

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

МАТАНЦЕВА

Ольга Валерьевна

**КОНКУРЕНТНОЕ ПОГЛОЩЕНИЕ И АССИМИЛЯЦИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ
ВЕЩЕСТВ И НИТРАТ-ИОНОВ КЛЕТКАМИ ДИНОФЛАГЕЛЛЯТ
*PROROCENTRUM MINIMUM***

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Скарлато Сергей Орестович

Санкт-Петербург

2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1 Характеристика группы Dinoflagellata.....	14
1.1.1 Филогенетическое положение и особенности клеточной организации динофлагеллят	14
1.1.2 Физиология питания динофлагеллят	17
1.1.3 Экологическое значение фотосинтезирующих динофлагеллят.....	21
1.1.4 Модельный вид – <i>Prorocentrum minimum</i> (Pavillard) Schiller 1933.....	22
1.2 Растворенные органические вещества как источники азота и углерода.....	25
1.2.1 Растворенные органические вещества в морских экосистемах.....	25
1.2.2 Мочевина и глицин как питательные субстраты для динофлагеллят	26
1.3 Транспорт и ассимиляция нитрат-ионов, мочевины и глицина.....	29
1.4 Исследования, проводимые на уровне отдельных клеток.....	32
1.4.1 Исследования на уровне отдельных клеток в экофизиологии фотосинтезирующих протистов	32
1.4.2 Исследования гетерогенности клеточных популяций	34
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	37
2.1 Культура клеток	37
2.2 Условия культивирования динофлагеллят <i>P. minimum</i>	37
2.3 Измерение концентрации источников азота и углерода.....	37
2.4 Подсчет клеток динофлагеллят	38
2.5 Протоколы экспериментов.....	38
2.6 Масс-спектрометрия изотопных отношений	42
2.7 Масс-спектрометрия вторичных ионов в наномасштабе (NanoSIMS).....	43
2.8 Вычисления.....	44
2.9 Биоинформатический анализ	46
2.10 Статистический анализ.....	47
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	48
3.1 Конкурентный транспорт нитрат-ионов и органических азотсодержащих веществ в клетки <i>P. minimum</i>	48

3.1.1 Конкуреннтное поглощение нитрат-ионов и мочевины	49
3.1.2 Конкуреннтное поглощение нитрат-ионов и глицина	51
3.1.3 Влияние мочевины и глицина на поглощение нитрат-ионов.....	53
3.1.4 Поглощение бикарбонат-ионов в присутствии дополнительного источника азота	54
3.2 Поглощение углерода мочевины и глицина клетками <i>P. minimum</i>	55
3.3 Анализ транскриптомов <i>P. minimum</i> на наличие гомологов белков, участвующих в транспорте и ассимиляции нитрат-ионов, мочевины и глицина	59
3.4 Анализ поглощения мочевины, ионов нитрата и бикарбоната отдельными клетками динофлагеллят с помощью масс-спектрометрии вторичных ионов в наномасштабе (NanoSIMS)	69
3.4.1 Сопоставление данных, полученных с помощью измерений на уровне популяций и отдельных клеток	69
3.4.2 Гетерогенность популяций <i>P. minimum</i> в отношении поглощения и ассимиляции питательных субстратов	72
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ	80
4.1 Мочевина и глицин как источники азота для динофлагеллят <i>P. minimum</i>	80
4.2 Роль мочевины и глицина как источников углерода для <i>P. minimum</i>	83
4.3 Белки <i>P. minimum</i> , вовлеченные в трансмембранный транспорт и ассимиляцию нитрат-ионов, мочевины и глицина	88
4.4 Гетерогенность популяций <i>P. minimum</i> в отношении поглощения питательных субстратов	90
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	96
ВЫВОДЫ	98
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	99
БЛАГОДАРНОСТИ	124
ПРИЛОЖЕНИЕ	125

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ацетил-КоА	ацетилкофермент А
AAP	пермеаза аминокислот (amino acid permease)
APC	семейство транспортеров, проводящих аминокислоты, полиамины и органокаатионы (amino acid-polyamine-choline)
ATF	семейство транспортеров аминокислот (amino acid transporter family)
CAT	транспортер аминокислот (cationic amino acid transporter)
CLC	семейство анионных каналов (chloride channel family)
DUR3	транспортер мочевины
DUR1,2	амидолиаза мочевины
GAP	пермеаза аминокислот (general amino acid permease)
GDC	комплекс декарбоксилирования глицина (glycine decarboxylation complex)
GLYT	транспортер глицина (glycine transporter)
MIP	суперсемейство аквапоринов (major intrinsic proteins)
MMETSP	проект, посвященный секвенированию транскриптомов различных видов морских протистов (Marine Microbial Eukaryote Sequencing Project)
NanoSIMS	масс-спектрометрия вторичных ионов в наномасштабе (nanoscale secondary ion mass spectrometry)
NAR	ассимиляционная нитрат-редуктаза
NIP	нодулин26-подобные аквапорины (Nodulin26-like intrinsic proteins)
NIR	ассимиляционная нитрит-редуктаза
NRT	транспортер нитрат-ионов
PIP	аквапорины плазматической мембраны (plasma membrane intrinsic proteins)
SDH	серин-дегидратаза (serine dehydratase)

SHMT	серин-гидроксиметилтрансфераза (serine hydroxymethyltransferase)
SIP	малые аквапорины (small basic intrinsic proteins)
SLAC/SLAH	медленные анионные каналы, проводящие мочевины (slow anion channel-associated homologues)
TIP	аквапорины тонопласта (tonoplast intrinsic proteins)
UAC	каналы, проводящие мочевины и амиды (urea amide channels)
URE	уреаза
YUT	канал, проводящий мочевины (<i>Yersinia urea transporter</i>)

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Динофлагелляты – это группа эукариотических микроорганизмов, широко распространенных в водах Мирового океана. Примерно половина видов этих протистов обладает пластидами, поэтому в водных экосистемах они играют основополагающую роль, являясь важнейшими первичными продуцентами (Околотков, 2011). При этом большая часть фотосинтезирующих динофлагеллят способна к миксотрофии, то есть сочетанию черт авто- и гетеротрофного типов питания. Источниками биогенных элементов для синтетических процессов у таких организмов могут быть не только канонические неорганические субстраты, такие как ионы нитрата, аммония и бикарбоната, но и растворенные органические соединения, а также другие микроорганизмы и частицы взвешенного органического вещества (Jones, 2000; Glibert, Legrand, 2006).

В последние десятилетия динофлагелляты часто становятся доминирующей группой фотосинтезирующих протистов в прибрежных регионах морей, что оказывает значительное влияние на функционирование водных экосистем. Многие виды в современных условиях оказываются способными к эффективной инвазии в новые для них местообитания, становясь так называемыми видами-вселенцами, несущими угрозу стабильности экосистем-реципиентов. Так, вид *Prorocentrum minimum* появился в Балтийском море в начале 1980-х годов и с тех пор успешно расселился по всем его регионам, составляя конкуренцию нативным видам того же рода (Telesh et al., 2016). Учащаются случаи вспышек пролиферации динофлагеллят, в результате которых формируются цветения воды, или «красные приливы». Цветения различных динофлагеллят снижают качество водных ресурсов и ведут к накоплению токсичных метаболитов этих протистов в тканях промысловых видов моллюсков и рыб, таким образом представляя угрозу здоровью людей и экономике прибрежных областей (Anderson, 2009). Распространение динофлагеллят и их цветений связывают с особенностями

физиологии питания этих организмов. Способность эффективно поглощать и ассимилировать различные органические соединения является конкурентным преимуществом в условиях антропогенной эвтрофикации, в результате которой возрастает содержание органических веществ в прибрежных регионах морей, в частности, в эстуариях крупных рек (Anderson et al., 2002; Heisler et al., 2008; Glibert, 2017). При этом из всех охарактеризованных растворенных органических веществ, присутствующих в морской воде, наибольшее значение имеют мочевины и глицин, так как именно они обычно представлены в самых высоких концентрациях.

Несмотря на то что способность динофлагеллят к росту на органических источниках азота была показана в полевых и лабораторных исследованиях (Белевич и др., 2009; Fan, Glibert, 2003b; Juzein et al., 2017; Glibert, 2017), процессы транспорта и ассимиляции азотсодержащих субстратов этими протистами до сих пор изучены недостаточно. Существует необходимость в исследованиях относительного вклада органических азотсодержащих соединений в питание динофлагеллят в различных условиях, например, в среде, где органические и неорганические субстраты, такие как мочевины, глицин и нитрат-ионы, присутствуют в высокой концентрации, что характерно для многих современных прибрежных экосистем. Отдельный и до конца не разрешенный вопрос – используют ли динофлагелляты растворенные органические вещества в качестве источников углерода наряду с неорганическими формами этого элемента. Существующие данные, полученные для различных групп протистов, достаточно противоречивы (Mulholland et al., 2002, 2003, 2004; Andersson et al., 2006), а в случае динофлагеллят с преимущественно фототрофным метаболизмом, таких как *P. minimum*, целенаправленных исследований, посвященных этому вопросу, не проводилось. Кроме того, на сегодняшний день изучение механизмов питания динофлагеллят затруднено тем, что ни одного генома свободноживущего вида до сих пор не было секвенировано и, следовательно, о генах и белках, обеспечивающих поглощение и ассимиляцию питательных субстратов этими протистами известно крайне мало. Анализ транскриптомов динофлагеллят

является наиболее эффективным подходом, позволяющим частично заполнить пробелы в этой области. Примечательно, что большая часть данных о питании динофлагеллят и других фотосинтезирующих протистов, доступных в настоящее время, получена с помощью измерений на уровне популяций. Однако современные исследования variability фенотипических параметров внутри клеточных популяций животных и бактерий указывают на то, что информация, полученная на уровне отдельных клеток, может существенно изменить наше понимание процессов, протекающих в природных и лабораторных системах (Kreft et al., 2013).

Таким образом, исследования, посвященные конкурентному поглощению и ассимиляции органических и неорганических субстратов динофлагеллятами, должны быть продолжены и требуют применения всестороннего подхода, включающего в себя лабораторные эксперименты с монокультурами динофлагеллят, измерения, проводимые на популяционном уровне и уровне отдельных клеток, а также анализ доступных транскриптомных данных.

Цель и задачи исследования

Целью работы было исследование конкурентного поглощения и ассимиляции органических веществ (мочевины и глицина) и нитрат-ионов клетками миксотрофных динофлагеллят *P. minimum*.

Для достижения цели работы были поставлены следующие задачи:

1. Изучить конкурентный транспорт азота мочевины и нитрат-ионов, а также азота глицина и нитрат-ионов в клетки динофлагеллят *P. minimum* в условиях избыточного содержания азота в среде.
2. Оценить роль мочевины и глицина как источников углерода для биосинтетических процессов в клетках *P. minimum*.
3. Идентифицировать гомологи белков, вовлеченных в поглощение и начальные этапы метаболизма нитрат-ионов, мочевины и глицина, у динофлагеллят *P. minimum* с помощью анализа транскриптомных баз данных.

4. Исследовать поглощение питательных субстратов отдельными клетками динофлагеллят *P. minimum*.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Транспорт азота в составе мочевины и глицина в клетки динофлагеллят *P. minimum* эффективнее, чем конкурентный транспорт азота в составе нитрат-ионов.
2. Углерод мочевины и глицина ассимилируется клетками *P. minimum* в незначительной степени.
3. Динофлагелляты *P. minimum* обладают гомологами белков, отвечающих за транспорт и метаболизм нитрат-ионов, мочевины и глицина, у растений и животных.
4. Популяции динофлагеллят *P. minimum* гетерогенны в отношении поглощения питательных субстратов.

Научная новизна полученных результатов

С помощью мечения субстратов стабильными изотопами азота и углерода выявлены особенности конкурентного поглощения нитрат-ионов и мочевины, а также нитрат-ионов и глицина динофлагеллятами *P. minimum*. Впервые в экспериментах с культурами *P. minimum*, адаптированными к росту на нитрат-ионах в условиях избыточного содержания азота в среде, показано, что при поступлении в среду равного количества азота мочевины или глицина азот органических субстратов поглощается клетками со скоростью, превышающей скорость поглощения ионов нитрата в два раза. Впервые продемонстрировано супрессирующее действие мочевины на поглощение и ассимиляцию нитрат-ионов. Впервые определено соотношение азота и углерода, поступающих в клетки *P. minimum* из мочевины и глицина и произведена оценка роли этих органических

веществ как источников углерода для фотосинтезирующих динофлагеллят. С помощью анализа транскриптомных баз данных у динофлагеллят *P. minimum* впервые идентифицированы гомологи белков, вовлеченных в поглощение и ассимиляцию нитрат-анионов, мочевины и глицина у многоклеточных эукариот. Впервые с помощью масс-спектрометрии вторичных ионов в наномасштабе показана гетерогенность популяций динофлагеллят в отношении поглощения питательных субстратов во время роста в присутствии мочевины и нитрата.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные в результате работы данные о поглощении и ассимиляции питательных субстратов клетками *P. minimum* важны для понимания физиологии питания динофлагеллят и динамики их природных популяций. Выявление в транскриптомах *P. minimum* белков, вовлеченных в транспорт и ассимиляцию нитрат-анионов, мочевины и глицина, проливает свет на метаболизм этих протистов и делает возможным дальнейшее изучение физиологии динофлагеллят с помощью методов молекулярной и клеточной биологии. Данные о вариабельности клеток *P. minimum* из одной популяции в отношении поглощения и ассимиляции органических и неорганических субстратов имеют большое фундаментальное значение, поскольку лежат в основе формирующегося в настоящее время нового научного направления, связанного с изучением физиологической гетерогенности популяций протистов и ее биологической роли. Данные, полученные в ходе настоящей работы, представляют интерес для экосистемного моделирования, позволяя усовершенствовать существующие модели.

Работа имеет и практическую ценность. Ее результаты могут быть полезны при разработке методов предсказания и мониторинга цветений динофлагеллят в прибрежных водах, а также программы по предотвращению дальнейшего распространения таких цветений. Кроме того, материалы диссертации могут быть использованы при подготовке курсов лекций и семинаров, а также при

планировании экспериментальных исследований в области клеточной биологии, микробиологии и протистологии.

Личный вклад автора

Результаты, представленные в диссертации, получены лично автором. Материалы работы обсуждались и публиковались совместно с соавторами и научным руководителем.

Апробация работы

Основные научные результаты исследования были представлены и обсуждены на международных и российских конференциях, а именно: на Международной конференции «Актуальные проблемы планктонологии» (Светлогорск, 2012), 38-м Конгрессе Федерации Европейских Биохимических Обществ (Санкт-Петербург, 2013), Международном научном совещании «Фундаментальная наука для образования и менеджмента окружающей среды» (Росток, Германия, 2014), Международной конференции «Микроорганизмы в Балтийском море: маленькие существа, маленькое море, большие вопросы» (Гдыня, Польша, 2014), Всероссийском симпозиуме с международным участием «Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов» (Москва, 2014), 7-м Европейском Протистологическом Конгрессе (Севилья, Испания, 2015), Московском форуме «Протист-2016» (Москва, 2016), совместном семинаре Лаборатории цитологии одноклеточных организмов, Лаборатории морфологии клетки и Лаборатории структурной организации генома Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, 2016), 15-м Международном Протистологическом Конгрессе (Прага, Чехия, 2017), конференции с международным участием «Клеточная биология: проблемы и перспективы» (Санкт-Петербург, 2017), а также на семинарах Лаборатории цитологии одноклеточных организмов Института цитологии РАН.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 14 печатных работ, в том числе 6 статей в рецензируемых журналах и 8 тезисов.

Статьи в рецензируемых журналах:

1. **Матанцева О. В.** Миксотрофия у микроорганизмов: экологические и цитофизиологические аспекты / О. В. Матанцева, С.О. Скарлато // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2013. – Т. 49. – № 4. – С. 245–254.
2. Pozdnyakov, I. Obtaining spheroplasts of armored dinoflagellates and first single-channel recordings of their ion channels using patch-clamping / I. Pozdnyakov, **О. Matantseva**, Y. Negulyaev, S. Skarlato // Marine drugs. – 2014. – V. 12. – N. 9. – P. 4743–4755.
3. **Matantseva О.** Current state and perspectives of single-cell studies in ecophysiology of protists / O. Matantseva, S. Skarlato // Protistology. – 2015. – V. 9. – N. 3/4. – P. 127–132.
4. **Matantseva О.** Superposition of individual activities: urea-mediated suppression of nitrate uptake in the dinoflagellate *Prorocentrum minimum* revealed at the population and single-cell levels / O. Matantseva, S. Skarlato, A. Vogts, I. Pozdnyakov, I. Liskow, H. Schubert, M. Voss // Frontiers in Microbiology. – 2016. – V. 7 – Article 1310.
5. Бердиева М. А. Влияние механического стресса на ультраструктуру клеточных покровов динофлагеллят *Prorocentrum minimum* / М. А. Бердиева, С. О. Скарлато, **О. В. Матанцева**, И. А. Поздняков // Цитология. – 2016. – Т. 58. – №10. – С. 792–798.
6. Pechkovskaya S. A. Molecular tools for invasion biology: a new approach for amplification of dinoflagellate nitrogen transport genes with unknown exon-intron structure / S. A. Pechkovskaya, **О. V. Matantseva**, N. A. Filatova, S. O. Skarlato, I. V. Telesh // Protistology. – V. 11. – N. 3. – P. 135–142.

Тезисы докладов:

1. **Матанцева, О. В.** Методы исследования единичных клеток в экологии морских микроорганизмов / О. В. Матанцева // Актуальные проблемы планктонологии : тез. докл. междунар. конф. – Калининград : АтлантНИРО, 2012. – С. 97.
2. **Matantseva, O.** Exploring the molecular properties of marine mixotrophic protists by a multidimensional scaling / O. Matantseva // 38th FEBS Congress : abstracts. – The FEBS Journal, 2013. – V. 280. – P. 508.
3. **Matantseva, O.** Role of urea in nutrition of dinoflagellates: is it merely a supplementary N source? / O. Matantseva, S. Skarlato, M. Voss // Microbes in the Baltic: Small things, small sea, big questions : abstracts of international workshop. – Gdynia, Poland, 2014 – P. 19.
4. **Матанцева, О. В.** Роль мочевины как источника азота и углерода для динофлагеллят / О. В. Матанцева // Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов : материалы Всероссийского симпозиума с международным участием. – М. : ООО «МАКС Пресс», 2014 . – С. 154.
5. **Matantseva O.** Urea vs. nitrate: concurrent uptake of nutrients by dinoflagellates *Prorocentrum minimum* at a population and single-cell level / O. Matantseva, A. Vogts, N. Filatova et al. // VII European Congress of Protistology : abstracts. – Seville, Spain, 2015. – P. 160.
6. **Matantseva, O.** Heterogeneity in nutrient uptake by individual dinoflagellate cells revealed using NanoSIMS / O. Matantseva, A. Vogts, M. Voss et al. // Moscow Forum «Protist-2016» : abstracts. – Protistology, 2016. – V. 10. – N. 2. – P. 44–45.
7. **Matantseva O.** The use of urea and glycine as C and N substrates by dinoflagellates / O. Matantseva, I. Pozdnyakov, M. Voss et al. // 15th International Congress of Protistology : abstracts. – Prague, Czech Republic, 2017. – P. 342.
8. **Матанцева О.** Роль мочевины и глицина как источников азота и углерода для динофлагеллят / О. Матанцева // Клеточная биология: проблемы и перспективы: тез. докл. конф. с международным участием. – СПб, 2017. – С. 92–93.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Характеристика группы *Dinoflagellata*

1.1.1 Филогенетическое положение и особенности клеточной организации динофлагеллят

Динофлагелляты (*Dinoflagellata*) – это одноклеточные эукариоты, широко распространенные по всему миру и обладающие значительным разнообразием типов клеточной организации и физиологии (Околотков, 2011). Вместе с инфузориями (*Ciliata*) и споровиками (*Apicomplexa*) они образуют монофилетическую группу *Alveolata*, выделяемую на основании ультраструктурных и молекулярно-генетических данных (Cavalier-Smith, 1993; Fast et al., 2002). В соответствии с современными представлениями, все альвеолы входят в состав так называемой супергруппы SAR (*Stramenopiles*, *Alveolates*, *Rhizaria*), к которой также относятся страменопилы и ризарии (Adl et al., 2012) (рисунок 1). Важно подчеркнуть, что таким образом динофлагелляты представляют собой отдельную крупную группу эукариот, не родственную ни многоклеточным животным (*Metazoa*), ни высшим растениям, относящимся к группе *Archaeplastida*.

Динофлагелляты представлены одноклеточными организмами разнообразной формы, обладающими подвижностью за счет функционирования двух неравнозначных жгутиков. В общих чертах их клетки характеризуются типичной для эукариотов организацией (рисунок 2), но имеют ряд уникальных особенностей. Прежде всего, это особый тип ядра (динокарион), содержащего постоянно конденсированные хромосомы и сохраняющего ядерную оболочку во время деления (Raikov, 1995). Кроме того, динофлагелляты обладают геномами огромных размеров, нередко превышающими размер генома человека в десятки раз. Так, в одной клетке динофлагеллят различных видов содержится 3–250 пг ДНК, что соответствует 3000–215000 млн. п. н. Для сравнения, гаплоидный набор хромосом человека содержит приблизительно 3180 млн. п. н. (Hackett et al., 2004).

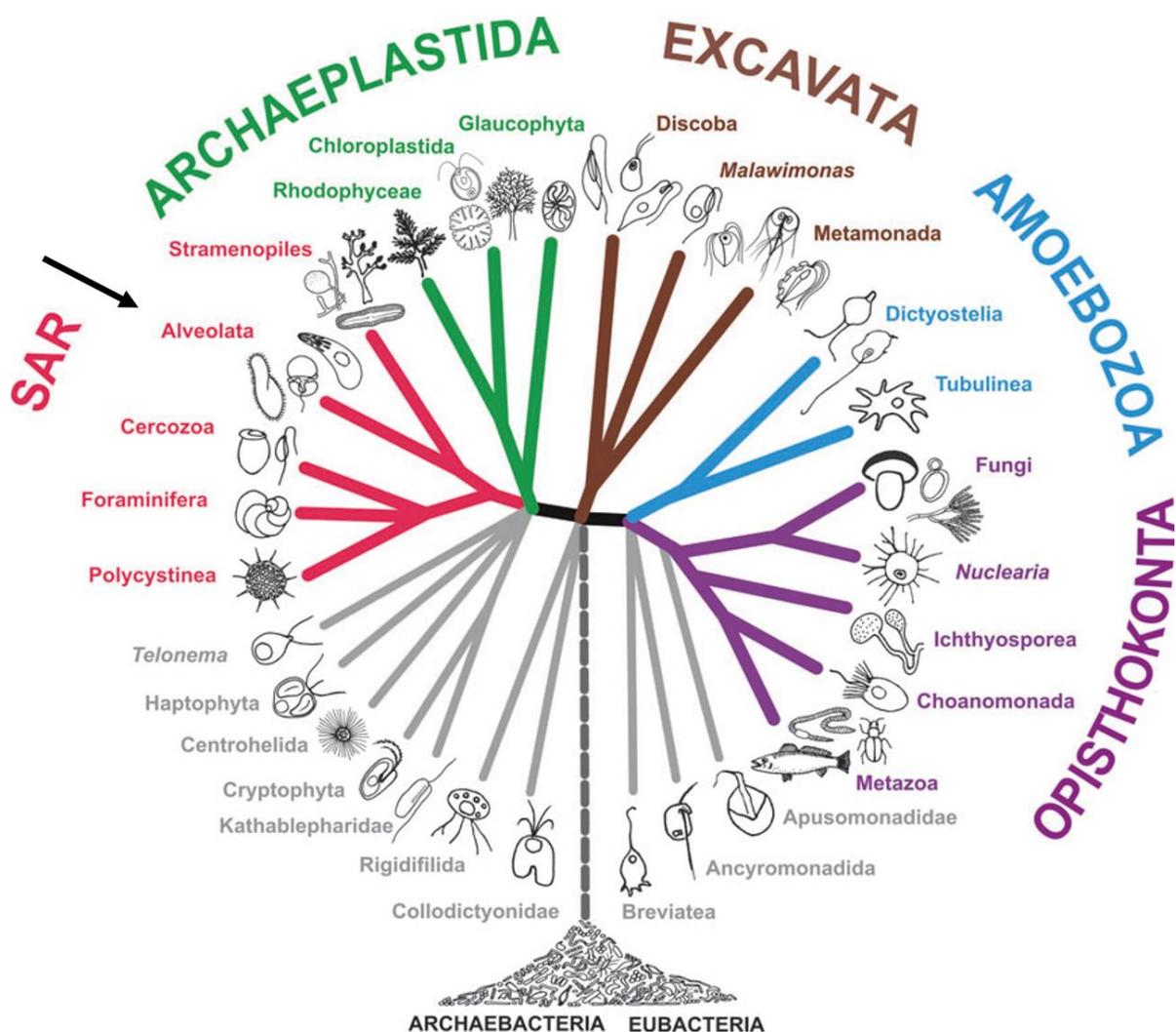


Рисунок 1. Современные представления о филогении эукариот. Стрелкой показана группа Alveolata, к которой относятся динофлагелляты. Из Adl et al., 2012, с изменениями.

Примерно половина современных видов динофлагеллят имеют собственные пластиды, эволюционное происхождение которых объясняется вторичным или третичным симбиозом с другими эукариотическими пластидосодержащими микроорганизмами (Archibald, 2009). Для всех видов характерно наличие особой мембранной органеллы – пузулы (Dodge, 1972; Klut et al., 1987; Schnepf, Elbrächter, 1992), предположительно участвующей в процессах осморегуляции и питания клетки, а также крупных, часто разветвленных, митохондрий с тубулярными кристами (Околотков, 2011). В качестве запасных питательных веществ

динофлагеллятами используются крахмал и липиды, которые свободно лежат в цитоплазме (Dodge, Greuet, 1987; Hacket et al., 2004).

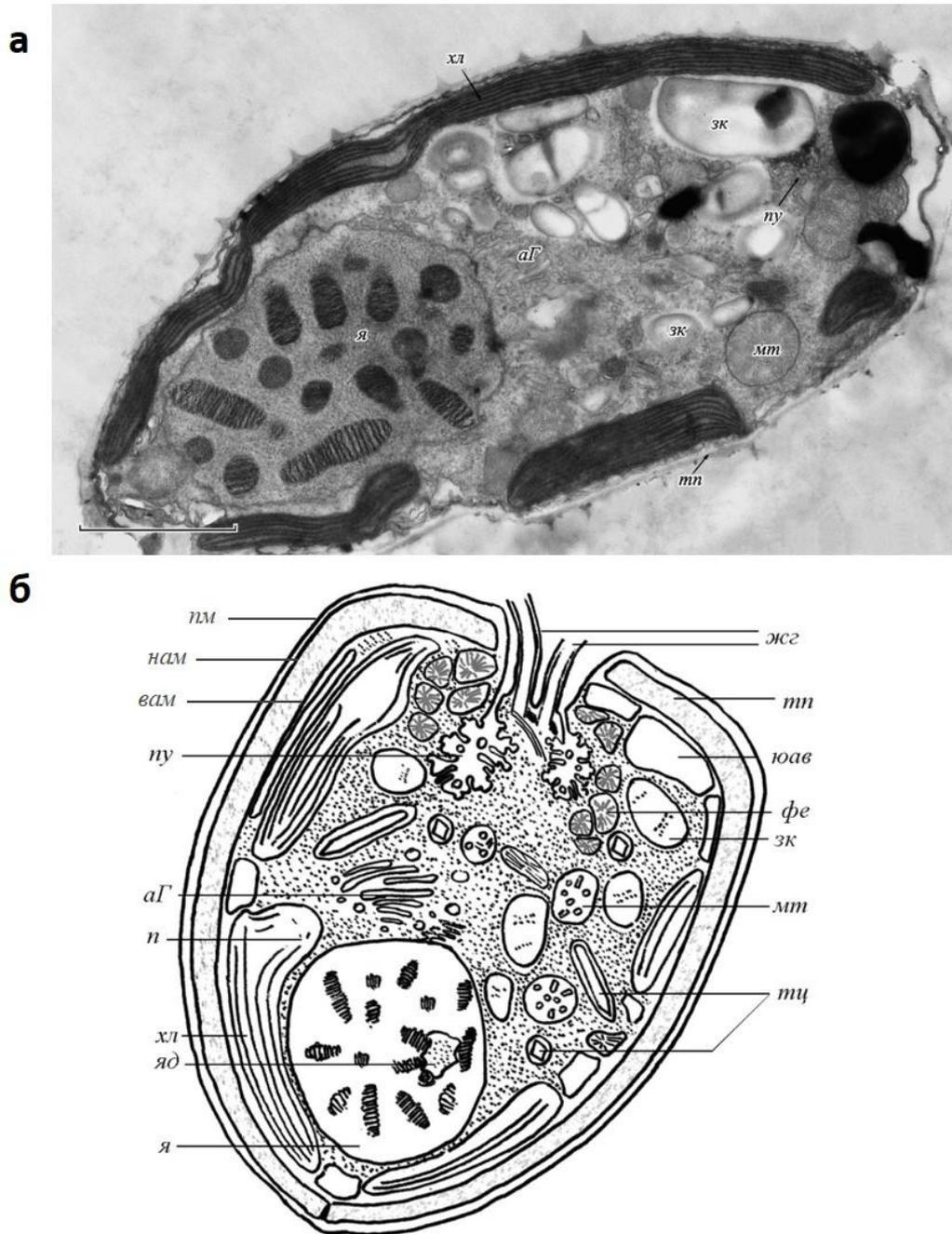


Рисунок 2. Организация клетки армированных динофлагеллят *Prorocentrum minimum*: (а) электронная микрофотография (б) схематический рисунок. Из: Бердиева, Скарлато, Матанцева и др., 2016, с изменениями. *аГ* – аппарат Гольджи, *вам* – внутренняя амфиесмальная мембрана, *жсг* – жгутики, *зк* – зерна крахмала, *мт* – митохондрии, *нам* – наружная амфиесмальная мембрана, *п* – пиреноид, *пм* –

плазматическая мембрана, *пу* – пузула, *тп* – текальные пластины, *тц* – трихоцисты, *фе* – вакуоли с фиброзным содержимым, *хл* – хлоропласты, *юав* – ювенильные амфиесмальные везикулы, *я* – ядро, *яд* – ядрышко. Масштабная линейка – 2 мкм.

Одной из важнейших черт клеточной организации динофлагеллят, на основании которой их впервые сблизили с другими представителями альвеолят, является устройство их клеточных покровов, называемых амфиесмой. Амфиесма состоит из плазматической мембраны и расположенных под ней системы везикул (альвеол, или амфиесмальных пузырьков) и слоя цитоскелетных элементов. У армированных динофлагеллят амфиесмальные пузырьки могут дополнительно содержать пелликулярный слой и/или текальные пластины из целлюлозоподобного вещества (Dodge, Crawford, 1970; Morrill, Loeblich, 1983; Pozdnyakov, Skarlato, 2012). Клеточные покровы динофлагеллят подвержены реорганизации в ходе так называемого экдизиса – процесса сбрасывания наружных слоев амфиесмы и формирования новой плазматической мембраны и новых амфиесмальных везикул под ней (Pozdnyakov, Skarlato, 2012). Экдизис может быть индуцирован различными факторами, например, действием 2,3-дихлорбензонитрила или механическим стрессом (Бердиева, Скарлато, Матанцева и др., 2016; Pozdnyakov, Matantseva et al., 2014).

1.1.2 Физиология питания динофлагеллят

Известно, что примерно половина видов динофлагеллят обладает собственными содержащими пигменты пластидами и способна к фотосинтезу (Околотков, 2011; Hackett et al., 2004). В соответствии с классическими представлениями, источниками углерода и азота для фотосинтезирующих организмов являются неорганические соединения, такие как углекислый газ (гидрокарбонат-ионы), ионы нитрата и аммония, которые в процессе метаболических преобразований трансформируются в углеводы, белки и липиды (Ketchum, 1954; Turpin, 1991). Однако с накоплением данных о физиологии многих

фотосинтезирующих протистов стало очевидно, что круг используемых ими питательных субстратов гораздо шире и также включает в себя органические источники биогенных элементов. Такие протисты являются миксотрофами, то есть организмами, метаболизм которых сочетает в себе черты авто- и гетеротрофии (Матанцева, Скарлато, 2013; Sanders, 1991; Stoecker et al., 2017). Гетеротрофная ветвь миксотрофного питания может быть представлена так называемой осмотрофией – поглощением растворенных органических веществ непосредственно из внешней среды, и фаготрофией – фагоцитированием других микроорганизмов или частиц органического вещества (Glibert, Legrand, 2006). Фаготрофия характерна, главным образом, для обладающих собственными пластидами фотосинтезирующих протистов из групп Dinoflagellata, Cryptophyta, Haptophyta, Chrysophyta (Raven, 1997; Stoecker, 1999), тогда как осмотрофия распространена гораздо шире и встречается в том числе у организмов, не способных к фагоцитированию, например, у многих зеленых и диатомовых водорослей. По этой причине некоторыми авторами была высказана мысль о том, что осмотрофия не является признаком, на основании которого тот или иной фотосинтезирующий организм может быть отнесен к миксотрофам (Flynn et al., 2013; Mitra et al., 2014). Тем не менее, в данной работе, посвященной осмотрофному поглощению и ассимиляции растворенных органических веществ динофлагеллятами, это явление рассматривается как часть миксотрофного питания в соответствии с традиционными представлениями (Burkholder et al., 2008).

На сегодняшний день больше всего миксотрофных видов встречается среди представителей динофлагеллят. Степень выраженности гетеротрофной составляющей их метаболизма может быть различной: некоторые виды способны питаться гетеротрофно независимо от фотосинтетической активности, тогда как другие используют органические субстраты лишь в качестве дополнительных ресурсов, поддерживающих фототрофный метаболизм (Матанцева, Скарлато, 2013; Stoecker, 1999; Burkholder et al., 2008).

Многие виды динофлагеллят способны к фаготрофии, причем круг их пищевых объектов чрезвычайно велик и включает в себя как бактерий, так и

протистов, таких как криптофитовые, гаптофитовые, золотистые и диатомовые водоросли, инфузории, а также другие виды динофлагеллят (Lewitus et al., 1999; Stoecker, 1999; Jeong et al., 2005a,c; Yoo et al., 2009b; Hansen, 2011). При этом фаготрофия может осуществляться как посредством фагоцитоза, так и с помощью специальных клеточных образований – педункулюма или паллиума (Jacobson, Anderson, 1986; Schnepf, Elbrächter, 1992; Hansen, Calado, 1999; Jeong et al., 2005b; Yoo et al., 2009a).

Осммотрофия также широко распространена среди динофлагеллят (Glibert, Legrand, 2006). Многочисленные исследования показали, что они способны ассимилировать различные растворенные органические вещества (Bronk et al., 2007; Burkholder et al., 2008). Наиболее изученными органическими субстратами, которые ассимилируются самыми разными видами динофлагеллят, являются мочевины и аминокислоты (Белевич и др., 2009; John, Flynn, 1999; Fan and Glibert, 2003a,b, 2005; Killberg-Thoreson et al., 2014; Jauzein et al., 2017). Кроме того, существуют свидетельства того, что рост динофлагеллят *Alexandrium tamarense* стимулируют гуминовые вещества, попадающие в воду с суши (Gagnon et al., 2005).

Несмотря на то что питание динофлагеллят вызывает повышенный интерес со стороны научного сообщества, прежде всего, благодаря его экологическому значению, сведения о нем на сегодняшний день отрывочны и чаще всего представляют собой описание способности тех или иных видов к ассимиляции различных соединений без объяснения регуляции таких процессов и их молекулярных основ. Последнее обстоятельство связано с отсутствием информации о генах и белках, участвующих в транспорте и метаболизме питательных субстратов в клетках динофлагеллят: большие размеры геномов затрудняют их полное секвенирование. На сегодняшний день секвенирован лишь небольшой геном симбиотических динофлагеллят *Symbiodinium* spp. (LaJeunesse et al., 2005; Shoguchi et al., 2013), но он до сих пор недостаточно хорошо аннотирован, и, вероятно, значительно редуцирован по сравнению с геномами свободноживущих видов. Появление транскриптомных данных может помочь решить эту проблему, однако пока эта информация не была широко использована (Matantseva, 2013).

Современные представления об азотном метаболизме миксотрофных динофлагеллят отражены на рисунке 3. Эти представления основаны на проведении параллелей между динофлагеллятами и растениями, однако конкретные данные о транспортерах азотсодержащих веществ и ферментах, участвующих в их ассимиляции, у динофлагеллят до сих пор практически отсутствуют. Лишь недавно анализ транскриптомных баз данных показал наличие транспортеров семейств NRT1 и NRT2, опосредующих транспорт нитрата, у динофлагеллят *Lingulodinium polyedrum* (Dagenais-Bellefeuille, Morse, 2016).

