

## Коэффициенты экстинкции бактериохлорофиллов $d$ и $e$ в органических растворителях для количественного спектрофотометрического определения пигментов фототрофных зеленых серобактерий

© А.А. Жильцова<sup>1</sup>, Е.Д. Краснова<sup>2</sup>, Д.А. Воронов<sup>3</sup>, Ю.Г. Соколовская<sup>1</sup>, С.В. Пацаева<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, физический факультет, 119991 Москва, Россия

<sup>2</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119234 Москва, Россия

<sup>3</sup> Институт проблем передачи информации имени А.А. Харкевича РАН, 127994 Москва, Россия

e-mail: aa.zhiltcova@physics.msu.ru

Поступила в редакцию 09.01.2024 г.

В окончательной редакции 15.01.2024 г.

Принята к публикации 05.03.2024 г.

Определены коэффициенты экстинкции бактериохлорофиллов  $d$  и  $e$  в нескольких органических растворителях и проведено их сравнение с коэффициентами родственных соединений — хлорофиллов  $a$  и  $b$ . В некоторых растворителях (этанол, изопропанол, ацетон-этанол (7:2) и ацетон-метанол (7:2) — для бактериохлорофилла  $d$ , в изопропанол и ацетон-этанол (7:2) — для бактериохлорофилла  $e$ ) коэффициенты экстинкции определены впервые. Приведены спектрофотометрические формулы для количественного измерения бактериохлорофиллов  $d$  и  $e$  в разных растворителях. Методом динамического светорассеяния выявлено отсутствие заметной агрегации молекул бактериохлорофиллов в ацетоне и этаноле до концентрации 0.14 г/л. Полученные данные расширят возможности спектрофотометрического метода количественной оценки пигментов фототрофных бактерий.

**Ключевые слова:** бактериохлорофилл, спектры поглощения, коэффициенты экстинкции, органические растворители, аноксигенные фототрофные бактерии.

DOI: 10.61011/OS.2024.03.58143.22-24

### Введение

Благодаря таким преимуществам, как быстрота, эффективность и возможность анализа сразу большого количества материала, оптические методы определения фотосинтетических пигментов микроорганизмов широко применяются в решении ряда практических задач, в том числе при изучении водных экосистем. В основном эти исследования посвящены определению концентрации хлорофилла (Хл), содержащегося в клетках водорослей или цианобактерий [1–5]. Однако в некоторых случаях, помимо хлорофилла, исследователей интересуют фотосинтетические пигменты фототрофных бактерий, бактериохлорофиллы (Бхл). Молекулы Бхл являются тетрапиррольными пигментами аноксигенных фототрофных бактерий, осуществляющими фотосинтез без выделения кислорода. Существуют разные типы молекул Бхл. Бактериохлорофилл  $a$  является преобладающим хлорофилловым пигментом в реакционных центрах большинства фототрофных протеобактерий, у всех зеленых серобактерий (*Chlorobiaceae*) и нитчатых аноксигенных фототрофов (*Chloroflexia*). У немногих фототрофных протеобактерий Бхл  $a$  полностью замещается на Бхл  $b$ . Бактериохлорофилл  $g$  обнаружен только у

одной небольшой по количеству видов и распространению группы бактерий, гелиобактерий. Так называемые хлоросомные Бхл (Бхл  $c$ ,  $d$ ,  $e$ ,  $f$ ) присутствуют исключительно в особых фотосинтетических антенных комплексах, хлоросомах, имеющих у всех зеленых серных бактерий (*Chlorobiales*), некоторых нитчатых аноксигенных фототрофов (*Chloroflexia*), а также у недавно обнаруженной фотогетеротрофной ацидобактерии *Chloracidobacterium thermophilum* [6–8].

Известны работы по изучению оптических свойств Бхл  $b$  [9–11] и одного из хлоросомных Бхл, Бхл  $c$  [12–16]. Однако спектральные свойства других Бхл исследованы крайне ограниченно. Молекулы Бхл  $c$ ,  $d$  и  $e$ , как и Хл, имеют хлорофилловое макроциклическое кольцо, обладающее боковыми заместителями, присутствие которых определяет характерные спектральные особенности данных соединений [17]. Вопреки своему названию хлоросомные Бхл (Бхл  $c$ ,  $d$  и  $e$ ) по своей химической структуре ближе к Хл  $a$  и  $b$ , чем к другим Бхл (Бхл  $a$ ,  $b$  и  $e$ ). Хлоросомные Бхл и Хл  $a$  и  $b$  относятся к одной химической группе металлопорфиринов, а именно к Mg-хлороинам, Бхл  $a$ ,  $b$  и  $e$  — к Mg-бактериохлороинам [11]. В отличие от всех остальных Хл и Бхл у Бхл  $c$ ,  $d$  и  $e$  отсутствует заместитель

—COOCH<sub>3</sub> и присутствует заместитель —СНОН—СН<sub>3</sub>, что позволяет молекулам агрегировать в определенные макромолекулярные структуры и обеспечивает плотную упаковку молекул Бхл в хлоросомах [18].

Спектры поглощения Бхл как в пробах природной воды с микроорганизмами, так и в экстрактах используются для оценки концентрации Бхл в водоемах [19–24]. В клетках зеленых серных бактерий Бхл в хлоросомах находятся в высокоагрегированном состоянии в отличие от растворов, что обуславливает различие их спектральных свойств и выражается в большом красном смещении длинноволновой полосы поглощения Бхл при агрегации [25]. При экстракции Бхл из клеток бактерий возникает необходимость работы с органическими растворителями, которая является неотъемлемой частью любых спектральных и хроматографических исследований. Для количественного определения концентрации пигментов необходимо знание коэффициентов экстинкции данного пигмента в определенном растворителе, применяемом для его экстрагирования из клеток фототрофных организмов.

