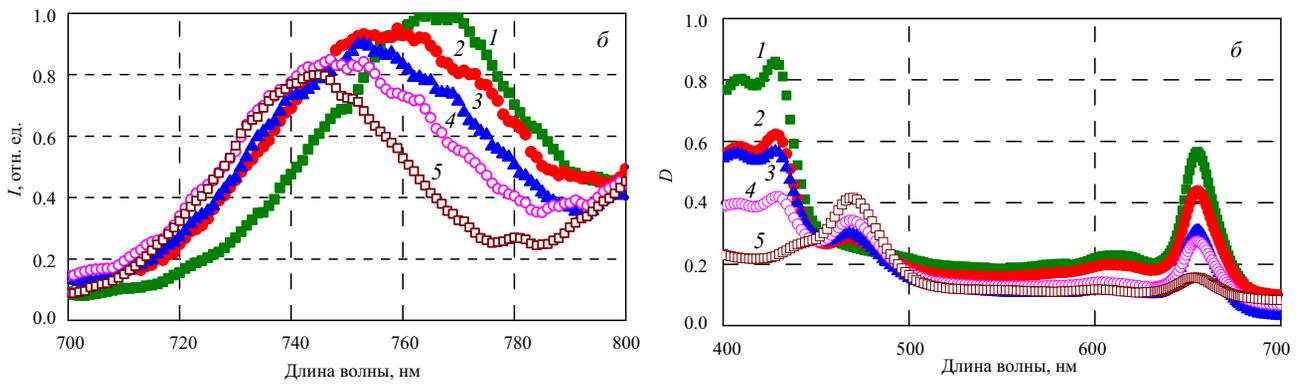


Рис. 1. Зависимость положения максимума испускания света бактериохлорофиллом в спектрах флуоресценции от соотношения концентраций двух типов зеленых серных бактерий (а), изменение полос поглощения в спектрах оптической плотности экстрактов при различных соотношениях концентраций двух типов зеленых серных бактерий *Chlorobium phaeovibrioides* (б); 1 — только зеленоокрашенные культуры, 2 — 75% зеленоокрашенных и 25% коричневоокрашенных культур, 3 — 60% зеленоокрашенных и 40% коричневоокрашенных культур, 4 — 45% зеленоокрашенных и 55% коричневоокрашенных культур, 5 — только коричневоокрашенные культуры

росли и цианобактерии), яркоокрашенный (от изумрудно-зеленого до буро-коричневого) слой с высокой концентрацией зеленых серных бактерий в области хемоклина соответствует переходу от аэробной среды к анаэробной [32] и придонный слой с оседающими и отмирающими зелеными серными бактериями, высокой концентрацией сероводорода и слабой освещенностью [14]. Согласно литературным данным [31, 33] верхний слой в озерах за счет поступления болотной и дождевой воды постепенно опресняется, положение хемоклина становится более глубоководным, а физико-химические характеристики воды в нижней части озер практически не изменяются.

Для образцов воды из озер Трехцветного и Елового, аналогично описанному в разд. 2.1, были измерены спектры флуоресценции. По флуоресценции природной воды в области 740–770 нм построены вертикальные распределения относительной интенсивности флуоресценции Бхл зеленых серных бактерий. По спектрам поглощения ацетон-метаноловых экстрактов рассчитаны концентрации Бхл $d+e$ и построены вертикальные распределения содержания этих фотосинтетических пигментов в озерах Трехцветном и Еловом.

В озере Трехцветном слой с наибольшим содержанием зеленых серных бактерий имел толщину около 30 см и располагался на глубине 1.7–2.0 м (рис. 2, а). Максимальная концентрация зеленых серобактерий была обнаружена на глубине 1.825 м, концентрация Бхл $d+e$ там составила $15.9 \pm 0.9 \text{ г/м}^3$.

