

СТАТИСТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ МЕТАБОЛОМА ЛИТОБИОНТНЫХ СООБЩЕСТВ В ЕСТЕСТВЕННЫХ И УРБАНИЗИРОВАННЫХ УСЛОВИЯХ

K.B. Сазанова

Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербургский филиал Архива РАН

Ksazanova@binran.ru

Аннотация. Изучен состав метаболитов в различных типах бионаслоений на поверхности мрамора в естественных местах и в городской среде. Метаболомный профайлинг выполняли методом газовой хроматографии / масс-спектрометрии. Статистическую обработку данных – методами мультивариантной статистики (PCA и OPLSDA). Обнаружено, что бионаслоения в городской среде гораздо менее разнообразны биохимически, чем в антропогенно-ненарушенных условиях. Различия по метаболомным данным были значительно больше между местами отбора проб, чем между типами сообществ. Литобионтные сообщества организмов представляют собой интересный и перспективный объект для целей биоиндикации и биомониторинга окружающей среды.

Ключевые слова: метаболомика, литобионтные сообщества, метод главных компонент, антропогенное воздействие.

Введение

Антропогенный фактор вносит серьезный вклад в функционирование экосистем. Техногенные загрязнители оказывают непосредственное влияние на организмы, включаются в трофические цепи и в конечном итоге влияют на всю экосистему. Способность живых организмов накапливать техногенные загрязнители, в первую очередь тяжелые металлы, активно используется для целей биомониторинга загрязнения среды [1–4]. Однако такой подход предполагает использование определенных видов биоиндикаторов и в большинстве случаев может быть эффективен только для оценки влияния отдельных поллютантов. Для более комплексного анализа степени антропогенного воздействия необходимо выявить системные изменения на уровне сообществ. Литобионтные сообщества представляют собой интересную модель для экологических исследований, поскольку они включают организмы из нескольких крупных таксонов (грибы, бактерии, мхи, лишайники, водоросли), различающихся по своим физиологическим характеристикам. Природный камень подвергается интенсивной биологической колонизации как в естественной среде, так и на урбанизированных территориях [5–7]. Часто разные типы литобионтных сообществ можно наблюдать на относительно малой площади.

Исследование организации сообществ и их адаптивного потенциала к неблагоприятным факторам среды осложняется необходимостью описания множества параметров системы и соответственно – большого объема аналитических данных. В последнее время очень продуктивным оказался подход к исследованию сверхсложных биологических систем на основе представлений о метаболитной сети как

о сообществе молекул метаболитов. Метаболомика обеспечивает «мгновенный снимок» клеточного метаболизма и может выявлять дискретные изменения метаболических путей и обилие промежуточных продуктов метаболизма малых молекул. Состояние метаболитной сети наиболее естественным образом описывается с помощью статистической модели с использованием метода главных компонент (PCA), поскольку в нем виртуальные координатные оси по сути представляют собой линейную комбинацию элементов наблюдаемого профиля, то есть относительных численностей отдельных метаболитов [8]. Структура метаболомных данных могла бы служить интегральной характеристикой литобионтных сообществ и использоваться при их сравнительном анализе.

Цель работы состояла в сравнительном анализе закономерностей формирования биохимических состояний литобионтных сообществ на мраморе в регионах с различным уровнем антропогенной нагрузки на основе математической обработки многомерного массива аналитических данных, полученных в результате метаболомного анализа.

Материалы и методы исследования

Отбор проб

Бионаслоения были отобраны с поверхности карельского мрамора в карьере Рускеала, а также с поверхности музеиных некрополей Александро-Невской лавры, выполненных из этого же вида мрамора. Карьер Рускеала расположен в Северном Приладожье (Сортавальский район Республики Карелия). В настоящее время добыча мрамора здесь прекращена и карьер идеально подходит для изучения обрастаний природного мрамора в условиях

низкой антропогенной нагрузки. Исторические некрополи расположены в центральной части г. Санкт-Петербурга в условиях высокой антропогенной нагрузки. Пробы отбирали в весенне-летний период (стадия активной вегетации).

