

Флуоресценция хлоросомных бактериохлорофиллов в органических растворителях

© А.А. Жильцова¹, О.А. Филиппова¹, Е.Д. Краснова², Д.А. Воронов³, С.В. Пацаева¹

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, физический факультет, 119991 Москва, Россия

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119234 Москва, Россия

³ Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН, 127051 Москва, Россия

e-mail: aa.zhiljtcova@physics.msu.ru, e_d_krasnova@mail.ru, da_voronov@mail.ru, spatsaeva@mail.ru

Поступила в редакцию 30.11.2022 г.

В окончательной редакции 28.12.2022 г.

Принята к публикации 10.01.2023 г.

Хлоросомные бактериохлорофиллы являются главными фотосинтетическими пигментами зеленых серных бактерий — аноксигенных фототрофных микроорганизмов. Если спектральные свойства хлорофиллов высших растений, водорослей и цианобактерий достаточно хорошо изучены, то спектрально-люминесцентные свойства их родственных соединений, бактериохлорофиллов, которые участвуют в аноксигенном фотосинтезе, практически не описаны в научной литературе. Полярность растворителя и окружающая среда оказывают значительное влияние на спектры испускания (бактерио)хлорофиллов, которое выражается в спектральном сдвиге максимумов поглощения и флуоресценции, а также изменениях интенсивности флуоресценции. В работе получены спектральные характеристики бактериохлорофиллов *d* и *e* в таких органических растворителях, как ацетон, метанол, этанол и изопропанол, а также в смесях ацетон-этанол (7 : 2) и ацетон-метанол (7 : 2). Данные растворители чаще всего используются для экстракции бактериохлорофиллов из клеток бактерий, поэтому работа будет полезна для разработки методов количественного определения хлоросомных бактериохлорофиллов в клетках бактерий или в пробах природной воды.

Ключевые слова: бактериохлорофилл (Бхл), флуоресценция, спектры поглощения, фотосинтетические пигменты.

DOI: 10.21883/OS.2023.06.55916.108-23

1. Введение

Спектрально-люминесцентные свойства бактериохлорофиллов (Бхл), пигментов фототрофных бактерий, в отличие от родственных соединений, хлорофиллов (Хл), практически не описаны в научной литературе. Бактериохлорофиллы представляют собой группу фотосинтетических тетрапиррольных пигментов, которые синтезируются различными аноксигенными фототрофными бактериями, осуществляющими фотосинтез без выделения кислорода (аноксигенный фотосинтез). У зеленых серных бактерий (ЗСБ) основными фотосинтетическими пигментами являются Бхл *d* и *e*, которые относятся к хлоросомным Бхл (*chlorosome chlorophylls*) [1] или, как раньше их называли, хлоробиум-хлорофиллам (*chlorobium chlorophylls*) [2]. Молекулы Бхл *d* и *e*, как и Хл, имеют хлориновое макроциклическое кольцо, степень ненасыщенности которого определяет характерные спектральные особенности данных соединений [3]. В отличие от всех остальных Хл и Бхл, у Бхл *d* и *e* отсутствует заместитель $-\text{COOCH}_3$ и присутствует заместитель $-\text{СНОН}-\text{СН}_3$, что позволяет молекулам агрегировать в определенные макромолекулярные структуры и обеспечивает плотную упаковку молекул Бхл

в хлоросомах, светособирающих комплексах ЗСБ [4]. В одной фотосинтетической единице ЗСБ (хлоросоме) может содержаться от 900 до 4500 молекул Бхл *d* или *e* и около 80–250 молекул Бхл *a*. Для сравнения фотосинтетическая единица зеленой нитчатой серобактерии содержит 100–200 молекул Бхл *c* в хлоросоме и около 10 молекул Бхл *a* [5,6].

Спектры поглощения Бхл *d* и *e* как в пробах природной воды с микроорганизмами, так и в экстрактах в органических растворителях используют для оценки концентрации ЗСБ в водоемах [7–9]. Методы, основанные на использовании абсорбционных характеристик пигментов, наиболее удобны для количественной оценки. Концентрация Бхл в серии образцов природной воды может быть оценена по спектрам флуоресценции их экстрактов [9–11] вследствие линейной зависимости концентрации пигмента от интенсивности его флуоресценции. Однако для калибровки этого метода требуется знание концентрации пигмента и его флуоресценции в одном из исследуемых образцов. Кроме того, имеется возможность оценки парциальных концентраций двух разновидностей ЗСБ по спектрам флуоресценции проб природной воды с микроорганизмами посредством разложения максимума флуоресценции на три кривые

гауссовой формы с фиксированными параметрами [12]. Однако этот метод не позволяет оценить точное содержание пигментов в образцах в отличие от методов абсорбционной спектроскопии. Таким образом, данное направление исследований крайне актуально для мониторинга стратифицированных водоемов с сульфидной аноксией, которая может возникать естественным путем или в случае антропогенного загрязнения, включая реликтовые водоемы Арктики. Общей отличительной чертой таких водоемов является устойчивое расслоение толщи воды и образование места обитания аноксигенных фототрофных микроорганизмов (преимущественно ЗСБ) на границе кислородного и сероводородного слоев.

В биохимических исследованиях для выделения хлорофиллов, каротиноидов и других липофильных пигментов клеток бактерий, в том числе в методе высокоэффективной жидкостной хроматографии, широко применяется процедура экстрагирования с помощью ацетона, метанола, изопропанола, этанола и наиболее часто используемого раствора ацетон-метанола в соотношении объемов 7 : 2 [13–17]. Эффективность экстракции липофильных пигментов, к которым относится Бхл, зависит сразу от нескольких факторов: полярности растворителя [18], видового разнообразия организмов, расположения и ориентации внутриклеточного пигмента, взаимодействия растворителя с мембраной [19]. В связи с этим в настоящее время не удастся выделить какой-либо один растворитель, полностью подходящий для экстрагирования фотосинтетических пигментов клеток. Работ, в которых представлены результаты исследования непосредственного влияния органических растворителей на выделение хлоросомных Бхл (Бхл *d* и *e*) из клеток, нами найдено не было. По этой причине полученные в настоящей работе результаты являются принципиально новыми и практически значимыми.

