

МЕТАБОЛОМНЫЙ ПОДХОД В ИЗУЧЕНИИ ЛИТОБИОНТНЫХ СООБЩЕСТВ

К.В. Сазанова^{1,2*}, Д.Ю. Власов^{1,2}, А.Л. Шаварда^{1,3},
М.С. Зеленская², О.А. Кузнецова²

¹ Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН,

² Биологический факультет, Санкт-Петербургский Государственный университет,

³ Научный парк Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, Россия

*Эл. почта: Ksazanova@binran.ru

Статья поступила в редакцию 09.06.2016; принята к печати 05.09.2016

Обосновывается возможность использования метаболомного метода для оценки биохимического состояния биопленок и первичных почв, формирующихся на поверхности камня. Биопленки различного состава на природном мраморе в карьере «Рускеала» охарактеризованы по внешним признакам и доминирующим видам микроорганизмов, входящим в их состав. Для сравнительного изучения биопленок на мраморе использован метаболомный профайлинг с последующей математической обработкой данных с помощью метода главных компонент. Корреляционная структура метаболомных данных указывает на определенные закономерности группировки биопленок, которые могут отражать различные этапы их развития. На основе наблюдаемых трендов в пространстве главных компонент обсуждается возможная последовательность смены биохимических состояний биопленок в процессе их формирования.

Ключевые слова: биопленки, литобионтные сообщества, метаболомика, биохимическое состояние, временные тренды.

METABOLOMIC APPROACH TO STUDYING LYTHOBIONTIC COMMUNITIES

K.V. Sazanova^{1,2*}, D.Yu. Vlasov^{1,2}, A.L. Shavarda^{1,3}, M.S. Zelenskaya², O.A. Kuznetsova²

¹ Komarov Botanical Institute, ² Biological Faculty, Saint-Petersburg State University, and

³ Research Park of Saint-Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

*E-mail: Ksazanova@binran.ru

Reasons are provided for the adequacy of the metabolomics approach to assessing the chemical state of biofilms and primary soils on rock surfaces. The approach is applied to different biofilms on natural marble at Ruskeala Quarry, which are characterized by their appearance and dominant microorganisms. The metabolite profile data of the biofilms are treated using principal component analysis. The correlational structure of the data suggest that their patterning reflects their developmental stages. The possible succession of changes in the biochemical states of biofilms is discussed.

Keywords: biofilms, lythobiontic communities, metabolomics, biochemical state, temporal trends.

Введение

Исследование закономерностей формирования сообществ микроорганизмов на поверхности горных пород и их взаимодействий с субстратом – одно из активно развивающихся направлений биогеохимии. Деятельность микроорганизмов является ключевым фактором процессов трансформации поверхностного слоя горных пород и первичного почвообразования. Однако механизмы функционирования литобионтных систем, а также влияние на эти процессы широкого комплекса внешних и внутренних факторов изучены недостаточно.

Условия существования на поверхности камня считаются близкими к экстремальным. Находясь в тонком поверхностном слое, микроорганизмы подвергаются воздействию резких колебаний температуры и влажности. Основу популяции микроорганизмов на поверхности камня составляют олиго- и пойкилотрофы. Чаще всего это организмы, характеризующиеся медленным ростом и устойчивостью к неблагоприятным условиям среды [21, 23].

Рост микроорганизмов на поверхности горных пород, как правило, происходит в биопленках. В их состав, кроме самих микроорганизмов (водоросли, бактерии, грибы, лишайники, простейшие), входят внеклеточные вещества – продукты жизнедеятельности микробного сообщества [2, 23]. В широком

смысле под биопленками понимаются сообщества микроорганизмов, объединенных посредством внеклеточных полимеров, выполняющих защитную, адгезивную и интегрирующую функции [14]. Формирование биопленок возможно на различных субстратах и в разных средах. Биопленки рассматриваются в качестве доминирующей формы роста микроорганизмов в почве. Из-за пространственной неоднородности распределения органических веществ клетки микроорганизмов, как правило, локализуются ближе к источникам питания, таким как корни растений или растительные остатки, где развиваются многовидовые биопленки [35]. Биопленки занимают значительную часть земной поверхности и играют существенную роль в круговороте вещества и энергии, в выветривании горных пород и процессах почвообразования [22]. В случае литобионтных систем формирование биопленок способствует выживанию организмов в олиготрофных условиях и защите от неблагоприятных внешних воздействий [7, 38].

Образование биопленок не является случайным явлением сосуществования отдельных микроорганизмов. Биопленки представляют собой четко структурированное сообщество, имеющее так называемую «социальную структуру». Способы взаимодействий в биопленках основываются на механизмах коагрегации микроорганизмов, межвидовой защиты, «чувств-

ва кворума» и горизонтального переноса генов. Для описания физиологической деятельности биопленок применяется термин «ко-метаболизм». Одни виды используют метаболиты, продуцируемые соседними видами, что является выгодным для всего микробного сообщества [5, 7, 11, 38]. Различные типы биопленок способны по-разному реагировать на изменения окружающей среды. В некоторых случаях эти изменения могут приводить к распаду биопленки, а в других случаях – к ее преобразованию и трансформации в другой тип сообщества [7].

Основными подходами для характеристики биопленок традиционно являются описание биоразнообразия и отдельных биохимических параметров [13, 23]. Наиболее применяемыми биохимическими подходами в исследовании биопленок являются методы определения содержания белка, хлорофилла, углеводов, АТФ, активности некоторых ферментов [2, 27, 30]. В последнее время появляется все больше исследований, касающихся механизмов обмена молекулярными сигналами и горизонтального переноса генов в биопленках [6, 8, 16, 26]. Однако для целостного описания закономерностей формирования и развития биопленок, а также для оценки влияния на них факторов среды требуется модель, позволяющая характеризовать системные изменения биопленок на основании изменений ряда универсальных параметров. Применение современной аналитической техники, развитие IT-технологий и биоинформатики позволяют получить новые представления о системном поведении малых молекул. Структура метаболомных данных могла бы служить интегральной характеристикой основных этапов развития литобионтных сообществ. Описание системных изменений биопленок может быть дано на основе оценки поведения малых молекул, составляющих так называемую метаболитную сеть.

