

УДК 631.417.2:631.445.24

**МЕТАБОЛОМИКА ЛЕСНЫХ ЭКОСИСТЕМ:
ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ***

© 2016 г. Н. В. Лукина¹, М. А. Орлова¹, И. В. Перминова², В. С. Хусаинова¹,
Д. Н. Воробьева¹, Н. А. Артемкина³

¹Центр по проблемам экологии и продуктивности лесов РАН
117997 Москва, ул. Профсоюзная, д. 84/32
E-mail: lukina@cepl.rssi.ru

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет
119991 Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 3, ГСП-1

³Институт проблем промышленной экологии Севера Кольского научного центра РАН
184209 Мурманская обл., г. Апатиты, Академгородок, д.14а

Поступила в редакцию 19.04.2016 г.

Дан литературный обзор, посвященный перспективам развития экометаболомики, направленной на исследование метаболитов и метаболомов компонентов экосистем и их динамики в связи с изменениями окружающей среды. В статье анализируются существующие подходы, методы, современные задачи. Особое внимание уделено характеристике современных методов нетаргетной (нецелевой, или обзорной) метаболомики, таких как спектроскопия ядерного магнитного резонанса и масс-спектрометрия инно-циклотронного резонанса с преобразованием Фурье. Для развития лесной метаболомики наряду с необходимостью решения общих для этой области науки проблем совершенствования инструментального анализа, подходов к обработке и интерпретации данных необходимо решение специфических задач. К ним относится выбор методов отбора образцов и извлечения метаболитов из почвенных экстрактов, почвенных, кроновых и стволовых вод. Очевидно, что исследования метаболома почв и почвенных вод связаны с изучением почвенного органического вещества, гумуса. Экстракты из лесных почв и почвенные воды являются информативной матрицей для характеристики метаболома лесных экосистем в целом, поскольку они отражают многочисленные взаимодействия биотических и абиотических компонентов. В экстрактах из почв и в почвенных водах содержатся метаболиты, поступающие из экссудатов растений, вымываемые из их надземных и подземных частей, образующиеся при переработке подстилки почвенной биотой, т.е. практически все вещества, выделяемые биотой в окружающую среду в ответ на любые воздействия как природного, так и антропогенного характера. Это открывает новые перспективы и дает возможность оценить не только воздействие окружающей среды на лесные экосистемы, но и воздействие лесной биоты на окружающую среду. Для сбора образцов атмосферных выпадений и почвенных вод целесообразно использование сорбционных коллекторов/лизиметров, но в этом случае встает непростой вопрос о выборе сорбента. Необходимы систематические исследования по влиянию выбора сорбентов на молекулярный состав выделяемых веществ. Метаболомика лесных экосистем находится в процессе становления, выделяясь в новое направление науки. Оценки метаболомов лесных экосистем позволят получать новые знания о биогеохимических циклах, почвенных процессах, а также о трофических связях и глобальных изменениях.

Экометаболомика, методы, лесные экосистемы, проблемы, перспективы.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 16-17-10284).

ОБЩИЕ ПОНЯТИЯ И ТЕРМИНЫ

Развитие современных аналитических технологий, таких как спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР), высокоэффективная жидкостная хроматография и газовая хроматография с масс-спектрометрическим окончанием, масс-спектрометрия ионно-циклотронного резонанса с преобразованием Фурье (МС ИЦРПФ), а также биоинформатика произвели революцию в возможностях молекулярного анализа биологических систем. Появились новые области исследований, так называемые “омики”: геномика, транскриптомика, протеомика, метаболомика и т.п.

Метаболомика – общий термин для определения научной области, целью которой является характеристика пула низкомолекулярных органических метаболитов, выделяемых живыми организмами в ответ на воздействия/раздражитель (Hernandez-Soriano, Jimenez-Lopez, 2014). К важнейшим компонентам метаболома относят углеводы, аминокислоты, органические кислоты, липиды и жирные кислоты, витамины и различные классы природных соединений, таких как фенилпропаноиды, терпеноиды, алкалоиды, глюкоиналаты и др. Количественные и качественные оценки состава клеточных метаболитов позволяют охарактеризовать биохимический статус организма. Компоненты метаболома рассматривают как конечные продукты экспрессии генов, которые определяют биохимические фенотипы клетки, тканей и целого организма (Sumner et al., 2003). Метаболомика, в отличие от транскриптомики и протеомики, позволяет давать прямые оценки фенотипического ответа (Fiehn et al., 2000). Если при исследовании транскриптома возрастание количества мРНК не всегда соответствует возрастанию количества белка, а при исследовании протеома исследуемые белки могут быть ферментативно не активны (Sumner et al., 2003), то метаболиты всегда выполняют определенную функцию в клетке и организме, и, соответственно, могут рассматриваться как конечный этап экспрессии. Поэтому метаболом может быть использован для мониторинга и оценки функции генов.