Коэффициент экстинкции Бхл — это физическая величина, которая характеризует поглощение света веществом на данной длине волны и зависит от типа Бхл и растворителя. В соответствии с законом Бугера—Ламберта—Бера монохроматический свет с определенной длиной волны при прохождении через оптически тонкий слой вещества ослабляется пропорционально толщине слоя и концентрации поглощающего свет вещества. В слое конечной толщины ослабление будет проходить по экспоненциальному закону. В настоящее время известны коэффициенты экстинкции Бхл *d* в растворах ацетона и метанола, а также коэффициенты экстинкции Бхл *e* в растворах ацетона, метанола, этанола и ацетон-метанола в пропорции 7 к 2, определенные в работах [26,27]. Если вместо коэффициента экстинкции Бхл *e* используется значение этой величины для Бхл *d* в том же растворителе, то погрешность определения концентрации пигмента спектрофотометрическим способом может достигать 50% [28]. Отсутствие полных сведений об абсорбционных характеристиках хлоросомных Бхл (Бхл *d* и *e*) в таких растворителях, как например смесь ацетона и метанола (7:2), широко использующегося для хроматографического выделения пигментов [27,29–32], делает задачу нахождения коэффициентов экстинкции Бхл важной и актуальной.

Эффективность экстракции липофильных пигментов, к которым относится Бхл, зависит сразу от нескольких факторов: полярности растворителя [33], видовой принадлежности организмов, расположения и ориентации внутриклеточного пигмента, взаимодействия растворителя с мембраной [34]. Это привело к тому, что в настоящее время не удается выбрать какой-либо один растворитель, полностью подходящий для экстрагирования фотосинтетических пигментов клеток микроорганизмов. Зависимость спектральных свойств Бхл от чистых или смешанных растворителей предполагает различие его

коэффициентов экстинкции в них и делает необходимым знание коэффициентов экстинкции для правильной интерпретации спектрофотометрических данных.

Полученные в работе данные позволят усовершенствовать спектрофотометрические методы определения фотосинтетических пигментов аноксигенных фототрофных бактерий. Данное направление исследований крайне актуально для мониторинга стратифицированных водоемов с сульфидной аноксией, включая реликтовые водоемы Арктики, которая может возникать естественным путем или под влиянием антропогенных факторов [35–37].

## 1. Объекты и методы исследования

Объектом исследования были пробы воды с двумя разновидностями зеленых серных бактерий *Chlorobium phaeovibrioides*, *Chlorobiaceae* (ЗСБ). Зеленые серные бактерии являются фототрофными микроорганизмами, в клетках которых протекает процесс аноксигенного фотосинтеза, использующего сероводород в качестве донора электронов. Зеленые серные бактерии встречаются в анаэробной зоне акваторий, в которую проникает солнечный свет с поверхности и содержатся восстановленные соединения серы. Такие условия, например, формируются в зоне хемоклина в водоемах, отделяющихся от Белого моря за счет постепенного поднятия береговой линии [35,36]. Были изучены две разновидности ЗСБ с разной пигментацией — зеленоокрашенные ЗСБ (в клетках которых содержится Бхл *d* и каротиноид хлоробактин) и коричневоокрашенные ЗСБ (содержащие в качестве фотосинтетических пигментов Бхл *e* и каротиноид изорениератин). Образцы природной воды отобраны погружным насосом из хемоклина двух отделяющихся озер Кандалакшского залива Белого моря в ходе экспедиций 2021 и 2022 годов. Вода с зеленоокрашенными ЗСБ отобрана из озера Трехцветное 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. В хемоклине каждого из этих водоемов присутствовала только одна разновидность ЗСБ, что подтвердило секвенирование генома бактерий [38,39], и это позволило использовать пробы воды из них в качестве источника определенного Бхл. Проверка чистоты пигмента, содержащегося в пробах природной воды, проводилась по спектрам испускания флуоресценции, которые имеют различные параметры (длину волны максимума и ширину полосы флуоресценции) в зависимости от присутствия того или иного типа Бхл [40]. Микроорганизмы из озер были сконцентрированы на стекловолоконных фильтрах с размером пор 2 μm с помощью вакуумной фильтрационной установки. После высушивания из полученных образцов готовили концентрированные экстракты пигментов в ацетоне.

### 1.1. Приготовление экстрактов

Для приготовления растворов Бхл для спектральных измерений в работе использовали четыре органических растворителя (ацетон, метанол, изопропанол и этанол) и две приготовленные смеси — раствор ацетон-этанола (7:2) и раствор ацетон-метанола (7:2). С целью устранения влияния растворителя на выход пигмента из клеток бактерий в раствор предварительно были приготовлены два концентрированных экстракта Бхл *d* и *e* в ацетоне, которые впоследствии разбавляли в 50 раз каждым из вышеупомянутых растворителей. Полученные в результате такого разбавления растворы будем называть „базовыми“. Таким образом, удалось обеспечить одинаковое содержание Бхл *d* или *e* в мономерной форме в каждом „базовом“ экстракте. Для приготовления экстрактов с различной концентрацией каждый из двенадцати „базовых“ экстрактов был разбавлен соответствующим растворителем таким образом, чтобы в итоге получались 50%, 25% и 15% растворы Бхл *d* или *e* относительно „базового“ раствора. В дальнейшем для каждого растворителя проводили проверку пропорциональности оптической плотности разбавленного раствора концентрации пигмента в растворе.

### 1.2. Спектральные измерения

Спектры оптической плотности экстрактов с различной концентрацией Бхл *d* или *e* измеряли с помощью спектрофотометра Solar PB2201 в спектральном диапазоне от 300 до 800 nm с шагом 1 nm по отношению к чистому растворителю. Для измерений использовали стандартные кварцевые кюветы с длиной оптического пути 1 cm. Перед измерениями с целью осаждения взвешенных частиц в растворах и устранения избыточного рассеяния в спектрах проводили центрифугирование экстрактов с помощью центрифуги Elmī CM-50 на скорости 13000 rpm в течение 10 min. Математическую обработку спектров (сглаживание или нормировку) не проводили.

