

Сравнительный анализ спектральных методов определения концентрации бактериохлорофилла *d* зеленых серных бактерий в воде

А.А. Жильцова¹, О.А. Филиппова¹, Е.Д. Краснова²,
Д.А. Воронов³, С.В. Пацаева^{1*}

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, физический факультет
119991, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 2

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет
119991, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

³Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН
127994, г. Москва, Б. Каретный пер., д. 19, стр. 1

Поступила в редакцию 14.02.2022 г.

Важная характеристика природного водоема – распределение пигментного состава различных групп фотосинтезирующих организмов по глубине и его изменения в разные сезоны. Оптические методы широко используются для мониторинга концентрации хлорофиллов водорослей или цианобактерий в водных экосистемах, однако для мониторинга бактериохлорофилла фототрофных бактерий применяются очень ограниченно.

Подробно описаны три метода количественного анализа фотосинтетического пигмента бактериохлорофилла *d* зеленых серных бактерий, использующие спектральные измерения, проведенные как на исходных пробах природной воды (спектры поглощения), так и для экстрактов пигментов в органических растворителях (спектры поглощения и флуоресценции). Проведен сравнительный анализ результатов применения разных методов на примере природной воды из области хемоклина оз. Трехцветного, одного из меромиктических водоемов Кандалакшского залива Белого моря (вода с разной глубины отобрана в марте 2021 г.). Сделаны выводы об условиях применимости разных методов, их преимуществах и ограничениях. Все три предложенных метода доказали возможность своего применения на пробах природной воды с разной концентрацией бактериохлорофилла, различающейся на порядки, от 5 до 5000 мг/м³.

Ключевые слова: бактериохлорофилл, флуоресценция, спектры поглощения, аноксигенные фототрофные бактерии, зеленые серобактерии, стратифицированные водоемы, Белое море; bacteriochlorophyll, fluorescence, absorption spectra, anoxygenic phototrophic bacteria, green sulfur, stratified reservoirs, the White Sea.

Введение

Оптические методы исследования имеют ряд неоспоримых преимуществ, благодаря которым широко применяются в решении ряда практических задач. Например, при мониторинге водных экосистем (морей, заливов, озер, водоемов искусственного происхождения), неотъемлемой частью которого является фиксирование различий в концентрации тех или иных соединений с течением времени и их годовой динамики. Непрерывное поднятие дна и берегов Белого моря на ~3–4 мм в год [1] влечет за собой естественное обособление от моря заливов и проливов и, как следствие, образование так называемых меромиктических озер с нарушенным перемешиванием слоев

воды. Задача мониторинга таких водоемов, проходящих меромиктическую стадию развития и имеющих разную степень отделения от моря, является актуальной, так как позволяет реконструировать ход их гидрологической и экологической эволюции, а также делать прогнозы для искусственно создаваемых водоемов [2, 3].

Отличительная черта меромиктических озер Беломорского региона – устойчивая вертикальная стратификация воды, возникающая из-за разницы плотности ее слоев. В водоеме можно выделить приповерхностный пресный слой воды, насыщенный кислородом, и придонный соленый, где присутствует большое количество сероводорода. В переходном слое (хемоклине) при достаточном освещении может наблюдаться массовое развитие аноксигенных фототрофных бактерий, чаще всего – зеленых серных бактерий (ЗСБ, *Chlorobiaceae*). В хлоросомах ЗСБ локализованы светособирающие комплексы, содержащие хлоросомные бактериохлорофиллы (Бхл) [4–7]. Присутствие ЗСБ в водоемах напрямую зависит от внешних условий: освещенности, солено-

* Анна Александровна Жильцова (aa.zhiljtcova@physics.msu.ru); Ольга Алексеевна Филиппова (filolik_edu@mail.ru); Елена Дмитриевна Краснова (e_d.krasnova@mail.ru); Дмитрий Анатольевич Воронов (d.a.voronov@gmail.com); Светлана Викторовна Пацаева (spatsaeva@mail.ru).

сти, концентрации сероводорода и др. Этот факт позволяет использовать оценку содержания пигментов ЗСБ в природной воде в качестве одного из индикаторов эволюционного состояния водоема [8–10]. Распределение по глубине этих и других бактерий может дать представление о микробных биогеохимических циклах серы и углерода в водоеме.

Оптические методы широко используются для мониторинга концентрации хлорофилл-содержащих организмов – водорослей [11, 12] и цианобактерий [13, 14] в водных экосистемах. Однако оптические методы мониторинга фототрофных аноксигенных микроорганизмов в природной воде пока применяются очень ограниченно [8, 15–17]. До настоящего времени для подсчета суммарной концентрации хлоросомных Бхл применялись метод экстрагирования пигментов из природной воды ацетоном или смесью ацетона и метанола, измерение спектров поглощения экстрактов и расчет по эмпирической формуле Овермана–Тилзера (ОТ) [8], в которой использовались величины оптической плотности при длинах волны $\lambda = 651$ и 663 нм для ацетоновых экстрактов. Однако предлагаемая формула разрабатывалась на образцах воды, содержащих помимо Бхл большую концентрацию хлорофилла *a*, что нехарактерно для высокоплотного слоя хемоклина меромиктических озер. Очевидна необходимость разработки более точных и удобных методов количественной оценки Бхл.

