

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

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург

Научный руководитель:

доктор биологических наук
Скарлато Сергей Орестович
главный научный сотрудник
Лаборатории цитологии одноклеточных
организмов Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Института
цитологии Российской академии наук,
Санкт-Петербург

Официальные оппоненты:

кандидат биологических наук
Сабанеева Елена Валентиновна
доцент кафедры цитологии и гистологии
Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего
образования «Санкт-Петербургский
государственный университет», Санкт-Петербург

доктор биологических наук
Фролов Александр Олегович
главный научный сотрудник Лаборатории
по изучению паразитических червей и протистов
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Зоологического
института Российской академии наук,
Санкт-Петербург

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Ботанический институт
им. В.Л. Комарова Российской академии наук,
Санкт-Петербург

Защита диссертации состоится «02» марта 2018 г. в _____ часов на заседании
Диссертационного совета Д 002.230.01 на базе Института цитологии РАН по адресу:
194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект, д. 4.

Сайт института: <http://www.cytspb.rssi.ru>

Адрес электронной почты института: cellbio@incras.ru

Факс института: (812) 297-35-41

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН и на сайте
<http://www.cytspb.rssi.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2018 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Е.В. Каминская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 (Окологков, 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 мочевина, 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 вариабельности 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 меченых 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.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения полученных результатов, их обсуждения, выводов, списка цитируемой литературы (242 источника, из них 233 – на иностранном языке) и приложения. Работа изложена на 134 страницах, иллюстрирована 31 рисунком и 10 таблицами. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 14-04-32146-мол_а и № 13-04-00703-а), Германской службы академических обменов и Российского научного фонда (грант № 16-14-10116).

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

ВВЕДЕНИЕ

Во введении обоснована актуальность темы исследования, сформулированы его цель и задачи, приводятся основные положения, выносимые на защиту, научная новизна работы, ее теоретическая и практическая значимость, а также сведения о личном вкладе автора, апробации работы и количестве публикаций по теме диссертации.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В этой главе дана характеристика группы Dinoflagellata. Особое внимание уделено физиологии питания миксотрофных динофлагеллят, в том числе их способности использовать органические источники биогенных элементов наряду с неорганическими. Обсуждена роль мочевины и глицина как наиболее распространенных растворенных органических субстратов в прибрежных водах морей. Рассмотрены молекулярные основы поглощения и ассимиляции нитрат-ионов, мочевины и глицина клетками. Приведен обзор современных данных об экофизиологии протистов, полученных путем исследования отдельных клеток.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культура клеток. В работе использовали культуру динофлагеллят *Prorocentrum minimum* CCAP1136/16 из коллекции культур водорослей и простейших Шотландского морского института (The Culture Collection of Algae and Protozoa, Шотландия, Великобритания). Динофлагелляты культивировались в бессиликатной среде f/2 (Guillard, Ryther, 1962) с pH 8.2 и соленостью 25‰, приготовленной на основе искусственной морской воды (Kester et al., 1967), при температуре 22–23 °C и освещенности 100 мкмоль фотонов $\times$ м⁻² $\times$ с⁻¹ в режиме 12 ч свет : 12 ч темнота.

Измерение концентрации источников азота и углерода. Концентрацию мочевины и ионов нитрата (NO₃⁻) и аммония (NH₄⁺) в среде измеряли методом колориметрии с

помощью спектрофотометра СФ-2000 (ОКБ Спектр, Россия). Измерение концентрации мочевины проводилось по Гойенсу с соавторами (Goeuens et al., 1998), ионов нитрата – по Дозйну и Хорвату (Doane, Horwath, 2003), ионов аммония – по Королеву (Koroleff, 1969; Hansen, Koroleff, 1999). После добавления реагентов пробы инкубировали в темноте при комнатной температуре 12–18 ч и измеряли абсорбцию света при длине волны 520 нм в случае мочевины и 540 нм в случае ионов нитрата и аммония. Определение концентрации ионов бикарбоната (HCO_3^-) проводили с помощью титрования 0.5М соляной кислотой в присутствии метилоранжа (Муравьев, 2004).

Подсчет клеток динофлагеллят. Клетки считали в камере Фукса-Розенталя или с помощью проточного цитометра FACSCalibur™ (Becton, Dickinson, and Company, США). Предварительно клетки фиксировали раствором Люголя (подсчет в камере Фукса-Розенталя) или смесью 1% формальдегида и 1% глутаральдегида (подсчет методом проточной цитометрии).

Протоколы экспериментов. Перед началом экспериментов среду f/2 с уменьшенным содержанием источников азота и фосфора (400 мкмоль l^{-1} нитрата натрия и 100 мкмоль l^{-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 l^{-1} . При проведении экспериментов не прибегали к полной замене среды, поскольку центрифугирование и вакуумная фильтрация, необходимые для концентрирования клеток, являются факторами, вызывающими экдизис у динофлагеллят, и 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, чтобы добавить равное количество органического азота. В экспериментах использовали поверхностную фракцию культуры, содержащую активно плавающие клетки. До начала опыта брали пробы для определения естественного изотопного состава клеток и для измерения концентрации нитрат- и бикарбонат-анионов в культуральной среде. 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 тяжелыми 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 (160–200 мкмоль N l^{-1}). В случае экспериментов, посвященных изучению поглощения углерода органических субстратов, мочевины и глицин добавляли в концентрации по азоту 200 мкмоль l^{-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. Фильтраты сохраняли для определения концентраций питательных субстратов. Время инкубации клеток с изотопными метками составляло 2 ч в случае экспериментов, посвященных изучению конкурентного поглощения нитрат-ионов и органических веществ. В ходе экспериментов, посвященных изучению поглощения азота и углерода органических веществ, пробы отбирались последовательно 3–4 раза, время инкубации составляло 0.3–6 ч. Эксперименты были выполнены в 3–6 повторностях.