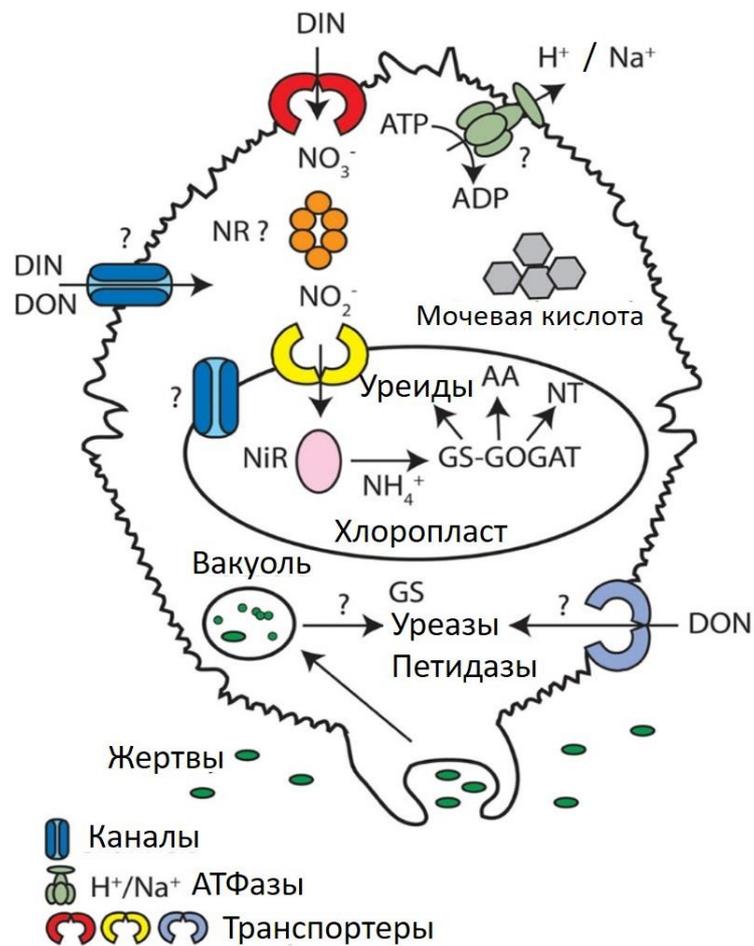


Рисунок 3. Азотный метаболизм у динофлагеллят. DIN – растворенный неорганический азот (ионы нитрата, нитрита, аммония), DON – растворенный органический азот, NR – нитрат-редуктаза, NiR – нитрит-редуктаза, GS – глутамин-синтетаза, GS-GOGAT – глутамин-2-оксоглутарат амидотрансфераза, AA –

аминокислоты, NT – нуклеотиды, АТФ - АТФ. Из: Dagenais-Bellefeuille, Morse, 2013, с изменениями.

1.1.3 Экологическое значение фотосинтезирующих динофлагеллят

Динофлагелляты представляют собой один из ключевых компонентов современных морских экосистем. Как было отмечено выше, многие виды этих протистов осуществляют фотосинтез и являются важнейшими первичными продуцентами. Способность большинства фотосинтезирующих динофлагеллят к миксотрофному питанию определяет их двойственную роль в биогеохимических циклах: с одной стороны, они фиксируют неорганический углерод, выводя его из окружающей среды, с другой – минерализуют органические вещества в процессе гетеротрофного питания и дыхания (Матанцева, Скарлато, 2013). Баланс авто- и гетеротрофии чрезвычайно важен с точки зрения глобального цикла углерода, постоянства концентрации кислорода и углекислого газа в атмосфере и, следовательно, климата планеты (Duarte, Prairie, 2005; Wilken et al., 2013). Таким образом, исследование физиологии миксотрофных динофлагеллят имеет огромное значение, особенно в свете воздействия человечества на естественные экосистемы.

Антропогенная эвтрофикация – это загрязнение прибрежных вод биогенными элементами в результате деятельности человека. Рост населения, развитие сельского хозяйства и промышленности влекут за собой увеличение объема сточных вод и стоков с возделываемых земель, содержащих биогенные элементы в высоких концентрациях (Glibert et al., 2005). За последние несколько десятилетий в результате активного использования синтетических удобрений экспорт органических азотсодержащих соединений в прибрежные зоны возрос в несколько раз (Galloway et al., 2004; Glibert et al., 2005). Антропогенное загрязнение влечет за собой как повышение общей концентрации доступного для ассимиляции азота в прибрежных водах, так и увеличение разнообразия его форм. Подобные перестройки ведут к изменению качественного (видового) и количественного состава сообществ, когда одни группы организмов начинают вытеснять другие.

Так, было отмечено, что в последние десятилетия доминирующей группой эукариотических фитопланктонных микроорганизмов в прибрежных экосистемах часто становятся динофлагелляты (Glibert et al., 2004; Neil et al., 2007). По-видимому, в условиях повышенной концентрации растворенных органических веществ они получают конкурентное преимущество, благодаря особенностям их физиологии, а именно способности использовать разнообразные азотсодержащие соединения в качестве источников этого важнейшего биогенного элемента.

Именно с эвтрофикацией прибрежных систем связывают все учащающиеся вспышки пролиферации динофлагеллят, называемые цветениями, или «красными приливами» (Anderson et al., 2002; Heisler et al., 2008; Glibert, 2017). В настоящее время цветения динофлагеллят наносят многомиллионный ущерб по всему миру. Помимо ухудшения качества воды и негативного влияния на морских животных, цветения представляют серьезную опасность для здоровья человека, поскольку многие виды динофлагеллят синтезируют сильнодействующие токсины, например, сакситоксин и бrevetоксин. Накапливаясь в моллюсках и рыбе, употребляемых в пищу, эти токсины вызывают тяжелые отравления людей, в том числе, с летальным исходом (Cembella, 2003; Wang, 2008).

1.1.4 Модельный вид – *Prorocentrum minimum* (Pavillard) Schiller 1933

Prorocentrum minimum (в настоящее время *Prorocentrum cordatum* (Ostenfeld) Dodge 1965; синонимы: *P. triangulatum*, *Exuviella minima*, *E. marie-lebourae*, *P. cordiforme*, *P. marie-lebourae*) – эвригалинный и эвритермный вид армированных динофлагеллят (Grzebyk, Verland, 1997), широко распространенный в морских экосистемах умеренных и тропических широт (Pertola et al., 2003; Neil et al., 2005) (рисунок 4).

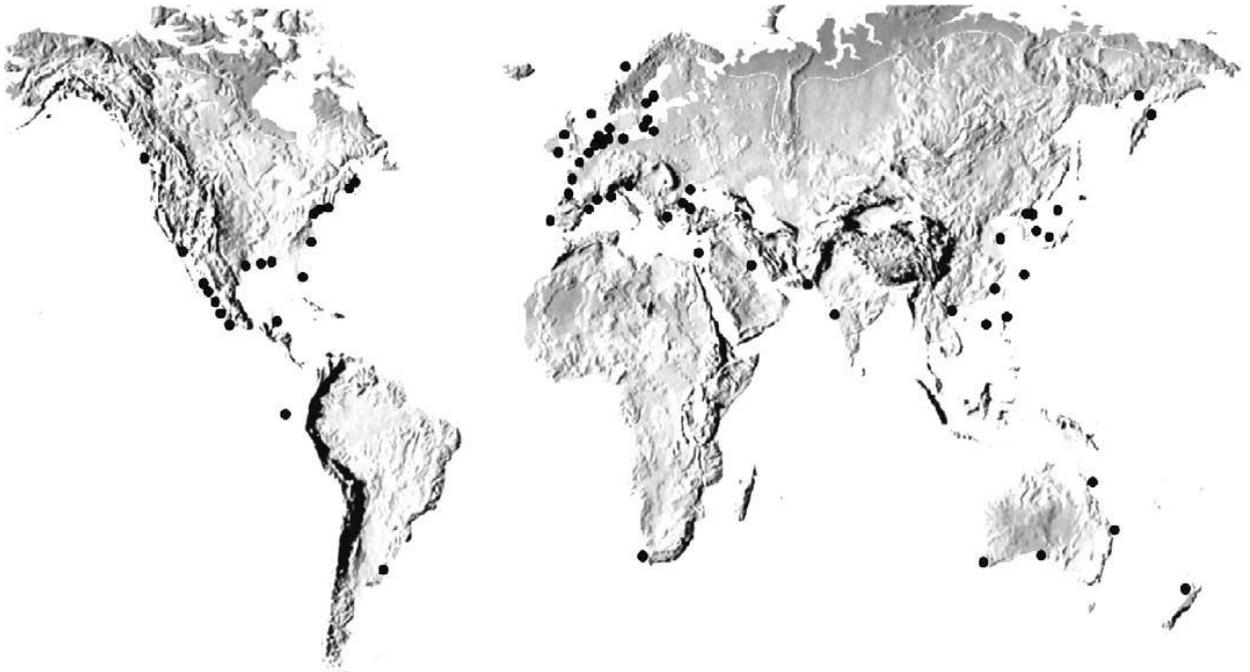


Рисунок 4. Распространение вида *P. minimum* в водах Мирового океана. Точками отмечены места, где было зарегистрировано присутствие *P. minimum* в естественных прибрежных сообществах по данным на 2005 год. Из: Neil et al., 2005.

Размер клеток *P. minimum* составляет 14–20 мкм в длину и 12–17 мкм в ширину. Клетки могут быть круглыми, овальными или треугольными с большим разнообразием промежуточных форм (рисунок 5) (Hajdu et al., 2005; Pertola et al., 2005).

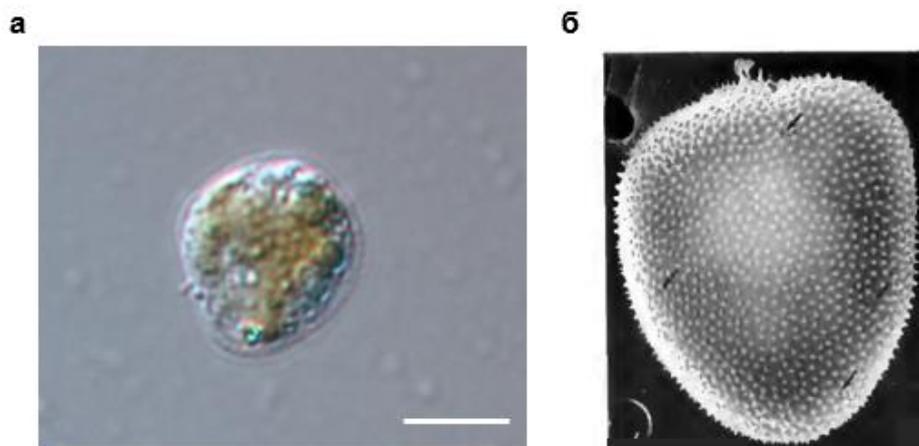


Рисунок 5. Микрофотографии *Prorocentrum minimum*, полученные с помощью световой (а) и электронной микроскопии (б, из: Faust, Gualledge, 2002, с изменениями). Масштабная линейка – 10 мкм.

Динофлагелляты вида *P. minimum* являются миксотрофами: с одной стороны, они обладают собственными пластидами и осуществляют фотосинтез, с другой – способны к поглощению и ассимиляции растворенных органических веществ и фагоцитозу (Stoecker, 1997; Glibert et al., 2008; Johnson, 2015). С миксотрофными возможностями *P. minimum* связывают участвовавшие случаи цветений этих протистов, а также их распространение в новые местообитания, наблюдаемое в последние десятилетия (Heil et al., 2005). В начале 80-х гг. *P. minimum* появился в Балтийском море и с тех пор заселил почти все его регионы и начал формировать цветения (Hajdu et al., 2005; Olenina et al., 2010, 2016). На сегодняшний день это единственный вид фитопланктонных организмов, отвечающий критериям настоящих видов-вселенцев, в Балтийском море (Telesh et al., 2016).

P. minimum считается потенциально токсичным видом динофлагеллят, поскольку в разное время были зарегистрированы случаи отравлений людей, употреблявших в пищу рыбу и другие морепродукты из вод, подверженных его цветениям (Heil et al., 2005). В экспериментах с аксеничными клонами данного вида было показано, что *P. minimum* действительно синтезирует растворимые нейротоксины, химическая природа которых не установлена (Grzebyk et al., 1997; Denardou-Queneherve et al., 1999). Несмотря на это, связь между отравлением моллюсками или рыбой и продуцированием токсинов *P. minimum* до сих пор обсуждается, поскольку зачастую одновременно с цветением этого вида динофлагеллят наблюдается цветение и других токсин-продуцирующих видов, а также ассоциированных с ними бактерий. Недавние исследования показали, что некоторые клоны *P. minimum* продуцируют аналоги одного из самых сильнодействующих из известных нейротоксинов – тетродотоксина. Вероятно, синтез тетродотоксин-подобных веществ осуществляется симбиотическими бактериями динофлагеллят, относящимися к родам *Roseobacter* и *Vibrio* (Rodríguez et al., 2017).

1.2 Растворенные органические вещества как источники азота и углерода

1.2.1 Растворенные органические вещества в морских экосистемах

Растворенные органические вещества – это наиболее значительный пул восстановленного углерода в Мировом океане, представляющий собой смесь низкомолекулярных органических соединений и макромолекул, таких как белки и полисахариды. Растворенные органические вещества морских экосистем формируются в результате метаболической активности водных организмов и птиц, а также привносятся в прибрежные регионы с речным стоком (Hedges et al., 1997; Opsahl, Benner, 1997; Hansell et al., 2009). В настоящее время, хозяйственная деятельность человека также является значительным источником привнесенных растворенных органических веществ. Общая концентрация растворенных органических веществ составляет 40–100 мкмоль л⁻¹ в различных частях Мирового океана (Ogawa, Tanoue, 2003), при этом большая их часть до сих пор не охарактеризована, несмотря на значительные успехи в этой области, связанные с применением таких аналитических методов, как резонансная масс-спектрометрия с Фурье преобразованием и спектроскопия ядерного магнитного резонанса (Nebbioso, Piccolo, 2013). Считается, что биологически доступные соединения, которые могут быть метаболизированы различными микроорганизмами, составляют менее половины всех растворенных органических веществ и присутствуют, главным образом, в фотическом слое океана.

Азот лимитирует рост фотосинтезирующих протистов в морских экосистемах, поскольку большая его часть находится в форме N₂, недоступной для подавляющего числа живых организмов (Vitousek, Howarth, 1991; Falkowski, 1997; Voss et al., 2013). Таким образом, азотсодержащие органические вещества представляют собой ценный источник этого элемента для протистов, способных ассимилировать их (Bronk et al., 2007; Glibert, 2017). Значительную часть охарактеризованных азотсодержащих органических веществ составляют мочевины и аминокислоты. При этом доминирующей аминокислотой в морской среде,

зачастую представленной в самой высокой концентрации, является глицин (Mopper, Lindroth, 1982; Coffin, 1989; Hubberten et al., 1994; Keil, Kirchman, 1999; Dittmar et al., 2001; Ogawa and Tanoue, 2003; Zhang et al., 2015).

В последние десятилетия промышленное производство мочевины и глицина существенно возросло, поскольку эти соединения используются в фармацевтической и косметической промышленности, а также в сельском хозяйстве. Особенно велико производство мочевины, так как в современном мире более 50% азотсодержащих удобрений представлено в форме этого соединения (Glibert et al., 2006). В результате привнесения антропогенных глицина и мочевины в морскую среду со стоками с суши, особенно после ливневых дождей и штормов, в прибрежных экосистемах спорадически наблюдается значительное повышение концентрации этих веществ (Lomas et al., 2002; Switzer, 2008). Предположительно такие события могут предшествовать крупным цветениям динофлагеллят (Glibert et al., 2001; Anderson et al., 2002; Heisler et al., 2008; Glibert et al., 2005). Тем не менее, лабораторных исследований ответа динофлагеллят на внезапное появление нового источника азота опубликовано не было.

1.2.2 Мочевина и глицин как питательные субстраты для динофлагеллят

Лабораторные и полевые исследования показали, что мочевина используется многими динофлагеллятами в качестве питательного субстрата, причем часто измеренная скорость поглощения мочевины превышает скорость поглощения неорганических источников азота этими же видами динофлагеллят (Kudela, Cochlan, 2000; Fan et al., 2003b; Collos et al., 2004; Sinclair et al., 2009; Solomon et al., 2010). Так, скорость поглощения мочевины динофлагеллятами *Lingulodinium polyedrum* во время их цветения у западного побережья США превышала скорость поглощения ионов нитрата почти в 3 раза и скорость поглощения ионов аммония почти в 2 раза (Kudela, Cochlan, 2000). Коллос с соавторами (Collos et al., 2004) показали, что лабораторные клоны динофлагеллят *Alexandrium catenella* поглощали мочевины со скоростью, превышающей скорость поглощения нитрата.

То же было показано для культур динофлагеллят *Karenia brevis* (Sinclair et al., 2009), *P. minimum* (Fan et al., 2003b) и *P. donghaiense* (Li et al., 2009). Однако в экспериментах с эпифитными бентосными динофлагеллятами *Ostreopsis cf. ovata* мочевины оказалась наименее предпочтительным источником по сравнению с ионами аммония и нитрата (Jauzein et al., 2017). Во всех упомянутых работах скорость поглощения различных субстратов была исследована независимо, то есть в среде во время измерения присутствовал лишь один источник азота. В свою очередь, конкурентное поглощение мочевины и неорганических ионов, то есть поглощение в условиях, когда различные источники азота доступны одновременно, было изучено в меньшей степени. Показано, что скорость поглощения мочевины природными популяциями *P. minimum* во время цветений этого вида была, как правило, меньше скорости конкурентного поглощения ионов нитрата. По-видимому, это связано с тем, что во время исследованных цветений концентрация мочевины в среде была в несколько раз меньше концентрации ионов нитрата (Fan et al., 2003b). Важно отметить, что конкурентный транспорт нитрат-ионов и мочевины в клетки динофлагеллят в условиях, когда эти соединения присутствуют в среде в близких высоких концентрациях, до сих пор не изучен. Кроме того, неизвестно, оказывает ли внезапное появление органического субстрата в среде эффект на конкурентный транспорт ионов нитрата.

Известно, что динофлагелляты способны использовать аминокислоты в качестве источников азота (John, Flynn, 1999; Fan et al., 2003b), однако в большей части исследований применялись смеси аминокислот, а не отдельные аминокислоты. Так, Фэн с соавторами (Fan et al., 200b) измеряли скорость поглощения аминокислот клетками *P. minimum* из естественных популяций во время цветений этого вида, но в качестве меченого субстрата они использовали смесь из 16 различных аминокислот, в которой доля глицина составляла лишь 6.2%. Поглощение глицина клетками динофлагеллят из природных популяций было показано для видов *Karenia mikimotoi* и *P. donghaiense*: эксперименты продемонстрировали, что транспорт глицина в клетки *K. mikimotoi* происходил с большей скоростью, чем в клетки *P. donghaiense*, а скорость этого процесса была

ниже, чем скорость транспорта мочевины, но превышала скорость транспорта ионов нитрата. При этом, скорости транспорта мочевины и глицина были примерно одинаковы у *P. donghaiense* (Li et al., 2009). В другом исследовании цветений этих же видов Ли с соавторами (Li et al., 2010) показали, что глицин был менее предпочтительным источником азота по сравнению с мочевиной для *K. mikimotoi* и более предпочтительным – для *P. donghaiense*.

Поглощение и ассимиляция углерода мочевины и глицина динофлагеллятами практически не изучены. В работе Фэн с соавторами (Fan et al., 2003b) есть упоминание о том, что углерод мочевины составлял менее 1% от всего углерода, ассимилируемого *P. minimum* во время цветения, однако подробные данные об этом процессе не приводятся. Информация о поглощении динофлагеллятами углерода глицина отсутствует.

Некоторая противоречивость имеющихся данных о роли мочевины и глицина в питании динофлагеллят связана с тем, что эти вопросы изучались, главным образом, в полевых исследованиях цветений отдельных видов, предполагающих высокую вариабельность условий среды, а также смешанное микробное сообщество, или же в значительно упрощенных экспериментах с культурами микроорганизмов, в которых транспорт различных субстратов оценивался независимо. Известно, что параметры поглощения питательных субстратов клетками фотосинтезирующих протистов в значительной степени зависят от множества факторов, таких как концентрация субстрата, скорость роста клеток, фаза жизненного цикла и т.д. (Goldman, Glibert, 1982). При этом не проводилось исследований, посвященных изучению поглощения азотсодержащих соединений в условиях избытка азота в среде, когда концентрация каждого из азотсодержащих субстратов обеспечивает максимальную скорость поглощения данного субстрата клетками. В свете повсеместной эвтрофикации прибрежных регионов морей актуальность подобных работ не вызывает сомнений. Таким образом, существует необходимость в проведении стандартизированных лабораторных экспериментов с целью изучения конкурентного транспорта азота и углерода мочевины и нитрат-ионов, глицина и нитрат-ионов в клетки динофлагеллят, а также исследования

влияния органических субстратов на поглощение ионов нитрата в условиях избыточного содержания азота в среде.

1.3 Транспорт и ассимиляция нитрат-ионов, мочевины и глицина

На сегодняшний день о белках, участвующих в трансмембранном транспорте и ассимиляции нитрат-ионов, мочевины и глицина у динофлагеллят известно мало. В то же время, молекулярные основы этих процессов довольно хорошо изучены на примере нескольких групп эукариотов: растений, зеленых водорослей, животных и грибов.

Поглощение ионов нитрата клетками растений и родственных им зеленых водорослей осуществляется посредством систем низко- и высокоаффинного транспорта, включающих в себя белки из семейств NRT1 и NRT2 (Forde, 2000; Orsel et al., 2002). Белки обоих семейств имеют 12 трансмембранных сегментов и функционируют как ко-транспортеры нитрат-ионов и протонов (Galván, Fernández, 2001). Помимо растений и зеленых водорослей, гены, кодирующие высокоаффинные транспортеры NRT2, были обнаружены у морских планктонных протистов из групп Haptophyta и Bacillariophyta (Song, Ward, 2007). У динофлагеллят последовательности, кодирующие белки NRT1.1 и NRT2.1, были идентифицированы в транскриптоме вида *L. polyedrum* (Bellefeuille, Morse, 2016). Помимо специфичных транспортеров, трансмембранный транспорт нитрата у растений могут осуществлять каналы семейства CLC (chloride channel family), локализующиеся в мембране тонопласта, а также каналы SLAC/SLAH (slow anion channel-associated homologues) (Krapp et al., 2001). Каналы CLC есть у большинства известных организмов и, как правило, являются антипортерами протонов H^+ и ионов хлора Cl^- (Jentsch, 2008; Lisal, Maduke, 2009), но у растений многие гомологи этих каналов функционируют как антипортеры протонов и ионов нитрата (De Angeli et al., 2006). Каналы SLAC/SLAH – это медленные анионные каналы, экспрессирующиеся в замыкающих клетках устьиц у растений и демонстрирующие селективность к нитрат-ионам (Geiger et al., 2011).

В настоящее время известно несколько типов белков, опосредующих трансмембранный транспорт мочевины у различных организмов. У растений пассивный транспорт мочевины осуществляется через белки-аквапорины суперсемейства MIP (major intrinsic proteins), а активный транспорт – через специфичные высокоаффинные транспортеры мочевины DUR3 (Kaldenhoff, Fischer, 2006; Kojima et al., 2006; Wang et al., 2008; Witte, 2011; Li et al., 2014), которые также были обнаружены у грибов (Navarhna et al., 2011). Суперсемейство растительных аквапоринов MIP включает в себя следующие подсемейства: TIP (tonoplast intrinsic proteins), PIP (plasma membrane intrinsic proteins), NIP (Nodulin26-like intrinsic proteins) и SIP (small basic intrinsic proteins). Экспериментально показано, что транспорт мочевины может осуществляться через некоторые из белков TIP (Gerbeau et al., 1999; Liu et al., 2003b) и PIP (Eckert et al., 1999; Siefritz et al., 2001) у *Arabidopsis thaliana* и *Nicotiana tabacum* и через аквапорин Nip1 у тыквы *Cucurbita pepo* (Klebl et al., 2003). Все аквапорины суперсемейства MIP имеют 6 трансмембранных сегментов и функционируют в мембранах как тетрамеры (Witte, 2011). Высокоаффинные транспортеры мочевины DUR3 и их гомологи обнаружены у растений, зеленых и красных водорослей, а также у грибов. Считается, что они функционируют как ко-транспортеры с протонами (Witte, 2011). Белок DUR3 имеет 14 предсказанных трансмембранных сегментов у *A. thaliana* и 15 – у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (Turk, Wright, 1997; Liu et al., 2003a)

У бактерий в активном транспорте мочевины участвуют ABC-транспортеры, а в пассивном – белки UT (urea transporters), в том числе белок YUT (*Yersinia urea transporter*), и UAC (urea amide channels), представляющие собой мембранные каналы (Sebbane et al., 2002; Sachs et al., 2006; Huysmans et al., 2012; Strugatsky et al., 2013). Особенно хорошо изучены относящиеся к семейству UAC белки UreI *Helicobacter pylori*, поскольку их функционирование является важнейшим фактором вирулентности этих патогенных бактерий (Mollenhauer-Rektorschek et al., 2002). У животных за транспорт мочевины отвечают белки SLC14

(solute carrier 14), гомологичные белкам UT бактерий (Sands, 2003; Shayakul et al., 2013).

Транспорт глицина у животных осуществляется посредством специфичных высокоаффинных Na^+ - и Cl^- -зависимых транспортеров глицина GLYT, несущих 12 трансмембранных сегментов и играющих важную роль в функционировании нервной системы (Tunncliffe, 2003; Hosoya et al., 2010). У растений основными транспортерами этой аминокислоты являются различные белки AAP (amino acid permeases), относящиеся к крупному семейству ATF (amino acid transporter family), а также белки CAT (cationic amino acid transporters), относящиеся к семейству APC (amino acid-polyamine-choline) (Rentsch et al., 2007; Taylor et al., 2015). Транспортеры CAT обладают высокой аффинностью к субстратам, а транспортеры AAP – высокой и умеренной аффинностью. Также белки, осуществляющие транспорт глицина, известны у дрожжей. Они представляют собой специфичные пермеазы GAP1, которые интересны тем, что их локализация зависит от внутриклеточной концентрации аминокислот: при низкой концентрации они локализованы, главным образом, в плазматической мембране, тогда как при высокой – в вакуолярной мембране (Jauniaux, Grenson, 1990; Risinger, Kaiser, 2008).

Для того чтобы поступивший в клетку азот нитрат-ионов мог быть ассимилирован и использован в биосинтетических процессах, ионы нитрата должны быть восстановлены до ионов аммония. В растительной клетке процессы восстановления нитрат-ионов до ионов аммония катализируются ферментами нитрат-редуктазой (NAR), локализуемой в цитозоле и осуществляющей восстановление ионов нитрата до ионов нитрита, и нитрит-редуктазой (NIR), опосредующей восстановление ионов нитрита до ионов аммония в хлоропластах (Crawford, 1995; Tischner, 2000).

Как мочевины, так и глицин в процессе ассимиляции претерпевают трансформацию в ионы аммония. На сегодняшний день известно два механизма расщепления мочевины на ионы аммония и бикарбоната. АТФ-независимый гидролиз осуществляется посредством цитозольного фермента уреазы (URE), широко распространенного в различных группах организмов, от бактерий до

растений (Mobley, Hausinger, 1989; Mobley et al., 1995; Witte, 2011). За АТФ-зависимое расщепление мочевины, происходящее в два этапа, отвечает фермент с двойной каталитической активностью амидолиаза мочевины (DUR1,2), обнаруженный у грибов. У зеленых водорослей те же реакции АТФ-зависимого расщепления мочевины осуществляются двумя отдельными ферментами, гомологичными двум функциональным частям амидолиазы мочевины, - амидазой и карбоксилазой мочевины (Solomon et al., 2010; Strobe et al., 2011).

Окисление глицина в клетках растений и животных катализируется белками Н, L, Р и Т, входящими в состав митохондриального комплекса декарбоксилирования глицина GDC (glycine decarboxylation complex). Образующийся в ходе декарбоксилирования глицина 5,10-метилентетрагидрофолат может вступать в реакцию с еще одной молекулой глицина с образованием серина (Douce et al., 2001; Schulze et al., 2016). В свою очередь, серин может быть трансформирован в пируват в ходе реакции, катализируемой ферментом серин-дегидратазой (серин-рацемазой), вероятно, локализующейся в цитозоле (Fujitani et al., 2006; Hildebrandt et al., 2015).

1.4 Исследования, проводимые на уровне отдельных клеток

1.4.1 Исследования на уровне отдельных клеток в экофизиологии фотосинтезирующих протистов

Одноклеточные фотосинтезирующие эукариоты вносят существенный вклад в первичную продукцию океана и фиксацию неорганического углерода, а также играют важную роль в биогеохимических циклах макро- и микроэлементов (Falkowski et al., 1998; Morel and Price, 2003; Chassot et al., 2010; Матанцева и Скарлато, 2013). До настоящего времени взаимодействие фотосинтезирующих микроорганизмов с окружающей средой изучалось, прежде всего, на популяционном уровне. Несмотря на то что этот традиционный подход позволяет получать ценную информацию, с его помощью невозможно полностью прояснить

сложные процессы, протекающие в популяциях и сообществах микроорганизмов. В последние десятилетия было разработано множество методов, позволяющих проводить исследования на уровне единичных клеток: микрофлюидика, секвенирование единичных клеток, рамановская спектроскопия, масс-спектрометрия вторичных ионов в нано-масштабе (NanoSIMS) и многие другие. Эти методы были успешно применены в различных областях экологической микробиологии и экофизиологии (Brehm-Stecher, Johnson, 2004; Popa et al., 2007; Li et al., 2008; Musat et al., 2008, 2012; Labonté et al., 2015; Martins and Locke, 2015).

NanoSIMS представляет собой один из наиболее эффективных подходов для исследований физиологии питания отдельных клеток, поскольку он позволяет определять их изотопный состав с высокой точностью (Nuñez et al., 2018). Тем не менее, на сегодняшний день данный метод был применен для изучения экофизиологии эукариотных микроорганизмов лишь в нескольких работах. В большинстве случаев эти работы направлены на изучение симбиотических отношений, в которых фотосинтетические протисты играют роль симбионтов или хозяев (Foster et al., 2011; Pernice et al., 2012, 2015; Kopp et al., 2013; Zehr, 2015). Так, исследования азотфиксирующих цианобактерий рода *Richelia*, часто живущих в ассоциации с диатомовыми водорослями, показали, что скорость фиксации азота у симбионтов в 171–420 раз выше, чем у свободноживущих представителей этих бактерий (Foster et al., 2011). Подобные симбиотические отношения изучались также на примере ассоциации некультивируемой цианобактерии из группы UCYN-A с клетками примнезиофитовых водорослей. С помощью метода NanoSIMS исследователи показали, что бактерии из группы UCYN-A, характеризующиеся утратой многих генов углеродного метаболизма, получают углерод в форме органических соединений от своих эукариотических хозяев (Thompson et al., 2012). Изучение отношений кораллов и их внутриклеточных симбионтов – фотосинтезирующих динофлагеллят *Symbiodinium* – показало, что оба участника этого симбиоза способны ассимилировать ионы аммония, однако клетки динофлагеллят делают это с более высокой скоростью, чем клетки их хозяев, обеспечивая быстрый ответ на появление этого питательного субстрата в среде

(Pernice et al., 2012). Дальнейшие исследования этой симбиотической системы выявили существование двух различных клад *Symbiodinium*, отличающихся эффективностью ассимиляции неорганического углерода и ионов аммония для своих хозяев (Pernice et al., 2014). Недавно метод NanoSIMS был применен и при изучении миксотрофии золотистых водорослей рода *Ochromonas*. С помощью анализа индивидуальных клеток было показано, что 84–99% углерода и 88–95% азота эти микроорганизмы получают в результате фагоцитирования бактерий, в то время как ассимиляция неорганических субстратов вносит лишь незначительный вклад в их питание и недостаточна для поддержания роста в отсутствие гетеротрофии (Terrado et al., 2017).

1.4.2 Исследования гетерогенности клеточных популяций

Относительно новым и многообещающим направлением исследований на уровне индивидуальных клеток является изучение гетерогенности клеточных популяций, в том числе популяций микроорганизмов (Kreft et al., 2013). Исследования, проведенные на бактериях и клеточных линиях млекопитающих, показали, что вариабельность фенотипических признаков среди клеток одной популяции – это универсальное явление, которое может иметь существенное значение при интерпретации групповых наблюдений и измерений (Altschuler, Wu, 2010). Кроме того, такая вариабельность является одним из ключевых свойств живых организмов, лежащих в основе их адаптации к меняющимся условиям среды (Forsman, Wennersten, 2016).

Гетерогенность популяций определяется как генетическими различиями между отдельными организмами (клетками одной популяции), так и фенотипической пластичностью. Морфологические и физиологические различия между клетками одной популяции, обусловленные фенотипической пластичностью, могут возникать благодаря внешним факторам, например, неравномерным условиям окружающей среды, или внутренним факторам, таким как стохастические процессы во время экспрессии генов, возраст отдельных

клеток, а также стадия клеточного цикла (Ackermann, 2015; Wennersten, Forsman, 2012).

Феномен гетерогенности популяций более полно изучен на примере бактерий (Booth, 2002; Elowitz et al., 2002; Kussel, Lebler, 2005; Acar et al., 2008; Lidstrom, Конопка, 2010; Martins, Locke, 2015), тогда как о гетерогенности природных популяций протистов известно гораздо меньше. Большая часть работ, посвященных этому вопросу, связана с выявлением вариабельности содержания биогенных элементов, пигментов и запасных питательных веществ в клетках микроскопических водорослей. Так, посредством рентгеноспектрального микроанализа было обнаружено, что клетки динофлагеллят *Dinophysis norvegica*, растущие в одинаковых условиях, содержали различное количество углерода, фосфора и азота (Gisselson et al., 2001). Воронова с соавторами (Воронова и др., 2009) исследовали вариабельность параметров естественной флуоресценции у диатомей *Thalassiosira weissflogii* и показали, что гетерогенность их популяций по этим параметрам возрастает в условиях дефицита источников азота. В другом исследовании Буччи с соавторами (Bucci et al., 2012) не только обнаружили вариабельность в содержании фосфора в различных клетках одной популяции диатомей *Cyclotella meneghiniana*, но и объяснили ее причины. Они доказали, что обнаруженная гетерогенность была связана, главным образом, с мозаичностью содержания биогенных элементов в окружающей среде. В той же работе было продемонстрировано, что традиционное моделирование скорости роста популяции, основанное на усредненном значении содержания фосфора, давало более высокие скорости роста, чем моделирование, в основе которого лежали индивидуальные показатели для отдельных клеток. Таким образом, данные о внутрипопуляционной гетерогенности, вероятно, имеют большое значение для понимания динамики сообществ микроорганизмов (Kreft et al., 2013). Недавно MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization) масс-спектрометрия была применена для анализа содержания 26 различных липидов и пигментов в отдельных клетках микроскопических зеленых водорослей *Chlamydomonas reinhardtii* в процессе адаптации к условиям лимитирования по азоту.

Эксперименты с генетически неоднородными и клональными культурами *Ch. reinhardtii* показали, что обнаруженная вариабельность в содержании пигментов и липидов определялась не только генетической гетерогенностью (Krismer et al., 2016). Использование масс-спектрометрии вторичных ионов в наномасштабе может дать ценную информацию о гетерогенности популяций эукариотических микроорганизмов в отношении процессов поглощения и ассимиляции питательных субстратов, однако до сих пор этот метод не был применен в подобных исследованиях.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Культура клеток

В работе использовали неаксеничную монокультуру динофлагеллят *Prorocentrum minimum* ССАР1136/16 из коллекции культур водорослей и простейших Шотландского морского института (The Culture Collection of Algae and Protozoa, Шотландия, Великобритания).

2.2 Условия культивирования динофлагеллят *P. minimum*

Динофлагелляты культивировались в бессиликатной среде f/2 (Guillard, Ryther, 1962) с pH 8.2 и соленостью 25‰, приготовленной на основе искусственной морской воды с соленостью 35‰ (на 1 л искусственной морской воды: 23.93 г NaCl, 0.68 г KCl, 3.39 г MgSO₄, 0.196 г NaHCO₃, 0.098 г KBr, 0.026 г H₃BO₃, 0.003 г NaF, 10.8 г MgCl₂ × 6H₂O, 1.12 г CaCl₂, 0.017 г SrSO₄) (Kester et al., 1967). Культивирование проводили при температуре 22–23 °С и освещенности 100 мкмоль фотонов × м⁻² × с⁻¹ в режиме 12 ч свет : 12 ч темнота.

2.3 Измерение концентрации источников азота и углерода

Концентрацию мочевины и ионов нитрата (NO₃⁻) и аммония (NH₄⁺) в культуральной среде измеряли методом колориметрии с помощью спектрофотометра СФ-2000 (ОКБ Спектр, Россия). Во всех случаях готовили стандарты в диапазоне концентраций, соответствующем каждому методу, и строили калибровочную кривую.

Измерение концентрации мочевины проводилось по Гойенсу с соавторами (Goeuens et al., 1998). Для развития окрашивания после добавления реагентов пробы инкубировали в темноте при комнатной температуре 12–18 ч и измеряли абсорбцию света при длине волны 520 нм.

Измерение концентрации ионов нитрата проводилось по Дозйну и Хорвату (Doane, Horwath, 2003). Для развития окрашивания после добавления реагентов пробы инкубировали в темноте при комнатной температуре 12-18 ч и измеряли абсорбцию света при длине волны 540 нм. Для более быстрого определения концентрации развитие окрашивания ускоряли нагреванием: пробы инкубировали на водяной бане при температуре 85 °С в течение 10 мин и немедленно остужали до комнатной температуры.

Измерение концентрации ионов аммония проводилось по Королеву (Koroleff, 1969; Hansen, Koroleff, 1999). Для развития окрашивания после добавления реагентов пробы инкубировали в темноте при комнатной температуре 12–18 ч и измеряли абсорбцию света при длине волны 540 нм.

Определение концентрации ионов бикарбоната (HCO_3^-) проводили с помощью титрования 0.5М соляной кислотой в присутствии красителя метилоранжа (Муравьев, 2004).

2.4 Подсчет клеток динофлагеллят

Клетки динофлагеллят считали в камере Фукса-Розенталя или с помощью проточного цитометра FACSCalibur™ (Becton, Dickinson, and Company, США) при скорости потока 30 мкл мин⁻¹, с использованием лазера 488 нм и естественной флуоресценции пигментов динофлагеллят и размера их клеток в качестве параметров сортировки. Предварительно клетки фиксировали раствором Люголя (подсчет в камере Фукса-Розенталя) или смесью 1% формальдегида и 1% глутаральдегида (подсчет методом проточной цитометрии).

