

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

А.А. Жильцова¹, О.А. Филиппова¹, Е.Д. Краснова¹,
Д.А. Воронов², С.В. Пацаева^{1*}

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

²Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН
127994, г. Москва, Б. Каретный пер., 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 новых метода количественного анализа фотосинтетического пигмента бактериохлорофилла *d* зеленых серных бактерий, использующие спектральные измерения как в 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. Сделаны выводы об условиях применимости разных методов, их преимуществах и ограничениях. Доказана эффективность всех трех предложенных методов на примерах проб природной воды с концентрацией бактериохлорофилла, различающейся на порядки, от 5 до 5000 мг/м³.

Ключевые слова: бактериохлорофилл, флуоресценция, спектр поглощения, аноксигенные фототрофные бактерии, зеленые серобактерии, стратифицированный водоем, Белое море; bacteriochlorophyll, fluorescence, absorption spectrum, 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 разной 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, солености, концентрации сероводорода и др. Таким образом, содержание пигментов ЗСБ в природной воде является одним из индикаторов эволюционного состояния водоема [8–10]. Распределение по глубине

* 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).

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 анаэробных микроорганизмов в природной воде пока применяются очень ограниченно [8, 15–17]. До настоящего времени подсчет суммарной концентрации хлоросомных Бхл производился по эмпирической формуле Овермана–Тилзера (ОТ) [8], в которой использовались величины оптической плотности на длинах волн $\lambda = 651$ и 663 нм для ацетоновых экстрактов. Однако предлагаемая формула разрабатывалась на образцах воды, содержащих помимо Бхл большое количество 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 в марте 2021 г.

1. Объекты и методы исследования

Образцы природной воды с фототрофными бактериями отбирали с разной глубины с шагом 2,5 см в зоне хемоклина меромиктического оз. Трехцветное в марте 2021 г. (в это время толщина льда озера ~ 40 см и снежного покрова — 50 см) многоприцевающим батометром, разработанным Д.А. Вороновым [18]. Для того, чтобы избежать перемешивания слоев после погружения батометра на нужную глубину, устройство медленно перемещали в горизонтальном направлении на расстояние порядка 0,5 м, а затем производили отбор проб одновременно с разных глубин. 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. Спектры поглощения проб измерялись 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 CM2203. Чтобы избежать так называемого эффекта внутреннего фильтра, значения интенсивности флуоресценции корректировали на поглощение по формуле

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

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 флуоресценции 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 [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 (где поглощают свет

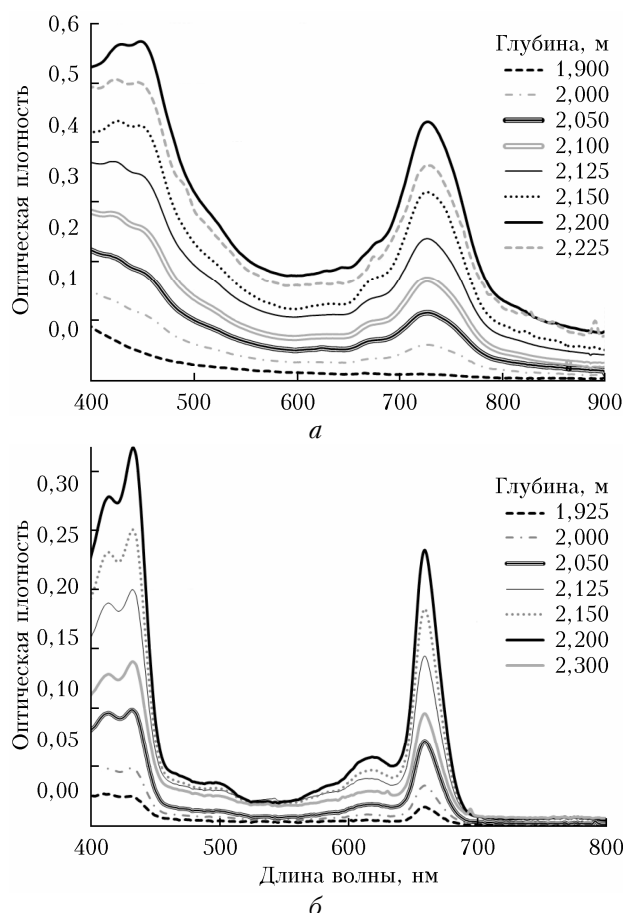


Рис. 1. Спектры поглощения образцов воды с разной глубины из зоны хемоклина (а) и приготовленных ацетон-этаноловых экстрактов (б), оз. Трехцветное