Метаболомика направлена на анализ полного метабололического профиля, т.е. всех метаболитов, которые продуцируются живыми организмами. История метаболомики берет начало от метабололического профилирования. Первые метабололические профили были построены в конце 60-х годов прошлого столетия (Horning E., Horning M., 1970) и включали многокомпонентный анализ белков, кислот и метаболитов лекарственных препаратов в моче методом ГХ-МС (газовая хроматография

с масс-спектрометрией). Тем же авторам принадлежит и сам термин “метабололический профиль”, под которым понимают качественный и количественный состав сложных смесей физиологического происхождения. С этого времени анализ метаболитов стал использоваться в медицине для мониторинга, диагностики и оценки здоровья человека. В начале 80-х годов прошлого века появились метабололические профили, полученные с помощью методов ВЭЖХ-МС (высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрией) и спектроскопии ЯМР (Bales et al., 1984; Nicholson et al., 1984).

Недавно появилось новое направление в метаболомике – “экометабономика”, целью которой является анализ метаболома и метаболитов компонентов экосистем и их динамики в условиях изменения окружающей среды (Sardans et al., 2011, 2012). Тем самым экометабономика представляет собой мощный инструмент оценки фенотипической изменчивости генотипа в ответ на воздействие различных факторов окружающей среды, таких как: засуха (Fumagalli et al., 2009), уровень доступности элементов питания (Hirai et al., 2004, 2005), засоление (Fumagalli et al., 2009), варьирование температуры (Michaud, Delinger, 2007), биотические взаимодействия (Choi et al., 2006), а также антропогенное загрязнение. Например, были обнаружены изменения в составе и концентрации метаболитов у представителей различных популяций одного вида (Davey et al., 2008).

Сдвиги в метаболомах биоты в связи с изменением условий окружающей среды отражаются на уровне элементного состава, поскольку углерод, азот, фосфор, сера и др. являются конституционными элементами всех компонентов метаболома. Экометабономика связана с геномикой, транскриптомикой, экологической стехиометрией, биологией сообществ и биогеохимией. Изменения в метаболоме влияют на структуру пищевых сетей, экологические ниши, биогеохимические циклы. Экометаболические исследования позволяют давать оценки воздействия изменения климата на метаболом компонентов экосистем.

МЕТОДЫ МЕТАБОЛОМИКИ

Главной проблемой метаболомики в настоящий момент является невозможность построения полного метабололического профиля из-за огромного химического разнообразия компонентов метаболома и ограниченными возможностями используемых инструментов. В отличие от генома и транскриптома, состоящих из линейных полимеров четырех нуклеотидов, и протеома, состоя-

щего из 22 первичных аминокислот, метаболом включает в себя огромное число компонентов различной химической природы, таких как белки, аминокислоты, низко- и высокомолекулярные органические кислоты, жиры, углеводы, фенилпропаноиды, терпеноиды, алкалоиды, глюкоксиналаты и др. По имеющимся оценкам представители растительного царства могут содержать от 100 000 до 200 000 различных метаболитов (Fiehn et al., 2001; Oksman-Caldentey, Inzé, 2004), а другие эукариоты – от 4000 до 20 000 (Fernie et al., 2004). Ни один существующий метод или комплекс методов анализа не способен провести количественный анализ всех этих компонентов в одном образце, однако результаты, получаемые на данном этапе развития технологий, способны дать ответы на множество вопросов.

Различают таргетную (целевую) и нетаргетную (нецелевую) метаболомику. В первом случае предполагается количественный анализ ограниченного числа известных веществ – биомаркеров. Нетаргетная метаболомика – это обзорный анализ всех метаболитов, включая неизвестные, поэтому такой анализ не может быть количественным по отношению ко всем метаболитам сразу (Гончаров и др., 2015). В настоящее время не существует единственного аналитического метода или комбинации методов для определения всех метаболитов в конкретном образце. ГХ-МС, ВЭЖХ-МС, спектроскопия ЯМР представляют собой методы определения широкого ряда метаболитов. Метод ГХ-МС является особенно важным для изучения летучих органических соединений (Degen et al., 2004; Ozawa et al., 2008; Llusia et al., 2010). Однако многие метаболиты представляют собой нелетучие соединения, поэтому необходима их дериватизация перед проведением ГХ-МС (Gullberg et al., 2004). При этом следует подчеркнуть, что методы ГХ-МС с квадрупольным или времяпролетным масс-спектрометрическим окончанием хотя и требуют предварительной дериватизации, превосходят другие методы по чувствительности и воспроизводимости и отличаются простотой интерпретации масс-спектров метаболитов (Chorell et al., 2009).