2.5 Протоколы экспериментов

Перед началом экспериментов среду f/2 с уменьшенным содержанием источников азота и фосфора (400 мкмоль л⁻¹ нитрата натрия и 100 мкмоль л⁻¹ монофосфата калия) засеивали культурой *P. minimum*, после чего культура росла в

течение 7–10 дней до достижения экспоненциальной фазы роста, плотности не менее 40 тыс. кл мл⁻¹ и концентрации нитрат-ионов в среде около 200 мкмоль л⁻¹. Для проведения экспериментов не прибегали к полной замене среды, поскольку центрифугирование и вакуумная фильтрация, необходимые для концентрирования клеток, являются факторами, вызывающими экдизис у динофлагеллят и, следовательно, существенно влияют на активность клеток (Бердиева, Скарлато, Матанцева и др., 2016; Pozdnyakov, Matantseva et al., 2014). Вместо этого, в день проведения экспериментов определяли точную концентрацию нитрата в культурах, для того чтобы добавить равное количество органического азота. В экспериментах использовали поверхностную фракцию культуры *P. minimum*, содержащую активно плавающие клетки.

До начала опыта брали пробы клеток для определения их естественного изотопного состава (естественного содержания тяжелых изотопов азота и углерода) и пробы среды для измерения концентрации нитрат- и бикарбонат-анионов, а также ионов аммония для того, чтобы убедиться, что нитрат-ионы являются единственным источником азота в среде (Приложение, таблицы 1, 2). Затем поверхностную фракцию культуры разделяли на несколько частей, или экспериментальных параллелей, и добавляли в них немеченые органические субстраты (при необходимости), а также субстраты, меченые стабильными изотопами азота и углерода. В случае экспериментов, посвященных изучению конкурентного поглощения нитрат-ионов и органических веществ, мочевины и глицин добавляли в концентрации по азоту, приблизительно равной концентрации нитрат-ионов в среде (160–200 мкмоль N л⁻¹) (Приложение, таблицы 1, 2). В случае экспериментов, посвященных изучению поглощения углерода органических субстратов, мочевины и глицин добавляли в концентрации по азоту 200 мкмоль л⁻¹. Комбинации субстратов и изотопных меток, использовавшиеся в различных экспериментальных параллелях в каждой из серий экспериментов приведены в таблице 1.

Эксперименты проводили в начале/середине светового периода. Клетки динофлагеллят инкубировали с изотопными метками, после чего собирали их на

стекловолоконных фильтрах GF/C с диаметром пор 1.2 мкм (Whatman, Великобритания) и высушивали в течение 12–24 ч при температуре 50 °С для последующего анализа изотопного состава. С целью исключения влияния сопутствующих бактерий на результаты экспериментов клетки бактерий собирали на фильтрах GF/F с диаметром пор 0.7 мкм (Whatman, Великобритания). Фильтраты сохраняли для определения концентраций питательных субстратов. Время инкубации клеток с изотопными метками составляло 2 ч в случае экспериментов «Конкурентное поглощение нитрат-ионов и мочевины» и «Конкурентное поглощение нитрат-ионов и глицина». В ходе экспериментов «Поглощение азота и углерода мочевины» и «Поглощение азота и углерода глицина» пробы отбирались последовательно 3–4 раза, время инкубации составляло 0.3–6 ч. Все эксперименты были выполнены в 3–6 повторностях.

Таблица 1. Схемы экспериментов, направленных на изучение поглощения питательных субстратов динофлагеллятами.

Эксперимент. параллель	Источники азота в среде	¹⁵ N-метка (конечная концентрация ¹⁵ N в %)	¹³ C-метка (конечная концентрация ¹³ C в %)	Измеряемый параметр
Эксперимент «Конкурентное поглощение нитрат-ионов и мочевины»				
1 («только нитрат»)	Нитрат	¹⁵ N-нитрат (10%)	¹³ C- бикаронтат (2%)	Скорость поглощения нитрат-ионов и бикарбоната
2 («нитрат»)	Нитрат + мочевина	¹⁵ N-нитрат (10%)	¹³ C- бикаронтат (2%)	Скорость поглощения нитрат-ионов и бикарбоната

3 («мочевина»)	Нитрат + мочевина	¹⁵ N-мочевина (10%)	¹³ C- бикаронтат (2%)	Скорость поглощения азота мочевины и бикарбоната
Эксперимент «Конкурентное поглощение нитрат-ионов и глицина»				
1 («только нитрат»)	Нитрат	¹⁵ N-нитрат (10%)	¹³ C- бикаронтат (2%)	Скорость поглощения нитрат-ионов и бикарбоната
2 («нитрат»)	Нитрат + глицин	¹⁵ N-нитрат (10%)	¹³ C- бикаронтат (2%)	Скорость поглощения нитрат-ионов и бикарбоната
3 («глицин»)	Нитрат + глицин	¹⁵ N-глицин (10%)	¹³ C-глицин (2%)	Скорость поглощения азота глицина и бикарбоната
Эксперимент «Поглощение азота и углерода мочевины»				
1	Нитрат + мочевина	¹⁵ N-мочевина (10%)	¹³ C-мочевина (98%)	Скорость поглощения азота и углерода мочевины
2	Нитрат + мочевина	¹⁵ N-мочевина (10%)	¹³ C- бикаронтат (2%)	Скорость поглощения азота мочевины и бикарбоната
Эксперимент «Поглощение азота и углерода глицина»				
1	Нитрат + глицин	¹⁵ N-глицин (10%)	¹³ C ₁ -глицин (98%)	Скорость поглощения азота и углерода-С ₁ глицина

2	Нитрат + глицин	¹⁵ N-глицин (10%)	¹³ C ₂ -глицин (98%)	Скорость поглощения азота и углерода-C ₂ глицина
3	Нитрат + глицин	¹⁵ N-глицин (10%)	¹³ C- бикаронтат (2%)	Скорость поглощения азота глицина и бикарбоната

2.6 Масс-спектрометрия изотопных отношений

Для определения изотопного состава биомассы на уровне популяций клетки динофлагеллят собирали на предварительно прокаленных при температуре 450 °С стекловолоконных фильтрах GF/C с диаметром пор 1.2 мкм (Whatman, Великобритания). Фильтры с клетками, полностью высушенные при температуре 50–60 °С, заворачивали в оловянную фольгу и спрессовывали до размеров, необходимых для подачи в пробоотборник. Измерения количества углерода и азота в биомассе, а также ее изотопного состава проводили с помощью масс-спектрометра Delta V (Thermo Scientific, США), соединенного с элементным анализатором. В качестве референсных газов для углерода и азота использовали ультрачистые углекислый газ и молекулярный азот, откалиброванные с помощью коммерческих стандартов IAEA N1, N2, N3, C3, C6 и NBS22 (International Atomic Energy Agency, Австрия). В качестве внутренних лабораторных стандартов для ежедневной калибровки использовали ацетанилид и пептон (Millipore, США). Точность измерений составляла ≤0.2 ‰.

2.7 Масс-спектрометрия вторичных ионов в наномасштабе (NanoSIMS)

Для определения изотопного состава отдельных клеток динофлагеллят использовали метод масс-спектрометрии вторичных ионов в наномасштабе (nanoscale secondary ion mass spectrometry, NanoSIMS). Клетки динофлагеллят собирали на поликарбонатных фильтрах с диаметром пор 0.2 мкм (Millipore, США). Фильтры с клетками полностью высушивали при комнатной температуре и покрывали слоем золота толщиной 30 нм с помощью прибора 108auto Sputter Coater (Cressington, Великобритания) для обеспечения электропроводности поверхности образцов. Анализ проводили с помощью прибора NanoSIMS 50L (Cameca, Франция). Для этого случайным образом выбирали 15–20 клеток из каждого образца и оценивали их целостность с помощью детектора вторичных электронов. Во время измерений прибор был настроен на прием следующих масс: $^{12}\text{C}^-$ и $^{13}\text{C}^-$ для определения изотопного состава по углероду; $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ и $^{12}\text{C}^{15}\text{N}^-$ для определения изотопного состава по азоту. Для удаления золота с поверхности и достижения стабильных условий формирования вторичных ионов использовали поток первичных ионов цезия (Cs^+) с силой тока 600 пА. Анализу подвергались участки площадью 10×10 нм или 45×45 нм в зависимости от числа клеток на данном участке фильтра. Для анализа использовали поток первичных ионов цезия (Cs^+) с силой тока 1 пА. В каждом случае анализировали 200 слоев толщиной 1 нм. Полученные данные обрабатывали в программе Look at NanoSIMS (Polerecky et al., 2012). Изотопные отношения $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ и $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ рассчитывались для участков интереса, которые были определены вручную и соответствовали контурам клеток на изображениях, полученных с помощью сигнала от детектора ионов $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ и детектора вторичных электронов (рисунок б).

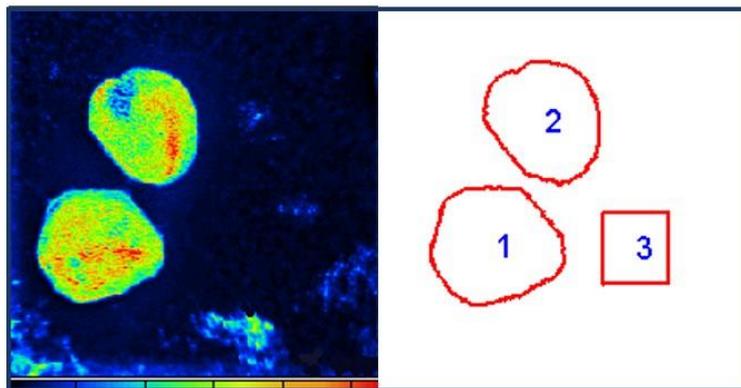


Рисунок 6. Определение участков интереса для анализа изотопного состава методом NanoSIMS. Слева – сигнал от детектора ионов $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$, справа – участки интереса (1 и 2 – клетки, 3 – фон).

Несколько клеток, выбранных случайным образом, были проанализированы на глубину, значительно превышающую 200 нм. Данный анализ не выявил различий в изотопном составе клеток по глубине.

2.8 Вычисления

Обогащение проб тяжелыми изотопами азота ^{15}N и углерода ^{13}C приводилось к стандартной дельта-нотации по формулам:

$$\delta^{15}\text{N} = \left(\frac{R_{\text{sample}}^{\text{N}}}{R_{\text{standard}}^{\text{N}}} - 1 \right) \times 1000 \text{ ‰}$$

$$\delta^{13}\text{C} = \left(\frac{R_{\text{sample}}^{\text{C}}}{R_{\text{standard}}^{\text{C}}} - 1 \right) \times 1000 \text{ ‰}$$

где ^{15}N and ^{13}C – стабильные тяжелые изотопы азота и углерода; $R_{\text{sample}}^{\text{N}}$ и $R_{\text{sample}}^{\text{C}}$ – отношения тяжелых изотопов к легким ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ и $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) в образце; $R_{\text{standard}}^{\text{N}}$ и $R_{\text{standard}}^{\text{C}}$ – отношения тяжелых изотопов к легким ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ и $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) в стандартах (за стандарты для измерений изотопного состава по азоту и углероду в

международной системе приняты атмосферный молекулярный азот и окаменевший белемнит из формации Pee Dee в Южной Каролине (Pee Dee Belemnite, PDB)).

Скорость включения метки (стабильных тяжелых изотопов) из меченых питательных субстратов рассчитывалась в соответствии с уравнениями, предложенными Дагдейлом и Уилкерсоном (Dugdale, Wilkerson, 1986):

$$V_{(t)} = \frac{I_{xs}}{(I_{enr} - (F)) \times T}$$

где I_{xs} – избыток тяжелых изотопов азота или углерода в образце после инкубации с мечеными субстратами по сравнению с их естественным содержанием в данном образце, выраженный в процентах; I_{enr} – процентное содержание тяжелых изотопов азота или углерода в меченом субстрате; F – естественное процентное содержание тяжелых изотопов азота или углерода в образце; T – время инкубации.

Абсолютная скорость поглощения азота и углерода питательных субстратов на объем культуры (p_{volume}) и на клетку (p_{cell}) рассчитывалась как:

$$p_{volume} = V_{(t)} \times PN$$

$$p_{cell} = p_{volume}/d$$

где PN – количество азота или углерода в биомассе 1 л культуры; d – число клеток динофлагеллят в 1 л культуры.

Подавление (S , *suppression*) ассимиляции нитрата в присутствии органических источников азота рассчитывалась как:

$$S = \left(1 - \frac{p(\text{Nitrate})}{p(\text{Nitrate})_{control}} \right) \times 100\%$$

где $p(\text{Nitrate})$ – скорость поглощения нитрата в присутствии органического источника азота (мочевины или глицина); $p(\text{Nitrate})_{control}$ – скорость поглощения нитрата в отсутствие иных источников азота.

Коэффициент вариации (CV) при анализе степени гетерогенности клеточных популяций рассчитывался по формуле:

$$CV = \frac{\sigma}{\mu}$$

где σ – стандартное отклонение, а μ - среднее значение исследуемого параметра.

2.9 Биоинформатический анализ

В настоящей работе были использованы транскриптомы динофлагеллят *P. minimum* CCMP1329 и CCMP2233 из базы данных проекта «Marine Microbial Eukaryote Transcriptome Sequencing Project» (MMETSP; <http://data.imicrobe.us/project/view/104>, Combined Assemblies; Keeling et al., 2014), содержащей неаннотированные транслированные транскрипты. Поиск аминокислотных последовательностей, гомологичных белкам, участвующим в транспорте и метаболизме нитрат-ионов, мочевины и глицина, осуществлялся с помощью алгоритма BLASTP (матрица весов аминокислотных замен BLOSUM62) в программе BioEdit 7.2.5 (Hall, 1999). В качестве последовательностей запроса использовались аминокислотные последовательности белков, участвующих в транспорте и метаболизме нитрат-ионов, мочевины и глицина и принадлежащих различным видам организмов, из базы данных белковых последовательностей National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>) (Приложение, таблица 3). Для каждого из обнаруженных гомологов параметр E-value не превышал 10^{-20} .

Выравнивание аминокислотных последовательностей осуществляли с помощью алгоритма ClustalW (Thompson et al., 2002) в программах BioEdit 7.2.5 (Hall, 1999) и Unipro UGENE (Okonechnikov et al., 2012). Предсказание трансмембранных доменов у белков-транспортеров проводили с помощью

TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) (Krogh et al., 2001).
Оценку идентичности аминокислотных последовательностей белков *P. minimum* с референсными последовательностями *Arabidopsis thaliana*, *Homo sapiens* и *Saccharomyces cerevisiae* проводили с помощью программы SIAS (<http://imed.med.ucm.es/Tools/sias.html>). Идентичность рассчитывалась как отношение числа идентичных аминокислотных остатков к длине наиболее короткой из выровненных последовательностей и выражалась в процентах.

2.10 Статистический анализ

Для статистического анализа использовали программное обеспечение MaxStat 3.06 (MaxStat software, Германия). Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего, если не оговорено иное. Нормальность распределения и равенство дисперсий больших выборок ($n > 30$) оценивались с помощью критериев Шапиро-Уилка, Андерсона-Дарлинга и Бартлетта. Для сравнения больших выборок, отвечающих условиям применения параметрических тестов, использовался однофакторный дисперсионный анализ (1-way ANOVA) с пост-тестом Тьюки. Для сравнения малых независимых выборок использовали непараметрические критерии Краскела-Уоллеса с последующим тестом Данна и Манна-Уитни (для $n > 4$). В случае сравнения парных измерений использовали непараметрический критерий Уилкоксона (для $n > 4$) или парный t-критерий Стьюдента (для $n = 3$), как метод выбора для экстремально малых выборок (De Winter, 2013). Для оценки корреляции переменных применялся коэффициент корреляции Спирмана. Статистически значимыми считались различия и корреляции при $p < 0.05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Конкурентный транспорт нитрат-ионов и органических азотсодержащих веществ в клетки *P. minimum*

Известно, что в естественной среде зачастую присутствует несколько источников азота одновременно, однако конкурентное поглощение различных азотсодержащих субстратов динофлагеллятами до сих пор изучено слабо, а существующие работы предоставляют лишь отрывочные сведения, полученные, главным образом, при изучении сообществ, в которых доминируют отдельные виды этих протистов, *in situ* (Fan et al., 2003). Несмотря на несомненную ценность таких работ, для понимания конкурентного транспорта различных азотсодержащих веществ в клетки динофлагеллят необходимо проведение лабораторных экспериментов с монокультурами различных видов в строго контролируемых условиях. В последние десятилетия в результате антропогенного загрязнения концентрации азотсодержащих субстратов в прибрежных экосистемах могут быть очень высоки. Кроме того, нередки случаи резкого локального повышения содержания некоторых соединений после сильных дождей, сброса сточных вод и т.п. Особенно часто таким образом происходит привнесение в экосистемы мочевины (Switzer, 2008), которая широко применяется в сельском хозяйстве и промышленности (Glibert et al., 2006). Тем не менее, лабораторные исследования конкурентного транспорта различных источников азота в среде, насыщенной питательными субстратами, а также ответа динофлагеллят на внезапное появление нового источника азота, до сих пор не проводились. В настоящей работе выполнены эксперименты с монокультурой динофлагеллят *P. minimum*, призванные охарактеризовать конкурентный транспорт нитрат-ионов и каждого из наиболее распространенных в прибрежье органических субстратов – мочевины или глицина – при их внезапном привнесении в культуральную среду в высокой концентрации.

3.1.1 Конкуреннтное поглощение нитрат-ионов и мочевины

После добавления мочевины к культуре *P. minimum*, растущей на нитрат-ионах в качестве единственного источника азота, транспорт мочевины в клетки динофлагеллят осуществлялся уже в первые 2 ч (Matantseva et al., 2014, 2016). При этом поглощение мочевины бактериями, присутствующими в культуре, не превышало 1% от поглощения мочевины динофлагеллятами, поэтому мы пренебрегаем активностью сопутствующих бактерий.

Скорость поглощения азота мочевины в 2 раза превышала скорость поглощения азота нитрат-ионов (односторонний критерий Уилкоксона, $p = 0.0156$, $n = 6$), несмотря на то что оба субстрата присутствовали в среде в равных по азоту концентрациях (рисунок 7, а). При этом средние молярные скорости поглощения нитрат-ионов и мочевины не различались (односторонний критерий Уилкоксона, $p = 0.4375$, $n = 6$) и составляли 15.1 ± 3.4 и 17.5 ± 2.2 фмоль кл⁻¹ ч⁻¹, соответственно (рисунок 7, б). Вклад азота мочевины в общий поглощенный клетками азот составлял приблизительно 70% (рисунок 7, в).

Примечательно, что в различных экспериментальных повторностях скорость поглощения питательных субстратов заметно отличалась (Матанцева, 2014). Вероятнее всего, это было связано с физиологическим состоянием культуры в момент инициирования экспериментов. Несмотря на то что во всех случаях использовались культуры в экспоненциальной фазе роста, даже небольшая разница в фазе роста (например, середина экспоненциальной фазы и более поздняя стадия) является существенной: чем выше скорость роста культуры, тем выше скорость поглощения питательных субстратов (Maguer et al., 2007). Тем не менее, характер ответа динофлагеллят на привнесение органического субстрата в среду был одинаков во всех повторностях (рисунок 7, а).

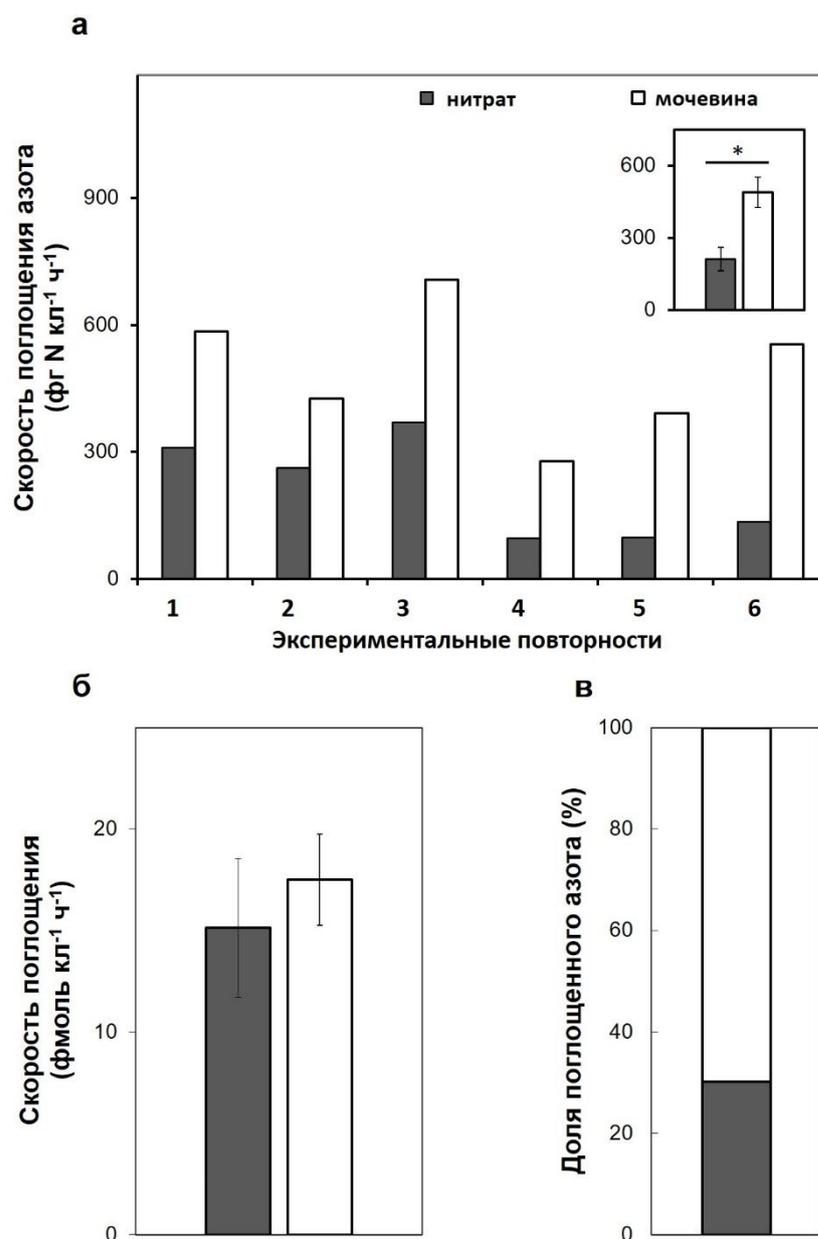


Рисунок 7. Конкурентный транспорт нитрат-ионов и мочевины в клетки *P. minimum*, адаптированные к росту на нитрате. **а** – скорость поглощения азота субстратов; **б** – молярная скорость поглощения субстратов; **в** – вклад каждого из субстратов в общее поглощение азота. На врезке показаны усредненные данные о скорости поглощения азота каждого из субстратов по всем повторностям. Звездочкой отмечены статистически значимые отличия в скорости поглощения азота нитрата и мочевины ($n = 6$, $p < 0.05$).

3.1.2 Конкуренентное поглощение нитрат-ионов и глицина

После добавления глицина к культуре *P. minimum*, растущей на нитрат-ионах в качестве единственного источника азота, транспорт глицина в клетки динофлагеллят также осуществлялся уже в первые 2 ч. При этом поглощение глицина бактериями, присутствующими в культуре, не превышало 1% от поглощения глицина динофлагеллятами, поэтому мы пренебрегаем активностью сопутствующих бактерий.

Скорость поглощения азота глицина клетками *P. minimum* была выше скорости поглощения ионов нитрата (односторонний парный критерий Стьюдента, $p = 0.046$, $n = 3$) в два раза, несмотря на то что оба субстрата присутствовали в среде в приблизительно равных по азоту концентрациях (рисунок 8, а). При этом молярная скорость поглощения глицина также была выше молярной скорости поглощения нитрат-ионов в два раза (рисунок 8, б). Азот глицина составлял около 70% всего азота, транспортируемого в клетки (рисунок 8, в). Таким образом, глицин так же, как и мочевины, представлял собой предпочтительный источник азота по сравнению с нитрат-ионами, в насыщенной субстратами среде.

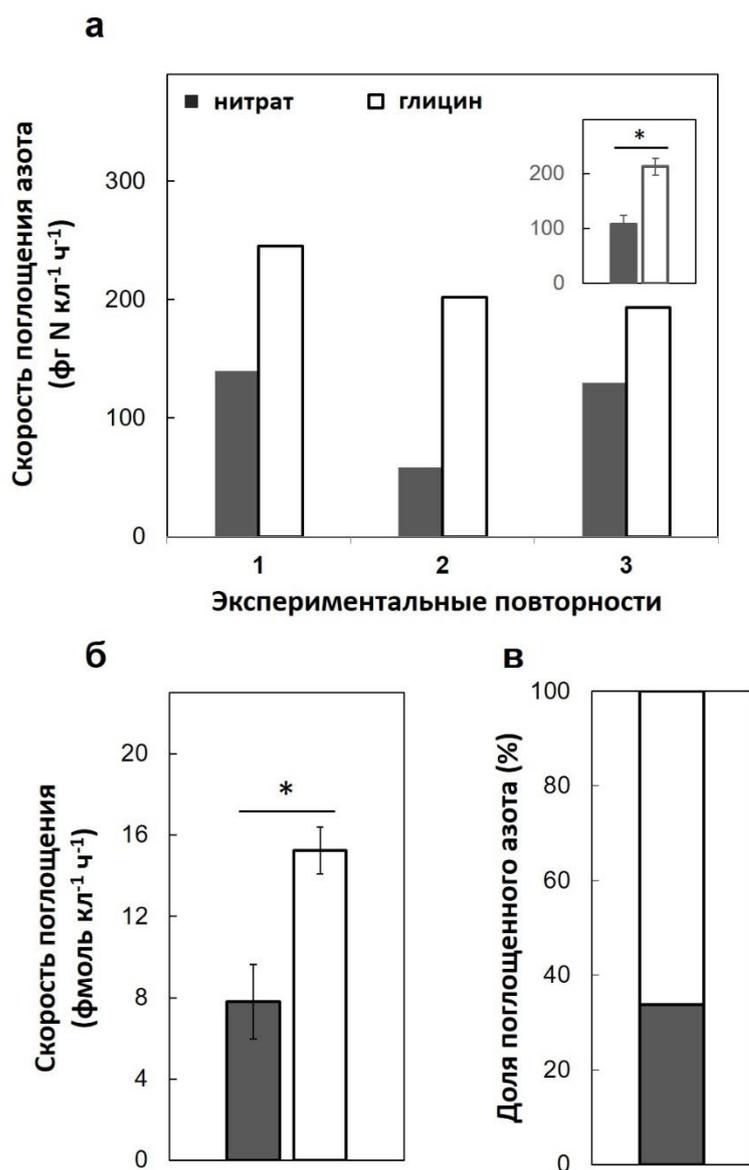


Рисунок 8. Конкурентный транспорт ионов нитрата и глицина в клетки *P. minimum*, адаптированные к росту на нитрате. **а** – скорость поглощения азота субстратов; **б** – молярная скорость поглощения субстратов; **в** – вклад каждого из субстратов в общее поглощение азота. На врезке показаны усредненные данные о скорости поглощения азота каждого из субстратов по всем повторностям. Звездочкой отмечены статистически значимые отличия в скорости поглощения нитрата и мочевины ($n = 3$, $p < 0.05$).

3.1.3 Влияние мочевины и глицина на поглощение нитрат-ионов

Различия в скорости конкурентного поглощения субстратов могут быть обусловлены не только функциональными характеристиками соответствующих белков-транспортёров, но и влиянием одного субстрата на транспорт другого. Так, было показано, что ионы аммония существенно ингибируют поглощение нитрата и мочевины динофлагеллятами (Lomas, Glibert, 1999; Jauzein et al., 2008; Glibert et al., 2016). В настоящей работе было исследовано влияние органических источников азота – мочевины и глицина – на конкурентный транспорт ионов нитрата в клетки *P. minimum*.

Эксперименты показали, что мочевина оказывала супрессирующее действие на конкурентное поглощение ионов нитрата динофлагеллятами (Matantseva et al., 2015, 2016a,b). В ее присутствии уже в первые 2 ч скорость поглощения нитрат-ионов снижалась на 30–40% по сравнению с контролем, в который не было добавлено органического источника азота (односторонний критерий Уилкоксона, $p = 0.0156$, $n = 6$) (рисунок 9, а). Хотя отношение азота мочевины к азоту нитрата несколько варьировало в разных экспериментальных повторностях, степень подавления поглощения нитрат-ионов не зависела от этого параметра (корреляция Спирмана, $r = -0.7$, $p = 0.12$, $n = 6$).

В присутствии глицина также было отмечено снижение скорости поглощения ионов нитрата динофлагеллятами, выраженность которого значительно варьировала между повторностями, однако это снижение скорости не было статистически значимым (односторонний парный критерий Стьюдента, $p = 0.272$, $n = 3$) (рисунок 9, б). Таким образом, на сегодняшний день не было показано статистически значимого супрессирующего действия глицина на поглощение нитрат-ионов клетками *P. minimum* (Матанцева, 2017; Matantseva et al., 2017).

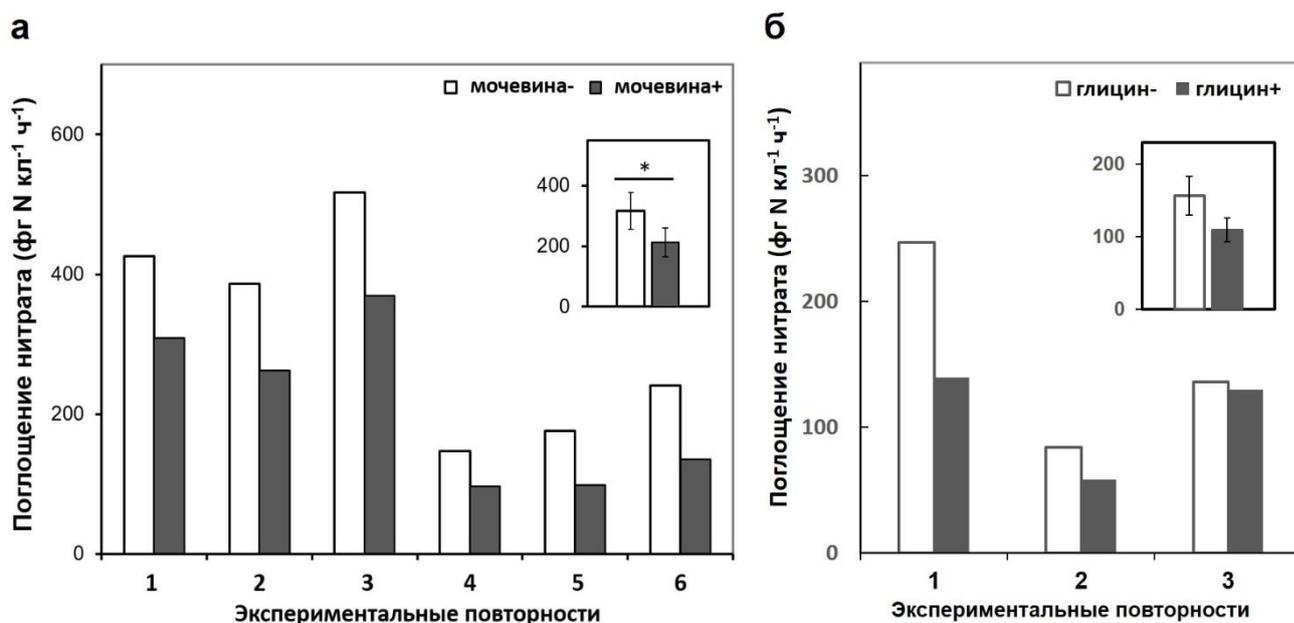


Рисунок 9. Влияние мочевины (а) и глицина (б) на скорость поглощения нитрата клетками динофлагеллят *P. minimum*. На врезках показаны усредненные данные по всем повторностям. Звездочкой отмечены статистически значимые отличия в скорости поглощения нитрата и мочевины ($n = 6$, $p < 0.05$).

3.1.4 Поглощение бикарбонат-ионов в присутствии дополнительного источника азота

Появление в среде дополнительного источника азота как в форме мочевины, так и в форме глицина приводило к увеличению транспорта азота в клетки динофлагеллят *P. minimum*. При этом транспорт неорганического углерода в форме бикарбонат-ионов оставался на прежнем уровне (рисунок 10, а, б), что свидетельствует о несбалансированном поглощении азота и углерода динофлагеллятами в условиях избытка азотсодержащих субстратов. После появления дополнительного органического источника азота в среде отношение поглощаемого углерода к поглощаемому азоту снижалось в два раза.

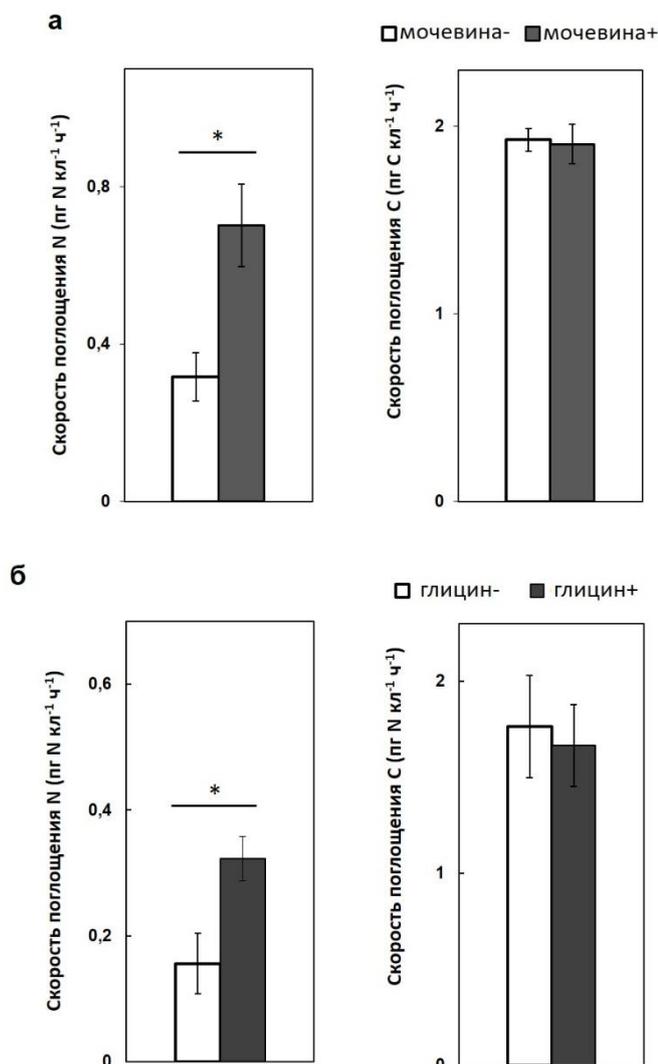


Рисунок 10. Изменения скорости поглощения общего азота (слева) и общего углерода (справа) в ответ на добавление мочевины (а) и глицина (б). Звездочками отмечено статистически значимое увеличение скорости поглощения общего азота в присутствии мочевины ($p < 0.05$, $n = 6$) и глицина ($p < 0.01$, $n = 3$).

3.2 Поглощение углерода мочевины и глицина клетками *P. minimum*

Способность динофлагеллят использовать органические азотсодержащие вещества в качестве источников азота была показана в полевых и лабораторных исследованиях, однако до сих пор неясно, являются ли те же органические соединения и дополнительными источниками углерода для этих организмов. В настоящей работе было исследовано поглощение углерода мочевины и глицина

клетками *P. minimum*. Эксперименты показали, что углерод мочевины составлял не более 0.5%, а углерод глицина – не более 1.5% от общего углерода, поступившего в клетки в форме бикарбонат-ионов и в органической форме (таблица 2).

Таблица 2. Поглощение неорганического углерода и углерода органических субстратов динофлагеллятами *P. minimum*. Значения приведены как среднее±SE (мочевина: n = 5; глицин: n = 3).

Органический субстрат	Скорость поглощения бикарбонат-ионов (фг С кл ⁻¹ ч ⁻¹)	Скорость поглощения углерода органического субстрата (фг С кл ⁻¹ ч ⁻¹)	Доля углерода органического субстрата (%)
Мочевина	2799±530	10±1	0.4±0.1
Глицин	1706±95	23±4	1.3±0.2

В соответствии со структурой молекул мочевины и глицина, при их поглощении азот и углерод должны поступать в клетку в соотношении 2:1 (мочевина, CH₄N₂O) и 1:2 (глицин, C₂H₅NO₂). В том случае, если углерод и азот органических соединений ассимилируются клетками в равной степени, соотношение азота и углерода, поступивших в клетку в форме мочевины и глицина, должно оставаться равным 2:1 и после их включения в биомассу. В настоящей работе использование мочевины и глицина, меченых тяжелыми изотопами ¹⁵N и ¹³C, позволило сравнить степень ассимиляции азота и углерода этих органических соединений клетками динофлагеллят *P. minimum*.

На рисунке 11 продемонстрировано соотношение количества азота и углерода мочевины, поступивших в клетки динофлагеллят во время экспериментов, а также соотношение этих параметров, теоретически ожидаемое в соответствии со структурой молекулы мочевины. Эксперименты показали, что клетки динофлагеллят содержали в 20 раз меньше углерода мочевины (N:C = 40:1), чем ожидалось в случае равной степени ассимиляции азота и углерода этого вещества (N:C = 2:1).

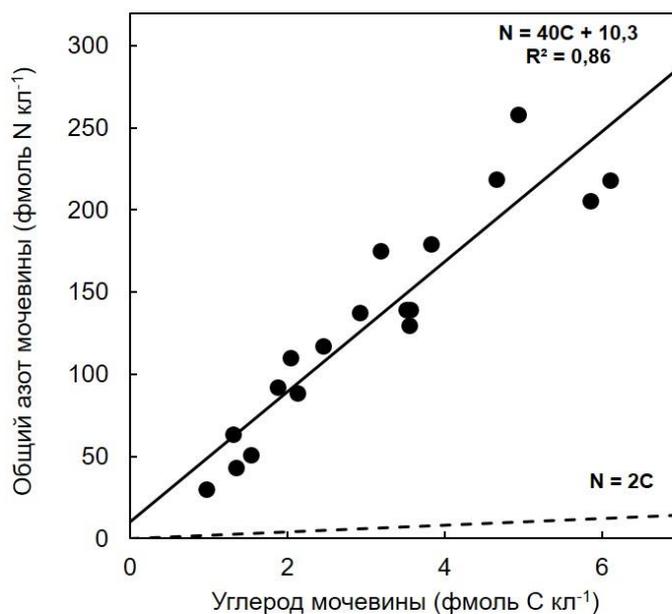


Рисунок 11. Соотношение азота и углерода мочевины, поглощенных клетками динофлагеллят *P. minimum*. Пунктирной линией показано теоретическое соотношение, ожидаемое в соответствии со структурой молекулы мочевины. Корреляция статистически значима ($p < 0.05$, $n = 5$).