Отметим важный факт, что распределение по глубине интенсивности флуоресценции Бхл не соответствует распределению концентрации этих же пигментов, определенной по спектрам поглощения экстрактов водных проб. Максимальное значение интенсивности флуоресценции Бхл зарегистрировано на глу-

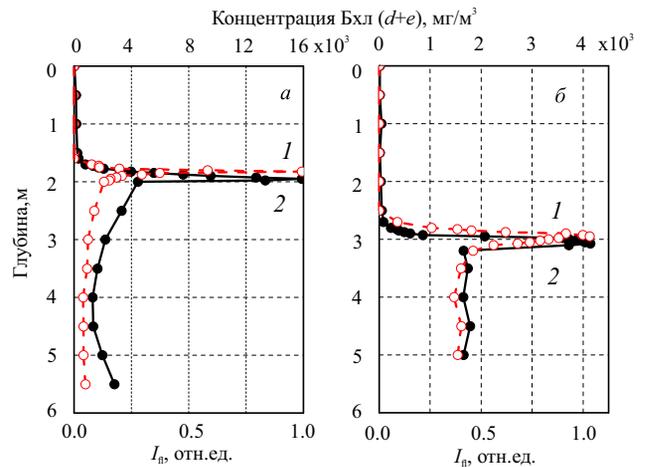


Рис. 2. Вертикальные распределения относительных интенсивностей флуоресценции бактериохлорофиллов зеленых серных бактерий (1) и концентраций бактериохлорофиллов ($d+e$) (2) в озерах Трехцветном (а) и Еловом (б) в июле 2016 г.

бине 1.900 м, то есть на 7.75 см ниже, чем пик концентрации пигментов. Мы предполагаем, что это связано с тушением флуоресценции Бхл на данных глубинах, так как известно, что в клетках ЗСБ происходит нарушение процесса переноса энергии возбуждения в фотосинтетическом аппарате при недостаточном значении окислительно-восстановительного потенциала Eh [34, 35] и наличии кислорода [36]. На глубине 2.1 м количество бактериальных клеток и концентрация пигментов резко падали. Интенсивность флуоресценции ниже хемоклина также плавно уменьшалась по направлению ко дну и практически не изменялась во всей нижележащей водной массе.

В озере Еловом зеленые серные бактерии появлялись на глубине 2.7 м (рис. 2, б). Их концентрация

