

УДК 631.48

Метаболомный профайлинг почв хроносерии подзолов песчаного карьера

К.В. Сазанова, Е.В. Абакумов, Д.Ю. Власов

ФГБОУ Санкт-Петербургский государственный университет,
199034, г. Санкт-Петербург,
Университетская наб. д.7-9

Аннотация:

Выполнен метаболомный профайлинг почвенных проб из хроносерии Малуксинского карьера по добыче песка. Проведено исследование почв из 5 разрезов: 1—2 года, свежий песчаный литострат без признаков зарастания и почвообразования, стадия самозарастания 15—20 лет с формирующимся сосняком и дерново-подбуром, стадия самозарастания 30—35 лет с эмбриоподзолом, стадия самозарастания 70 лет со сформированным подзолом и фоновая почва соснового леса вблизи карьера. Хроносерии почв являются перспективными модельными объектами, в которых процесс почвовосстановления можно наблюдать в развитии в рамках определенных временных промежутков. Пробы почв двукратно экстрагировали метанолом. Анализ метанольных экстрактов почвы выполняли с помощью метода ГХ-МС. Статистическая обработка результатов была выполнена с помощью методов мультивариантной статистики. В метаболомном профиле были выявлены аминокислоты, жирные кислоты, органические кислота цикла Кребса, полиолы, сахара, стерины, дитерпены, фенольные соединения. Результаты показали, что изученные пробы значительно различаются по содержанию низкомолекулярных органических веществ. Как правило, наибольшим структурным разнообразием малых молекул отличались пробы верхнего горизонта. Молекулярное разнообразие достигалось главным образом за счет вторичных метаболитов растений, скорее всего, вымываемых из подстилки и опада высших растений. Профили нижележащих горизонтов в большей степени схожи. В песчаных отвалах количество органических веществ было очень низким и метаболомные профили всех горизонтов отличались мало. Полученные результаты расширяют представление о биохимическом составе почв, вносят вклад в понимание процессов педогенеза и структуры метаболитной сети почв.

Ключевые слова: почвы, карьеры, метаболом, хроносерия подзолов.

Metabolomic profiling of soils of chronoserries of podzols of a sand quarry

K.V. Sazanova, E.V. Abakumov, D.Yu. Vlasov

FGBOU St. Petersburg State University,
199034, St. Petersburg,
University Emb. d.7-9

Abstract:

Metabolic profiling of soil samples from the chrono-series of the Maluksinsky quarry was carried out: 1-2 years old, fresh sand lithostrata with no signs of overgrowing and soil formation, the stage of self-overgrowing 15–20 years with emerging pine-tree and sod-podbur, the stage of self-overgrowing 30–35 years with embryo podzol, the stage of self-overgrowing 70 years with formed podzol and pine forest background soil near the quarry. Soil chronoserries are promising model objects in which the process of soil restoration can be observed in development within certain time intervals. Analysis of methanol extracts of the soil was performed using the GC-MS method. Metabolic profiling of soil samples from the chrono-series of the Maluksinsky quarry was carried out. Amino acids, fatty acids, organic acids of the Krebs cycle, polyols, sugars, sterols, diterpenes, and phenolic compounds were identified in the metabolic profile. The results showed the samples significantly differ in the content of low molecular weight organic substances. The greatest structural diversity of small molecules was found in samples from the upper horizon. Molecular diversity was achieved mainly due to the secondary plant metabolites are likely to leach out of the litter and higher plants. The profiles of the underlying horizons are more similar. In the sand dumps, the amount of organic matter was very low and the metabolic profiles of all horizons differed little. The obtained results expand the understanding of the biochemical composition of the soil, contribute to the understanding of the processes of pedogenesis and the structure of the metabolite network of soils.

Keywords: soil, quarry, metabolol, chrono-series of podzols.

Введение

Изучение процесса почвообразования является актуальной задачей, как с точки зрения изучения эволюции почв, так и в плане разработки методов возобновления почвенных ресурсов (рекультивации). Педогенез представляет собой комплексный процесс взаимодействия абиотических и биотических факторов, при этом вклад последних является существенным и зависит от функционирования почвенного микробиома и трансформации продуктов

метаболизма в почвенной среде. Значительная часть органического вещества в составе почв представлена малыми органическими молекулами, являющимися продуктами метаболизма растений и микроорганизмов. В настоящее время появляется всё больше данных, указывающих на возможность характеризовать сообщество малых органических молекул в почве как единую метаболитную сеть. Однако о структуре и динамике метаболитной сети почв известно очень мало [4, 6].

