

Ваши контрольные:

Четкие, впечатление, что ВСЕ понятно.

Артем – ответил не на все вопросы, надеюсь, позже «закроет» пробелы

Саша – очень «деловая» работа: «Отвечаю кратко, только по существу»

Впечатлила работа Кати – ОЧЕНЬ развернуто и даже ПОЭТИЧНО!!

Степа – АУ! Пока работ нет....

Сегодня:

Влияние температуры на рост и фотосинтез водорослей

Зависимость фотосинтеза от обеспеченности биогенными элементами

Для ответа на экзаменационный вопрос:

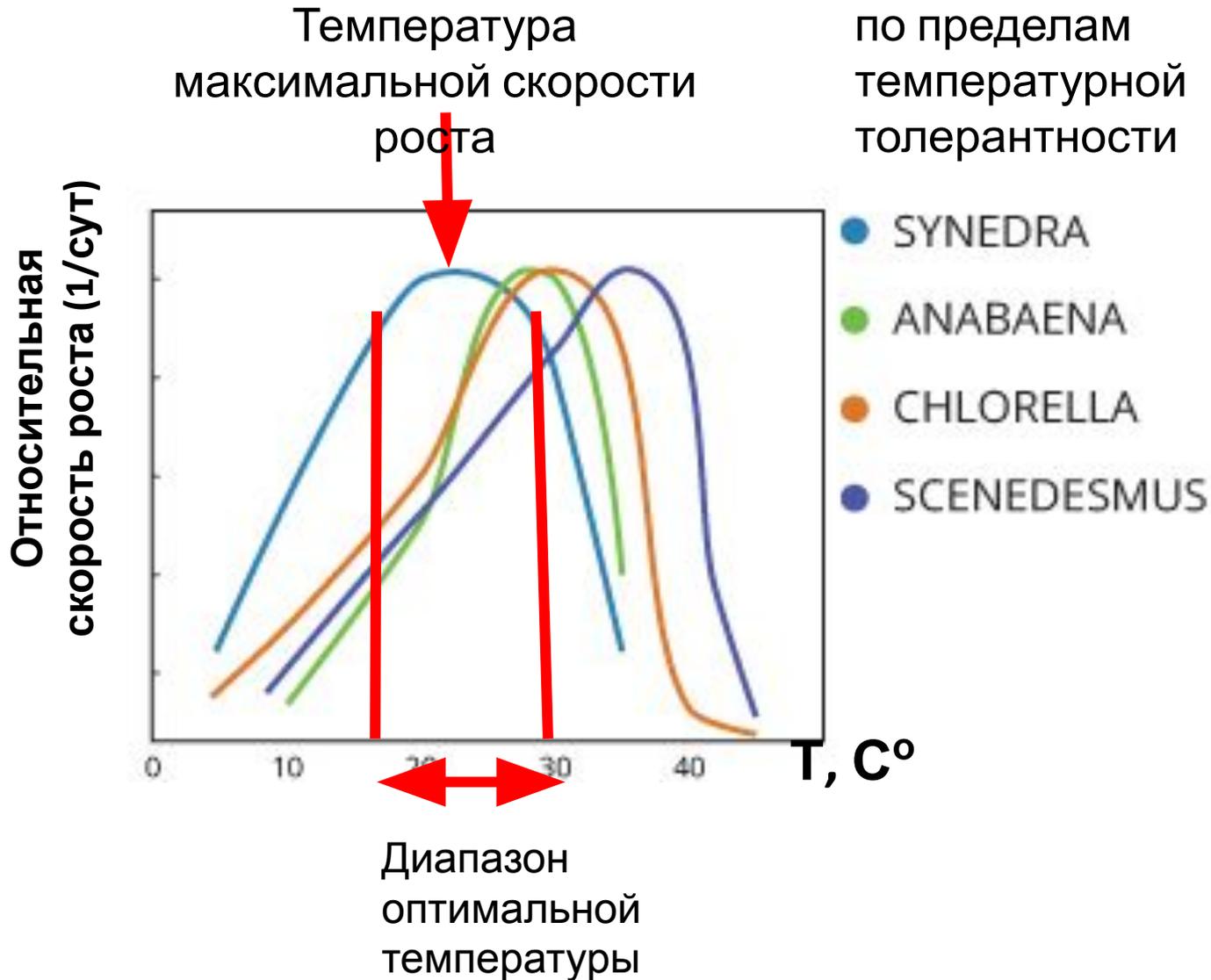
Основные биогенные элементы и формы их присутствия в водной среде. Биогенные элементы, лимитирующие рост фитопланктона. Потребление биогенных элементов водорослями. **Модели минерального питания фитопланктона.** Зависимость скорости роста водорослей от концентрации биогенных элементов в среде.

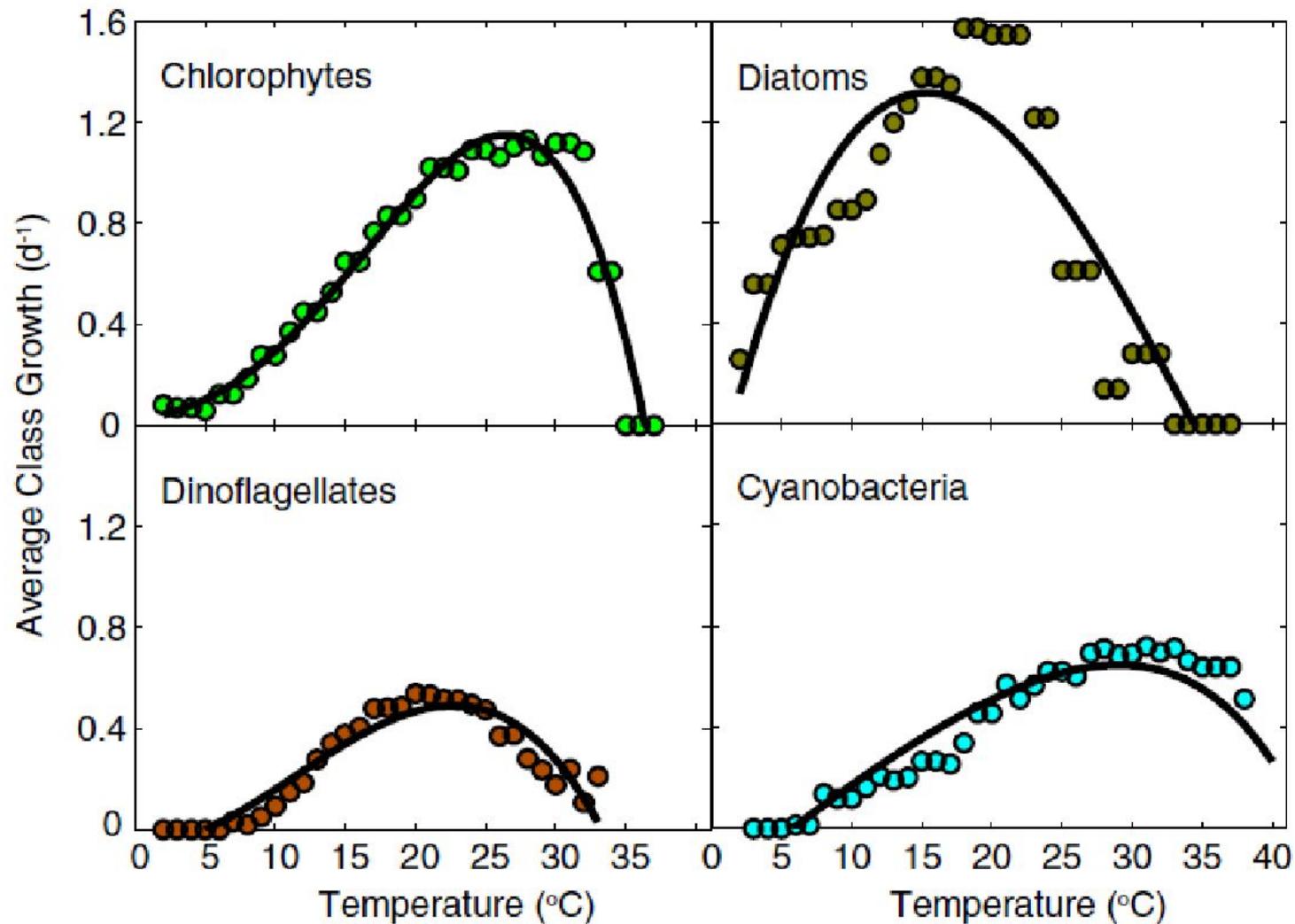
Влияние температуры на рост и фотосинтез водорослей



Влияние температуры на рост водорослей

Водоросли различаются по пределам температурной толерантности





Относительная скорость роста (1/сут), усреднение для классов эукариотических водорослей и цианобактерий

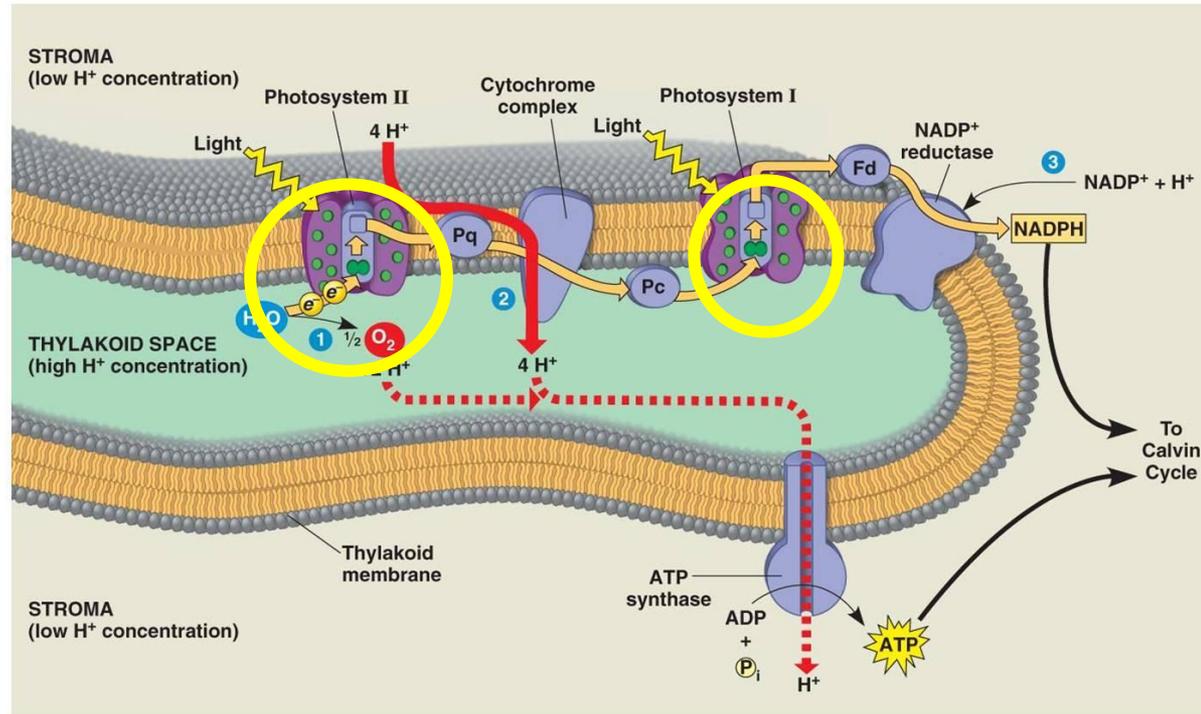
Данные экспериментов при насыщающей освещенности и обеспеченности биогенными элементами

Эффект температуры на фотосинтез водорослей

Скорость фотохимических реакций от температуры **НЕ** зависит



Улавливание фотонов, передача энергии возбуждения на РЦ ФС1 и ФС2, переход Р680 и Р700 в возбужденное состояние, окисление воды - от температуры **НЕ** зависят



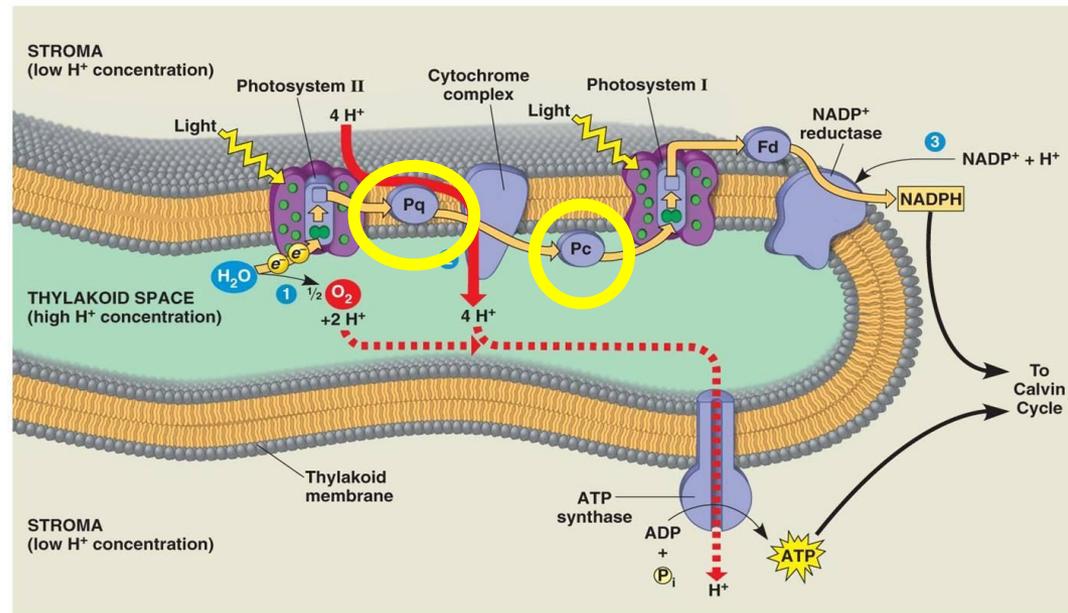
НО! Скорость **совокупности** световых реакций фотосинтеза (т.е. скорость световой фазы фотосинтеза в целом) от температуры (T°) **ЗАВИСИТ**, т.к. от T° зависит скорость **фотосинтетического транспорта электронов**

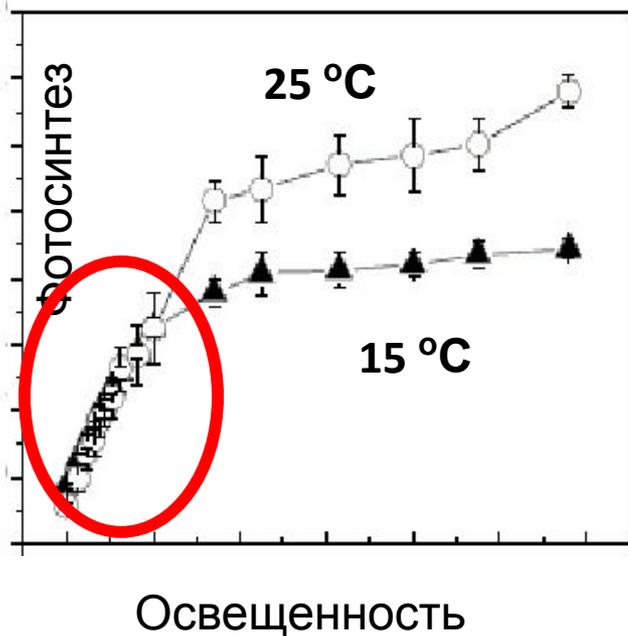
Белковые комплексы, осуществляющие транспорт электронов, встроены в тилакоидные мембраны - скорость реакций в них зависит от «вязкости» мембран. Биологические мембраны ведут себя как жидкие кристаллы, при определенной критической T° они «замерзают» - вязкость мембран достигает такого уровня, что препятствует свободному движению компонентов, связанных с мембранами.

Каких компонентов?

Диффузия пластохинона и пластоцианина при снижении T° замедляется, и скорость оборота этих компонентов, а соответственно и фотосинтетических единиц в целом, **снижается**

Как правило, критической является T° , примерно на 10° ниже, чем T° , оптимальная для роста.





Кратковременное изменение T° незначительно влияет на наклон светозависимой кривой фотосинтеза (α).

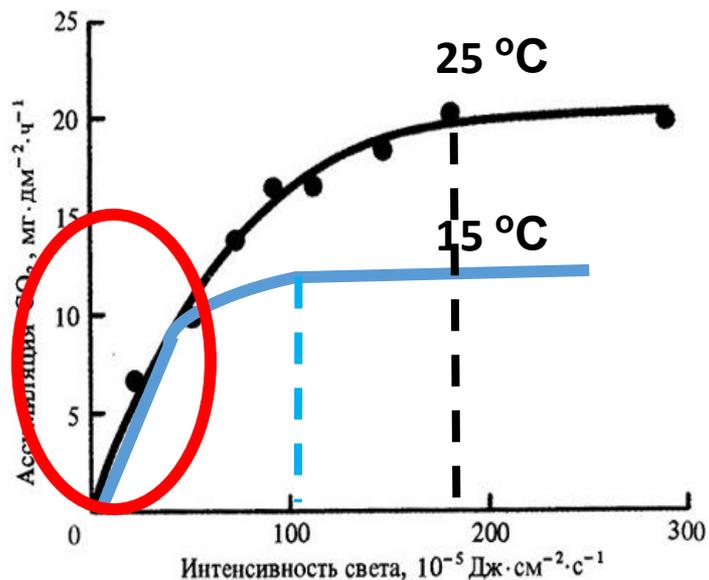


На светолимитированном участке фотосинтез определяет улавливание световой энергии и первичное разделение зарядов.