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

Эксперим. 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-бикарбонат (2%)	Скорость поглощения нитрата и бикарбоната
2 («нитрат»)	Нитрат + мочевина	¹⁵ N-нитрат (10%)	¹³ C-бикарбонат (2%)	Скорость поглощения нитрата и бикарбоната
3 («мочевина»)	Нитрат + мочевина	¹⁵ N-мочевина (10%)	¹³ C-бикарбонат (2%)	Скорость поглощения азота мочевины и бикарбоната
Эксперимент «Конкурентное поглощение нитрат-ионов и глицина»				
1 («только нитрат»)	Нитрат	¹⁵ N-нитрат (10%)	¹³ C-бикарбонат (2%)	Скорость поглощения нитрата и бикарбоната
2 («нитрат»)	Нитрат + глицин	¹⁵ N-нитрат (10%)	¹³ C-бикарбонат (2%)	Скорость поглощения нитрата и бикарбоната
3 («глицин»)	Нитрат + глицин	¹⁵ N-глицин (10%)	¹³ C-бикарбонат (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-бикарбонат (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-C 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-бикарбонат (2%)	Скорость поглощения азота глицина и бикарбоната

Масс-спектрометрия изотопных отношений. Фильтры с клетками, полностью высушенные при температуре 50–60 °С, заворачивали в оловянную фольгу и спрессовывали. 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 использовали ацетанилид и пептон (Millipore, США). Точность измерений составляла ≤ 0.2 ‰.

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) (Матанцева, 2012). Клетки 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 удаления золота с поверхности и достижения стабильных условий формирования вторичных ионов использовали поток первичных ионов цезия (Cs⁺) с силой тока 600 пА. Для анализа использовали поток первичных ионов цезия (Cs⁺) с силой тока 1 пА. Анализировали 200 слоев толщиной 1 нм. Полученные данные обрабатывали в программе Look at NanoSIMS (Polerecky et al., 2012). Изотопные отношения рассчитывались для участков интереса, которые были определены вручную и соответствовали контурам клеток. Несколько клеток, выбранных случайным образом, были проанализированы на глубину, значительно превышающую 200 нм. Анализ не выявил различий в изотопном составе по глубине.

Вычисления. 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.

Биоинформатический анализ. В работе использованы транскриптомы *P. minimum* CCMP1329 и CCMP2233 из базы данных проекта «Marine Microbial Eukaryote Transcriptome Sequencing Project» (MMETSP; 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 National Center for Biotechnology Information. Для каждого из обнаруженных гомологов параметр E-value не превышал 10^{-20} . Выравнивание 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 проводили с помощью TMHMM Server v. 2.0 (Krogh et al., 2001). Идентичность последовательностей *P. minimum* с референсными последовательностями оценивали в программе SIAS (<http://imed.med.ucm.es/Tools/sias.html>), рассчитывая ее как процентное отношение числа идентичных аминокислотных остатков к длине наиболее короткой из выровненных последовательностей.

Статистический анализ. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего, если не оговорено иное. Нормальность распределения и равенство дисперсий больших выборок ($n > 30$) оценивали с помощью критериев Шапиро-Уилка, Андерсона-Дарлинга и Бартлетта. Для сравнения независимых выборок использовали

однофакторный дисперсионный анализ (1-way ANOVA) с пост-тестом Тьюки и непараметрические критерий Краскела-Уоллеса с последующим тестом Данна и критерий Манна-Уитни. В случае сравнения парных измерений использовали непараметрический критерий Уилкоксона или парный t-критерий Стьюдента. Для оценки корреляции переменных применялся коэффициент корреляции Спирмана. Статистически значимыми считались различия и корреляции при $p < 0.05$.

ГЛАВЫ 3 и 4. РЕЗУЛЬТАТЫ и ОБСУЖДЕНИЕ

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

После добавления мочевины или глицина к культуре *P. minimum*, растущей на нитрат-ионах, транспорт органических субстратов в клетки динофлагеллят осуществлялся уже в первые 2 ч (Matantseva et al., 2014, 2016). Скорость поглощения азота мочевины в два раза превышала скорость поглощения азота нитрат-ионов ($p = 0.0156$, $n = 6$), несмотря на то, что оба субстрата присутствовали в среде в равных по азоту концентрациях (рисунок 1, а). При этом средние молярные скорости поглощения нитрат-ионов и мочевины не различались ($p = 0.4375$, $n = 6$) и составляли 15.1 ± 3.4 и 17.5 ± 2.2 фмоль $\text{кл}^{-1} \text{ч}^{-1}$, соответственно (рисунок 1, б). Вклад азота мочевины в общий поглощенный клетками азот составлял приблизительно 70% (рисунок 1, в).

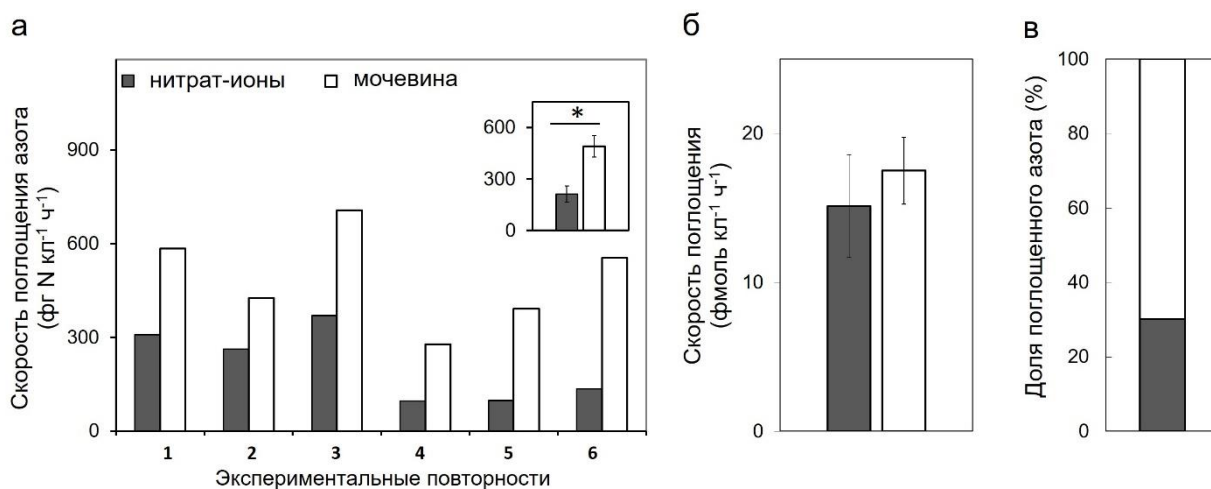


Рисунок 1. Конкурентный транспорт нитрат-ионов и мочевины в клетки *P. minimum*. а – скорость поглощения азота субстратов; б – молярная скорость поглощения субстратов; в – вклад каждого из субстратов в общее поглощение азота. На врезке показаны усредненные данные о скорости поглощения азота каждого из субстратов по всем повторностям. Звездочкой отмечены статистически значимые отличия в скорости поглощения азота нитрата и мочевины ($p < 0.05$, $n = 6$).