Цель настоящей работы – описание новых подходов, основанных на многолетних исследованиях спектральных свойств ЗСБ отделяющихся водоемов Белого моря. Их сравнительный анализ проведен в ходе экспедиции марта 2021 г.

1. Объекты и методы исследования

Образцы природной воды с фототрофными бактериями отбирали с разной глубины через 2,5 см в зоне хемоклина меромиктического (оз. Трехцветное) в марте 2021 г. многошприцевым батометром, разработанным Д.А. Вороновым. Для получения экстрактов к 1 мл пробы природной воды с ЗСБ добавляли 4 мл смеси ацетона с этанолом (7 : 2), пробирки заворачивали в фольгу и выдерживали в холодильнике не менее 12 ч. Измерение спектров поглощения проб проводилось на спектрофотометре Solar PB2201. Спектры поглощения проб воды или суспензий клеток в воде регистрировали по отношению к дистиллированной воде, спектры поглощения экстрактов – по отношению к растворителю. Спектры флуоресценции регистрировали при помощи флуориметра Solar SM2203. Чтобы избежать так называемого «эффекта внутреннего фильтра», значения интенсивности флуоресценции корректировали на поглощение по формуле

$$I_{corr} = I \cdot 10^{0,5(D_{ex} + D_{em})}, \quad (1)$$

где I_{corr} – скорректированное значение интенсивности флуоресценции; I – измеренная интенсивность флуоресценции; D_{ex} и D_{em} – значения оптической

плотности образца на длине волны возбуждения и испускания соответственно.

2. Спектры поглощения и флуоресценция проб воды с микроорганизмами и ацетон-этаноловых экстрактов

2.1. Спектры поглощения природной воды

Из оз. Трехцветное одновременно было отобрано 23 образца воды с шагом по глубине 2,5 см, спектры поглощения некоторых из них приведены на рис. 1. До глубины 1,9 м спектры имеют вид бесструктурной полосы с монотонно уменьшающейся при возрастании длины волны оптической плотностью – типичные спектры поглощения растворенного органического вещества РОВ [18]. Начиная с глубины 1,925 м в воде присутствует Бхл *d*, поглощение которого возрастает и достигает своего максимального значения на глубине 2,2 м, после чего наблюдается спад.

Полосы поглощения Бхл имеют два главных максимума в коротковолновой (соответствующие

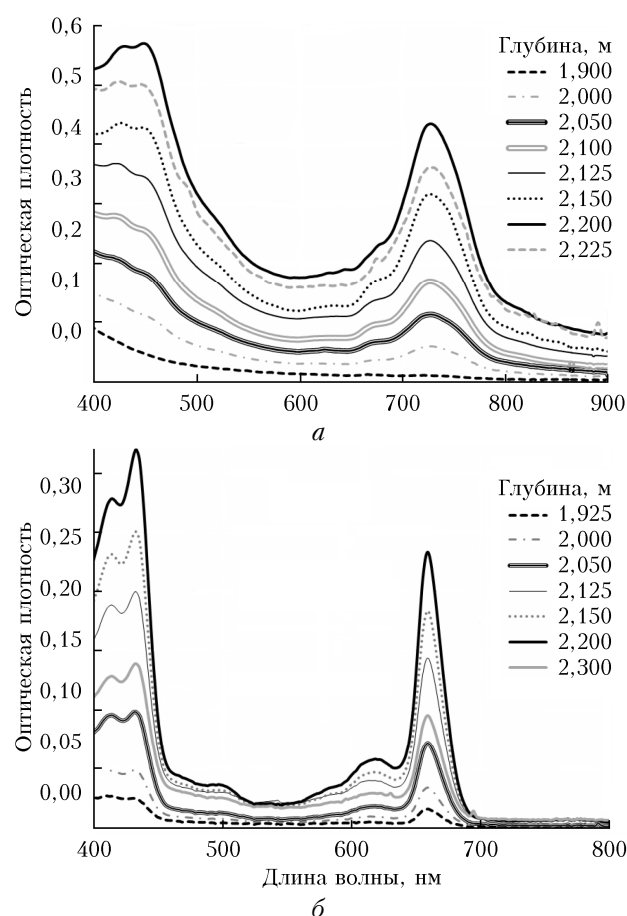


Рис. 1. Спектры поглощения образцов воды с разной глубины из зоны хемоклина (а) и приготовленных из них ацетон-этаноловых экстрактов (б), оз. Трехцветное

поглощению света молекулами Бхл *d* и каротиноидами) и длинноволновой областях спектра (где поглощают свет молекулы Бхл *d* и Бхл *a*). Максимумы коротковолновых полос поглощения проб воды, содержащих клетки **зеленоокрашенного** типа ЗСБ, приходятся на $\lambda = 427$ и 450 нм, а длинноволновой – на $\lambda = 726–729$ нм, что соответствует поглощению света Бхл *d* [5, 6, 17]. Для всех образцов в районе $\lambda = 800$ нм присутствует небольшое плечо, соответствующее поглощению света Бхл *a*.