Метод ВЭЖХ-МС особенно важен для единовременной регистрации продуктов различных путей метаболизма, поскольку, например, метаболизм растений включает широкий диапазон семиполярных соединений, в том числе ключевые группы вторичных метаболитов, которые лучше всего определяются и детектируются с использованием именно этого метода (Allwood, Goodacre, 2009). Отличительной особенностью ВЭЖХ является использование сорбентов с размером зерен

3–10 мкм, что обеспечивает быстрый массоперенос при очень высокой эффективности разделения. Важнейшее преимущество ВЭЖХ по сравнению с газовой хроматографией заключается в возможности исследования практически любых растворимых объектов без ограничений по температуре кипения или молекулярной массе. Кроме того, мягкость условий ВЭЖХ (почти все разделения можно проводить при комнатных температурах) делает ее методом, особенно пригодным, а зачастую единственным для исследования лабильных соединений. Преимуществом ВЭЖХ является большой диапазон молекулярных масс определяемых веществ, высокая эффективность разделения и скорость анализа. Наконец, чувствительность, достигаемая в ВЭЖХ, позволяет определять микроколичества веществ в сложных смесях. Метод ВЭЖХ-МС более чувствителен к низкомолекулярным (до 3000 Да) метаболитам, позволяет определять пептиды и нуклеозиды, но имеет ограничения в определении ряда низкомолекулярных соединений, например, жирных кислот.

Спектроскопия ЯМР, и в первую очередь, протонного магнитного резонанса (ПМР), является мощным инструментом для нетаргетного анализа. Преимущество этого метода в том, что он может применяться для определения полярных, семиполярных и неполярных метаболитов. Особым достоинством ПМР является пропорциональность интенсивности сигнала числу присутствующих протонов с различным химическим окружением (Lewis et al., 2007). Наиболее полно перспективы использования спектроскопии ЯМР для исследования почвенного органического вещества на молекулярном уровне изложены в обзоре (Feng, Simpson, 2011; Simpson et al., 2012).

Таким образом, метод ГХ-МС целесообразно выбирать для определения классов соединений, относящихся к первичным метаболитам (аминокислоты, жирные кислоты, сахара) или летучих соединений. Метод ВЭЖХ-МС применим для определения всего биохимического разнообразия, включая семиполярные группы вторичных метаболитов. Его предпочтительно использовать для определения лабильных соединений, находящихся в смесях в низкой концентрации. Преимущества спектроскопии ЯМР – простота пробоподготовки, доступность интерпретации спектра, а также высокая производительность. Недостатки этого метода – низкая чувствительность, в связи с чем он может быть использован только для определения метаболитов с высокой концентрацией. Поэтому наиболее успешно методы ЯМР можно применять в сочетании с другими подходами, например, с ГХ-МС и ВЭЖХ-МС для определения

биомаркеров. Применение такого комплексного подхода позволяет проводить детальный мониторинг молекулярных изменений, происходящий с органическим веществом под воздействием различных внешних факторов (потепление, увеличение содержания углекислого газа в атмосфере, таяние вечной мерзлоты и др.).

Рассмотрение всех указанных методов показывает их ограниченность для исследования сложных полимолекулярных систем, таких как почвенный метаболит. Поэтому переломными моментами в данной области можно считать 1974 г., когда М. Comisarow и А. Marshall (1974) сообщили о создании масс-спектрометрического метода высокого разрешения – масс-спектрометрии ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье (МС ИЦРПФ), и 1997 г. – год опубликования первой работы об ионизации природного органического вещества при помощи электрораспыления, позволяющего проводить неразрушающую ионизацию органических веществ (McIntyre et al., 1997). Уникальной особенностью МС ИЦРПФ является беспрецедентно высокая разрешающая способность, позволяющая определять массы ионов до шестого знака после запятой (Marshall et al., 1998). Применение этого мощного спектрального метода показало присутствие в составе одного образца органического вещества почв и вод сотен тысяч молекулярных стехиометрий, которым соответствуют миллионы атомов углерода с уникальным химическим окружением (Hertkorn et al., 2013). Тем самым впервые появилась возможность экспериментально наблюдать химическое разнообразие органического вещества на молекулярном уровне (Hertkorn et al., 2008). Так, в 2003 г. появилась первая публикация по идентификации молекулярных формул гуминовых веществ (Stenson et al., 2003). С тех пор наблюдается неуклонный рост числа публикаций, посвященных этой тематике, и к настоящему времени согласно базе данных “Web of Science” оно достигло 425, причем наиболее активный его рост наблюдается в последние десять лет: среднее число публикаций за 2005–2015 гг. составляет не менее 20, а в 2015 г. оно достигло 50. Особо следует отметить недавний обзор, в котором приводятся последние достижения МС ИЦРПФ в области петролеомики (Cho et al., 2015), а также монографию по использованию масс-спектрометрии для анализа объектов окружающей среды, в которой отдельный раздел (глава 19) посвящен МС ИЦРПФ (Лебедев, 2013).