Экспериментальное соотношение азота и углерода глицина, поступивших в клетки, также отличалось от теоретически ожидаемого. Азот и углерод глицина находились в клетках в отношении 7:1 вместо отношения 1:2, соответствующего молекулярной структуре глицина (рисунок 12, а). Таким образом, клетки *P. minimum* содержали в 14 раз меньше углерода глицина ($N:C = 7:1$), чем ожидалось в случае равной степени ассимиляции азота и углерода этого вещества ($N:C = 1:2$). Использование глицина, меченого только по одному из двух атомов углерода (глицин-¹³C₁ и глицин-¹³C₂), позволило определить степень ассимиляции каждого из атомов углерода отдельно. Обнаружено, что обогащение клеток динофлагеллят атомами углерода C₁ (углерод карбонильной группы) было ниже, чем обогащение атомами C₂ (рисунок 12, б, в). Выявленное соотношение поглощения углерода C₁ и C₂ указывает на то, что в клетках содержалось в 1.3 раза меньше углерода C₁, чем C₂.

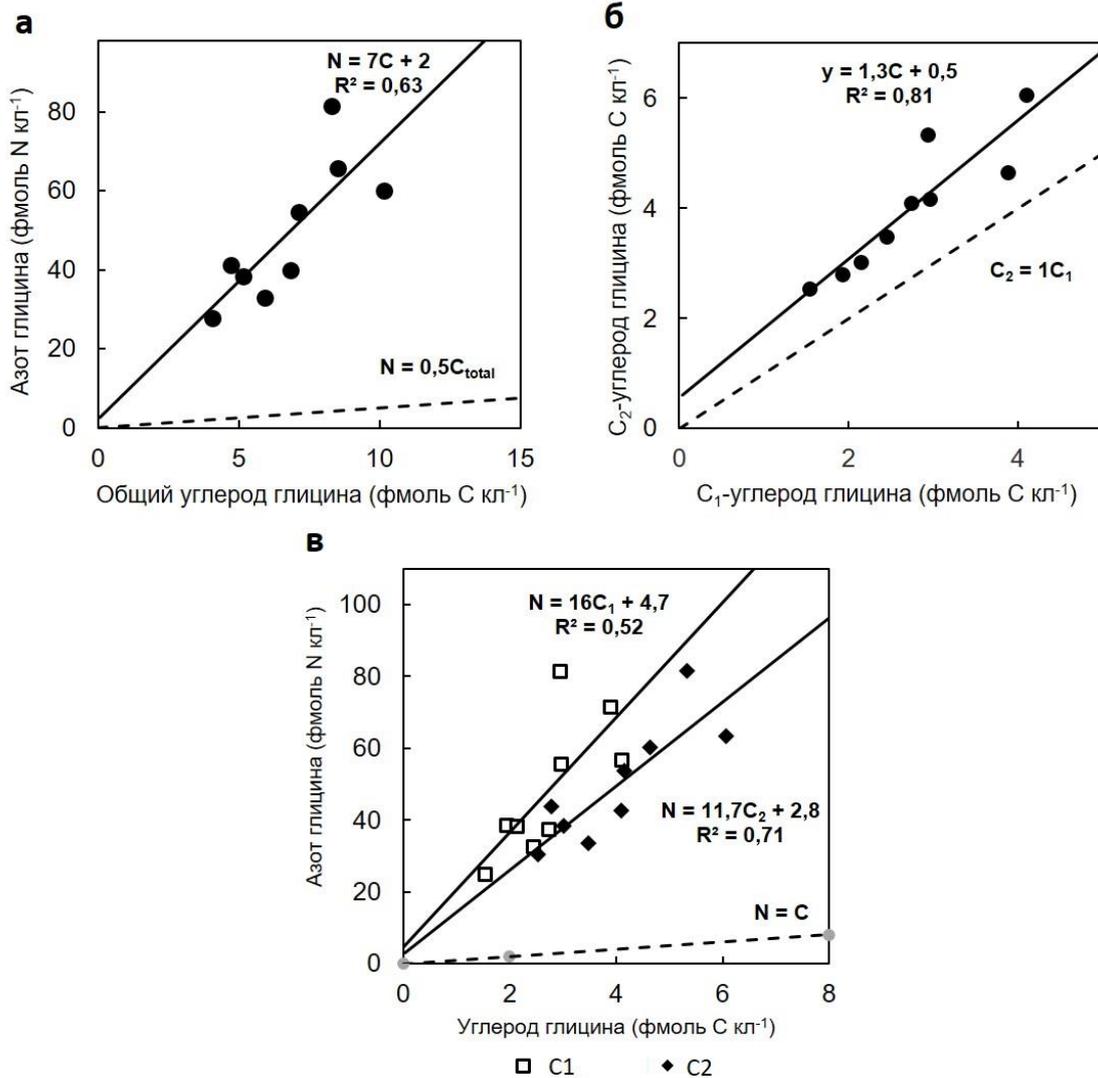


Рисунок 12. Соотношение азота и общего углерода глицина (**а**), C_1 - и C_2 -атомов углерода глицина (**б**), азота и каждого из атомов углерода глицина (**в**), поглощенных клетками динофлагеллят *P. minimum*. Пунктирными линиями показаны теоретические соотношения, ожидаемые в соответствии со структурой молекулы глицина.

Как в случае мочевины, так и в случае глицина, соотношение азота и углерода этих веществ, поступивших в клетки, оставалось неизменным в течение всего времени инкубации (рисунок 13).

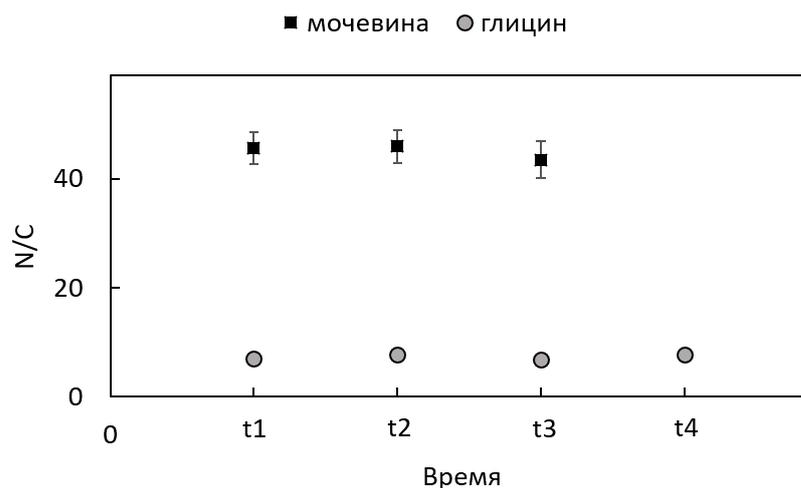


Рисунок 13. Соотношение азота и углерода, поступивших в клетки *P. minimum* в форме органических веществ, в течение всего времени инкубации. t1–t4 – время отбора проб.

3.3 Анализ транскриптомов *P. minimum* на наличие гомологов белков, участвующих в транспорте и ассимиляции нитрат-ионов, мочевины и глицина

Прогресс в исследованиях физиологии питания динофлагеллят, в том числе с применением методов молекулярной биологии, затруднен в связи с отсутствием информации о генах и белках, участвующих в транспорте и ассимиляции питательных субстратов у этих протистов. Чтобы частично заполнить данный пробел, в настоящей работе секвенированные транскриптомы *P. minimum* SSMP1329 и SSMP2233 из базы данных проекта MNETSP были использованы для поиска гомологов важнейших белков, опосредующих поглощение и ассимиляцию нитрат-ионов, мочевины и глицина, у этого вида динофлагеллят. Скрининг транскриптомов показал, что динофлагелляты *P. minimum* обладают разнообразным репертуаром белков, осуществляющих трансмембранный транспорт питательных субстратов (рисунок 14, таблица 3) (Matantseva et al., 2016; Pechkovskaya, Matantseva et al., 2017).

Таблица 3. Гомологи белков, вовлеченных в транспорт и ассимиляцию нитрат-ионов, мочевины и глицина, обнаруженные в транскриптах *P. minimum* ССМР1329 и ССМР2233. Приведены номера последовательностей с наименьшим E-value из каждого транскрипта. Серым цветом выделена последовательность, гомологичная амидолиазе мочевины DUR1,2, но отличающаяся от этого фермента порядком и организацией функциональных доменов. *A. thaliana* – *Arabidopsis thaliana*; *R. equi* – *Rhodococcus equi*; *S. cerevisiae* – *Saccharomyces cerevisiae*; *H. sapiens* – *Homo sapiens*.

Послед-ть запроса (организм)	№ послед-ти (<i>P. minimum</i>)	E- value	Длина, а.о.	Идент-ть, %	Функция
NRT1.1 (<i>A. thaliana</i>)	–	–	–	–	транспорт нитрата
NRT1.2 (<i>A. thaliana</i>)	10286_1 (ССМР1329); 13648_1 (ССМР2233)	6e-23; 6e-23	663; 701	21; 21	
NRT2.1 (<i>A. thaliana</i>)	224264_1 (ССМР1329); 255222_1 (ССМР2233)	2e-47; 2e-47	574; 523	23; 24	
CLCa (<i>A. thaliana</i>)	11985_1 (ССМР1329); 47364_1 (ССМР2233)	6e-79; 3e-78	912; 912	28; 28	
SLAC1 (<i>A. thaliana</i>)	–	–	–	–	
MIP (PIP, NIP, TIP) (<i>A. thaliana</i>)	6038_1 (ССМР1329);	7e-24; 7e-24	303; 288	23; 23	транспорт мочевины

	47098_1 (CCMP2233)				
DUR3 (<i>A. thaliana</i>)	263164_1 (CCMP1329); 255379_1 (CCMP2233)	0; e-162	1349; 1422	53; 53	
Urea ABC transporter (<i>R. equi</i>)	—	—	—	—	транспорт мочевины
YUT (<i>Y. rohdei</i>)	—	—	—	—	
UAC (<i>H. pylori</i>)	—	—	—	—	
SLC14 (<i>M. musculus</i>)	—	—	—	—	
AAP (AAP1, AAP2, AAP3, AAP4, AAP7) (<i>A. thaliana</i>)	—	—	—	—	
CAT1 (<i>A. thaliana</i>)	13539_1 (CCMP1329); 43864_1 (CCMP2233)	6e-44; 4e-59	575; 635	22; 25	транспорт глицина
GAP1 (<i>S. cerevisiae</i>)	—	—	—	—	
GLYT (<i>H. sapiens</i>)	44598_1 (CCMP1329); 41065_1 (CCMP2233)	2e-71; 1e-83	584; 758	30; 31	
NAR (<i>A. thaliana</i>)	67873_1 (CCMP1329);	1e- 180; 0	829; 942	42; 42	метаболизм нитрата

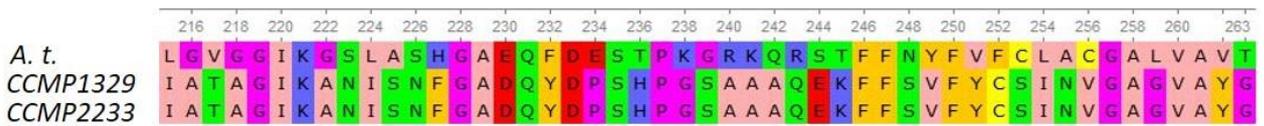
	257292_1 (CCMP2233)				
NIR (<i>A. thaliana</i>)	258241 (CCMP1329); 241489_1 (CCMP2233)	2e-28; 2e-24	1489; 802	22; 21	метаболизм нитрата
URE (<i>A. thaliana</i>)	39151_1 (CCMP1329); 16863_1 (CCMP2233)	0; 0	818; 814	66; 66	метаболизм мочевины
DUR1,2 (<i>S. cerevisiae</i>)	256473_1 (CCMP1329); 17430_1 (CCMP2233)	4e-53; 2e-59	2140; 1078	10; 11	
H-белок [GDC] (<i>A. thaliana</i>)	14765_1 (CCMP1329); 45622_1 (CCMP2233)	1e-21; 1e-21	222; 142	32; 36	
L-белок [GDC] (<i>A. thaliana</i>)	5108_1 (CCMP1329); 21839_1 (CCMP2233)	1e- 150; 1e- 152	630; 528	58; 58	метаболизм глицина
P-белок [GDC] (<i>A. thaliana</i>)	14760_1 (CCMP1329); 215831_1 (CCMP2233)	0; 0	980; 966	51; 51	
T-белок [GDC] (<i>A. thaliana</i>)	44708_1 (CCMP1329);	1e- 100;	496; 474	51; 50;	

	25581_1 (CCMP2233)	1e- 100			метаболизм глицина
SHMT (<i>A. thaliana</i>)	30838_1 (CCMP1329);	1e- 169;	495;	60;	
	67811_1 (CCMP2233)	1e- 160	422	65	
SDH (<i>A. thaliana</i>)	20540_1 (CCMP1329);	1e-57;	362;	43;	
	201278_1 (CCMP2233)	2e-55	342	42	

В транскриптомах *P. minimum* CCMP1329 и CCMP2233 были обнаружены гомологи транспортеров нитрат-ионов NRT1.2 и NRT2.1 (рисунок 14, а, б). Анализ первичной структуры показал наличие 13 предсказанных трансмембранных сегментов у белков NRT1.2 (Приложение, рисунок 1) и 10–12 предсказанных трансмембранных сегментов у белков NRT2.1 (Приложение, рисунок 2). Идентичность аминокислотных последовательностей NRT1.2 и NRT2.1 *P. minimum* и *A. thaliana* составляет приблизительно 21% и 23%, соответственно.

Также были обнаружены гомологи каналов CLC, идентичные референсной последовательности на 28% (рисунок 14, в) и содержащие 7–8 предсказанных трансмембранных сегментов (Приложение, рисунок 3). Выравнивание показало, что в позиции, имеющей определяющее значение для проведения ионов нитрата (Bergsdorf et al., 2009; Wege et al., 2010), последовательности *P. minimum* содержат остаток серина вместо остатка пролина, характерного для последовательности *A. thaliana*. Гомологи SLAC/SLAH каналов не были выявлены ни в одном из транскриптомов *P. minimum* (таблица 3).

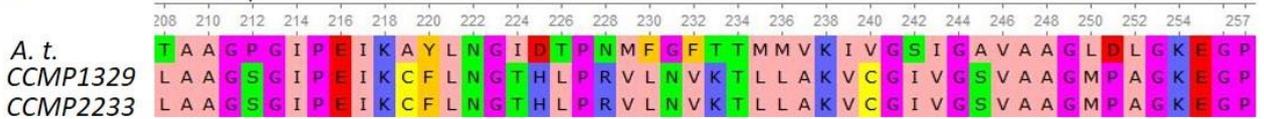
а



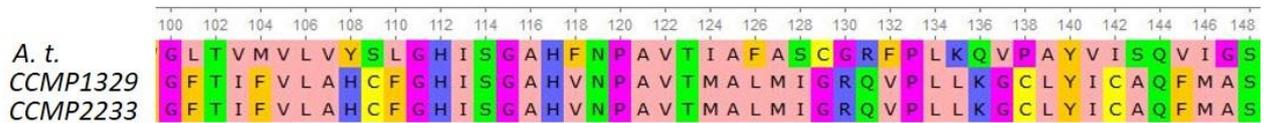
б



в



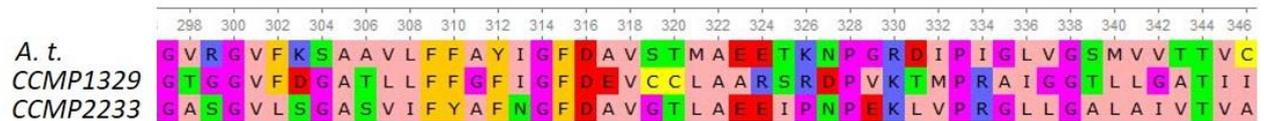
г



д



е



ж

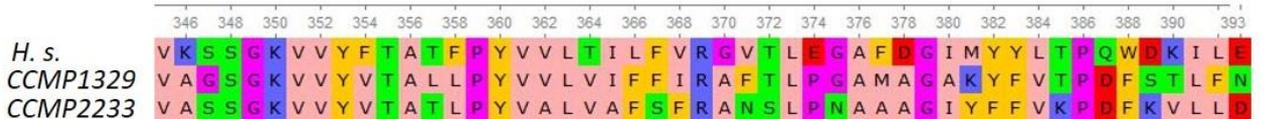
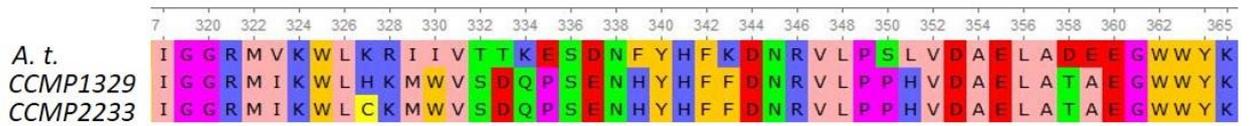


Рисунок 14. Результаты выравнивания аминокислотных последовательностей *P. minimum*, гомологичных белкам, вовлеченным в транспорт нитрат-ионов, мочевины и глицина, с референсными последовательностями. Показаны наиболее консервативные фрагменты выравниваний. **а** – транспортер нитрата NRT1.2; **б** – транспортер нитрата NRT2.1; **в** – канал CLC; **г** – аквапорин суперемейства MIP; **д** – транспортер мочевины DUR3; **е** – транспортер глицина CAT1; **ж** – транспортер глицина GLYT1(GLYT2). *CCMP1329* и *CCMP2233* – последовательности динофлагеллят *P. minimum* из двух соответствующих транскриптомов. *A. t.* –

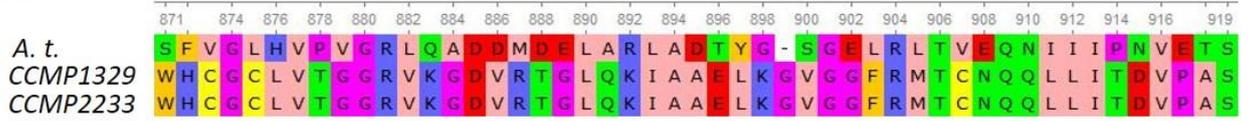
последовательности *A. thaliana*. *H. s.* – последовательность *H. sapiens*. Линейкой показаны номера позиций в выравнивании. Аминокислотные остатки выделены цветом в соответствии с цветовой схемой Zappo (Unipro UGENE 1.16.0): светло-розовый – алфатические/гидрофобные аминокислоты (ILVAM); оранжевый – ароматические (FWY); синий – положительно заряженные (KRH); красный – отрицательно заряженные (DE); зеленый – полярные (STNQ); пурпурный – пролин и глицин (PG); желтый – цистеин (C). Стрелкой отмечена позиция в выравнивании последовательностей CLC, определяющая селективность канала к ионам нитрата или хлора.

В настоящей работе обнаружено, что транскриптомы динофлагеллят *P. minimum* CCMP1329 и CCMP2233 содержат последовательности, гомологичные аквапоринам MIP и транспортерам DUR3, в то время как гомологи бактериальных и животных белков UAC, UT и SLC14, а также гомологи ABC транспортеров, проводящих мочевины, отсутствуют в этих транскриптомах (рисунок 14 г, д, таблица 3). В качестве последовательностей запроса для поиска гомологов аквапоринов MIP были использованы последовательности белков PIP, NIP и TIP *A. thaliana*, однако BLAST анализ выявлял одни и те же гомологи в ответ на все варианты запросов. Таким образом, на данном этапе нельзя сказать, какие именно аквапорины из суперсемейства MIP присутствуют в транскриптомах *P. minimum*. Идентичность последовательностей *P. minimum* референсным белкам *A. thaliana* составляет 23% в случае MIP и 53% в случае DUR3. Анализ первичной структуры показал, что гомологи аквапорина MIP предположительно имеют по 6 трансмембранных сегментов (Приложение, рисунок 4), а гомологи транспортера мочевины DUR3 – 16–18 трансмембранных сегментов (Приложение, рисунок 5).

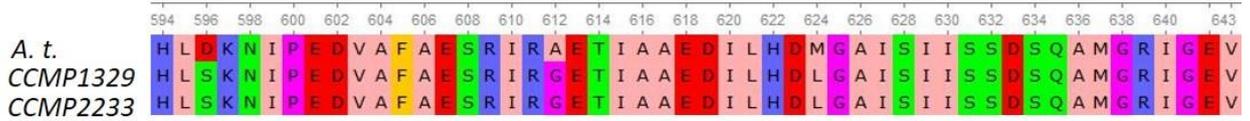
a



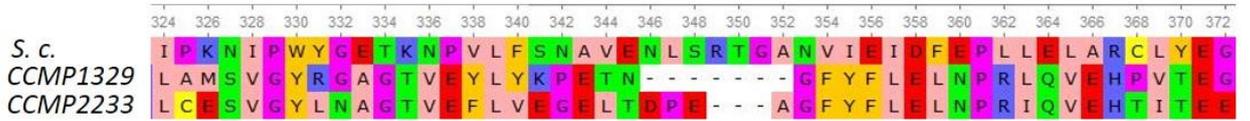
б



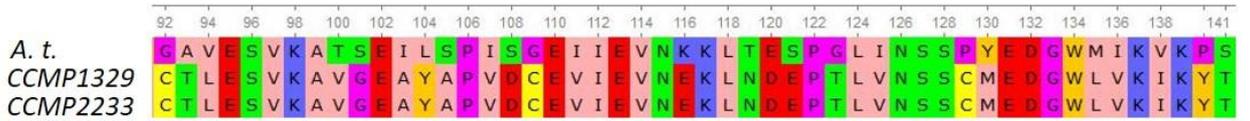
в



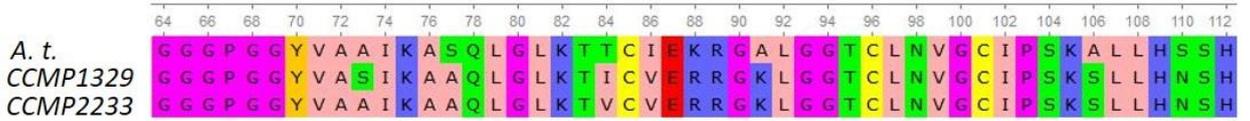
г



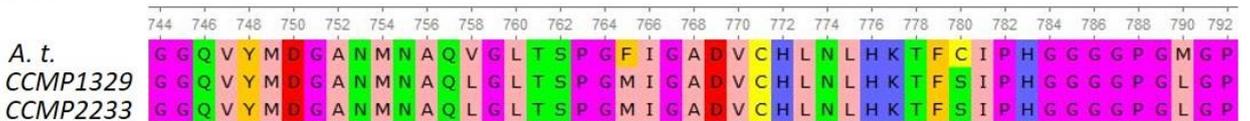
д



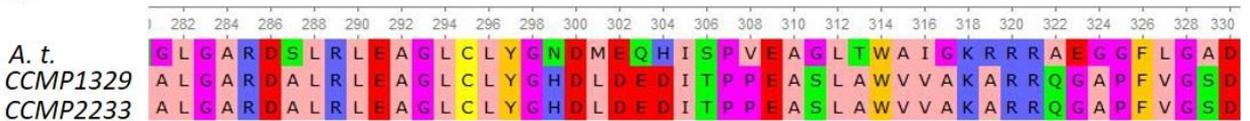
е



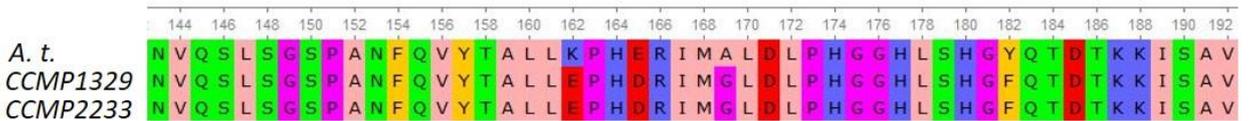
ж



з



и



к

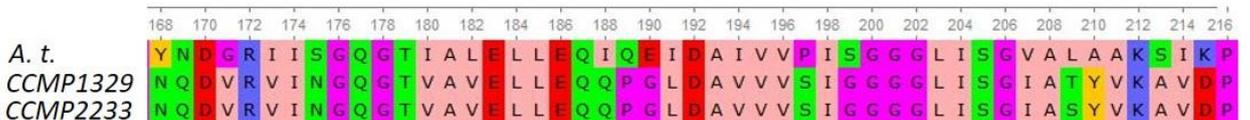


Рисунок 15. Результаты выравнивания аминокислотных последовательностей

P. minimum, гомологичных белкам, вовлеченным в ассимиляцию нитрат-ионов, мочевины и глицина, с референсными последовательностями. Показаны наиболее консервативные фрагменты выравниваний. **а** – ассимиляционная нитрат-редуктаза NAR; **б** – ассимиляционная нитрит-редуктаза NIR; **в** – уреазы URE; **г** – амидолиаза мочевины DUR1,2; **д** – H-белок (GDC); **е** – L-белок (GDC); **ж** – P-белок (GDC); **з** – T-белок (GDC); **и** – серин-гидроксиметилтрансфераза SHMT; **к** – серин дегидратаза SDH. *CCMP1329* *CCMP2233* – последовательности динофлагеллят *P. minimum* из двух соответствующих транскриптомов. *A.t.* – последовательности *A. thaliana*. *S. c.* – последовательность *S. cerevisiae*. Линейкой показаны номера позиций в выравнивании. Аминокислотные остатки выделены цветом в соответствии с цветовой схемой Zappo (Unipro UGENE 1.16.0): светло-розовый – алтфатические/гидрофобные аминокислоты (ILVAM); оранжевый – ароматические (FWY); синий – положительно заряженные (KRH); красный – отрицательно заряженные (DE); зеленый – полярные (STNQ); пурпурный – пролин и глицин (PG); желтый – цистеин (C).

В транскриптомах *P. minimum* были обнаружены гомологи последовательностей, кодирующих транспортеры глицина CAT1 и GLYT у растений и животных (таблица 3, рисунок 14 е, ж). Интересно, что не было найдено ни одного гомолога белков семейства AAP с E-value < 1e-20, хотя именно эти белки играют ключевую роль в транспорте аминокислот у растений (таблица 3). Идентичность последовательностей белков CAT1 *P. minimum* и *A. thaliana* составляет приблизительно 24%, последовательностей GLYT *P. minimum* и *H. sapiens* – 30–31%. В соответствии с анализом первичной структуры, последовательности CAT1 *P. minimum* предположительно имеют 14 (Приложение, рисунок 6), а последовательности GLYT – 11–12 трансмембранных сегментов (Приложение, рисунок 7).

При анализе транскриптомов *P. minimum* *CCMP1329* и *CCMP2233* были выявлены гомологи ферментов нитрат-редуктазы NAR и нитрит-редуктазы NIR, осуществляющих восстановление нитрат- и нитрит-ионов (таблица 3, рисунок

15 а, б). Их идентичность последовательностям *A. thaliana* равна 42% и 21–22%, соответственно.

Также в транскриптомах *P. minimum* найдены гомологи ферментов, осуществляющих расщепление мочевины, – уреазы URE и амидолиазы мочевины DUR1,2 (таблица 3, рисунок 14 в, г). Уреаза является очень консервативным белком и идентична референсной последовательности на 66%. В свою очередь, обнаруженные гомологи амидолиазы мочевины идентичны последовательности *S. cerevisiae* лишь на 10–11%. Последующее сравнение предсказанных консервативных доменов амидолиазы мочевины показало, что гомологи этого белка у *P. minimum* имеют структуру и порядок консервативных доменов, характерную не для амидолиазы мочевины, а для родственной этому ферменту Ацетил-КоА карбоксилазы (рисунок 16). Таким образом, обнаруженные гомологи с большой вероятностью не являются амидолиазой мочевины.

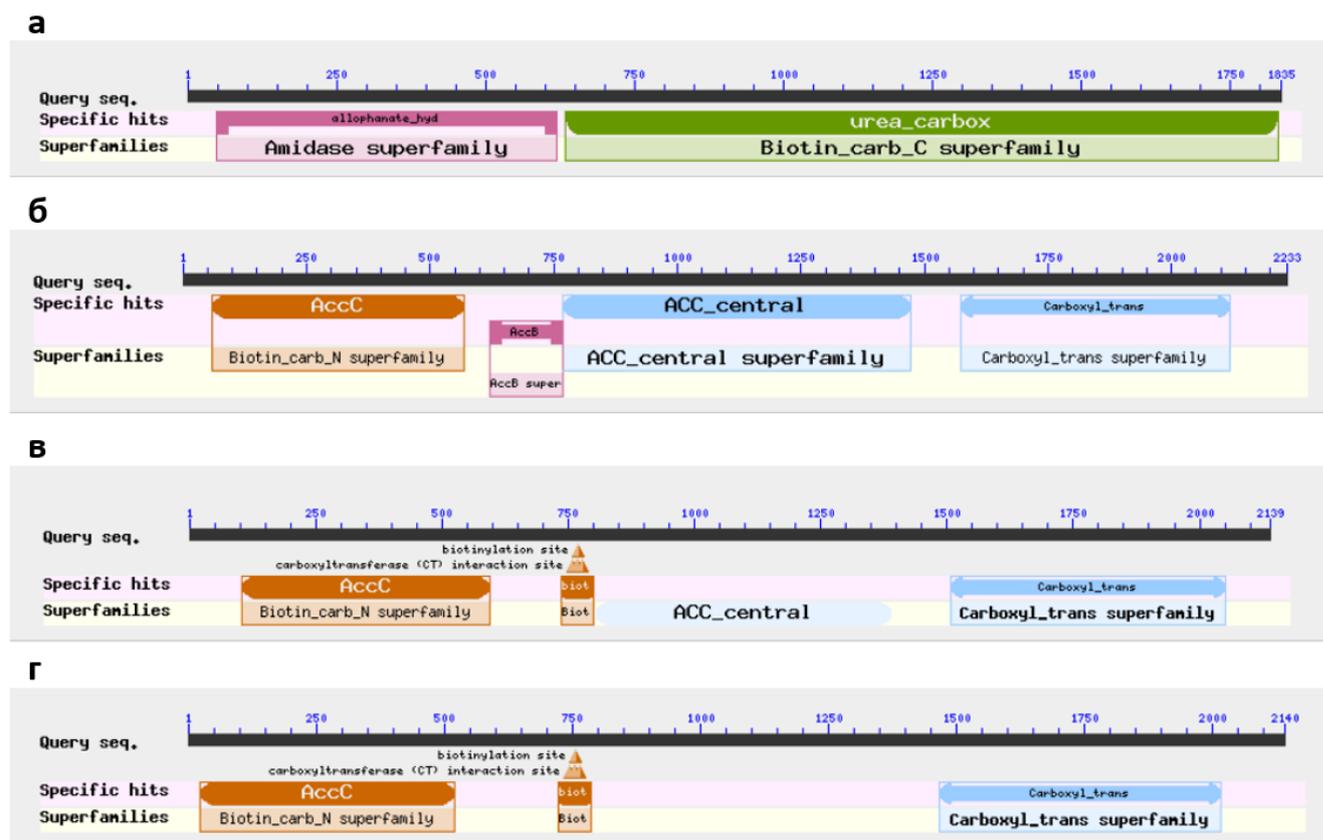


Рисунок 16. Сравнение доменной организации амидолиазы мочевины и ацетил-КоА карбоксилазы с их гомологом у *P. minimum*. а – амидолиаза мочевины

S. cerevisiae; **б** – ацетил-КоА карбоксилаза *S. cerevisiae*; **в** - ацетил-КоА карбоксилаза *Micromonas commoda*; **г** – гомолог амидолиазы мочевины *P. minimum* CCMP1329. Домен АссВ в последовательности ацетил-КоА карбоксилазы *S. cerevisiae* содержит в себе домен Biot.

Кроме того, у динофлагеллят *P. minimum* были найдены последовательности, предположительно кодирующие весь спектр белков комплекса декарбоксилирования глицина GDC (glycine decarboxylation complex), а также сопряженный с ним фермент серин-гидроксиметилтрансферазу SHMT (таблица 3, рисунок 15 д–к). Все белки комплекса GDC, кроме белка H, показали высокую идентичность белкам *H. sapiens*, превышающую 50%. Идентичность серин-гидроксиметилтрансферазы и референсной последовательности составляет 60–65%. Серин-дегидратаза SDH, катализирующая превращение серина в пируват с высвобождением ионов аммония, также была обнаружена у *P. minimum* (таблица, рисунок). Ее идентичность соответствующему белку *A. thaliana* составляет 42–43%.

3.4 Анализ поглощения мочевины, ионов нитрата и бикарбоната отдельными клетками динофлагеллят с помощью масс-спектрометрии вторичных ионов в наномасштабе (NanoSIMS)

3.4.1 Сопоставление данных, полученных с помощью измерений на уровне популяций и отдельных клеток

С помощью метода масс-спектрометрии вторичных ионов в наномасштабе (NanoSIMS) было исследовано поглощение нитрат-ионов, мочевины и ионов бикарбоната отдельными клетками динофлагеллят (Matantseva et al., 2016a, b). Проанализировано по 15–25 клеток из всех экспериментальных параллелей («мочевина», «нитрат», «только нитрат» и «контроль», не содержащий

искусственно добавленных изотопных меток) повторностей 5 и 6 (Приложение, таблицы 4, 5).

В целом, данные, полученные посредством анализа индивидуальных клеток, соответствуют данным, полученным на уровне популяций. Среднее поглощение азота мочевины одной клеткой было выше, чем среднее поглощение азота нитрат-ионов (критерий Манна-Уитни, $p < 0.001$; для обеих повторностей); при этом уровень поглощения нитрат-ионов в присутствии мочевины был ниже, чем уровень поглощения нитрат-ионов, наблюдаемый в параллели, куда мочевина не была добавлена (односторонний критерий Манна-Уитни, $p < 0.001$; для обеих повторностей) (рисунок 17 а, в).

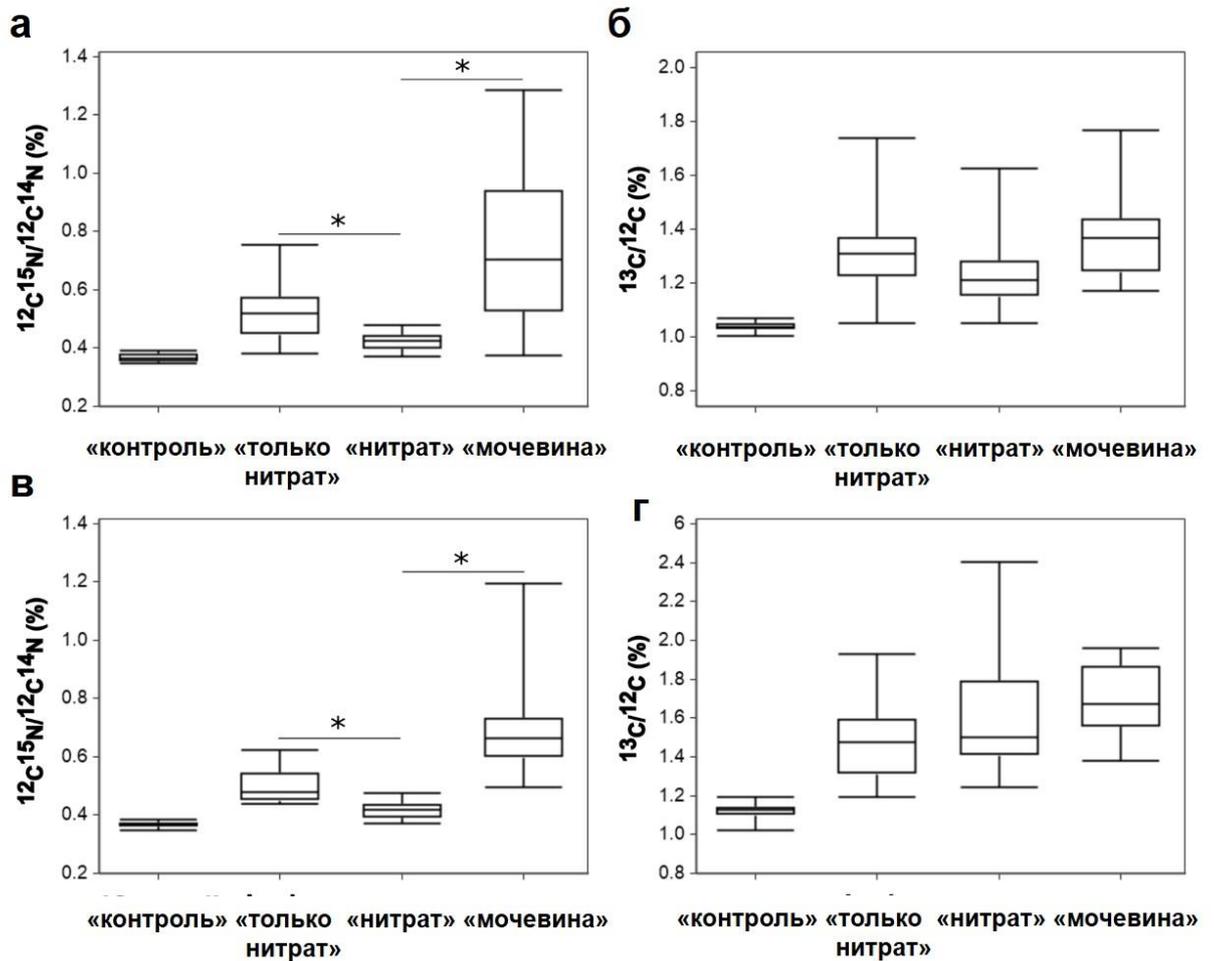


Рисунок 17. Поглощение азота нитрат-ионов и мочевины, а также углерода бикарбонат-ионов клетками динофлагеллят *P. minimum*, измеренное методом NanoSIMS: **а** – обогащение клеток изотопами ^{15}N в повторности 5; **б** - обогащение клеток изотопами ^{13}C в повторности 5; **в** - обогащение клеток изотопами ^{15}N в

повторности б; г - обогащение клеток изотопами ^{13}C в повторности б. Обогащение изотопами ^{15}N и ^{13}C представлено, как отношения $^{12}\text{C}^{15}\text{N}/^{12}\text{C}^{14}\text{N}$ и $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ соответственно. «Контроль» - параллель без добавления изотопных меток; «только нитрат» – ^{15}N -нитрат и ^{13}C -бикарбонат, поглощенные клетками в отсутствие мочевины; «нитрат» – ^{15}N -нитрат и ^{13}C -бикарбонат, поглощенные клетками в присутствии мочевины; «мочевина» - ^{15}N -мочевина и ^{13}C -бикарбонат, поглощенные клетками в присутствии нитрат-ионов. Показаны медианы, 25^й и 75^й перцентили, а также полный диапазон значений $^{12}\text{C}^{15}\text{N}/^{12}\text{C}^{14}\text{N}$ и $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$. Обогащение во всех экспериментальных параллелях значимо выше, чем в контроле (критерий Краскела-Уоллеса с пост-тестом Данна, $p < 0.05$). Звездочками отмечены значимые различия между параллелями «нитрат» и «только нитрат» (отражает подавление поглощения нитрат-ионов в присутствии мочевины) (критерий Манна-Уитни, $p < 0.001$), «нитрат» и «мочевина» (отражает предпочтительное поглощение мочевины в присутствии нитрата) (критерий Краскела-Уоллеса с пост-тестом Данна, $p < 0.05$, и критерий Манна-Уитни, $p < 0.001$).