2.2. Спектры поглощения экстрактов

Спектры поглощения ацетон-этаноловых экстрактов, приготовленных из образцов воды с микроорганизмами, также имеют две основные полосы поглощения. Максимальное поглощение света пигментами для зеленоокрашенных ЗСБ приходится на $\lambda = 414–416$, $433–435$ и $659–661$ нм (рис. 1). Наблюдается сужение длинноволновой полосы поглощения Бхл *d* и сдвиг ее в коротковолновую область спектра на величину порядка 70 нм по сравнению с полосами поглощения клеток ЗСБ в исходной природной воде. Это явление связано с тем, что при экстрагировании происходит разрушение плотно упакованных хлоросом клеток, внутри которых располагаются фотосинтетические пигменты, вследствие чего Бхл переходит из высокоагрегированной формы, в которой он находился в хлоросомах, к мономерной.

2.3. Спектры флуоресценции природной воды

Спектры испускания флуоресценции образцов воды регистрировали при возбуждении светом с длиной волны 440 нм ($\lambda_{ex} = 440$ нм), так как ранее было показано, что интенсивность флуоресценции Бхл при облучении светом с такой длиной волны максимальна [19]. Спектры флуоресценции были скорректированы на спектральную чувствительность детектора и пропускание монохроматора регистрации. Для образцов на глубине менее 1,9 м существенной флуоресценции Бхл не наблюдалось. На спектрах флуоресценции, начиная с глубины 1,925 м, присутствуют три ярко выраженные полосы испускания с максимумами при 765 нм (соответствует флуоресценции Бхл *d* [5, 6]), при 814 нм (флуоресценция Бхл *a* [5, 6, 17]) и при 670–675 нм (рис. 2).

Природа последней полосы не доказана в литературе, однако существует предположение, что этот пик – излучение мономерной формы Бхл [17].

2.4. Спектры флуоресценции экстрактов

На спектрах испускания флуоресценции ацетон-этаноловых экстрактов присутствуют две перекрывающиеся полосы свечения Бхл *d*, максимумы которых приходятся на $\lambda = 663$ (наиболее интенсивная

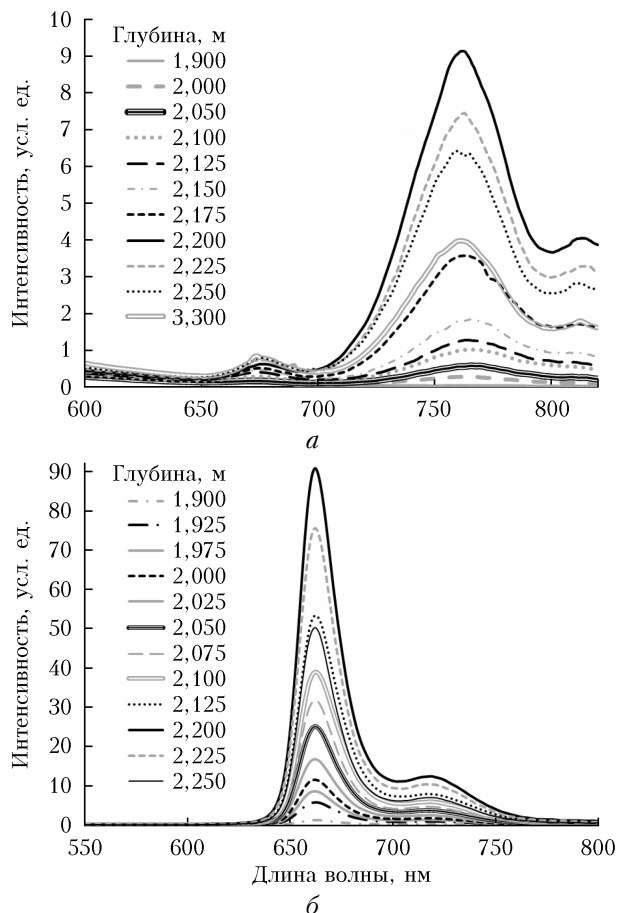


Рис. 2. Спектры флуоресценции воды с разной глубины из зоны хемоклина ($\lambda_{ex} = 440$ нм) (а) и приготовленных из них ацетон-этаноловых экстрактов ($\lambda_{ex} = 425$ нм) (б) из оз. Трехцветное