Термин «метаболомика сообществ» был предложен относительно недавно для применения метаболомного подхода в исследованиях сообществ организмов [19, 32, 36]. Метаболомный анализ успешно применяется для исследований взаимодействия организмов *in situ*. Так, с применением этого подхода было установлено, что циклогексимид отвечает за антагонистическое взаимодействие актиномицетов рода *Kitasatospora* и корневого патогена *Phytophthora citricola* [12]. Исследования состава мицелия трех конкурирующих видов грибов, участвующих в процессе разложения древесины, выполненные с использованием газовой хромато-масс-спектрометрии, показали, что синтез 2-метил-2,3-дигидроксипропионовой и пиридоксиновой кислот, скорее всего, вовлечен в защитные механизмы, активируемые в ответ на прямой контакт мицелия нескольких видов грибов [29]. Исследования межвидовых взаимодействий и аллелопатического эффекта у двух видов диатомовых водорослей показали различия в метаболомном профиле монокультур в сравнении с профилем, который наблюдается в смешанной культуре [28]. В результате метаболомного исследования бактериальной биопленки, выполненного с применением ядерного магнитного резонанса, было установлено, что метаболомные профили монокультуры суспензированных бактериальных клеток и бактерий этого же вида, формирующих биопленку, существенно разные [38].

В последнее время очень продуктивным оказался подход к исследованию сверхсложных биологических систем на основе представлений о метаболитной сети как о сообществе молекул метаболитов, главной особенностью которых является их принципиальная адресуемость, то есть возможность получить персональное сообщение. Условием возникновения и существования любой системы является наличие взаимодействия между ее элементами [3]. В биологическом объекте элементарным актом передачи информации может считаться трансформация одного метаболита в другой, при этом с точки зрения процессов, предшествующих этому конкретному акту, и его последствий наличие каждой молекулы метаболита в составе живой системы индивидуально в экзистенциальном смысле, неповторимо по своей судьбе. Из этого следует, что состояние сложной системы может быть описано на основе суперпозиции численности ее экзистенциально индивидуализированных элементов, что и подтверждается теперь уже многочисленными метаболомными экспериментами, то есть наблюдением за динамикой метаболитного профиля – количественно охарактеризованного состава метаболитов, обнаруженных в исследуемой системе. Состояние метаболитной сети (биохимическое состояние) наиболее естественным образом описывается с помощью статистической модели с использованием метода главных компонент (МГК), поскольку в нем виртуальные координатные оси по сути представляют собой линейную комбинацию элементов наблюдаемого профиля, то есть относительных численностей отдельных метаболитов. В таких моделях хорошо прослеживаются временные тренды, соответствующие процессам развития системы [33]. В случае суперсистем (ценозов) наличие таких трендов демонстрирует системную целостность. Структура метаболомных данных могла бы служить интегральной характеристикой литобионтных сообществ и использоваться при их сравнительном анализе. Можно полагать, что описание системных изменений биопленок может быть основано на оценке поведения малых молекул, составляющих так называемую метаболитную сеть.

Задача настоящей работы состояла в выявлении закономерностей формирования биохимических состояний литобионтных сообществ (биопленок) на мраморе в карьере «Рускеала» на основе математической обработки многомерного массива аналитических данных, полученных в результате метаболомного анализа различных типов биопленок и первичных почв.

Материалы и методы

Для исследования был выбран карьер «Рускеала» в Северном Приладожье (Сортавальский район Республики Карелия), где мрамор добывался для облицовки зданий и сооружений Санкт-Петербурга. В настоящее время добыча мрамора здесь прекращена, а карьер представляет собой памятник горного дела. Он идеально подходит для изучения обрастаний природного мрамора в условиях низкой антропогенной нагрузки. На поверхности мрамора можно наблюдать различные формы биологической колонизации горной породы. Наблюдения за развитием биопленок в карьере «Рускеала», а также за типовыми формами обрастаний рускеальского мрамора в Санкт-Петербурге проводили с 2012 г. В данной статье основное внимание уделено биопленкам на карьере, где отбор проб проводился в осенний период 2015 г. Образцами

для исследования служили поверхностные наслоения определенного типа, формирующиеся на поверхности камня в местах его увлажнения.

Для метаболомного анализа пробы двукратно экстрагировали метанолом. Полученный экстракт объединяли и выпаривали при 40°C, сухой остаток растворяли в пиридине. Далее с использованием N,O-бис-(триметилсилил)трифторацетамида (BSTFA) получали триметилсилил-производные.

Анализ проводили методом газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС) на аналитическом комплексе Agilent с масс-селективным детектором 5975С (США), колонка HP-5MS, 30 м × 0,25 мм. Для хроматографии использовали линейное программирование температуры от 70°C до 320°C со скоростью 4°C/мин. Сбор данных осуществляли с помощью программного обеспечения Agilent ChemStation. Обработку и интерпретацию масс-спектрометрической информации проводили с использованием программы AMDIS и стандартной библиотеки NIST2005. Количественная интерпретация хроматограмм проводилась методом внутренней стандартизации по углеводороду C₂₃ с помощью программы UniChrom. Статистическая обработка результатов была выполнена в MS Excel с надстройкой Multibase 2015 (<http://www.numericaldynamics.com>).