Скорость поглощения азота глицина клетками *P. minimum* была выше скорости поглощения ионов нитрата ($p = 0.046$, $n = 3$) в два раза, несмотря на то, что оба субстрата присутствовали в среде в приблизительно равных по азоту концентрациях (рисунок 2, а). При этом молярная скорость поглощения глицина также была выше молярной

скорости поглощения нитрат-ионов в два раза (рисунок 2, б). Азот глицина составлял около 70% всего азота, транспортируемого в клетки (рисунок 2, в).

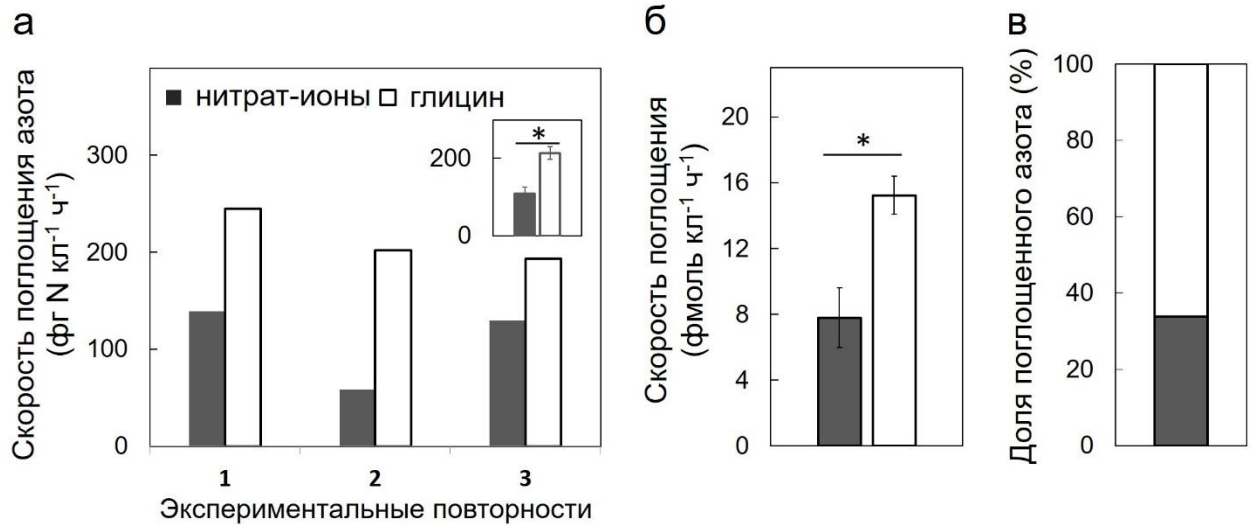


Рисунок 2. Конкурентный транспорт ионов нитрата и глицина в клетки *P. minimum*. а – скорость поглощения азота субстратов; б – молярная скорость поглощения субстратов; в – вклад каждого из субстратов в общее поглощение азота. На врезке показаны усредненные данные о скорости поглощения азота каждого из субстратов по всем повторностям. Звездочкой отмечены статистически значимые отличия в скорости поглощения нитрата и мочевины ($p < 0.05$, $n = 3$).

Эксперименты показали, что мочевина оказывала супрессирующее действие на конкурентное поглощение ионов нитрата динофлагеллятами (Matantesva et al., 2015, 2016a,b). В ее присутствии скорость поглощения нитрат-ионов снижалась на 30–40% по сравнению с контролем, в который не было добавлено органического источника азота ($p = 0.0156$, $n = 6$) (рисунок 3, а).

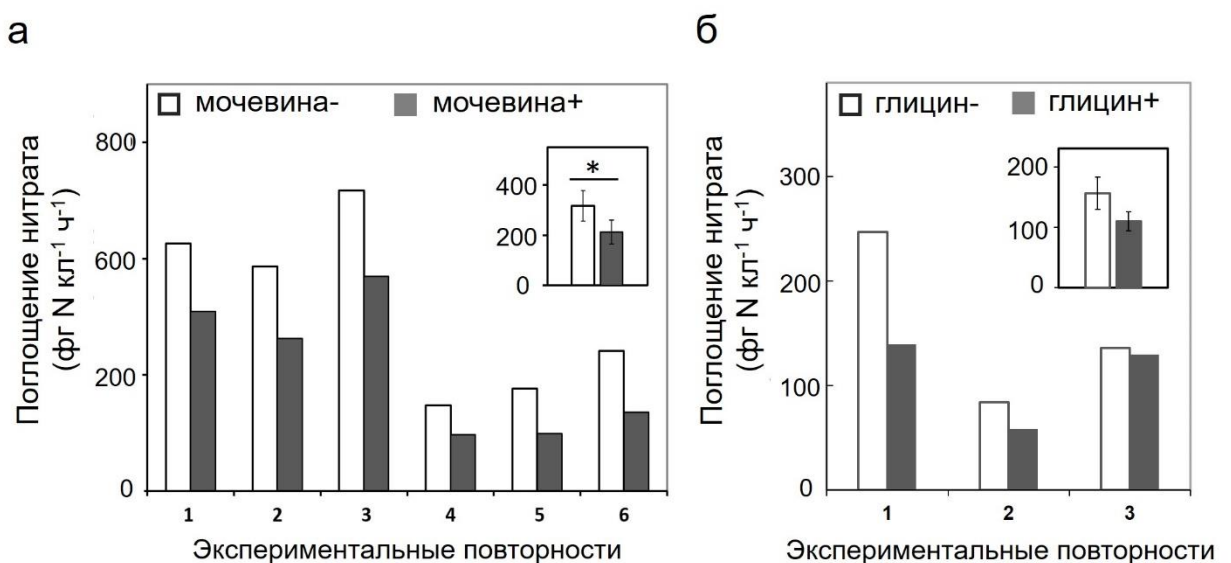


Рисунок 3. Влияние мочевины (а) и глицина (б) на скорость поглощения нитрата клетками *P. minimum*. На врезках показаны усредненные данные по всем повторностям. Звездочкой отмечены статистически значимые отличия в скорости поглощения нитрата и мочевины ($p < 0.05$, $n = 6$).