полоса) и $716–720$ нм (см. рис. 2). Для определения эффективной длины волны возбуждения свечения Бхл *d* были зарегистрированы спектры возбуждения флуоресценции на длине волны испускания 663 нм, они имели ярко выраженные пики при $\lambda = 408–410$ и $425–428$ нм. В качестве длины волны возбуждения флуоресценции Бхл *d* в экстрактах в дальнейшем была выбрана $\lambda = 425$ нм, так как она соответствовала более интенсивному пику в спектре возбуждения. Полосы флуоресценции Бхл *d* обнаружены для всех экстрактов (23 образца), при этом интенсивность наиболее сильно флуоресцирующей пробы с глубины 2,2 м превышала более чем в 600 раз интенсивность наименее флуоресцирующей с глубины 1,750 м. Таким образом, экстрагирование пигментов ацетон-этаноловым растворителем повышает чувствительность регистрации Бхл *d* по сравнению с исходными клетками ЗСБ в воде.

3. Методы оценки концентрации Бхл

Известно, что при отсутствии значительного рассеяния света в образце или взаимодействия молекул пигмента величина оптической плотности раствора пигмента пропорциональна его концентрации.

На основе этого мы разработали несколько методов, позволяющих получить количественные значения концентрации Бхл d в пробах воды по их спектрам поглощения и спектрам поглощения ацетон-этаноловых экстрактов этих образцов [20]. Кроме этого, благодаря предположению о зависимости интенсивности флуоресценции пигмента от его количества был предложен новый метод оценки концентрации Бхл d в пробах природной воды по спектрам флуоресценции их экстрактов.

Для всех методов полученные результаты сравнивались со значениями концентрации Бхл d ($\text{мг}/\text{м}^3$), рассчитанным по модернизированной формуле ОТ [21], которая применялась в [21, 22] для оценки пигментов ЗСБ в отделяющихся водоемах Белого моря:

$$C(\text{Бхл } d) = (1,315 \cdot D_{655'} - 0,643 \cdot D_{667'}) / (\varepsilon_{\text{Бхл } d} \cdot l) \cdot (v/V) \cdot 10^6, \quad (2)$$

где $D_{655'} = D_{655} - D_{850}$, $D_{667'} = D_{667} - D_{850}$ – величины оптической плотности экстракта пигментов при $\lambda = 655$ и 667 нм соответственно (после вычитания величины светорассеяния D_{850} при 850 нм); v – объем экстракта (мл); V – объем пробы воды, использованный при экстрагировании (мл); $l = 1$ см – длина оптического пути; $\varepsilon_{\text{Бхл } d}$ – коэффициент экстинкции Бхл d ($\varepsilon_{\text{Бхл } d} = \text{мл} \cdot (\text{мг} \cdot \text{см})^{-1}$) [23].

3.1. Оценка концентрации Бхл d по спектрам поглощения экстрактов

Получим формулу для расчета концентрации Бхл d по спектрам поглощения экстрактов (метод ASE, Absorption spectra of Extractions) из закона Бугера–Ламберта–Бера. При прохождении через оптически тонкий слой вещества монохроматический свет с определенной длиной волны ослабляется пропорционально толщине слоя и концентрации поглощающего свет вещества. Оптическая плотность D экстракта Бхл в максимуме полосы поглощения будет равна концентрации Бхл, умноженной на коэффициент экстинкции пигмента $\varepsilon_{\text{Бхл}}$ (зависящий от типа Бхл, растворителя и длины волны, на которой измерена оптическая плотность) и длину оптического пути l :

$$D = C(\text{Бхл}) \cdot \varepsilon_{\text{Бхл}} \cdot l.$$

Для концентрации Бхл d в исходной воде, выраженной в $\text{мг}/\text{м}^3$, с учетом концентрирования пигментов в растворителе при экстрагировании получим расчетную формулу

$$C(\text{Бхл } d) = \frac{D_{655}}{\varepsilon_{\text{Бхл } d} \cdot l} \cdot \frac{v}{V} \cdot 10^6, \quad (4)$$

где D_{655} – оптическая плотность ацетон-этанолового экстракта на $\lambda = 655$ нм, откорректированная на рассеяние; $\varepsilon_{\text{Бхл } d}$ – коэффициент экстинкции Бхл $d = 98 \text{ мл} \cdot (\text{мг} \cdot \text{см})^{-1}$ [23]; l – ~~длина оптического пути (см); v – объем экстракта (мл); V – исходный объем воды, использованный при экстрагировании (мл).~~