Для настоящего исследования было выбрано 4 типа сообществ, классифицированных на основании наших предыдущих исследований [9; 10] по доминирующему группам организмов.

I тип – бионаслоения с доминированием водорослей и цианопрокариот. В карьере Рускеала – слизистая, пигментированная, сросшаяся с камнем пленка, преимущественно оливкового цвета, может приобретать красноватый оттенок. В городской среде имеют вид сухого зеленого налета на поверхности камня.

II тип – бионаслоения с доминированием грибов, большим обилием водорослей и цианобактерий. В карьере Рускеала – темные корковидные наслонения, плотно прилегающие к поверхности камня. На памятниках некрополей Александро-Невской лавры похожи на бионаслоения типа I, но имеют темную окраску. Часто наблюдаются в местах выкрашивания камня.

III тип – наслоения, включающие отдельные деревушки мхов и талломы лишайников, не формирующие сплошной покров. Характеризуется большим видовым разнообразием и обилием грибов.

IV тип – первичная почва с развитым моховым покровом. Характеризуется высоким обилием грибов.

Пробоподготовка

Образцы двукратно экстрагировали холодным метанолом и центрифугировали (10 min, 400 x g). Супернатант объединяли, переносили в новые виалы и выпаривали при 40 °C. Высушенные экстракты растворяли в пиридине (30 µL), далее добавляли BSTFA (N,O-bis-3-methyl-silyl-3-F-acetamide) (30 µL), и инкубировали в течение 15 минут при 100 °C для получения ТМС (триметил-силил-производных).

Газовая хроматография / масс-спектрометрия

Полученные ТМС-производные анализировали методом газовой хроматографии / масс-спектрометрии (ГХ-МС) на приборе Maestro instrument (Interlab, Russia) с детектором Agilent 5975. Колонка HP-5MS, 30 m X 0.25 mm X 0.25 µm. Хроматографирование выполнялось при линейном повышении температуры от 70 °C до 320 °C, 6 °C/мин. при постоянном потоке газа через (1 мл мин). Газ носитель – гелий. Масс-спектры сканировались в диапазоне 50–750 m/z с частотой 1,6 скан/сек. Хроматограммы были записаны по полному ионному току. Для обработки и интерпре-

тации масс-спектрометрических данных использовали программу AMDIS (<http://www.amdis.net/index.html>), библиотеку стандартов NIST2005 и библиотеку стандартных соединений, созданную в БИН РАН. Количественная интерпретация хроматограмм выполнена с использованием тридекана в программе UniChrom (<http://www.unichrom.com/unichrome.shtml>).

Статистический анализ

Статистический анализ был выполнен методом главных компонент (PCA) и дискриминантным анализом ортогональных проекций на латентные структуры (OPLSDA) в программе MetaboAnalyst (<https://www.metaboanalyst.ca>).

Результаты и обсуждение

В пробах из карьера Рускеала было обнаружено более 200 различных соединений, относящихся к следующим основным классам: моно-, ди- и три- сахарида, карбоновые кислоты алифатического ряда, жирные кислоты, аминокислоты, фенольные соединения, терпеноиды, стерины.

В пробах, отобранных на поверхности музеиных некрополей, метаболитная матрица насчитывала не более 100 соединений, что в два раза меньше по сравнению с пробами из карьера Рускеала. В образцах бионаслоений, отобранных с памятников, было мало аминокислот, фенольных соединений и терпеноидов. Однако некоторые пробы из городской среды содержали полиолы (в основном арабит, маннит, эритрит) в очень высоких концентрациях. Вероятно, это связано с более высокой долей грибов: в городских пробах грибов больше (по количеству КОЕ и видовому разнообразию) [11]. Известно, что полиолы синтезируются и выполняют физиологические функции в растениях, но в большей степени они характерны для грибов, частично заменяя сахара [12]. Концентрации всех других соединений, характерных для городской среды и карьера, были значительно выше в пробах, отобранных из карьера.