Кроме того, как и в случае групповых измерений, данные NanoSIMS показали, что поглощение бикарбонат-ионов клетками *P. minimum* не изменялось при добавлении мочевины в среду (критерий Краскела-Уоллеса с пост-тестом Данна, $p > 0.5$) (рисунок 17 б, г).

Для того чтобы напрямую сопоставить результаты измерений на популяционном уровне и уровне отдельных клеток, они были представлены как относительная скорость поглощения азота. Для этого скорость поглощения азота нитрат-ионов как единственного источника азота была принята за единицу, а скорости конкурентного поглощения нитрат-ионов и мочевины были выражены относительно нее (рисунок 18). Как видно из рисунка, данные о поглощении азота, полученные путем измерения активности отдельных клеток динофлагеллят и последующего усреднения полученных значений, хорошо согласуются с данными, полученными в результате групповых измерений на уровне популяций.

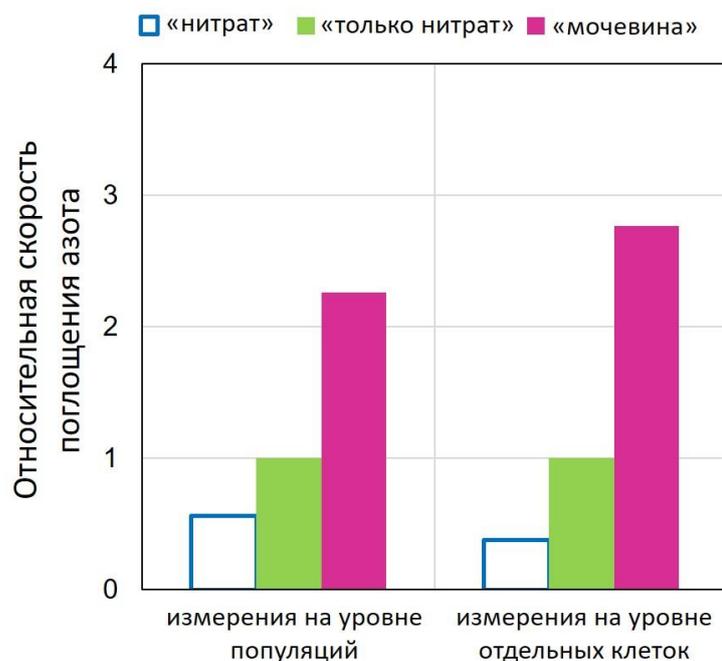


Рисунок 18. Средние значения относительных скоростей конкурентного поглощения нитрата и мочевины, а также поглощения нитрата в отсутствие мочевины, определенные с использованием измерений на уровне популяций и на уровне отдельных клеток методом NanoSIMS. Скорость поглощения азота нитрат-ионов в отсутствие мочевины была принята за единицу, относительно нее были выражены скорости конкурентного поглощения нитрат-ионов и мочевины. Приведены средние значения для экспериментальных повторностей 5 и 6.

3.4.2 Гетерогенность популяций *P. minimum* в отношении поглощения и ассимиляции питательных субстратов

Основным преимуществом масс-спектрометрии в наномасштабе является возможность измерения активности отдельно взятых клеток. В настоящей работе данный метод был применен с целью исследования гетерогенности популяций динофлагеллят *P. minimum* в отношении поглощения и ассимиляции мочевины, нитрат- и бикарбонат-ионов.

В ходе анализа было показано, что уровень поглощения азота и углерода отдельными клетками *P. minimum* существенно варьировал в пределах одной и той

же экспериментальной параллели («Мочевина», «Нитрат», «Только нитрат») (рисунки 17, а–г, 19, а–е), и эта гетерогенность не была связана с недостаточной точностью метода, так как значительно превышала погрешность измерений (рисунок 19, а, б).

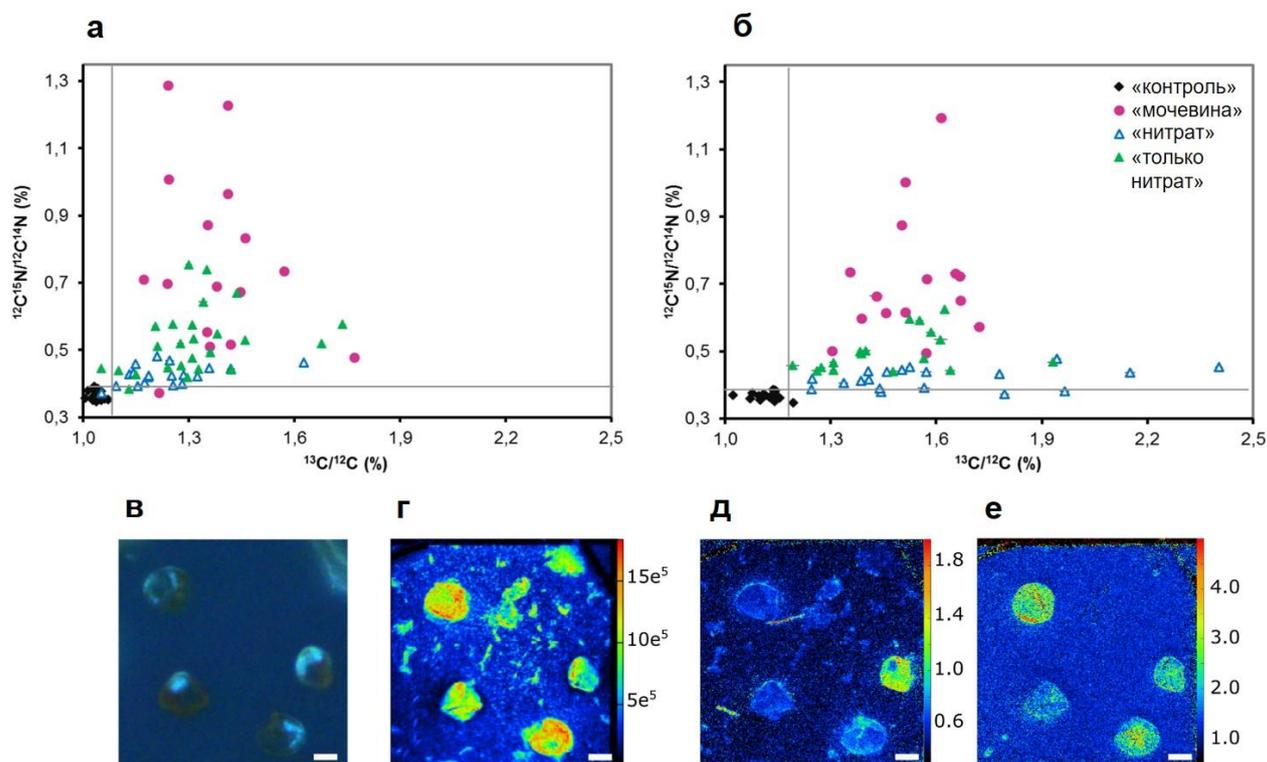


Рисунок 19. Гетерогенность популяций динофлагеллят *P. minimum* в отношении поглощения нитрат-ионов, мочевины и бикарбонат-ионов, выявленная методом NanoSIMS: **а** – обогащение отдельных клеток изотопами ^{15}N и ^{13}C , выраженное через отношения $^{12}\text{C}^{15}\text{N}/^{12}\text{C}^{14}\text{N}$ и $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, в каждой из экспериментальных параллелей повторности 5; **б** – обогащение отдельных клеток изотопами ^{15}N и ^{13}C , выраженное через отношения $^{12}\text{C}^{15}\text{N}/^{12}\text{C}^{14}\text{N}$ и $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, в каждой из экспериментальных параллелей повторности 6 («контроль» - параллель без добавления изотопных меток; «только нитрат» – ^{15}N -нитрат и ^{13}C -бикарбонат, поглощенные клетками в отсутствие мочевины; «нитрат» – ^{15}N -нитрат и ^{13}C -бикарбонат, поглощенные клетками в присутствии мочевины; «мочевина» - ^{15}N -мочевина и ^{13}C -бикарбонат, поглощенные клетками в присутствии нитрата; **в** –

микрофотография клеток *P. minimum* в УФ свете (здесь и далее показаны клетки из параллели «мочевина»); **г** – содержание вторичных ионов $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$, отражающее распределение биомассы на фильтре; **д** – поглощение ^{15}N -азота мочевины, выраженное через отношение $^{12}\text{C}^{15}\text{N}^-/^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$; **е** - поглощение ^{13}C -углерода бикарбоната, выраженное через отношение $^{13}\text{C}^-/^{12}\text{C}^-$. Отношения $^{12}\text{C}^{15}\text{N}^-/^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ и $^{13}\text{C}^-/^{12}\text{C}^-$ приведены в процентах (**г-е**). Планками показаны ошибки измерений методом NanoSIMS (в большинстве случаев они очень малы). Серые линии показывают максимальное содержание тяжелых изотопов ^{15}N и ^{13}C в клетках из контрольной параллели («контроль») без искусственного добавления изотопных меток.

Более того, разница в обогащении тяжелыми изотопами отдельных клеток из параллели, характеризующейся наименьшей активностью и, следовательно, наиболее близкими значениями обогащения для отдельных клеток («нитрат»), была подвергнута тщательному статистическому анализу в соответствии с рекомендациями Полерецкого с соавторами (Polerecky et al., 2012). В ходе данного анализа, значения обогащения тяжелыми изотопами каждого проанализированного слоя были использованы для расчета среднего значения обогащения и его стандартного отклонения для каждой клетки. Все полученные значения стандартных отклонений лежали в пределах измерительной погрешности метода. Статистическая значимость различий между средними значениями для отдельных клеток с близкими значениями обогащения тяжелыми изотопами была оценена посредством дисперсионного анализа, который показал, что различия между индивидуальными клетками были высоко значимыми (1-way ANOVA, $p < 0.0001$). Апостериорный анализ с использованием критерия Тьюки показал, что даже небольшие различия двух клеток в обогащении тяжелыми изотопами были значимы при 95% уровне доверия: различия в 0.00635% и 0.01547% в случае обогащения атомами ^{15}N и 0.03607% и 0.06317% – в случае обогащения атомами ^{13}C в экспериментальных повторностях 5 и 6, соответственно.

Чтобы доказать, что выявленная гетерогенность в обогащении клеток тяжелыми изотопами была связана именно с физиологической гетерогенностью, а не являлась следствием различного размера клеток, был предпринят корреляционный анализ, который не выявил корреляции между размерами клеток и их обогащением тяжелыми изотопами ^{15}N и ^{13}C во всех экспериментальных параллелях (корреляция Спирмана, $-0.304 \geq r \leq 0.004$, $p > 0.05$), кроме параллели «Нитрат», в случае которой наблюдалась очень слабая отрицательная корреляция между размером клеток и их обогащением атомами ^{13}C (корреляция Спирмана, $r = -0.383$, $p = 0.017$) (рисунок 20). Таким образом, различные уровни обогащения клеток тяжелыми изотопами не могли быть объяснены различиями в размерах клеток и были связаны с разницей в скорости поглощения и ассимиляции меченых питательных субстратов.

Самый высокий уровень поглощения питательного субстрата отдельными клетками превышал самый низкий наблюдаемый уровень в девять раз в случае мочевины, в семь раз в случае нитрат-ионов и в десять раз в случае бикарбонат-ионов (рисунок 19, а, б). В качестве относительного параметра описательной статистики, характеризующего гетерогенность популяции, был использован коэффициент вариации (CV). Для расчета коэффициента вариации CV_{N} и CV_{C} значения обогащения клеток изотопами ^{15}N и ^{13}C , соответственно, были нормированы на естественное распределение изотопов ^{15}N и ^{13}C путем вычитания из них среднего значения обогащения клеток из контрольной параллели, не содержащей искусственно добавленных тяжелых изотопов. Полученные коэффициенты вариации для всех экспериментальных параллелей приведены в таблице 4.

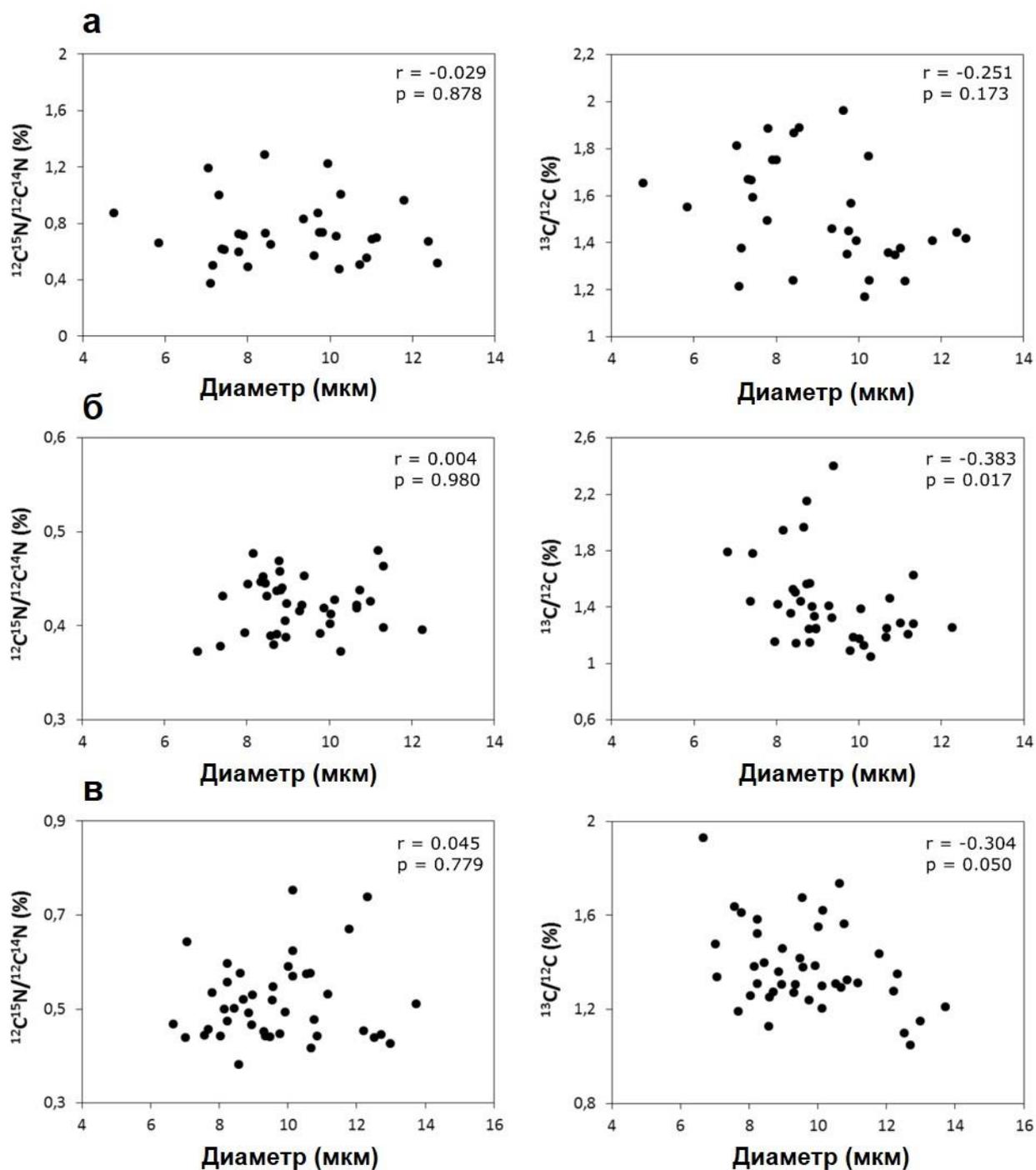


Рисунок 20. Корреляция между размером клеток *P. minimum* и их обогащением изотопами азота ^{15}N (слева) и изотопами углерода ^{13}C (справа): **а** – параллель «мочевина»; **б** – параллель «нитрат»; **в** – параллель «только нитрат». Размер клеток выражен как диаметр круга, содержащего то же количество пикселей, что и область интереса (ОИ), определенная в процессе обработки данных NanoSIMS.

Статистические данные приведены в правом верхнем углу каждого графика (корреляция Спирмана).

Таблица 4. Коэффициенты вариации как показатели гетерогенности популяции в отношении поглощения азота (CV_N) и углерода (CV_C), рассчитанные для каждой из экспериментальных параллелей.

Экспериментальная параллель	CV_N	CV_C
«Мочевина»	0.61 ± 0.09 (n = 2)	0.51 ± 0.17 (n = 4)
«Нитрат»	0.54 ± 0.05 (n = 2)	
«Только нитрат»	0.53 ± 0.12 (n = 2)	0.54 ± 0.02 (n = 2)

Примечательно, что не было обнаружено корреляции между конкурентным поглощением мочевины или нитрат-ионов и поглощением ионов бикарбоната (корреляция Спирмана, $r = -0.042$, $p = 0.824$ и $r = 0.175$, $p = 0.293$, соответственно) (рисунок 21, а, б), а статистически значимая корреляция между поглощением нитрат-ионов в отсутствие мочевины и поглощением бикарбонат-ионов была слабой (корреляция Спирмана, $r = 0.379$, $p = 0.013$) (рисунок 21, в). Иными словами, клетки, которые поглощали азот мочевины или нитрат-ионов с наибольшей скоростью не обязательно были самыми активными в отношении поглощения ионов бикарбоната.

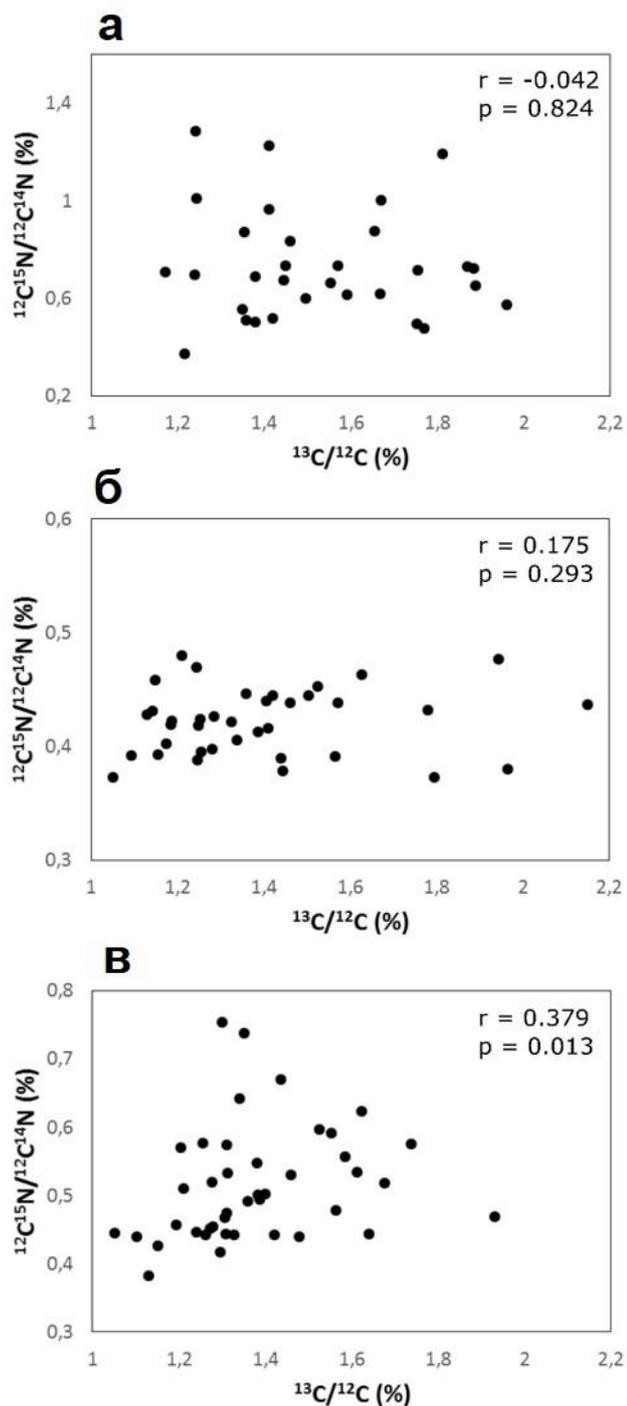


Рисунок 21. Корреляция между обогащением клеток *P. minimum* изотопами ^{13}C и ^{15}N : **а** – параллель «мочевина»; **б** – параллель «нитрат»; **в** – параллель «только нитрат». Статистические данные приведены в правом верхнем углу каждого графика (корреляция Спирмана).

Пожалуй, наиболее интересным результатом анализа методом NanoSIMS стало выявление того, что ингибирование поглощения ионов нитрата в присутствии мочевины не было одинаковым для разных клеток. Примерно у 30% клеток поглощение нитрат-ионов было полностью подавлено: обогащение таких клеток изотопами ^{15}N не отличалось от контроля (рисунок 19, а, б). Важно отметить, что подавляющее большинство таких клеток поглощало ионы бикарбоната, то есть они были метаболически активны. Около 50% клеток поглощали нитрат-ионы со скоростью, которая соответствовала наименьшей скорости поглощения этого аниона в отсутствие мочевины примерно половиной клеток в параллели «Только нитрат». Таким образом, нельзя исключать того, что у части клеток поглощение нитрата не было подавлено после добавления мочевины. При этом уровень поглощения мочевины некоторыми клетками не превышал уровня поглощения нитрат-ионов, несмотря на то, что средняя скорость поглощения мочевины динофлагеллятами, полученная путем усреднения значений для единичных клеток или групповых измерений, всегда была значительно выше средней скорости поглощения нитрат-ионов.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1 Мочевина и глицин как источники азота для динофлагеллят *P. minimum*

Способность динофлагеллят *P. minimum*, адаптированных к росту на нитрат-ионах, осуществлять транспорт мочевины и глицина в клетку уже в первые два часа после появления этих веществ в среде свидетельствует о наличии у них быстрого и эффективного механизма активации необходимых для этого белков. В соответствии с полученными на сегодняшний день данными, у многих видов динофлагеллят регуляция экспрессии генов, вовлеченных в ключевые клеточные процессы, осуществляется на посттранскрипционном уровне (Morse et al., 1989; Van Dolah et al., 2007; Brunelle, Van Dolah, 2011; Morey et al., 2011), что может значительно сокращать время, которое требуется для физиологического ответа на те или иные стимулы. Кроме того, возможно, белки, необходимые для транспорта и ассимиляции мочевины и глицина постоянно экспрессируются в клетках *P. minimum*. В пользу этого предположения говорят данные об уреазной активности у этого вида динофлагеллят. В нескольких независимых исследованиях было показано, что уровень уреазной активности не отличался у динофлагеллят *P. minimum*, выращенных на нитрате и мочеvine (Dyhrman, Anderson, 2003; Solomon, Glibert, 2008; Liu et al., 2015). Однако для быстрого ответа на поступление в среду нового источника азота также необходимо постоянное присутствие соответствующих транспортеров в плазматической мембране или их незамедлительная доставка в мембрану. В настоящее время данные об экспрессии транспортеров питательных субстратов у динофлагеллят крайне скудны. Недавно было показано, что белок-транспортер нитрата NRT2.1 присутствует в клетках динофлагеллят *Lingulodinium polyedrum* независимо от условий освещенности, хотя поглощение нитрат-ионов происходит преимущественно на свету (Bellefeuille, Morse, 2016).

В наших экспериментах клетки *P. minimum* поглощали поступивший азот мочевины и глицина с высокой скоростью даже в условиях изначально высокой

концентрации азота (нитрат-ионов) в среде. Таким образом, они с большой вероятностью будут поглощать азот этих органических субстратов и в естественных экосистемах, которые, как правило, характеризуются недостаточным содержанием азота, доступного для ассимиляции, а также в эвтрофированных водах, насыщенных антропогенными азотсодержащими соединениями. При этом, независимо от первоначального азотного статуса экосистемы (недостаток азота или его избыточное содержание), подобные поступления органических соединений в среду следует рассматривать как факторы, способствующие инициации и пролиферации цветений. В случае роста динофлагеллят, лимитированного по азоту, привнесение дополнительных источников этого элемента приведет к увеличению скорости роста популяции и скорости фиксации неорганического углерода. В случае роста динофлагеллят в условиях, характеризующихся избыточным содержанием азота, появление мочевины или глицина вызовет несбалансированное поглощение этих субстратов динофлагеллятами и запасание азота в их клетках. Разные виды динофлагеллят способны запасать как нитрат, так и мочевину (Flynn, 1990; Lomas, Glibert, 2000; Solomon, Glibert, 2008; Kopp et al., 2013); формирование запасов азота было косвенно показано и в настоящей работе. Нужно отметить, что внутриклеточные запасы могут играть важную роль в местообитаниях со спорадическими поступлениями азота: при снижении концентрации азотсодержащих субстратов в среде, внутриклеточные запасы могут служить источником азота для поддержания скорости роста популяции (Fujita, 1985; Smauda, 1997). В этом случае, несмотря на недостаточное содержание азота в воде, может наблюдаться пролиферация цветения.

В лабораторных экспериментах с монокультурой динофлагеллят *P. minimum* было продемонстрировано, что мочевина является предпочтительным источником азота для этих микроорганизмов по сравнению с нитрат-ионами, когда оба субстрата присутствуют в равном по азоту количестве в условиях избыточного содержания азота в среде (Matantseva et al., 2016a). Эти данные согласуются с исследованиями, проведенными на природных сообществах фитопланктона во время цветения *P. minimum*, которые показали, что максимальные скорости

поглощения мочевины превышали максимальные скорости поглощения нитрата (Fan et al., 2003b). Примечательно, что в наших экспериментах скорость поглощения мочевины, выраженная через массу азота, превышала скорость конкурентного поглощения нитрат-ионов приблизительно в 2 раза, в то время как молярные скорости поглощения этих субстратов были равны (рисунок 7, а, б). Это свидетельствует о том, что поглощение мочевины, каждая молекула которой содержит два атома азота, более выгодно по сравнению с поглощением ионов нитрата с точки зрения затрат энергии, необходимых для транспорта одного и того же количества азота в клетку. В свою очередь, глицин, содержащий лишь один атом азота, также поглощался клетками со скоростью, превышающей скорость транспорта ионов нитрата в два раза (рисунок 8, а, б). Более высокая скорость поглощения глицина может быть связана как с большим количеством транспортеров этого вещества в мембране, так и с большей скоростью работы этих транспортеров.

Взаимоотношения между поглощением различных источников азота изучены недостаточно. Известно, что ионы аммония ингибируют поглощение нитрат-ионов динофлагеллятами *P. minimum* (Lomas, Glibert, 1999; Glibert et al., 2016) и поглощение мочевины динофлагеллятами *Alexandrium catenella* (Jauzein et al., 2008), но до сих пор не было получено информации о влиянии мочевины и глицина на конкурентное поглощение ионов нитрата. В настоящей работе впервые показано, что поглощение ионов нитрата клетками динофлагеллят *P. minimum* частично подавляется в присутствии мочевины (Matantseva et al., 2016a). Эти результаты согласуются с данными об ингибирующем действии мочевины на активность фермента нитрат-редуктазы у динофлагеллят *Akashiwo sanguinea* (Liu et al., 2015). Таким образом, мочевина влияет на процесс ассимиляции нитрат-ионов как на стадии его ферментативного восстановления, так и на стадии транспорта в клетки. Мочевина может напрямую влиять на работу транспортеров нитрат-ионов, поскольку и транспортеры мочевины DUR3, и транспортеры нитрата NRT2, обнаруженные в транскриптомах *P. minimum*, функционируют как ко-транспортеры с протонами H^+ и таким образом конкурируют за энергию

протонного электрохимического потенциала (Liu et al., 2003; Miller et al., 2007; Wang et al., 2010). Экспериментально было показано, что уменьшение трансмембранного потенциала ведет к снижению аффинности транспортеров NRT2 у растений (Zhou et al., 1998). Таким образом, активация транспортеров DUR3 в присутствии мочевины может приводить к снижению эффективности функционирования транспортеров нитрат-ионов. Кроме того, поглощение ионов нитрата может быть подавлено не мочевиной как таковой, а ионами аммония, высвобождающимися в процессе ее ассимиляции, так как ингибирующее действие ионов аммония на транспорт нитрат-ионов было показано ранее (Lomas, Glibert, 1999; Glibert et al., 2016). В транскриптомах *P. minimum* обнаружены последовательности, кодирующие фермент уреазу, осуществляющий расщепление мочевины с образованием двух ионов NH_4^+ (Mobley et al., 1995; Strobe et al., 2011), в результате чего во время роста на мочеvine внутриклеточная концентрация ионов аммония может быть довольно высокой.

4.2 Роль мочевины и глицина как источников углерода для *P. minimum*

Фотосинтезирующие динофлагелляты, без сомнения, используют растворенные органические вещества в качестве источников азота для биосинтетических процессов, однако роль углерода этих веществ в их питании изучена недостаточно. В отличие от азота, углерод постоянно присутствует в морской воде, главным образом, в неорганической форме бикарбонат-ионов в очень высокой концентрации – 2–2.2 ммоль л^{-1} (Stoll et al., 2001), поэтому он никогда не лимитирует рост микроорганизмов, осуществляющих фотосинтез. Тем не менее, вопрос о том, являются ли растворенные органические вещества дополнительным источником углерода для миксотрофных протистов, остается открытым.

Мы использовали мочевины и глицин, меченые стабильными изотопами ^{13}C , чтобы проследить судьбу углерода этих веществ. Эксперименты показали, что и углерод мочевины, и углерод глицина, поглощенные клетками, составляли не более

0.5–1.5% от неорганического углерода, поглощенного ими в форме бикарбонат-ионов (таблица 2). При этом было обнаружено, что клетки *P. minimum* ассимилировали в 20 раз меньше углерода мочевины и в 14 раз меньше углерода глицина по сравнению с уровнем ассимиляции, ожидаемым в соответствии со структурой их молекул (рисунки 7, 8). Если бы углерод и азот этих веществ ассимилировались в равной степени, то отношение поглощенного азота к углероду составляло бы 2:1 в случае мочевины и 1:2 в случае глицина. Таким образом, в настоящей работе показано, что азот и углерод мочевины и глицина ассимилируются клетками *P. minimum* в разной степени, то есть происходит разобщение ассимиляции азота и углерода этих органических субстратов. Разобщение ассимиляции азота и углерода мочевины и глицина, вероятно связано с метаболизмом этих соединений в клетках динофлагеллят.

Динофлагелляты способны расщеплять мочевину на углекислый газ (ионы бикарбоната) и ионы аммония. Реакция с образованием данных продуктов катализируется ферментом уреазой и амидолиазой мочевины (или гомологичным ей комплексом из двух белков – амидазы и карбоксилазы мочевины) (Moblely et al., 1995; Strobe et al., 2011; Witte, 2011). В литературе эту реакцию часто называют уреазной на основании того, что уреазы шире распространены среди одноклеточных эукариотов, чем амидолиаза мочевины и гомологичные ей ферменты амидаза и карбоксилаза мочевины (Fan et al., 2003a; Solomon, Glibert, 2008). Тем не менее, до сих пор белок, катализирующий расщепление мочевины свободноживущими динофлагеллятами, не был идентифицирован. В настоящей работе с помощью анализа транскриптомов динофлагеллят *P. minimum* показано, что они действительно обладают уреазой (таблица 3, рисунок 15, в). В результате гидролиза мочевины, осуществляемого этим ферментом (Roop, Levenberg, 1972; Solomon et al., 2010), углерод мочевины высвобождается в форме CO_2 (HCO_3^-) и покидает клетку, смешиваясь с неорганическим углеродом, содержащимся в морской воде (рисунок 22, а).

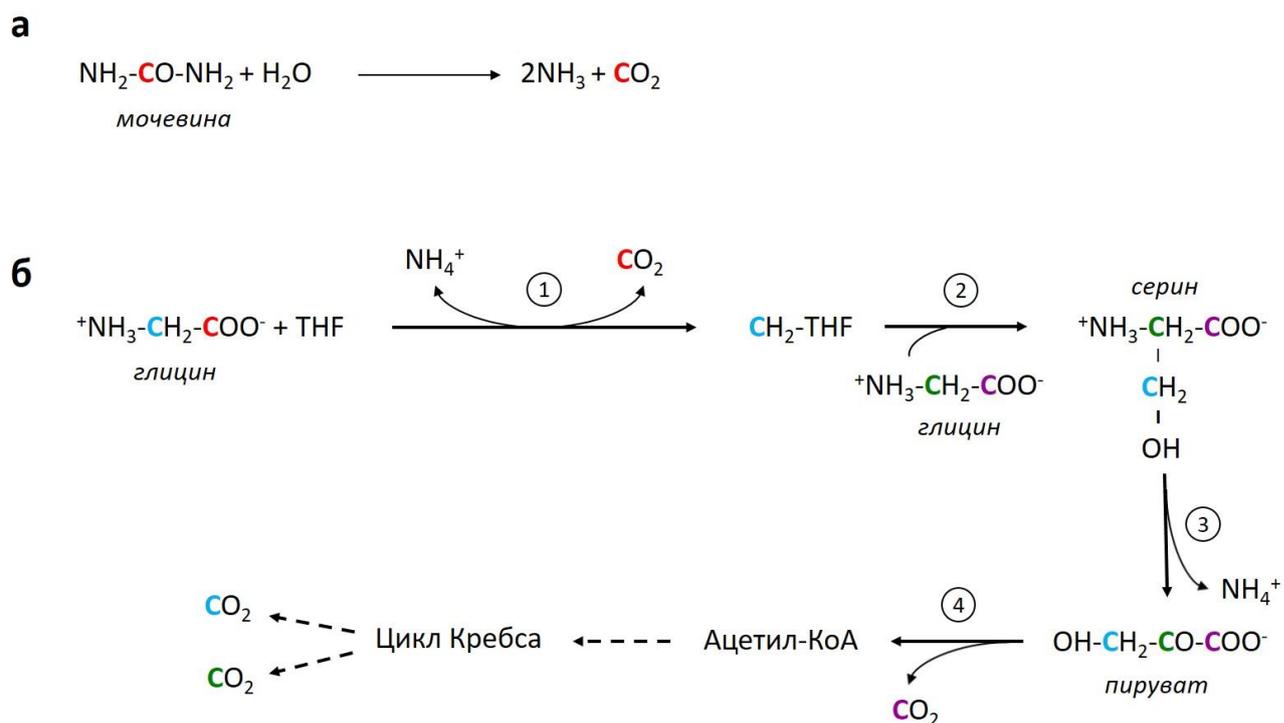


Рисунок 22. Пути метаболизма мочевины (а) и глицина (б) у *P. minimum* в соответствии с транскриптомными данными. Красным и фиолетовым обозначены первые атомы углерода, голубым и зеленым – вторые. (1) – ферменты комплекса декарбоксилирования глицина; (2) – серин-гидроксиметилтрансфераза; (3) - серин-дегидратаза (серин-рацемаза); (4) – пируватдегидрогеназный комплекс. THF – тетрагидрофолат.

В ходе метаболизма глицина с помощью белков комплекса декарбоксилирования глицина также происходит образование неорганического углерода из углерода карбонильной группы глицина (рисунок 22, б) (Douce et al., 2001; Schulze et al., 2016), что, вероятно, является причиной более низкого уровня ассимиляции этого атома углерода (C₁) по сравнению со вторым. Второй атом углерода глицина (C₂) в результате реакции с еще одной молекулой глицина оказывается в составе серина; данная реакция катализируется серин-гидроксиметилтрансферазой. В свою очередь, серин является субстратом для серин-дегидратазы, или серин-рацемазы, катализирующей образование пирувата с высвобождением еще одного иона аммония (рисунок 22, б) (Hildebrandt et al., 2015). Пируват может быть вовлечен в различные биохимические пути, одним из которых

является его окисление до ацетил-КоА пируватдегидрогеназным комплексом белков, с последующим окислением ацетил-КоА в цикле трикарбоновых кислот. Атом углерода в неорганической форме, высвобождающийся в ходе окисления пирувата до ацетил-КоА, происходит из первого атома углерода (C_1) молекулы глицина (рисунок 21, б), что также ведет к более низкому уровню ассимиляции атома карбонильной группы глицина клетками динофлагеллят.