### 1.3. Исследование агрегации бактериохлорофиллов в органических растворителях

Для каждой серии разбавленных растворов и в „базовом“ экстракте исследовали возможности образования агрегатов — проверяли пропорциональность оптической плотности раствора концентрации пигмента в растворе и сохранение формы спектра поглощения при разбавлении раствора. Процессы агрегации обнаружены не были, форма спектров после нормировки на поглощение в максимуме сохранялась.

Для растворов наибольшей концентрации в ацетоне и этаноле (0.14 g/l для Бхл *d* и 0.09 g/l для Бхл *e*) проводили измерение размеров частиц методом динамического светорассеяния с помощью лазерного анализатора размеров частиц Photocor. Для концентрированных

растворов в ацетоне или этаноле не были обнаружены частицы, которые могли быть приняты за агрегаты молекул Бхл. Спектры поглощения концентрированных растворов Бхл *d* и *e* в ацетоне и этаноле, измеренные в тонких кюветах (0.5 cm), по форме не отличались от спектров поглощения более разбавленных растворов в тех же растворителях. Поэтому мы считаем, что во всем изученном диапазоне концентраций (до 0.14 g/l) агрегация молекул Бхл *d* и *e* отсутствует.

### 1.4. Спектрофотометрический метод определения концентрации бактериохлорофиллов в экстрактах

Согласно закону Бугера–Ламберта, 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]

$$D = \varepsilon_{10} C l, \quad (1)$$

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

$$\varepsilon M = \varepsilon_{\text{мол}}, \quad (2)$$

где  $M$  — молярная масса пигмента (Бхл) [41].

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

$$C = D / 0.4343 \varepsilon l, \quad (3)$$

где  $D$  — оптическая плотность экстракта на длине волны 655 nm,  $l$  — длина оптического пути 1 cm,  $\varepsilon$  — коэффициент экстинкции в ацетоне, равный 98 l/g·cm для Бхл *d* [26] и 58.6 l/g·cm для Бхл *e* [27].

Известные в настоящее время коэффициенты экстинкции Бхл *d* и *e* с указанием органического растворителя и длиной волны  $\lambda_{\text{max}}$ , на которой оптическая плотность максимальна, приведены в табл. 1. Кроме того, в таблице приведены коэффициенты экстинкции родственных соединений — Хл *a* и *b*. Недостающие значения молярных или удельных коэффициентов экстинкции были пересчитаны через известные молярные массы пигментов по формуле (2), в качестве последних использовались следующие значения:  $M$  (Бхл *d*) = 806.6 g/mol [42],  $M$  (Бхл *e*) = 834.5 g/mol [27],  $M$  (Хл *a*) = 893.5 g/mol и  $M$  (Хл *b*) = 907.5 g/mol [41].

**Таблица 1.** Коэффициенты экстинкции Бхл *d* и *e*, Хл *a* и *b* (определенные на указанных длинах волн), жирным шрифтом выделены значения, пересчитанные по формуле (2)

Пигмент	Растворитель	$\lambda_{\max}$ , nm	$\varepsilon$ , l·g <sup>-1</sup> ·cm <sup>-1</sup>	$\varepsilon_{\text{мол}}$ , l·mmol <sup>-1</sup> ·cm <sup>-1</sup>	Источник
Бхл <i>d</i>	Ацетон	654	98.0	<b>79.0</b> (654 nm)	[26]
	Метанол	659	82.3	<b>66.4</b> (659 nm)	[26]
Бхл <i>e</i>	Ацетон	649	58.6	48.9 (649 nm)	[27]
	Ацетон-метанол (7:2)	651	<b>49.6</b>	41.4 (651 nm)	[27]
	Этанол	654	<b>49.0</b>	40.9 (654 nm)	[27]
	Метанол	660	<b>42.5</b>	35.5 (660 nm)	[27]
Хл <i>a</i>	Ацетон	662	<b>88.2</b>	78.8 (662 nm)	[43]
	Этанол (96%)	665	83.4	74.5 (665 nm)	[44]
	Метанол	665	<b>79.9</b>	71.4 (665 nm)	[45]
Хл <i>b</i>	Ацетон	646	<b>51.3</b>	46.6 (646 nm)	[43]
	Этанол (96%)	650	44.2	40.1 (650 nm)	[44]
	Метанол	652	<b>42.5</b>	38.6 (652 nm)	[45]

### 1.5. Расчет коэффициентов экстинкции Бхл *d* и *e* в различных растворителях относительным способом

Если имеются два различных раствора с одинаковой концентрацией пигмента, спектры поглощения которых регистрируются в одинаковых кюветах (то есть длина оптического пути совпадает), то значения их оптических плотностей, согласно закону Бугера—Ламберта—Бера, будут определяться только значениями коэффициентов экстинкции пигмента в используемых растворителях. Пусть коэффициент экстинкции и угловой коэффициент наклона зависимости максимумов оптической плотности от концентрации в растворителе 1 равны  $\varepsilon_1$  и  $k_1$  соответственно, а в растворителе 2 —  $\varepsilon_2$  и  $k_2$ . Вследствие равенства концентраций пигментов и длин оптических путей можно записать

$$\frac{k_1}{\varepsilon_1} = \frac{k_2}{\varepsilon_2}.$$

Или

$$\varepsilon_1 = \varepsilon_2 \frac{k_1}{k_2}.$$

Таким образом, зная коэффициент экстинкции для пигмента в растворителе 1 и угловые коэффициенты в графиках зависимостей максимумов оптических плотностей от концентраций в растворителях 1 и 2, можно определить коэффициент экстинкции для этого пигмента в растворителе 2.