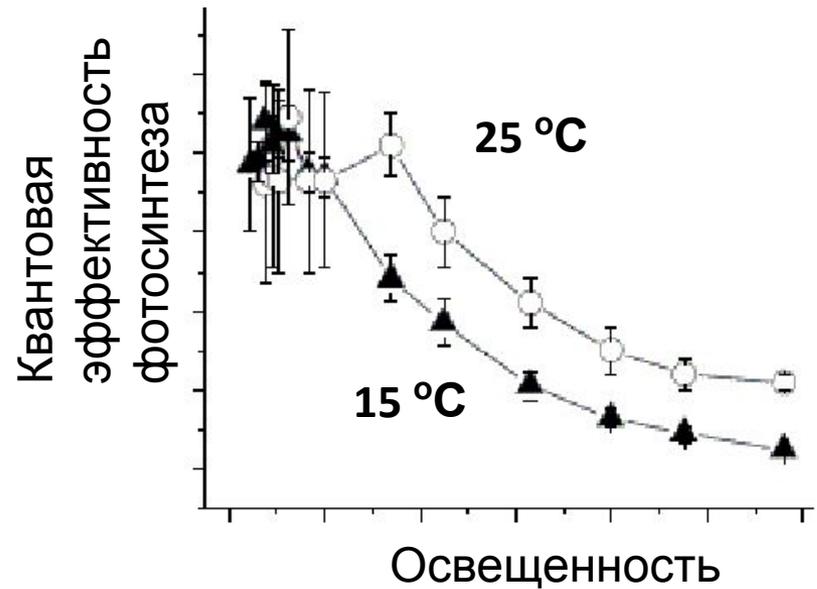
На светонасыщающем участке T° существенно влияет на скорость фотосинтеза. При снижении T° уменьшаются E_n и P_{max} .

Из-за чего?

Из-за снижения скорости оборота фотосинтетических единиц (накопление пула восстановленных пластохинонов)



На светонасыщающем участке с уменьшением температуры снижается квантовый выход фотосинтеза

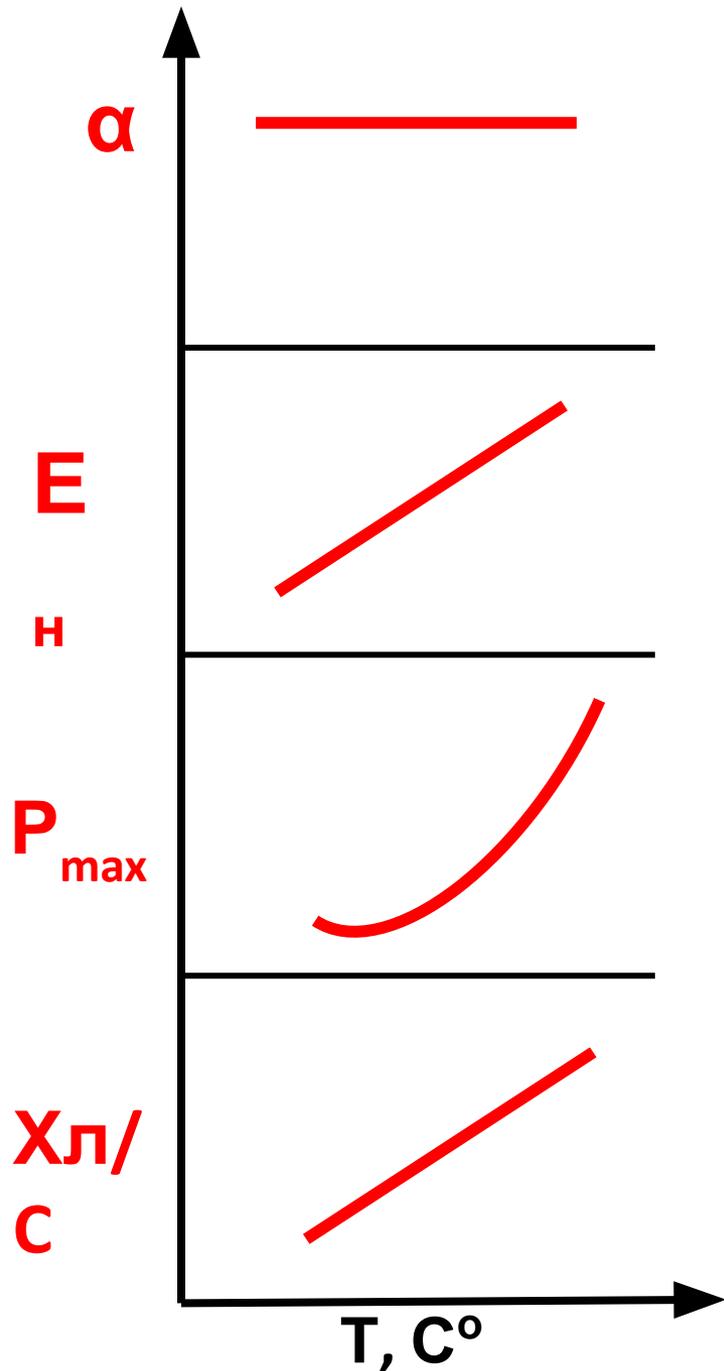


Акклимация к снижению температуры:

Уменьшение клеточного содержания хлорофилла из-за снижения E_n , (аналогично тому эффекту, что наблюдается при **увеличение** освещенности).

Способность к фотоакклимации к высокой интенсивности света **снижается!**

Предположительно, сигналом экспрессии/репрессии фотосинтетических генов при термоакклимации также выступает окислительно-восстановительный статус **пластохинонов**.



Зависимость скорости темновых реакций от температуры

??

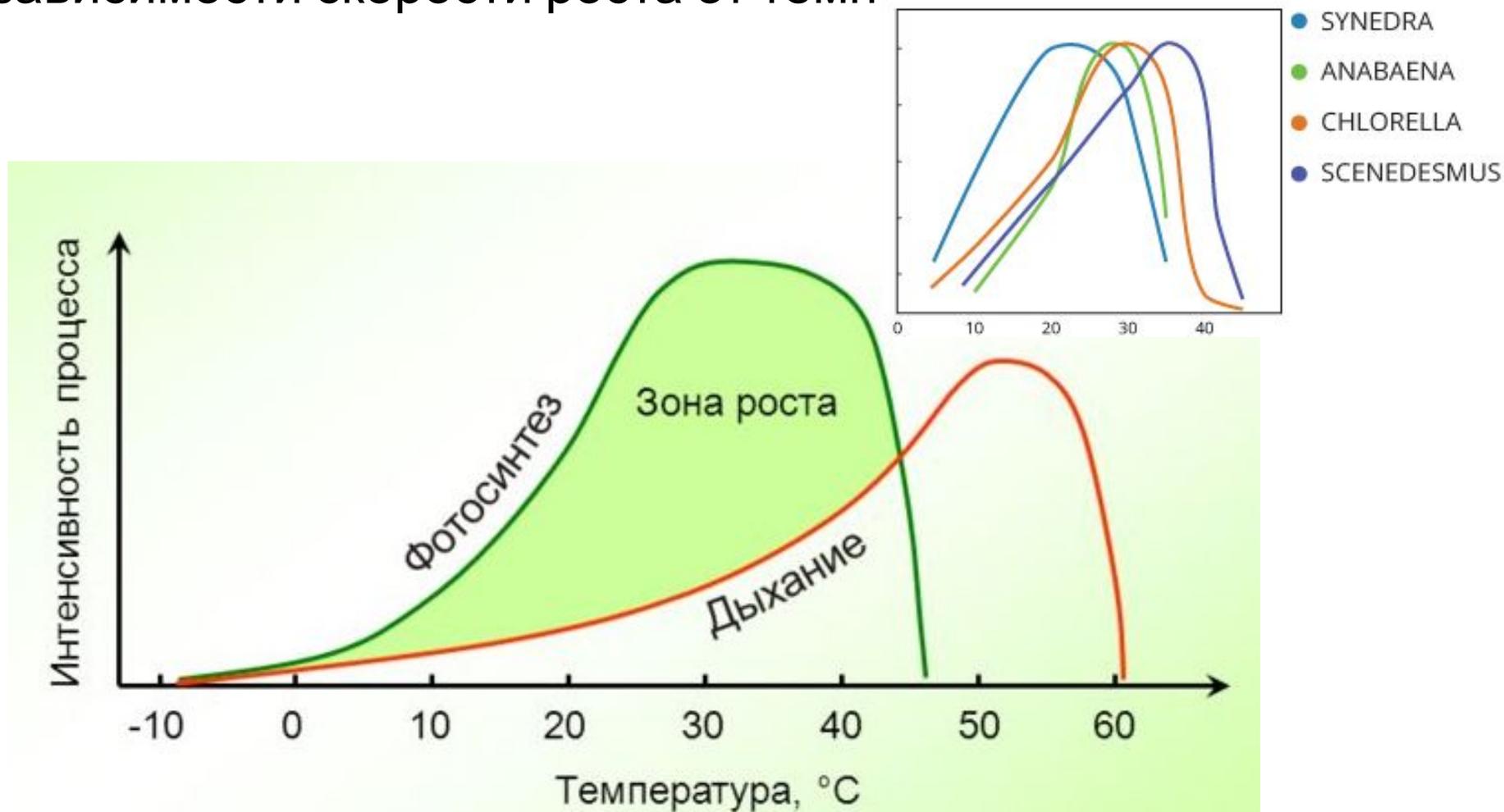
Скорость фотосинтетической фиксации углерода (как скорость любых ферментативных реакций) подчиняется уравнению Аррениуса.

Скорость темновых реакций фотосинтеза возрастает примерно в два раза при увеличении температуры на 10°C (в диапазоне до $30 - 35^\circ\text{C}$)

Подведем итог:

Изменения параметров фотосинтеза при изменении температуры

Следует отметить, что возрастание интенсивности дыхания идет медленнее, фотосинтеза – важно для оценки чистой первичной продукции, и понимания закономерностей зависимости скорости роста от темп



Другие аспекты изменение метаболизма

Скорость синтеза белков возрастает при повышении температуры

НО! При этом снижается число рибосом и транспортных РНК
снижается



При более высокой температуре клеткам фитопланктона требуется меньшее число рибосом для достижения необходимого уровня синтезируемых белков

Рибосомы – клеточные структуры, богатые фосфором

Снижение числа богатых фосфором рибосом приведет к увеличению клеточного соотношения азот/фосфор



Увеличение клеточных потребностей в азоте, и если его **НЕ** хватает – усилению азотного лимитирования

ЗАВИСИМОСТЬ ФОТОСИНТЕЗА ОТ ОБЕСПЕЧЕННОСТИ БИОГЕННЫМИ ЭЛЕМЕНТАМИ

Элементный состав взвешенного органического вещества в океане в среднем соответствует соотношению **106C : 16N : 1P** (атомарное соотношение) - соотношение Редфилда.

У многих водорослей при обеспеченном биогенными элементами росте элементный состав биомассы в среднем соответствует соотношению Редфилда.

	C:N	
макрофиты	14	значительная доля полисахаридов, формирующих клеточные стенки
динофлагелляты	8	целлюлозные клеточные стенки
цианобактерии	5-6 (4)	большая доля белков
фитопланктон	4-40	
фитопланктон	6,6	(в среднем по Мировому океану)

По сравнению с макрофитами и высшими растениями водоросли:

1. содержат большую долю белков (30 – 50% от сырой массы клетки);

Соответственно углеводы и жиры - 50 – 70% от сырой массы клетки.

2. обладают гораздо меньшей способностью внутриклеточно “откладывать” углерод. Если в клетке “переизбыток” углерода – идет выделение внеклеточных метаболитов.

Исходя из соотношения Редфилда:

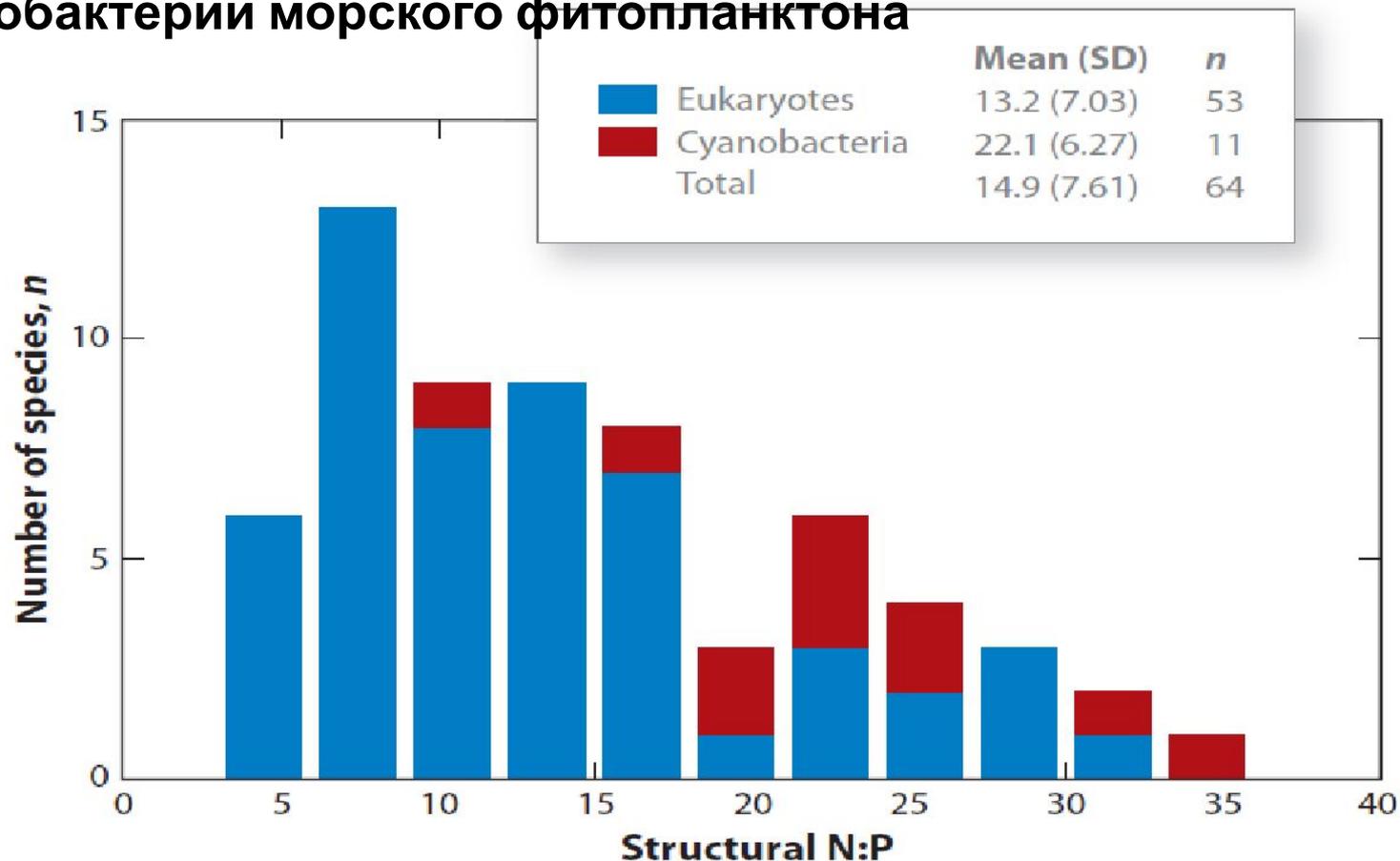
$N:P < 16$	$N:P > 16$
рост фитопланктона лимитирован недостатком азота	рост фитопланктона лимитирован недостатком фосфора

Значения $N:P$, близкие к соотношению Редфилда, свидетельствуют об оптимальных условиях обеспеченности фитопланктона биогенными элементами

Лимитирование??

Суждение о лимитировании фитопланктона азотом или фосфором по соотношению этих элементов в среде «работает» не всегда – из-за видоспецифичности соотношения

Соотношение N:P в биомассе у 64 видов водорослей и цианобактерий морского фитопланктона



Культуры выращивали в хемостате при оптимальных условиях роста.

Соответственно, соотношение N:P отражает соотношение структурных компонентов клеток у разных видов

АЗОТ

Формы азота в водных экосистемах: молекулярный азот (наибольшее количество), нитраты, нитриты, аммоний и органический азот.

Ассимиляция нитратов, нитритов и аммония

Нитраты, нитриты и аммоний – формы неорганического (минерального) азота, потребляемые цианобактериями и эукариотическими водорослями.

Нитраты - наиболее окисленная форма, в окисляющей водной среде термодинамически наиболее стабильна, соответственно, преобладающая (из минеральных) в водных экосистемах

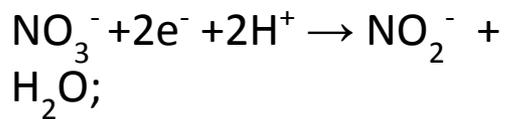
При внутриклеточной ассимиляции нитраты восстанавливаются до нитритов, а затем до аммония, который и присоединяется к углеродным скелетам (амминирование)

Соответственно, ассимиляция нитритов и аммония – «укороченные» метаболитные пути.

Ассимиляция нитратов

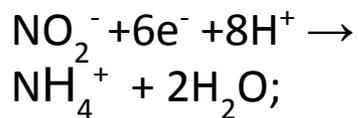
I. Активный транспорт нитратов в клетку (процесс с использованием энергии).