На первом этапе анализа данных с помощью методов PCA и OPLSDA была построена статистическая модель для каждой группы проб, т.е. для проб, отобранных в карьере Рускеала и на поверхности некрополей.

PCA-анализ не позволил выявить четкую кластеризацию данных по типам сообществ, выделенных на основании доминирующих групп организмов (рис. 1). PCA не визуализирует обоснованное положение III и IV типов, а также показывает частичное перекрывание кластеров I и II типов. Четкую кластеризацию метаболомных данных удалось визуализировать только при использовании OPLSDA (рис. 2).

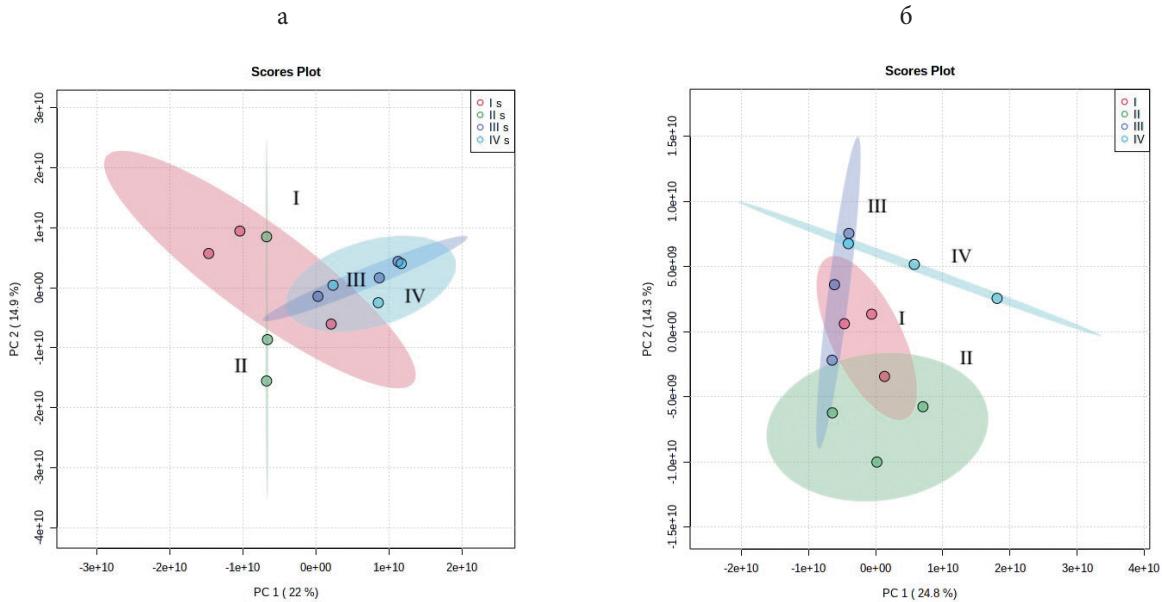


Рис. 1. РСА-анализ метаболитов в бионаслоениях из карьера Рускеала (а) и с поверхности музеиных некрополей (б)

Это ожидаемо, поскольку неконтролируемый характер алгоритма РСА обеспечивает средства для достижения объективного уменьшения размерности и его применение выявляет групповую структуру только тогда, когда внутригрупповые вариации значительно меньше, чем межгрупповые вариации. ОПЛСДА-метод близок к РСА, но основан на комбинированном разложении двух матриц. Первая матрица содержит экспериментальные измерения, а вторая матрица включает в себя априорные данные, т.е. принадлежность образца к классу [13]. В результате мы получаем матрицу счетов, где объекты представлены в пространстве меньшей размерности, но уже так, что различия между классами максимальны [14].