Погрешности для угловых коэффициентов были рассчитаны с помощью метода наименьших квадратов (МНК), а погрешности для коэффициента экстинкции были определены по формуле стандартного откло-

нения:

$$\begin{aligned} \sigma(\varepsilon_1) &= \sqrt{\left(\frac{\partial \varepsilon_1}{\partial k_1}\right)^2 S_{k_1}^2 + \left(\frac{\partial \varepsilon_1}{\partial k_2}\right)^2 S_{k_2}^2} \\ &= \sqrt{\left(\frac{\varepsilon_2}{k_2}\right)^2 S_{k_1}^2 + \left(-\frac{\varepsilon_2 k_1}{k_2^2}\right)^2 S_{k_2}^2}, \end{aligned}$$

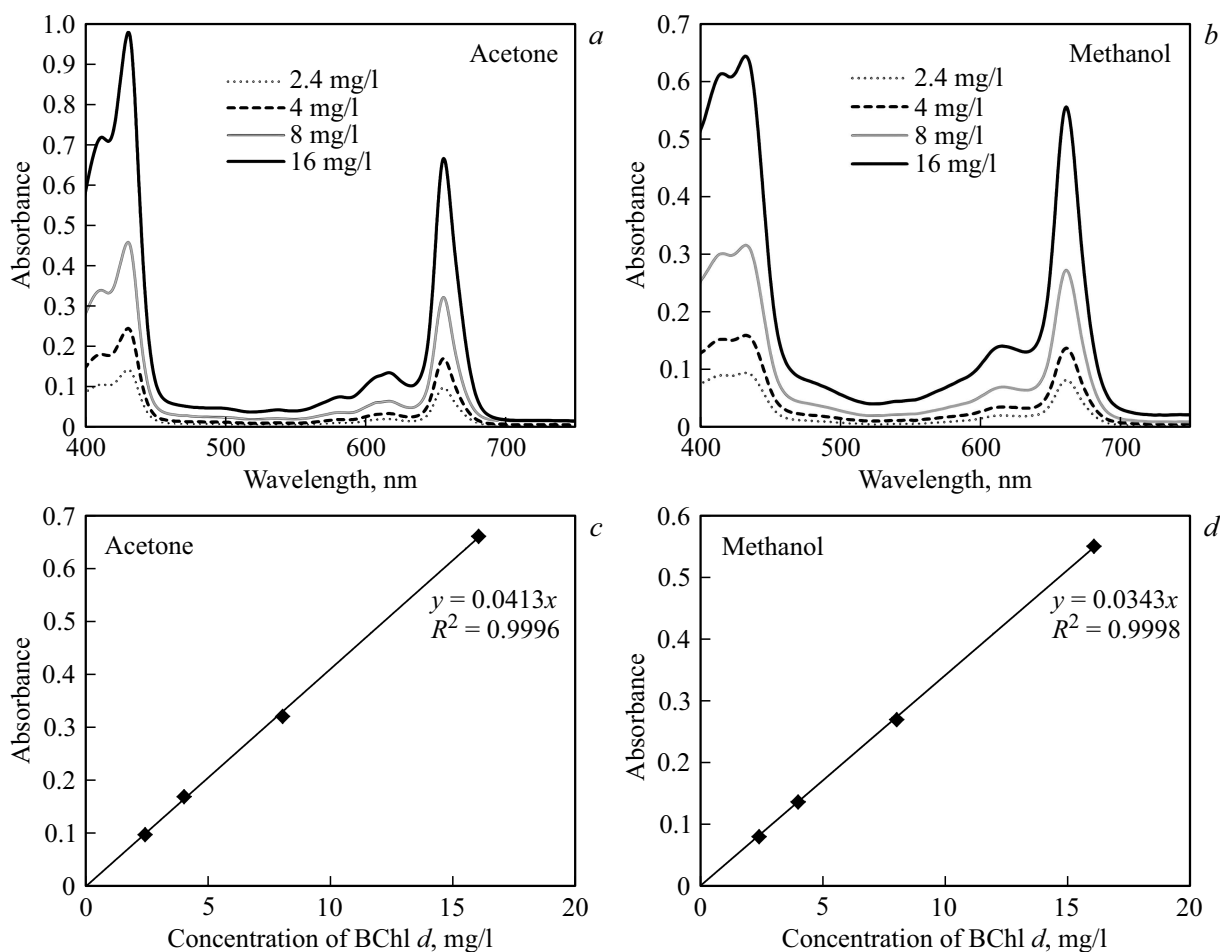
где  $S_{k_1}$  и  $S_{k_2}$  — погрешности коэффициентов наклона  $k_1$  и  $k_2$  соответственно.

## 2. Экспериментальные результаты

### 2.1. Спектры поглощения экстрактов Бхл *d* и *e* в различных растворителях

Все спектры экстрактов Бхл имеют две ярко выраженные полосы поглощения в коротковолновой и длинноволновой областях спектра (рис. 1). Коротковолновая полоса зеленоокрашенной формы ЗСБ (с главным фотосинтетическим пигментом Бхл *d*) состоит из двух перекрывающихся полос с максимальными значениями оптической плотности в районе 412–415 и 430–433 nm (в зависимости от растворителя), что соответствует поглощению света Бхл *d* и каротиноидами, основным из которых является хлоробактин [46]. В длинноволновой области спектра присутствует ярко выраженная полоса поглощения с максимальным значением оптической плотности, приходящимся на 655–661 nm (длина волны зависит от растворителя), рядом с менее заметной — на длине волны 613–622 nm, соответствующей поглощению только Бхл *d* [26, 47, 48].

Коричневоокрашенная форма ЗСБ отличается от зеленоокрашенной более интенсивным поглощением в сине-зеленой области длин волн видимого спектра [49].



**Рис. 1.** Спектры поглощения экстрактов Бхл *d* в растворах ацетона (*a*) и метанола (*b*). Зависимости оптической плотности в максимуме длинноволновой полосы поглощения Бхл *d* от концентрации в ацетоне (*c*) и метаноле (*d*).