II. Восстановление нитратов до нитритов:
НАДФ·Н

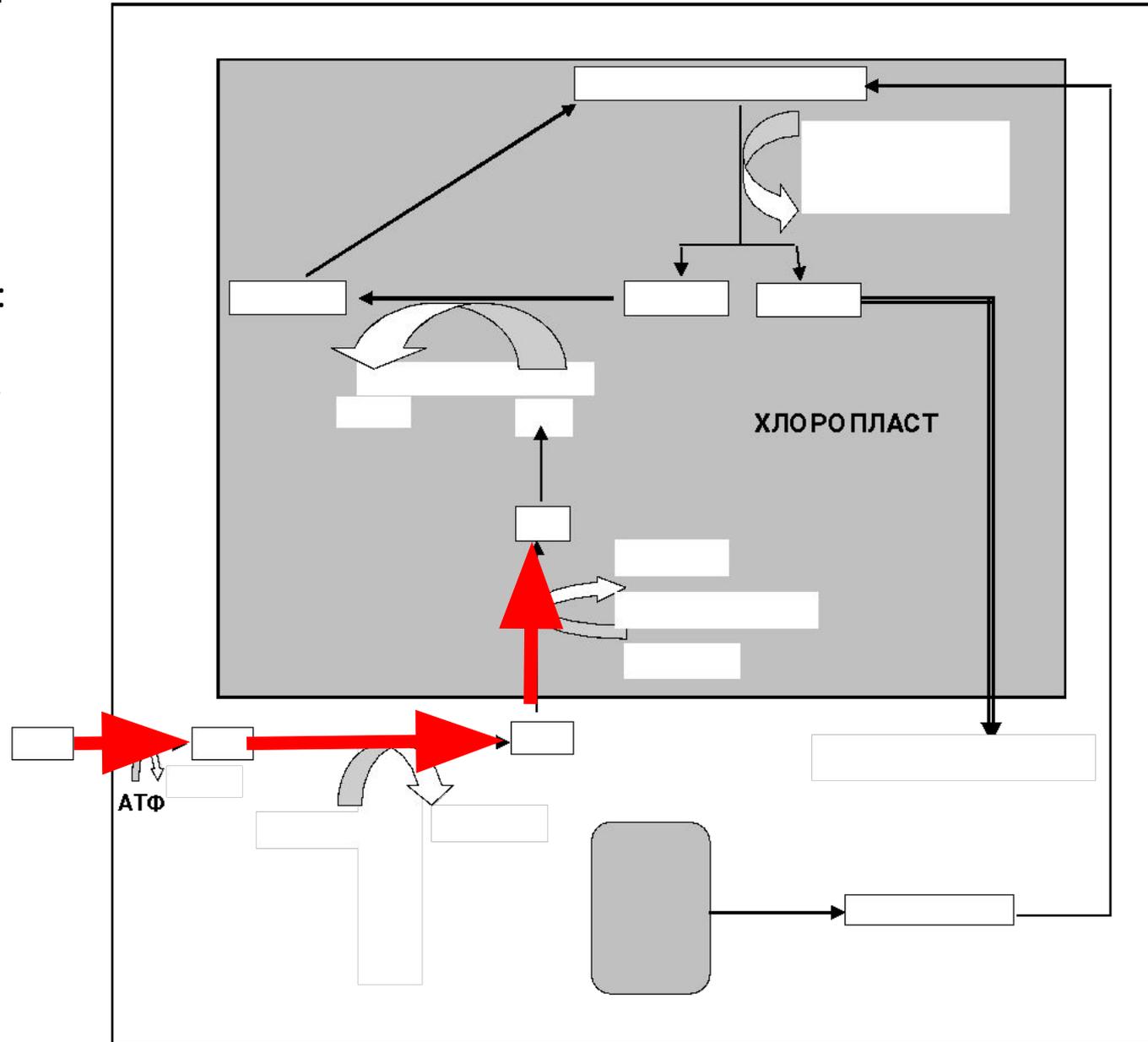


Фермент нитратредуктаза (в цитоплазме)

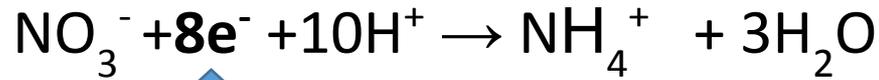
III. Восстановление нитритов до аммония (в хлоропластах):



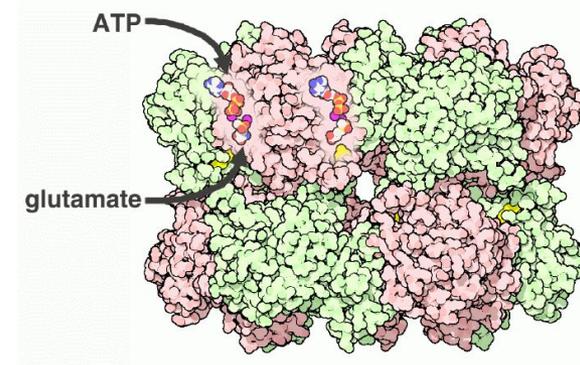
Фермент нитритредуктаза, восстановитель - ферредоксин.



Суммарное уравнение восстановления азота нитратов



фотосинтетически генерированные



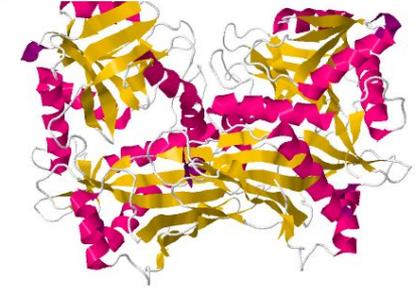
IV. Включение аммония в аминокислоты (в хлоропластах):



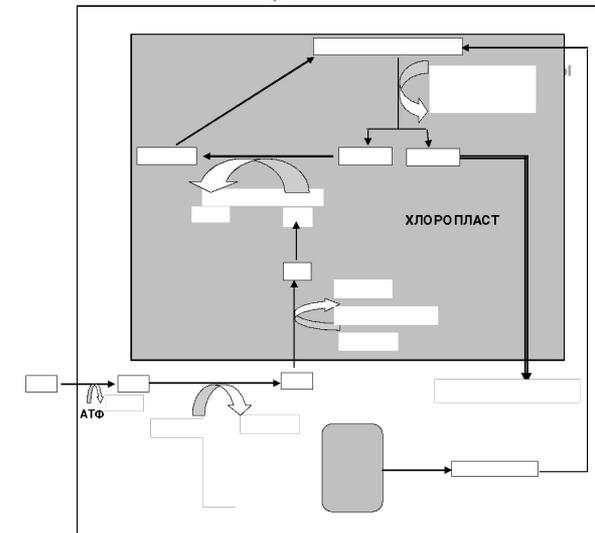
Фермент: **глутамин 2-оксоглутарат аминотрансфераза** (ГОГАТ).

Одна молекула глутамата снова возвращается в цикл ГС-ГОГАТ

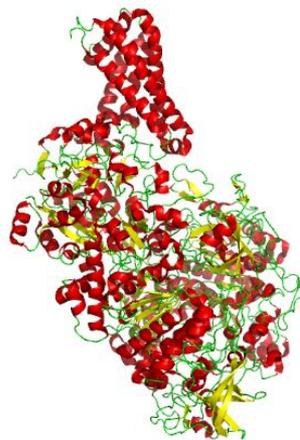
Другая молекула глутамата транспортируется в цитоплазму, где в результате трансаминирования идет синтез всех аминокислот



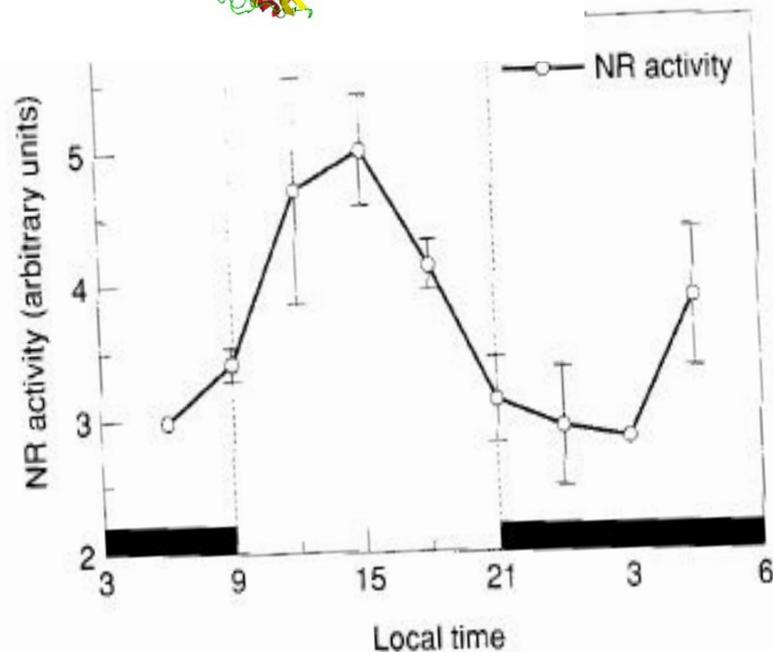
V. Синтез белков.



Нитратредуктаза – фермент, кодируемый ядерным геномом. Регуляция экспрессии на уровне **транскрипции**. Предположительно, сигнал экспрессии – восстановительно-окислительный статус компонентов электрон транс



При цикле свет-темнота максимум активности - в середине фотофазы, минимум - в темновой период.



Перестройка фотосинтетического аппарата в зависимости от источника азота

При освещенности ниже насыщающей (светолимитированный участок Р-Е кривой) в зависимости от того, нитраты или аммоний используются в качестве источника азота, у водорослей меняется улавливающая способность антенн ФС2 и ФС1 (переходные состояния). Поскольку:

При восстановлении нитратов до аммония, необходим **восстановитель** (но не АТФ).

При включении аммония в аминокислоты необходима **АТФ**.

При использовании **нитратов** в качестве источника азота:
увеличение улавливающей способности антенны ФС2 → увеличение линейного транспорта электронов → увеличение количества восстановителя, необходимого для восстановления нитратов.

При использовании **аммония** в качестве источника азота:
увеличение улавливающей способности антенны ФС1 → увеличение циклического транспорта электронов → увеличение количества АТФ, необходимой для включения аммония в аминокислоты.

Скорость ассимиляции минерального азота зависит от количества углеродных скелетов, восстановителя и АТФ, которые поставляются как фотосинтетическим метаболизмом, так и через дыхание. В свою очередь фотосинтез зависит от обеспеченности клеток азотом.

Зависимость фотосинтеза от обеспеченности клеток азотом

Азотное лимитирование. Когда количество минерального азота ниже, чем требуется для максимальной биосинтетической активности клеток, азот становится лимитирующим элементом.

На молекулярном уровне азотное лимитирование – контроль экспрессии фотосинтетических генов на уровне трансляции.

Нехватка азота для синтеза аминокислот → снижение концентрации аминокислот → снижение трансляции иРНК → уменьшение синтеза белков ФА и др. клеточных белков → повышение содержания углеводов и (или) липидов.

ПРОЯВЛЕНИЕ АЗОТНОГО

ЛИМИТИРОВАНИЯ:

(а) снижение эффективности использования уловленной световой энергии в фотохимических реакциях в ФС2 при увеличении теплового рассеивания энергии возбуждения в антенне.

Количество белков РЦ ФС2 **D1, CP43, CP47** (хлоропласт кодированных) снижается быстрее, чем количество хл-белков ССК (ядерно кодируемых) → уменьшение числа **активных РЦ** по отношению к размеру антенны → функциональный размер антенны увеличивается, но (!) вероятность передачи энергии возбуждения на РЦ ФС2 снижается – антенна разобщена с РЦ → эффективность работы ФС2 снижается.

(б) снижение скорости прохождения электронов от воды до CO_2 , увеличение количества квантов, необходимое для выделения одной молекулы кислорода - снижение квантового выхода фотосинтеза.

(в) уменьшение насыщающей интенсивности света E_n – фотоингибирование при более низкой освещенности.

Клеточный уровень: (а) увеличение клеточного соотношения $C_{орг} : N_{орг}$.

(б) снижение клеточного содержания фотосинтетических пигментов.

(в) снижение Р/В-коэффициента, ассимиляционного числа

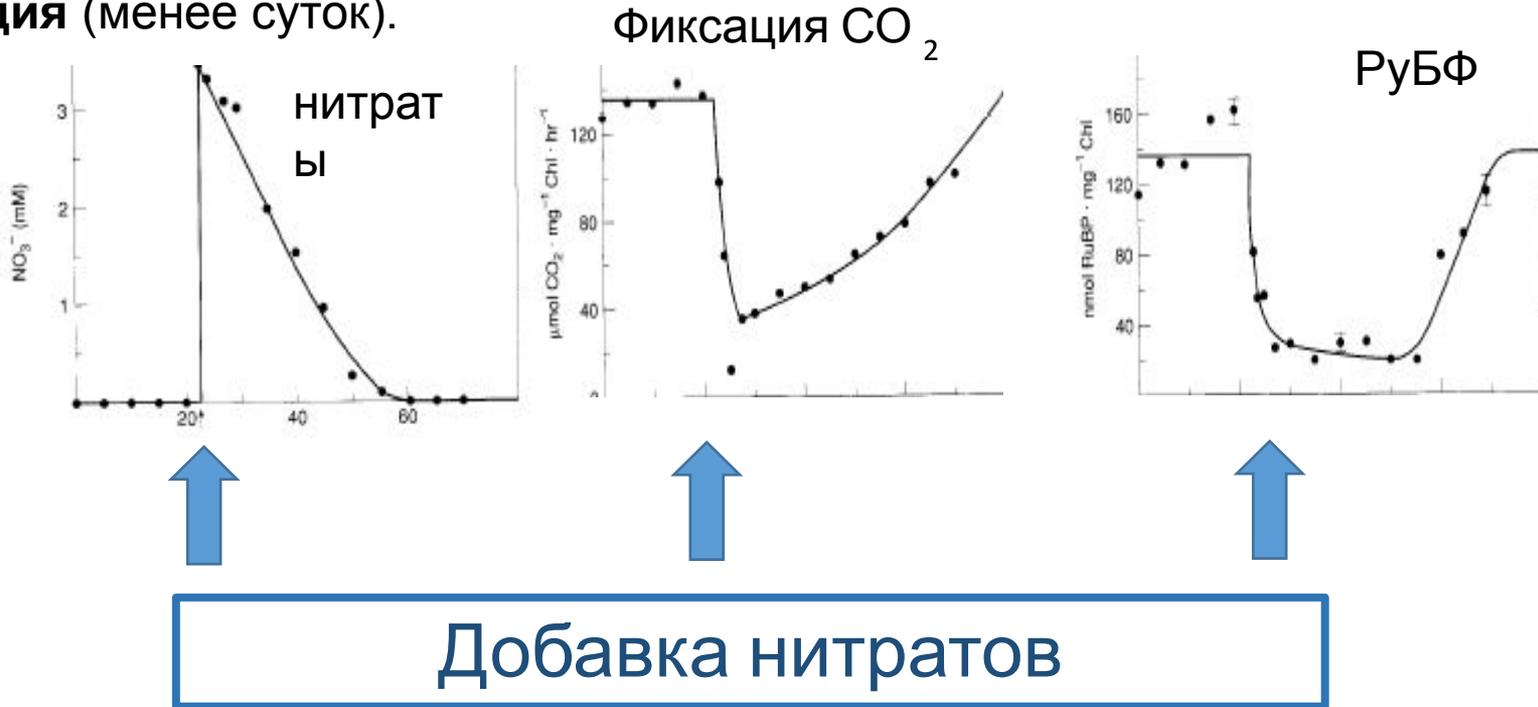
Популяционный уровень: снижение скорости роста, при увеличении степени клеточного дефицита азота смертность превышает скорость роста – снижение численности популяции.

ВЫХОД ИЗ СОСТОЯНИЯ АЗОТНОГО

ЛИМИТИРОВАНИЯ.

Изменение фотосинтеза водорослей, испытывавших дефицит азота, при поступлении в среду минерального азота (пульс азота):

I стадия (менее суток).



Эффективность и интенсивность **световых** реакций не изменяется, а **скорость фотосинтетической фиксации углерода снижается.**

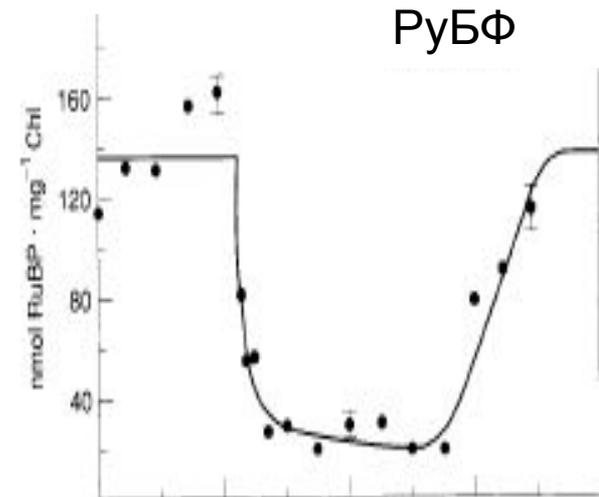
Депрессия темновых реакций продолжается до тех пор, пока большая часть азота не употребится из среды.

Причины:

1. **Конкуренция** между процессами ассимиляции нитратов (нитритов и аммония) и цикла Кальвина за восстановитель и АТФ, образованные в световых реакциях фотосинтеза. При поступлении нитратов большая часть фотосинтетически образованных АТФ и восстановителя направляются на ассимиляцию азота.

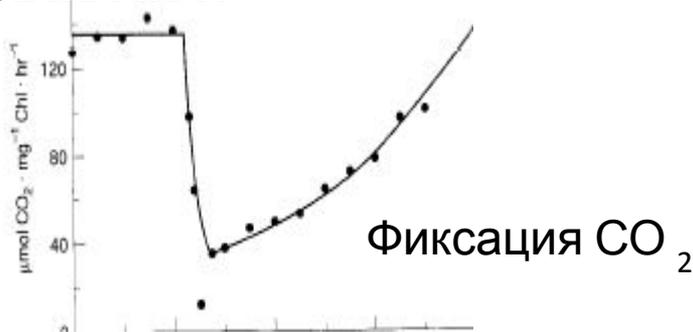
2. Снижение концентрации РубФ (также до тех пор, пока не потребится большая часть азота из среды).

Для покрытия возросших потребностей в предшественниках для аминокислот (углеродных скелетах) из цикла Кальвина изымается больше, чем 1/6 фосфотриоз – регенерация меньшего количества РубФ.



Дыхание **возрастает**, поскольку возрастает потребность в субстратах для аминирования.

II стадия (более суток). Скорость фотосинтетической фиксации углерода **возрастает**:



Темновые реакции:
(а) Увеличение пула РубФ.
(б) Увеличение скорости фиксации CO₂.

Световые реакции:

(а) возрастание синтеза белков РЦ ФС2 (снятие эффекта разобщения антенны с РЦ) → синтез белков СУК → синтез компонентов электронтранспортной цепи → увеличение скорости прохождения электронов от воды до CO₂, снижение количества квантов, необходимое для выделения одной молекулы кислорода - увеличение квантового выхода фотосинтеза;

б) увеличение насыщающей интенсивности света E_n – фотоингибирование при более высокой освещенности.