Разобщение ассимиляции азота и углерода органических питательных субстратов имеет большое экологическое значение. Клеткам необходимо получать определенное количество азота для поддержания роста и пролиферации, и в случае динофлагеллят источниками этого азота могут быть как неорганические, так и органические соединения. По сравнению с ростом на неорганических источниках азота, рост фотосинтезирующих динофлагеллят на мочеvine или глицине может приводить к снижению эффективности выведения неорганического углерода из окружающей среды, поскольку неорганический углерод высвобождается из клетки в процессе метаболизма этих веществ (таблица 5).

Иными словами, разобщенная ассимиляция азота и углерода мочевины и глицина представляет собой дополнительный путь минерализации органического вещества, напрямую не связанный с дыханием. Принимая во внимание повсеместную эвтрофикацию прибрежных экосистем, ведущую к повышению концентрации растворенных органических веществ в воде и распространению динофлагеллят, а также предпочтительное использование некоторыми динофлагеллятами азота глицина и мочевины по сравнению с ионами нитрата, следует ожидать, что данный путь минерализации растворенных органических веществ может приобрести большее значение в будущем. Таким образом, рост фотосинтезирующих динофлагеллят на мочеvine и глицине в качестве источников азота следует рассматривать, как фактор, оказывающий существенное влияние на локальные и глобальный циклы углерода.

Таблица 5. Расчетное снижение эффективности выведения неорганического углерода клетками *P. minimum* из окружающей среды при росте на органических субстратах по сравнению с ростом на неорганическом источнике азота. Значения скоростей поглощения приведены для соотношения азота и углерода, поступающих в клетку, равного 10:1, и соответствуют диапазону экспериментально полученных данных; коэффициенты k определены экспериментально и показывают, какая часть углерода мочевины и глицина ассимилируется клетками по сравнению с теоретически ожидаемым уровнем ассимиляции.

Субстрат	Скорость поглощения $C_{\text{неорг.}}$ (фмоль кл ⁻¹ ч ⁻¹)	Скорость поглощения N (фмоль кл ⁻¹ ч ⁻¹)	k	Скорость высвобождения $C_{\text{неорг.}}$ (фмоль кл ⁻¹ ч ⁻¹)	Снижение эффективности выведения $C_{\text{неорг.}}$ из среды
Нитрат-ионы	200	20	—	—	—
Мочевина	200	20	1/20	9.5	~ 5%
Глицин	200	20	1/14	37.2	~ 19%

Кроме того, данные о низкой степени ассимиляции углерода органических веществ клетками *P. minimum* указывают на то, что мочевина и глицин, меченые тяжелыми изотопами углерода, должны с осторожностью использоваться исследователями при изучении скорости поглощения этих субстратов динофлагеллятами, так как такой подход приведет к значительно заниженным значениям измеренной скорости.

4.3 Белки *P. minimum*, вовлеченные в трансмембранный транспорт и ассимиляцию нитрат-ионов, мочевины и глицина

В настоящей работе в результате анализа транскриптомов *P. minimum* показано, что эти динофлагелляты обладают несколькими типами белков, вовлеченных в трансмембранный транспорт и ассимиляцию нитрат-ионов, мочевины и глицина (рисунки, 14, 15, 23, таблица 3). Среди них есть транспортеры, осуществляющие активный транспорт этих соединений, каналы и аквапорины, участвующие в их пассивном трансмембранном транспорте, а также ферменты, ответственные за метаболизм нитрат-ионов, мочевины и глицина в клетке. Все обнаруженные последовательности значимо гомологичны последовательностям запроса. При этом количество предсказанных трансмембранных сегментов у последовательностей, кодирующих белки-транспортеры, аквапорины и каналы (Приложение, рисунки 1–7), согласуется с количеством трансмембранных сегментов, характерным для структурно охарактеризованных гомологов этих белков (Jentsch et al., 1995; Galván, Fernández, 2001; Liu et al., 2003a; Hosoya et al., 2010; Witte, 2011).

В целом, выявленный набор белков *P. minimum* соответствует основным белкам, опосредующим транспорт и ассимиляцию исследуемых субстратов у растений. Однако, помимо белков, характерных для растений, у *P. minimum* также были обнаружены гомологи транспортеров глицина GLYT, функционирующие в клетках нервной системы животных (рисунок 14, ж, таблица 3). В то же время, у *P. minimum* не были найдены гомологи важнейших растительных транспортеров глицина – белков AAP – с E-value $<10^{-20}$ (таблица 3).

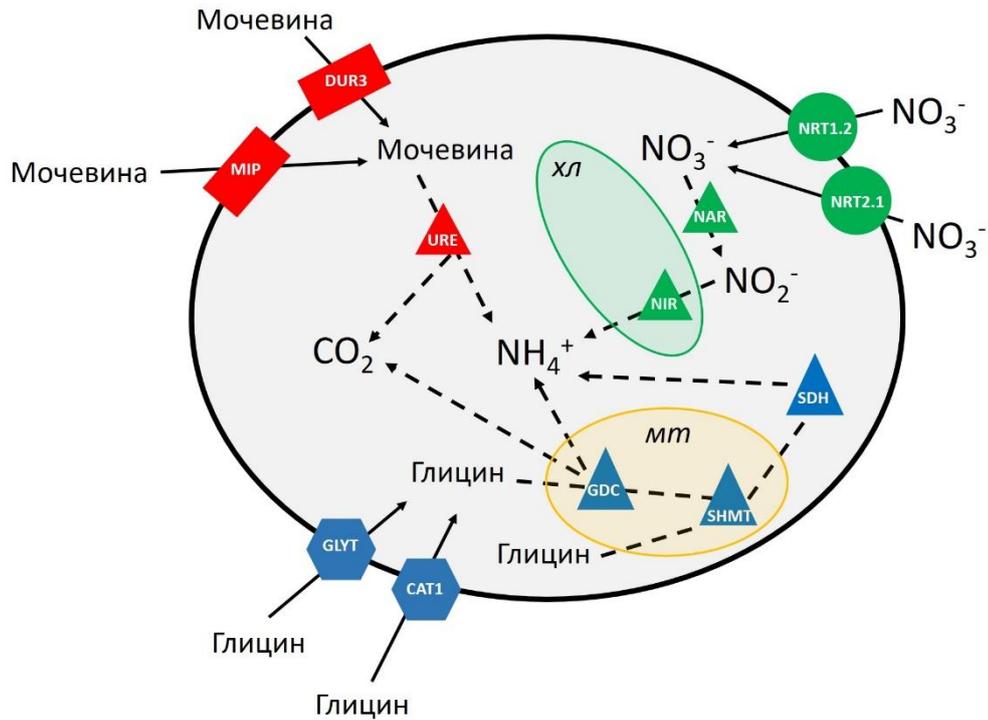


Рисунок 23. Обобщающая схема предположительных путей транспорта и ассимиляции нитрат-ионов, мочевины и глицина клетками динофлагеллят *P. minimum*, выявленных на основании анализа транскриптомных данных. Стрелками показан трансмембранный транспорт, пунктирными стрелками – ферментативные реакции, ведущие к высвобождению ионов аммония и углерода в неорганической форме. Зелены круги – транспортеры нитрата NRT1.2 и NRT2.1, красные прямоугольники – транспортер мочевины DUR3 и аквапорин суперсемейства MIP, синие шестиугольники – транспортеры глицина GLYT и CAT1, зеленые треугольники – нитрат-редуктаза NAR и нитрит-редуктаза NIR, красный треугольник – уреаза URE, синие треугольники – комплекс белков декарбоксилирования глицина GDC, серин-гидроксиметилтрансфераза SHMT, серин-дегидратаза SDH, *хл* – хлоропласт, *mt* – митохондрия.

Важно отметить, что обнаруженные нами гомологи каналов CLC, вероятно, не вовлечены в транспорт ионов нитрата, как это показано для многих каналов CLC растений, поскольку вместо остатка пролина в положении 160 (по последовательности *A. thaliana*) они содержат остаток серина (рисунок 14, в).

Известно, что аминокислотный остаток в этом положении играет ключевую роль в определении селективности канала CLC. Так, остаток серина занимает это положение в последовательностях CLC каналов животных, не проводящих ионы нитрата и являющихся хлорными каналами (Bergsdorf et al., 2009; Wege et al., 2010). Кроме того, выявленные в транскриптомах *P. minimum* гомологи амидолиазы мочевины дрожжей (рисунок 15, г) также, вероятно, не являются этим ферментом. Об этом свидетельствует как их низкая идентичность референсной последовательности (таблица 3), так и порядок и организация предсказанных доменов, в большей мере соответствующие структуре ацетил-КоА карбоксилазы (рисунок 16). Амидолиаза мочевины, а также гомологичные ее доменам амидаза и карбоксилаза мочевины действительно представляют собой белки, родственные ацетил-КоА карбоксилазе (Strope et al., 2011), что объясняет гомологию обнаруженных нами последовательностей *P. minimum* с амидолиазой мочевины.

4.4 Гетерогенность популяций *P. minimum* в отношении поглощения питательных субстратов

С момента появления метода NanoSIMS, позволяющего определять изотопный состав отдельных клеток, его возможности были успешно применены для выявления функций некультивируемых микроорганизмов в смешанных сообществах (Kuipers and Jørgensen, 2007; Foster et al., 2011; Krupke et al., 2013; Gao et al., 2015). Значительно меньше внимания было уделено исследованиям функциональной гетерогенности популяций одного и того же экологически значимого вида микроорганизмов, хотя, в соответствии с современными представлениями, межклеточная вариабельность является универсальным свойством всех клеточных популяций, имеющих множество биологически значимых следствий (Junker, van Oudenaarden, 2014).

Представленные в настоящей работе данные об уровне поглощения мочевины, нитрат- и бикарбонат-ионов отдельными клетками динофлагеллят

P. minimum свидетельствуют о высокой гетерогенности их популяций в этом отношении (во всех случаях коэффициенты вариации превышали 50%). Обнаруженная гетерогенность популяций *P. minimum* не связана ни с погрешностью измерений (рисунок 19), ни с размером клеток (рисунок 20), ни с их общей метаболической активностью (рисунок 21) и стадией клеточного цикла, поскольку известно, что в начале/середине светового периода более 90% клеток в культурах фотосинтезирующих динофлагеллят находятся в одной и той же фазе клеточного цикла G0/G1 (Van Dolah, Leighfield, 1999; Skarlato et al., 2017). Кроме того, в экспериментах использовалась поверхностная фракция активно плавающих динофлагеллят, тогда как синтез ДНК и деление их клеток происходят, главным образом, в донной фракции культуры.

Ранее было показано, что в естественных экосистемах для единичных клеток бактерий *Chlorobium clathratiforme* характерен широкий диапазон скоростей поглощения аммония и неорганического углерода. В числе возможных причин метаболической вариабельности клеток *Ch. clathratiforme* были названы генетическая гетерогенность, типичная для природных бактериальных популяций, и гетерогенность, связанная с микроокружением отдельных клеток (Musat et al., 2008). В другом исследовании была обнаружена выраженная гетерогенность природных популяций бактерий *Ch. phaeobacteroides*, на основании чего авторами был сделан вывод о необходимости исследований этого явления с точки зрения экологической микробиологии (Zimmermann et al., 2015). В случае эукариотических микроорганизмов, Траллером и Хильдербрандом (Traller, Hildebrand, 2013) была зарегистрирована гетерогенность популяции диатомовых водорослей *Cyclotella cryptica* в отношении внутриклеточного накопления липидов и содержания пигментов. Исследование показало, что групповые измерения каких-либо физиологических параметров должны интерпретироваться с осторожностью.

В основе межклеточной вариабельности в скорости поглощения питательных субстратов отдельными клетками *P. minimum*, выявленной в настоящей работе, может лежать несколько причин. Во-первых, условия среды в периодических культурах, использованных в экспериментах, могли быть негомогенными, а

распределение добавленных изотопных меток – неравномерным. Однако это маловероятно, поскольку после добавления субстратов, меченых стабильными изотопами, а также в течение последующей инкубации культуры тщательно перемешивались. Во-вторых, различия в активности отдельных клеток могут объясняться стохастическими процессами во время экспрессии генов. Исследования, проведенные на бактериальных модельных объектах, показали, что даже для изогенных популяций, культивируемых в идентичных условиях среды, характерна вариабельность физиологических параметров на уровне отдельных клеток (Lidstrom, Конопка, 2010). Наконец, нельзя исключать того, что гетерогенность популяций динофлагеллят – это регулируемое адаптивное свойство, находящееся под контролем различных факторов среды, а также функционального состояния отдельных клеток, связанного с их возрастом и стадией клеточного цикла (Elowitz et al., 2002; Martins, Locke, 2015). В любом случае, независимо от изначальных причин такой гетерогенности, она должна быть связана с разницей в уровне экспрессии и активности транспортеров мочевины, нитрата и бикарбоната и/или с экспрессией разных наборов транспортеров этих субстратов в разных клетках. Действительно, в транскриптомах *P. minimum* были обнаружены гомологи различных типов белков, отвечающих за транспорт мочевины и нитрат-ионов (таблица 3), характеризующихся различной аффинностью к соответствующим субстратам у растений и зеленых водорослей (Galvan, Fernández, 2001; Mérigout et al., 2008; Sun et al., 2014).

Несмотря на то что исследования гетерогенности клеточных популяций начались сравнительно недавно и это явление еще недостаточно изучено, уже сейчас существуют свидетельства того, что такая гетерогенность приобретает особое значение при изменениях условий среды, а также под воздействием стресса (Kussell, Leibler, 2005; Acar et al., 2008). Например, именно благодаря гетерогенности бактериальных популяций, некоторые клетки способны переживать воздействие факторов среды, губительных для большей части популяции (Booth, 2002). В недавних работах продемонстрировано, что степень гетерогенности популяций бактерий *Klebsiella oxytoca* в отношении скорости

фиксации азота и зеленых водорослей *Chlamydomonas reinhardtii* в отношении содержания липидов и пигментов возрастает в условиях азотного лимитирования (Krismer et al., 2016; Schreiber et al., 2016). По этой причине гетерогенность представляет собой важнейшее свойство природных популяций микроорганизмов, населяющих местообитания с часто и непредсказуемо меняющимися условиями.

Эксперименты, проведенные в рамках настоящего исследования, показали, что в культурах динофлагеллят *P. minimum* присутствовало несколько типов клеток, имеющих различия в стратегии питания. Обнаруженная физиологическая гетерогенность популяций динофлагеллят вообще и *P. minimum* в частности, вероятно, предоставляет им существенное конкурентное преимущество в естественных прибрежных экосистемах. С одной стороны, в гетерогенной популяции всегда присутствуют клетки, которые способны использовать новые источники биогенных элементов сразу после их появления в среде. С другой стороны, в среде, в которой доступны разные формы питательных субстратов, гетерогенность популяции может ослаблять внутривидовую конкуренцию за них (Menden-Deuer, Rowlett, 2014).

Еще один немаловажный аспект гетерогенности популяций микроорганизмов связан с тем, что ответ популяции на какой-либо фактор среды не является простой суммой одинаковых ответов всех клеток, составляющих ее. В настоящее время этот аспект практически полностью игнорируется при экосистемном моделировании, хотя он может иметь решающее значение для моделирования динамики популяций, которые традиционно рассматриваются как гомогенные. В одних и тех же условиях среды динамика (характер роста и пролиферации) гомогенной и гетерогенной популяций может быть существенно различной, поскольку каждая из функциональных групп внутри гетерогенной популяции может демонстрировать свою собственную динамику (рисунок 24). В предельном случае динамика всей популяции определяется динамикой роста и пролиферации каждой из клеток, составляющих ее.

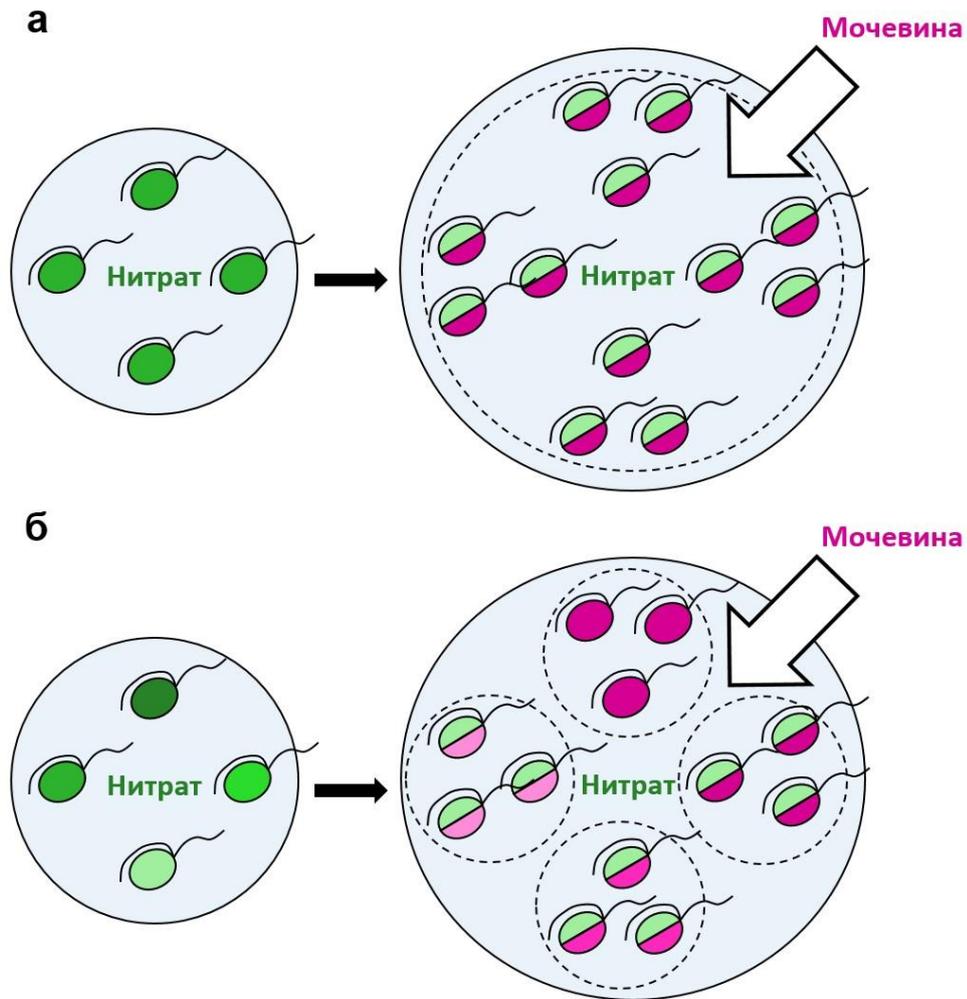


Рисунок 24. Ответ популяций *P. minimum*, растущих на нитрат-ионах, на появление мочевины в среде: **а** – гомогенная популяция; **б** – гетерогенная популяция. Динофлагелляты, растущие на нитрат-ионах, начинают поглощать мочевины сразу после ее появления в среде, что приводит к росту популяции. Зеленым цветом показано поглощение ионов нитрата, розовым – поглощение мочевины. Интенсивность оттенка отражает интенсивность поглощения субстрата. В гомогенной популяции (**а**) все клетки демонстрируют одинаковую стратегию питания (поглощение азота мочевины преобладает над поглощением азота нитрат-ионов), а популяция подчиняется единой динамике. В гетерогенной популяции (**б**) клетки демонстрируют различные стратегии питания, формируя несколько функциональных групп, каждая из которых характеризуется собственной динамикой. При этом средние значения скоростей поглощения субстратов могут быть одинаковыми для обеих популяций.

Несмотря на то что гетерогенность в той или иной мере является свойством всех живых систем, степень ее выраженности и характер распределения значений, характерных для отдельных клеток, могут значительно отличаться в случае различных фенотипических признаков. Соответственно, биологическая роль гетерогенности в отношении различных параметров неодинакова и не может быть оценена без проведения детальных исследований. В частности, уже сейчас некоторые авторы подчеркивают необходимость получения данных о гетерогенности популяций микроорганизмов для построения принципиально новых моделей экологических процессов (Kreft et al., 2013), например, цветений динофлагеллят или функционирования биогеохимических циклов в морских экосистемах. Опубликованные исследования клеточных популяций животных и бактерий указывают на то, что даже очень малые субпопуляции могут играть решающую роль для выживания и функционирования популяции в целом (Altschuler, Wu, 2010). Для окончательных выводов о том, какое значение для природных экосистем имеет гетерогенность популяций протистов в отношении поглощения питательных субстратов, необходимы как данные, полученные с применением современных методов исследования отдельных клеток (Матанцева, 2012; Matantseva, Skarlato, 2015; Matantseva et al., 2016), так и принципиально новые подходы к моделированию.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе показано, что мочевины и глицин являются важными субстратами для динофлагеллят в условиях избыточного содержания азота в среде. В таких условиях скорость поступления азота органических веществ в клетку превышает скорость поступления азота неорганических ионов нитрата в два раза, в результате чего вклад органического азота в питание динофлагеллят достигает 70%. Более того, в присутствии мочевины наблюдается снижение скорости транспорта ионов нитрата в клетку. Эти данные указывают на то, что в современных прибрежных экосистемах, подверженных высокому уровню антропогенного загрязнения азотсодержащими веществами, органические соединения играют основополагающую роль в питании динофлагеллят. При этом, использование мочевины и глицина в качестве источников азота сопровождается высвобождением углерода этих соединений в неорганической форме, что оказывает существенное влияние на эффективность выведения неорганического углерода из окружающей среды в результате активности фотосинтезирующих динофлагеллят и, следовательно, влечет за собой изменения в функционировании локальных и глобального биогеохимических циклов углерода.

Полученные в настоящей работе данные свидетельствуют о том, что динофлагелляты *P. minimum* обладают разными типами белков, обеспечивающих поступление нитрат-ионов, мочевины и глицина в клетку, а также ферментами, необходимыми для трансформации исследуемых субстратов в ионы аммония. Данная информация является ключом к пониманию молекулярных основ питания динофлагеллят и может быть использована для дальнейшего изучения регуляции этого физиологического процесса методами молекулярной биологии.

Сегодня стала очевидной необходимость детального исследования различных аспектов гетерогенности популяций микроорганизмов, механизмов ее возникновения и роли в естественных экосистемах. Выявление значительной гетерогенности популяций динофлагеллят *P. minimum* в отношении поглощения питательных субстратов и ответа на поступление в среду нового источника азота,

является первым шагом на пути к включению данных о физиологии отдельных клеток динофлагеллят в экосистемные модели и новому пониманию динамики популяций этих протистов в природе. Дальнейшие исследования позволят ответить на важные вопросы о механизмах возникновения обнаруженной гетерогенности, возможных путях ее регуляции и значении для природных популяций динофлагеллят и других протистов.

ВЫВОДЫ

1. Транспорт азота мочевины и глицина в клетки динофлагеллят *Prorocentrum minimum* в два раза эффективнее конкурентного транспорта нитрат-ионов в условиях избыточного содержания азота в среде.
2. Скорость поглощения нитрат-ионов клетками *P. minimum* снижается в присутствии мочевины на 30–40%.
3. Во время миксотрофного роста *P. minimum* мочевина и глицин являются незначительными источниками углерода по сравнению с бикарбонат-ионами: углерод мочевины составляет не более 0.5%, а углерод глицина – не более 1.5% от общего углерода, ассимилированного клетками.
4. В процессе метаболизма мочевины и глицина в клетках динофлагеллят *P. minimum* происходит разобщение ассимиляции азота и углерода этих веществ, в результате которого азот ассимилируется в большей степени, чем углерод.
5. У динофлагеллят *P. minimum* идентифицированы гомологи белков, опосредующих транспорт ионов нитрата (транспортеры NRT1.2, NRT2.1), мочевины (белки-аквапорины суперсемейства MIP, транспортеры DUR3) и глицина (белки GLYT и CAT1), а также ферментов, осуществляющих начальные этапы метаболизма этих соединений: нитрат- и нитрит-редуктазы, уреазы, белков комплекса декарбоксилирования глицина, серин-гидроксиметилтрансферазы и серин-дегидратазы.
6. Скорость поглощения одних и тех же питательных субстратов отдельными метаболически активными клетками *P. minimum* из одной популяции варьирует в широком диапазоне, что свидетельствует о высокой степени гетерогенности популяций этих динофлагеллят в отношении поглощения питательных субстратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белевич Т. А. Взаимодействие между планктонными водорослями при разных источниках азота / Т. А. Белевич, Е. В. Запара, Л. В. Ильяш // Успехи современной биологии. – 2009. – Т. 129. – №. 4. – С. 379–385.
2. Бердиева, М. А. Влияние механического стресса на ультраструктуру клеточных покровов динофлагеллят *Prorocentrum minimum* / М. А. Бердиева, С. О. Скарлато, О. В. Матанцева, И. А. Поздняков // Цитология. – 2016. – Т. 58. - № 10. – С. 792–798.
3. Воронова Е. Н. Внутрипопуляционная гетерогенность параметров флуоресценции у морской планктонной водоросли *Thalassiosira weissflogii* при разной обеспеченности азотом / Е. Н. Воронова, Л. В. Ильяш, С. И. Погосян и др. // Микробиология. – 2009. – Т. 78. – №. 4. – С. 469–478.
4. Матанцева, О. В. Методы исследования единичных клеток в экологии морских микроорганизмов / О. В. Матанцева // Актуальные проблемы планктонологии : тез. докл. междунар. конф. – Калининград : АтлантНИРО, 2012. – С. 97.
5. Матанцева, О. В. Миксотрофия у микроорганизмов: экологические и цитофизиологические аспекты / О. В. Матанцева, С. О. Скарлато // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2013. – Т. 49. – № 4. – С. 245–254.
6. Матанцева, О. В. Роль мочевины как источника азота и углерода для динофлагеллят / О. В. Матанцева // Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов : материалы Всероссийского симпозиума с международным участием. – М. : ООО «МАКС Пресс», 2014 . – С. 154.
7. Матанцева О. Роль мочевины и глицина как источников азота и углерода для динофлагеллят / О. Матанцева // Клеточная биология: проблемы и перспективы: тез. докл. конф. с международным участием. – СПб., 2017. – С. 92–93.
8. Муравьев А. Г. Руководство по определению показателей качества воды полевыми методами / А. Г. Муравьев. – СПб. – Крисмас+, 2004. – 248 с.

9. Окологков, Ю. Б. *Dinoflagellata* / Ю. Б. Окологков // Протисты : Руководство по зоологии. – СПб. – М. : Товарищество научных изданий КМК, 2011. – Ч. 3. – С. 7–94.
10. Acar, M. Stochastic switching as a survival strategy in fluctuating environments / M. Acar, J. T. Mettetal, A. Van Oudenaarden // *Nature Genetics*. – 2008. – V. 40. – N. 4. – P. 471–475.
11. Ackermann M. A functional perspective on phenotypic heterogeneity in microorganisms / M. Ackermann // *Nature Reviews. Microbiology*. – 2015. – V. 13. – N. 8. – P. 497.
12. Adl, S. M. The revised classification of eukaryotes / S. M. Adl, A. G. Simpson, C. E. Lane et al. // *Journal of Eukaryotic Microbiology*. – 2012. – V. 59. – N. 5. – P. 429–514.
13. Altschuler, S. J. Cellular heterogeneity: do differences make a difference? / S. J. Altschuler, L. F. Wu // *Cell*. – 2010. – V. 141. – N. 4. – P. 559–563.
14. Anderson, D. M. Approaches to monitoring, control and management of harmful algal blooms (HABs) / D. M. Anderson // *Ocean & Coastal Management*. – 2009. – V. 52. – P. 342–347.
15. Anderson, D. M. Harmful algal blooms and eutrophication: nutrient sources, composition, and consequences / D. M. Anderson, P. M. Glibert, J. M. Burkholder // *Estuaries*. – 2002. – V. 25. – N. 4b. – P. 704–726.
16. Andersson, M. G. Uptake of dissolved inorganic nitrogen, urea and amino acids in the Scheldt estuary: comparison of organic carbon and nitrogen uptake / M. G. Andersson, P. van Rijswijk, J. J. Middelburg // *Aquatic Microbial Ecology*. – 2006. – V. 44. – N. 3. – P. 303–315.
17. Archibald J. M. The puzzle of plastid evolution / J. M. Archibald // *Current Biology*. – 2009. – V. 19. – N. 2. – P. R81–R88.
18. Bellefeuille, S. D. The main nitrate transporter of the dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum* is constitutively expressed and not responsible for daily variations in nitrate uptake rates / S. D. Bellefeuille, D. Morse // *Harmful Algae*. – 2016. – V. 55. – P. 272–281.

19. Bergsdorf E. Y. Residues important for nitrate/proton coupling in plant and mammalian CLC transporters / E. Y. Bergsdorf, A. A. Zdebik, T. J. Jentsch // *Journal of Biological Chemistry*. – 2009. – V. 284. – N. 17. – P. 11184–11193.
20. Booth, I. R. Stress and the single cell: intrapopulation diversity is a mechanism to ensure survival upon exposure to stress / I. R. Booth // *International Journal of Food Microbiology*. – 2002. – V. 78. – N. 1. – P. 19–30.
21. Brehm-Stecher, B. F., Johnson E. A. Single-cell microbiology: tools, technologies, and applications / B. F. Brehm-Stecher, E. A. Johnson // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. – 2004. – V. 68. – N. 3. – P. 538–559.
22. Bronk, D. A. DON as a source of bioavailable nitrogen for phytoplankton / D. A. Bronk, J. H. See, P. Bradley et al. // *Biogeosciences*. – 2007. – V. 4. – N. 3. – P. 283–296.
23. Brunelle, S. A. Post-transcriptional Regulation of S-Phase Genes in the Dinoflagellate, *Karenia brevis* / S. A. Brunelle, F. M. Van Dolah // *Journal of Eukaryotic Microbiology*. – 2011. – V. 58. – N. 4. – P. 373–382.
24. Bucci, V. Microscale patchiness leads to large and important intraspecific internal nutrient heterogeneity in phytoplankton / V. Bucci, D. Nunez-Milland, B. S. Twining et al. // *Aquatic Ecology*. – 2012. – V. 46. – N. 1. – P. 101–118.
25. Burkholder J. A. M., Glibert P. M., Skelton H. M. Mixotrophy, a major mode of nutrition for harmful algal species in eutrophic waters / J. A. M. Burkholder, P. M. Glibert, H. M. Skelton // *Harmful Algae*. – 2008. – V. 8. – N. 1. – P. 77–93.
26. Cavalier-Smith, T. Multigene eukaryote phylogeny reveals the likely protozoan ancestors of opisthokonts (animals, fungi, choanozoans) and Amoebozoa / T. Cavalier-Smith, E. E. Chao, E. A. Snell, C. Berney, A. M. Fiore-Donno, R. Lewis // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. – 2014. – V. 81. – P. 71–85.
27. Cembella, A. D. Chemical ecology of eukaryotic microalgae in marine ecosystems / A. D. Cembella // *Phycologia*. – 2003. – V. 42. – N. 4. – P. 420–447.
28. Chassot, E. Global marine primary production constrains fisheries catches // E. Chassot, S. Bonhommeau, N. K. Dulvy et al. // *Ecology Letters*. – 2010. – V. 13. – N. 4. – P. 495–505.

29. Coffin R. B. Bacterial uptake of dissolved free and combined amino acids in estuarine waters / R. B. Coffin // *Limnology and Oceanography*. – 1989. – V. 34. – N. 3. – P. 531–542.
30. Collos Y. Nitrogenous nutrition of *Alexandrium catenella* (Dinophyceae) in cultures and in Thau lagoon, southern France / Y. Collos, C. Gagne, M. Laabir et al. // *Journal of Phycology*. – 2004. – V. 40. – N. 1. – P. 96–103.
31. Crawford N. M. Nitrate: nutrient and signal for plant growth / N. M. Crawford // *The Plant Cell*. – 1995. – V. 7.– P. 859–868.
32. Dagenais-Bellefeuille, S. Putting the N in dinoflagellates / S. Dagenais-Bellefeuille, D. Morse // *Frontiers in Microbiology*. – 2013. – V. 4.- Article 369.
33. Dagenais-Bellefeuille, S. The main nitrate transporter of the dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum* is constitutively expressed and not responsible for daily variations in nitrate uptake rates / S. Dagenais-Bellefeuille, D. Morse // *Harmful Algae*. – 2016. – V. 55. – P. 272–281.
34. De Angeli A. The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles / A. De Angeli, D. Monachello, G. Ephritikhine et al. // *Nature*. – 2006. – V. 442. – N. 7105. – P. 939.
35. De Winter J. C. F. Using the Student's t-test with extremely small sample sizes / J. C. F. De Winter // *Practical Assessment, Research & Evaluation*. – 2013. – V. 18. – N. 10.
36. Denardou-Queneherve A. Toxicity of French strains of the dinoflagellate *Prorocentrum minimum* experimental and natural contaminations of mussels / A. Denardou-Queneherve, D. Grzebyk, Y. F. Pouchus, et al. // *Toxicon*. – 1999. – V. 37. – N. 12. – P. 1711–1719.
37. Dittmar, T. Origin and biogeochemical cycling of organic nitrogen in the eastern Arctic Ocean as evident from D-and L-amino acids / T. Dittmar, H. P. Fitznar, G. Kattner // *Geochimica et Cosmochimica Acta*. – 2001. – V. 65. – N. 22. – P. 4103–4114.
38. Doane T.A. Spectrophotometric determination of nitrate with a single reagent / T.A. Doane, W. R. Horwath // *Analytical Letters*. – 2003. – V. 36. – N. 12. – P. 2713–2722.

39. Dodge, J. D. Thecal fine-structure in the dinoflagellate genera *Prorocentrum* and *Exuviaella* / J. D. Dodge // Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom. – 1965. – V. 45. – N. 3. – P. 607–614.
40. Dodge, J. D. A survey of thecal fine structure in Dinophyceae / J. D. Dodge, R. M. Crawford // Botanical Journal of the Linnean Society. – 1970. – V. 63. – P. 53–67.
41. Dodge J. D. The ultrastructure of the dinoflagellate pusule: a unique osmoregulatory organelle / J. D. Dodge // Protoplasma. – 1972. – V. 75. – N. 3. – P. 285–302.
42. Dodge J. D. Dinoflagellate ultrastructure and complex organelles / J. D. Dodge, C. Greuet // The Biology of Dinoflagellates. – Oxford. – Blackwell, 1987. – P. 92–142.
43. Douce, R. The glycine decarboxylase system: a fascinating complex / R. Douce, J. Bourguignon, M. Neuburger et al. // Trends in Plant Science. – 2001. – V. 6. – N. 4. – P. 167–176.
44. Duarte, C. M. Prevalence of heterotrophy and atmospheric CO₂ emissions from aquatic ecosystems / C. M. Duarte, Y. T. Prairie // Ecosystems. – 2005. – V. 8. – N. 7. – P. 862–870.
45. Dugdale R. C. The use of ¹⁵N to measure nitrogen uptake in eutrophic oceans; experimental considerations / R. C. Dugdale, F. P. Wilkerson // Limnology and Oceanography. – 1986. – V. 31. – N. 4. – P. 673–689.
46. Dyhrman, S. T. Urease activity in cultures and field populations of the toxic dinoflagellate *Alexandrium* / S. T. Dyhrman, D. M. Anderson, // Limnology and Oceanography. – 2003. – V. 48. – N. 2. – P. 647–655.
47. Eckert, M. New aspects of plant aquaporin regulation and specificity / M. Eckert, A. Biela, F. Siefritz et al. // Journal of Experimental Botany. – 1999. – V. 50. – N. 339. – P. 1541–1545.
48. Elowitz, M. B. Stochastic gene expression in a single cell / M. B. Elowitz, A. J. Levine, E. D. Siggia et al. // Science. – 2002. – V. 297. – N. 5584. – P. 1183–1186.
49. Falkowski P. G. Evolution of the nitrogen cycle and its influence on the biological sequestration of CO₂ in the ocean / P. G. Falkowski // Nature. – 1997. – V. 387. – N. 6630. – P. 272.

50. Falkowski, P. G. Biogeochemical controls and feedbacks on ocean primary production / P. G. Falkowski, R. T. Barber, V. Smetacek // *Science*. – 1998. – V. 281. – N. 5374. – P. 200–206.
51. Fan, C. Characterization of urease activity in three marine phytoplankton species, *Aureococcus anophagefferens*, *Prorocentrum minimum*, and *Thalassiosira weissflogii* / C. Fan, P. M. Glibert, J. Alexander et al. // *Marine Biology*. – 2003a. – V. 142. – N. 5. – P. 949–958.
52. Fan, C. Characterization of the affinity for nitrogen, uptake kinetics, and environmental relationships for *Prorocentrum minimum* in natural blooms and laboratory cultures / C. Fan, P. M. Glibert, J. M. Burkholder // *Harmful Algae*. – 2003b. – V. 2. – N. 4. – P. 283–299.
53. Fan, C. Effects of light on nitrogen and carbon uptake during a *Prorocentrum minimum* bloom / C. Fan, P. M. Glibert // *Harmful Algae*. – 2005. – V. 4. – N. 3. – P. 629–641.
54. Fast, N. M. Re-examing alveolate evolution using protein molecular phylogenies / N. M. Fast, L. Xue, S. Bungham, P. J. Keeling // *Journal of Eukaryotic Microbiology*. – 2002. – V. 49. – P. 30–37.
55. Faust, M. A. Identifying harmful marine dinoflagellates / M. A. Faust, R. A. Gulledge // *Contributions from the United States national herbarium*. – 2002. – V. 42. – P. 1–144.
56. Flynn, K. J. The determination of nitrogen status in microalgae / K. J. Flynn // *Marine Ecology Progress Series*. – 1990. – V. 61. – N. 3. – P. 297–307.
57. Flynn, K. J. Misuse of the phytoplankton–zooplankton dichotomy: the need to assign organisms as mixotrophs within plankton functional types / K. J. Flynn, D. K. Stoecker, A. Mitra et al. // *Journal of Plankton Research*. – 2012. – V. 35. – N. 1. – P. 3–11.
58. Forde B. G. Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation / B. G. Forde // *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*. – 2000. – V. 1465. – N. 1. – P. 219–235.