молекулы Бхл *d* и каротиноиды) и длинноволновой областях спектра (где поглощают свет Бхл *d* и Бхл *a*). Максимумы коротковолновых полос поглощения проб воды, содержащих клетки зеленоокрашенного типа ЗСБ, приходится 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 (см. рис. 1). Наблюдается сужение длинноволновой полосы поглощения Бхл *d* и ее сдвиг 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 переходят из высокоагрегированной формы, в которой они находились в хлоросомах, к мономерной.

2.3. Спектры флуоресценции природной воды

Спектры испускания флуоресценции образцов воды регистрировали при возбуждении светом с $\lambda_{\text{ex}} = 440$ нм, так как ранее было показано [19], что интенсивность флуоресценции Бхл при облучении светом с такой длиной волны максимальна. Спектры флуоресценции были скорректированы на спектральную чувствительность детектора и пропускание монохроматора регистрации. Для образцов с глубины 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 на 765 нм (соответствует флуоресценции Бхл *d* [5, 6]), 814 нм (флуоресценция Бхл *a* [5, 6, 17]) и 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 полоса) и $716–720$ нм (см. рис. 2). Для опре-

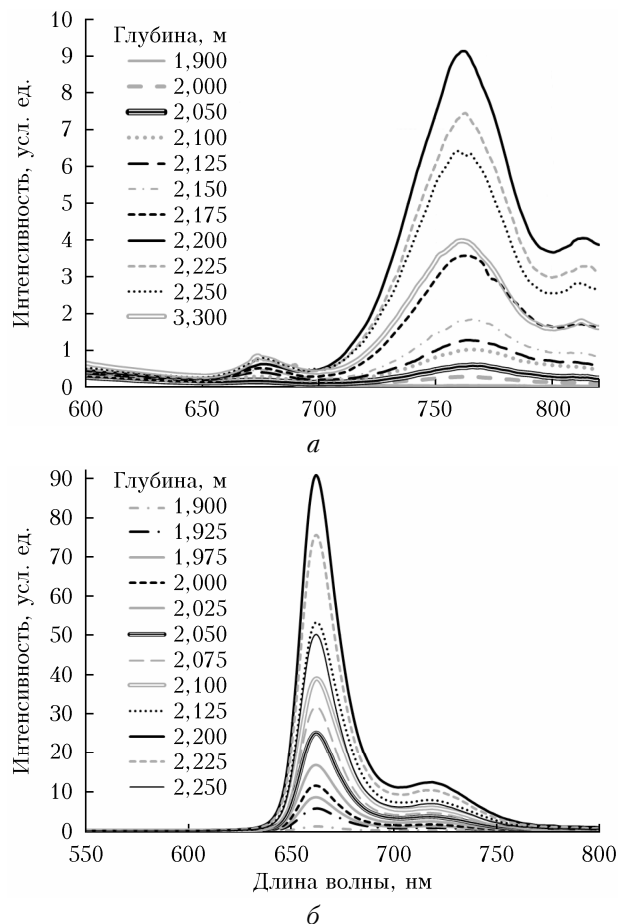


Рис. 2. Спектры флуоресценции воды с разной глубины из зоны хемоклина ($\lambda_{\text{ex}} = 440$ нм) (а) и приготовленных из них ацетон-этаноловых экстрактов ($\lambda_{\text{ex}} = 425$ нм), оз. Трехцветное

деления эффективной длины волны возбуждения свечения Бхл *d* были зарегистрированы спектры возбуждения флуоресценции на $\lambda = 663$ нм, они имели ярко выраженные пики на $\lambda = 408–410$ 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 пробы 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 оценить концентрации Бхл d в пробах воды по их спектрам поглощения и спектрам поглощения ацетон-этаноловых экстрактов этих образцов [20]. Кроме этого, исходя из предполагаемой 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:

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

где $D_{655}' = D_{655} - D_{850}$, $D_{667}' = D_{667} - D_{850}$ — величины оптической плотности экстракта пигментов на $\lambda = 655$ и 667 нм соответственно (после вычитания величины светорассеяния D_{850} на $\lambda = 850$ 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 :

$$D = C(\text{Бхл}) \cdot \varepsilon_{\text{Бхл } d} \cdot l. \quad (3)$$

Для концентрации Бхл d в исходной воде ($\text{мг}/\text{м}^3$) 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, скорректированная на рассеяние; $\varepsilon_{\text{Бхл } d} = 98 \text{ мл} \cdot (\text{мг} \cdot \text{см})^{-1}$ [23].