3.2. Оценка концентрации Бхл d по спектрам поглощения природной воды

Разработанный ранее метод (~~метод ASW, Absorption Spectra of Water~~) позволяет вычислить концентрацию Бхл, используя площадь длинноволновой полосы поглощения в абсорбционных спектрах клеток бактерий непосредственно в воде, без пробоподготовки. Для вычитания рассеяния используется линейное приближение базовой линии светорассеяния как самое простое и удобное. Исходя из пропорциональной зависимости между площадью длинноволновой полосы в спектрах поглощения Бхл (с вычтенной линией светорассеяния) и его концентрацией был вычислен коэффициент пропорциональности A [$\text{мг}/(\text{нм} \cdot \text{м}^3)$], позволяющий записать формулу для расчета концентрации Бхл по спектрам поглощения в воде:

$$C(\text{Бхл } d) = A \cdot \Sigma D, \quad (5)$$

где ΣD – площадь длинноволновой полосы в спектрах поглощения Бхл в пробах воды с вычтенной линией светорассеяния (нм); $A = (336 \pm 9) \text{ мг}/(\text{нм} \cdot \text{м}^3)$ ~~– коэффициент пропорциональности [20].~~ Вычисленная по формуле (4) концентрация Бхл выражена в $\text{мг}/\text{м}^3$.

3.3. Оценка концентрации Бхл d по спектрам флуоресценции экстрактов

Метод оценки концентрации Бхл d по флуоресценции его экстракта (метод FSE, Fluorescence Spectra of Extractions) основан на предположении о пропорциональной зависимости концентрации пигмента в экстракте и интенсивности его флуоресценции. Впервые он был предложен авторами в [24]. Для калибровки метода требуется знать значения концентрации пигмента для какого-то одного образца и его интенсивность флуоресценции. Рабочая формула имеет вид

$$C(\text{Бхл } d) = Fl \cdot \frac{C_{\text{max}}}{Fl_{\text{max}}}, \quad (6)$$

где C_{max} – максимально зарегистрированная концентрация Бхл d в серии образцов ($\text{мг}/\text{м}^3$); Fl_{max} – ~~соответствующая этой концентрации флуоресценция~~ (в относительных единицах). В дальнейшем можно использовать формулу для расчета концентрации Бхл d по флуоресценции экстракта **с тем же значением отношения** $C_{\text{max}}/Fl_{\text{max}}$, если измерения флуоресценции выполняются на одном и том же приборе.

4. Сравнение методов и обсуждение результатов

Приведенные выше методы были опробованы на образцах воды из области хемоклина оз. Трехцветное в марте 2021 г. – **конце зимнего сезона в беломорском регионе. В это время лед на озере имеет толщину ~ 40 см и поверх него лежит снежный**



покров толщиной 50 см. Полученные вертикальные распределения концентрации Бхл d от глубины 1,7 до 2,3 м приведены на рис. 3. Все методы дают оценки, совпадающие в пределах 20%, а также имеют схожий профиль изменения ~~значений~~ концентрации Бхл с глубиной. Наименьшими ~~по величине~~ оказались значения, рассчитанные по модернизированной формуле ОТ. Для проб воды с максимальной концентрацией пигмента расхождение значений, посчитанных по формуле ОТ и методом ASE, составило 25%. Сильно заниженные по сравнению с другими методами оценки концентраций Бхл d могут быть связаны с тем, что исходно формула ОТ разрабатывалась для водоема с **существенной концентрацией хлорофилла** в воде и при этом занижалось определение Бхл.

В пробах воды, отобранных из верхних горизонтов до глубины 1,9 м, присутствие Бхл d было зафиксировано только для измерений, проведенных для ацетон-этаноловых экстрактов, но не для исходной воды. Отчетливых полос поглощения Бхл в спектрах природной воды на фоне рассеяния зарегистрировать не удалось, по этой причине только методы ASE и FSE позволили получить реальные значения концентрации Бхл в верхних пробах, где они составляли от 90 до 210 мг/м³. На глубине 1,925 м концентрация Бхл возросла до 360 мг/м³, это значение оказалось достаточным для того, чтобы результаты всех трех методов совпали в пределах 10%. Концентрация Бхл на глубине 2,0 м составляла 800 мг/м³, а наибольшая концентрация Бхл (6135 ± 175) мг/м³ обнаружена на глубине 2,2 м. Таким образом, количество пигмента через 20 м увеличения глубины возрастает почти в 8 раз. **На 2,5 см ниже максимальной концентрации**, на глубине 2,225 м количество

Бхл было оценено в (5120 ± 150) мг/м³. Это демонстрирует крайне высокую плотность фототрофного микробного сообщества в конце зимнего сезона под толщей льда (40 см) и снега на нем (50 см), т.е. практически в полной темноте.