Разумеется, выделенные на основании доминирующих таксонов организмов группы являются смешанными сообществами микроорганизмов и частично образованы одними и теми же видами. Наиболее близкими по метаболомным данным оказались образцы из III и IV типов. Эти сообщества действительно представляют собой разные стадии единого процесса – формирования первичной почвы. Следует отметить, что IV тип – первичная почва представляет собой особый тип сообщества, обладающий наибольшей дисперсией метаболомных данных, в отличие от III типа, что, возможно, связано с увеличением роли высших растений.

В целом можно выявить следующие закономерности распределения метаболитов в пробах различных типов. В бионаслоениях, формирующихся в карьере Рускела сахара присутствовали в каждом типе проб, но распределялись по-разному: фруктоза

доминировала в I и II типах приблизительно в равных соотношениях, мальтоза – в I типе, арабиноза – во II типе, глюкоза – в III типе. Суммарно полиолы распределялись приблизительно одинаково между I и II типами, но эритритол присутствовал в больших концентрациях в первом типе бионаслоений, а дульцитол – во втором. Фумаровая, кето-глюконо-вая и глицериновая кислоты доминировали в I типе проб. Малеиновая кислота распределялась равномерно между I и II типами. Стерины накапливались в основном в первых двух типах бионаслоений: содержание стигмастерола было наиболее высоким в типе I, а ситостерола – в типе II. Жирные кислоты распределялись по-разному: С 18:0 и С 24:0 накапливались в основном во II типе проб, а С 5:0 – в I. Гидроксихинон доминировал во втором типе проб, но присутствовал также и в пробах первого типа в достаточно высокой концентрации.

Метаболомный анализ проб из городской среды показал, что для проб III типа было характерно большее накопление некоторых моносахаров и полиолов (маннитол, арабитол, эритритол). Пробы I типа накапливали больше хиро-инозитола, рибозы, фруктозы, глицериновой и янтарной кислот. Пробы второго типа отличались накоплением эритритола дисахаридов, гликозидов, пальмитиновой кислоты и некоторых моносахаров. Пробы IV типа отличались накоплением стеринов (кампостерола, ситостерола и стигмастерола), токоферола и ряда неидентифицированных соединений.

Совместный РСА и ОПЛСДА-анализ метаболитной матрицы бионаслоений из карьера Рускела и с поверхности музеиных некрополей показал, что образцы проб из музеиных некрополей образуют