59. Forsman A. Inter-individual variation promotes ecological success of populations and species: evidence from experimental and comparative studies / A. Forsman, L. Wennersten // *Ecography*. – 2016. – V. 39. – N. 7. – P. 630–648.
60. Foster, R. A. Nitrogen fixation and transfer in open ocean diatom–cyanobacterial symbioses / R. A. Foster, M. M. M. Kuypers, T. Vagner et al. // *The ISME Journal*. – 2011. – V. 5. – N. 9. – P. 1484–1493.
61. Fujita, R. M. The role of nitrogen status in regulating transient ammonium uptake and nitrogen storage by macroalgae / R. M. Fujita // *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. – 1985. – V. 92. – N. – P. 283–301.
62. Fujitani, Y. Molecular and biochemical characterization of a serine racemase from *Arabidopsis thaliana* / Y. Fujitani, N. Nakajima, K. Ishihara et al. // *Phytochemistry*. – 2006. – V. 67. – N. 7. – P. 668–674.
63. Gagnon, R. Growth stimulation of *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae) by humic substances from the Manicouagan river (Eastern Canada) / R. Gagnon, M. Levasseur, A. M. Weise et al. // *Journal of Phycology*. – 2005. – V. 41. – N. 3. – P. 489–497.
64. Galloway, J. N. Nitrogen cycles: past, present, and future / J. N. Galloway, F. J. Dentener, D. G. Capone et al. // *Biogeochemistry*. – 2004. – V. 70. – N. 2. – P. 153–226.
65. Galván, A. Eukaryotic nitrate and nitrite transporters / A. Galván, E. Fernández // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2001. – V. 58. – N. 2. – P. 225–233.
66. Gao, D. A critical review of NanoSIMS in analysis of microbial metabolic activities at single-cell level / D. Gao, X. Huang, Y. Tao // *Critical Reviews in Biotechnology*. – 2016. – V. 36. – N. 5. – P. 884–890.
67. Geiger D. Stomatal closure by fast abscisic acid signaling is mediated by the guard cell anion channel SLAH3 and the receptor RCAR1 / D. Geiger, T. Maierhofer, K. A. Al-Rasheid et al. // *Science Signaling*. – 2011. – V. 4. – N. 173. – ra32.
68. Gerbeau, P. Aquaporin Nt-TIPa can account for the high permeability of tobacco cell vacuolar membrane to small neutral solutes / P. Gerbeau, J. Güçlü, P. Ripoché et al. // *The Plant Journal*. – 1999. – V. 18. – N. 6. – P. 577–587.

69. Gisselson, L. Variation in cellular nutrient status within a population of *Dinophysis norvegica* (Dinophyceae) growing in situ: Single-cell elemental analysis by use of a nuclear microprobe / L. Gisselson, E. Granéli, J. Pallon, // *Limnology and Oceanography*. – 2001. – V. 46. – N. 5. – P. 1237–1242.
70. Glibert, P. M. Eutrophication, harmful algae and biodiversity – challenging paradigms in a world of complex nutrient changes / P. M. Glibert // *Marine Pollution Bulletin*. – 2017.
71. Glibert, P. M. Escalating worldwide use of urea – a global change contributing to coastal eutrophication / P. M. Glibert, J. Harrison, C. Heil et al. *Biogeochemistry*. – 2006. – V. 77. – N. 3. – P. 441–463.
72. Glibert, P. M. The diverse nutrient strategies of harmful algae: focus on osmotrophy / P. M. Glibert, C. Legrand // *Ecology of Harmful Algae*. – Berlin Heidelberg New York. – Springer, 2006. – P. 164–175.
73. Glibert P. M. Harmful algal blooms in the Chesapeake and coastal bays of Maryland, USA: comparison of 1997, 1998, and 1999 events / P. M. Glibert, R. Magnien, M. W. Lomas et al. // *Estuaries and Coasts*. – 2001. – V. 24. – N. 6. – P. 875–883.
74. Glibert, P. M. *Prorocentrum minimum* tracks anthropogenic nitrogen and phosphorus inputs on a global basis: application of spatially explicit nutrient export models / P. M. Glibert, E. Mayorga, S. Seitzinger // *Harmful Algae*. – 2008. – V. 8. – N. 1. – P. 33–38.
75. Glibert, P. M. Pluses and minuses of ammonium and nitrate uptake and assimilation by phytoplankton and implications for productivity and community composition, with emphasis on nitrogen-enriched conditions / P. M. Glibert, F. P. Wilkerson, R. C. Dugdale et al. // *Limnology and Oceanography*. – 2016. – V. 61. – N. 1. – P. 165–197.
76. Goeyens, L. A room temperature procedure for the manual determination of urea in sea water / L. Goeyens, N. Kindermans, M. A. Yusuf, M. Elskens // *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. – 1998. – V. 47 – N. 4. – P. 415–418.
77. Goldman, J. C. Kinetics of inorganic nitrogen uptake by phytoplankton / J. C. Goldman, P. M. Glibert // *Nitrogen in the marine environment*. – New York London Paris

San Diego San Francisco Sao Paolo Sydney Tokyo Toronto : Academic Press, 1983. – P. 233–274.

78. Grzebyk, D. Evidence of a new toxin in the red-tide dinoflagellate *Prorocentrum minimum* / D. Grzebyk, A. Denardou, B. Berland, Y. F. Pouchus // Journal of Plankton Research. – 1997. – V. 19. – N. 8. – P. 1111–1124.

79. Hackett, J. D. Dinoflagellates: a remarkable evolutionary experiment / J. D. Hackett, D. M. Anderson, D. L. Erdner et al. // American Journal of Botany/ – 2004. – V. 91 – N. 10. – P. 1523–1534.

80. Hajdu, S. *Prorocentrum minimum* (Dinophyceae) in Baltic Sea : morphology, occurrence – a review / S. Hajdu, S. Petrola, H. Kuosa // Harmful Algae. – 2005. – V. 4. – N. 3. – P. 471–480.

81. Hall, T. A. BioEdit : a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT / T. A. Hall // Nucl. Acids Symp. Ser. – 1999. – V. 41. – P. 95–98.

82. Hansell D. A. Dissolved organic matter in the ocean: a controversy stimulates new insights / D. A. Hansell, C. A. Carlson, D. J. Repeta et al. // Oceanography. – 2009. – V. 22. – N. 4. – P. 202–211.

83. Hansen H. P. Determination of ammonia / H. P. Hansen, F. Koroleff // Methods of seawater analysis. – Weinheim. – New York. – Chichester. – Brisbane. – Singapore. – Toronto. : Willey-VCH, 1999. – P. 188–193.

84. Hansen, P. J. Phagotrophic mechanisms and prey selection in free-living dinoflagellates / P. J. Hansen, A. J. Calado // Journal of Eukaryotic Microbiology. – 1999. – V. 46. – N. 4. – P. 382–389.

85. Hansen, P. J. The role of photosynthesis and food uptake for the growth of marine mixotrophic dinoflagellates / P. J. Hansen // Journal of Eukaryotic Microbiology. – 2011. – V. 58. – N. 3. – P. 203–214.

86. Hedges J. I. What happens to terrestrial organic matter in the ocean? / J. I. Hedges, R. G. Keil, R. Benner // Organic geochemistry. – 1997. – V. 27. – N. 5. – P. 195–212.

87. Heil, C. A. *Prorocentrum minimum* (Pavillard) Schiller : a review of a harmful algal bloom species of growing worldwide importance / C. A. Heil, P. M. Glibert, C. Fan // *Harmful Algae*. – 2005. – V. 4. – N. 3. – P. 449–470.
88. Heisler, J. Eutrophication and harmful algal blooms: a scientific consensus / J. Heisler, P. M. Glibert, J. M. Burkholder et al. // *Harmful Algae*. – 2008. – V. 8. – P. 3–13.
89. Hildebrandt, T. M. Amino acid catabolism in plants / T. M. Hildebrandt, A. N. Nesi, W. L. Araújo et al. // *Molecular Plant*. – 2015. – V. 8. – N. 11. – P. 1563–1579.
90. Hosoya, K. I. Glycine and L-arginine transport in cultured Müller glial cells (TR-MUL) / K. I. Hosoya, T. Ichikawa, S. I. Akanuma et al. // *Neurochemistry International*. – 2010. – V. 57. – N. 3. – P. 262–268.
91. Jacobson, D. M. Thecate heterophic dinoflagellates: feeding behavior and mechanisms / D. M. Jacobson, D. M. Anderson // *Journal of Phycology*. – 1986. – V. 22. – N. 3. – P. 249–258.
92. Jauniaux, J. C. GAP1, the general amino acid permease gene of *Saccharomyces cerevisiae* / J. C. Jauniaux, M. Grenson // *The FEBS Journal*. – 1990. – V. 190. – N. 1. – P. 39–44.
93. Jauzein, C. Uptake of dissolved inorganic and organic nitrogen by the benthic toxic dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata* / C. Jauzein, D. Couet, T. Blasco et al. // *Harmful Algae*. – 2017. – V. 65. – P. 9–18.
94. Jentsch T. J. CLC chloride channels and transporters: from genes to protein structure, pathology and physiology / T. J. Jentsch // *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. – 2008. – V. 43. – N. 1. – P. 3–36.
95. Jentsch T. J. Properties of voltage-gated chloride channels of the CLC gene family / T. J. Jentsch, W. Günther, M. Pusch et al. // *The Journal of Physiology*. – 1995. – V. 482. – P. 19–25
96. John, E. H. Amino acid uptake by the toxic dinoflagellate *Alexandrium fundyense* / E. H. John, K. J. Flynn // *Marine Biology*. – 1999. – V. 133. – N. 1. – P. 11–19.
97. Jones, R. I. Mixotrophy in planktonic protists: an overview / R. I. Jones // *Freshwater Biology*. – 2000. – V. 45. – P. 219–226.

98. Hosoya, K. I. Glycine and L-arginine transport in cultured Müller glial cells (TR-MUL) / K. I. Hosoya, T. Ichikawa, S. I. Akanuma et al. // *Neurochemistry International*. – 2010. – V. 57. – N. 3. – P. 262–268.
99. Hubberten U. Amino acid composition of seawater and dissolved humic substances in the Greenland Sea / U. Hubberten, R. J. Lara, G. Kattner // *Marine Chemistry*. – 1994. – V. 45. – N. 1–2. – P. 121–128.
100. Huysmans, G. H. A urea channel from *Bacillus cereus* reveals a novel hexameric structure / G. H. Huysmans, N. Chan, J. M. Baldwin et al. // *Biochemical Journal*. – 2012. – V. 445. – N. 2. – P. 157–166.
101. Jauniaux, J. C. GAP1, the general amino acid permease gene of *Saccharomyces cerevisiae* / J. C. Jauniaux, M. Grenson. *European Journal of Biochemistry*. – 1990. – V. 190. – N. 1. – P. 39–44.
102. Jauzein, C. Dark metabolism and carbon–nitrogen uncoupling in the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* (Dinophyceae) / C. Jauzein, Y. Collos, M. Laabir et al. // *Harmful Algae*. – 2011. – V. 11. – P. 73–80.
103. Jeong, H. J. Feeding by phototrophic red-tide dinoflagellates: five species newly revealed and six species previously known to be mixotrophic / H. J. Jeong, Y. Du Yoo, J. Y. Park et al. // *Aquatic Microbial Ecology*. – 2005a. – V. – 40. – N. 2. – P. 133–150.
104. Jeong, H. J. Feeding by the mixotrophic red-tide dinoflagellate *Gonyaulax polygramma*: mechanisms, prey species, effects of prey concentration, and grazing impact / H. J. Jeong, Y. Du Yoo, K. A. Seong et al. // *Aquatic Microbial Ecology*. – 2005b. – V. 38. – N. 3. – P. 249–257.
105. Jeong, H. J. Feeding by red-tide dinoflagellates on the cyanobacterium *Synechococcus* / H. J. Jeong, J. Y. Park, J. H. Nho et al. // *Aquatic Microbial Ecology*. – 2005c. – V. 41. – N. 2. – P. 131–143.
106. Johnson, M. D. Inducible mixotrophy in the dinoflagellate *Prorocentrum minimum* / M. D. Johnson // *Journal of Eukaryotic Microbiology*. – 2015. – V. 62. – N. 4. – P. 431–443.

107. Junker, J. P. Every cell is special: genome-wide studies add a new dimension to single-cell biology / J. P. Junker, A. van Oudenaarden // *Cell*. – 2014. – V. 157. – N. 1. – P. 8–11.
108. Kaldenhoff, R. Functional aquaporin diversity in plants / R. Kaldenhoff, M. Fischer // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. – 2006. – V. 1758. – N. 8. – P. 1134–1141.
109. Keeling P. J. The Marine Microbial Eukaryote Transcriptome Sequencing Project (MMETSP): illuminating the functional diversity of eukaryotic life in the oceans through transcriptome sequencing / P. J. Keeling, F. Burki, H. M. Wilcox et al. // *PLoS Biology*. – 2014. – V. 12. – N. 6. – e1001889.
110. Keil, R. G. Dissolved combined amino acids in marine waters as determined by a vapor-phase hydrolysis method / R. G. Keil, D. L. Kirchman // *Marine Chemistry*. – 1991. – V. 33. – N. 3. – P. 243–259.
111. Ketchum B. H. Mineral nutrition of phytoplankton / B. H. Ketchum // *Annual Review of Plant Physiology*. – 1954. – V. 5. – N. 1. – P. 55–74.
112. Killberg-Thoreson, L. Nitrogen uptake kinetics in field populations and cultured strains of *Karenia brevis* / L. Killberg-Thoreson, M. R. Mulholland, C. A. Heil et al. // *Harmful Algae*. – 2014. – V. 38. – P. 73–85.
113. Klebl, F. A defect in the yeast plasma membrane urea transporter Dur3p is complemented by CpNIP1, a Nod26-like protein from zucchini (*Cucurbita pepo* L.), and by *Arabidopsis thaliana* δ -TIP or γ -TIP / F. Klebl, M. Wolf, N. Sauer // *FEBS Letters*. – 2003. – V. 547. – N. 1–3. – P. 69–74.
114. Klut M. E., Bisalputra T., Antia N. J. Some observations on the structure and function of the dinoflagellate pusule / M. E. Klut, T. Bisalputra, N. J. Antia // *Canadian Journal of Botany*. – 1987. – V. 65. – N. 4. – P. 736–744.
115. Kojima, S. Molecular mechanisms of urea transport in plants / S. Kojima, A. Bohner, N. Von Wirén // *The Journal of Membrane Biology*. – 2006. – V. 212. – N. 2. – P. 83–91.

116. Kopp, C. Highly dynamic cellular-level response of symbiotic coral to a sudden increase in environmental nitrogen / C. Kopp, M. Pernice, I. Domart-Coulon et al. // MBio. – 2013. – V. 4. – N. 3. - e00052-13.
117. Koroleff F. Direct determination of ammonia in natural waters as indophenol blue / F. Koroleff // ICES. – 1969. – V.100. – P. 9.
118. Krapp A. Nitrate transport and signalling in *Arabidopsis* / A. Krapp, L. C. David, C. Chardin et al. // Journal of Experimental Botany. – 2014. – V. 65. – N. 3. – P. 789–798.
119. Kreft, J. U. Mighty small: observing and modeling individual microbes becomes big science / J. U. Kreft, C. M. Plugge, V. Grimm et al. // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2013. – V. 110. – N. 45. – P. 18027–18028.
120. Krismer J. Single-cell mass spectrometry reveals the importance of genetic diversity and plasticity for phenotypic variation in nitrogen-limited *Chlamydomonas* / J. Krismer, M. Tamminen, S. Fontana et al. // The ISME Journal. – 2016. – V. 11. – P. 988–998.
121. Krogh A. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes / A. Krogh, B. Larsson, G. Von Heijne et al. // Journal of Molecular Biology. – 2001. – V. 305. – N. 3. –P. 567–580.
122. Krupke, A. In situ identification and N₂ and C fixation rates of uncultivated cyanobacteria populations / A. Krupke, N. Musat, J. LaRoche et al. // Systematic and Applied Microbiology. – 2013. – V. 36. – N. 4. – P. 259–271.
123. Kudela R. M. Nitrogen and carbon uptake kinetics and the influence of irradiance for a red tide bloom off southern California / R. M. Kudela, W. P. Cochlan // Aquatic Microbial Ecology. – 2000. – V. 21. N. 1. – P. 31–47.
124. Kussell, E. Phenotypic diversity, population growth, and information in fluctuating environments / E. Kussell, S. Leibler // Science. – 2005. – V. 309. – N. 5743. – P. 2075–2078.
125. Kuypers, M. M. The future of single-cell environmental microbiology / M. M. M. Kuypers, B. B. Jørgensen // Environmental Microbiology. – 2007. – V. 9. – N. 1. – P. 6–7.

126. Labonté, J. M. Single-cell genomics-based analysis of virus–host interactions in marine surface bacterioplankton / J. M. Labonté, B. K. Swan, B. Poulos et al. // *The ISME Journal*. – 2015. – V. 9. – N. 11. – P. 2386–2399.
127. LaJeunesse, T. C. *Symbiodinium* (Pyrrhophyta) genome sizes (DNA content) are smallest among dinoflagellates / T. C. LaJeunesse, G. Lambert, R. A. Andersen et al. // *Journal of Phycology*. – 2005. – V. 41. – N. 4. – P. 880–886.
128. Lee, K. H. Feeding by the newly described mixotrophic dinoflagellate *Gymnodinium smaydae*: feeding mechanism, prey species, and effect of prey concentration / K. H. Lee, H. J. Jeong, T. Y. Jang et al. // *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. – 2014. – V. 459. – P. 114–125.
129. Lewitus, A. J. Mixotrophy and nitrogen uptake by *Pfiesteria piscicida* (Dinophyceae) / A. J. Lewitus, B. M. Willis, K. C. Hayes et al. // *Journal of Phycology*. – 1999. – V. 35. – N. 6. – P. 1430–1437.
130. Li, J. Relationships between nitrogen and phosphorus forms and ratios and the development of dinoflagellate blooms in the East China Sea / J. Li, P. M. Glibert, M. Zhou et al. // *Marine Ecology Progress Series*. – 2009. – V. 383. – P. 11–26.
131. Li, J. Temporal and spatial variability in nitrogen uptake kinetics during harmful dinoflagellate blooms in the East China Sea / J. Li, P. M. Glibert, M. Zhou // *Harmful Algae*. – 2010. – V. 9. – N. 6. – P. 531–539.
132. Li, G. Plant aquaporins: roles in plant physiology / G. Li, V. Santoni, C. Maurel // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. – 2014. – V. 1840. – N. 5. – P. 1574–1582.
133. Li, T. Simultaneous analysis of microbial identity and function using NanoSIMS / T. Li, T. D. Wu, L. Mazéas, L. et al. // *Environmental Microbiology*. – 2008. – V. 10. – N. 3. – P. 580–588.
134. Lidstrom, M. E. The role of physiological heterogeneity in microbial population behavior / M. E. Lidstrom, M. C. Konopka // *Nature Chemical Biology*. – 2010. – V. 6. – N. 10. – P. 705–712.

135. Lísal J., Maduke M. Proton-coupled gating in chloride channels / J. Lísal, M. Maduke // *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. – 2009. – V. 364. – N. 1514. – P. 181–187.
136. Liu, L. H. AtDUR3 encodes a new type of high-affinity urea/H⁺ symporter in *Arabidopsis* / L. H. Liu, U. Ludewig, W. B. Frommer et al. // *The Plant Cell*. – 2003a. – V. 15. – N. 3. – P. 790–800.
137. Liu, L. H. Urea transport by nitrogen-regulated tonoplast intrinsic proteins in *Arabidopsis* / L. H. Liu, U. Ludewig, B. Gassert et al. // *Plant Physiology*. – 2003b. – V. 133. – N. 3. – P. 1220–1228.
138. Liu, Y., Chen, T., Song, S., & Li, C. (2015). Effects of nitrogenous nutrition on growth and nitrogen assimilation enzymes of dinoflagellate *Akashiwo sanguinea* / Y. Liu, T. Chen, S. Song et al. // *Harmful Algae*. – 2015. – V. 50. – P. 99–106.
139. Lomas, M. W. Interactions between NH₄⁺ and NO₃⁻ uptake and assimilation: comparison of diatoms and dinoflagellates at several growth temperatures / M. W. Lomas, P. M. Glibert // *Marine Biology*. – 1999. – V. 133. – N. 3. – P. 541–551.
140. Lomas, M. W. Comparisons of nitrate uptake, storage, and reduction in marine diatoms and flagellates / M. W. Lomas, P. M. Glibert // *Journal of Phycology*. – 2000. – V. 36. – N. 5. – P. 903–913.
141. Lomas M. W. Temporal and spatial dynamics of urea uptake and regeneration rates and concentrations in Chesapeake Bay / M. W. Lomas, T. M. Trice, P. M. Glibert et al. // *Estuaries*. – 2002. – V. 25. – N. 3. – P. 469–482.
142. Maguer J. F. Nitrogen uptake and assimilation kinetics in *Alexandrium minutum* (Dinophyceae): effect of N-limited growth rate on nitrate and ammonium interactions / J. F. Maguer, S. L'Helguen, Madec C. et al. // *Journal of Phycology*. – 2007. – V. 43. – N. 2. – P. 295–303.
143. Martins, B. M. Microbial individuality: how single-cell heterogeneity enables population level strategies / B. M. Martins, J. C. Locke // *Current Opinion in Microbiology*. – 2015. – V. 24. – P. 104–112.

144. Matantseva, O. Exploring the molecular properties of marine mixotrophic protists by a multidimensional scaling / O. Matantseva // 38th FEBS Congress : abstracts. – The FEBS Journal, 2013. – V. 280. – P. 508.
145. Matantseva, O. Role of urea in nutrition of dinoflagellates: is it merely a supplementary N source? / O. Matantseva, S. Skarlato, M. Voss // Microbes in the Baltic: Small things, small sea, big questions : abstracts of international workshop. – Gdynia, 2014 – P. 19.
146. Matantseva O. Urea vs. nitrate: concurrent uptake of nutrients by dinoflagellates *Prorocentrum minimum* at a population and single-cell level / O. Matantseva, A. Vogts, N. Filatova et al. // VII European Congress of Protistology : abstracts. – Seville, Spain, 2015. – P. 160.
147. Matantseva, O. Current state and perspectives of single-cell studies in ecophysiology of protists / O. Matantseva, S. Skarlato // Protistology. – 2015. – V. 9. – N. 3-4. – P. 127–132.
148. Matantseva, O. Superposition of individual activities: urea-mediated suppression of nitrate uptake in the dinoflagellate *Prorocentrum minimum* revealed at the population and single-cell levels / O. Matantseva, S. Skarlato, A. Vogts et al. // Frontiers in Microbiology. – 2016. – V. 7. – Article 1310.
149. Matantseva, O. Heterogeneity in nutrient uptake by individual dinoflagellate cells revealed using NanoSIMS / O. Matantseva, A. Vogts, M. Voss et al. // Moscow Forum «Protist-2016» : abstracts. – Protistology, 2016. – V. 10. – N. 2. – P. 44–45.
150. Matantseva O. The use of urea and glycine as C and N substrates by dinoflagellates / O. Matantseva, I. Pozdnyakov, M. Voss et al. // 15th International Congress of Protistology : abstracts. – Prague, Czech Republic, 2017. – P. 342.
151. Menden-Deuer S. Many ways to stay in the game: individual variability maintains high biodiversity in planktonic microorganisms / S. Menden-Deuer, J. Rowlett // Journal of The Royal Society Interface. – 2014. – V. 11. – N. 95. – Article 20140031.
152. Mériçout, P. Physiological and transcriptomic aspects of urea uptake and assimilation in Arabidopsis plants / P. Mériçout, M. Lelandais, F. Bitton et al. // Plant Physiology. – 2008. – V. 147. – N. 3. – P. 1225–1238.

153. Miller, A. J. Nitrate transport and signaling / A. J. Miller, X. Fan, M. Orsel et al. // *Journal of Experimental Botany*. – 2007. – V. 58. – N. 9. – P. 2297–2306.
154. Mitra A. The role of mixotrophic protists in the biological carbon pump / A. Mitra, K. J. Flynn, L. M. Burkholder et al. // *Biogeosciences*. – 2014. – V. 11. – P. 995–1005.
155. Mobley H. L. Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization / H. L. Mobley, R. P. Hausinger // *Microbiological Reviews*. – 1989. – V. 53. – N. 1. – P. 85–108.
156. Mobley, H. L. Molecular biology of microbial ureases / H. L. Mobley, M. D. Island, R. P. Hausinger // *Microbiological Reviews*. – 1995. – V. 59. – N. 3. – P. 451–480.
157. Mollenhauer-Rektorschek, M., Hanauer, G., Sachs, G., & Melchers, K. (2002). Expression of UreI is required for intragastric transit and colonization of gerbil gastric mucosa by *Helicobacter pylori* / M. Mollenhauer-Rektorschek, G. Hanauer, G. Sachs et al. // *Research in Microbiology*. – 2002. – V. 153. – N. 10. – P. 659–666.
158. Mopper, K. Diel and depth variations in dissolved free amino acids and ammonium in the Baltic Sea determined by shipboard HPLC analysis / K. Mopper, P. Lindroth // *Limnology and Oceanography*. – 1982. – V. 27. – N. 2. – P. 336–347.
159. Morel, F. M. M. The biogeochemical cycles of trace metals in the oceans / F. M. M. Morel, N. M. Price // *Science*. – 2003. – V. 300. – N. 5621. – P. 944–947.
160. Morey, J. S. Transcriptomic response of the red tide dinoflagellate, *Karenia brevis*, to nitrogen and phosphorus depletion and addition / J. S. Morey, E. A. Monroe, A. L. Kinney et al. // *BMC Genomics*. – 2011. – V. 12. – N. 1. – P. 346.
161. Morrill, L. C. Ultrastructure of the dinoflagellate amphiesma / L. C. Morrill, A.R. Loeblich, III. // *International Review of Cytology*. – 1983. – V. 82. – P. 151–180.
162. Morse, D. Circadian regulation of bioluminescence in *Gonyaulax* involves translational control / D. Morse, P. M. Milos, E. Roux et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 19989. – V. 86. – N. 1. – P. 172–176.
163. Mulholland, M. R. Peptide hydrolysis, amino acid oxidation, and nitrogen uptake in communities seasonally dominated by *Aureococcus anophagefferens* / M. R. Mulholland, C. J. Gobler, C. Lee // *Limnology and Oceanography*. – 2002. – V. 47. – N. 4. – P. 1094–1108.

164. Mulholland, M. R. Extracellular enzyme activity and uptake of carbon and nitrogen along an estuarine salinity and nutrient gradient / M. R. Mulholland, C. Lee, P. M. Glibert // *Marine Ecology Progress Series*. – 2003. – V. 258. – P. 3–17.
165. Mulholland, M. R. A comparison of N and C uptake during brown tide (*Aureococcus anophagefferens*) blooms from two coastal bays on the east coast of the USA / M. R. Mulholland, G. Boneillo, E. C. Minor // *Harmful Algae*. – 2004. – V. 3. – N. 4. – P. 361–376.
166. Musat, N. A single-cell view on the ecophysiology of anaerobic phototrophic bacteria / N. Musat, H. Halm, B. Winterholler et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2008. – V. 105. – N. 46. – P. 17861–17866.
167. Musat, N. Detecting metabolic activities in single cells, with emphasis on nanoSIMS / N. Musat, R. Foster, T. Vagner et al. // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2012. – V. 36. – N. 2. – P. 486–511.
168. Navarathna, D. H. Dur3 is the major urea transporter in *Candida albicans* and is co-regulated with the urea amidolyase Dur1, 2 / D. H. Navarathna, A. Das, J. Morschhäuser et al. // *Microbiology*. – 2011. – V. 157. – N. 1. – P. 270–279.
169. Nebbioso A. Molecular characterization of dissolved organic matter (DOM): a critical review / A. Nebbioso, A. Piccolo // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2013. – V. 405. – N. 1. – P. 109–124.
170. Nuñez J. NanoSIMS for biological applications: Current practices and analyses / J. Nuñez, R. Renslow, J. B. Cliff et al. // *Biointerphases*. – 2018. – V. 13. – N. 3. – 03B301.
171. Ogawa H. Dissolved organic matter in oceanic waters / H. Ogawa, E. Tanoue // *Journal of Oceanography*. – 2003. – V. 59. – N. 2. – P. 129–147.
172. Okonechnikov K. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit / K. Okonechnikov, O. Golosova, M. Fursov, et al. // *Bioinformatics*. – 2012. – V. 28. – N. 8. – P. 1166–1167.
173. Olenina, I. Assessing impacts of invasive phytoplankton: The Baltic Sea case / I. Olenina, N. Wasmund, S. Hajdu et al. // *Marine Pollution Bulletin*. – 2010. – V. 60. – N. 10. – P. 1691–1700.

174. Olenina, I. The dinoflagellate *Prorocentrum cordatum* at the edge of the salinity tolerance: The growth is slower but cells are larger / I. Olenina, E. Vaičiukynas, S. Šulčius et al. // *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. – 2016. – V. 168. – P. 71–79.
175. Opsahl S. Distribution and cycling of terrigenous dissolved organic matter in the ocean / S. Opsahl, R. Benner // *Nature*. – 1997. – V. 386. – N. 6624. – P. 480–482.
176. Orsel, M. Nitrate transport in plants: which gene and which control? / M. Orsel, S. Filleur, V. Fraissier et al. // *Journal of Experimental Botany*. – 2002. – V. 53. – N. 370. – P. 825–833.
177. Pechkovskaya S. A. Molecular tools for invasion biology: a new approach for amplification of dinoflagellate nitrogen transport genes with unknown exon-intron structure / S. A. Pechkovskaya, O. V. Matantseva, N. A. Filatova, S. O. Skarlato, I. V. Telesh // *Protistology*. – V. 11. – N. 3. – P. 135–142.
178. Pernice, M. A single-cell view of ammonium assimilation in coral–dinoflagellate symbiosis / M. Pernice, A. Meibom, A. Van Den Heuvel et al. // *The ISME Journal*. – 2012. – V. 6. – N. 7. – P. 1314–1324.
179. Pernice, M. A nanoscale secondary ion mass spectrometry study of dinoflagellate functional diversity in reef-building corals / M. Pernice, S. R. Dunn, L. Tonk et al. // *Environmental Microbiology*. – 2015. – V. 17. – N. 10. – P. 3570–3580.
180. Pertola, S. Morphology of *Prorocentrum minimum* (Dinophyceae) in the Baltic Sea and in Chesapeake Bay : comparison of cell shapes and thecal ornamentation / S. Pertola, M. A. Faust, H. Kuosa, G. Hällfors // *Botanica Marina*. – 2003. – V. 46. – P. 477–486.
181. Pertola, S. Is the invasion of *Prorocentrum minimum* (Dinophyceae) related to the nitrogen enrichment of the Baltic Sea? / S. Pertola, H. Kuosa, R. Olsonen // *Harmful Algae*. – 2005. – V. 4. – N. 3. – P. 481–492.
182. Polerecky L. Look@ NanoSIMS – a tool for the analysis of nanoSIMS data in environmental microbiology / L. Polerecky, B. Adam, J. Milucka et al. // *Environmental Microbiology*. – 2012. – V. 14. – N. 4. – P. 1009–1023.
183. Popa, R. et al. Carbon and nitrogen fixation and metabolite exchange in and between individual cells of *Anabaena oscillarioides* / R. Popa, P. K. Weber, J. Pett-Ridge et al. // *The ISME Journal*. – 2007. – V. 1. – N. 4. – P. 354–360.

184. Pozdnyakov, I. Dinoflagellate amphiesma at different stages of the life cycle / I. Pozdnyakov, S. Skarlato // *Protistology*. – 2012. – V. 7. – N. 2. – P. 108–115.
185. Pozdnyakov I. Obtaining spheroplasts of armored dinoflagellates and first single-channel recordings of their ion channels using patch-clamping / I. Pozdnyakov, O. Matantseva, Y. Negulyaev, S. Skarlato // *Marine Drugs*. – 2014. – V. 12. – N. 9. – P. 4743-4755.
186. Raikov, I. B. The dinoflagellate nucleus and chromosomes : mesokaryote concept reconsidered / I. B. Raikov // *Acta Protozool.* – 1995. – V. 34. – N. 4. – P. 239–247.
187. Raven J. A. Phagotrophy in phototrophs / J. A. Raven // *Limnology and Oceanography*. – 1997. – V. 42. – N. 1. – P. 198–205.
188. Rentsch, D. Transporters for uptake and allocation of organic nitrogen compounds in plants / D. Rentsch, S. Schmidt, M. Tegeder // *FEBS Letters*. – 2007. – V. 581. – N. 12. – P. 2281–2289.
189. Risinger, A. L. Different ubiquitin signals act at the Golgi and plasma membrane to direct GAP1 trafficking / A. L. Risinger, C. A. Kaiser // *Molecular Biology of the Cell*. – 2008. – V. 19. – N. 7. – P. 2962–2972.
190. Rodríguez I. The association of bacterial C9-based TTX-like compounds with *Prorocentrum minimum* opens new uncertainties about shellfish seafood safety / I. Rodríguez, A. Alfonso, E. Alonso, et al. // *Scientific Reports*. – 2017. – V. 7. –40880.
191. Roon, R. J. Urea amidolyase I. Properties of the enzyme from *Candida utilis* / R. J. Roon, B. Levenberg // *Journal of Biological Chemistry*. – 1972. – V. 247. – N. 13. – P. 4107–4113.
192. Sachs, G. Urea transport in bacteria: acid acclimation by gastric *Helicobacter* spp. / G. Sachs, J. A. Kraut, Y. Wen et al. // *The Journal of Membrane Biology*. – 2006. – V. 212. – N. 2. – P. 71–82.
193. Sanders R. W. Mixotrophic protists in marine and freshwater ecosystems / R. W. Sanders // *Journal of Eukaryotic Microbiology*. – 1991. – V. 38. – N. 1. – P. 76–81.
194. Sands, J. M. Mammalian urea transporters / J. M. Sands // *Annual Review of Physiology*. – 2003. – V. 65. – N. 1. – P. 543–566.

195. Schnepf E., Elbrächter M. Nutritional strategies in dinoflagellates: a review with emphasis on cell biological aspects / E. Schnepf, M. Elbrächter // *European Journal of Protistology*. – 1992. – V. 28. – N. 1. – P. 3–24.
196. Schreiber F. Phenotypic heterogeneity driven by nutrient limitation promotes growth in fluctuating environments / F. Schreiber, S. Littmann, G. Lavik et al. // *Nature Microbiology*. – 2016. – V. 1. – Article 16055.
197. Schulze, S. Glycine decarboxylase in C3, C4 and C3–C4 intermediate species / S. Schulze, P. Westhoff, U. Gowik, // *Current Opinion in Plant Biology*. – 2016. – V. 31. – P. 29–35.
198. Sebbane F. The *Yersinia pseudotuberculosis* Yut protein, a new type of urea transporter homologous to eukaryotic channels and functionally interchangeable in vitro with the *Helicobacter pylori* UreI protein / F. Sebbane, S., S. Bury-Moné, K. Cailliau et al. // *Molecular Microbiology*. – 2002. – V. 45. – N. 4. – P. 1165–1174.
199. Shayakul, C. The urea transporter family (SLC14): physiological, pathological and structural aspect / C. Shayakul, B. Cléménçon, M. A. Hediger // *Molecular Aspects of Medicine*. – 2013. – V. 34. – N. 2. – P. 313–322.
200. Shoguchi, E. Draft assembly of the *Symbiodinium minutum* nuclear genome reveals dinoflagellate gene structure / E. Shoguchi, C. Shinzato, T. Kawashima et al. // *Current Biology*. – 2013. – V. 23. – N. 15. – P. 1399–1408.
201. Siefritz, F. The tobacco plasma membrane aquaporin NtAQP1 / F. Siefritz, A. Biela, M. Eckert et al. // *Journal of Experimental Botany*. – 2001. – V. 52. – N. 363. – P. 1953–1957.
202. Sinclair G. Growth, uptake, and assimilation of ammonium, nitrate, and urea, by three strains of *Karenia brevis* grown under low light / G. Sinclair, D. Kamykowski, P. M. Glibert // *Harmful Algae*. – 2009. – V. 8. – N. 5. – P. 770–780.
203. Skarlato, S. Salinity stress response of the invasive dinoflagellate *Prorocentrum minimum* / S. Skarlato, N. Filatova, N. Knyazev et al. // *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. – 2017. – doi.org/10.1016/j.ecss.2017.07.007.

204. Smayda, T. J. Harmful algal blooms: their ecophysiology and general relevance to phytoplankton blooms in the sea / T. J. Smayda // *Limnology and Oceanography*. – 1997. – V. 42. – P. 1137–1153.
205. Solomon, C. M. Urease activity in five phytoplankton species / C. M. Solomon, P. M. Glibert // *Aquatic Microbial Ecology*. – 2008. – V. 52. – N. 2. – P. 149–157.
206. Solomon, C. M. Role of urea in microbial metabolism in aquatic systems: a biochemical and molecular review / C. M. Solomon, J. L. Collier, G. M. Berg et al. // *Aquatic Microbial Ecology*. – 2010. – V. 59. – N. 1. – P. 67–88.
207. Song, B. Molecular cloning and characterization of high-affinity nitrate transporters in marine phytoplankton / B. Song, B. B. Ward // *Journal of Phycology*. – 2007. – V. 43. – N. 3. – P. 542–552.
208. Stoecker, D. K. Mixotrophy in the dinoflagellate *Prorocentrum minimum* / D. K. Stoecker, A. Li, D. W. Coats et al. // *Marine Ecology Progress Series*. – 1997. – V. 152. – P. 1–12.
209. Stoecker, D. Mixotrophy among dinoflagellates / D. Stoecker // *Journal of Eukaryotic Microbiology*. – 1999. – V. 46. – N. 3. – P. 397–401.
210. Stoecker D. K. Mixotrophy in the marine plankton / D. K. Stoecker, P. J. Hansen, D. A. Caron et al. // *Annual Review of Marine Science*. – 2017. – V. 9. – P. 311–335.
211. Stoll, M. H. C., Bakker, K., Nobbe, G. H., & Haese, R. R. (2001). Continuous-flow analysis of dissolved inorganic carbon content in seawater / M. H. C. Stoll, K. Bakker, G. H. Nobbe et al. // *Analytical Chemistry*. – 2001. – V. 73. – N. 17. – P. 4111–4116.
212. Strobe, P. K. Molecular evolution of urea amidolyase and urea carboxylase in fungi / P. K. Strobe, K. W. Nickerson, S. D. Harris et al. // *BMC Evolutionary Biology*. – 2011. – V. 11. – N. 1. – P. 80.
213. Strugatsky, D. Structure of the proton-gated urea channel from the gastric pathogen *Helicobacter pylori* / D. Strugatsky, R. McNulty, K. Munson et al. // *Nature*. – 2013. – V. 493. – N. 7431. – P. 255–258.
214. Sun, J. Crystal structure of the plant dual-affinity nitrate transporter NRT1. 1 / J. Sun, J. R. Bankston, J. Payandeh et al. // *Nature*. – 2014. – V. 507. – N. 7490. – P. 73–77.