Для микологических исследований проводили прямой посев фрагментов биопленок, частиц первичной почвы, фрагментов мхов и слоевищ лишайников, крошки разрушающегося мрамора с биологическими объектами на поверхность питательной среды в чашки Петри. В качестве питательной среды использовалась агаризованная среда Чапека-Докса. Численность микромицетов в пробах оценивалась с использованием метода почвенных разведений. При этом количество колониеобразующих единиц (КОЕ) определялось на 1 грамм субстрата [1].

Идентификацию грибов проводили с использованием общепринятых диагностических методов и определителей [9, 10, 17, 18]. Верификацию видов в соответствии с современной номенклатурой проводили с использованием электронной базы данных Index Fungorum (<http://www.indexfungorum.org/NAMES/NAMES.asp>).

Для идентификации цианобактерий осуществляли прямое микроскопирование проб после их отстаивания в дистиллированной воде в течение недели. Идентификацию видов проводили с использованием световой микроскопии (микроскоп Leica DM 1000). Для определения видового состава цианобактерий использовали определители [24, 25] и электронную базу данных AlgaeBase (<http://www.algaebase.org/>).

Результаты

На поверхности мрамора из рускеальского карьера было выявлено четыре основных типа наслоений: I – слизистая, пигментированная сросшаяся с камнем пленка, преимущественно оливкового цвета, может приобретать красноватый оттенок (рис. 1а); II – темные корковидные наслоения, плотно прилегающие к поверхности камня (рис. 1б); III – мягкие наслоения, включающие отдельные мхи и лишайники, не формирующие сплошной покров, начало образования первичной почвы (рис. 1в); IV – первичная почва с развитым моховым покровом (рис. 1г).

Для характеристики сообществ микроорганизмов в образцах, соответствующих перечисленным типам наслоений на мраморе, проведено изучение видового разнообразия цианобактерий, водорослей и грибов (табл. 1). При этом основное внимание уделяли выявлению доминирующих и часто встречающихся видов; подробное же описание всего видового разнообразия заслуживает специального исследования и выходит за рамки данной работы.

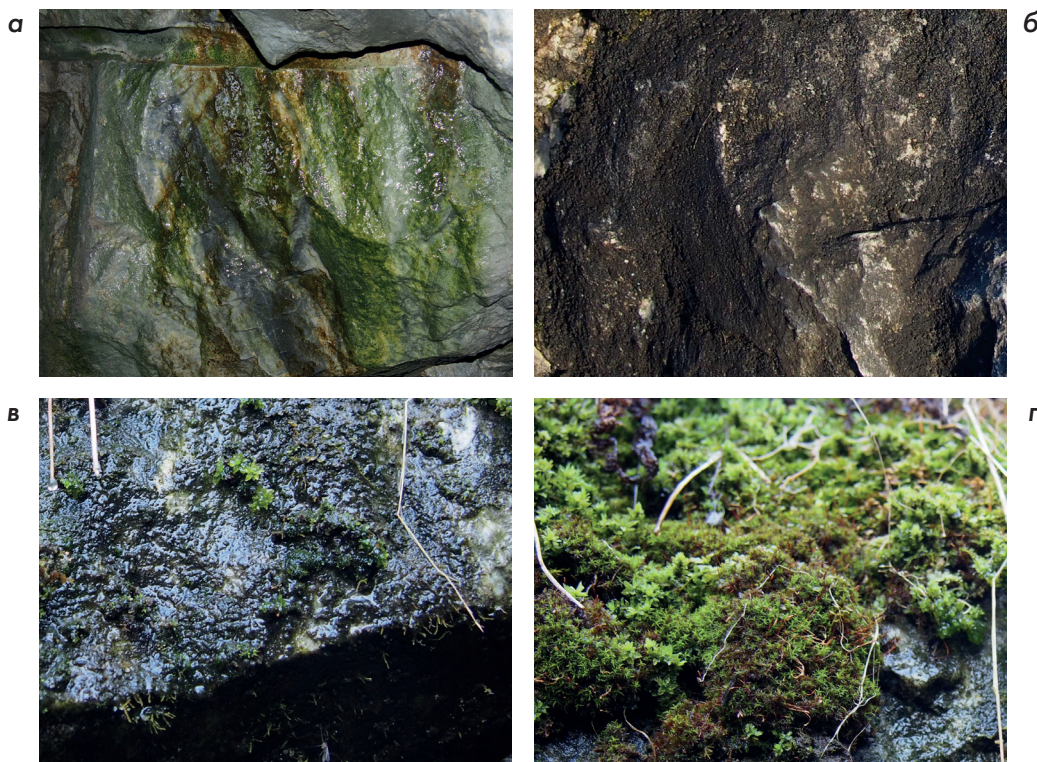


Рис. 1. Наслоения на поверхности мрамора из карьера «Рускеала»: а – слизистая, пигментированная, сросшаяся с камнем пленка, преимущественно оливкового цвета; б – темные корковидные наслоения, плотно прилегающие к поверхности камня; в – мягкие наслоения, включают отдельные мхи и лишайники; г – моховой покров, под которым формируется первичная почва

Разнообразие микроорганизмов в наслоениях на мраморе в карьере «Рускеала»