При измерении спектров поглощения для суспензий клеток в водной среде большое значение имеет учет светорассеяния. Чтобы оценить, насколько величина светорассеяния влияет на измерение **площади полосы** поглощения (и, соответственно, на оценку концентрации Бхл), были проведены модельные расчеты, в которых **вид светорассеяния** аппроксимировался нелинейной (типа $1/x^n$) и линейной **функциями**. Оценки площади полосы поглощения Бхл при вычитании светорассеяния в виде нелинейной функции отличались от площади полосы поглощения Бхл при вычитании линейной функции не более чем на 5% для спектров, в которых рассеяние составляло не более четверти величины оптической плотности. Если же вклад рассеяния был сопоставим по величине с вкладом поглощения в оптическую плотность в максимуме длинноволновой полосы, то все оценки концентрации Бхл (при любом вычитании фоновой линии) плохо коррелировали с оценками пигмента в экстрактах, приготовленных из таких проб воды.

Таким образом, особых преимуществ вычитания нелинейной функции выявлено не было. Однако стоит отметить, что при большом светорассеянии уменьшается точность определения концентрации Бхл в пробе. Это применимо для проб с малой концентрацией Бхл, но большим рассеянием, например, в глубинных пробах воды в меромиктических озерах. В этих случаях преимущества имеют флуоресцентные методы измерения концентрации Бхл.

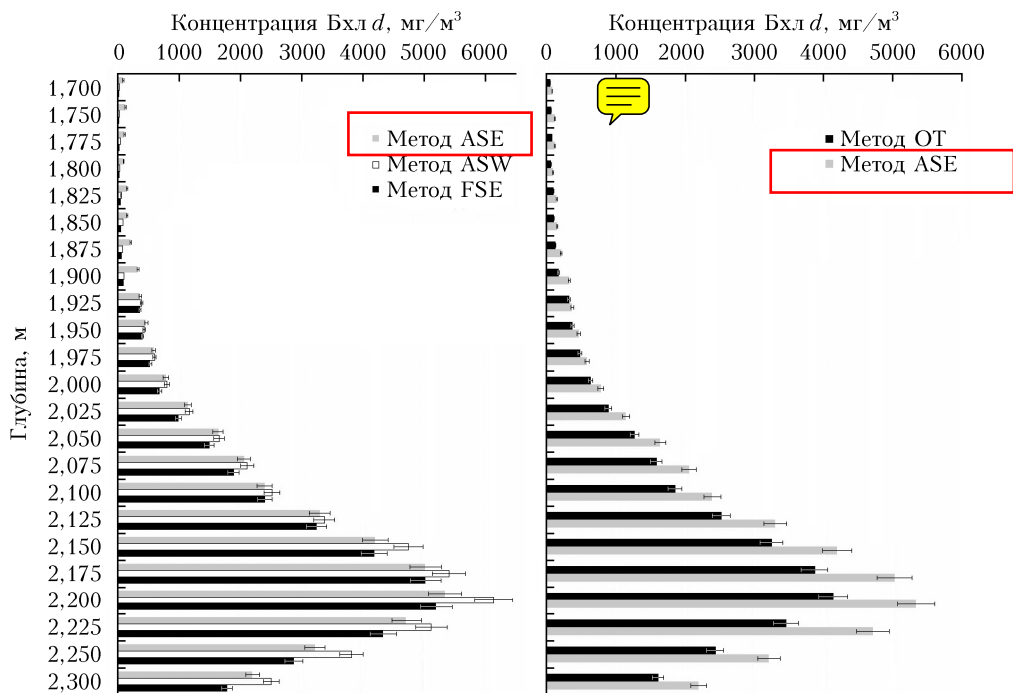


Рис. 3. Сравнение концентраций Бхл d , рассчитанных различными методами: ОТ (по формуле ОТ), ASE (по спектрам поглощения экстрактов), ASW (по спектрам поглощения природной воды), FSE (по спектрам флуоресценции экстрактов)

Заключение

В работе приведено описание спектральных трех методов оценки концентрации Бхл d в пробах воды, один из которых (по спектрам флуоресценции экстрактов) описан впервые. Методы апробированы на серии образцов природной воды, отобранных из зоны хемоклина оз. Трехцветное в марте 2021 г. В диапазоне концентраций Бхл d в воде от 360 мг/м³ до максимального значения 6135 мг/м³ результаты всех трех методов совпали в пределах 20%. При этом методы с предварительным экстрагированием пигмента ацетон-этаноловым растворителем являются более чувствительными при определении концентрации Бхл d по сравнению с методом измерения спектров поглощения исходной воды без пробоподготовки. Однако благодаря отсутствию необходимости экстрагирования неоспоримыми преимуществами метода, основанного на измерении спектров поглощения исходной воды, являются его быстрота и возможность использования непосредственно в толще воды, например с помощью погружаемого спектрометра.

Подробное изучение флуоресценции экстрактов образцов воды с Бхл d с разной глубины в зимнем сезоне проводилось впервые. Разработанный на основе этого исследования метод оценки концентрации Бхл позволил установить связь между концентрацией пигмента и флуоресцентными свойствами его экстракта. В отличие от флуоресценции Бхл d в клетках бактерий, флуоресценция экстрактов Бхл не меняется с течением времени (так как прекращена жизнедеятельность микроорганизмов), что позволяет получать более надежные данные после транспортировки и хранения образцов. Кроме того, изучение флуоресценции мономерного Бхл d в дальнейшем будет полезно для установления его спектроскопических характеристик.