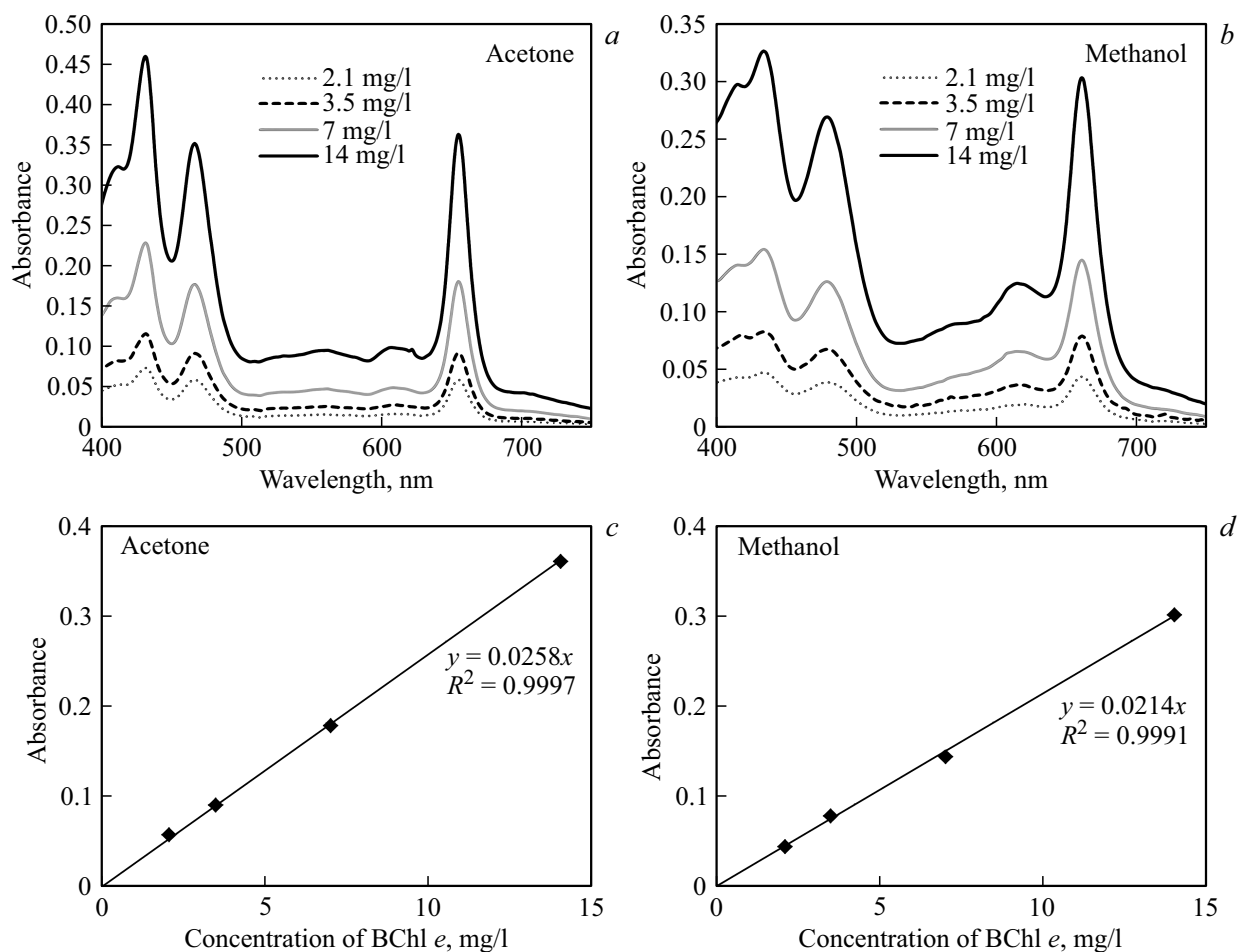
Коротковолновая полоса коричневоокрашенной формы ЗСБ, для которой главным фотосинтетическим пигментом служит Бхл *e*, состоит из трех перекрывающихся полос с максимумами при 412–415 и 430–434 нм (в зависимости от растворителя), соответствующих поглощению Бхл *e* и каротиноидов, а также выраженной полосы с максимумом на 466–479 нм (рис. 1, *b*), основной вклад в которую вносит специфический каротиноид — изорениератин [48]. В длинноволновой области спектра Бхл *e*, как и у Бхл *d*, присутствует ярко выраженная полоса поглощения с максимальным значением оптической плотности, приходящимся на 655–661 нм (длина волны зависит от растворителя), соответствующая поглощению только Бхл *e* [27,48], и полоса с меньшей оптической плотностью, максимум которой приходится на длину волны 612–618 нм (рис. 2).

## 2.2. Расчет коэффициентов экстинкции Бхл *d* и *e*

Значения концентраций Бхл в „базовых“ экстрактах были рассчитаны исходя из значений оптической плотности в максимумах длинноволновых полос поглощения

Бхл *d* и *e* в ацетоне по формуле (3). Для Бхл *d* использована оптическая плотность на длине волны 655 нм (равная 0.67), для Бхл *e* — 654 нм (0.36). Выбор ацетона в качестве растворителя был сделан из-за того, что коэффициенты экстинкции Бхл *d* и *e* в ацетоне известны [26,27]. Полученные значения концентрации Бхл *d* и *e* равнялись 0.016 г/л (или 16 мг/л) и 0.014 г/л (или 14 мг/л) соответственно. Концентрации разбавленных 50%, 25% и 15% растворов Бхл *d* принимали равными 8 мг/л, 4 мг/л, 2.4 мг/л, а разбавленных 50%, 25% и 15% растворов Бхл *e* — 7 мг/л, 3.5 мг/л и 2.1 мг/л.

Для „базовых“ экстрактов и трех их разведений были построены зависимости оптической плотности в максимуме длинноволновой полосы поглощения, соответствующей поглощению Бхл *d* или *e* в экстрактах, от рассчитанной концентрации Бхл (рис. 1 и 2). Полученные зависимости оказались линейными и позволили рассчитать угловые коэффициенты наклона прямых, аппроксимирующих экспериментальные данные (табл. 2). С помощью углового коэффициента наклона Бхл *d* или *e* в ацетоне, табличных коэффициентов экстинкции Бхл *d* или *e* в ацетоне и рассчитанных коэффициентов наклона



**Рис. 2.** Спектры поглощения экстрактов Бхл *e* в растворах ацетона (*a*) и метанола (*b*). Зависимости оптической плотности в максимуме длинноволновой полосы поглощения Бхл *e* от концентрации в ацетоне (*c*) и метаноле (*d*).