2. Объекты и методы исследования

Объектами исследования являлись пробы воды с двумя разновидностями зеленых серных бактерий (*Chlorobiaceae*) — зеленоокрашенными ЗСБ (в клетках которых содержится Бхл *d* и каротиноид хлоробактин) и коричневоокрашенными ЗСБ (содержащими в качестве фотосинтетического пигмента Бхл *e* и каротиноид изорениератин) [1]. Образцы природной воды были отобраны в ходе экспедиции в сентябре 2022 г. погружным насосом из хемоклина прибрежных стратифицированных озер, отделяющихся от Белого моря в Кандалакшском заливе. В хемоклине данных озер присутствовала только одна разновидность ЗСБ, что позволило использовать пробы воды из них в качестве источников определенных Бхл. Вода с зеленоокрашенными ЗСБ была отобрана из озера Трёхцветное с глубины 2.2 м, с коричневоокрашенными ЗСБ — из Лагуны на Зеленом мысе с глубины 5.3 м. Выбор глубины определялся расположением зоны

с максимальной концентрацией микроорганизмов в водной толще. Проверка чистоты пигмента, содержащегося в пробах природной воды, проводилась по спектрам испускания их флуоресценции, которые имеют различные параметры (длину волны максимума и ширину полосы флуоресценции) в зависимости от присутствия того или иного типа Бхл [12]. Микроорганизмы из озер были сконцентрированы на стекловолоконных фильтрах с размером пор $2\ \mu\text{m}$ с помощью стандартной фильтрационной установки. После высушивания фильтров из полученных образцов готовили концентрированные экстракты.

2.1. Приготовление экстрактов

В работе использовались четыре органических растворителя (ацетон, метанол, этанол и изопропанол) и две приготовленные смеси — раствор ацетон-этанола (7 : 2) и раствор ацетон-метанола (7 : 2). С целью устранения влияния растворителя на процесс выхода пигмента из клеток бактерий в раствор предварительно были приготовлены два концентрированных экстракта Бхл *d* и *e* в ацетоне, одинаковый объем которых впоследствии разбавлялся в 60 раз каждым из вышеупомянутых растворителей. Полученные в процессе такого разбавления растворы содержали одинаковое количество Бхл *d* или *e* в мономерной форме. Влиянием ацетона на другую используемый растворитель в таких растворах пренебрегали.

2.2. Метод определения концентрации Бхл в экстрактах

В соответствии с законом Бугера–Ламберта–Бера монохроматический свет с определенной длиной волны при прохождении через оптически тонкий слой вещества ослабляется пропорционально толщине тонкого слоя и концентрации поглощающего свет вещества. В слое конечной толщины ослабление будет проходить по экспоненциальному закону. Оптическая плотность D , которая определяется как десятичный логарифм отношения интенсивности света, падающего на образец, к интенсивности света, выходящего из образца, пропорциональна концентрации поглощающих молекул. Для экстракта Бхл концентрации C [mol/l] и длины оптического пути l [cm]

$$D = \varepsilon_{10}Cl,$$

где ε_{10} — коэффициент пропорциональности, называемый десятичным молярным коэффициентом экстинкции [l/(mol·cm)]. Десятичный молярный коэффициент экстинкции связан с молярным соотношением $\varepsilon_{10} \sim 0.4343\varepsilon_{\text{мол}}$. В зависимости от размерности концентрации C (выраженной в g/l или mol/l) выделяют удельный ε и молярный $\varepsilon_{\text{мол}}$ коэффициенты экстинкции, связанные между собой соотношением

$$\varepsilon M = \varepsilon_{\text{мол}},$$

где M — молярная масса пигмента (Бхл) [20].

При переходе к удельному коэффициенту экстинкции ε и концентрации c размерностью $[g/l]$ получаем окончательную формулу расчета концентрации Бхл d или e в ацетоне, которая была использована в работе:

$$C = D/0.4343\varepsilon l,$$

где D — оптическая плотность экстракта на длине волны 655 nm, l — длина оптического пути, равная 1 см, ε — коэффициент экстинкции в ацетоне, равный 98 l/g·cm для Бхл d [2] и 58.6 l/g·cm для Бхл e [13].

2.3. Спектральные измерения

Измерение спектров оптической плотности проб проводилось на спектрофотометре Solar PB2201 в диапазоне длин волн от 350 до 900 nm. Спектры испускания флуоресценции были зарегистрированы на флуориметре Solar SM2203 при длине волны возбуждения 425 nm в диапазоне длин волн от 500 до 800 nm (для экстрактов) и при длине волны возбуждения 440 nm в диапазоне длин волн от 600 до 820 nm (для двух проб природной воды). Температура кюветного отделения устанавливалась равной 15°C. Для спектральных измерений использовалась стандартная кварцевая кювета с плотно прилегающей крышкой с длиной оптического пути 1 см. Спектры испускания флуоресценции были скорректированы на поглощение по формуле

$$I_{\text{corr}} = I \cdot 10^{0.5(D_{\text{ex}}+D_{\text{em}})},$$

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.