Клеточный уровень: (а) снижение клеточного соотношения C_{орг} : N_{орг};

(б) увеличение клеточного содержания фотосинтетических пигментов;

(в) увеличение Р/В-коэффициента, ассимиляционного числа.

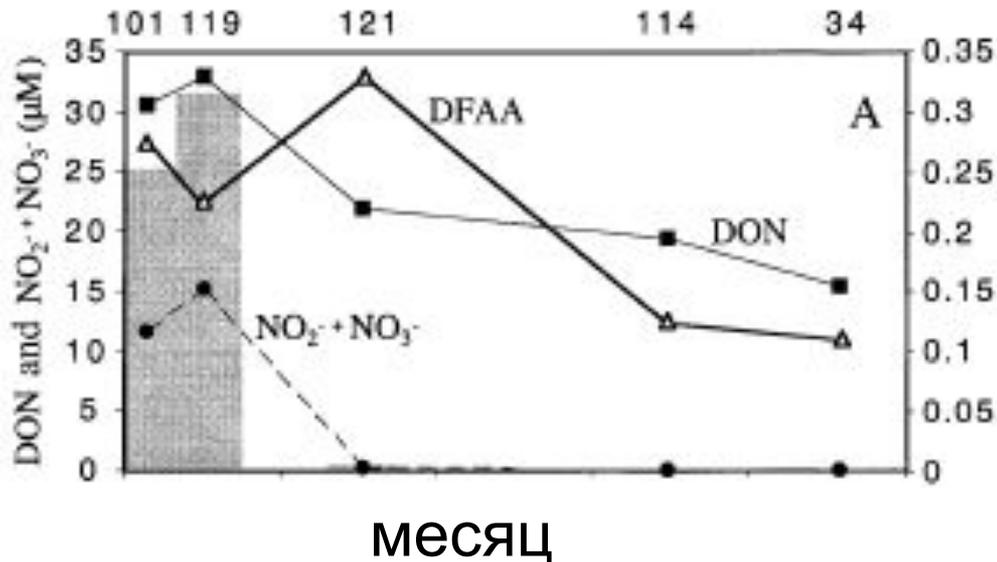
Популяционный уровень: увеличение скорости роста.

Ассимиляция растворенного органического азота ($N_{\text{орг}}$)

Концентрация $N_{\text{орг}}$ в фотическом слое 8,6 – 31,4 мкмоль азота.

Лабильная фракция $N_{\text{орг}}$: мочевины и ее производные, разнообразные аминокислоты и аminosахара, пурины, пиримидины, ДНК, РНК, АТФ и др - продукты секреции или производными внеклеточных метаболитов водных организмов (исключение- нуклеиновые кислоты и АТФ).

В водах с выраженной сезонной динамикой (умеренные и высокие широты) весеннее развитие фитопланктона ведет к практически полному исчерпанию минерального азота в фотическом слое. Относительная доля минерального азота в суммарном содержании растворенного азота снижается, а доля $N_{\text{орг}}$ увеличивается.



Водоросли способны потреблять мочевины и ее производные, разнообразные аминокислоты, аminosахара, пурины, пиримидины, ДНК, РНК, АТФ и др.

ПОТРЕБЛЕНИЕ МОЧЕВИНЫ

Потребление **мочевины** идет за счет активного транспорта при использовании фотосинтетически генерированной АТФ (у некоторых видов возможно и использование митохондриальной АТФ), соответственно, скорость потребления мочевины зависит от уровня освещенности.

Ферменты внутриклеточной трансформации мочевины: **уреаза** (диатомовые, золотистые, цианобактерии, криптофитовые), **мочевино-амидаза** (зеленые). Мочевина разлагается на **аммоний** и бикарбонат. Аммоний далее усваивается в глутамин-глутамат синтетазном метаболическом пути, а бикарбонат – в цикле Кальвина-Бенсона.

Потребление мочевины зависит от вида водорослей и обеспеченности минеральным азотом ($N_{\text{мин}}$):

Дефицит $N_{\text{мин}}$

- Многие водоросли способны расти на мочеvine в качестве единственного источника азота
- Рост ряда видов не меняется в зависимости от того, что используется в качестве источника азота – мочеvine, нитраты или аммоний
- Скорость потребления мочевины возрастает на порядок у азот- дефицитных клеток

Обеспеченность $N_{\text{мин}}$

Видоспецифичная взаимосвязь:

- Наличие в среде $N_{\text{мин}}$ ингибирует потребление мочевины
- Одновременное потребление $N_{\text{мин}}$ и $N_{\text{орг}}$, снижения скорости потребления мочевины не происходит
- Потребление $N_{\text{мин}}$ в присутствии мочевины подавлено.

ПОТРЕБЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ

Потребление **аминокислот** - активный транспорт.

Предположительно: наличие трех транспортных систем – для кислых, нейтральных и основных аминокислот.

Отсутствие переносчиков определенного класса аминокислот - видоспецифичность водорослей в потреблении аминокислот. Например, прازیнофитовые **не способны** потреблять гистидин и лизин, тогда как некоторые зеленые водоросли растут с использованием лизина в качестве единственного источника азота.

(Альтернативная точка зрения – единая транспортная система для всех

Потребляемые аминокислоты:

- включение в клеточные белки без предшествующей трансформации (аргинин)
- внутриклеточная трансформация аминокислот с образованием аммония и углеродных скелетов. Аммоний далее усваивается в глутамин-глутамат синтетазном метаболическом пути, а углеродные скелеты идут на биосинтез или на дыхание.

У некоторых примнезиофитовых и динофитовых водорослей выявлено **внеклеточное** деаминирование аминокислот. Ферменты: **деаминазы**, встроенные в клеточную мембрану с внешней стороны. Разлагают L-аминокислоты (аланин, глутамат, лизин) с образованием перекиси водорода + кетокислоты + аммоний.

Аммоний далее транспортируется в клетку

Потребление аминокислот зависит от вида водорослей и обеспеченности $N_{\text{мин}}$:

Дефицит $N_{\text{мин}}$

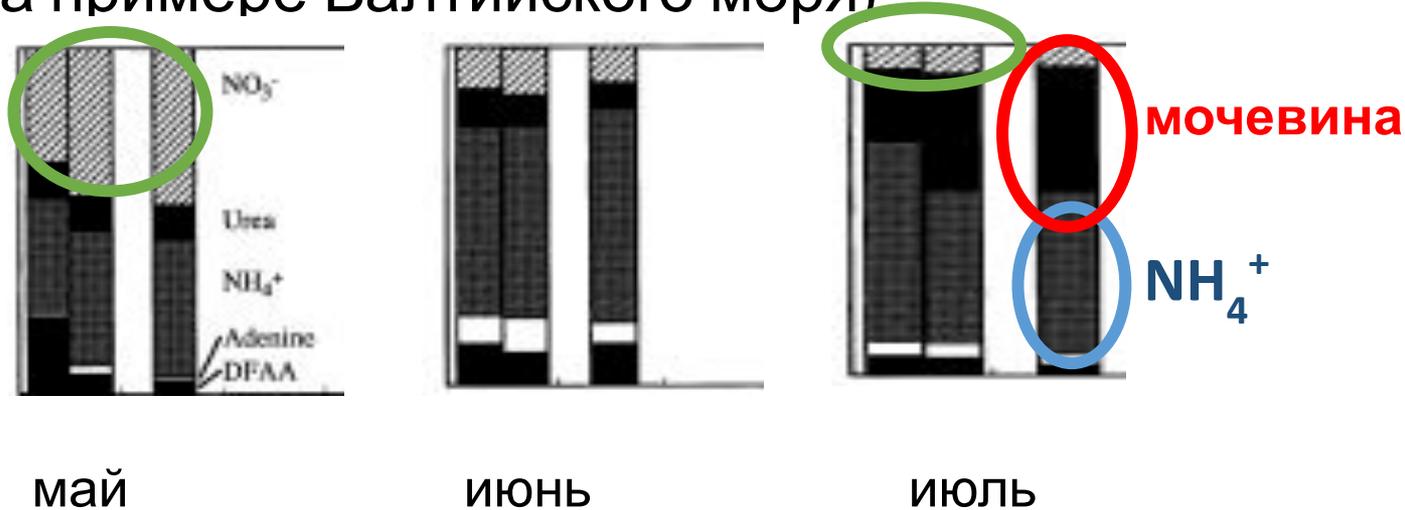
- Многие водоросли способны расти на аминокислотах в качестве единственного источника азота
- Рост ряда видов не меняется в зависимости от того, что используется в качестве источника азота – аминокислоты или $N_{\text{мин}}$
- Скорость потребления аминокислот возрастает у клеток, испытывающих дефицит азота
- Одни виды способны ассимилировать аминокислоты только при достаточно высокой освещенности, тогда как у других скорость потребления аминокислот возрастает при снижении освещенности

Обеспеченность $N_{\text{мин}}$

Видоспецифичная взаимосвязь:

- Наличие в среде $N_{\text{мин}}$ ингибирует потребление аминокислот
- Одновременное потребление $N_{\text{мин}}$ и $N_{\text{орг}}$, снижения скорости потребления аминокислот не происходит
- Потребление $N_{\text{мин}}$ в присутствии аминокислот подавлено.

Относительный вклад разных субстратов (%) в суммарное количество потребляемых азот содержащих субстратов (на примере Балтийского моря)



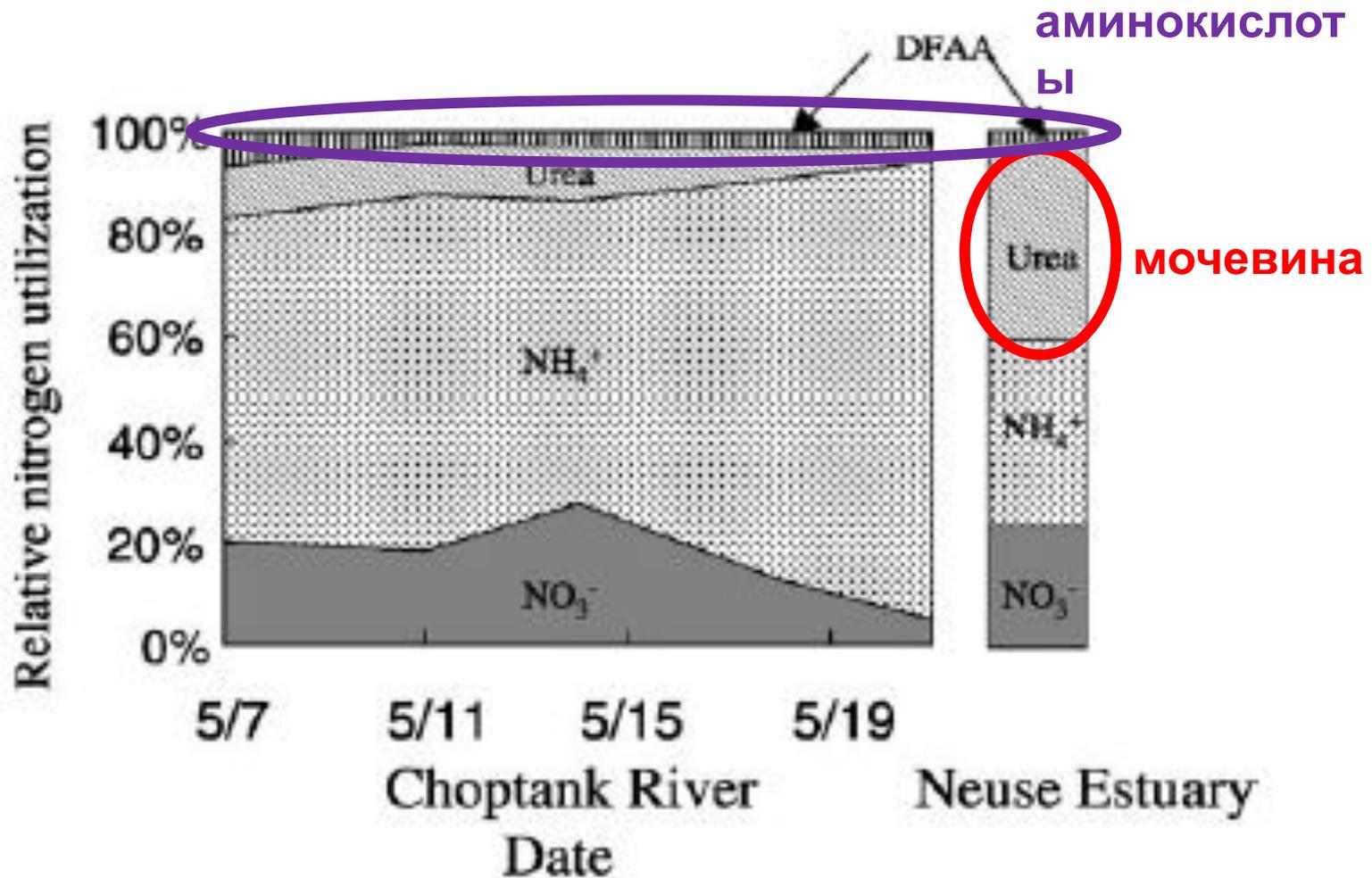
Разные группы водорослей дают разный вклад в суммарное потребление отдельных субстратов

Например, цианобактерии и прازیнофитовые «предпочитают» аммоний, и дают основной вклад в суммарное потребление фитопланктоном этой формы азота

Диатомовые «предпочитают» нитраты, криптофитовые - мочевины

Относительный вклад разных субстратов (%) в суммарное количество потребляемых азот

содержащих субстратов



АССИМИЛЯЦИЯ

ФОСФОРА

В водной среде минеральный фосфор представлен преимущественно в виде ионов ортофосфата. В морских водах преобладает HPO_4^{-2} при незначительном количестве PO_4^{-3} .

Благодаря тому, что уровень восстановленности фосфора в фосфатах и органических молекулах одинаков, фосфаты могут быть напрямую включены в предшественники нуклеиновых кислот, углеводы и углеродные скелеты без передачи электронов, т.е. в результате **гидролитических**, а не окислительно-восстановительных реакций.

Лимитирование фотосинтеза недостатком фосфора:

1. Ограничение синтеза нуклеиновых кислот.

Проявляется на уровне репликации генома или на уровне синтеза иРНК - контроль экспрессии на уровне транскрипции. Ведет к уменьшению эффективности улавливания и использования световой энергии из-за снижения скорости синтеза белков фотосинтетического аппарата.

2. Более быстрый отклик водорослей на фосфорное лимитирование проявляется в снижении скорости синтеза и регенерации субстратов в цикле Кальвина. Скорость утилизации световой энергии в процессах фиксации углерода существенно снижается.

Ассимиляция растворенного органического фосфора

(Концентрация $P_{\text{орг}}$ в поверхностных морских водах может достигать 1 мкмоль и в отдельные периоды вегетационного сезона существенно превышать содержание фосфатов.

Лабильная фракция $P_{\text{орг}}$: фосфосахара, фосфоспирты, нуклеотиды, нуклеиновые кислоты, фосфолипиды и др.

Поступление $P_{\text{орг}}$: с материковым стоком, в результате процессов регенерации, а также из биологических источников – лизис клеток водорослей, прижизненные метаболиты бактерий, водорослей и зоопланктона.

Ассимиляция $P_{\text{орг}}$ - **внеклеточное** отщепления фосфатной группы от органических молекул с последующим потреблением фосфатов.

Ферменты - фосфатазы, встроенные в мембрану или выделяемые во внешнюю среду.

По оптимальному для активности ферментов значению pH - **щелочные и кислые**.

Низкая специфичность по отношению к углеродному скелету молекулы, дефосфорилируют разнообразные эфиры фосфорной кислоты: фосфосахара, нуклеозидмонофосфаты, фенилфосфат, нитрофенилфосфат, фосфоенолпируват, фосфосерин, АДФ, АТФ, фосфоангидриды и др.

Два типа фосфатаз: (1) **конститутивные** фосфатазы, активность которых не зависит от наличия и количества $P_{\text{мин}}$ во внешней среде; (2) фосфатазы, индуцируемые фосфорными эфирами. Активность подавляется присутствием $P_{\text{мин}}$ в среде.

У многих видов водоросле - оба типа фосфатаз.

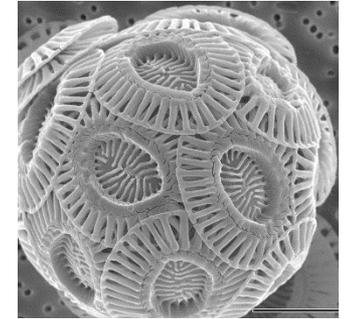
Синтез индуцибельных фосфатаз начинается в условиях фосфорного лимитирования. Величины концентрации $P_{\text{мин}}$ во внешней среде, при которой начинается экспрессия фосфатаз – видоспецифичны.

В ряде случаев при исчерпании $P_{\text{мин}}$ в среде клетки сначала используют внутриклеточные запасы фосфора, и лишь затем начинается синтез внеклеточных фосфатаз.

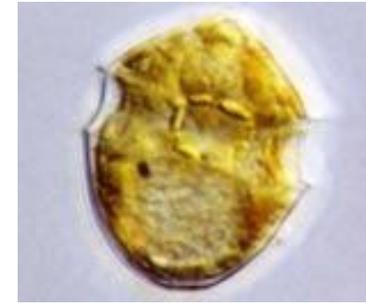
У других водорослей синтез внеклеточных фосфатаз начинается даже при значительном размере внутриклеточного пула фосфора.

Примеры экологической значимости потребления

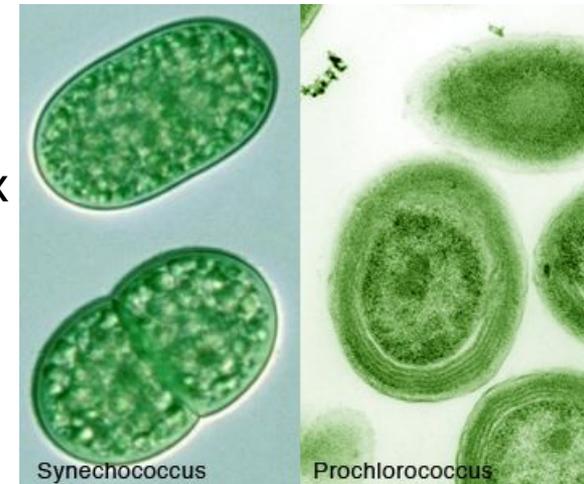
Р **ор** Цветение кокколитофориды *Emiliana huxleyi* наблюдается в олиготрофных водах Северной Атлантики, в которых развитие водорослей лимитировано недостатком фосфора. В таких условиях у *Emiliana* начинается экспрессия трех фосфатаз, встроенных в клеточную стенку, и одной фосфатазы в цитоплазме.