в остальных растворителях были найдены неизвестные коэффициенты экстинкции согласно разд. 1.5. Полученные значения представлены в табл. 2.

### 3. Спектрофотометрические формулы для количественного измерения Бхл в разных растворителях

Общая для всех растворителей формула для расчета концентрации Бхл (при наличии только одного типа Бхл в растворе) выглядит следующим образом:

$$C = AD/l, \quad (5)$$

где  $D$  — оптическая плотность в максимуме полосы поглощения для слоя толщины  $l$  (см), а эмпирический коэффициент пропорциональности  $A = \frac{1}{0.4343\epsilon}$ , рассчитанный через соответствующий коэффициент экстинкции для индивидуального Бхл и конкретного растворителя, приведен в табл. 3. Полученная по данной формуле концентрация Бхл будет выражаться в mg/l растворителя. Погрешность коэффициента пропорциональности  $A$  рассчитывали по формуле  $S_A = \frac{S_\epsilon}{0.4343\epsilon^2}$ .

### Обсуждение результатов

Полученные в ходе эксперимента зависимости оптической плотности от концентрации пигмента оказались линейными с коэффициентом корреляции  $R^2$ , принимающим значения от 0.98 до 1, что подтверждает выполнение закона Бугера–Ламберта–Бера для растворов Бхл в использованных органических растворителях. Признаки агрегации молекул Бхл *d* и *e* отсутствуют вплоть до концентрации 0.14 g/l. Таким образом, применение относительного способа расчета коэффициентов экстинкции Бхл *d* и *e*, описанного в разд. 1.5, является корректным для имеющихся растворов.

Найденные коэффициенты экстинкции Бхл были сопоставлены с литературными данными (табл. 2). Для Бхл *d* в метаноле и Бхл *e* в этаноле значения коэффициентов экстинкции в максимумах поглощения равны  $81.5 \pm 0.8$  и  $47.3 \pm 0.9$  l/g·cm соответственно и практически совпадают с данными из литературы (различие не больше 3.5%). В растворе ацетон-метанола (7:2) и чистом метаноле коэффициенты экстинкции Бхл *e* превышали литературные данные на 11 и 13% соответственно. Такое

**Таблица 2.** Экспериментально полученные коэффициенты экстинкции Бхл  $\epsilon_{\text{exp}}$  (на указанной длине волны), соответствующие им угловые коэффициенты наклона  $k_i$  зависимости максимумов оптической плотности от концентрации в растворителе и табличные коэффициенты экстинкции  $\epsilon_{\text{tab}}$  из литературных источников

Бхл	Растворитель	$k_i, \text{l/g}$	$\epsilon_{\text{exp}}, \text{l/g}\cdot\text{cm}$	$\epsilon_{\text{tab}}, \text{l/g}\cdot\text{cm}$
Бхл $d$	Ацетон	$41.3 \pm 0.3$	<b>98</b> (655 nm)	<b>98</b> (654 nm) [26]
	Ацетон-этанол (7:2)	$34.7 \pm 0.3$	$82.5 \pm 0.8$ (657 nm)	—
	Ацетон-метанол (7:2)	$32.5 \pm 0.3$	$77.3 \pm 0.8$ (657 nm)	—
	Изопропанол	$35.2 \pm 0.3$	$83.6 \pm 0.9$ (659 nm)	—
	Этанол	$34.2 \pm 0.3$	$81.3 \pm 0.8$ (660 nm)	—
	Метанол	$34.3 \pm 0.3$	$81.5 \pm 0.8$ (661 nm)	82.3 (659 nm) [26]
Бхл $e$	Ацетон	$25.8 \pm 0.3$	<b>58.6</b> (655 nm)	<b>58.6</b> (649 nm) [27]
	Ацетон-этанол (7:2)	$23.8 \pm 0.3$	$54.0 \pm 1.1$ (656 nm)	—
	Ацетон-метанол (7:2)	$24.6 \pm 0.3$	$55.9 \pm 1.1$ (657 nm)	49.6 (651 nm) [27]
	Изопропанол	$24.8 \pm 0.3$	$56.2 \pm 1.1$ (657 nm)	—
	Этанол	$20.8 \pm 0.3$	$47.3 \pm 0.9$ (659 nm)	49 (654 nm) [27]
	Метанол	$21.4 \pm 0.3$	$48.6 \pm 0.9$ (661 nm)	42.5 (660 nm) [27]

**Таблица 3.** Коэффициент  $A$  для расчета концентрации Бхл  $d$  и  $e$  в органических растворителях спектрофотометрическим методом

Растворитель	Коэффициент $A$ для Бхл $d$ , (mg·cm)/l	Коэффициент $A$ для Бхл $e$ , (mg·cm)/l
Ацетон	$23.50 \pm 0.22$	$39.3 \pm 0.7$
Ацетон-этанол (7:2)	$27.9 \pm 0.3$	$42.7 \pm 0.9$
Ацетон-метанол (7:2)	$29.8 \pm 0.3$	$41.2 \pm 0.8$
Изопропанол	$27.5 \pm 0.3$	$41.0 \pm 0.8$
Этанол	$28.3 \pm 0.3$	$48.7 \pm 0.9$
Метанол	$28.2 \pm 0.3$	$47.4 \pm 0.9$

расхождение результатов может быть объяснено тем, что коэффициенты экстинкции в цитированных работах определялись на других длинах волн. Близость экспериментальных данных с литературными, полученными с использованием хроматографических методов [26,27], свидетельствует о корректности полученных значений и возможности использования длинноволновых полос поглощения экстрактов клеток бактерий для расчетов концентрации Бхл.