Все три предложенных метода оценки концентрации Бхл доказали возможность своего применения на пробах природной воды с разной концентрацией Бхл, отличающейся на порядки. Метод должен выбираться с учетом уровня концентрации пигмента в воде, возможности использования растворителей и требуемого времени на подготовку проб для измерений.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках гранта № 19-05-00377. А.А. Жильцова является стипендиатом фонда «БАЗИС».

1. Романенко Ф.А., Шилова О.С. Последлениковое поднятие Карельского берега Белого моря по данным радиоуглеродного и диатомового анализов озерно-болотных отложений полуострова Киндо // Докл. АН. 2012. Т. 442, № 4. С. 544–548.
2. Краснова Е.Д. Экология меромиктических озер России. 1. Прибрежные морские водоемы // Водные ресурсы. 2021. Т. 48, № 3. С. 322–333.
3. Краснова Е.Д., Мардашова М.В. Как морской залив превращается в озеро // Природа. 2020. № 1. С. 16–27.
4. Overmann J. Green sulfur bacteria // Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons, Ltd. 2001. DOI: 10.1038/npg.els.0000458.
5. Blankenship R.E., Olson J.M., Miller M. Antenna complexes from green photosynthetic bacteria. Anoxygenic photosynthetic bacteria / R.E. Blankenship, M.T. Madigan, C.E. Bauer. 1995. Chapter 20, 2004. P. 399–435.
6. Hohmann-Marriott M.F., Blankenship R.E. Variable fluorescence in green sulfur bacteria // Biochimica et Biophysica Acta. 2007. 1767. P. 106–113.
7. Frigaard N.-U., Takaichi S., Hirota M., Shimada K., Matsuura K. Quinones in chlorosomes of green sulfur bacteria and their role in the redox-dependent fluorescence studied in chlorosome-like bacteriochlorophyll c aggregates // Arch Microbiol. 1997. V. 167. P. 343–349.
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 Sci. 1989. V. 51. P. 261–278.
9. Marschall E., Jogler M., Hesse U., Overmann J. Large-scale distribution and activity patterns of an extremely low-light-adapted population of green sulfur bacteria in the Black Sea // Environ. Microbiol. 2010. V. 12, N 5. P. 1348–1362.
10. Becker K.W., Elling F.J., Schröder J.M., Lipp J.S., Goldhammer T., Zabel M., Elvert M., Overmann J., Hinrichs K.-U. Isoprenoid quinones resolve the stratification of redox processes in a biogeochemical continuum from the photic zone to deep anoxic sediments of the Black Sea // Appl. Environ. Microbiology. 2018. V. 84, N 10. P. e02736-17.
11. Gostev T.S., Kouzminov F.I., Gorbunov M.Yu., Voronova E.N., Fadeev V.V. Physiological effect of variations in salinity and nitrogen concentration on the physiological characteristics of phytoplankton obtained using fluorescence spectroscopy techniques // EARSel eProc. 2012. V. 11, N 21. P. 98–107.
12. Gorbunov M.Y., Falkowski P.G. Using chlorophyll fluorescence kinetics to determine photosynthesis in aquatic ecosystems // Limnol. Oceanogr. 2021. V. 66. P. 1–13.
13. Кузьминов Ф.И., Ширшин Е.А., Горбунов М.Ю., Фадеев В.В. Новые оптические подходы в исследовании физиологических характеристик цианобактерий *in situ* // Ж. фонд. и прикл. гидрофизики. 2015. Т. 8, № 1. С. 41–47.
14. Block K.R., O'Brien J.M., Edwards W.J., Marnocha C.L. Vertical structure of the bacterial diversity in meromictic Fayetteville Green Lake // Microbiology Open. 2021. V. 10. P. e1228.
15. Краснова Е., Kharcheva A., Milyutina I., Voronov D., Patsaeva S. Study of microbial communities in redox zone of meromictic lakes isolated from the White Sea using spectral and molecular methods // J. Mar. Biol. Assoc. U. K. 2015. V. 95, N 8. P. 1579–1590.
16. Харчева А.В., Жильцова А.А., Лунина О.Н., Краснова Е.Д., Воронов Д.А., Саввичев А.С., Пацаева С.В. Флуоресценция бактериохлорофиллов зеленых серных бактерий в анаэробной зоне двух природных водоемов // Вестн. Моск. университета. Физика, астрономия. 2018. № 4. С. 40–45; Kharcheva A.V., Zhiltsova A.A., Lunina O.N., Krasnova E.D., Voronov D.A., Savvichev A.S., Patsaeva S.V. Bacteriochlorophyll fluorescence of green sulfur bacteria in the anaerobic zone of two natural water bodies // Moscow Univ. Phys. Bull. 2018. V. 73, N 4. P. 377–381.
17. Жильцова А.А., Харчева А.В., Краснова Е.Д., Лунина О.Н., Воронов Д.А., Саввичев А.С., Горшкова О.М., Пацаева С.В. Спектральное исследование зеленых серных бактерий в стратифицированных водоемах Кандлакского залива Белого моря // Оптика атмосф. и океана. 2018. Т. 31, № 3. С. 233–239; Zhiltsova A.A., Kharcheva A.V., Krasnova E.D., Lunina O.N., Voronov D.A.,