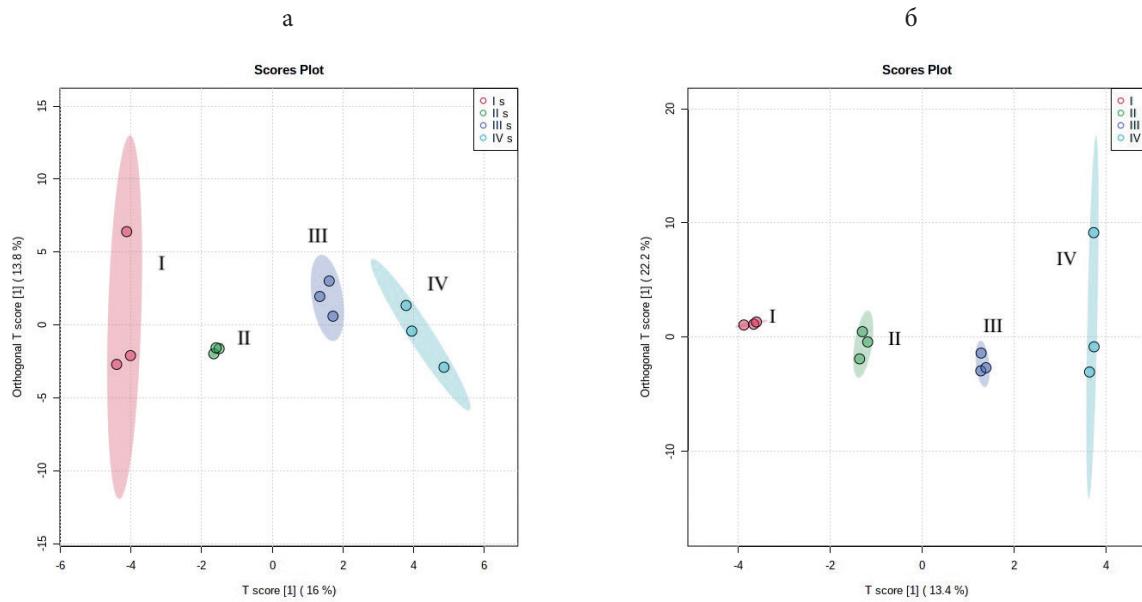


Рис. 2. OPLSDA-анализ метаболитов в бионаслоениях из карьера Рускеала (а) и с поверхности музейных некрополей (б)

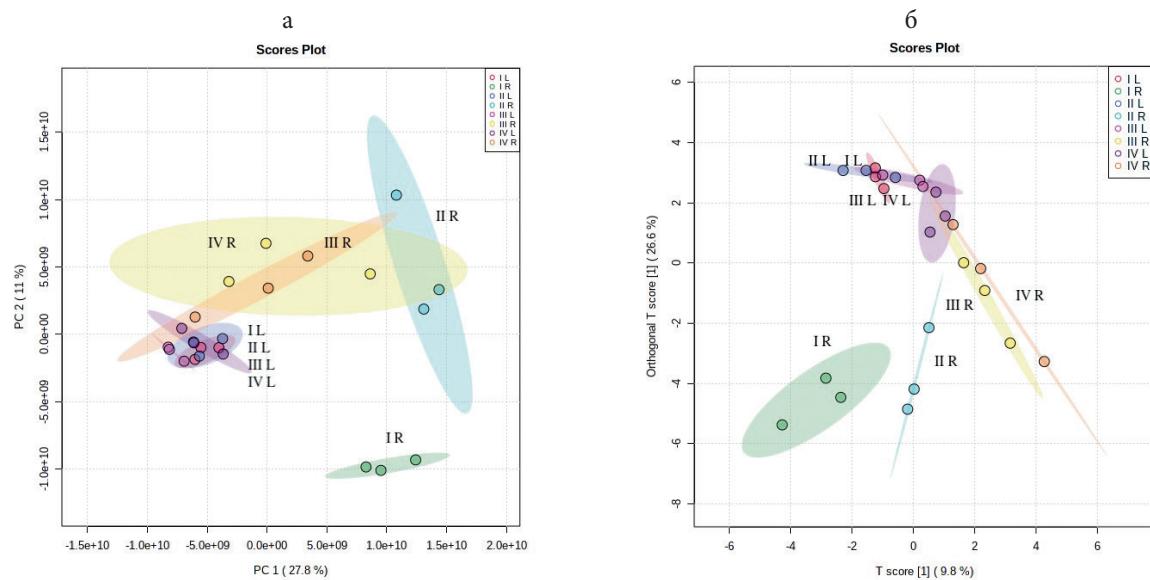


Рис. 3. Совместный PCA- (а) и OPLSDA- (б) анализ метаболитной матрицы бионаслоений из карьера Рускела и с поверхности музеиных некрополей

единую плотно сгруппированную группу, в то время как пробы из Рускеальского карьера распределяются по типам и практически не перекрываются с пробами из городской среды (рис. 3).

Полученные данные показывают принципиальную разницу на биохимическом уровне между литобионтными сообществами в естественной и антропогенно-нарушенной среде обитания. Различия по метаболомным данным были значительно больше между местами отбора проб, чем между

типами сообществ. На наш взгляд, литобионтные сообщества организмов представляют собой интересный и перспективный объект для целей биоиндикации и биомониторинга окружающей среды.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ для молодых ученых № МК-799.2021.1.4 «Метаболомика сообществ микроорганизмов литобионтных систем», а также Комитета по науке и высшей школе.