3.2. Оценка концентрации Бхл d по спектрам поглощения природной воды

Разработанный ранее метод ASW 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 вычитенной линией светорассеяния ΣD (нм) и его концентрацией

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

был вычислен коэффициент пропорциональности $A = (336 \pm 9) \text{ мг}/(\text{нм} \cdot \text{м}^3)$ [20].

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 отн. ед.). 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. Полученные распределения концентрации Бхл d по глубине от 1,7 до 2,3 м приведены на рис. 3. Все методы дают оценки, совпадающие в пределах 20%, а также имеют схожий вертикальный профиль концентрации Бхл. Наименьшими оказались значения, рассчитанные по модернизированной формуле ОТ. Для проб воды с максимальной концентрацией пигмента расхождение

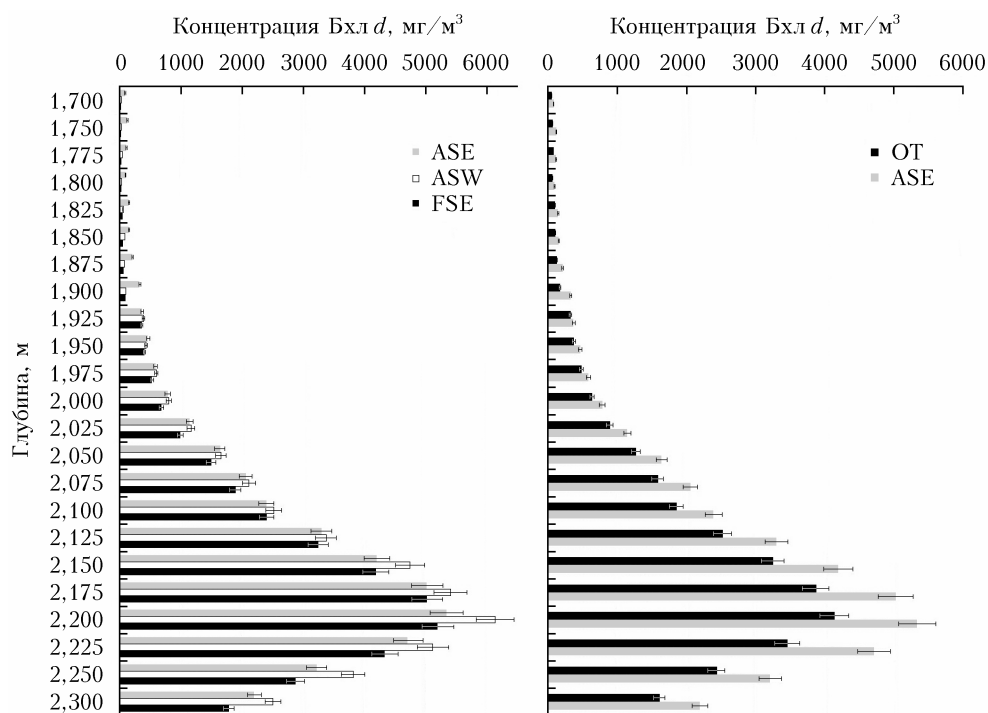


Рис. 3. Сравнение концентраций Бхл d , рассчитанных различными методами: ASE (по спектрам поглощения экстрактов), ASW (по спектрам поглощения природной воды), FSE (по спектрам флуоресценции экстрактов) (слева); OT (по формуле OT) и ASE (справа)

значений, посчитанных по формуле OT и методом ASE, составило 25%. Сильно заниженные по сравнению с другими методами оценки концентраций Бхл d могут быть связаны с тем, что формула OT разрабатывалась для водоема, где наряду с Бхл присутствовал пигмент хлорофилл, концентрация которого была сопоставима с концентрацией Бхл [8].