215. Switzer, T. Urea loading from a spring storm — Knysna estuary, South Africa / T. Switzer // *Harmful Algae*. – 2008. – V. 8. – N. 1. – P. 66–69.
216. Taylor, M. R. Transport function of rice amino acid permeases (AAPs) / M. R. Taylor, A. Reinders, J. M. Ward // *Plant and Cell Physiology*. – 2015. – V. 56. – N. 7. – P. 1355–1363.
217. Telesh, I. V. Ecological niche partitioning of the invasive dinoflagellate *Prorocentrum minimum* and its native congeners in the Baltic Sea / I. V. Telesh, H. Schubert, S. O. Skarlato // *Harmful Algae*. – 2016. – V. 59. – P. 100–111.
218. Terrado R. Autotrophic and heterotrophic acquisition of carbon and nitrogen by a mixotrophic chrysophyte established through stable isotope analysis / R. Terrado, A. L. Pasulka, A. A. Lie et al. // *The ISME Journal*. – 2017. – V. 11. – P. 2022–2034.
219. Thompson, A. W. Unicellular cyanobacterium symbiotic with a single-celled eukaryotic alga / A. W. Thompson, R. A. Foster, A. Krupke et al. // *Science*. – 2012. – V. 337. – N. 6101. – P. 1546–1550.
220. Thompson J. D. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice / J. D. Thompson, D. G. Higgins, T. J. Gibson // *Nucleic Acids Research*. – 1994. – V. 22. – N. 22. – P. 4673–4680.
221. Tischner R. Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants / R. Tischner // *Plant, Cell & Environment*. – 2000. – V. 23. – N. 10. – P. 1005–1024.
222. Traller, J. C. High throughput imaging to the diatom *Cyclotella cryptica* demonstrates substantial cell-to-cell variability in the rate and extent of triacylglycerol accumulation / J. C. Traller, M. Hildebrand // *Algal Research*. – 2013. – V. 2. – N. 3. – P. 244–252.
223. Tunncliffe, G. Membrane glycine transport proteins / G. Tunncliffe // *Journal of Biomedical Science*. – 2003. – V. 10. – N. 1. – P. 30–36.
224. Turk E. Membrane topology motifs in the SGLT cotransporter family / E. Turk, E. M. Wright // *Journal of Membrane Biology*. – 1997. – V. 159. – N. 1. – P. 1–20.
225. Turpin D. H. Effects of inorganic N availability on algal photosynthesis and carbon metabolism / D. H. Turpin // *Journal of Phycology*. – 1991. – V. 27. – N. 1. – P. 14–20.

226. Van Dolah, F. M. Diel phasing of the cell-cycle in the Florida red tide dinoflagellate, *Gymnodinium breve* / F. M. Van Dolah, T. A. Leighfield // *Journal of Phycology*. – 1999. – V. 35. – N. 6. – P. 1404–1411.
227. Van Dolah, F. M. Microarray analysis of diurnal-and circadian-regulated genes in the florida red-tide dinoflagellate *Karenia brevis* (Dinophyceae) / F. M. Van Dolah, K. B. Lidie, J. S. Morey et al. // *Journal of Phycology*. – 2007. – V. 43. – N. 4. – P. 741–752.
228. Vitousek P.M. Nitrogen limitation on land and in the sea: how can it occur? / P.M. Vitousek, R.W. Howarth // *Biogeochemistry*. – 1991. – V. 13. – N. 2. – P. 87–115.
229. Voss M. The marine nitrogen cycle: recent discoveries, uncertainties and the potential relevance of climate change / M. Voss, H. W. Bange, J. W. Dippner et al. // *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. – 2013. – V. 368. – N. 1621. – Article 20130121.
230. Wang, D. Z. Neurotoxins from marine dinoflagellates: a brief review / D. Z. Wang // *Marine Drugs*. – 2008. – V. 6. – N. 2. – P. 349–371.
231. Wang, W. H. Molecular and physiological aspects of urea transport in higher plants / W. H. Wang, B. Köhler, F. Q. Cao et al // *Plant Science*. – 2008. – V. 175. – N. 4. – P. 467–477.
232. Wege S. The proline 160 in the selectivity filter of the *Arabidopsis* NO_3^-/H^+ exchanger AtCLCa is essential for nitrate accumulation in planta / S. Wege, M. Jossier, S. Filleur et al. // *The Plant Journal*. – 2010. – V. 63. – N. 5. – P. 861–869.
233. Wennersten L. Population-level consequences of polymorphism, plasticity and randomized phenotype switching: a review of predictions / Wennersten L., Forsman A. // *Biological Reviews*. – 2012. – V. 87. – N. 3. – P. 756–767.
234. Wilken, S. Mixotrophic organisms become more heterotrophic with rising temperature / S. Wilken, J. Huisman, S. Naus-Wiezer et al. // *Ecology letters*. – 2013. – V. 16. – N. 2. – P. 225–233.
235. Wisecaver, J. H. Dinoflagellate genome evolution / J. H. Wisecaver, J. D. Hackett // *Annual Review of Microbiology*. – 2011. – V. 65. – P. 369–387.

236. Witte, C. P. Urea metabolism in plants / C. P. Witte // *Plant Science*. – 2011. – V. 180. – N. 3. – P. 431–438.
237. Yoo, Y. D. Feeding by the newly described mixotrophic dinoflagellate *Paragymnodinium shiwhaense*: feeding mechanism, prey species, and effect of prey concentration / Y. D. Yoo, H. J. Jeong, N. S. Kang et al. // *Journal of Eukaryotic Microbiology*. – 2009a. – V. 57. – N. 2. – P. 145–158.
238. Yoo, Y. Feeding by phototrophic red-tide dinoflagellates on the ubiquitous marine diatom *Skeletonema costatum* / Y. Du Yoo, H. J. Jeong, M. S. Kim et al. // *Journal of Eukaryotic Microbiology*. – 2009b. – V. 56. – N. 5. – P. 413–420.
239. Zehr, J. P. How single cells work together / J. P. Zehr // *Science*. – 2015. – V. 349. – N. 6253. – P. 1163–1164.
240. Zhang, G. Dissolved organic nitrogen bioavailability indicated by amino acids during a diatom to dinoflagellate bloom succession in the Changjiang River estuary and its adjacent shelf / G. Zhang, S. Liang, X. Shi et al. // *Marine Chemistry*. – 2015. – V. 176. – P. 83–95.
241. Zhou, J. J. Cloning and functional characterization of a *Brassica napus* transporter that is able to transport nitrate and histidine / J. J. Zhou, F. L. Theodoulou, I. Muldin et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 1998. – V. 273. – N. 20. – P. 12017–12023.
242. Zimmermann, M. Phenotypic heterogeneity in metabolic traits among single cells of a rare bacterial species in its natural environment quantified with a combination of flow cell sorting and NanoSIMS / M. Zimmermann, S. Escrig, T. Hübschmann et al. // *Frontiers in microbiology*. – 2015. – V. 6. – Article 243.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую благодарность своему научному руководителю, доктору биологических наук Сергею Орестовичу Скарлато, за всестороннюю поддержку на всех этапах выполнения работы и написания диссертации.

Автор благодарит сотрудников Лаборатории цитологии одноклеточных организмов Института цитологии РАН за дружескую и творческую атмосферу и помощь при выполнении работы.

Автор благодарит д. б. н. Ирину Викторовну Телеш и д. б. н. Елену Алексеевну Морачевскую за ценные советы по написанию диссертации.

Автор признателен профессору Марен Фосс, профессору Хендрику Шуберту, доктору Ангеле Фогтс и Ирис Лискоу за возможность проведения масс-спектрометрических измерений с помощью оборудования Института исследований Балтийского моря в Варнемюнде, Германия.

Автор искренне благодарен своей семье за неоценимую поддержку во время работы над диссертацией. Особенно признателен автор Илье Позднякову – за помощь при планировании настоящего исследования и обсуждении полученных результатов, вдохновение и поддержку всегда, везде и во всем.

В ходе выполнения работы финансовая помощь была оказана: Российским фондом фундаментальных исследований (проекты №№ 14-04-32146-мол_a и 13-04-00703-а), Германской службой академических обменов и Российским научным фондом (проект № 16-14-10116).

ПРИЛОЖЕНИЕ

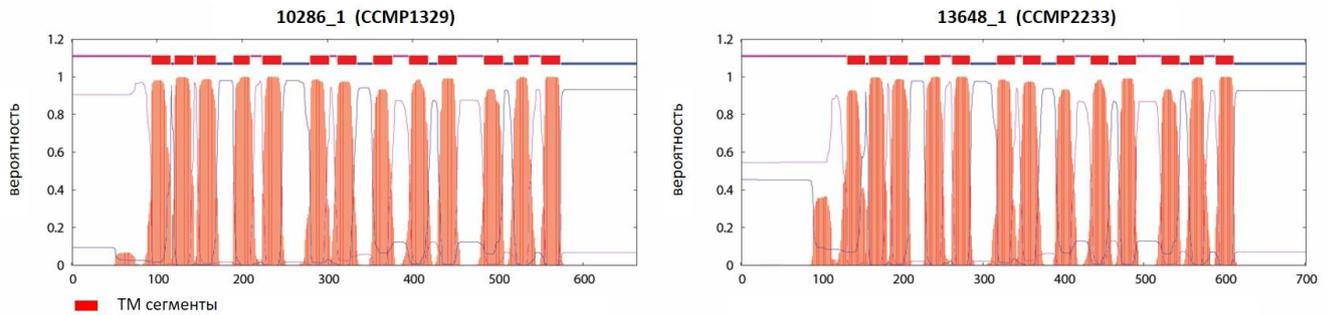


Рисунок 1. Предсказанные трансмембранные сегменты (ТМ сегменты) гомологов белка NRT1.2 у динофлагеллят *P. minimum*. Слева – гомологи из транскриптома CCMP1329, справа – из транскриптома CCMP2233.

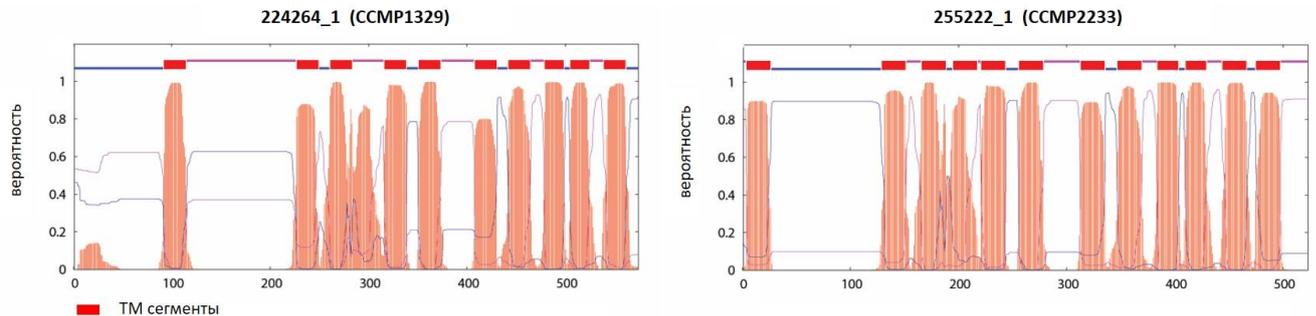


Рисунок 2. Предсказанные трансмембранные сегменты (ТМ сегменты) гомологов белка NRT2.1 у динофлагеллят *P. minimum*. Слева – гомологи из транскриптома CCMP1329, справа – из транскриптома CCMP2233.

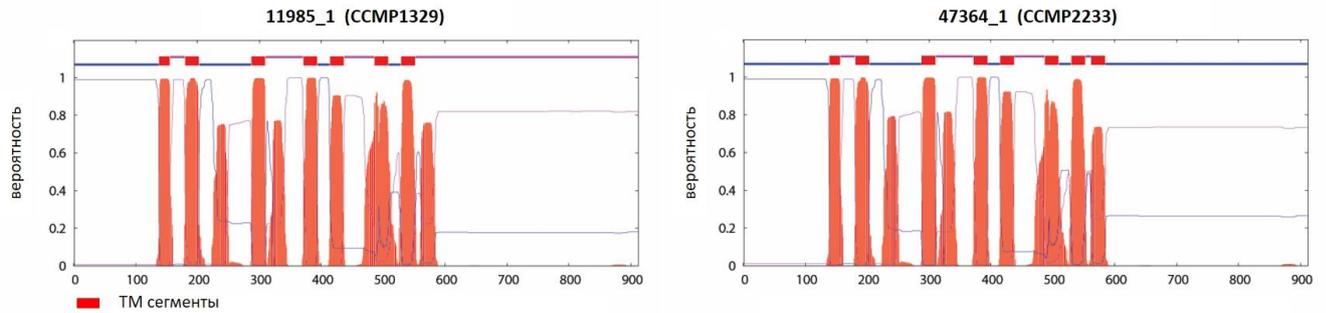


Рисунок 3. Предсказанные трансмембранные сегменты (ТМ сегменты) гомологов белка CLCа у динофлагеллят *P. minimum*. Слева – гомологи из транскриптома CCMP1329, справа – из транскриптома CCMP2233.

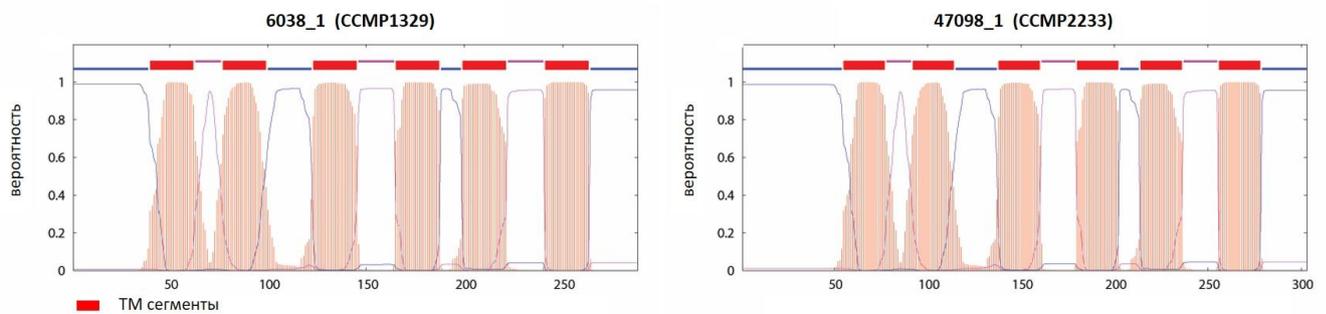


Рисунок 4. Предсказанные трансмембранные сегменты (ТМ сегменты) гомологов белка MIP у динофлагеллят *P. minimum*. Слева – гомологи из транскриптома CCMP1329, справа – из транскриптома CCMP2233.

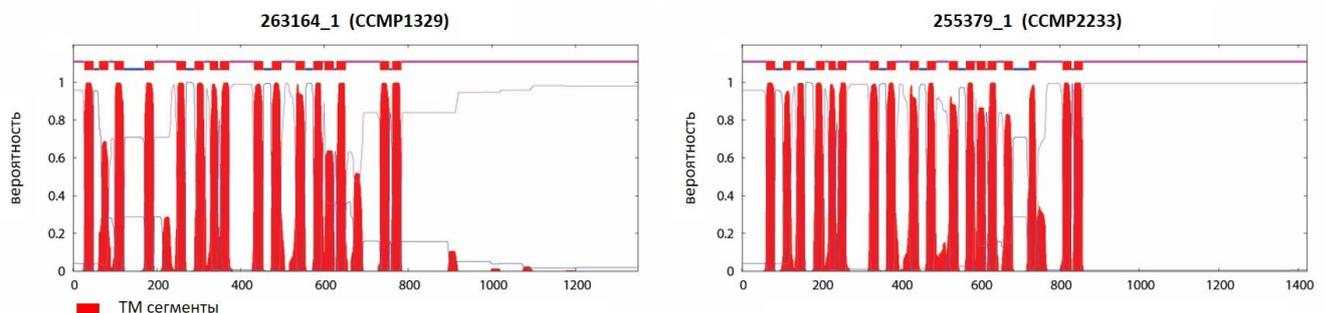


Рисунок 5. Предсказанные трансмембранные сегменты (ТМ сегменты) гомологов белка DUR3 у динофлагеллят *P. minimum*. Слева – гомологи из транскриптома CCMP1329, справа – из транскриптома CCMP2233.

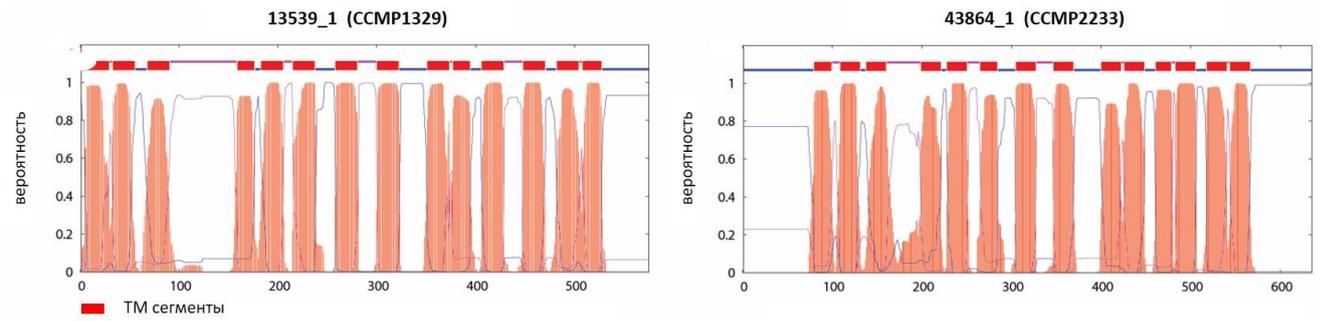


Рисунок 6. Предсказанные трансмембранные сегменты (ТМ сегменты) гомологов белка SAT1 у динофлагеллят *P. minimum*. Слева – гомологи из транскриптома CCMP1329, справа – из транскриптома CCMP2233.

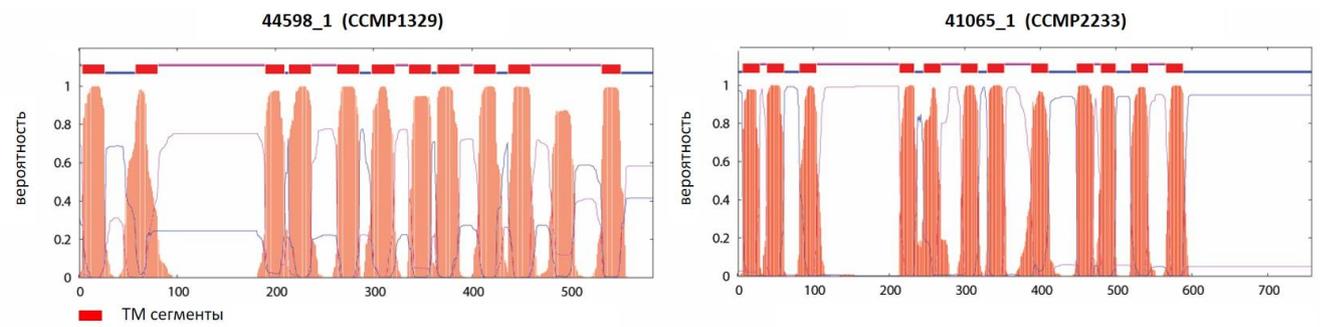


Рисунок 7. Предсказанные трансмембранные сегменты (ТМ сегменты) гомологов белка GLYT у динофлагеллят *P. minimum*. Слева – гомологи из транскриптома CCMP1329, справа – из транскриптома CCMP2233.

Таблица 1. Количество азотсодержащих субстратов в среде во время проведения экспериментов «Конкурентное поглощение нитрат-ионов и мочевины». В скобках приведены значения SD.

Параметр	Экспериментальная повторность					
	1	2	3	4	5	6
Нитрат-ионы, мкмоль л ⁻¹	190.7 (3.3)	210.6 (3.4)	202.1 (0.4)	136.4 (3.4)	135.9 (0.9)	135.6 (1.8)
Мочевина, мкмоль л ⁻¹	100	80	80	80	80	80
Азот нитрата/Азот мочевины	0.95	1.31	1.26	0.85	0.85	0.85
Ионы аммония, мкмоль л ⁻¹	-	-	-	-	-	-

Таблица 2. Количество азотсодержащих субстратов в среде во время проведения экспериментов «Конкурентное поглощение нитрат-ионов и глицина». В скобках приведены значения SD.

Параметр	Экспериментальная повторность		
	1	2	3
Нитрат-ионы, мкмоль л ⁻¹	204.8 (10.2)	229.6 (17.9)	188.3 (11.9)
Глицин, мкмоль л ⁻¹	200	200	200
Азот нитрата/Азот глицина	1.02	1.15	0.94
Ионы аммония, мкмоль л ⁻¹	-	-	-

Таблица 3. Последовательности запроса, которые использовались при поиске гомологов белков, вовлеченных в транспорт и ассимиляцию нитрат-ионов, мочевины и глицина, в транскриптомах *P. minimum*.

Белок	Организм	№ в базе данных NCBI
AAP (AAP1)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_176132.1
AAP (AAP2)	<i>A. thaliana</i>	NP_196484.1
AAP (AAP3)	<i>A. thaliana</i>	NP_177862.1
AAP (AAP4)	<i>A. thaliana</i>	NP_201190.1
AAP (AAP7)	<i>A. thaliana</i>	NP_001031934.1
CAT1	<i>A. thaliana</i>	NP_193844.2
CLCa	<i>A. thaliana</i>	OAO95328.1
DUR1,2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	EDN64818.1
DUR3	<i>A. thaliana</i>	NP_199351.2
GAP1	<i>S. cerevisiae</i>	ONH80356.1
GLYT1	<i>Homo sapiens</i>	P48067.3
H-белок [GDC]	<i>A. thaliana</i>	AAM64413.1
L-белок [GDC]	<i>A. thaliana</i>	Q9M5K3.2
MIP (NIP, Nod26-like)	<i>A. thaliana</i>	CAD67694.1
MIP (PIP)	<i>A. thaliana</i>	OAP10089.1
MIP (TIP4.1)	<i>A. thaliana</i>	O82316.1
NAR	<i>A. thaliana</i>	AAF19225.1
NIR	<i>A. thaliana</i>	BAA21672.1
NRT1.1	<i>A. thaliana</i>	AEE28838.1
NRT1.2	<i>A. thaliana</i>	NP_564978.1
NRT2.1	<i>A. thaliana</i>	NP_172288.1
P-белок [GDC]	<i>A. thaliana</i>	NP_001119106.1
SDH	<i>A. thaliana</i>	AEE83032.1
SHMT	<i>A. thaliana</i>	NP_851081.1
SLAC1	<i>A. thaliana</i>	OAP18701.1

SLC14	<i>Mus musculus</i>	Q8R4T9.2
T-белок [GDC]	<i>A. thaliana</i>	O65396.1
UAC	<i>Helicobacter pylori</i>	ACG58803.1
URE	<i>A. thaliana</i>	AEE34663.1
Urea ABC transporter	<i>Rhodococcus equi</i>	WP_022596374.1
YUT	<i>Yersinia rohdei</i>	AAR15142.1

Таблица 4. Первичные данные измерений методом NanoSIMS, экспериментальная повторяемость 5. Ошибки Пуассона приведены по данным программы Look@NanoSIMS. Размер клетки представлен как диаметр круга, содержащего столько же пикселей, сколько содержит изображение соответствующей клетки.

Параллель	Измерение	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$	Ошибка Пуассона	$^{12}\text{C}^{15}\text{N}/^{12}\text{C}^{14}\text{N}$	Ошибка Пуассона	Размер (мкм)
«контроль»	160106b	1,03E-02	4,18E-05	3,91E-03	7,90E-06	10,3
	160106b	1,01E-02	6,89E-05	3,79E-03	7,24E-06	11,1
	160106c	1,03E-02	4,51E-05	3,63E-03	6,96E-06	11,2
	160106c	1,03E-02	4,66E-05	3,51E-03	6,80E-06	11,2
	160106d	1,03E-02	3,81E-05	3,59E-03	7,55E-06	10,6
	160106e	1,04E-02	6,72E-05	3,47E-03	9,24E-06	10,2
	160106e	1,07E-02	7,33E-05	3,53E-03	6,69E-06	11,9
	160107a	1,06E-02	3,93E-05	3,54E-03	1,09E-05	10,6
	160107a	1,05E-02	5,32E-05	3,51E-03	9,69E-06	11,2
	160112c	1,04E-02	3,47E-05	3,85E-03	8,16E-06	10,0
	160112c	1,05E-02	4,15E-05	3,77E-03	8,42E-06	11,5
	160112d	1,03E-02	3,26E-05	3,82E-03	8,41E-06	11,6
	160112d	1,04E-02	2,64E-05	3,84E-03	7,33E-06	12,1
	160112e	1,01E-02	4,79E-05	3,57E-03	8,91E-06	9,5
160112e	1,04E-02	4,90E-05	3,80E-03	7,77E-06	9,6	
«мочевина» (+ мочевины, ^{15}N -мочевина)	160105a	1,77E-02	5,82E-05	4,79E-03	7,19E-06	10,2
	160105a	1,17E-02	5,38E-05	7,09E-03	9,23E-06	10,1
	160105a	1,22E-02	8,50E-05	3,74E-03	1,06E-05	7,1
	160105b	1,24E-02	4,67E-05	1,01E-02	1,13E-05	10,3
	160105b	1,45E-02	3,49E-05	6,73E-03	7,75E-06	12,4
	160105c	1,42E-02	5,18E-05	5,17E-03	9,55E-06	12,6

	160105c	1,38E-02	5,78E-05	6,89E-03	1,14E-05	11,0
	160105c	1,36E-02	4,01E-05	5,11E-03	1,00E-05	10,7
	160106a	1,46E-02	5,84E-05	8,33E-03	1,11E-05	9,4
	160106a	1,24E-02	7,34E-05	1,29E-02	1,78E-05	8,4
	160106a	1,41E-02	4,56E-05	9,65E-03	1,04E-05	11,8
	160112a	1,57E-02	7,87E-05	7,36E-03	1,38E-05	9,8
	160112a	1,35E-02	6,41E-05	5,55E-03	1,12E-05	10,9
	160112a	1,41E-02	5,30E-05	1,23E-02	2,01E-05	9,9
	160112b	1,35E-02	5,86E-05	8,73E-03	1,30E-05	9,7
	160112b	1,24E-02	4,65E-05	6,98E-03	1,05E-05	11,1
«нитрат» (+ мочевины, ¹⁵ N-нитрат)	160114b	1,16E-02	6,35E-05	3,93E-03	9,86E-06	8,0
	160114b	1,05E-02	3,96E-05	3,73E-03	1,47E-05	10,3
	160114b	1,32E-02	5,90E-05	4,22E-03	9,26E-06	9,3
	161515a	1,13E-02	8,55E-05	4,28E-03	1,31E-05	10,1
	161515a	1,21E-02	5,71E-05	4,80E-03	8,66E-06	11,2
	161515a	1,28E-02	7,31E-05	3,98E-03	9,91E-06	11,3
	160115b	1,18E-02	5,29E-05	4,02E-03	1,03E-05	10,0
	160115b	1,18E-02	7,35E-05	4,19E-03	9,31E-06	9,9
	160115b	1,25E-02	6,39E-05	4,24E-03	1,27E-05	9,0
	160115b	1,25E-02	1,14E-04	4,69E-03	1,64E-05	8,8
	160115c	1,36E-02	6,79E-05	4,47E-03	1,34E-05	8,3
	160115c	1,15E-02	9,06E-05	4,58E-03	1,15E-05	8,8
	160115c	1,14E-02	7,94E-05	4,32E-03	1,12E-05	8,5
	160115c	1,09E-02	4,66E-05	3,92E-03	1,47E-05	9,8
	160115d	1,63E-02	6,71E-05	4,63E-03	1,19E-05	11,3
	160115d	1,42E-02	1,13E-04	4,45E-03	1,42E-05	8,0
	160115d	1,29E-02	5,29E-05	4,26E-03	9,86E-06	11,0
	160115d	1,26E-02	6,97E-05	3,96E-03	9,77E-06	12,3
	160115d	1,19E-02	7,88E-05	4,23E-03	1,03E-05	10,7
	«только нитрат» (– мочевины, ¹⁵ N-нитрат)	160108b	1,21E-02	4,59E-05	5,11E-03	9,14E-06
160108b		1,33E-02	5,80E-05	4,43E-03	8,17E-06	10,9
160108b		1,28E-02	5,11E-05	4,54E-03	8,45E-06	12,2
160108c		1,36E-02	9,55E-05	4,92E-03	1,83E-05	8,86
160108c		1,24E-02	9,64E-05	4,47E-03	1,80E-05	9,75
160108c		1,34E-02	1,13E-04	6,43E-03	1,83E-05	7,05
160108c		1,28E-02	9,49E-05	5,20E-03	1,29E-05	8,7
160108d		1,20E-02	7,73E-05	5,71E-03	9,57E-06	10,13

	160108d	1,74E-02	7,13E-05	5,76E-03	9,77E-06	10,64
	160108d	1,30E-02	7,67E-05	4,18E-03	8,47E-06	10,68
	160111a	1,31E-02	6,91E-05	5,33E-03	1,27E-05	11,16
	160111a	1,38E-02	7,94E-05	5,48E-03	1,19E-05	9,56
	160111a	1,10E-02	6,40E-05	4,39E-03	1,30E-05	12,51
	160113a	1,68E-02	5,80E-05	5,19E-03	8,71E-06	9,55
	160113a	1,13E-02	7,28E-05	3,83E-03	1,56E-05	8,57
	160113b	1,15E-02	5,31E-05	4,27E-03	9,69E-06	12,97
	160113b	1,35E-02	6,57E-05	7,39E-03	1,36E-05	12,32
	160113b	1,30E-02	9,20E-05	7,54E-03	2,13E-05	10,13
	160113c	1,31E-02	5,23E-05	5,75E-03	1,04E-05	10,53
	160113c	1,25E-02	6,12E-05	5,77E-03	1,40E-05	8,6
	160113c	1,44E-02	6,31E-05	6,70E-03	1,07E-05	11,78
	160113d	1,42E-02	6,18E-05	4,42E-03	7,51 E-06	9,48
	160113d	1,05E-02	4,56E-05	4,46E-03	6,73E-06	12,7
	160113c	1,31E-02	4,47E-05	4,75E-03	8,74E-06	8,23
	160113c	1,46E-02	5,47E-05	5,30E-03	8,90E-06	9,0

Таблица 5. Первичные данные измерений методом NanoSIMS, экспериментальная повторность 6. Ошибки Пуассона приведены по данным программы Look@NanoSIMS. Размер клетки представлен как диаметр круга, содержащего столько же пикселей, сколько содержит изображение соответствующей клетки.

Параллель	Измерение	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$	Ошибка Пуассона	$^{12}\text{C}^{15}\text{N}/^{12}\text{C}^{14}\text{N}$	Ошибка Пуассона	Размер (мкм)
«контроль»	141119e	1,15E-02	9,07E-05	3,94E-03	1,01E-05	10,4
	141119e	1,19E-02	9,52E-05	3,77E-03	1,19E-05	9,7
	141119e	1,14E-02	9,98E-05	3,94E-03	1,12E-05	10,0
	141120c	1,07E-02	3,95E-05	3,91E-03	1,04E-05	11,3
	141121a	1,10E-02	1,03E-04	4,05E-03	1,40E-05	10,8
	141121a	1,14E-02	1,17E-04	4,13E-03	1,66E-05	8,5
	141121a	1,10E-02	1,78E-04	3,87E-03	1,99E-05	6,8
	141121b	1,11E-02	7,30E-05	4,02E-03	8,36E-06	9,1
	141121c	1,12E-02	8,33E-05	3,97E-03	1,08E-05	7,3
	141211b	1,09E-02	5,14E-05	4,00E-03	7,79E-06	8,3

	141212a	1,07E-02	5,95E-05	4,04E-03	1,30E-05	12,3
	141212a	1,02E-02	9,56E-05	4,19E-03	1,61E-05	9,4
	141215c	1,14E-02	6,90E-05	3,83E-03	1,42E-05	10,0
	141215c	1,14E-02	1,02E-04	4,20E-03	1,39E-05	7,4
	141215c	1,13E-02	1,25E-04	4,08E-03	7,71E-06	7,9
«мочевина» (+ мочевины, ¹⁵ N-мочевина)	141118a	1,55E-02	1,79E-04	6,64E-03	2,22E-05	5,8
	141118a	1,59E-02	1,09E-04	6,15E-03	1,75E-05	7,4
	141118a	1,66E-02	1,24E-04	8,76E-03	2,63E-05	4,8
	141118a	1,67E-02	9,24E-05	1,00E-02	1,99E-05	7,3
	141118a	1,67E-02	8,75E-05	6,18E-03	1,60E-05	7,4
	141124a	1,38E-02	1,19E-04	5,02E-03	1,63E-05	7,2
	141124a	1,89E-02	1,71E-04	7,24E-03	1,57E-05	7,8
	141124a	1,45E-02	9,13E-05	7,36E-03	1,64E-05	9,8
	141124a	1,75E-02	1,31E-04	4,95E-03	1,56E-05	8,0
	141124b	1,75E-02	6,99E-05	7,15E-03	1,56E-05	7,9
	141124c	1,96E-02	1,44E-04	5,75E-03	1,64E-05	9,6
	141124c	1,50E-02	1,20E-04	5,98E-03	2,18E-05	7,8
	141124c	1,87E-02	1,46E-04	7,32E-03	2,00E-05	8,4
	141124c	1,81E-02	1,56E-04	1,19E-02	3,78E-05	7,0
	141124d	1,89E-02	4,41E-05	6,52E-03	8,01E-06	8,6
«нитрат» (+ мочевины, ¹⁵ N-нитрат)	141125a	1,24E-02	9,99E-05	4,22E-03	1,13E-05	9,0
	141125a	1,57E-02	1,50E-04	4,77E-03	1,42E-05	8,8
	141125a	1,96E-02	1,39E-04	4,14E-03	1,20E-05	8,7
	141125b	1,52E-02	1,08E-04	4,92E-03	1,31E-05	8,4
	141125b	1,38E-02	1,07E-04	4,49E-03	1,45E-05	10,0
	141125b	1,44E-02	1,13E-04	4,12E-03	1,26E-05	7,4
	141125b	1,79E-02	1,15E-04	4,06E-03	1,52E-05	6,8
	141125c	1,46E-02	8,99E-05	4,77E-03	2,03E-05	10,7
	141125c	1,94E-02	1,22E-04	5,19E-03	1,44E-05	8,2
	141125c	1,56E-02	1,72E-04	4,26E-03	1,46E-05	8,7
	141125d	1,24E-02	7,64E-05	4,56E-03	1,46E-05	10,7
	141125d	1,33E-02	1,36E-04	4,41E-03	2,38E-05	8,9
	141125d	2,14E-02	1,47E-04	4,75E-03	2,19E-05	8,7
	141212b	1,40E-02	8,27E-05	4,52E-03	1,86E-05	9,3
	141212c	1,43E-02	1,15E-04	4,24E-03	1,46E-05	8,6
	141212c	1,77E-02	9,35E-05	4,70E-03	2,22E-05	7,4
141212c	1,50E-02	8,66E-05	4,84E-03	2,18E-05	8,5	

	141212c	2,39E-02	1,07E-04	4,93E-03	1,41E-05	9,4
	141215a	1,40E-02	3,30E-05	4,79E-03	6,62E-06	8,9
«только нитрат» (¹⁵ N-нитрат)	141126a	1,30E-02	9,36E-05	4,82E-03	1,31E-05	9,3
	141126a	1,58E-02	1,23E-04	6,06E-03	1,43E-05	8,2
	141126a	1,55E-02	1,10E-04	6,43E-03	1,88E-05	10,0
	141126a	1,40E-02	1,33E-04	5,47E-03	1,56E-05	8,4
	141126b	1,61E-02	1,88E-04	5,82E-03	2,13E-05	7,8
	141126b	1,63E-02	1,45E-04	4,83E-03	1,95E-05	7,6
	141126b	1,30E-02	9,28E-05	5,08E-03	1,62E-05	8,9
	141126b	1,47E-02	2,47E-04	4,79E-03	2,86E-05	7,0
	141126c	1,19E-02	1,86E-04	4,98E-03	2,73E-05	7,7
	141126c	1,27E-02	1,21E-04	4,91E-03	4,43E-05	9,3
	141126c	1,92E-02	1,60E-04	5,10E-03	2,08E-05	6,7
	141204c	1,38E-02	7,92E-05	5,45E-03	1,08E-05	8,2
	141204c	1,56E-02	5,41E-05	5,20E-03	1,33E-05	10,8
	141210a	1,52E-02	4,66E-05	6,49E-03	6,43E-06	8,2
	141210a	1,62E-02	3,73E-05	6,79E-03	7,33E-06	10,1
	141211a	1,26E-02	1,52E-04	4,81E-03	1,79E-05	8,0
	141211a	1,38E-02	6,78E-05	5,38E-03	1,75E-05	9,9