Еще одна группа методов масс-спектрометрии с десорбционной ионизацией (DIMS) обеспечивают быстрое (2 минуты на образец) распознавание

метаболитов (Allwood, Goodacre, 2009), что дает большие возможности для первоначального скрининга материала образца перед более затратными и длительными хроматографическими исследованиями с масс-спектрометрическим окончанием. DIMS также можно использовать с масс-анализатором ИЦРПФ. Этому и другим мягким методам ионизации на воздухе, которые имеют наибольшее значение для экосистемной метаболомики, посвящена обзорная публикация (Лебедев, 2015). В целом следует отметить, что несмотря на впечатляющие успехи масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения, ее существенным ограничением является невозможность идентификации структурных изомеров метаболитов с одинаковой молекулярной массой.

Таким образом, выбор метода анализа для конкретного исследования – сложная задача, поскольку приходится выбирать между скоростью анализа, селективностью и чувствительностью, учитывая свойства анализируемых метаболитов.

Помимо совершенствования различных методов анализа, важнейшим направлением развития метаболомики в настоящее время является поиск новых подходов к обработке и интерпретации данных, в том числе расширение существующих и создание новых баз данных метаболитов (Waagele et al., 2012). Значительную часть исследований в этой области составляют работы по таргетной метаболомике, отвечающей на конкретные вопросы в рамках определенной гипотезы. Работ по нетаргетной метаболомике гораздо меньше (Sevin, 2015), хотя их число растет и будет увеличиваться по мере развития методологии, поскольку нетаргетная метаболомика – мощный и комплексный инструмент оценки состояния организма и экосистемы в целом (Hertkorn et al., 2013). Однако о полном анализе метаболома инструментами нецелевой метаболомики говорить рано, поскольку пока анализируется лишь его малая часть. D. Sevin (2015) привел удачное сравнение современного состояния дел в экометаболомике с бутылочным горлышком, которое создается ограничениями аналитических технологий, трудностями обработки данных, сложностью интерпретации результатов и постановки гипотезы, что снижает информационную насыщенность полученных результатов.

ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ЛЕСНОЙ МЕТАБОЛОМИКИ

Развитие экометаболомики связано не только с совершенствованием инструментальных возможностей, но и с постановкой масштабных задач оценки метаболома отдельных компонентов

(растений, животных, микроорганизмов, почв, почвенных вод, атмосферных осадков в лесу) и экосистем в целом. Очевидно, что исследования метаболома почв и почвенных вод непосредственно связаны с изучением гумус-органического вещества почвы, представленного совокупностью специфических и неспецифических гуминовых веществ (Орлов, 1990). По своей химической природе гуминовые вещества представляют собой супрамолекулярную систему макро-, олиго- и низкомолекулярных компонентов (Перминова, 2008; Schaumann 2006). При этом есть сторонники того, что гуминовые вещества – это система исключительно низкомолекулярных компонентов (< 2000 Да) (Burdon, 2001; Piccolo, 2001; Simpson et al., 2002). Однако такие воззрения могут быть справедливы для водорастворимых компонентов гуминовых веществ (Nebbioso, Piccolo, 2013), но не могут относиться ко всему пулу гуминового вещества почв: это противоречит данным по растворимости и свойствам почвенных гуминовых веществ (Swift, 1999).

Анализ немногочисленных работ по метаболомике почв показывает, что большая часть исследований включает изучение микроорганизмов, культивируемых из почвенных вытяжек, и почвенных животных (главным образом, червей) (Rochfort et al., 2009). Появились работы по оценке влияния загрязнения почв тяжелыми металлами и органическими загрязнителями на метаболом модельных видов почвенной биоты методом определения биомаркеров стресса, в основном представленных аминокислотами, моно- и дисахаридами, липидами, жирными кислотами и фенолами (Hernandez-Soriano, Jimenez-Lopez, 2014). Показано, что загрязнение почвы непосредственно влияет на важнейшие процессы в живых организмах, такие как гликолиз, цикл Кребса и метаболизм аминокислот, и снижает синтез соответствующих метаболитов. Еще одним важным индикатором неблагоприятного воздействия может служить состояние липидного метаболизма, который весьма чувствителен к загрязнению окружающей среды (Lankadurai et al., 2011). Лишь несколько относительно недавних работ характеризуют метаболиты экстрактов из почвенных образцов и почвенных вод. Известны работы, направленные на оценку азотсодержащих метаболитов в почвенных водах (Warren, 2013). Показано, что пул небольших молекул органического азота в почвенных водах более разнообразен, чем предполагали ранее, и в нем не обязательно доминируют белковые и небелковые аминокислоты. Изучение пула органических молекул азота в почвенных растворах позволи-