Коэффициенты экстинкции хлоросомных Бхл  $d$  и Бхл  $e$  сильно различаются между собой, однако схожи с коэффициентами экстинкции родственных соединений — Хл  $a$  и Хл  $b$ . Согласно полученным нами данным, в максимуме длинноволновой полосы поглощения коэффициент экстинкции Бхл  $d$  превышает коэффициент экстинкции Бхл  $e$  в ацетоне в 1.67 раз, в метаноле — в 1.69 раз, а в этаноле — в 1.72 раза. Соотношение коэффициентов экстинкции Хл  $a$  к Хл  $b$  в ацетоне составляет 1.72, а в этаноле и метаноле 1.88 (табл. 2). Схожесть спектральных свойств фотосинтетических пигментов клеток бактерий и растений объясняется схожестью их химических структур. Бактериохлорофиллы  $d$  и  $e$  относятся к группе фитохлорофиллов, так же как и Хл  $a$  и  $b$ , и имеют одно восстановленное пиррольное кольцо в химической структуре. У бактериохлорофиллов, к

которым относится, например, Бхл  $a$ , присутствуют два восстановленных пиррольных кольца [45]. В растворе спектры поглощения Бхл  $d$  очень похожи на спектры поглощения Хл  $a$ , а спектры поглощения Бхл  $e$  очень похожи на спектры поглощения Хл  $b$  [18]. Однако благодаря некоторым структурным различиям, например, наличию у Бхл  $e$  метильной группы (которая может способствовать искажению плоскости порфиринового кольца) и отсутствию винильной группы, которая есть у Хл  $b$ , коэффициенты экстинкции у Бхл  $e$  и Хл  $b$  различаются [27]. Согласно нашим расчетам, коэффициенты экстинкции Бхл  $e$  в ацетоне и метаноле превышают табличные коэффициенты экстинкции Хл  $b$  в 1.14 раза. В свою очередь, коэффициенты экстинкции Бхл  $d$  в ацетоне и метаноле превышают табличные коэффициенты экстинкции Хл  $a$  в 1.11 и 1.02 раза соответственно.

Еще раз подчеркнем, что использовать значение коэффициента экстинкции Бхл  $d$  для оценки Бхл коричневоокрашенной формы ЗСБ, содержащих Бхл  $e$ , некорректно. Для экстрактов, приготовленных из пробы воды со смесью клеток бактерий двух типов, необходимо вначале разделить вклады двух Бхл (например, способом, описанным авторами работы [31]) и затем рассчитать отдельно концентрации Бхл  $d$  и Бхл  $e$  с

использованием коэффициентов экстинкции, найденных для конкретного растворителя.

Смесь ацетона и метанола в соотношении 7 к 2 была удачно использована в качестве растворителя в экстрактах Бхл, и в работе [27] 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. Поскольку коэффициенты экстинкции для двух ацетоновых смесей мало отличаются, то мы предлагаем при измерении концентрации Бхл применять смесь ацетон:этанол (7:2) для экстрагирования пигмента как менее токсичную.

## Заключение

Впервые определены коэффициенты экстинкции в полосе длинноволнового поглощения (655–661 nm) Бхл *d* в таких растворителях, как этанол, изопропанол, ацетон-этанол (7:2) и ацетон-метанол (7:2), а также коэффициенты экстинкции Бхл *e* в изопропанол и ацетон-этанол (7:2). Знание светопоглощающих способностей пигментов клеток в данных растворителях позволит не только работать с разными растворителями, используемыми в биологических исследованиях и хроматографии, но и перейти от широко применяемого раствора ацетон-метанола к менее токсичному — ацетон-этанолу. Полученные коэффициенты экстинкции в длинноволновых максимумах поглощения Бхл делают возможным расчет концентрации Бхл в экстрактах, так как каротиноиды в этой области свет не поглощают. Приведена общая формула для расчета концентраций спектрофотометрическим методом, а также определены необходимые коэффициенты.

## Благодарности

Авторы благодарят администрацию Беломорской биологической станции имени Н.А. Перцова МГУ имени М.В. Ломоносова за поддержку экспедиционных работ. Выражаем благодарность студентке магистратуры О.А. Филипповой за помощь в измерении спектров поглощения.

## Финансирование работы

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-24-00008.

## Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## Список литературы

[1] T.S. Gostev, F.I. Kouzminov, M.Yu. Gorbunov, E.N. Voronova, V.V. Fadeev. *EARSel eProceedings*, **11** (21), 98 (2012).

- [2] M.Y. Gorbunov, P.G. Falkowski. *Limnology and Oceanography*, **66** (1), 1 (2021). DOI: 10.1002/lno.11581
- [3] Ф.И. Кузьминов, Е.А. Ширшин, М.Ю. Горбунов, В.В. Фадеев. *Журн. фонд. и прикл. гидрофизики*, **8** (1), 41 (2015).
- [4] K.R. Block, J.M. O'Brien, W.J. Edwards, C.L. Marnocha. *Microbiology Open*, **10** (4), e1228 (2021). DOI: 10.1002/mbo3.1228
- [5] Е.А. Кудрявцева, Т.В. Буканова, С.В. Александров. *Современные проблемы дистанционного зондирования Земли из космоса*, **19** (4), 59 (2022). DOI: 10.21046/2070-7401-2022-19-4-59-74
- [6] A. Razjivin, J. Götze, E. Lukashev, V. Kozlovsky, A. Ashikhmin, Z. Makhneva, A. Moskalenko, H. Lokstein, V. Paschenko. *J. Phys. Chem. B*, **125** (14), 3538 (2021). DOI: 10.1021/acs.jpcc.1c00719
- [7] L. Limantara, S. Sakamoto, Y. Koyama, H. Nagae. *Photochem. Photobiol.*, **65** (2), 330 (1997). DOI: 10.1111/j.1751-1097.1997.tb08566.x
- [8] J.S. Connolly, E.B. Samuel, A.F. Janzen. *Photochem. Photobiol.*, **36** (5), 565 (1982). DOI: 10.1111/j.1751-1097.1982.tb04417.x
- [9] J.P. Thornber, R.J. Cogdell, R.E.B. Seftor, G.D. Webster. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Bioenergetics*, **593** (1), 60 (1980). DOI: 10.1016/0005-2728(80)90008-0
- [10] J. Linnanto, J. Korppi-Tommola. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2** (21), 4962 (2000). DOI: 10.1039/b004998k
- [11] *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. 6, p. 79–94.
- [12] M. Taniguchi, J.S. Lindsey. *Photochem. Photobiol.*, **97** (1), (2020). DOI: 10.1111/php.13319
- [13] J. Goc, A. Dudkowiak, Z. Gryczyński, I. Gryczyński, B. Zelent, D. Frackowiak. *J. Fluoresc.*, **11** (1), 53 (2001). DOI: 10.1023/a:1016699616249
- [14] T.P. Causgrove, P. Cheng, D.C. Brune, R.E. Blankenship. *J. Phys. Chem.*, **97** (21), 5519 (1993). DOI: 10.1021/j100123a011
- [15] S.C.M. Otte, J.C. van der Heiden, N. Pfennig, J. Amesz. *Photosynth. Res.*, **28** (2), 77 (1991). DOI: 10.1007/bf00033717
- [16] А.Г. Яковлев, А.С. Таисова, З.Г. Фетисова. *Вестн. Моск. ун-та. Серия 16*, **78** (2), 64 (2023).
- [17] *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
- [18] *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.
- [19] J. Overmann, M.M. Tilzer. *Aquatic Sciences*, **51** (4), 261 (1989). DOI: 10.1007/bf00877171
- [20] П.С. Емельянцева, А.А. Жильцова, Е.Д. Краснова, Д.А. Воронов, В.В. Рымарь, С.В. Пацаева. *Вестн. Моск. ун-та*, **3** (2), 25 (2020). [P.S. Emeliantseva, 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]
- [21] А.А. 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