Список литературы

1. *Bargagli R., Monaci F., Borghini F., Bravi F., Agnorelli C.* Mosses and lichens as biomonitoring of trace metals. A comparison study on *Hypnum cupressiforme* and *Parmelia caperata* in a former mining district in Italy // Environ. Pollut. 2002. Vol. 116. P. 279–287.
2. *Szczepaniak K., Biziuk M.* Aspects of the biomonitoring studies using mosses and lichens as indicators of metal pollution // Environ. Res. 2003. Vol. 93. P. 221–230.
3. *Harmens H., Norris D.A., Koerber G., Buse A., Steinnes E., Röhling A.* Temporal trends in the concentration of arsenic, chromium, copper, iron, nickel, vanadium and zinc in mosses across Europe between 1990 and 2000 // Atmos. Environ. 2007. Vol. 41. P. 6673–6687.
4. *Szczyglowska M., Bodnar M., Namieśnik J., Konieczka P.* The use of vegetables in the biomonitoring of cadmium and lead pollution in the environment // Crit Rev Anal Chem. 2014. Vol. 44. P. 2–15.
5. *Warscheid T., Braams J.* Biodeterioration of stone: A review // Int. Biodeterior. Biodegradation. 2000. Vol. 46. P. 343–368.
6. *Salvadori O., Municchia A.C.* The Role of Fungi and Lichens in the Biodeterioration of Stone Monuments // Open Conf. Proc. J. 2016. V. 7. P. 39–54.
7. *Di Martino P.* What about Biofilms on the Surface of Stone Monuments? // Open Conf. Proc. J. 2016. Vol. 6. P. 14–28.
8. *Shavarda A., Kotlova E., Pozhvanov G., Sazanova K., Senik S.* Existential metabolomics: visualization of growth and development processes through metabolite profiling. In: Proc 12th Annu Conf Metabolom Soc. Dublin, 2016. P. 124.
9. Сазанова К.В., Власов Д.Ю., Шаварда А.Л., Зеленская М.С., Кузнецова О.А. Метаболомный подход в изучении литобионтных сообществ // Биосфера. 2016. Т. 8. № 3. С. 291–300.
10. *Sazanova K.V., Zelenskaya M.S., Manurtdinova V.V., Izatulina A.R., Rusakov A.V., Vlasov D.Y., Frank-Kamenetskaya O.V.* Accumulation of Elements in Biodeposits on the Stone Surface in Urban Environment. Case Studies from Saint Petersburg, Russia // Microorganisms. 2021. Vol. 9 (36).
11. *Sazanova K., Shavarda A., Zelenskaya M., Rodina O., Vlasov D.* Metabolomic Profiling of Biolayers on the Surface of Marble in Nature and Urban Environment. Case Study of Karelia and St. Petersburg // Minerals. 2021. In press.
12. Sugar alcohols // Loewus F.A., Tanner W., eds. Plant Carbohydrates I: Intracellular Carbohydrates, Encyclopedia of Plant Physiology. 13A. New York: Springer, 1982. P. 158–192.
13. *Worley B., Powers R.* PCA as a practical indicator of OPLS-DA model reliability // Curr Metabolomics. 2016. Vol. 4. P. 97–103.
14. *Bylesjö M., Rantalainen M., Cloarec O., Nicholson J., Holmes E., Trygg J.* OPLS discriminant analysis: combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification // J. Chemometr. 2006. Vol. 20. P. 341.