3. Экспериментальные результаты

3.1. Спектры поглощения

Бактериохлорофиллы d и e в клетках бактерий находятся в высокоагрегированном состоянии и имеют два пика поглощения: в коротковолновой (440–460 nm, полосу Core) и длинноволновой (730–750 nm) областях [21]. В органических растворителях наблюдается сдвиг максимумов поглощения в коротковолновую область спектра в связи с переходом агрегированного состояния пигмента Бхл в мономерную форму [1]. Все спектры растворов Бхл имеют две ярко выраженные полосы поглощения в коротковолновой и длинноволновой областях (рис. 1). Коротковолновая полоса зеленоокрашенной формы ЗСБ (главный фотосинтетический пигмент Бхл d) состоит из двух перекрывающихся полос с максимумами в районах 412–415 и 430–433 nm (в зависимости от растворителя), что соответствует поглощению света Бхл d и каротиноидами, основным из которых является хлоробактин [1]. В длинноволновой области спектра присутствует

ярко выраженный максимум поглощения на 655–661 nm (длина волны зависит от растворителя) рядом с менее заметным — на длине волны 613–622 nm, соответствующим поглощению только Бхл d [2,22,23]. Коричневоокрашенная форма ЗСБ отличается от зеленоокрашенной усиленным поглощением в сине-зеленой области длин волн видимого спектра, что объясняет возможность их обитания в более глубоких слоях воды, куда проникает свет данного спектрального диапазона [24]. Коротковолновая полоса коричневоокрашенной формы ЗСБ (главный фотосинтетический пигмент Бхл e) состоит из трех перекрывающихся полос с максимумами при 412–415 и 430–434 nm (в зависимости от растворителя), соответствующими поглощению Бхл e и каротиноидов, а также ярко выраженной полосы с максимумом на 466–479 nm (табл. 1), обусловленной поглощением специального каротиноида — изорениератина [23].

Таким образом, в разных растворителях местоположение коротковолновых максимумов Бхл d и e различалось не более, чем на 3 nm, тогда как главный длинноволновый максимум Бхл d и e смещался на 6 nm в длинноволновую область спектра в ряду используемых растворителей ацетон → ацетон-этанол (7 : 2) → ацетон-метанол (7 : 2) → изопропанол → этанол → метанол.

Используя значения оптической плотности ацетонового экстракта и известные из литературы коэффициенты экстинкции Бхл d и e в ацетоне, были рассчитаны концентрации каждого пигмента в приготовленных растворах (разд. 2.2). Полученные значения составили 2.4 mg/l для всех растворов, содержащих Бхл d , и 2.1 mg/l для растворов, содержащих Бхл e . Несмотря на близкие значения концентраций, поглощающие способности пигментов сильно различаются, о чем свидетельствует различие в максимумах оптической плотности кривых поглощения. Так, оптическая плотность Бхл d превышала оптическую плотность Бхл e почти в 2 раза в растворах ацетон-этанола (7:2) и изопропанола. Соотношение максимумов в коротковолновой области тоже было различным и зависело от растворителя (рис. 2).

3.2. Спектры флуоресценции

Для экстрактов Бхл в различных органических растворителях были получены спектры испускания флуоресценции на длине волны возбуждения 425 nm (рис. 3). Длина волны возбуждения была выбрана экспериментально исходя из максимумов спектров поглощения или спектров возбуждения флуоресценции, где максимум поглощения или излучения приходился на длину волны 425 nm. Все спектры имели главный пик флуоресценции на длинах волн от 657 до 665 nm и второй пик со значительно меньшей интенсивностью, максимум которого приходился на длины волн от 712 до 720 nm в зависимости от растворителя (табл. 2).

Максимумы флуоресценции Бхл сдвигались в длинноволновую область спектра в ряду

Таблица 1. Длины волн (в nm), соответствующие максимумам оптической плотности для экстрактов Бхл *d* и *e* (λ_{\max}), и значения оптической плотности *D* (в скобках) в длинноволновом максимуме

Пигмент	Растворитель	Формула	λ_{\max} , (<i>D</i>)
Бхл <i>d</i>	Ацетон	(CH ₃) ₂ CO	412, 430, 615, 655 (0.099)
	Ацетон-этанол (7:2)	–	412, 431, 617, 657 (0.097)
	Ацетон-метанол (7:2)	–	413, 431, 616, 657 (0.083)
	Изопропанол	(CH ₃) ₂ CH(OH)	413, 432, 617, 659 (0.094)
	Этанол	C ₂ H ₅ OH	415, 433, 622, 660 (0.087)
	Метанол	CH ₃ OH	413, 433, 613, 661 (0.082)
Бхл <i>e</i>	Ацетон	(CH ₃) ₂ CO	412, 430, 615, 655 (0.059)
	Ацетон-этанол (7:2)	–	412, 431, 617, 656 (0.052)
	Ацетон-метанол (7:2)	–	413, 431, 616, 657 (0.053)
	Изопропанол	(CH ₃) ₂ CH(OH)	413, 432, 618, 657 (0.053)
	Этанол	C ₂ H ₅ OH	414, 434, 612, 659 (0.044)
	Метанол	CH ₃ OH	415, 433, 615, 661 (0.055)

Таблица 2. Длины волн λ_{\max} (в nm), соответствующие максимумам флуоресценции для экстрактов Бхл *d* и *e*, и интенсивность в максимуме I_{Π} (в относительных единицах, в скобках), для растворителей указаны значения дипольного момента μ [29]

Пигмент	Растворитель	Формула	μ , D	λ_{\max} (I_{Π})
Бхл <i>d</i>	Ацетон	(CH ₃) ₂ CO	2.84	657 (96.2), 713 (11.6)
	Ацетон-этанол (7:2)	–	–	659 (74.2), 716 (10.3)
	Ацетон-метанол (7:2)	–	–	661 (60.4), 717 (9.1)
	Изопропанол	(CH ₃) ₂ CH(OH)	1.66	662 (57.1), 718 (8.6)
	Этанол	C ₂ H ₅ OH	1.69	663 (49.8), 719 (8.4)
	Метанол	CH ₃ OH	1.70	665 (37.7), 720 (7.4)
Бхл <i>e</i>	Ацетон	(CH ₃) ₂ CO	2.88	657 (43.2), 712 (5.1)
	Ацетон-этанол (7:2)	–	–	659 (33.4), 715 (4.6)
	Ацетон-метанол (7:2)	–	–	660 (31.8), 717 (4.7)
	Изопропанол	(CH ₃) ₂ CH(OH)	1.66	662 (28.4), 717 (4.3)
	Этанол	C ₂ H ₅ OH	1.69	663 (24.3), 719 (4.1)
	Метанол	CH ₃ OH	1.70	665 (16.0), 719 (3.1)