- Способность к экспрессии щелочных фосфатаз выявлена у динофлагеллят *Prorocentrum minimum* и *Heterocapsa triquetra*, вызывающих мощные цветения во многих прибрежных районах.



- Способность к экспрессии щелочных фосфатаз выявлена у пикопланктонных цианобактерий *Prochlorococcus* и *Synechococcus*. Эти водоросли преобладают в планктоне (дают основной вклад в суммарную биомассу фитопланктона) в олиготрофных водах Центральной Пацифики и Северной Атлантики.



Интересно, что разные клоны *Prochlorococcus* и *Synechococcus* значительно различаются по способности к экспрессии щелочных фосфатаз (у одних клонов - высокая, у других - очень низкая).

АССИМИЛЯЦИЯ

СУЛЬФАТОВ

Сера необходима для синтеза двух аминокислот – цистеина и метионина, а также для синтеза ряда серосодержащих жиров, которые составляют около 10% жиров тилакоидных мембран.

Потребление сульфатов – АТФ-зависимый процесс. Для включения серы в углеродные скелеты, сульфаты восстанавливаются в реакциях с потреблением НАДФ·Н и НАД·Н, катализируемых группой ферментов.

Сульфатредукция потребляет около 1% фотосинтетически генерированного восстановителя.

Сульфат – второй после хлорида по обилию анион в морских водах и никогда не лимитирует развитие водорослей.

В пресных водах концентрация сульфатов \approx в 100 раз ниже. При этом анаэробное восстановление сульфатов в сульфиды может вести к выделению этого элемента в атмосферу. Соответственно, в ряде случаев, сульфаты могут лимитировать развитие пресноводного фитопланктона.

Лимитирование недостатком серы ведет к снижению скорости синтеза фотосинтетических пигментов и активности фотосинтетических ферментов и, соответственно, к снижению фотосинтеза. У цианобактерий начинается синтез альтернативных фикобилипротеинов, которые содержат меньше серы на молекулу пигмента.

АССИМИЛЯЦИЯ

ЖЕЛЕЗА

Концентрация растворенного Fe в открытых водах Мирового океана низка – ($<0,2-0,4$ μM) и может лимитировать фотосинтез.

Fe входит в состав многих белков и ферментов, участвующих как в фотосинтезе, так и в дыхании.

Механизмы потребления водорослями Fe (обеспечения потребностей в Fe):

активный транспорт растворенных форм (с высоким сродством к субстрату),

- синтез сидерофоров (веществ, выделяемых во внешнюю среду. Они переводят железо в растворимую форму и связывают его для дальнейшего переноса железа через мембрану внутрь клетки специальными переносчиками),
- внеклеточное хелатирование коллоидных соединений железа с последующим транспортом Fe в клетку,
- у миксотрофов также питание железосодержащими бактериями и фагоцитоз коллоидных частиц Fe.

Лимитирование недостатком железа:

- разобщение антенны ФС2 с РЦ ФС2: накопление неактивных РЦ ФС2 в результате снижения количества белков D_1 , CP43 и CP47 и увеличения пула неактивного (из-за потери гемного Fe) цитохрома b_{559} ;
- у цианобактерий в РЦ ФС1 – снижение содержания железо-серных комплексов вплоть до прекращения транспорта электронов (и прекращения роста)
- снижение концентрации хлорофилла (уменьшение размера антенны)
- снижение скорости популяционного роста

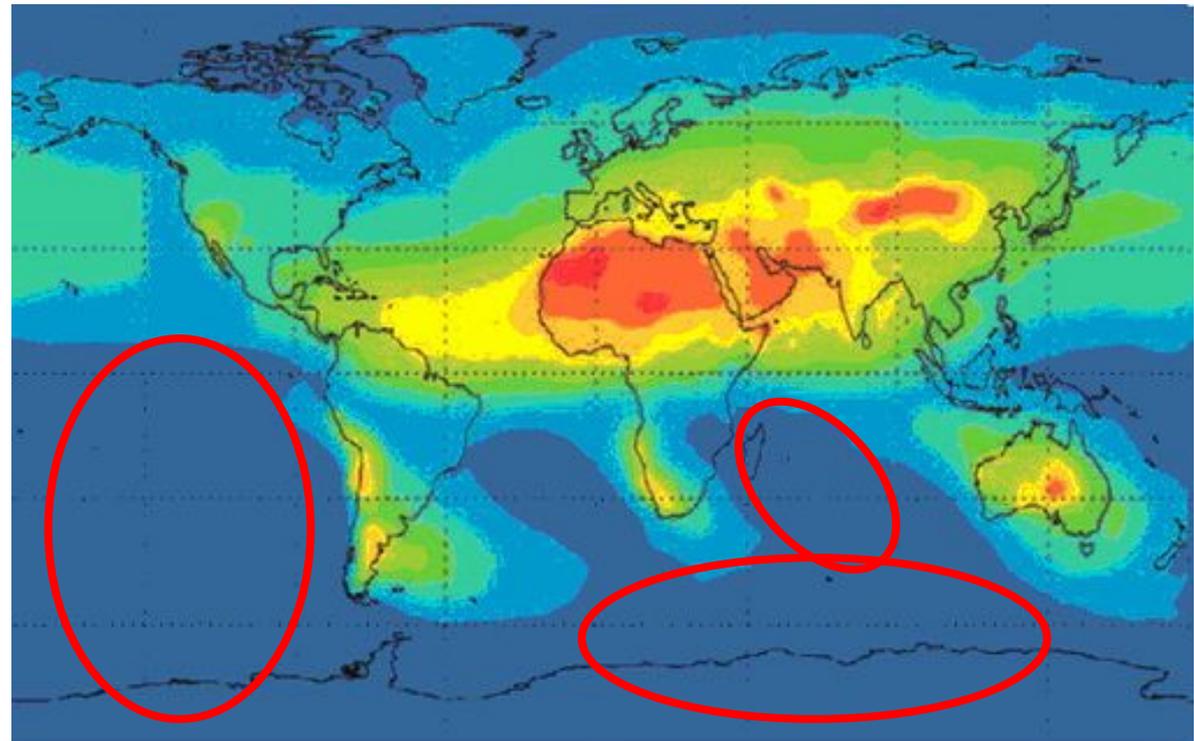
Лимитирование фитопланктона недостатком железа в районах «высокой концентрации биогенных элементов и низкой концентрацией биомассы фитопланктона»

При высокой концентрации азота и фосфора – низкая биомасса фитопланктона



Основной источник поступления железа в открытые океанические воды – эоловый перенос железа из Сахары, пустынь Аравийского полуострова и Центральной Азии

Распределение пыли (г/м^2 в год), приносимой ветрами из Сахары, пустынь Аравийского полуострова и Центральной Азии. С пылью поступает железо!



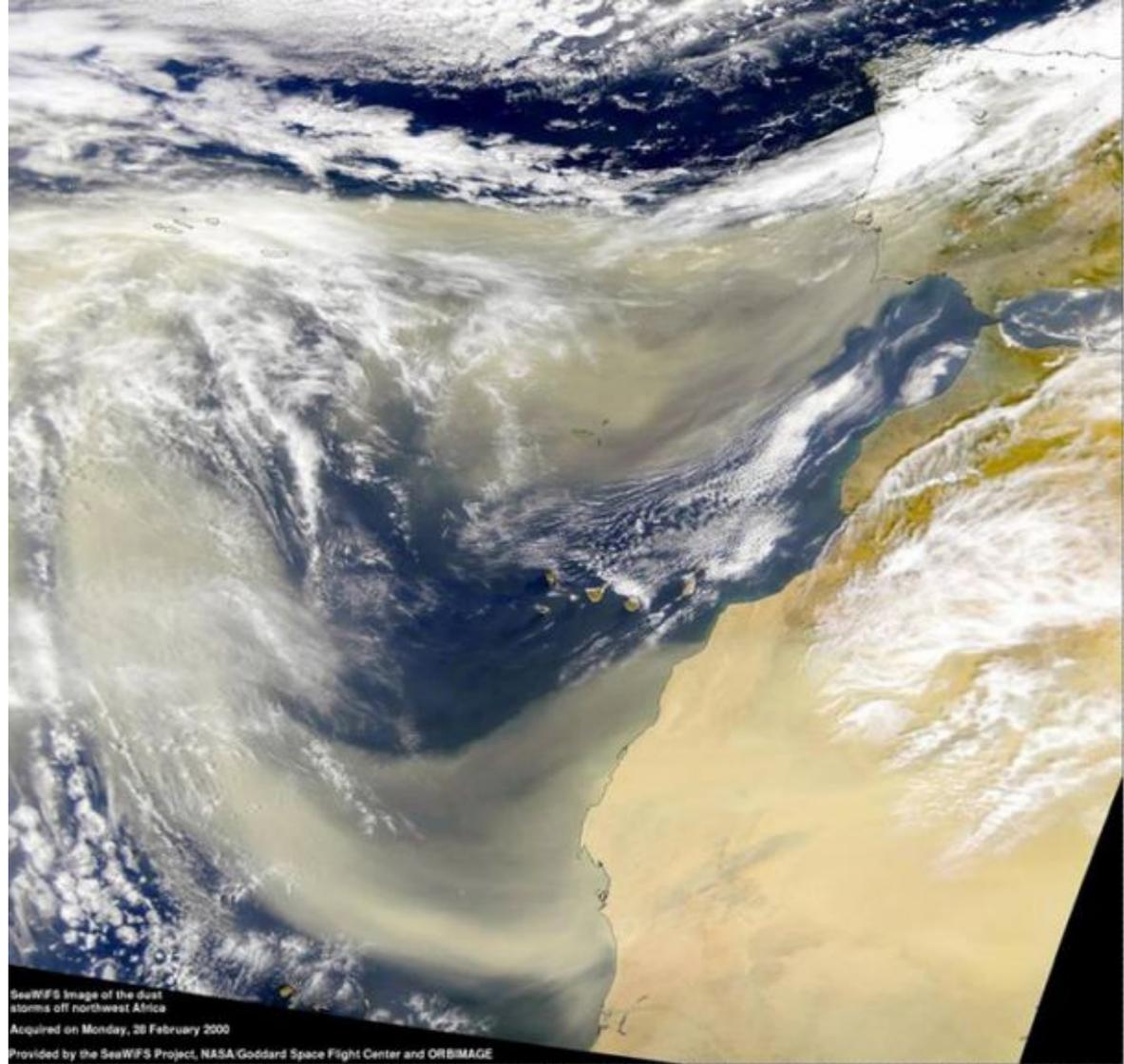
Районы лимитирования фотосинтеза недостатком железа



Буря в северо-западной Африке.

Облака пыли из района Сахары сносятся ветром на запад, в Атлантический океан.

Попадающая в центральные районы океана пыль – важнейший источник биогенных элементов, прежде всего фосфора и железа



Снимок со спутника 28 февраля 2000 г.

Фиксация молекулярного азота

Чтобы разорвать прочную тройную связь в молекуле N_2 , нужны либо высокие давление и температура, либо невероятно эффективный катализатор. По первому пути пошла химическая промышленность, производящая аммиак из азота воздуха при помощи чрезвычайно энергоемкого процесса Габера — Боша (при температуре 400— 500 °С и давлении 200—1000 атм).

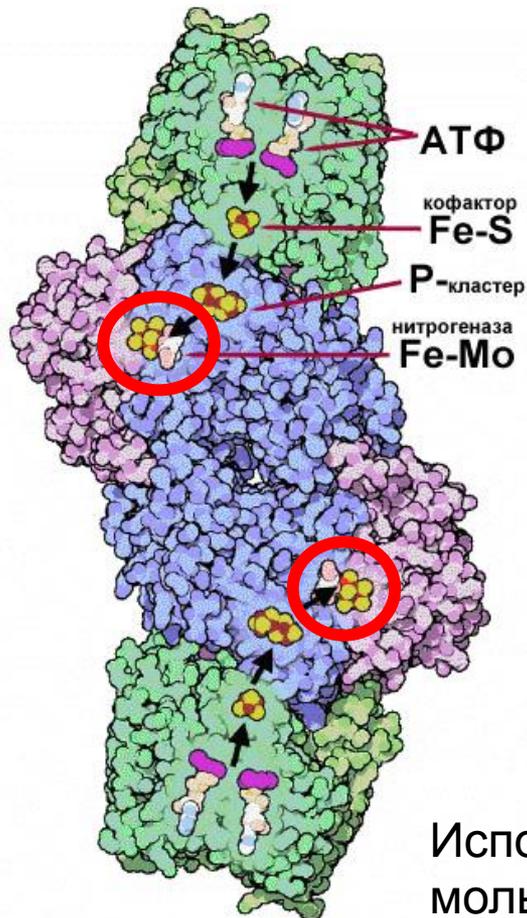


По имеющимся оценкам, сегодня около половины всего азота, входящего в состав человеческих тел, — это азот, зафиксированный при помощи процесса Габера (и попавший сначала в азотные удобрения, синтезируемые из аммиака, а затем в культурные растения).

Клетки прокариот проводят процесс азотфиксации в обычных условиях.

Фиксацию молекулярного азота осуществляют некоторые виды цианобактерий, способные синтезировать ферментный комплекс нитрогеназу (Nif гены)

Комплекс состоит из двух ферментов: собственно нитрогеназы (называемой также Mo-Fe-белком или динитрогеназой) и дегидрогеназы (ди)нитрогеназы (Fe-белок).



Железо-молибденовый кофактор (сокращенно FeMoco) — самый большой и сложный из известных на сегодняшний день биологических катализаторов на основе металлов.

Этот шедевр биологических нанотехнологий изготавливается специальными ферментами (Nif гены) и прикрепляется к белковой основе нитрогеназы.

Именно железо-молибденовый кофактор играет ключевую роль в процессе азотфиксации: к нему присоединяется молекула азота, и здесь же происходит ее расщепление

Используется энергия АТФ (12 – 15 молекул АТФ на моль фиксированного азота)

Нитрогеназа (по структуре – консервативный фермент) крайне чувствительна к молекулярному O_2 , и даже малые количества O_2 подавляют активность фермента.

Ранее считалось, что чувствительность нитрогеназного комплекса к кислороду обусловлена тем, что он возник до кислородного фотосинтеза

Новые данные (на основе молекулярно-генетических методов):

Процесс азотфиксации «стартовал» по крайней мере 3–3,5 млрд лет назад, но эффективная система, основанная на работе железо-молибденового каталитического комплекса, образовалась существенно позже — 1,5–2,2 млрд лет назад, то есть после оксигенизации планетарной среды.

Это событие изначально произошло в группе гидрогенотрофных метаногенов (архебактерий), обитавших в особых бескислородных нишах на большой глубине

У современных азотфиксирующих фотоавтотрофных цианобактерий кислородный (с выделением кислорода) фотосинтез и азотфиксация возможны только в случае **пространственного** и/или **временного разделения** этих двух процессов.

Пространственное разделение.

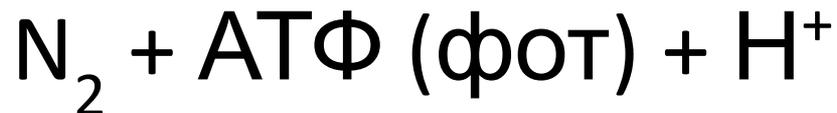
У большинства пресноводных цианобактерий, образующих гетероцисты.

В колонии гетероцисты располагаются между вегетативными клетками.

Гетероцисты – результат клеточной дифференциации.
Деактивация ФС2: хл-белковые комплексы и компоненты ФС2 разрушаются (активность ФС1 сохраняется);
экспрессия генов, кодирующих нитрогеназный комплекс;

Улавливание световой энергии ФС1 → циклический поток электронов вокруг ФС1 → образование АТФ → расходование АТФ на азотфиксацию.