Для изучения процессов относительно быстрой эволюции почв принципиально при анализе почвы как биологического объекта использовать простые модельные системы, в которых можно максимально дискретно выявить последовательные стадии почвообразования и связанные с ними изменения в составе микробиома и метаболома.

В этом отношении перспективными модельными объектами являются хроносерию почв, в которых процесс почвовосстановления можно наблюдать в развитии в рамках определенных временных промежутков. В данном исследовании проведена попытка метаболомного анализа классической хроносерию, основные данные по которой опубликованы ранее [1-3].

Материалы и методы

В качестве хорошей верифицированной хроносерию выбраны почвы Малуксинского карьера по добыче песка (рис. 1), изучены следующие объекты: 1—2 года, свежий песчаный литострат без признаков зарастания и почвообразования М1 (С1-С2-С3), стадия самозарастания 15—20 лет с формирующимся сосняком и дерново-подбуром М2 (О-АУ-ВФ-С), стадия самозарастания 30—35 лет с эмбриоподзолом М3 (О-(е)-ВФ-С), стадия самозарастания 70 лет со сформированным подзолом М4 (О1-О2-Е-ВНФ-ВС-С) и фоновая почва соснового леса вблизи карьера М5 (О-Е-ВФ-С)

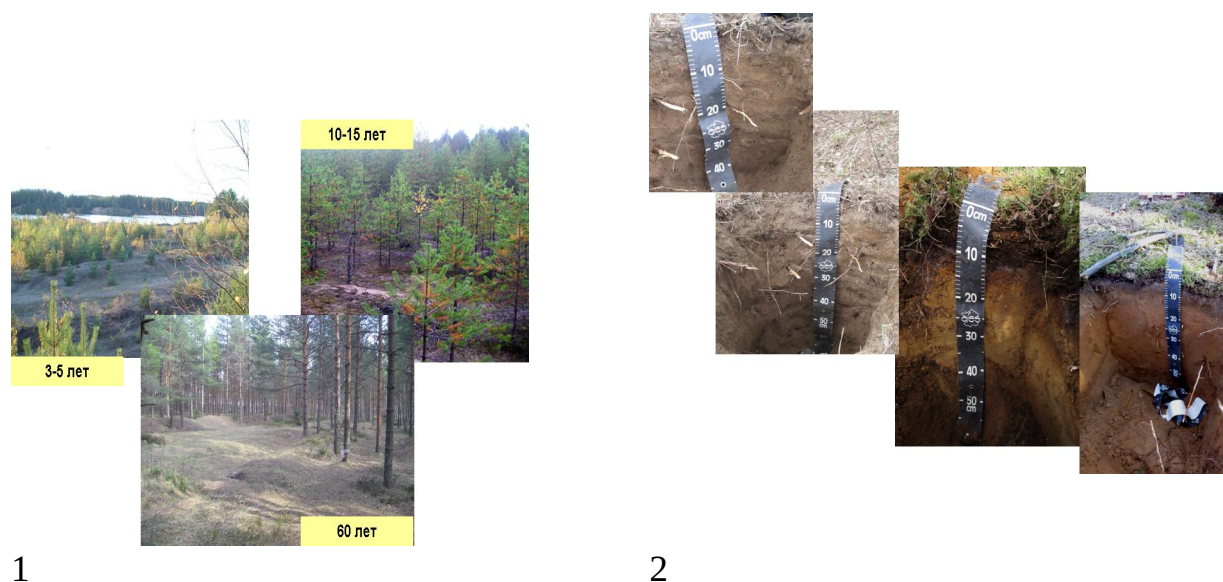


Рис.1 - Самозарастание отвалов (1) и развитие почв (2) на территории Малуксинского карьера

Классические метаболические параметры определены согласно [5]. Проведено метаболомное исследование почв из 5 разрезов. 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 ТМС (триметилсилил)-производные. Анализ проводили методом газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС) на приборе Agilent с масс-селективным детектором 5975С (США), колонка HP-5MS, 30м X 0,25 мм. Хроматографирование вели при линейном программировании температуры от 70°C до 320°C со скоростью 4°C/мин. Сбор данных осуществляли с помощью программного обеспечения Agilent ChemStation. Обработку и интерпретация 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 с помощью методов мультивариантной статистики (МГК-анализ) с использованием программы OriginPro 2017.