ло продемонстрировать, что растения способны поглощать не только минеральные, но и органические соединения азота, такие как аминокислоты и пептиды (Chapin et al., 1993; Jones, Darragh, 1993; Warren, 2006; Soper et al., 2011). Известна работа, посвященная изучению метаболитов почв на рудниках США (Jones et al., 2014). Показано, что метаболитические профили образцов меняются в зависимости от типа загрязнения.

Какие же барьеры необходимо преодолеть для успешного развития лесной экометаболомики? Наряду с необходимостью решения общих для метаболомики проблем совершенствования инструментов анализа, подходов к обработке и интерпретации данных, развития методологии нетаргетной (обзорной) метаболомики встают специфические задачи, которые необходимо решить для оценки метаболомов почв, почвенных вод, ствольных и кроновых вод. К таким специфическим задачам относится выбор экстрагентов для почвенных образцов. Так, экстракты из почвенных образцов в работе, посвященной изучению метаболитов почв на рудниках США (Jones et al., 2014), получали с использованием смеси метанол – хлороформ – вода, растворяли водную фракцию в D₂O и анализировали методом ЯМР. В сравнительном исследовании метаболома сельскохозяйственных и ненарушенных почв Австралии использовали метанол как растворитель, что позволило проанализировать больше неполярных метаболитов с применением метода ЯМР (Rochfort et al., 2009). Следует подчеркнуть, что использование указанных растворителей приводит к со-экстракции метаболомов почвенных организмов.

Для анализа метаболомов ствольных, кроновых и почвенных вод существенной проблемой является выбор метода отбора образцов, поскольку сбор вод в обычные пластиковые бутылки с опробованием один раз в две – четыре недели неприемлем из-за трансформации метаболома микроорганизмами. Целесообразно использование сорбционных коллекторов/лизиметров, но в этом случае встает непростой вопрос о выборе сорбента.

В 1959 г. профессором И.С. Кауричевым и Е.М. Ноздруновой был разработан метод сорбционных лизиметров, который применялся для учета миграции водорастворимого органического вещества и Fe-органических соединений в почвах. В качестве сорбентов использовали оксид алюминия и ионообменные смолы. Профессор И.М. Яшин при изучении компонентного состава и свойств водорастворимого органического

вещества (ВОВ) в таежных почвах Карелии, Архангельской и Московской областей усовершенствовал аналитическую схему N.G.C. Forsyth (1947). Модификация проведена на основе исследования кинетики, статики и динамики сорбции основных компонентов ВОВ, обладающих кислотными свойствами, на низкозольном активированном угле марки “карболен”, осветляющем и высокозольном березовом активированном угле, оксиде алюминия и ионообменных смолах (Яшин, 1993, 2013; Яшин и др., 2011). Совсем недавно коллективом авторов (Жеребкер и др., 2016) был дан анализ использования сорбентов для извлечения гуминовых веществ из природных вод, в том числе с учетом результатов исследований известных советских и российских ученых: Г.М. Варшал с соавт. (1993), Г.В. Славинской с соавт. (1981, 2001), П.Н. Линника с соавт. (2004) и других работ. Показано, что эффективным методом извлечения является твердофазная экстракция на ионообменных и/или макропористых сорбентах. Степень извлечения гуминовых веществ максимальна при использовании макропористых анионитов, однако они обладают большим недостатком – существенной необратимостью сорбции, минимальной для целлюлозных сорбентов. Авторы проведенного анализа обращают внимание на неионогенные макроситовые сорбенты, применяемые в настоящее время для выделения гуминовых веществ – Amberlite XAD-8, а также картриджи для твердофазной экстракции Bond Elut (картриджи PPL). Полученные препараты гуминовых веществ анализируются методами не-таргетной метаболомики – МС ИЦР ПФ и спектроскопии ПМР. Авторы отмечают отсутствие систематических исследований по влиянию выбора сорбентов на молекулярный состав выделяемых препаратов растворенного органического вещества и гуминовых веществ. Они показали зависимость молекулярного состава препарата растворенного органического вещества арктических рек от типа сорбента (Perminova et al., 2014). Этими же авторами показано, что препарат гуминовых веществ высокоцветного озера Приокско-Террасного государственного природного заповедника, выделенный на смоле XAD-8 и проанализированный с использованием МС ИЦРПФ, имеет более ароматический и окисленный характер по сравнению с препаратом, полученным с использованием картриджа PPL, отличающимся более высоким содержанием алифатических и азотсодержащих компонентов (Жеребкер и др., 2016). Тем самым адекватный выбор сорбентов для оценки метаболомов кроновых, стволовых и почвенных вод требует проведения специальных исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, экстракты из лесных почв и почвенные воды лесов, так же как атмосферные осадки в лесу, наряду с метаболомами живых организмов, являются информативной матрицей для характеристики метаболома лесных экосистем в целом, поскольку они отражают многочисленные взаимодействия биотических и абиотических компонентов. В экстрактах из почв и в почвенных водах содержатся метаболиты, поступающие из экссудатов растений, вымываемые из их надземных и подземных частей, образующиеся при переработке подстилки почвенной биотой – т.е. практически все вещества, выделяемые биотой в окружающую среду в ответ на любые воздействия как естественного, так и антропогенного характера. Это открывает новые перспективы и дает возможность оценить влияние не только окружающей среды на лесные экосистемы, но и лесной биоты на окружающую среду.