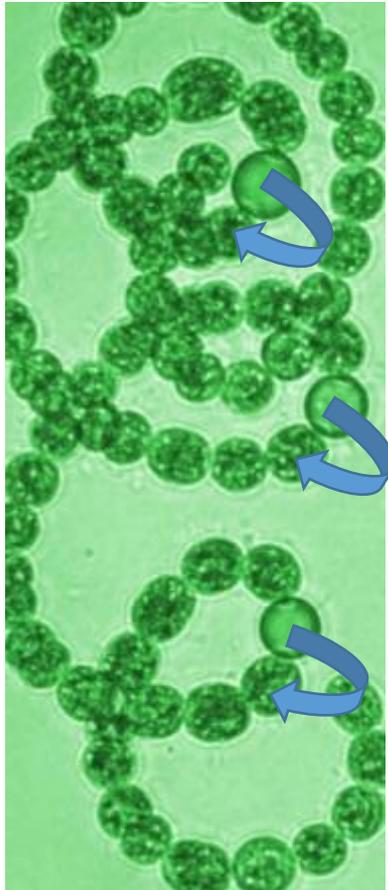
Нитрогеназа использует энергию **фотосинтетически генерированной АТФ**



(ферредоксин) + углеродный скелет

→ **глутамат**

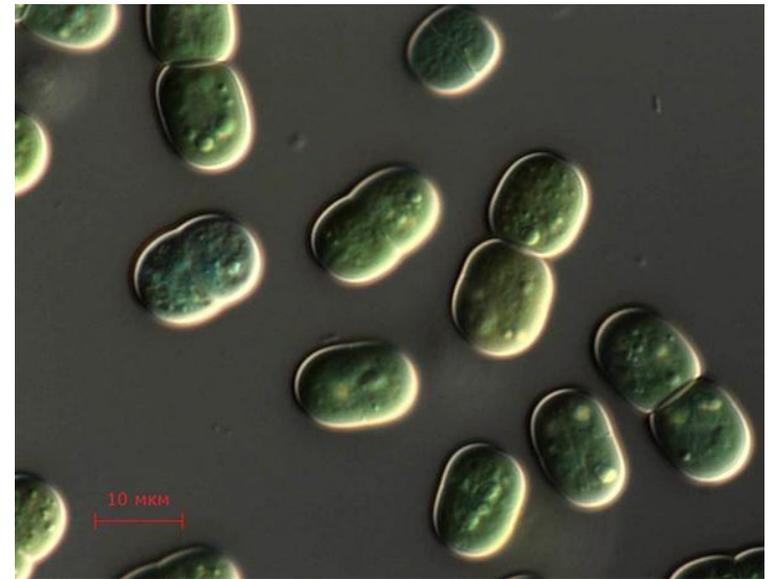
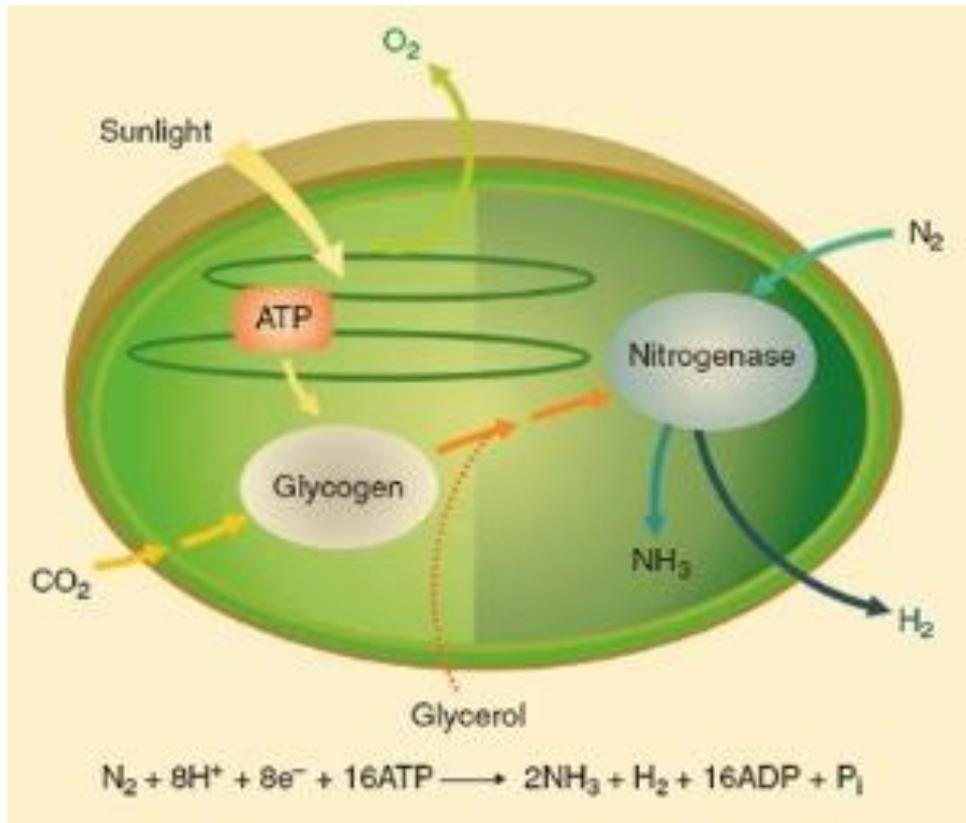
Глутамат поступает в соседние фотосинтетические клетки и используется для синтеза других аминокислот



Временное разделение. У ряда цианобактерий, не образующих гетероцисты, фотосинтез протекает в присутствии света (днем), азотфиксация – в отсутствие света (ночью).

Нитрогеназа работает за счет энергии АТФ, образованной в дыхательной элетронтранспортной цепи. Катаболизму подвергаются продукты фотосинтеза.

«Соблюдение режима дня»



Cyanoscydus 51142

«Знаменита» тем, что выделяет большое количество водорода

Crocosphaera watsonii

Фиксирует азот
НОЧЬЮ.

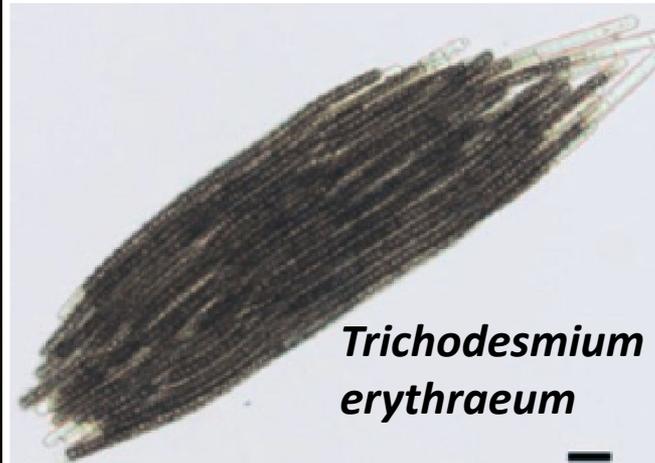
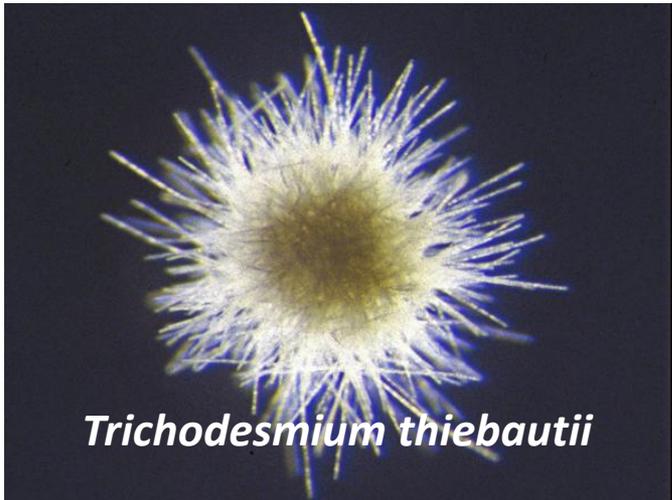
Диаметр клетки 2.5-6 мкм.
Вегетирует в теплых водах (> 24 °C). В олиготрофных водах тропической зоны Атлантического и Тихого океанов достигает численности порядка 1 млн кл/мл в фотической зоне.
Высокая скорость роста.



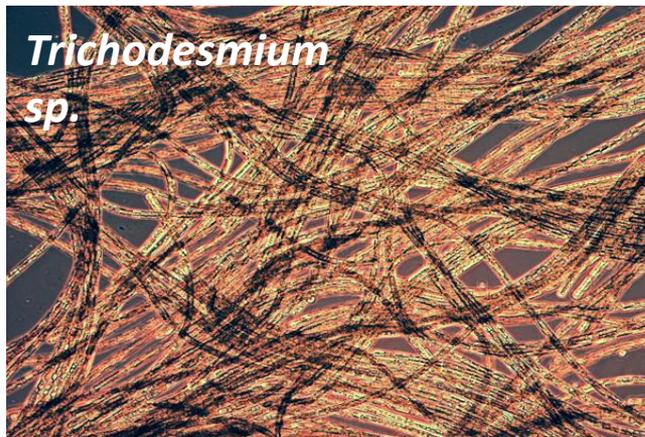
Crocosphaera дает значительный вклад в бюджет азота в тропических водах

Trichodesmium spp.

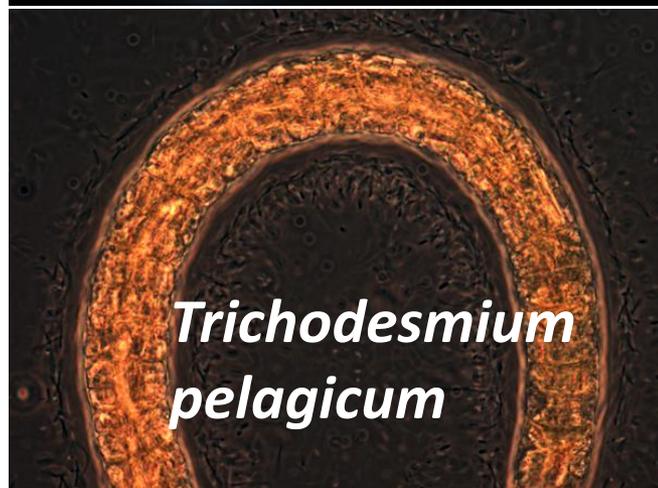
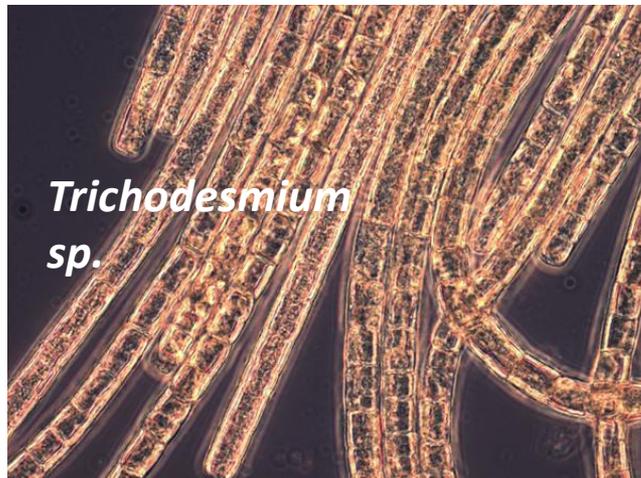
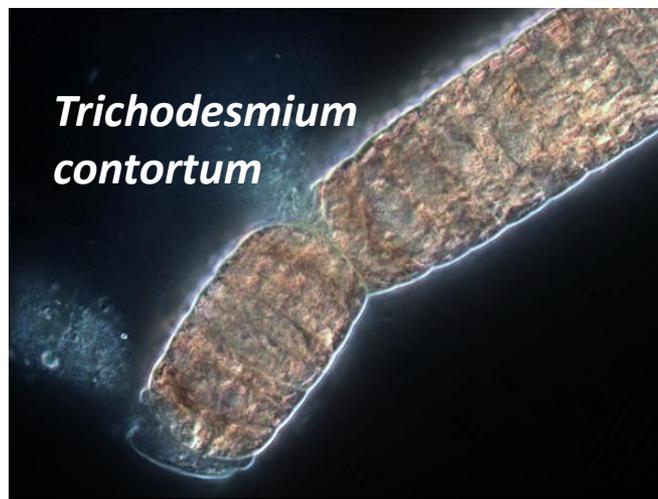
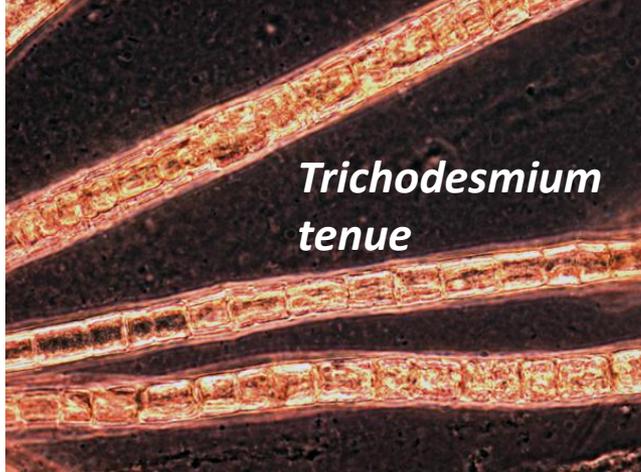
Цианобактерии *Trichodesmium* фиксируют азот **ТОЛЬКО** на свету и при этом у них **НЕТ** гетероцист



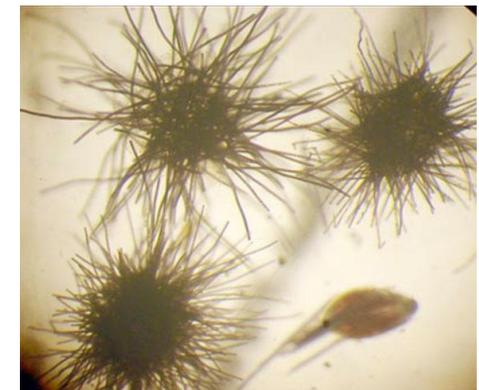
Trichodesmium – наиболее распространенная азотфиксирующая цианобактерия в морских экосистемах, часто формирует цветения



Колонии – сферические, «сноповидные», встречаются и одиночные трихомы. В колонии 200 и более трихомов.



До 80 % клеточного объема могут занимать газовые вакуоли.



Как экспрессия Nif генов, так и активность нитрогеназного комплекса у блокируются

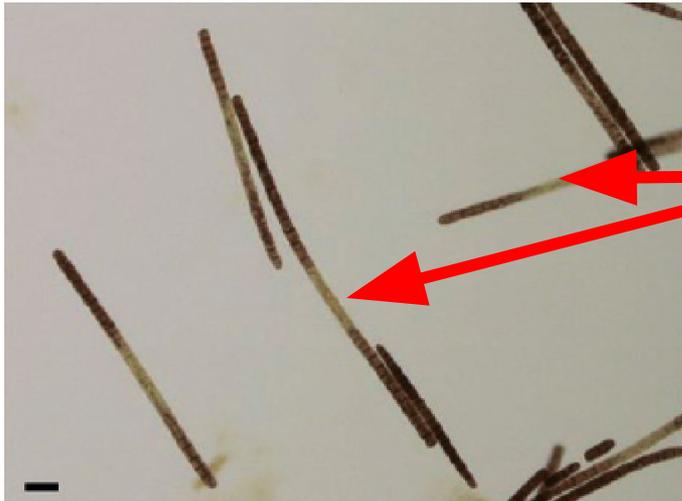
кислородом. Как же обустраивается защита нитрогеназ от фотосинтетически выделяемого кислорода у *Trichodesmium*?

??

По сути, у *Trichodesmium* есть и пространственное, и временное разделение процессов фиксации азота и фотосинтеза

в фотосинтеза «светлых» участков, состоящих из клеток (2 – 30 клеток), практически не содержащих гранул (более прозрачных – «светлых»).

На трихом – 1-4 «светлые» зоны. «Светлые» клетки названы **диазоцитами**



диазоциты

Низкое число и меньший размер клеточных структур, таких как цианофициевые гранулы, газовые вакуоли, полифосфатные гранулы (из-за этого и большая прозрачность диазоцита)

Трихомы, фиксированные р-ром Люголя

Разделение азотфиксации и фотосинтеза в пространстве у *Trichodesmium*

Фиксация азота идет
ТОЛЬКО в диазоцитах

Число диазоцитов отрицательно коррелирует с присутствием связанного азота (минерального и органического). В отсутствие связанного азота диазоциты формируются в течение 8 – 27 час.

Формирование диазоцитов начинается с трансформации клеточных структур, только потом происходит экспрессия нитрогеназного комплекса

Фиксированный азот быстро распространяется по «обычным» клеткам трихома (результаты экспериментов с меченым азотом).

Расчеты на модели предсказывают, что при пространственном разделении процессов фиксации азота и фотосинтеза продукция выше, чем при разделении во времени



Окраска специфическим красителем Nif белков

Разделение азотфиксации и фотосинтеза во времени у *Trichodesmium*

Суточный ритм регулирует транскрипцию *nif* генов, синтез *de novo* одних субъединиц нитрогеназного комплекса, пост-трансляционную модификацию других белков, а также фотосинтез для обеспечения энергией и восстановителем, необходимых для азотфиксации

Число диазоцитов мало на рассвете и увеличивается к полудню

Азотфиксация идет во время полуденной депрессии фотосинтеза, когда фотосинтетическое выделение кислорода крайне низкое (фотоингибирование) и возрастает интенсивность кислород потребляющих процессов – дыхания и реакции Мелера

Реакция Мелера - восстановленный ферредоксин может окисляться не НАДФ⁺, а кислородом. Такой нециклический транспорт электронов от молекулы воды на O₂ называют псевдоциклическим транспортом. Псевдоциклический транспорт электронов приводит к восстановлению кислорода (образованного при окислении воды) с образованием перекиси водорода H₂O₂. При этом идет образование АТФ

Также происходит изменение равновесного состояния – (псевдоциклическое фотофосфорилирование)
передача энергии возбуждения фикобилисомами на ФС1

За счет изменения равновесного состояния с типа 1 на тип 2 переключение с фотосинтетического статуса клеток на азотфиксирующий статус происходит очень быстро, что является преимуществом при жизни в водной среде (перемешивание, изменение светового режима)

Способность к фиксации CO_2 также снижается в диазоцитах *Trichodesmium* во время полуденной депрессии, при этом возрастает деградация клеточных запасов углеводов (гликогена)

В целом метаболизм диазоцитов переключается на катаболические реакции: повышается активность ферментов катаболизма, снижается активность ферментов синтеза углеводов, белков, жиров

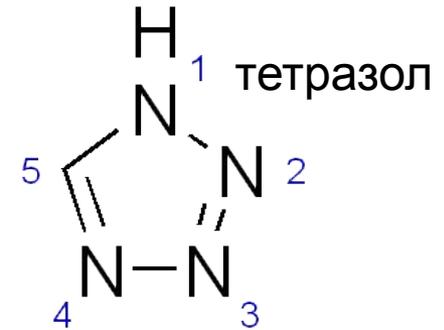
Повышается содержание ферментов, участвующих в образовании восстановителя в пентозофосфатном шунте

Все это ведет к снижению содержания кислорода, т.е. к «микро» кислородным условиям в диазоцитах во время полуденной депрессии