В присутствии глицина также было отмечено снижение скорости поглощения ионов нитрата динофлагеллятами, однако оно не было статистически значимым ($p = 0.272$, $n = 3$) (рисунок 3, б). Таким образом, на сегодняшний день не было показано супрессирующего действия глицина на поглощение нитрат-ионов клетками *P. minimum* (Матанцева, 2017; Matantseva et al., 2017).

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. Независимо от первоначального азотного статуса экосистемы (недостаток азота или его избыточное содержание), растворенные органические вещества следует считать важным источником азота для миксотрофных динофлагеллят (Матанцева, Скарлато, 2013; Matantseva, 2013), а их поступление в среду – рассматривать как фактор, способствующий инициации и пролиферации их цветений.

Примечательно, что скорость поглощения мочевины клетками *P. minimum*, выраженная через массу азота, превышала скорость конкурентного поглощения нитрат-ионов приблизительно в два раза, в то время как молярные скорости поглощения этих субстратов были равны (рисунок 1, 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 2, а, б). Более высокая скорость поглощения глицина может быть связана как с большим количеством транспортеров этого вещества в мембране, так и с большей скоростью функционирования этих транспортеров.

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.

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 всего углерода, поступающего в клетки динофлагеллят преимущественно в форме бикарбонат-ионов (таблица 2).

Таблица 2. Поглощение неорганического углерода и углерода органических субстратов динофлагеллятами *P. minimum*. Значения приведены как среднее $\pm$ 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 $\pm$ 530	10 $\pm$ 1	0.4 $\pm$ 0.1
Глицин	1706 $\pm$ 95	23 $\pm$ 4	1.3 $\pm$ 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 1:2, соответственно, и после их включения в биомассу. В настоящей работе показано, 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 4) (Матанцева, 2014).

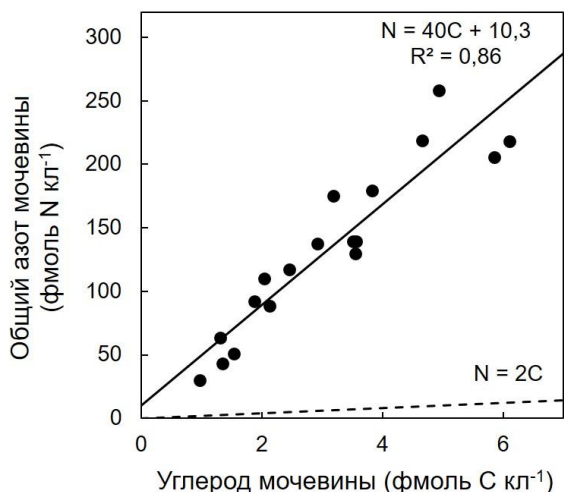


Рисунок 4. Соотношение азота и углерода мочевины, поглощенных клетками *P. minimum*. Пунктирной линией показано теоретическое соотношение, ожидаемое в соответствии со структурой молекулы мочевины. Корреляция статистически значима ($p < 0.05$).

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 5, 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). При этом

обогащение клеток атомами углерода C_1 (углерод карбоксильной группы) было ниже, чем обогащение атомами C_2 (рисунок 5, б, в). Выявленное соотношение поглощения углерода C_1 и C_2 указывает на то, что в клетках содержалось в 1.3 раза меньше углерода C_1 , чем C_2 .