растворителей: ацетон→ацетон-этанол (7:2)→ацетон-метанол (7:2)→изопропанол→этанол→метанол, где максимумы флуоресценции Бхл *d* или *e* в ацетоне приходились на наименьшие длины волн, а дальше всех были расположены максимумы Бхл в растворе метанола. При этом интенсивность флуоресценции для этого же ряда растворителей уменьшалась, несмотря на одинаковую концентрацию Бхл в растворе. Например, интенсивность излучения Бхл *d* и *e* в метаноле оказалась в более чем 2.5 раза меньше, чем в ацетоне.

В работе [26] проводилось исследование флуоресценции Бхл *d* в трех различных растворителях — метаноле, насыщенном гексанолом воде и чистой воде — при одинаковой концентрации Бхл. Было показано, что интенсивность флуоресценции Бхл *d* в метаноле значительно выше, чем в воде, насыщенном гексанолом. Сильное тушение излучения во втором случае объяснялось взаимодействием флуорофора с окружающими молекулами растворителя.

Стоит отметить, что в настоящей работе получено, что длины волн, на которые приходятся максимумы флуоресценции Бхл *d* и *e*, совпадают с точностью до 1 nm для обоих пигментов в каждом из растворителей, как и форма кривой испускания (рис. 4, *a*), несмотря на разную концентрацию пигмента (2.4 mg/l Бхл *d* и 2.1 mg/l Бхл *e*) и различные излучающие способности. Для сравнения были измерены спектры флуоресценции природной воды с фототрофными бактериями из озер, которая использовалась для приготовления экстрактов. В качестве возбуждения использовался свет с длиной волны 440 nm, как в работах [9,12,21]. В отличие от Бхл в экстрактах длины волн максимумов флуоресценции Бхл *d* и *e* в клетках бактерий отстоят друг от друга на 20 nm, что наблюдается и в предыдущих работах [12,21]. Максимум флуоресценции клеток бактерий с Бхл *e* (коричневоокрашенная форма ЗСБ) приходится на длину волны 745 nm, а с Бхл *d* (зеленоокрашенная форма) — на 765 nm (рис. 4, *b*).

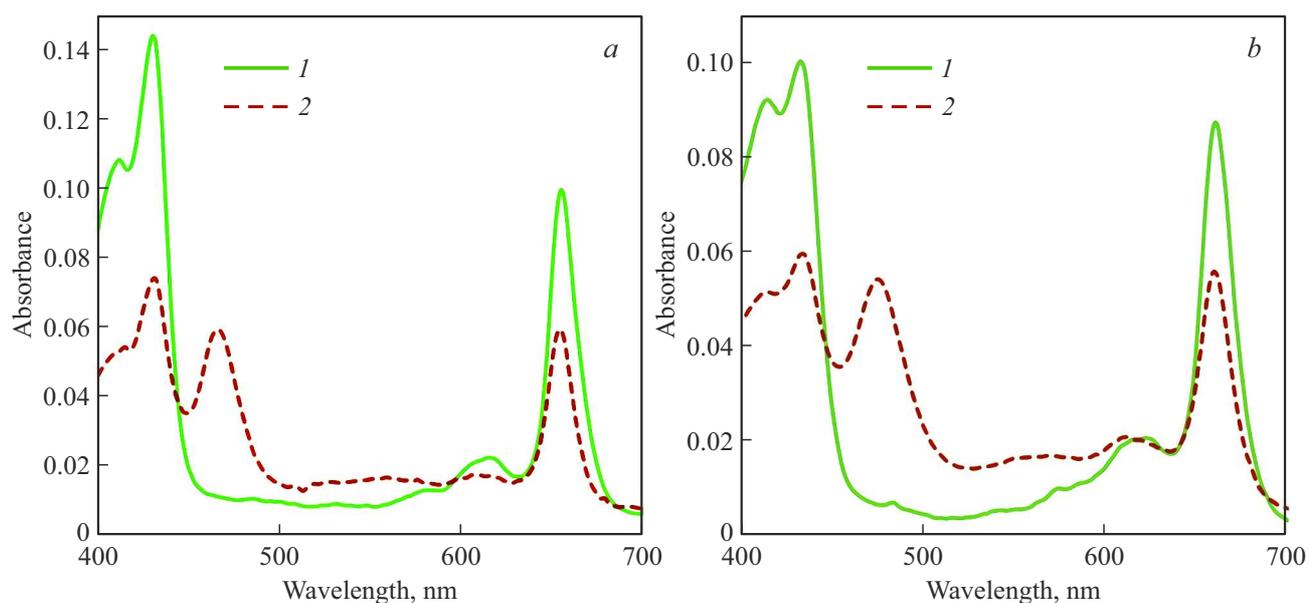


Рис. 1. Спектры поглощения Бхл *d* (1), Бхл *e* (2) в ацетоне (а) и этаноле (б).