- [22] 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]
- [23] C.Mazière, M. Bodo, M.A. Perdrau, C. Cravo-Laureau, R. Duran, C. Dupuy, C. Hubas, Science of The Total Environment, **802**, 149787 (2022). DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.1497
- [24] L. de Moura Sousa, F.S. Moreira, V.L. Cardoso, F.R.X. Batista. J. Water Process Engineer., **52**, 103567 (2023). DOI: 10.1016/j.jwpe.2023.103567.
- [25] T. Miyatake, H. Tamiaki. J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev., **6** (2–3), 89 (2005). DOI: 10.1016/j.jphotochemrev.2005.
- [26] R.Y. Stanier, J.H.C. Smith. Biochim. Biophys. Acta, **41** (3), 478 (1960). DOI: 10.1016/0006-3002(60)90045-7
- [27] 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
- [28] A. Picazo, C. Rochera, E. Vicente, M.R. Miracle, A. Camacho. Limnética, **32** (1), 139 (2013). DOI: 10.23818/limn.32.13
- [29] 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
- [30] 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
- [31] 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].
- [32] R.J. Ritchie, S. Sma-Air. J. Appl. Phycol., **34** (3), 1577 (2022). DOI: 10.1007/s10811-022-02740-z
- [33] Н.А. Марнаутов, Л.Х. Комиссарова, А.Б. Елфимов. Int. J. Prof. Sci., **10**, 10 (2020).
- [34] N.D. Bowles, H.W. Paerl, J. Tucker. Can. J. Fish. Aquat. Sci., **42** (6), 1127 (1985). DOI: 10.1139/f85-139
- [35] Е.Д. Краснова, М.В. Мардашова. Природа, **1**, 16 (2020). DOI: 10.7868/S0032874X20010020
- [36] Е.Д. Краснова. Водные ресурсы, **48** (3), 322 (2021). DOI: 10.31857/S0321059621030093
- [37] V.A. Zhezherya, T.P. Zhezherya, P.M. Linnik. Hydrobiol. J., **58** (2), 79 (2022). DOI: 10.1615/HYDROBJ.V58.I2.70
- [38] A.S. Savvichev, V.V. Babenko, O.N. Lunina, M.A. Letarova, D.I. Boldyreva, E.F. Veslopolova, N.A. Demidenko, N.M. Kokryatskaya, E.D. Krasnova, V.A. Gaisin, E.S. Kostryukova, V.M. Gorlenko, A.V. Letarov. Environmental Microbiology, **20** (10), 3784 (2018). DOI: 10.1111/1462-2920.14384
- [39] D. Grouzdev, V. Gaisin, O. Lunina, M. Krutkina, E. Krasnova, D. Voronov, R. Baslerov, P. Sigalevich, A. Savvichev, V. Gorlenko. FEMS Microbiology Ecology, **98** (10), (2022). DOI: 10.1093/femsec/fiac103.
- [40] 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].
- [41] Z.B. Namsaraev. Microbiology, **78** (6), 794 (2009). DOI: 10.1134/S0026261709060174
- [42] J.G. Ormerod, T. Nesbakken, S.I. Beale. J. Bacteriol., **172** (3), 1352 (1990). DOI: 10.1128/jb.172.3.1352-1360.1990
- [43] *Phytoplankton Pigments in Oceanography: Guidelines to Modern Methods*, ed. by S.W. Jeffrey, R.F.C. Mantoura, S.W.E. Wright (UNESCO Publishing, Paris, 1997), p. 595–596.
- [44] J.F.G.M. Wintermans, A. Demots. Biochim. Biophys. Acta, **109** (2), 448 (1965). DOI: 10.1016/0926-6585(65)90170-6
- [45] *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. DOI: 10.1007/1-4020-4516-6\_7
- [46] *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*, ed. by R.E. Blankenship, M.T. Madigan, C.E. Bauer (Kluwer Academic Publishers, NY., 2004), vol. 2, ch. 20, p. 399–435.
- [47] A. Jensen, O. Aasmundrud, K.E. Eimhjellen. Biochim. Biophys. Acta, **88** (3), 466 (1964). DOI: 10.1016/0926-6577(64)90089-0
- [48] A. Gloe, N. Pfennig, H. Brockmann, W. Trowitzsch. Arch. Microbiol., **102** (1), 103 (1975). DOI: 10.1007/BF00428353
- [49] 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