Метаболомика лесных экосистем находится в процессе становления, выделяясь в новое направление науки. Оценки метаболомов лесных экосистем позволят получать новые знания о биогеохимических циклах, почвенных процессах, а также о трофических связях и глобальных изменениях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Варшал Г.М., Велюханова Т.К., Коцеева И.Я. Гуминовые вещества в биосфере. М.: Наука, 1993. 97 с.
- Гончаров Н.В., Уколов А.И., Орлова Т.И., Мигаловская Е.Д., Войтенко Н.Г. Метаболомика на пути интеграции биохимии, аналитической химии, информатики // Успехи современной биологии. 2015. Т. 135. № 1. С. 3–17.
- Жеребкер А.Я., Перминова И.В., Константинов А.И., Воликов А.Б., Костюкевич Ю.И., Кононихин А.С., Николаев Е.Н. Выделение гуминовых веществ из пресных вод на твердофазных картриджах и их исследование методом масс-спектрометрии ионно-циклотронного резонанса с преобразованием Фурье // Журнал аналитической химии. 2016. Т. 71. № 4. С. 390–396.
- Лебедев А.Т. Масс спектрометрия для анализа объектов окружающей среды. М.: Техносфера, 2013. 632 с.
- Лебедев А.Т. Масс-спектрометрия с ионизацией на воздухе // Успехи химии. 2015. Т. 84. Вып. 7. С. 665–692.
- Линник П.Н., Васильчук Т.А., Линник Р.П. Гумусовые вещества природных вод и их значение для водных экосистем (обзор) // Гидробиологический журнал. 2004. Т. 40. № 1. С. 81–107.