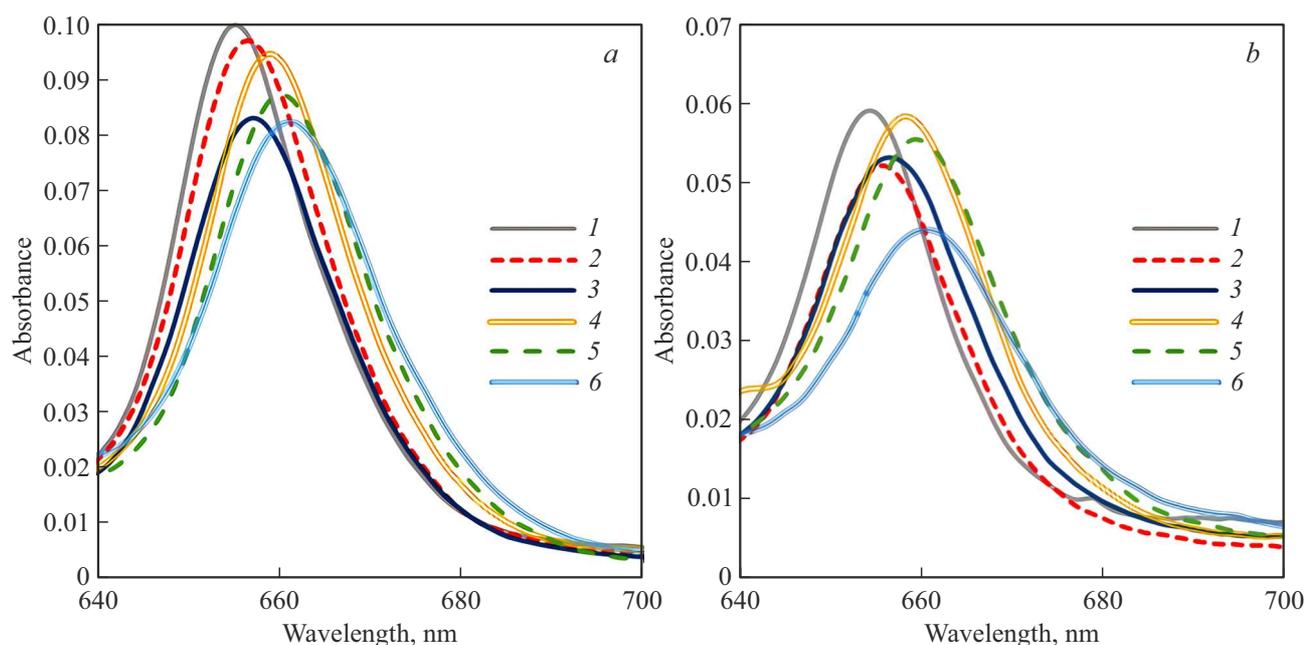


Рис. 2. Длинноволновая полоса поглощения растворов Бхл *d* (а) и Бхл *e* (б) в ацетоне (1), ацетон-этаноле (7 : 2) (2), ацетон-метаноле (7 : 2) (3), изопропаноле (4), этаноле (5), метаноле (6).

4. Обсуждение результатов

В органическом растворителе молекулы Бхл находятся в мономерном состоянии, поэтому изменение спектров поглощения и флуоресценции объясняется сольватацией молекул и воздействием растворителя на электронные уровни молекул. Растворитель воздействует на электронную оболочку молекулы Бхл *d* или *e*, изменяя энергию электронных энергетических уровней в молекуле, что отражается на положении полос в спек-

трах поглощения. При этом уровень энергии основного состояния понижается на величину энергии сольватации, которая зависит от силы и характера взаимодействия молекул порфиринов (к которым относится и Бхл) с растворителем [27]. Считается, что спектры поглощения менее чувствительны к специфическим характеристикам растворителя (например, к полярности), чем спектры флуоресценции [25], что наблюдается и в настоящей работе, где изменение положения максимума оптической плотности не столь велико, как изменение положения

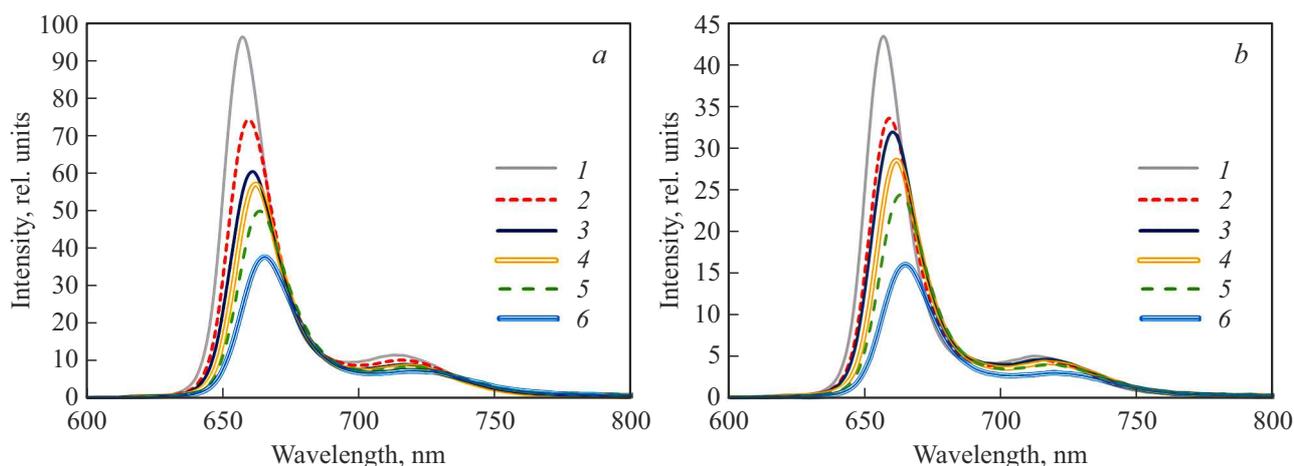


Рис. 3. Спектры испускания флуоресценции Бхл *d* (а) и Бхл *e* (б) в ацетоне (1), ацетон-этаноле (7 : 2) (2), ацетон-метаноле (7 : 2) (3), изопропанол (4), этаноле (5), метаноле (6) (на длине волны возбуждения 425 nm).