Результаты и обсуждение

Метаболический коэффициент (рис. 2) сначала увеличивается, а затем, после 30 лет, снижается, что свидетельствует об увеличении эффективности использования органического вещества микроорганизмами. При этом увеличивается содержание микробной биомассы в верхнем горизонте до 30 лет – самой активной стадии начального преобразования субстрата, и затем снижается по мере формирования подзолистого профиля. В хроносерии резко увеличивается содержание общего содержания органического углерода в верхнем оподзоленном органоминеральном горизонте. В связи с накоплением органического вещества с возрастом резко увеличивается кислотность мелкозема почв.

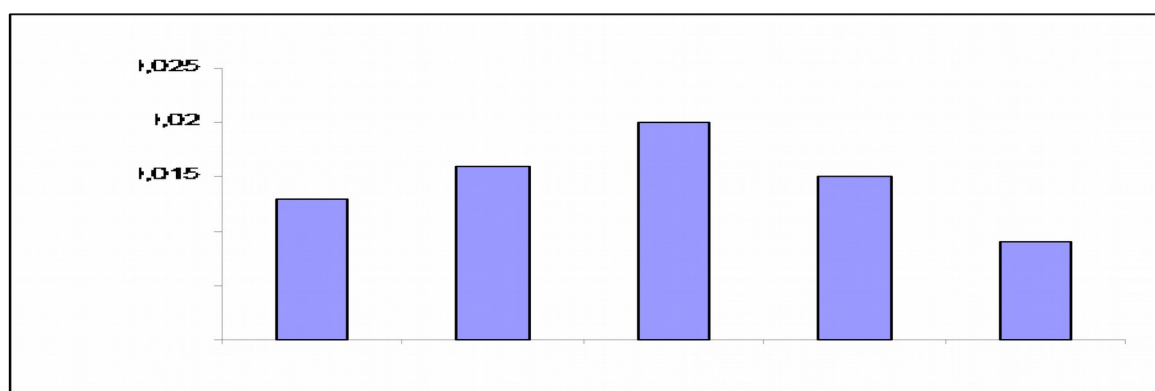


Рис. 2 – Метаболический коэффициент в разновозрастных почвах хроносерии

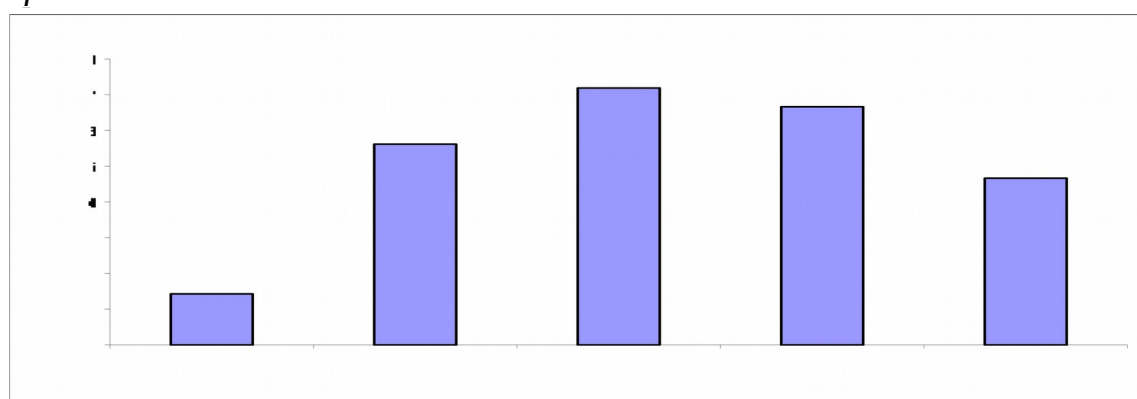


Рис. 3 – Содержание углерода микробной биомассы в разновозрастных почвах хроносерии

Проведённый метаболомный анализ почвенных проб из хроносерии Малуксинского карьера показал, что изученные пробы значительно

различаются по содержанию низкомолекулярных органических веществ (таблица 1). Так, все пробы, отобранные в точке 1 (песчаные отвалы, возрастом 1,5-2 года) характеризовались невысоким структурным разнообразием малых молекул и общим низким содержанием низкомолекулярных органических веществ. В профиле проб начальной стадии почвообразования 1 (0—5 см), 1 (5—10 см), 1 (10—20 см), 1 (20—30 см) доминировали жирные кислоты. Всего было обнаружено около 50 пиков, среди которых идентифицировано более 30. Во всех пробах, отобранных в данной точке, в следовых количествах присутствовали органические кислоты, сахара, стеринны и полиолы.