- Орлов Д. С. Гумусовые кислоты почв и общая теория гумификации. М.: Изд-во Моск. университета, 1990. 325 с.
- Перминова И. В. Гуминовые вещества – вызов химикам XXI века // Химия и жизнь. 2008. № 1. С. 26–31.
- Славинская Г. В., Кузнецова Н. С., Зеленова Л. А. Удаление органических веществ из природных вод // Теория и практика сорбционных процессов. 1981. № 4. С. 93.
- Славинская Г. В., Селеменев В. Ф. Фульвокислоты природных вод. Воронеж: Изд-во Воронеж. университета, 2001. 165 с.
- Яшин И. М. Водорастворимые органические вещества почв таежной зоны и их экологические функции. Автореф. дисс. ... д-ра биол. наук (03.00.27). М.: Моск. сельхоз академия, 1993. 32 с.
- Яшин И. М. Мониторинг процессов миграции и трансформации веществ в почвах. М.: Российский гос. аграрн. университет – Московская сельхоз. академия, 2013. 183 с.
- Яшин И. М. Сорбция и десорбция органических веществ почвы активированным углем и “безводной” окисью алюминия // Известия Сельхоз. академии им. К. А. Тимирязева. 1972. Вып. 6. С. 123–129.
- Яшин И. М., Петухова А. А., Грачев Д. А. Экологические аспекты глее- и подзолообразования в экосистемах тайги // Известия Сельхоз. академии им. К. А. Тимирязева. 2011. № 5. С. 13–26.
- Allwood J. W., Goodacre R. An introduction to liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation applied in plant metabolomic analyses // Phytochemical Analysis: PCA. 2009. V. 21. N 1. P. 33–47.
- Alvarez-Puebla R. A., Goulet P. J. G., Garrido J. J. Characterization of the porous structure of different humic // Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 2005. V. 256. P. 129–135.
- Bales J. R., Higham D. P., Howe I., Nicholson J. K., Sadler P. J. Use of high-resolution proton nuclear magnetic resonance spectroscopy for rapid multi-component analysis of urine // Clinical chemistry. 1984. V. 30. N 3. P. 426–432.
- Burdon J. Are the traditional concepts of the structures of humic substances realistic? // Soil Science. 2001. V. 166. N 11. P. 752–769.
- Chapin F. S., Moilanen L., Kielland K. Preferential use of organic nitrogen for growth by a non-mycorrhizal arctic sedge // Nature. 1993. V. 361. P. 150–153.
- Cho Y., Ahmed A., Islam A., Kim S. Developments in FT-ICR MS instrumentation, ionization techniques, and data interpretation methods for petroleomics. // Mass Spectrometry Reviews. 2015. V. 34. P. 248–263.
- Choi Y., Kim H., Linthorst H., Hollander J., Lefeber A., Erkelens C., Verpoorte R. NMR Metabolomics to Revisit the Tobacco Mosaic Virus Infection in *Nicotiana tabacum* Leaves // Journal of Natural Products. 2006. V. 69. N 5. P. 742–748.
- Chorell E., Moritz T., Branth S., Antti H., Svensson M. B. Predictive metabolomics evaluation of nutrition-modulated metabolic stress responses in human blood serum during the early recovery phase of strenuous physical exercise // Journal of Proteome Research. 2009. V. 8. N 6. P. 2966–2977.
- Comisarow M. B., Marshall A. G. Fourier-transform ion-cyclotron resonance spectroscopy // Chemical Physics Letter. 1974. V. 25. P. 282–283.
- Davey M. P., Burrell M. M., Woodward F. I., Quick W. P. Population-specific metabolic phenotypes of *Arabidopsis lyrata* ssp. *petraea* // New Phytologist. 2008. V. 177. N 2. P. 380–388.
- Degen T., Dillmann C., Marion-Poll F., Turlings T. C. High genetic variability of herbivore-induced volatile emission within a broad range of maize inbred lines // Plant Physiology. 2004. V. 135. № 4. P. 1928–1938.
- Feng X., Simpson M. J. Molecular-level methods for monitoring soil organic matter responses to global climate change // Journal of Environmental Monitoring. 2011. V. 13. N 5. P. 1246–1254.
- Fernie A. R., Trethewey R. N., Krotzky A. J., Willmitzer L. Metabolite profiling: from diagnostics to systems biology // Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2004. V. 5. N 9. P. 763–769.
- Fiehn O., Kloska S., Altmann T. Integrated studies on plant biology using multiparallel techniques // Current Opinion in Biotechnology. 2001. V. 12. N 1. P. 82–86.
- Fiehn O., Kopka J., Dörmann P., Altmann T., Trethewey R. N., Willmitzer L. Metabolite profiling for plant functional genomics // Nature Biotechnology. 2000. V. 18. N 11. P. 1157–1161.
- Forsyth W. G. C. Studies on the more soluble complexes of soil organic matter: 1. A method of fractionation // Biochemical Journal. 1947. V. 41. N 2. P. 176.
- Fumagalli E., Baldoni E., Abbruscato P., Piffanelli P., Genga A., Lamanna R., Consonni R. NMR techniques coupled with multivariate statistical analysis: tools to analyse *Oryza sativa* metabolic content under stress conditions // Journal of Agronomy & Crop Science. 2009. V. 195. N 2. P. 77–88.
- Gullberg J., Jonsson P., Nordström A., Sjöström M., Moritz T. Design of experiments: an efficient strategy to identify factors influencing extraction and derivatization of *Arabidopsis thaliana* samples in metabolomic studies with gas chromatography/mass spectrometry // Analytical Biochemistry. 2004. V. 331. N 2. P. 283–295.
- Hernandez-Soriano M. C., Jimenez-Lopez J. C. Metabolomics for Soil Contamination Assessment / Environmental Risk Assessment of Soil Contamination. Dr. Maria C. Hernandez Soriano (Ed.). InTech, 2014. DOI: 10.5772/58294. Available from: <http://www.intechopen.com/books/environmental-risk-assessment-of-soil-contamination/metabolomics-for-soil-contamination-assessment>