Тип наслоений	Микромицеты	Цианобактерии и водоросли
I. Слизистые пигментированные, срастающиеся с камнем	<p><i>Ascomycota:</i> <i>Penicillium citrinum</i> Thom <i>Penicillium decumbens</i> Thom <i>Pseudogymnoascus pannorum</i> (Link) Minnis & D.L. Lindner <i>Sarocladium strictum</i> (W. Gams) Summerb. <i>Trichocladium asperum</i> Harz <i>Trichoderma viride</i> Pers.</p>	<p><i>Cyanoprokaryota:</i> <i>Chroococcales:</i> <i>Chroococcus minutus</i> (Kützing) <i>Chroococcus turgidus</i> (Kütz.) Näg. <i>Chroococcus minor</i> (Kützing) Nägeli <i>Gloeocapsa punctata</i> Näg. ampl. Hollerb., Nageli <i>Gloeocapsopsis magma</i> (Brébisson) Komarék et Anagnostidis. <i>Gloeothece</i> sp. <i>Nostocales:</i> <i>Calothrix parietina</i> Thur. ex Born. & Flah. <i>Oscillatoriales:</i> <i>Phormidium puteale</i> (Montagne ex Gomont) Anagnostidis & Komárek <i>Synechococcales:</i> <i>Eucapsis</i> sp. <i>Leptolyngbya foveolarum</i> (Rabenhorst ex Gomont) Anagnostidis et Komarek <i>Synechocystis aquatilis</i> Sauv. <i>Charophyta:</i> <i>Zygnematales:</i> <i>Netrium</i> sp.</p>
II. Темные (почти черные) корковидные, сросшиеся с камнем	<p><i>Ascomycota:</i> <i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl. <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries <i>Cladosporium herbarum</i> (Pers.) Link <i>Epicoccum nigrum</i> Link <i>Fusarium oxysporum</i> Schldl. <i>Metarhizium marquandii</i> (Masse) Kepler, S.A. Rehner & Humber <i>Penicillium brevicompactum</i> Dierckx <i>Penicillium decumbens</i> Thom <i>Penicillium waksmanii</i> K.M. Zaleski <i>Polyscytalum fecundissimum</i> Riess <i>Trichoderma viride</i> Pers.</p>	<p><i>Cyanoprokaryota:</i> <i>Chroococcales:</i> <i>Chroococcus minor</i> (Kützing) Nägeli <i>Gloeocapsa alpina</i> Näg. Emend Brand <i>Gloeocapsa compacta</i> Kütz. <i>Gloeocapsa punctata</i> Näg. ampl. Hollerb., Nageli <i>Gloeocapsa</i> sp. <i>Gloeocapsopsis magma</i> (Brébisson) Komarék et Anagnostidis. <i>Gloeothece palea</i> (Kütz.) Rabenh. <i>Gloeothece</i> sp. <i>Nostocales:</i> <i>Anabaena</i> sp. <i>Calothrix parietina</i> Thur. ex Born. & Flah. <i>Oscillatoriales:</i> <i>Phormidium tergestinum</i> (Rabenhorst ex Gomont) Anagnostidis & Komárek <i>Synechococcales:</i> <i>Leptolyngbya foveolarum</i> (Rabenhorst ex Gomont) Anagnostidis et Komarek <i>Euglenophyta:</i> <i>Euglenales:</i> <i>Euglena</i> sp.</p>

<p>III. Мягкие наслоения, включают отдельные мхи и лишайники, не формирующие сплошной покров</p>	<p><i>Ascomycota:</i> <i>Acremonium potronii</i> Vuill. <i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl. <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries <i>Coniosporium sp.</i>, <i>Fusarium oxysporum</i> Schldtl. <i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc. <i>Metarhizium marquandii</i> (Masse) Kepler, S.A. Rehner & Humber <i>Penicillium brevicompactum</i> Dierckx <i>Penicillium decumbens</i> Thom <i>Penicillium oxalicum</i> Currie & Thom <i>Penicillium waksmanii</i> K.M. Zaleski <i>Pseudogymnoascus pannorum</i> (Link) Minnis & D.L. Lindner <i>Sarocladium strictum</i> (W. Gams) Summerb. <i>Scytalidium lignicola</i> Pesante <i>Trichoderma koningii</i> Oudem. <i>Trichoderma viride</i> Pers.</p> <p><i>Zygomycota:</i> <i>Mortierella lignicola</i> (G.W. Martin) W. Gams & R. Moreau</p>	<p><i>Cyanoprokaryota:</i> <i>Chroococcales:</i> <i>Chroococcus minor</i> (Kützing) Nägeli <i>Gloeocapsa punctata</i> Näg. ampl. Hollerb., Nageli <i>Gleothece palea</i> (Kütz.) Rabenh.</p> <p><i>Oscillatoriales:</i> <i>Phormidium papyraceum</i> (Ag.) Gom.</p> <p><i>Bacillariophyta:</i> <i>Cocconeidales:</i> <i>Cocconeis</i> sp.</p> <p><i>Mastogloiales:</i> <i>Achnanthe</i> sp.</p> <p><i>Naviculales:</i> <i>Diploneis</i> sp. <i>Navicula</i> sp. <i>Pinnularia</i> sp.</p> <p><i>Euglenophyta:</i> <i>Euglenales:</i> <i>Euglena</i> sp.</p> <p><i>Ochrophyta:</i> <i>Vaucheriales:</i> <i>Vaucheria</i> sp.</p>
<p>IV. Первичная почва с развитым моховым покровом</p>	<p><i>Ascomycota:</i> <i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl. <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries <i>Metarhizium marquandii</i> (Masse) Kepler, S.A. Rehner & Humber <i>Penicillium decumbens</i> Thom <i>Penicillium oxalicum</i> Currie & Thom <i>Penicillium roqueforti</i> Thom <i>Sarocladium strictum</i> (W. Gams) Summerb. <i>Scytalidium lignicola</i> Pesante <i>Trichoderma koningii</i> Oudem. <i>Trichoderma viride</i> Pers.</p> <p><i>Zygomycota:</i> <i>Mortierella lignicola</i> (G.W. Martin) W. Gams & R. Moreau</p>	<p><i>Cyanoprokaryota:</i> <i>Synechococcales:</i> <i>Synechocystis aquatilis</i> Sauv.</p> <p><i>Bacillariophyta</i> (единичные представители)</p>