резко возрастала с увеличением глубины до 2.95 м, при этом концентрация Бхл составляла $4.13 \pm 0.12 \text{ г/м}^3$ в максимуме. Затем наблюдалось резкое уменьшение концентрации бактерий, но более плавное, чем в озере Трехцветном. С глубины 3.5 м и ниже концентрация зеленых серных бактерий практически не менялась. Флуоресценция Бхл появлялась начиная с глубины 2.7 м, там же, где возникала заметная концентрация Бхл зеленых серных бактерий. В области наибольшей концентрации бактерий на глубине 2.9 м флуоресценция резко возрастала, но далее по направлению вниз не уменьшалась, а, наоборот, продолжала расти и достигала максимума на глубине 3.075 м, то есть как и в Трехцветном озере примерно на 10 см ниже горизонта с наибольшей численностью зеленых серных бактерий. Сразу под слоем с максимальной флуоресценцией ее интенсивность резко падала и оставалась низкой в диапазоне глубин 3.2–5.0 м.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе спектральными методами изучены аноксигенные фототрофные микроорганизмы хемоклина и анаэробной зоны двух меромиктических водоемов, отделившихся от Белого моря (оз. Трехцветного и оз. Елового) на примере природной воды с бактериями с разных горизонтов и выделенных монокультур *Ch. Phaeo-vibrioides*. Получены распределения зеленых серобактерий по глубине, в том числе отдельно для зеленоокрашенной и коричневоокрашенной форм. По нашим данным, в водоеме с преобладанием коричневоокрашенного штамма пик численности бактерий приходится на большую глубину, чем в водоеме с преобладанием зеленоокрашенного штамма. Это согласуется с наличием в фотосинтетическом аппарате бактерий коричневой окраски вспомогательного пигмента — каротиноида изорениератина, поглощающего свет диапазона 500–550 нм, глубже проникающий в высокоплотное микробное сообщество меромиктического водоема. Показано, что в каждом озере максимум распределения интенсивности флуоресценции Бхл клеток бактерий по глубине находится примерно на 8–10 см ниже горизонта с максимальной концентрацией пигмента, измеренной по спектрам поглощения экстрактов водных проб. Сделано предположение о нарушении процесса переноса энергии возбуждения между молекулами Бхл фотосинтетического аппарата зеленых серобактерий в зоне с максимальной численностью их клеток. Для монокультур рассчитано количество молекул Бхл в одной клетке бактерии: в зеленоокрашенной зеленой серной бактерии содержалось $25.0 \cdot 10^4$ молекул Бхл *d*, в коричневоокрашенной — $7.3 \cdot 10^4$ молекул Бхл *e*.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты № 16-05-00548а и № 17-04-01263а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gostev T.S., Kouzminov F.I., Gorbunov M.Yu. et al. // EARSel eProceedings. 2012. **11**, № 2. P. 98.
2. Doubell M.J., Prairie J.C., Yamazaki H. // Deep-Sea Research II. 2014. **101**. P. 207.
3. Калмацкая О.А., Левыкина И.П., Пацаева С.В. и др. // Вестн. Моск. ун-та. Физ. Астрон. 2013. № 6. С. 31. (Kalmatskaya O.A., Levykina I.P., Patsaeva S.V. et al. // Moscow Univ. Phys. Bull. 2013. **68**, N 6. P. 466.)
4. Калмацкая О.А., Караваев В.А. // Биофизика. 2015. 2015. **60**, № 5. С. 1018.
5. Khundzhua D.A., Patsaeva S.V., Terekhova V.A., Yuzhakov V.I. // J. Spectroscopy. 2013. **2013**. Article ID 538608.
6. Мошарова И.В., Ильинский В.В., Маторин Д.Н. и др. // Микробиология. 2015. **84**, № 6. С. 712.
7. Lunina O.N., Savvichev A.S., Krasnova E.D. et al. // Mikrobiologiya. 2016. **85**, № 5. P. 531.
8. Oguntoyinbo F.A. // Afr. J. Biotechnol. 2007. **6**, № 2. P. 163.
9. Harrison A.P. // Ann. Rev. Microbiol. 1984. **38**. P. 265.
10. Blankenship R.E., Madigan M.T., Bauer C.E. Anoxygenic photosynthetic bacteria. 2. Springer Netherlands, 1995.
11. Mori Y., Kataoka T., Okamura T., Kondo R. // Arch. Microbiol. 2013. **195**. P. 303.
12. Hamilton T.L., Bovee R.J., Thiel V. et al. // Geobiology. 2014. **12**, № 5. P. 451.
13. Pjevac P., Korlevic M., Berg J.S. et al. // Appl. Environ. Microbiol. 2014. **81**, № 1. P. 298.
14. Kharcheva A.V., Krasnova E.D., Gorlenko V.M. et al. // Proc. SPIE. 2016. **9917**. 99170Q.
15. Kurian S., Roy R., Repeta D.J. et al. // Biogeosciences. 2012. **9**. P. 2485.
16. Krasnova E.D., Kharcheva A.V., Milyutina I.A. et al. // JMBA. 2015. **95**, № 8. P. 1579.
17. Hashimoto H., Uragami C., Cogdell R.J. // Subcell. Biochem. 2016. **79**. P. 111.
18. Otte S.C.M., van der Heiden J.C., Pfennig N., Amesz J. // Photosynth. Res. 1991. **28**. P. 77.
19. Kharcheva A.V., Zhiltsova A.A., Lunina O.N. et al. // Proc. SPIE. 2016. **9917**. 99170P.
20. Overmann J., Cypionka H., Pfennig N. // Limnology and Oceanography. 1992. **37**, № 1. P. 150.
21. Borrego C.M., Garcia-Gil L.J. // Photosynth. Res. 1994. **41**, № 1. P. 157.
22. Tsukatani Y., Masuda S. // Orig. Life Evol. Biosph. 2015. **45**, № 3. P. 367.
23. Huh J., Saikin S.K., Brookes J.C. et al. // JACS. 2014. **136**. P. 2048.
24. Orf G.S., Blankenship R.E. // Photosynth. Res. 2013. **116**. P. 315.
25. Mizoguchi T., Harada J., Yamamoto K., Tamiaki H. // J. Photochem. Photobiol. A – Chem. 2015. **313**. P. 52.
26. Orf G.S., Tank M., Vogl K. et al. // Bioch. Bioph. Acta. 2013. **1827**. P. 493.
27. Harada J., Mizoguchi T., Satoh S. et al. // PLoS ONE. 2013. **8**, № 4. P. 1.
28. Lunina O.N., Savvichev A.S., Kuznetsov B.B. et al. // Microbiol. 2013. **83**, № 1. P. 90.
29. Горбунов М.Ю. // Поволжский экол. журн. 2011. № 3. С. 280.
30. Krasnova E., Voronov D., Frolova N. et al. // EARSel eProc. 2015. **1**. P. 8.