- Savvichev A.S., Gorshkova O.M., Patsaeva S.V.* Spectroscopic study of green sulfur bacteria in stratified water bodies of the Kandalaksha Gulf of the White Sea. // *Atmos. Ocean. Opt.* 2018. V. 31, N 4. P. 390–396.
18. *Хунджа Д.А., Пацаева С.В., Трубецкой О.А., Трубецкая О.Е.* Анализ растворенного органического вещества пресноводных озер Карелии обратно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографией с одновременной регистрацией оптической плотности и флуоресценции // *Вестн. Моск. ун-та. Физика, астрономия.* 2017. № 1. С. 66–73.
 19. *Kharcheva A.V., Zhiltsova A.A., Lunina O.N., Savvichev A.S., Patsaeva S.V.* Quantification of two forms of green sulfur bacteria in their natural habitat using bacteriochlorophyll fluorescence spectra // *Proc. SPIE. The International Society for Optical Engineering.* 2016. V. 9917. P. 99170P-1–99170P-8.
 20. *Емельянец П.С., Жильцова А.А., Краснова Е.Д., Воронов Д.А., Рымарь В.В., Пацаева С.В.* Определение концентрации хлоросомных бактериохлорофиллов по спектрам поглощения клеток зеленых серных бактерий в пробах природной воды // *Вестн. Моск. ун-та. Серия 3: Физика, астрономия.* 2020. № 2. С. 25–30.
 21. *Лунина О.Н., Саввичев А.С., Кузнецов Б.Б., Пименов Н.В., Горленко В.М.* Аноксигенные фототрофные бактерии стратифицированного озера Кисло-Сладкое (Кандалакшский залив Белого моря) // *Микробиология.* 2014. Т. 83, № 1. С. 90–108.
 22. *Лунина О.Н., Саввичев А.С., Бабенко В.В., Болдырева Д.И., Кузнецов Б.Б., Колганова Т.В., Краснова Е.Д., Кокрятская Н.М., Веслополова Е.Ф., Воронов Д.А., Демиденко Н.А., Летарова М.А., Летаров А.В.* Сезонные изменения структуры сообщества аноксигенных фототрофных бактерий меромиктического озера Трехцветное (Кандалакшский залив Белого моря) // *Микробиология.* 2019. Т. 88, № 1. С. 100–115.
 23. *Stanier R.Y., Smith J.H.C.* The chlorophylls of green bacteria // *Biochim. Biophys. Acta.* 1960. V. 41. P. 478–484.
 24. *Zhiltsova A.A., Rymar V.V., Krasnova E.D., Voronov D.A., Patsaeva S.V.* Fluorescence of chlorosomal bacteriochlorophylls extracted by organic solvents applied for pigment quantification in natural water samples // *Proc. SPIE. 2021. V. 11845. Saratov Fall Meeting 2020: Optical and Nanotechnologies for Biology and Medicine.* P. 118450H.

A.A. Zhiltsova, O.A. Filippova, E.D. Krasnova, D.A. Voronov, S.V. Patsaeva. **Comparative analysis of spectral methods for detection of the concentration of bacteriochlorophyll *d* of green sulfur bacteria in water.**

An important characteristic of a natural reservoir is the distribution of the pigment composition of various groups of photosynthetic organisms by depth and its changes in different seasons. Optical methods are widely used to monitor the concentration of chlorophylls of algae or cyanobacteria in aquatic ecosystems, but they are very limited used to monitor the bacteriochlorophyll's (BChl) concentration of phototrophic bacteria. The paper describes in detail three methods of quantitative analysis of the photosynthetic pigment of BChl *d* of green sulfur bacteria, using spectral measurements carried out both on initial samples of natural water (optical density spectra) and on pigment extracts in organic solvents (absorption and fluorescence spectra). A comparative analysis of the results of using different methods is carried out on the example of natural water from the chemocline region of the lake Trekhztvetnoe, one of the meromictic reservoirs of the Kandalaksha Bay of the White Sea (water from different depths was selected in March 2021). The conclusions about the conditions of applicability of different methods, their advantages and limitations were made. All three proposed methods for estimating the concentration of BChl have proved the possibility of their application on the samples of natural water with different concentrations of BChl, differing by orders of magnitude, from 5 to 5000 mg/m³.