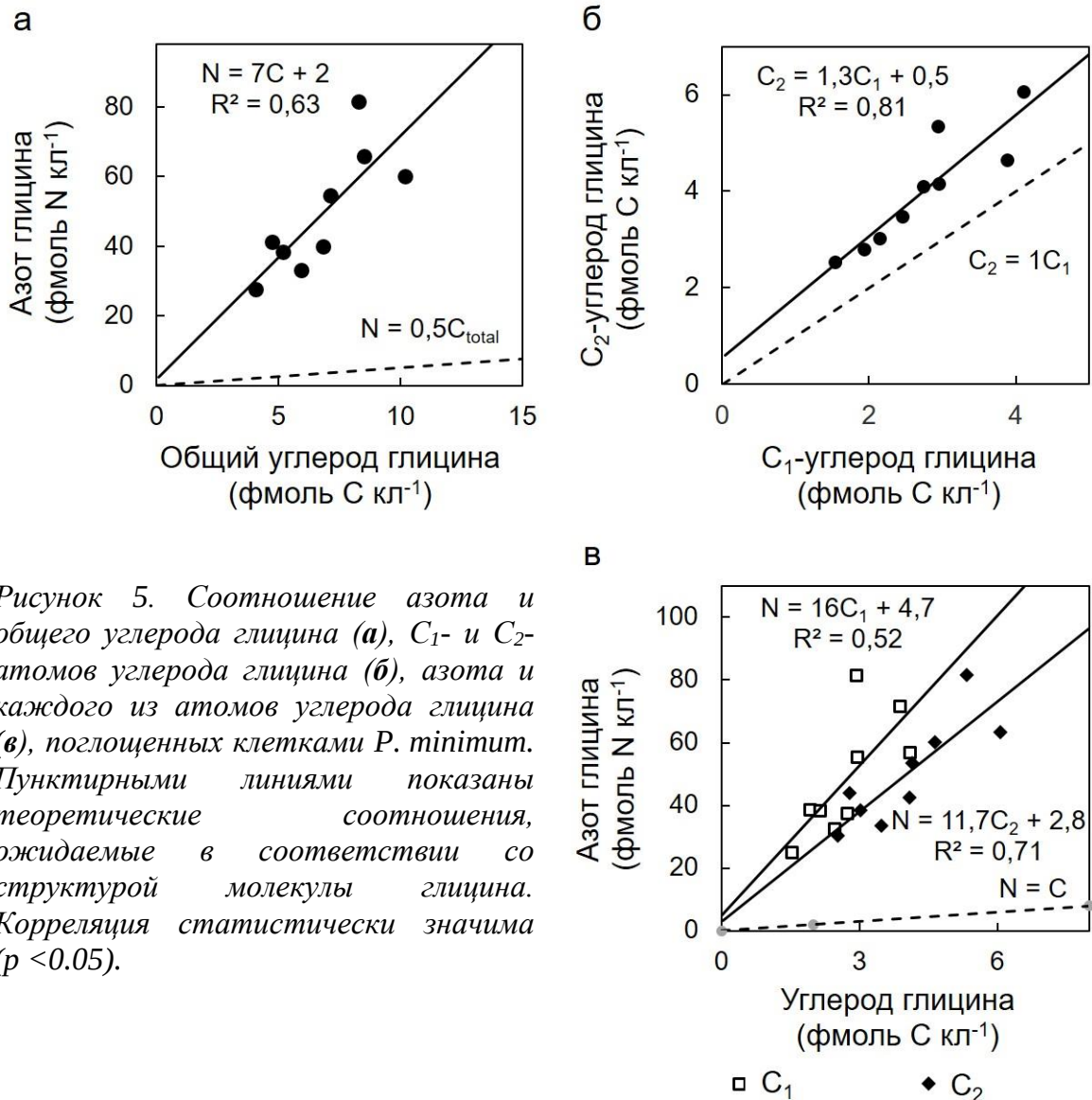


Рисунок 5. Соотношение азота и общего углерода глицина (а), C_1 - и C_2 -атомов углерода глицина (б), азота и каждого из атомов углерода глицина (в), поглощенных клетками *P. minitum*. Пунктирными линиями показаны теоретические соотношения, ожидаемые в соответствии со структурой молекулы глицина. Корреляция статистически значима ($p < 0.05$).

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

Скрининг транскриптомов показал, что *P. minitum* обладает разнообразным репертуаром гомологов белков, вовлеченных в транспорт и ассимиляцию исследуемых питательных субстратов (таблица 3) (Matantseva et al., 2016; Pechkovskaya, Matantseva et al., 2017). Среди них – транспортеры, осуществляющие активный транспорт нитрат-ионов, мочевины и глицина, каналы и аквапорины, участвующие в их пассивном транспорте, а также ферменты, ответственные за метаболизм этих соединений в клетке.

Таблица 3. Гомологи белков, вовлеченных в транспорт и ассимиляцию нитрат-ионов, мочевины и глицина, в транскриптомах *P. minimum* CCMP1329/CCMP2233. Приведены номера последовательностей с наименьшим E-value из каждого транскриптома.

Послед-ть запроса (организм)	№ послед-ти (<i>P. minimum</i>)	E-value	Длина, а.о.	Идент-ть, %	Функция
NRT1.1 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	—	—	—	—	транспорт нитрата
NRT1.2 (<i>A. thaliana</i>)	10286_1/ 13648_1	6e-23/ 6e-23	663/701	21/21	
NRT2.1 (<i>A. thaliana</i>)	224264_1/ 255222_1	2e-47/ 2e-47	574/ 523	23/24	
CLCa (<i>A. thaliana</i>)	11985_1/ 47364_1	6e-79/3e-78	912/ 912	28/28	
SLAC1 (<i>A. thaliana</i>)	—	—	—	—	
MIP (PIP, NIP, TIP) (<i>A. thaliana</i>)	6038_1/ 47098_1	7e-24/7e-24	303/288	23/23	транспорт мочевины
DUR3 (<i>A. thaliana</i>)	263164_1/ 255379_1	0/e-162	1349/142 2	53/53	
Urea ABC transporter (<i>Rhodococcus equi</i>)	—	—	—	—	
YUT (<i>Yersinia rohdei</i>)	—	—	—	—	
UAC (<i>Helicobacter pylori</i>)	—	—	—	—	
SLC14 (<i>Mus musculus</i>)	—	—	—	—	транспорт глицина
AAP (AAP1, AAP2, AAP3, AAP4, AAP7) (<i>A. thaliana</i>)	—	—	—	—	
CAT1 (<i>A. thaliana</i>)	13539_1/ 43864_1	6e-44/4e-59	575/635	22/25	
GAP1 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	—	—	—	—	
GLYT (<i>Homo sapiens</i>)	44598_1/ 41065_1	2e-71/1e-83	584/758	30/31	метаболизм нитрата
NAR (<i>A. thaliana</i>)	67873_1/ 257292_1	1e-180/0	829/942	42/42	
NIR (<i>A. thaliana</i>)	258241_1/ 241489_1	2e-28/2e-24	1489/802	22/21	метаболизм мочевины
URE (<i>A. thaliana</i>)	39151_1/ 16863_1	0/0	818/814	66/66	
H-белок [GDC] (<i>A. thaliana</i>)	14765_1/ 45622_1	1e-21/1e-21	222/142	32/36	метаболизм глицина
L-белок [GDC] (<i>A. thaliana</i>)	5108_1/ 21839_1	1e-150/ 1e-152	630/528	58/58	
P-белок [GDC] (<i>A. thaliana</i>)	14760_1/ 215831_1	0/0	980/966	51/51	
T-белок [GDC] (<i>A. thaliana</i>)	44708_1/ 25581_1	1e-100/ 1e-100	496/474	51/50	
SHMT (<i>A. thaliana</i>)	30838_1/ 67811_1	1e-169/ 1e-160	495/422	60/65	
SDH (<i>A. thaliana</i>)	20540_1/ 201278_1	1e-57/ 2e-55	362/342	43/42	

Выявленное в настоящей работе разобщение ассимиляции азота и углерода мочевины и глицина, вероятно, связано с метаболизмом этих соединений в клетках динофлагеллят. Показано, что динофлагелляты *P. minimum* обладают уреазой (URE) (таблица 3). В результате гидролиза мочевины, осуществляемого этим ферментом (Roop, Levenberg, 1972; Solomon et al., 2010), углерод этого соединения высвобождается в форме CO_2 (HCO_3^-) и покидает клетку, смешиваясь с неорганическим углеродом, содержащимся в морской воде (рисунок 6, а).