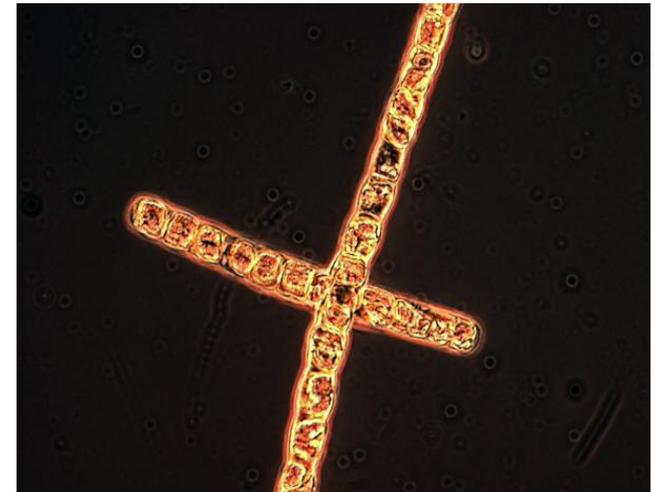
Клеточное деление и формирование диазоцитов приурочено к темновому периоду (ночь)

Механизмы предотвращения блокирования нитрогеназ фотосинтетически выделяемым кислородом, ПРЕДПОЛОЖИТЕЛЬНО, также включают:

Формирование в диазоцитах восстановленных зон за счет скопления солей тетразола



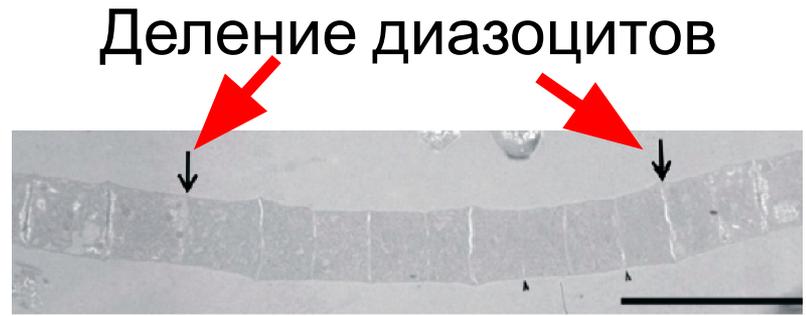
Наличие в диазоцитах особых каротиноидов, обладающих сильной антиокислительной способностью



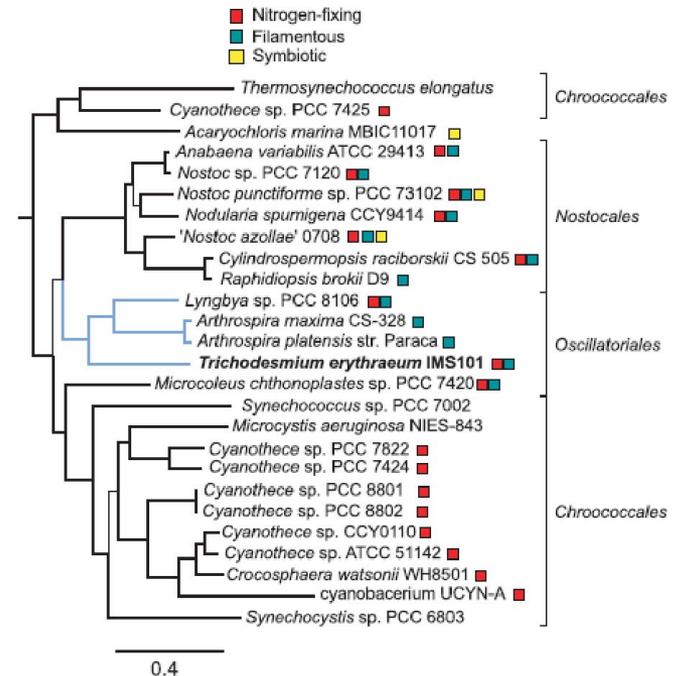
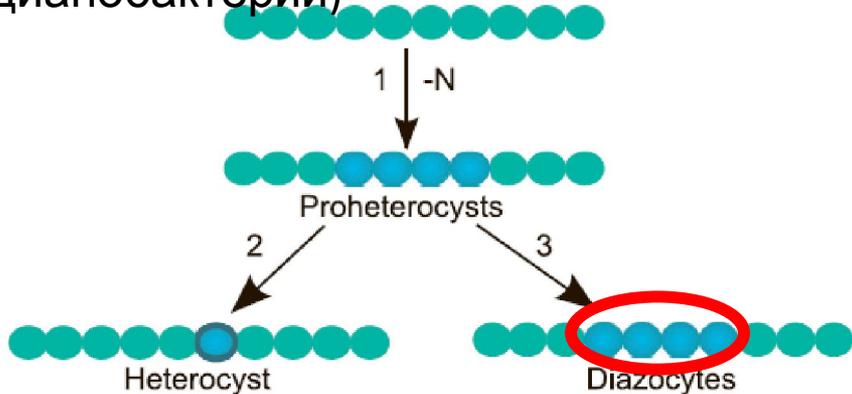
Диазоцит

Диазоциты НЕ являются полностью дифференцированными клетками (в отличие от гетероцист).

У них сохраняется способность к делению. Это также является преимуществом при жизни в водной среде (перемещение, изменение светового режима, содержание связанного азота в среде), поскольку дает возможность более быстро и «легко» приспосабливаться к изменениям условий среды.



Гипотетический сценарий эволюционного образования диазоцитов (предложен на основе результатов расшифровки геномов цианобактерий)



Дальнейшая ассимиляция глутамата, образованного при азотфиксации, происходит в глутаминсинтетазо - глутамин оксоглутарат аминотрансферазном (ГС-ГОГАТ) метаболитном цикле

Наличие внешних источников азота снижает экспрессию *nif* генов, синтез компонентов нитрогеназного комплекса, активность нитрогеназного комплекса и количество диазоцитов в трихомах

Trichodesmium

Но в отличие от многих азотфиксирующих цианобактерий, полного подавления активности нитрогеназного комплекса НЕ происходит.

Trichodesmium способен фиксировать молекулярный азот в присутствии низкой концентрации растворенного органического и неорганического азота.

Эта способность еще раз свидетельствует о высокой «гибкости» и приспособляемости метаболизма *Trichodesmium*

Основными биогенными элементами, ограничивающими рост и азотфиксацию у *Trichodesmium*, являются фосфор и железо

Для потребления фосфатов колонии *Trichodesmium* мигрируют – опускаются ниже пикноклина (зарегистрированы вертикальные миграции до глубины 100 – 200 м).

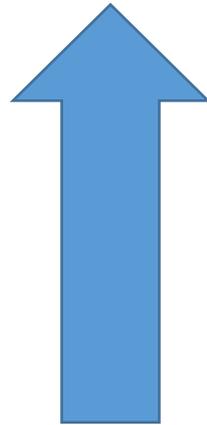


Поверхностный слой: азотфиксация и фотосинтез, запасание углеводов (гликоген) и азота (цианофициевые гранулы) → накопление «балласта»

При
фосфорном
лимитировани
и



Потребление фосфатов. Для жизнедеятельности - использование запасных веществ «балласта»



Когда весь «балласт» метаболизируется, легкие колонии поднимаются в верхние слои для фотосинтеза и азотфиксации

Цианофициевые??
гранулы

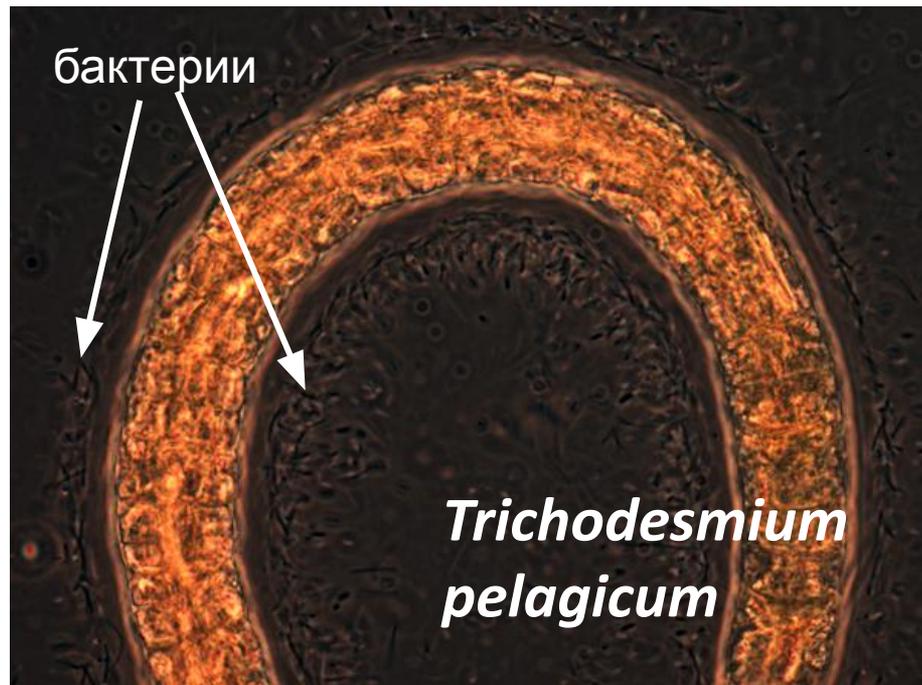
состоят из полипептида, содержащего аргинин и аспарагиновую кислоту в эквимольных количествах, служат резервом азота

Дополнительные механизмы покрытия потребностей в фосфоре при фосфорном лимитировании у *Trichodesmium*

Мембраны - замена фосфолипидов на мембранные белки, НЕ содержащие фосфор

Ассимиляция органического фосфора – за счет щелочных фосфатаз (у *Trichodesmium thiebautii* ген, кодирующий щелочную фосфатазу НЕ найден)

Выработка фосфатаз колонией *Trichodesmium* в целом может быть усилена сигналом (биологически активные вещества лактоны) «чувство кворума» (Quorum sensing), вырабатываемых ассоциированными с колониями микроорганизмами



Потребление фосфатов идет как во время фотосинтеза и азотфиксации, так и в их отсутствие (на глубине)

Потребленный фосфор может запасаться в виде полифосфатных гранул

Обеспечение потребностей в железе у *Trichodesmium*

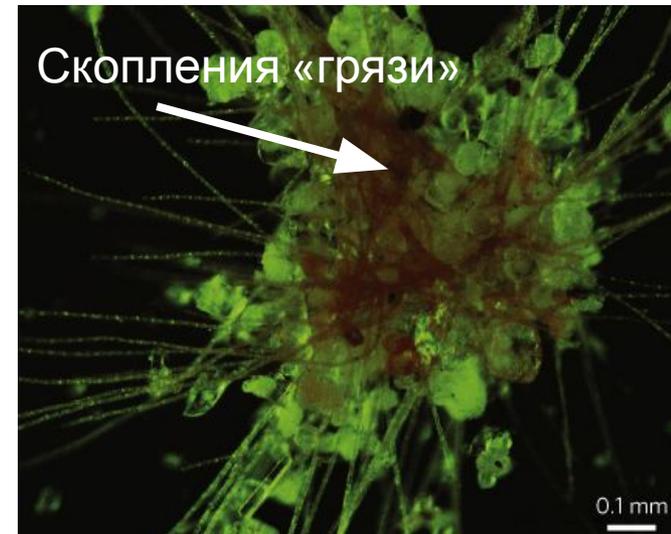
В клетках *Trichodesmium* высокое содержание Fe. Учитывая, что массовое развитие наблюдается в олиготрофных водах с низкой концентрацией железа, предполагают высокую способность *Trichodesmium* к потреблению и клеточному «удержанию» этого биогенного элемента

Но! В настоящее время гены, кодирующие сидерофоры, у *Trichodesmium* НЕ обнаружены. Однако выявлены гены, кодирующие транспортные белки, вводящие в клетку связанное сидерофорами железо, а также ферменты, участвующие в процессах запасания железа в клетках

Полагают, что сидерофоры синтезируются ассоциированными бактериями, что способствует потреблению железа *Trichodesmium*. С другой стороны показано, что железо, связанное сидерофорами бактерий, самими же бактериями и утилизируется

Возможно, сам колониальный образ жизни *Trichodesmium* способствует его обеспечению железом. В скоплении трихомов задерживается и накапливается «грязь» (dust), богатая железом

Сидерофоры - выделяемые микроорганизмами вещества, переводящие железо в растворимую форму и связывающие его для дальнейшего переноса внутрь клетки



Лимитирование недостатком железа ведет к снижению числа диазоцитов и скорости азотфиксации

А вот фотосинтетическая активность продолжает сохраняться!

Замена ферредоксина на флаводоксин, не содержащий железа (предложено использовать флаводоксин в качестве маркера недостатка железа)

Но это под вопросом, поскольку экспрессия гена, кодирующего флаводоксин, регулируется также степенью обеспеченности азотом

Экосистемная роль *Trichodesmium*

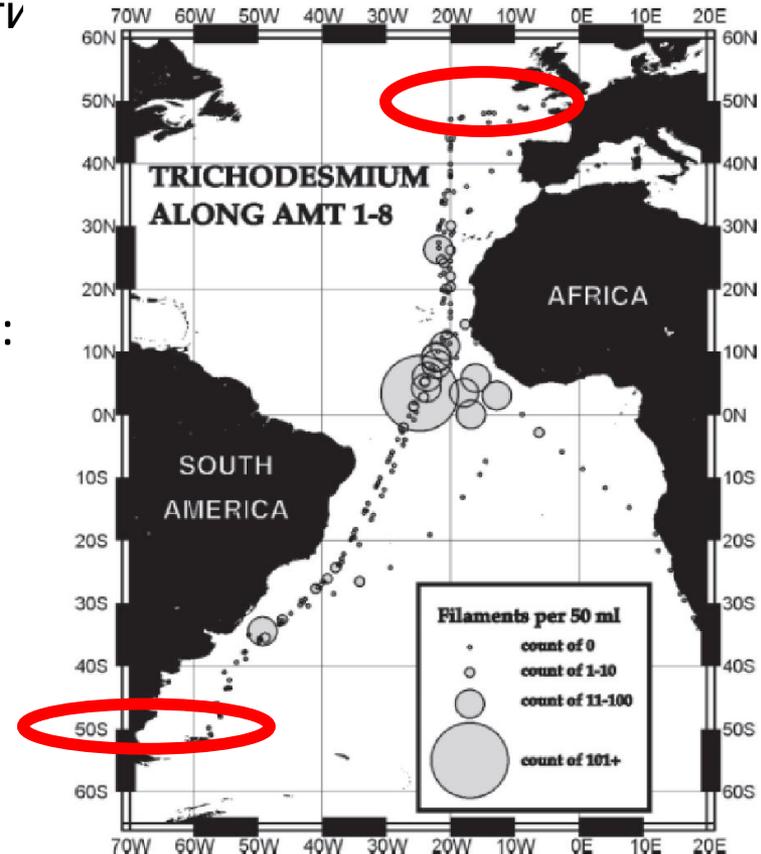
Пределы температурной толерантности для роста и азотфиксации у *Trichodesmium*: 20 – 34 °С, оптимальная температура 24 – 30 °С, в зависимости от вида

НО! *Trichodesmium*-подобные цианобактерии (nif гены) недавно обнаружены в Арктике – более широкие пределы толерантности

Trichodesmium также способен выживать при длительном периоде отсутствия света

Согласно спутниковым и судовым данным распределение ограничено приблизительно: 50°S и 50°N в Атлантическом и Индийском океанах и 20°S и 20°N в западной части Тихого океана

В этих районах формирует мощные цветения



Цветение *Trichodesmium*.
Большой барьерный риф
побережья Австралии.
Снимок NASA



Массовое развитие в
олиготрофных теплых водах
Атлантического, Тихого и
Индийского океанов

Протяженность акватории, охваченной
цветением *Trichodesmium*, может достигать
100 000 км² (отмечено в Аравийском море)

Число колоний при цветении может
достигать 11 000/м³ с числом трихомов до
200 в одной колонии

Цветение *Trichodesmium*.
Красное море
Снимок NASA



Рекорд: Индийский океан, поверхность - 17
000 трихомов в 1 л объема колонии

Экосистемная роль *Trichodesmium*

Скорость азотфиксации примерно 1,1 пМ N/(трихом ч)

Масштаб поступления азота в воды Мирового океана в результате азотфиксации *Trichodesmium* оценивается для Мирового океана в **60-80 · 10¹² г N/год** (суммарно азотфиксация в водных экосистемах оценивается в 100 – 200 · 10¹² г N/год).

Для цветений *Trichodesmium* характерно как **прижизненное** выделение значительного количества органического вещества, так и при отмирании клеток (окончание цветения)

По невыясненным до сих пор причинам (поражение вирусами??), цветения подвержены внезапному отмиранию *Trichodesmium*. Мертвые клетки разрушаются, обогащая воду органическим веществом, азотом и другими биогенными элементами.

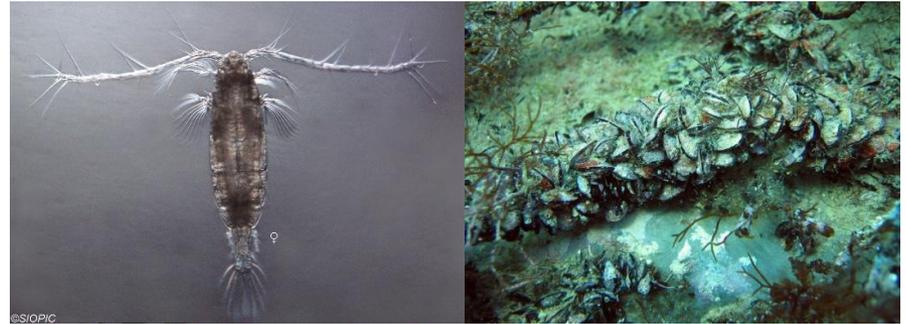
Такое «отмирающее цветение» действует как «сброс удобрений», стимулируя развитие водорослей, неспособных к азотфиксации, а также гетеротрофной биоты

Помимо этого, азот, фиксированный *Trichodesmium*, может поступать в пищевую цепь в результате выедания *Trichodesmium* оболочниками, копеподами и рыбами.