Состав малых молекул в пробах, отобранных в почве 10—15 летнего возраста (стадия самозаращения 15—20 лет с формирующимся сосняком и дерново-подбуром М2), значительно отличался. Наиболее значимые отличия имела проба верхнего горизонта (0—5 см). Молекулярный состав данной пробы был наиболее разнообразен. Метаболомный профиль её содержал моно-, ди- и трисахариды, карбоновые кислоты, аминокислоты, полиолы, дитерпены, стеринны, фосфат, глицерол-3-Р. Доминирующими соединениями являлись сахара и жирные кислоты. Общее содержание органических веществ более, чем в 100 раз превышало их содержание в составе экстрактов проб более глубоких слоёв почвы (0,5—10 см). Пробы, отобранные на глубине 0,5—10 см практически не содержали сахаров. В сравнении с пробами, отобранными в точке 1, состав жирных кислот практически не менялся, увеличивалась содержание стериннов и полиолов (в пробе, отобранной на глубине 10—20 см, было отмечено высокое содержание глицерола, а в пробе с глубины 0,5—4 см – циклического сахароспирта пинитола). Особенно высокое содержание в пробах 2 (0,5—4 см) и 2 (10 см) было характерно для неидентифицированного соединения (M/z 484; RI 2438).

В почве 30 летнего возраста, как и в точке 15 летнего возраста, наибольшим структурным разнообразием малых молекул отличались пробы верхнего горизонта. В гумусовом горизонте 30 летней почвы были обнаружены более 100 соединений, среди которых были идентифицированы карбоновые кислоты алифатического ряда, в том числе кислоты цикла Кребса, аминокислоты, сахарокислоты, жирные кислоты, полиолы, моно- и дисахара, циклические кислоты (шикимовая кислота, хинная кислота, кумаровая кислота, феруловая кислота), флавоноиды (катехины, изорамнетин), терпены (в том числе абиетиновая кислота и фитол), стеринны. Профили нижележащих горизонтов этой почвы (3—4 см и 50—70 см) были в значительной степени схожи. В отличие от проб, отобранных в точках 1 и 2 в данных пробах общее качественное содержание низкомолекулярных органических веществ, особенно фенольных соединений, было выше.

Метаболомные профили пробы верхних горизонтов 70 летнего подзола (0—5 и 5—9 см) были представлены, главным образом моно, ди- и трисахаридами, жирными кислотами и полиолами. Причем в слое 0—5 см количество моносахаров было значительно выше, чем в горизонте 5—9 см, а количество стеринов ниже. Доминирующими соединениями являлись сахара и жирные кислоты. Метаболомные профили проб иллювиального горизонта содержали, главным образом, жирные кислоты и стерины, а также следовые количества глицерола и кислот цикла Кребса.

Метаболомный профиль пробы в верхнем горизонте фоновой почвы содержал высокие (относительно проб нижних горизонтов) концентрации сахаров, кислот цикла Кребса и жирных кислот. Также были идентифицированы аминокислоты, полиолы, и стерины. Нижние горизонты содержали преимущественно жирные и следовые количества сахаров, полиолов стеринов и дитерпенов.

Глицероновая кислота			+												+	+							
Глицерол					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Сорбитод	+	+		+	+				+	+			+	+				+				+	+
Арабитол									+						+	+				+			
Мио-инозитол			+		+	+		+	+						+				+	+			
Эритритол	+	+		+															+				
Алло-инозитол			+																+				
Хиро-инозитол					+	+				+													
Манноза	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+	+					+		+
Глюкоза					+				+		+		+	+	+	+				+		+	+
Галактоза					+				+											+			
Фруктоза					+				+						+	+				+			
Сахароза					+				+						+								
Трегалоза					+																		
Стигмастерол	+	+	+	+		+	+												+	+	+		
Кампостерол	+	+	+		+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Холестерол	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+		+	+				+	+	+	+	+	+
Эргостерол					+		+																
Ситостерол									+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Фукостерол																		+					

Статистический анализ, выполненный методом главных компонент (рис 4), показал, что точки, характеризующие биохимическое состояние проб, группируются в пространстве координат в зависимости от места сбора, а также от глубины залегания почвенного слоя. Все пробы, отобранные в точке М1 формируют единый кластер (в песчаных отвалах количество органических веществ было очень низким и метаболомные профили горизонтов отличались мало). Для остальных точек отбора проб характерно обособление верхних горизонтов и формирование единого кластера более глубоких горизонтов.