31. Vasil'chuk Yu. K., Frolova N. L., Krasnova E. D. et al. // *Water Res.* 2016. **43**, № 5. P. 828.
32. Kharcheva A. V., Meschankin A. V., Lyalin I. I. et al. // *Proc. SPIE.* 2014. **9031**. 90310T.
33. Lisitzin A. P., Vasil'chuk Yu. K., Shevchenko V. P. et al. // *Dokl. Earth Sci.* 2013. **449**, № 2. P. 406.
34. Blankenship R. E., Cheng P., Causgrove T. P. et al. // *Photochem. Photobiol.* 1993. **57**, № 1. P. 103.
35. Wang J., Brune D. C., Blankenship R. E. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1990. **1015**. P. 457.
36. Mirkovic T., Ostroumov E. E., Anna J. M. et al. // *Chem. Rev.* 2017. **117**. P. 249.

Bacteriochlorophyll Fluorescence of Green Sulfur Bacteria in Anaerobic Zone of Two Natural Water Bodies

A. V. Kharcheva^{1,a}, A. A. Zhiltsova¹, O. N. Lunina², E. D. Krasnova³, D. A. Voronov^{4,5}, A. S. Savvichev², S. V. Patsaeva¹

¹Department of General Physics, Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University. Moscow 119991, Russia.

²Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences. Moscow 117312, Russia.

³Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University. Moscow 119991, Russia.

⁴Institute for Information Transmission Problems of the Russian Academy of Sciences (Kharkevich Institute), Moscow, 127994, Russia.

⁵A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow 119992, Russia. E-mail: ^aharcheva.anastasiya@physics.msu.ru.

Absorption and fluorescence spectra for living cells of green sulfur bacteria inhabiting the anaerobic zone of two meromictic lakes separated from the White Sea have been studied. The spectral-optical properties of pure cultures of green-colored and brown-colored species of green sulfur bacteria *Chlorobium phaeovibrioides* have been compared, and the content of bacteriochlorophyll molecules in one bacterial cell of each species has been estimated. The method of separating the contributions of different groups of green sulfur bacteria to bacteriochlorophyll fluorescence was applied for a mixture of two species of bacteria with different pigmentation. The depth distributions of fluorescence intensity and concentration of bacteriochlorophylls for microorganisms inhabiting the Trekhtzvetnoe and Elovoe lakes at the Kandalaksha Gulf of the White Sea were plotted.

Keywords: fluorescence spectra, absorbance spectra, bacteriochlorophyll, green sulfur bacteria, *Chlorobium phaeovibrioides*.

PACS: 33.50.Dq, 42.68.Xy.

Received 13 September 2017.

English version: *Moscow University Physics Bulletin.* 2018. **73**, No. 4. Pp. 377–381.

Сведения об авторах

1. Харчева Анастасия Витальевна — аспирант; тел.: (926) 735-73-36, e-mail: harcheva.anastasiya@physics.msu.ru.
2. Жильцова Анна Александровна — студент; тел.: (910) 407-55-70, e-mail: aa.zhiltsova@physics.msu.ru.
3. Лунина Ольга Николаевна — канд. биол. наук, науч. сотрудник; тел.: (499) 135-79-77, e-mail: onlun@yandex.ru.
4. Краснова Елена Дмитриевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник; тел.: (903) 151-74-05, e-mail: e_d_krasnova@mail.ru.
5. Воронov Дмитрий Анатольевич — канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник; тел.: (925) 022-72-16, e-mail: da_voronov@mail.ru.
6. Саввичев Александр Сергеевич — доктор биол. наук, зав. лабораторией; тел.: (499) 135-79-77, e-mail: savvichev@mail.ru.
7. Пацаева Светлана Викторовна — канд. физ.-мат. наук, доцент; тел.: (916) 384-39-40, e-mail: spatseva@mail.ru.