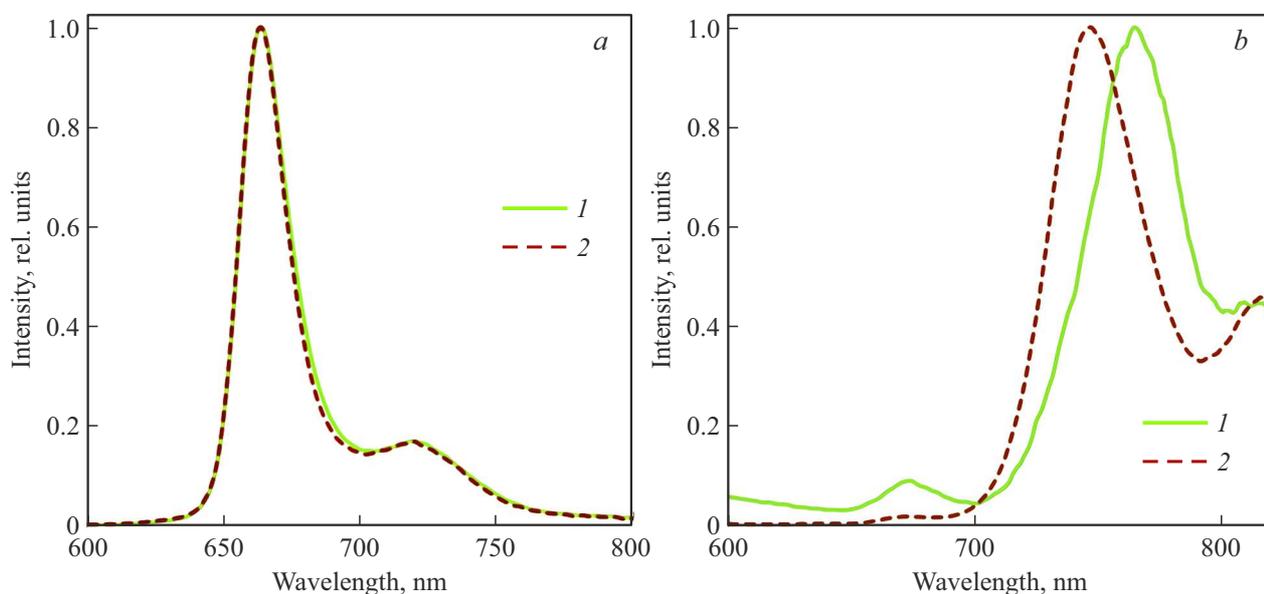


Рис. 4. Спектры флуоресценции, нормированные на длинноволновый максимум флуоресценции: Бхл *d* (1), Бхл *e* (2) в ацетоне (а) и в воде (б) на длинах волн возбуждения 425 и 440 nm соответственно.

максимума флуоресценции в различных растворителях. В возбужденном состоянии характер взаимодействия молекул порфиринов с растворителем изменяется в связи с изменением состояния электронной оболочки молекулы вследствие ее поляризации электрическим вектором световой волны, т.е. меняется не только электронное состояние излучающего флуорофора, но и окружающей его среды, которая содержит молекулы растворителя, ориентированные вокруг дипольного момента возбужденного состояния. В этом случае полярность растворителя может оказать значительное влияние на спектры излучения [28].

Сдвиг максимума флуоресценции Бхл в различных органических растворителях может быть объяснен раз-

личием в полярности молекул растворителя, а также различной способностью к связыванию с молекулами Бхл. Обычно флуорофор имеет больший дипольный момент в возбужденном состоянии, чем в основном. После возбуждения диполи растворителя могут переориентироваться, что снижает энергию возбужденного состояния. По мере увеличения полярности растворителя этот эффект становится сильнее и приводит к испусканию на более низких энергиях или больших длинах волн [25].

Одним из показателей полярности вещества на молекулярном уровне является дипольный момент молекулы, он характеризует электрические свойства молекулы как системы заряженных частиц [29].

Для наблюдаемой последовательности растворителей, соответствующей сдвигу максимумов поглощения и флуоресценции Бхл (ацетон→ацетон:этанол (7:2)→ацетон:метанол (7:2)→изопропанол→этанол→метанол), наибольшим дипольным моментом обладает ацетон ($\mu = 2.84 \text{ D}$), однако другие растворители, хотя и имеют меньший дипольный момент (табл. 2, [29]), однако не выстраиваются по порядку его убывания. Следовательно, полярность растворителя и окружающая среда оказывают значительное влияние на спектры испускания Бхл, однако объяснить наблюдаемые изменения только влиянием полярности растворителя не представляется возможным.

Родственными соединениями Бхл *d* и *e* микроорганизмов являются Хл *a* и *b* растений. Все они являются фитохлоринами с одним восстановленным кольцом в химической структуре. Бхл *e* имеет заместитель -СНО, присутствующий и у Хл *b*, что приводит к схожести их спектральных характеристик [4]. В растворах спектры поглощения Бхл *d* очень похожи на спектры поглощения Хл *a*, однако в отличие от Бхл в мономерном состоянии разность длин волн, на которые приходится максимумы поглощения Хл *a* и *b*, в ацетоне составляет 17 nm, а в метаноле — 13.2 nm [30], т.е. является значительной по сравнению с аналогичными величинами, наблюдаемыми для Бхл *d* и *e*.