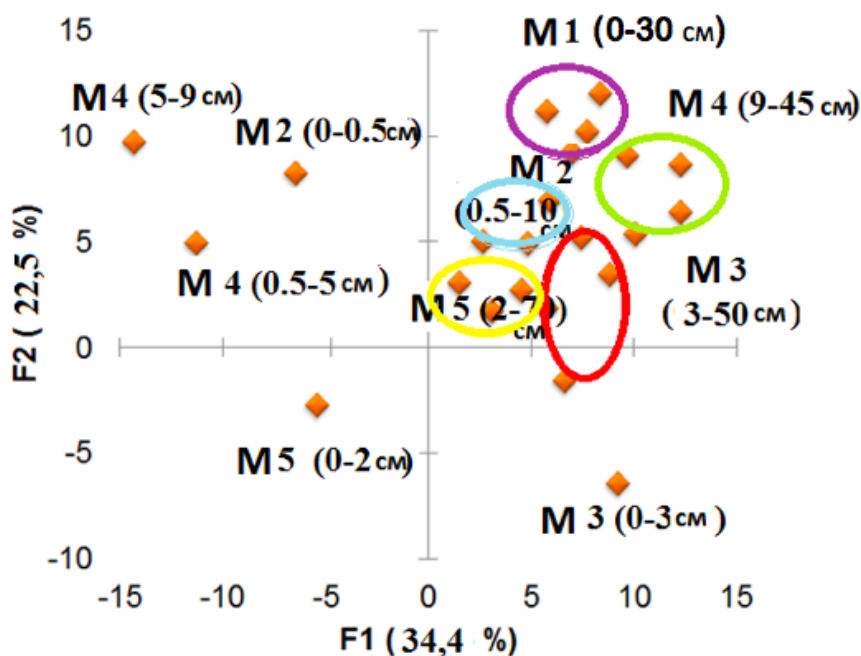


Рис. 4 – МГК-анализ разновозрастных почв хроносерии

Выводы

Данные метаболомного анализа свидетельствуют о том, что верхние горизонты почв характеризуются значительно большим структурным разнообразием малых органических молекул, чем нижележащие слои почв. Профили нижележащих горизонтов этой почвы в большей степени схожи. Статистический анализ данных показал, что точки, характеризующие биохимическое состояние проб, группируются в пространстве координат главных компонент в зависимости от места сбора, а также от глубины залегания почвенного слоя. При этом отличия поверхностного слоя от других слоёв почвы вносят значительно больший вклад в кластеризацию данных, чем место отбора проб.

Работа выполнена при поддержке РНФ, грант № 17-16-01030

Литература

1. Abakumov E.V. Accumulation and transformation of organic matter in different-aged dumps from sand quarries // Eurasian Soil Science. 2008. № 41. pp. 844-851.
2. Abakumov E.V. Elemental composition and structural features of humic substances in young podzols developed on sand quarry dumps // Eurasian Soil Science. Eurasian Soil Science. V. 42 № 6. pp. 616-622.
3. Abakumov E., Trubetskoj O., Demin D., Celi L., Cerli C., Trubetskaya O. Humic acid characteristics in podzol soil chronosequence // Chemistry and Ecology. 2010. № 26. pp. 59-66.
4. Swenson T. L., Jenkins S., Bowen B. P., Northen T. R. Untargeted soil metabolomics methods for analysis of extractable organic matter // Soil Biology and Biochemistry. 2015. № 80. pp 189-198.
5. Jenkinson D.S., Ladd J.N. Microbial biomass in soil: measurement and turnover // Soil Biochemistry. 1981. № 5. pp 415–471.
6. Jenkins S., Swenson T.L., Lau R., Rocha A. M., Aaring A., Hazen T. C., Chakraborty R., Northen T. R. Construction of Viable Soil Defined Media Using Quantitative Metabolomics Analysis of Soil Metabolites // Front Microbiol. 2017. № 8. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5744445/>