Установлено, что в слизистых пигментированных пленках (тип I) доминируют цианобактерии при относительно низком обилии и видовом разнообразии грибов. В качестве доминанта биопленок первого типа определен вид *Calothrix parietina*, образующий характерные слизистые налеты на поверхности камня (трихомы одеты в чехлы и собраны в дерновинки, которые обильно покрываются слизью). Образованная цианобактериями слизь может служить источником питательных веществ для органотрофных микроорганизмов в литобионтном сообществе. В темных корковидных наслоениях (тип II) сохраняется большая доля цианобактерий. По сравнению с типом I, обильнее встречается *Gloeocapsopsis magma*, а также большее разнообразие цианобактерий из рода *Gloeocapsa*, в составе которого выявлено 4 вида (немногомикроариот). Доля грибов-микромикетов в наслоениях типа II заметно больше. Численность колониеобразующих единиц грибов (КОЕ) увеличивается (в сравнении с типом I) в среднем в 2,5 раза и составляет 4500 КОЕ в 1 грамме наслоений. В мягких наслоениях с отдельными мхами и лишайниками (тип III) заметно большее разнообразие микромикетов (идентифицировано 17 видов), тогда как их количественное содержание существенно не отличается от их содержания в пробах типа II. При этом сохраняется присутствие цианобактерий, появляются диатомовые и эвгленовые водоросли. Наконец, в первичных почвах под моховым покровом уже явно доминируют почвенные микромикетовые, тогда как цианобактерии и диатомовые водоросли встречаются единично. Среди грибов преобладают темноокрашенные формы, а также виды рода *Penicillium*, что типично для почв северных регионов. При этом численность микромикетов достигает 6500 КОЕ в 1 грамме первичной почвы.

Для метаболомного анализа было взято 14 проб (табл. 2). При отборе проб мы исходили из того, чтобы каждый тип наслоений был представлен не менее чем тремя образцами.

В результате метаболомного исследования в пробах было обнаружено более 200 различных соединений, среди которых идентифицированы: моно- ди- и трисахариды, карбоновые кислоты алифатического ряда (янтарная, треоновая, яблочная, малеиновая, хинная, глицериновая, эритроновая, глюконовая, фумаровая; жирные кислоты: пеларгоновая, каприновая, ундециловая, лауриновая, миристиновая, пальмитиновая, линолевая, олеиновая, стеариновая, арахидиновая, бегеновая, лигноцериновая, азе-

лаиновая), аминокислоты (аланин, глицин, пролин, треонин, оксипролин, фенилаланин, серин, лейцин, аспарагин, аспарагиновая кислота), полиолы (глицерин, эритрит, хиро-инозит, мио-инозит, арабит, ононит, дульцит), фенольные соединения (пирогаллол, бензойная кислота, 4-гидроксибензойная кислота, миндальная кислота, ванилин, орцинол, гидроксифенолы), дитерпены (абиетиновая кислота, фитол), стериды (кампомтерол, ситостерол), этаноламин, фосфат, глицеро-3-фосфат, мочевины.

На рис. 2 представлена тепловая карта количественного содержания идентифицированных соединений в пробах. Максимальная концентрация для каждого вещества принята за 1. Качественный состав и относительное содержание соединений в исследуемых образцах существенно варьировали, однако при этом наличие взаимосвязи между типом наслоений на мраморе и характером метаболомного спектра все же прослеживалось. Количество аминокислот было значительно выше в пробах наслоений первого типа (с доминированием цианобактерий) в сравнении с другими типами наслоений и первичной почвой. В целом, пробы биопленок на мраморе, относящиеся к типам II и III, характеризуются наименьшим разнообразием и количественным содержанием низкомолекулярных органических веществ. Это может объясняться относительно малым обилием фототрофных организмов, накоплением внеклеточных полимерных соединений, а также высоким содержанием минеральной фракции относительно суммарной биомассы организмов, что связано с процессами биогенного выветривания горных пород [22]. Количество полиолов было выше в пробе с наибольшим видовым разнообразием и количеством грибов, а в остальных пробах варьировало незначительно. Известно, что полиолы синтезируются и выполняют физиологические функции в растениях, но в большей степени они характерны для грибов, отчасти заменяя сахара [4]. Фенольные соединения и некоторые другие соединения вторичного метаболизма встречались в отдельных пробах без четко выраженной зависимости от типа сообщества.

Состояние метаболомной сети биопленок было смоделировано в виде траектории, изображающей точки в фазовом пространстве, которое построено в координатах, выражающих число молекул каждого структурного типа, обнаруженных в данный момент времени в пробе. Визуализация фазовой траектории построена с использованием метод главных компонент.

Табл. 2

Характеристика проб, отобранных для метаболомного исследования

Тип наслоений	Номера проб и варианты биопленок	Доминирующие группы микроорганизмов
I	1 – красно-коричневая	Цианобактерии
	2 – пурпурная	Цианобактерии
	3 – оливково-черная	Цианобактерии
II	4–6 – серо-черные или почти черные сухие	Цианобактерии, микромикетовые
III	7–11 – от зеленовато-оливковых до почти черных, легко отделяются от субстрата	Микромикетовые, цианобактерии, водоросли
IV	12–14 – первичная почва, содержащая фрагменты мхов и разрушенного мрамора	Микромикетовые