Спектры флуоресценции Хл *a* и *b*, как и спектры флуоресценции Бхл *d* и *e*, состоят из двух полос, одна из которых соответствует электронным переходам между синглетными энергетическими уровнями в молекуле флуорофора, а другая (с меньшей интенсивностью и находящаяся в более длинноволновой области спектра) связана с колебательными модами [31]. Длина волны, на которую приходится максимум поглощения Хл *a* в ацетоне равна 663 nm, Хл *b* — 645 nm. Главные максимумы флуоресценции Хл *a* и *b* в ацетоне расположены на длинах волн 669.5 и 654.6 nm соответственно [30,32]. Таким образом, стоксов сдвиг для Хл *a* в ацетоне составляет 6.5 nm, а для Хл *b* — 9.6 nm. В случае Бхл *d* и *e* стоксов сдвиг варьирует от 2 до 4 nm в зависимости от растворителя. Меньшие значения стоксова сдвига свидетельствуют о меньших потерях энергии в процессе ее миграции, что указывает на большую эффективность переноса энергии в молекулах Бхл по сравнению с Хл.

Совпадение спектральных характеристик (длины волн, на которые приходится максимумы флуоресценции, форма кривых испускания) Бхл *d* и *e* во всех исследуемых органических растворителях и их значительное различие в клетках в водных суспензиях свидетельствуют о разном влиянии агрегации на спектральные свойства молекул. В высокоагрегированном состоянии Бхл *d* обладает более длинноволновой флуоресценцией по сравнению с Бхл *e*. В то же время спектральные свойства мономеров Бхл *d* и *e*, наблюдаемые в органических растворителях, совпадают по многим характеристикам.

5. Заключение

В ходе работы измерены спектры поглощения и флуоресценции хлоросомных Бхл (Бхл *d* и *e*) в таких органических растворителях как ацетон, метанол, этанол и изопропанол, а также смесях-растворах ацетон-этанол (7:2) и растворах ацетон-метанол (7:2). Показана близость длин волн максимумов поглощения и испускания флуоресценции обоих типов Бхл (*d* и *e*) в мономерной форме. Однако выявлена зависимость данных спектральных характеристик от растворителя. Определена последовательность растворителей, соответствующая сдвигу максимумов спектров поглощения и флуоресценции в область больших длин волн: ацетон→ацетон:этанол (7:2)→ацетон:метанол (7:2)→изопропанол→этанол→метанол. Наши наблюдения могут свидетельствовать о различном взаимодействии флуорофора с окружающими молекулами растворителя.

Данные растворители широко используются в биохимических исследованиях, а также при расчете концентрации Бхл в культурах клеток или в природной воде. Полученные данные позволят провести корректировку имеющихся спектральных методов в зависимости от использования определенного растворителя, а также выбрать подходящую среду для экстракции пигментов. Наблюдаемые в работе закономерности объяснены с точки зрения теории сольватофлуорохромии, выдвинуты предположения об имеющихся особенностях поглощения и флуоресценции Бхл в экстрактах.

Финансирование работы

А.А. Жильцова выражает благодарность за поддержку Фонду развития теоретической физики и математики „БАЗИС“ (проект 19-2-6-87-1).

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] Anoxygenic Photosynthetic Bacteria, ed. by R.E. Blankenship, M.T. Madigan, C.E. Bauer (Kluwer Academic Publishers, New York, 2004), vol. 2, ch. 20, p. 399-435.
- [2] R.Y. Stanier, J.H.C. Smith. *Biochim. Biophys. Acta*, **41** (3), 478 (1960). DOI: 10.1016/0006-3002(60)90045-7
- [3] *Advances in Photosynthesis and Respiration*, ed. by B.R. Green, W.W. Parson (Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 2003), vol. 13, ch. 2, p. 29–81. DOI: 10.1007/978-94-017-2087-8_2
- [4] *Chlorophylls and Bacteriochlorophylls: Biochemistry, Biophysics, Functions and Applications*, ed. by B. Grimm, R.J. Porra, W. Rudiger, H. Scheer (Springer, Dordrecht, 2006), vol. 25, ch. 1, p. 1–26.
- [5] J.M. Olson. *Photochem. Photobiol.*, **67** (1), 61 (1998). DOI: 10.1111/j.1751-1097.1998.tb05166.x