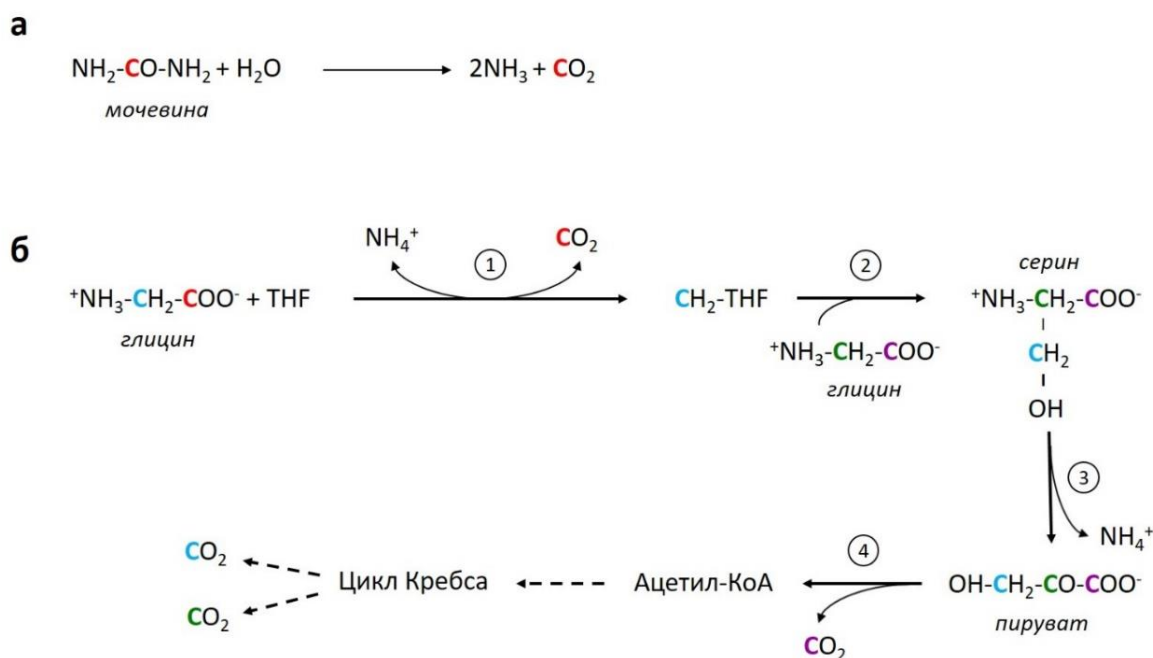


Рисунок 6. Пути метаболизма мочевины (а) и глицина (б) у *P. minimum* в соответствии с транскриптомными данными. Красным и фиолетовым обозначены первые атомы углерода, голубым и зеленым – вторые. (1) – ферменты комплекса декарбоксилирования глицина; (2) – серин-гидроксиметилтрансфераза; (3) – серин-дегидратаза (серин-рацемаза); (4) – пируватдегидрогеназный комплекс. THF – тетрагидрофолат.

В ходе метаболизма глицина с помощью белков комплекса декарбоксилирования глицина (H-, L-, P- и T-белки) также происходит образование неорганического углерода из углерода карбоксильной группы глицина (рисунок 6, б) (Douce et al., 2001; Schulze et al., 2016), что, вероятно, является причиной более низкого уровня ассимиляции этого атома углерода (C_1) по сравнению со вторым. Вторым атомом углерода глицина (C_2) в результате реакции с еще одной молекулой глицина оказывается в составе серина; данная реакция катализируется серин-гидроксиметилтрансферазой (SHMT). В свою очередь, серин является субстратом для серин-дегидратазы, или серин-рацемазы (SDH), катализирующей образование пирувата с высвобождением еще одного иона аммония (рисунок 6, 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.

Разобобщение 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 азота могут быть как неорганические, так и органические соединения. По сравнению с ростом на неорганических субстратах, 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 4).

*Таблица 4. 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; 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)	<i>k</i>	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%

Учитывая повсеместное эвтрофирование прибрежных экосистем, ведущее к повышению концентрации растворенных органических веществ в воде и распространению динофлагеллят, а также предпочтительное использование динофлагеллятами азота глицина и мочевины по сравнению с ионами нитрата, следует ожидать, что данный путь минерализации органических веществ может приобрести еще большее значение в будущем. Таким образом, рост фотосинтезирующих динофлагеллят на мочеvine и глицине следует считать фактором, оказывающим существенное влияние на локальные и глобальный циклы углерода.

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

С помощью метода NanoSIMS проанализировано по 15–25 клеток *P. minimum* из всех экспериментальных параллелей («мочевина», «нитрат», «только нитрат» и «контроль», не содержащий изотопных меток) повторностей 5 и 6 и определен уровень поглощения нитрат-ионов, мочевины и ионов бикарбоната этими клетками (рисунок 7,

а–г). В целом, данные, полученные посредством анализа индивидуальных клеток, соответствуют результатам, полученным на уровне популяций. Уровень поглощения азота мочевины был выше, чем уровень поглощения азота нитрат-ионов ($p < 0.001$); при этом уровень поглощения нитрат-ионов в присутствии мочевины был ниже, чем уровень поглощения нитрат-ионов, наблюдаемый в параллели, куда мочевина не была добавлена ($p < 0.001$) (рисунок 7, а, в). Для того чтобы напрямую сопоставить результаты измерений на популяционном уровне и уровне отдельных клеток, они были представлены как относительная скорость поглощения азота. Скорость поглощения азота нитрат-ионов в отсутствие мочевины была принята за единицу, а скорости конкурентного поглощения нитрат-ионов и мочевины были выражены относительно нее (рисунок 8). Как видно из рисунка 8, 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.