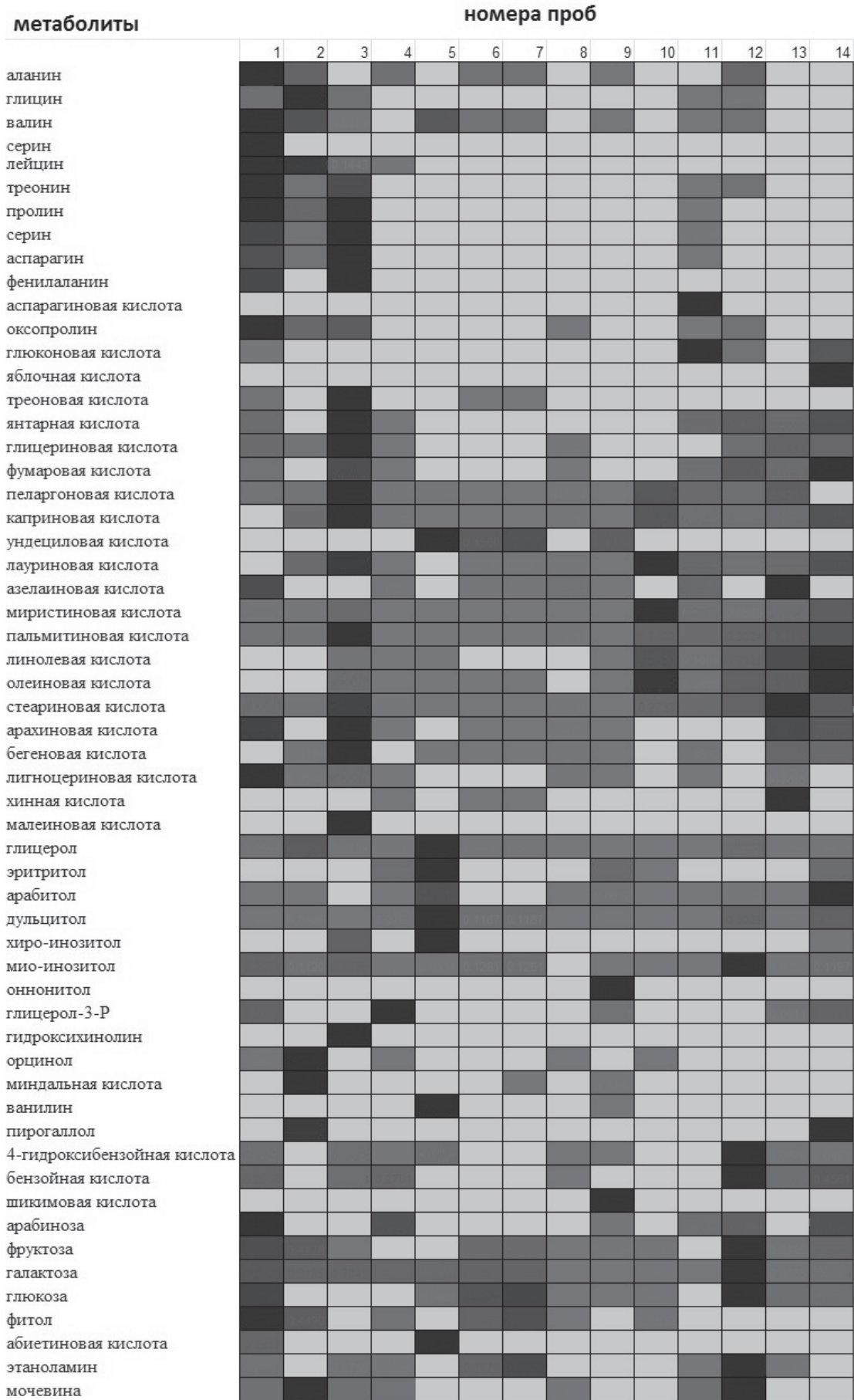
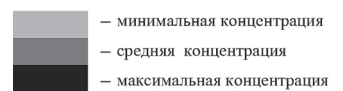


Рис. 2. Тепловая карта содержания идентифицированных соединений в пробах биопленок на поверхности мрамора карьера «Рускеала» (номера проб в таблице соответствуют номерам и описаниям, приведенным в табл. 2). Максимальная концентрация принята за 1



Полученная модель, представленная двумя главными компонентами (principal component, PC), объясняет 52% общей дисперсии (PC1 – 32,4%; PC2 – 19,6%). Результаты обработки данных показали, что точки, характеризующие биохимическое состояние проб, не просто группируются в пространстве координат в зависимости от типа наслоений, а формируют тренд, в котором выстраиваются последовательно от первого типа к четвертому, то есть от пигментированных пленок с доминированием цианобактерий к первичной почве с высшими растениями (рис. 3).

Обсуждение

Факт организации точек, характеризующих биохимическое состояние системы, в тренды был ранее выявлен нами для индивидуальных организмов – растений (*Arabidopsis thaliana* и *Syringa vulgaris*) и чистых культур грибов (*Flammulina velutipes* и *Lignomyces velutianus*) [33]. Смена биохимических состояний организмов при этом отражала этапы их онтогенеза.

В отличие от систем, представляющих целостный организм, биопленка является сообществом организмов, находящихся на разных стадиях онтогенеза. При этом онтогенез каждого конкретного организма сопровождается сменой его собственных биохимических состояний. Полученный в данном случае тренд показывает, что структура метаболомных данных может отражать системные изменения смены морфофункциональных состояний литобионтных сообществ, которые способны функционировать как единое целое.

Ранее на организованную структуру биопленок указывали результаты многочисленных исследований механизмов молекулярной сигнализации, ко-метаболизма, горизонтального переноса генов и других аспектов взаимодействий микроорганизмов в таких сообществах [7, 11, 31, 38]. Полученные нами данные, свидетельствующие о наличии метаболомных трендов в наслоениях 4 типов, указывают на возможность

использовать этот подход для выявления закономерностей формирования и развития литобионтных систем.