- [6] Anoxygenic Photosynthetic Bacteria, ed. by R.E. Blankenship, M.T. Madigan, C.E. Bauer (Kluwer Academic Publishers, New York, 2004), vol. 2, ch. 30, p. 665–685.
- [7] П.С. Емельянцева, А.А. Жильцова, Е.Д. Краснова, Д.А. Воронов, В.В. Рымарь, С.В. Пацаева. Вестн. Моск. ун-та. Сер. 3. Физ. Астрон., (2), 25 (2020). [P.S. Emeliantsev, A.A. Zhiltsova, E.D. Krasnova, D.A. Voronov, V.V. Rymar, S.V. Patsaeva. Moscow University Physics Bulletin, **75** (2), 137 (2020). DOI: 10.3103/S0027134920020046].
- [8] A.A. Zhiltsova, E.D. Krasnova, A. Prosenkov, A.I. Pelaez Andres, D.A. Voronov, S.V. Patsaeva. Proc. SPIE, 12086, 1208603 (2021). DOI: 10.1117/12.2613667
- [9] А.А. Жильцова, О.А. Филиппова, Е.Д. Краснова, Д.А. Воронов, С.В. Пацаева. Оптика атмосферы и океана, **35** (4), 312 (2022). DOI: 10.15372/AOO20220411 [A.A. Zhiltsova, O.A. Filippova, E.D. Krasnova, D.A. Voronov, S.V. Patsaeva. Atmospheric and Oceanic Optics, **35** (5), 562 (2022). DOI: 10.1134/S1024856022050232].
- [10] A.A. Zhiltsova, V.V. Rymar, E.D. Krasnova, D.A. Voronov, S.V. Patsaeva. Proc. SPIE, **11845**, 118450H (2021). DOI: 10.1117/12.2590921
- [11] A.A. Zhiltsova, E.D. Krasnova, D.A. Voronov, G.N. Losyuk, N.M. Kokryatskaya, S.V. Patsaeva. Proc. SPIE, **12192**, 121920K (2022). DOI: 10.1117/12.2626191
- [12] А.А. Жильцова, А.В. Харчева, Е.Д. Краснова, О.Н. Лунина, Д.А. Воронов, А.С. Саввичев, О.М. Горшкова, С.В. Пацаева. Оптика атмосферы и океана, **31** (3), 233 (2018). DOI: 10.15372/AOO20180315 [A.A. Zhiltsova, A.V. Kharcheva, E.D. Krasnova, O.N. Lunina, D.A. Voronov, A.S. Savvichev, O.M. Gorshkova, S.V. Patsaeva. Atmospheric and Oceanic Optics, **31** (4), 390 (2018). DOI: 10.1134/S1024856018040188].
- [13] C.M. Borrego, J.B. Arellano, C.A. Abella, T. Gillbro, L.J. Garcia-Gil. Photosynth. Res., **60** (2–3), 257 (1999). DOI: 10.1023/A:1006230820007
- [14] B. Tian, Z. Sun, S. Shen, H. Wang, J. Jiao, L. Wang, Y. Hu, Y. Hua. Lett. Appl. Microbiol., **49** (6), 699 (2009). DOI: 10.1111/j.1472-765x.2009.02727.x
- [15] M. Ruivo, P. Cartaxana, M. Cardoso, A. Tenreiro, R. Tenreiro, B. Jesus. Limnology and Oceanography: Methods, **12** (6), 338 (2014). DOI: 10.4319/lom.2014.12.338
- [16] О.Н. Лунина, А.С. Саввичев, В.В. Бабенко, Д.И. Болдырева, Б.Б. Кузнецов, Т.В. Колганова, Е.Д. Краснова, Н.М. Кокрятская, Е.Ф. Веслополова, Д.А. Воронов, Н.А. Демиденко, М.А. Летарова, А.В. Летаров, В.М. Горленко. Микробиология, **88** (1), 100 (2019). DOI: 10.1134/S0026365619010051 [O.N. Lunina, A.S. Savvichev, V.V. Babenko, D.I. Boldyreva, B.B. Kuznetsov, T.V. Kolganova, E.D. Krasnova, N.M. Kokryatskaya, E.F. Veslopolova, D.A. Voronov, N.A. Demidenko, M.A. Letarova, A.V. Letarov, V.M. Gorlenko. Microbiology, **88** (1), 100 (2019). DOI: 10.1134/S0026261719010041].
- [17] R.J. Ritchie, S. Sma-Air. J. Appl. Phycol., **34** (3), 1577 (2022). DOI: 10.1007/s10811-022-02740-z
- [18] Н.А. Марнаутов, Л.Х. Комиссарова, А.Б. Елфимов. Int. J. Profess. Sci., **10**, (2), 10 (2020).
- [19] N.D. Bowles, H.W. Paerl, J. Tucker. Can. J. Fish. Aquat. Sci., **42** (6), 1127 (1985). DOI: 10.1139/f85-139
- [20] Z.B. Namsaraev. Microbiology, **78** (6), 794 (2009). DOI: 10.1134/S0026261709060174
- [21] А.В. Харчева, А.А. Жильцова, О.Н. Лунина, Е.Д. Краснова, Д.А. Воронов, А.С. Саввичев, С.В. Пацаева. Вестн. Моск. ун-та. Сер. 3. Физ. Астрон., (4), 40 (2018). [A.V. Kharcheva, A.A. Zhiltsova, O.N. Lunina, E.D. Krasnova, D.A. Voronov, A.S. Savvichev, S.V. Patsaeva. Moscow University Physics Bulletin, **73** (4), 377 (2018). DOI: 10.3103/s0027134918040082].
- [22] A. Jensen, O. Aasmundrud, K.E. Eimhjellen. Biochim. Biophys. Acta, **88** (3), 466 (1964). DOI: 10.1016/0926-6577(64)90089-0
- [23] A. Gloe, N. Pfennig, H. Brockmann, W. Trowitzsch. Arch. Microbiol., **102** (1), 103 (1975). DOI: 10.1007/BF00428353
- [24] J.A. Maresca, A.G.M. Chew, M.R. Ponsati, N.-U. Frigaard, J.G. Ormerod, D.A. Bryant. J. Bacteriol., **186** (9), 2558 (2004). DOI: 10.1128/JB.186.9.2558-2566.2004
- [25] *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, ed. by J.R. Lakowicz, 3rd ed. (Springer, Singapore, 2008).
- [26] Y. Zhu, S. Lin, B.L. Ramakrishna, P.I. Van Noort, R.E. Blankenship. Photosynth. Res., **47** (3), 207 (1996). DOI: 10.1007/BF02184282
- [27] М.Б. Березин. *Термохимия сольватации хлорофилла и родственных соединений* (Красанд, М., 2008).
- [28] Н.Г. Бахшиев, В.С. Либов, Ю.Т. Мазуренко, В.А. Амеличев. *Сольватохромия: проблемы и методы* (Изд-во ЛГУ, Л., 1989).
- [29] В.А. Рабинович, З.Я. Хавин. *Краткий химический справочник*, 2-е изд. (Химия, Л., 1978).
- [30] *Chlorophylls and Bacteriochlorophylls: Biochemistry, Biophysics, Functions and Applications*, ed. by B. Grimm, R.J. Porra, W. Rudiger, H. Scheer (Springer, Dordrecht, 2006), vol. 25, ch. 7, p. 95–107.
- [31] A.P. Gerola, F.A.P. de Moraes, P.F.A. Costa, E. Kimura, W. Caetano, N. Hioka. Spectrochim. Acta A, **173**, 213 (2017). DOI: 10.1016/j.saa.2016.09.019
- [32] N. Kawai, K. Morishige. Bunseki Kagaku, **43** (12), 1155 (1994). DOI: 10.2116/bunsekikagaku.43.1155