Однако 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 7, а–г; 9, а–е), и эта гетерогенность не была связана с недостаточной точностью метода, так как значительно превышала погрешность измерений (рисунок 9, а, б). Не было обнаружено корреляции между размером клеток и уровнем их обогащения тяжелыми изотопами азота и углерода во всех экспериментальных параллелях ($-0.304 \geq r \leq 0.004$, $p > 0.05$), кроме параллели «нитрат», в случае которой наблюдалась очень слабая отрицательная корреляция между размером клеток и их обогащением атомами ^{13}C ($r = -0.383$, $p = 0.017$). Таким образом, различные уровни обогащения клеток тяжелыми изотопами связаны с разницей в скорости поглощения и ассимиляции меченых питательных субстратов. Кроме того, не было обнаружено статистически значимой корреляции между скоростью поглощения ионов бикарбоната и скоростью поглощения мочевины или нитрат-ионов ($r = -0.042$, $p = 0.824$ и $r = 0.175$, $p = 0.293$, соответственно), то есть клетки, которые поглощали азот мочевины или нитрат-ионов с наибольшей скоростью не обязательно были самыми активными в отношении поглощения ионов бикарбоната.

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 (рисунки 7, а–г; 9, а, б). Коэффициенты вариации, характеризующие скорость поглощения каждого из субстратов, превышали 50%, что свидетельствует о высокой гетерогенности популяций динофлагеллят по исследуемым параметрам. Примечательно, что степень подавления поглощения ионов нитрата в присутствии мочевины не была одинаковой для разных клеток. Примерно у 30% клеток поглощение нитрат-ионов было ингибировано полностью: обогащение таких клеток изотопами ^{15}N

не отличалось от контроля (рисунок 9, а, б). При этом 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 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.

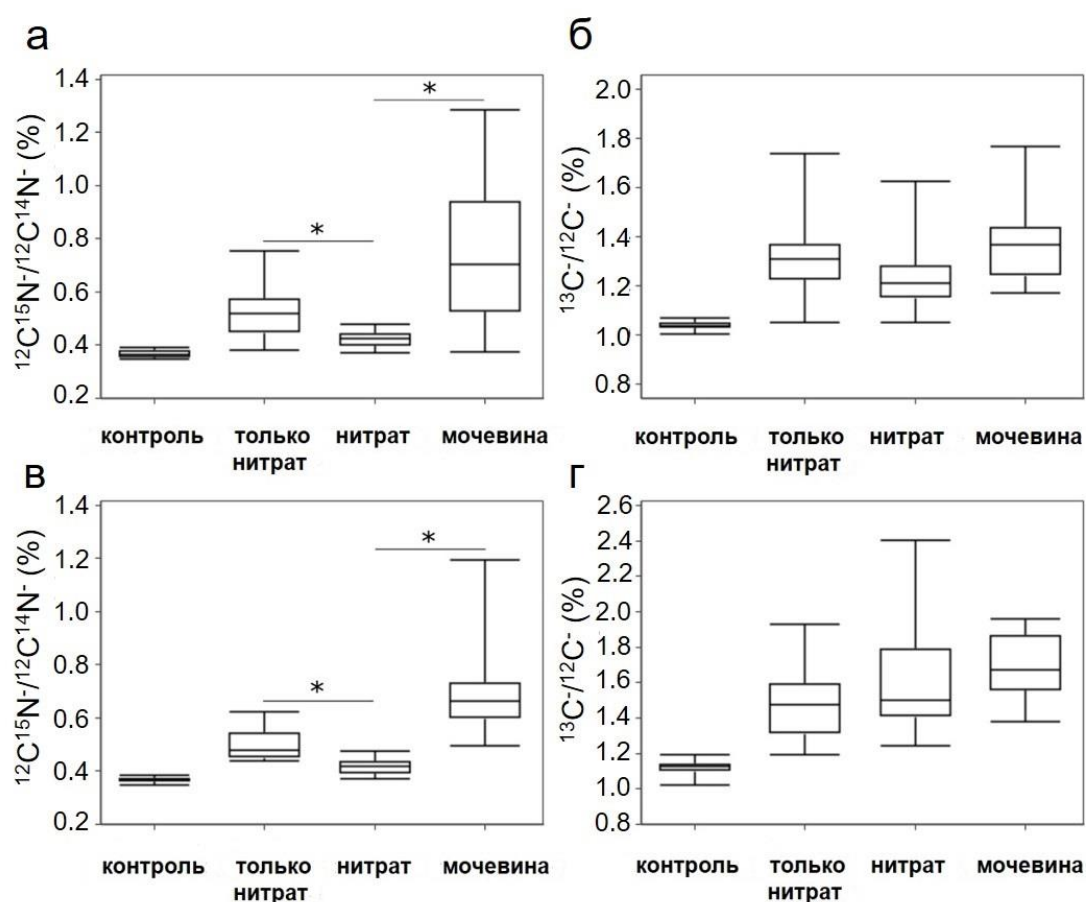


Рисунок 7. Поглощение азота нитрат-ионов и мочевины, а также углерода бикарбонат-ионов клетками *P. minimum*, измеренное методом NanoSIMS: а – обогащение клеток изотопами ^{15}N в повторности 5; б – обогащение клеток изотопами ^{13}C в повторности 5; в – обогащение клеток изотопами ^{15}N в повторности 6; г – обогащение клеток изотопами ^{13}C в повторности 6. Показаны медианы, 25^я и 75^я перцентили, а также полный диапазон значений. 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 «мочеви́на» (отражает предпочтительное поглощение мочевины в

присутствии нитрата) (критерий Краскела-Уоллеса с пост-тестом Данна, $p < 0.05$, и критерий Манна-Уитни, $p < 0.001$).