STATISTICAL MODELS OF THE METABOLOME OF LITHOBIONTIC COMMUNITIES IN NATURAL AND URBANIZED CONDITIONS

K.V. Sazanova

V.L. Komarov Botanical Institute RAS
Ksazanova@binran.ru

Abstract. The composition of metabolites in various types of biolayering on the marble surface in natural outcrops and in an urban environment has been studied. Metabolomic profiling was performed by gas chromatography-mass spectrometry. It was found that biolayering in the urban environment is much less diverse biochemically than in anthropogenically undisturbed conditions. The differences in metabolomic data were significantly greater between sampling sites than between community types. Lithobiontic communities of organisms are an interesting and promising for bioindication and biomonitoring of the environment.

Keywords: metabolomics, lithobiontic communities, principal component analysis, anthropogenic impact.

References

1. *Bargagli R., Monaci F., Borghini F., Bravi F., Agnorelli C.* Mosses and lichens as biomonitoring of trace metals. A comparison study on *Hypnum cupressiforme* and *Parmelia caperata* in a former mining district in Italy // Environ. Pollut. 2002. Vol. 116. P. 279–287.
2. *Szczepaniak K., Biziuk M.* Aspects of the biomonitoring studies using mosses and lichens as indicators of metal pollution // Environ. Res. 2003. Vol. 93. P. 221–230.
3. *Harmens H., Norris D.A., Koerber G., Buse A., Steinnes E., Rühling A.* Temporal trends in the concentration of arsenic, chromium, copper, iron, nickel, vanadium and zinc in mosses across Europe between 1990 and 2000 // Atmos. Environ. 2007. Vol. 41. P. 6673–6687.
4. *Szczygłowska M., Bodnar M., Namieśnik J., Konieczka P.* The use of vegetables in the biomonitoring of cadmium and lead pollution in the environment // Crit Rev Anal Chem. 2014. Vol. 44. P. 2–15.
5. *Warscheid T., Braams J.* Biodeterioration of stone: A review // Int. Biodeterior. Biodegradation. 2000. Vol. 46. P. 343–368.
6. *Salvadori O., Municchia A.C.* The Role of Fungi and Lichens in the Biodeterioration of Stone Monuments // Open Conf. Proc. J. 2016. Vol. 7. P. 39–54.
7. *Di Martino P.* What about Biofilms on the Surface of Stone Monuments? // Open Conf. Proc. J. 2016. Vol. 6. P. 14–28.
8. *Shavarda A., Kotlova E., Pozhvanov G., Sazanova K., Senik S.* Existential metabolomics: visualization of growth and development processes through metabolite profiling // Proc 12th Annu Conf Metabolom Soc. Dublin, 2016. P. 124.
9. *Sazanova K.V., Vlasov D.Yu., Shavarda A.L., Zelenskaya M.S., Kuznetsova O.A.* Metabolomic approach to studying lithobiontic communities // Biosfera. 2016. Vol. 8. № 3. P. 291–300. (In Russian).
10. *Sazanova K.V., Zelenskaya M.S., Manurtdinova V.V., Izatulina A.R., Rusakov A.V., Vlasov D.Y., Frank-Kamenetskaya O.V.* Accumulation of Elements in Biodeposits on the Stone Surface in Urban Environment. Case Studies from Saint Petersburg, Russia // Microorganisms. 2021. Vol. 9 (36).
11. *Sazanova K., Shavarda A., Zelenskaya M., Rodina O., Vlasov D.* Metabolomic Profiling of Biolayers on the Surface of Marble in Nature and Urban Environment. Case Study of Karelia and St. Petersburg // Minerals. 2021. In press.
12. Sugar alcohols // Loewus F.A., Tanner W., eds. Plant Carbohydrates I: Intracellular Carbohydrates, Encyclopedia of Plant Physiology. 13A. New York: Springer, 1982. P. 158–192.
13. *Worley B., Powers R.* PCA as a practical indicator of OPLS-DA model reliability // Curr Metabolomics. 2016. V. 4. P. 97–103.
14. *Bylesjö M., Rantalainen M., Cloarec O., Nicholson J., Holmes E., Trygg J.* OPLS discriminant analysis: combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification // J. Chemometr. 2006. Vol. 20. P. 341.