Согласно данным изотопного анализа, азот, фиксированный в процессе азотфиксации водорослями, является основным источником азота для зоопланктона в Северной Атлантике

Это довольно НЕОЖИДАННЫЙ результат, поскольку *Trichodesmium* синтезирует токсины, вызывающие гибель копепод, таких как *Acartia tonsa*, а также устриц и некоторых видов рыб (сельдь, анчоусы)

Накопленные в устрицах и рыбах токсины могут вызывать паралитические поражения у человека



Прогнозы динамики *Trichodesmium* при наблюдаемом климатическом тренде

Есть все основания полагать, что повышение температуры и концентрации CO₂, а также возрастание стратификации приведут к возрастанию масштабов цветения *Trichodesmium*

Возрастанию масштабов цветения *Trichodesmium* способствует также антропогенная эвтрофикация (использование удобрений, сброс сточных вод, марикультура)

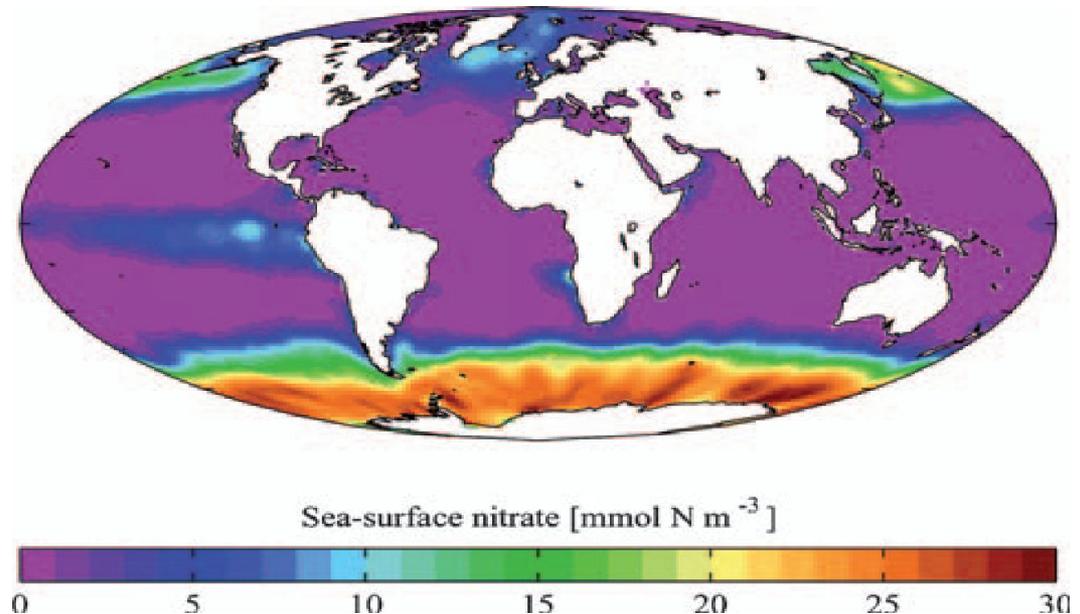
С другой стороны, такие механизмы, как **колимитирование** несколькими биогенными элементами может предотвратить возрастание масштабов цветения *Trichodesmium*

КОЛИМИТИРОВАНИЕ

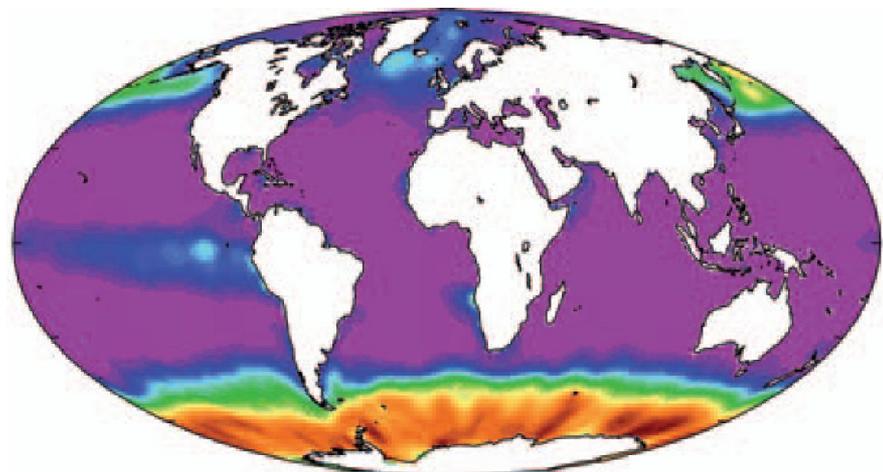
Длительное время основной парадигмой в экологии фитопланктона было утверждение, что только один ресурс лимитирует рост водорослей в любой конкретный момент времени (закон Либиха, сформулированный при изучении высшей растительности).

Лимитирующий элемент в водных экосистемах:

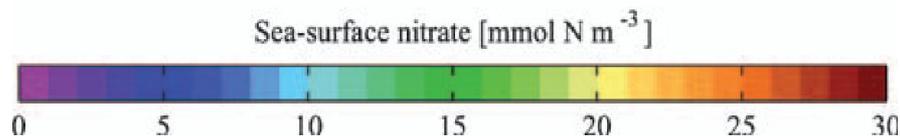
1. На большей части акватории Мирового океана фотосинтетическую активность и рост водорослей лимитирует недостаток **азота**.



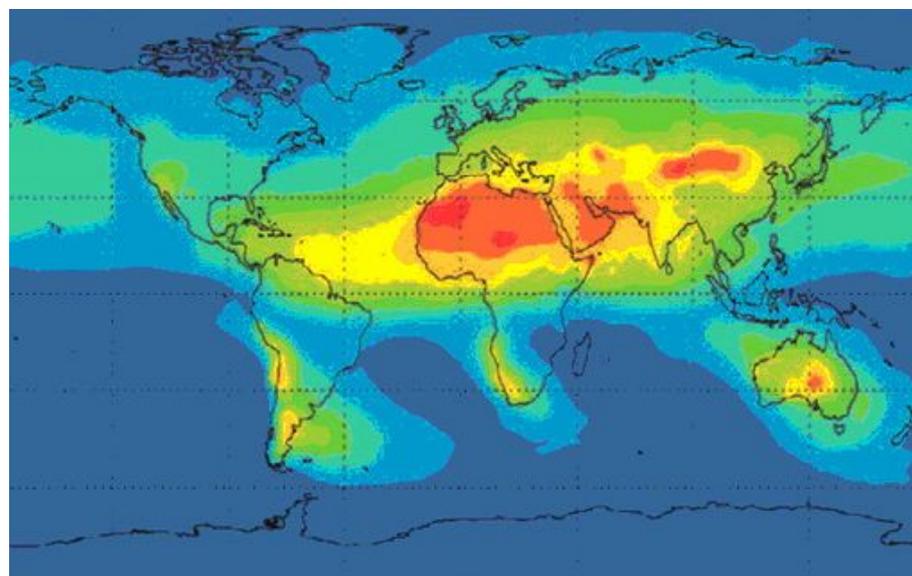
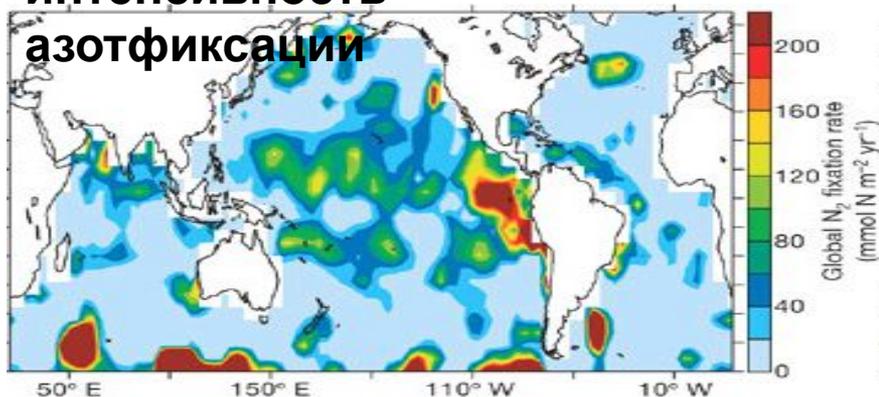
2. В так называемых «районах высокой концентрации биогенных элементов и низкой концентрации хлорофилла» фотосинтетическую активность и рост водорослей лимитирует недостаток **железа**.



Распределение пыли (г/м^2 в год), приносимой ветрами



**ИНТЕНСИВНОСТЬ
азотфиксации**



3. В ряде районов Мирового океана (Северная Атлантика, Средиземное море, Бискайский залив, норвежские фиорды, Белое море) на определенных стадиях сезонного развития фотосинтетическую активность и рост водорослей лимитирует недостаток фосфора.

4. В **пресных** водах в большинстве случаев фотосинтетическую активность и рост водорослей лимитирует недостаток **фосфора**. В настоящее время накапливается все больше свидетельств, что фотосинтез и рост водорослей может быть лимитирован более чем одним ресурсом –

колимитирование

Регистрация ко-лимитирования:

- Повышение фотосинтетической активности и роста при добавлении сразу двух ресурсов **A** и **B**.
- Повышение фотосинтетической активности и роста при добавлении как ресурса **A**, так и ресурса **B**.

Колимитирование проявляется (регистрируется) как на клеточном уровне, так и на уровне сообщества: мультиресурсное колимитирование, биохимическое колимитирование, колимитирование на уровне сообщества.

Мультиресурсное ко-лимитирование.

Два ресурса в такой низкой концентрации (ниже порогового уровня), что их потребление уже невозможно.

Например: лимитирующий ресурс – азот, а азот фиксаторы (их рост не лимитирован азотом) снижают концентрацию фосфора ниже критического уровня.

→ Добавки двух ресурсов необходимы для роста фитопланктона.
Показано для:

- вод Балтийского моря (азот и фосфор),
- для эстуария реки Перл в Южно-Китайском море (кремний и фосфор),
- для азотфиксаторов в тропических районах Северной Атлантики (фосфор и железо).

Биохимическое колимитирование. Проявляется на **клеточном уровне.**

Хотя два ресурса лимитируют рост и фотосинтез, добавка только одного уже ведет к активации роста.

Обусловлено тем, что добавка одного ресурса (например, **A**) ведет к повышению **эффективности потребления** другого (ресурса **B**).

Например, азот (железо) и свет лимитируют рост и фотосинтез.

Добавка азота (железа) ведет к повышению улавливающей способности антенн, и свет становится нелимитирующим ресурсом. В свою очередь, повышение интенсивности света повышает эффективность потребления азота (железа) – снижение K_s , и уже азот (железо) становится нелимитирующим ресурсом.

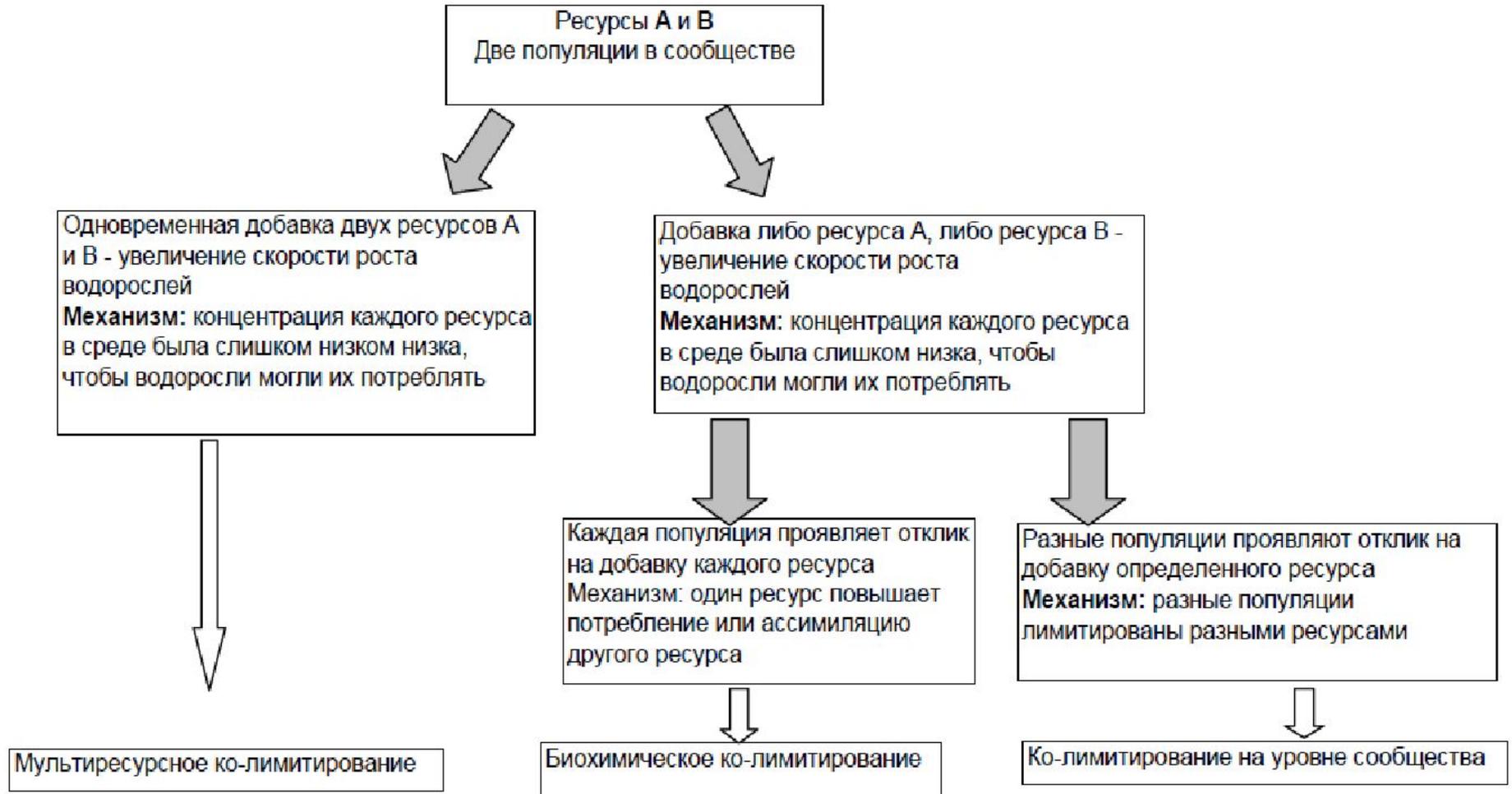
Колимитирование на уровне сообщества. Добавка ресурса **A** стимулирует рост одной популяции, добавка ресурса **B** стимулирует другую. В итоге при добавке каждого ресурса активируется рост сообщества.

Примеры: олиготрофные воды, в которых достаточно высокое содержание железа. Добавка нитратов стимулирует водоросли, не являющиеся азотфиксаторами, но способными к утилизации органического фосфора. А добавка фосфора стимулирует азотфиксатора *Trichodesmium*

При колимитировании на уровне сообщества одна (или несколько) популяций сообщества могут находиться в состоянии биохимического колимитирования, а развитие других лимитировано одним ресурсом.

Например: в тропических районах Северной Атлантики для активации азотфиксаторов необходима одновременная добавка фосфора и железа, а добавка одного нитратного азота стимулирует рост пикоцианобактерий *Prochlorococcus* и *Synechococcus*, обладающих более высокой эффективностью использования органического фосфора и железа.

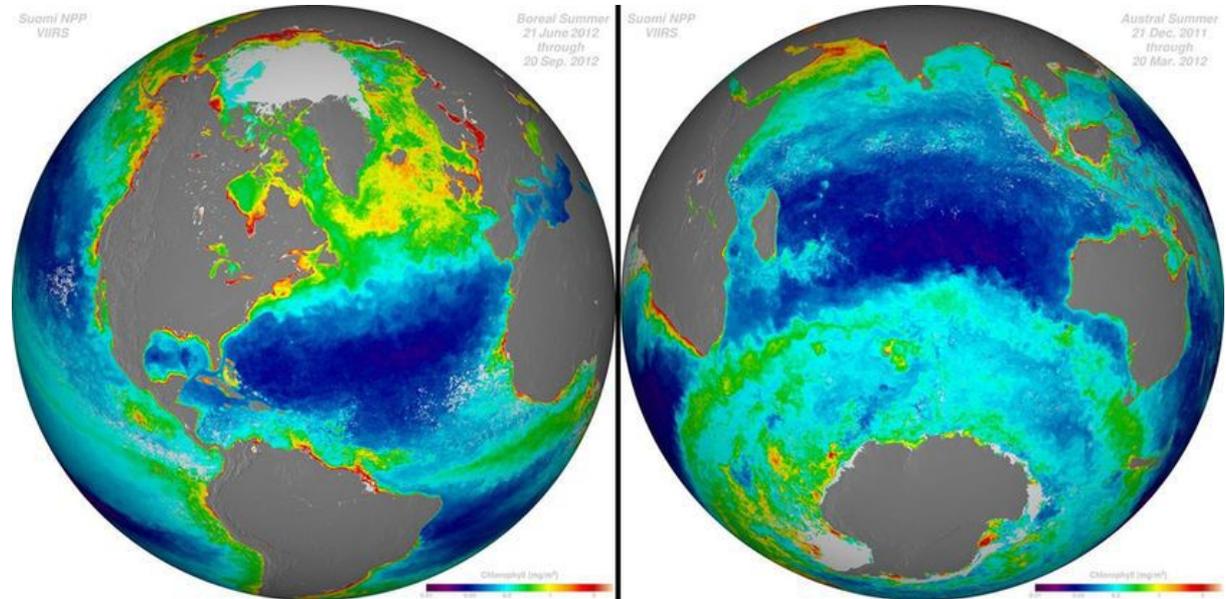
Схема колимитирования



Вопросы?

На следующей лекции:

Пространственно-временная изменчивость первичной продукции в Мировом океане



Вопросы экзамена

(бакалавриат)

8. Основные биогенные элементы и формы их присутствия в водной среде. Биогенные элементы, лимитирующие рост фитопланктона.

Потребление биогенных элементов водорослями. Модели минерального питания фитопланктона. Зависимость скорости роста водорослей от концентрации биогенных элементов в среде.

9. Зависимость фотосинтеза от интенсивности света и концентрации биогенных элементов. Прижизненное выделение водорослями экзометаболитов. Дыхание фитопланктона. Чистый и валовый фотосинтез.

Спасибо за внимание!