В пробах воды, отобранных из верхних горизонтов до глубины 1,9 м, присутствие Бхл d было зафиксировано в измерениях, 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, где они составляли от 90 до 210 $\text{мг}/\text{м}^3$. На глубине 1,925 м концентрация Бхл возросла до 360 $\text{мг}/\text{м}^3$, это значение оказалось достаточным для того, чтобы результаты всех трех методов совпали в пределах 10%. Концентрация Бхл на глубине 2,0 м составляла 800 $\text{мг}/\text{м}^3$, а наибольшая концентрация Бхл (6135 ± 175) $\text{мг}/\text{м}^3$ обнаружена на глубине 2,2 м. Таким образом, количество пигмента при увеличении глубины на 20 см возрастает почти в 8 раз. На 2,5 м ниже уровня максимальной концентрации, на глубине 2,225 м концентрация Бхл была (5120 ± 150) $\text{мг}/\text{м}^3$. 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 под контуром спектра поглощения (и, следовательно, на оценку концентрации Бхл), были проведены модельные расчеты, в которых форма кривой светорассеяния аппроксимировалась 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 вклад рассеяния в величину оптической плотности составлял не более четверти. 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.

Заключение

В работе приведено описание трех спектральных методов оценки концентрации Бхл *d* в пробах воды, один из которых (по спектрам флуоресценции экстрактов) описан впервые. Методы апробированы на серии образцов природной воды, взятых 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 со временем (так как прекращена жизнедеятельность микроорганизмов), что позволяет получать более надежные данные после транспортировки и хранения образцов. Изучение флуоресценции мономерного Бхл *d* в дальнейшем будет полезно для установления его спектроскопических характеристик.

Доказана возможность применения всех трех предложенных методов оценки концентрации Бхл на примерах проб природной воды с разной концентрацией Бхл, отличающейся на порядки. Каждый из разработанных методов имеет свои преимущества. Метод ASE является усовершенствованной версией классического метода ОТ, используемого в биологических исследованиях. Он позволяет определить концентрацию Бхл в пробах воды, где хлорофилл отсутствует или его концентрация незначительна, а также количественно определять пигментный состав с точностью до нескольких мг/м³. Метод ASW уступает в точности методу ASE, однако он позволяет производить оценку содержания Бхл в природной воде без предварительной пробоподготовки и использования токсичных растворителей, что немаловажно в полевых работах. Оценка Бхл флуоресцентным методом FSE позволяет работать с маленькими концентрациями пигмента (порядка мг/м³), но требует специального оборудования. Таким образом, при выборе метода необходимо учитывать концентрацию пигмента в воде, возможность использования растворителей и время, требующееся на подготовку проб для измерений.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (грант № 19-05-00377). А.А. Жильцова является стипендиатом фонда «БАЗИС».

1. Романенко Ф.А., Шилова О.С. Последлединовое 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. UK: 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. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. Ch. 20. 2004. P. 399–435.
6. Hohmann-Marriott M.F., Blankenship R.E. Variable fluorescence in green sulfur bacteria // Biochim. Biophys. 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 See, West-Germany // Aquatic Sci. 1989. V. 51. P. 261–278.
9. Marschall E., Jogler M., Hessge 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., Goldammer 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. Microbiol. 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* // Журн. фундамент. и прикл. гидрофиз. 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 // Microbiol. Open. 2021. V. 10. P. e1228.
15. Krasnova E., 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. UK. 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. ун-та. Физика, астрономия. 2018. № 4. С. 40–45.
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 Кандакшского 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. Хунджуа 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. 2016. V. 9917. P. 99170P-1–8.
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. 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 (Кандакшский 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 (Кандакшский 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., Ryman 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. 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 over 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 (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 both in initial samples of natural water (optical density spectra) and in pigment extracts in organic solvents (absorption and fluorescence spectra). A comparative analysis of the results of different methods is carried out on the example of natural water from the chemocline region of the lake Trekhtzvetnoe, 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 methods for estimating the BChl concentration have proved their applicability on the samples of natural water with BChl concentrations differing by orders of magnitude, from 5 to 5000 mg/m³.