Образование биопленок – это сложный комплексный динамический процесс, состоящий из нескольких этапов. Считается, что формирование биопленок начинается с заселения субстрата фототрофными организмами (водорослями и цианобактериями). Рост гетеротрофных организмов (грибов и большинства бактерий) происходит, как правило, позже и обеспечивается за счет метаболитов других (автотрофных) организмов или органических веществ, поступающих из окружающей среды. Фототрофные организмы либо развиваются на поверхности камня, либо проникают на несколько миллиметров в глубь субстрата. Гифы грибов проникают глубже, что отчасти достигается за счет растворения минералов метаболитами, выделяемыми мицелием [34, 37]. По мере развития сообщества микроорганизмов, увеличения его биомассы и воздействия метаболитов грибов и бактерий на поверхность камня происходит выветривание горных пород и формирование первичной почвы [15, 20]. Результаты исследования разнообразия организмов в пробах, а также наблюдений за развитием биопленок на мраморе в карьере «Рускеала», проводимые в течение 4 лет, позволяют предположить, что описанные четыре типа наслоений на камне представляют собой этапы последовательной биологической колонизации горных пород и последующего первичного почвообразования. Результаты же обработки метаболомных данных показали наличие тренда, адекватного предполагаемой временной динамике развития биопленок и связанного с этим процесса выветривания горных пород и, таким образом, подтверждают сделанное предположение.

Обобщая результаты проведенного исследования, можно заключить, что метаболомные данные показывают системные различия морфофункциональных состояний литобионтных сообществ и спо-

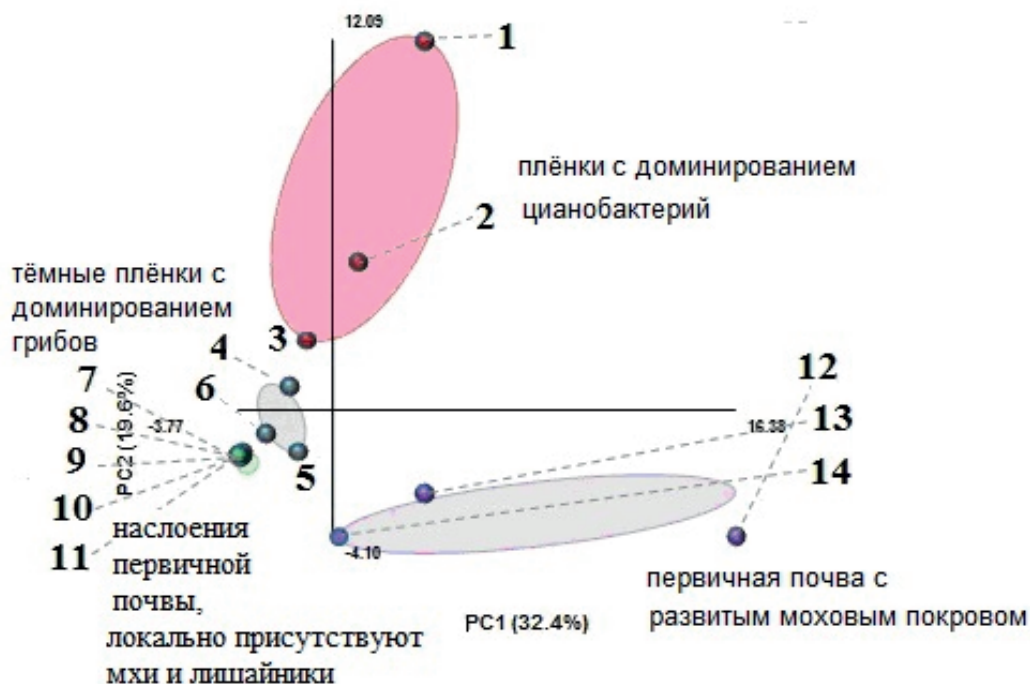


Рис. 3. Результаты анализа поверхностных наслоений на камне методом главных компонент (Principal Component Analysis, PCA). Номера на рисунке соответствуют номерам проб и описаниям в табл. 2

собны характеризовать временной тренд развития биообратаний горных пород. Кроме того, применение метаболического подхода открывает возможность выявления особенностей развития и биохимической активности литобионтных сообществ в различных экологических условиях, в том числе на урбанизированных территориях, что может быть полезным при

разработке мероприятий по борьбе с биоповреждениями в городской среде.

Работа выполнена в рамках плановых тем БИН РАН (01201255617 и 01201255607) при поддержке РФФИ (гранты 16-34-00725; 16-05-00986; 14-04-01795) и гранта СПбГУ 1.37.151.2014.

Литература

Список русскоязычной литературы

1. Литвинов МА. Методы изучения почвенных микроскопических грибов. Л.: Наука; 1969.

Общий список литературы/Reference List

1. Litvinov MA. Metody Izucheniya Pochvennykh Mikroskopicheskikh Gribov. Leningrad: Nauka; 1969. (In Russ.).

2. Berdoulay M, Salvado JC. Genetic characterization of microbial communities living at the surface of building stones. *Lett Appl Microbiol.* 2009;49:311-6.

3. Bertalanffy L. Das biologische Weltbild. Bern: Francke; 1949.

4. Bielecki RL. Sugar alcohols. In: Loewus FA, Tanner W, eds. *Plant Carbohydrates I: Intracellular Carbohydrates*, Encyclopedia of Plant Physiology, 13A. New York: Springer; 1982. p. 158-92.

5. Boonchan S, Britz ML, Stanley GA. Degradation and mineralization of high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66:1007-19.

6. Case RJ, Labbate M, Kjelleberg S. AHL-driven quorum-sensing circuits: their frequency and function among the Proteobacteria. *The ISME J.* 2008 (2):345-9.

7. Danese PN, Pratt LA, Kolter R. Biofilm formation as a developmental process. *Meth Enzymol.* 2001;336:19-26.

8. Ehrlich GD, Ahmed A, Earl J, Hiller NL, Costerton JW, Stoodley P, Post JC, DeMeo P, Hu FZ. The distributed genome hypothesis as a rubric for understanding evolution in situ during chronic bacterial biofilm infectious processes. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2010 (59):269-79.