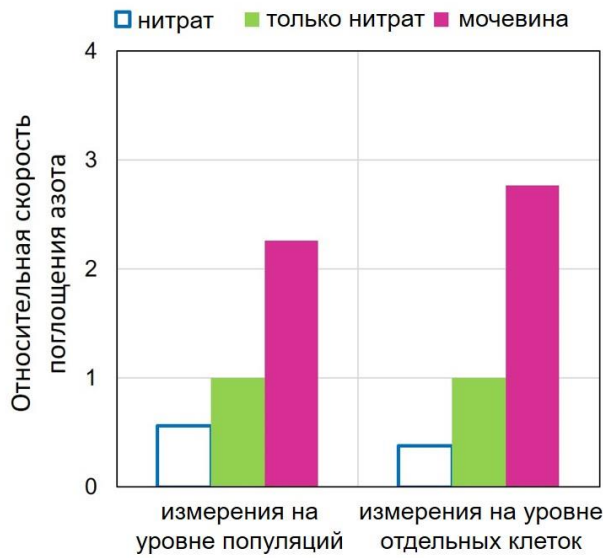


Рисунок 8. Средние значения относительных скоростей конкурентного поглощения нитрата и мочевины, а также поглощения нитрата в отсутствие мочевины, определенные путем измерений на уровне популяций и отдельных клеток. Скорость поглощения азота нитрат-ионов в отсутствие мочевины принята за единицу, относительно нее выражены скорости конкурентного поглощения нитрат-ионов и мочевины. Приведены средние значения для экспериментальных повторностей 5 и 6.

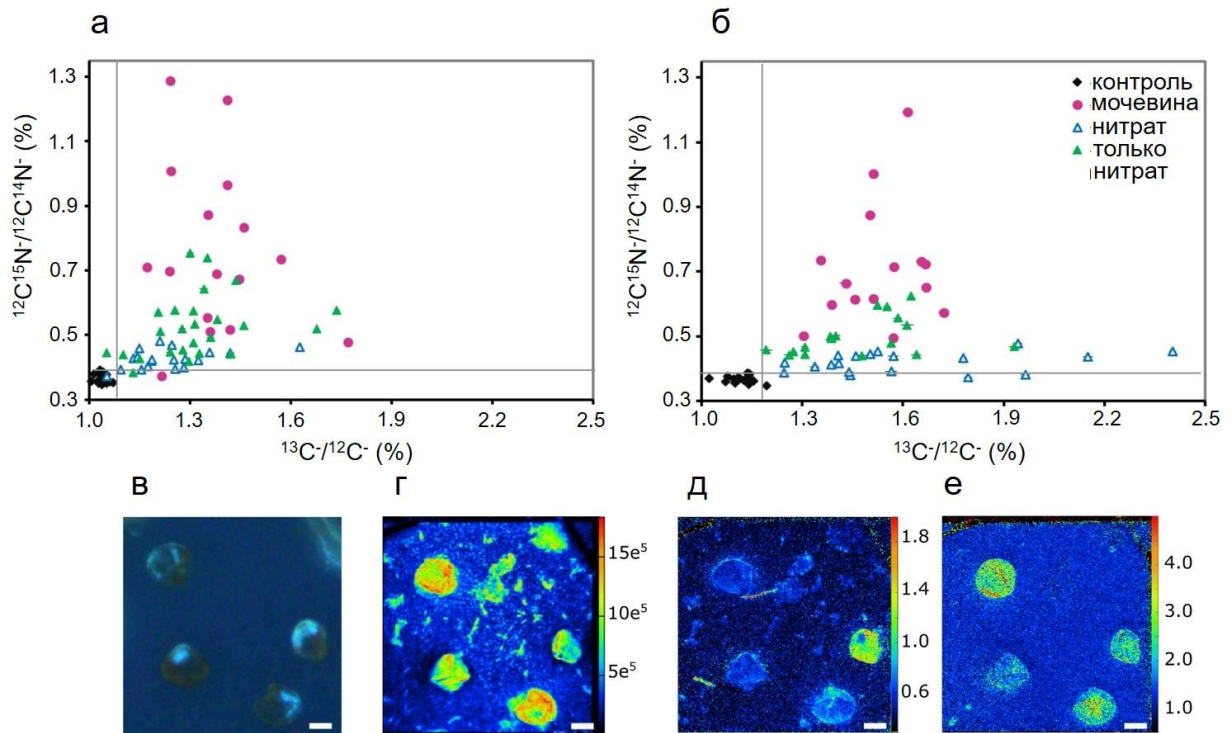


Рисунок 9. Гетерогенность популяций *P. tininit* в отношении поглощения нитрат-ионов, мочевины и бикарбонат-ионов, выявленная методом NanoSIMS: а – обогащение отдельных клеток изотопами ^{15}N и ^{13}C в каждой из экспериментальных параллелей повторности 5; б – обогащение отдельных клеток изотопами ^{15}N и ^{13}C в каждой из экспериментальных параллелей повторности 6; в – микрофотография клеток *P. tininit* в УФ свете (здесь и далее показаны клетки из параллели «мочевина»); г – содержание $^{12}\text{C}^{14}\text{N-}$, 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 (д, е). Планками показаны ошибки измерений методом NanoSIMS (в большинстве случаев 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.

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 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 (Lidstrom, Konopka, 2010). Наконец, гетерогенность популяций динофлагеллят может быть регулируемым адаптивным свойством, находящимся под контролем факторов среды, а также функционального состояния отдельных клеток (Elowitz et al., 2002; Martins, Locke, 2015). Независимо от изначальных причин такой гетерогенности, она должна быть связана с разницей в уровне экспрессии и активности транспортеров мочевины, ионов нитрата и бикарбоната и/или с экспрессией разных наборов транспортеров этих субстратов в разных клетках. В настоящей работе 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).

Существуют экспериментальные свидетельства того, что гетерогенность приобретает особое значение при изменениях условий среды, а также под воздействием стресса (Kussell, Leibler, 2005; Acar et al., 2008; 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, 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 (Matantseva, Skarlato, 2015).

В настоящее время этот аспект практически полностью игнорируется при экосистемном моделировании, хотя в одних и тех же условиях среды динамика (характер роста и пролиферации) гомогенной и гетерогенной популяций может быть существенно различной. В предельном случае динамика всей популяции определяется динамикой роста и пролиферации каждой из клеток, составляющих ее.

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 SAT1), 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах из списка ВАК:

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, **O. Matantseva**, Y. Negulyaev, S. Skarlato // Marine drugs. – 2014. – V. 12. – N. 9. – P. 4743–4755.
3. **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.
4. **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, 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, **O. 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.