9. Ellis MB. *Dematiaceae Hyphomycetes*. Kew, Surrey, UK: Commonwealth Mycological Institute; 1971.

10. Ellis MB. *More Dematiaceae Hyphomycetes*. Kew, Surrey, UK: Commonwealth Mycological Institute; 1976.

11. Gilbert P, Maira-Litran T, McBain AJ, Rickard AH, Whyte FW. The physiology and collective recalcitrance of microbial biofilm communities. *Adv Microb Physiol.* 2002;46:203-56.

12. Haesler F, Hagn A, Frommberger M, Hertkorn N, Schmitt-Kopplin P, Munch JC, Schloter M. In vitro antagonism of an actinobacterial *Kitasatospora* isolate against the plant pathogen

Phytophthora citricola as elucidated with ultrahigh resolution mass spectrometry. *J Microbiol Meth.* 2008;75:188-95.

13. Hallmann C, Stannek L, Fritzlar D, Hause-Reitner D, Fried T, Hoppert M. Molecular diversity of phototrophic biofilms on building stone. *FEMS Microbiol Ecol.* 2013;84:355-72.

14. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol.* 2004;2:95-108.

15. Hoffland E, Kuyper TW, Wallander H, Plassard C, Gorbushina AA, Haselwandter K, Holmström S, Landeweert R, Lundström US, Rosling A, Sen R, Smits MM, van Hees PAW, van Breemen N. The role of fungi in weathering. *Front Ecol Environ.* 2004;2(5):258-64.

16. Huang Y, Zeng Y, Yu Z, Zhang J, Feng H, Lin X. In silico and experimental methods revealed highly diverse bacteria with quorum sensing and aromatics biodegradation systems—a potential broad application on bioremediation. *Bioresour Technol.* 2013;(148):311-6.

17. De Hoog GS, Guarro J. *Atlas of clinical fungi*. Baarn: CBS; 1995.

18. De Hoog GS, Hermanides-Nijhof EJ. Survey of the black yeasts and allied fungi. *Stud Mycol.* 1977;15:178-223.

19. Jones OA, Sdepanian S, Lofts S, Svendsen C, Spurgeon DJ, Maguire ML, Griffin JL. Metabolomic analysis of soil communities can be used for pollution assessment. *Environ Toxicol Chem.* 2014;33(1):61-4.

20. Gadd GM. Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycol Res.* 2007;111:3-49.

21. Gorbushina AA, Lialikova NN, Vlasov DYu, Khizhniak TV. Microbial communities on the monuments of Moscow and St. Petersburg: biodiversity and trophic relations. *Mikrobiologiya.* 2002;71(3):409-17.

22. Grbić ML, Vukojević J, Simić GS, Krizmanić J, Stupar M. Biofilm forming cyanobacteria, algae and fungi on two historic monuments in Belgrade, Serbia. *Arch Bio Sci.* 2010;62(3):625-31.

23. Keshari N, Prasad S, Biofouling A. Characterization of cyanobacteria isolated from biofilms on stone monuments at Santiniketan, India. *Biofouling: J Bioadhesion Biofilm Res.* 2013;29(5):525-36.

24. Komárek J, Anagnostidis K. Cyanoprokaryota. 1. Teil. Part: Chroococcales. Berlin: Spektrum, 1998.

25. Komárek J, Anagnostidis K, Cyanoprokaryota. 2. Teil. Part: Oscillatoriales. Berlin: Spektrum, 2005.

26. Ma H, Bryers JD. Non-invasive determination of conjugative transfer of plasmids bearing antibiotic-resistance genes in biofilm-bound bacteria: effects of substrate loading and antibiotic selection. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013;(97): 317-28.

27. Ortega-Morales BO, Lopez-Corttes A, Ndez-Duque GH, Crassous P, Guezennec J. Extracellular Polymers of Microbial Communities Colonizing Ancient Limestone Monuments. *Meth Enzymol.* 2001;336:331-9.

28. Paul C, Barofsky A, Vidoudez C, Pohnert G. Diatom exudates influence metabolism and cell growth of co-cultured diatom species. *Mar Ecol Prog Ser.* 2009;389:61-70.

29. Peiris D, Dunn WB, Brown M, Kell DB, Roy I, Hedger JN. Metabolite profiles of interacting mycelial fronts differ for pairings of the wood decay basidiomycete fungus *Stereum hirsutum* with its competitors *Coprinus micaceus* and *Coprinus disseminatus*. *Metabolomics.* 2008;4:52-62.

30. Prieto B, Silva B, Lantes O. Biofilm quantification on stone surfaces: comparison of various methods. *Sci Total Environ.* 2004;333:1-7.

31. Ren D, Madsen JS, Sørensen SJ, Burmølle M. High prevalence of biofilm synergy among bacterial soil isolates in co-cultures indicates bacterial interspecific cooperation. *ISME J.* 2015;9(1):81-9.

32. Sardans J, Penuelas J, Rivas A. Ecological metabolomics: overview of current developments and future challenges. *Ubach Chemoecology.* 2011;21:191-225.

33. 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.

34. Suihko LM, Alakomi LH, Gorbushina AA, Fortune I, Marquardt J, Saarela M. Characterization of aerobic bacterial and fungal Microbiota on surfaces of historic scottish monuments. *Syst Appl Microbiol.* 2007;30:494-508.

35. Sutherland IW. The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol.* 2001;9:222-7.

36. Viant MR. Metabolomics of aquatic organisms: the new 'omics' on the block. *Mar Ecol Prog Ser.* 2007;332:301-6.

37. Warscheid T, Braams J. Biodeterioration of stone: a review. *Int Biodeter Biodegr.* 2000;46: 343-68.

38. Zhang B, Powers R. Analysis of bacterial biofilms using NMR-based metabolomics. *Future Med Chem.* 2012;4(10):1273-306.