- Hertkorn N., Frommberger M., Witt M., Koch B.P., Schmitt-Kopplin P., Perdue E.M. Natural organic matter and the event horizon of mass spectrometry // *Analytical Chemistry*. 2008. V. 80. P. 8908–8919.
- Hertkorn N., Harir M., Koch B.P., Michalke B., Schmitt-Kopplin P. High-field NMR spectroscopy and FTICR mass spectrometry: powerful discovery tools for the molecular level characterization of marine dissolved organic matter. // *Biogeosciences*. 2013. V. 10. P. 1583–1624.
- Hirai M.Y., Klein M., Fujikawa Y., Yano M., Goodenowe D.B., Yamazaki Y., Sakurai N. Elucidation of gene-to-gene and metabolite-to-gene networks in *Arabidopsis* by integration of metabolomics and transcriptomics // *Journal of Biological Chemistry*. 2005. V. 280. N 27. P. 25590–25595.
- Hirai M.Y., Yano M., Goodenowe D.B., Kanaya S., Kimura T., Awazuwara M., Saito K. Integration of transcriptomics and metabolomics for understanding of global responses to nutritional stresses in *Arabidopsis thaliana* // *Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America*. 2004. V. 101. N 27. P. 10205–10210.
- Horning E.C., Horning M.G. Metabolic profiles: chromatographic methods for isolation and characterization of a variety of metabolites in man // *Methods in Medical Research*. 1970. V. 12. P. 369.
- Jones D.L., Darrah P.R. Re-sorption of organic compounds by roots of *Zea mays* L. and its consequences in the rhizosphere // *Plant & Soil*. 1993. V. 153. N 1. P. 47–59.
- Jones O.A.H., Sdepanian S., Loftis S., Svendsen C., Spurgeon D.J., Maguire M.L., Griffin J.L. Metabolomic analysis of soil communities can be used for pollution assessment // *Environmental Toxicology & Chemistry*. 2014. V. 33. N 1. P. 61–64.
- Lankadurai B.P., Wolfe D.M., Simpson A.J., Simpson M.J. 1 H NMR-based metabolomics of time-dependent responses of *Eisenia fetida* to sub-lethal phenanthrene exposure // *Environmental Pollution*. 2011. V. 159. N 10. P. 2845–2851.
- Lewis I.A., Schommer S.C., Hodis B., Robb K.A., Tonelli M., Westler W.M., Markley J.L. Method for determining molar concentrations of metabolites in complex solutions from two-dimensional 1H-13C NMR spectra // *Analytical Chemistry*. 2007. V. 79. N 24. P. 9385–9390.
- Llusia J., Penuelas J., Sardans J., Owen S.M., Niinemets U. Measurement of volatile terpene emissions in 70 dominant vascular plant species in Hawaii: aliens emit more than natives // *Global Ecology & Biogeography*. 2010. V. 19. N 6. P. 863–874.
- Marshall A.G., Hendrickson C.L., Jackson G.S. Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry: A Primer // *Mass Spectrometry Reviews*. 1998. V. 17. P. 1–35.
- McIntyre C., Batts B.D., Jardine D.R. Electrospray mass spectrometry of groundwater organic acids // *Journal of Mass Spectrometry*. 1997. V. 32. P. 328–330.
- Michaud M.R., Delinger D.L. Shifts in the carbohydrate, polyol, and amino acid pools during rapid cold-hardening and diapause-associated cold-hardening in flesh flies (*Sarcophaga crassipalpis*): a metabolomic comparison // *Journal of Comparative Physiology B*. 2007. V. 177. N 7. P. 753–763.
- Nebbioso A., Piccolo A. Molecular characterization of dissolved organic matter (DOM): a critical review // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2013. V. 405. N 1. P. 109–124.
- Nicholson J.K., O'Flynn M.P., Sadler P.J., Macleod A.F., Juul S.M., Sönksen P.H. Proton-nuclear-magnetic-resonance studies of serum, plasma and urine from fasting normal and diabetic subjects // *Biochemistry Journal*. 1984. V. 217. P. 365–375.
- Oksman-Caldentey K.M., Inzé D. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites // *Trends in Plant Science*. 2004. V. 9. N 9. P. 433–440.
- Ozawa R., Shiojiri K., Sabelis M.W., Takabayashi J. Maize plants sprayed with either jasmonic acid or its precursor, methyl linolenate, attract armyworm parasitoids, but the composition of attractants differs // *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 2008. V. 129. N 2. P. 189–199.
- Perminova I.V., Dubinenkov I.V., Kononikhin A.S., Konstantinov A.I., Zhrebker A.Y., Andzhushev M.A., Lebedev V.A., Bulygina E., Holmes R.M., Kostyukovich Y.I., Popov I.A., Nikolaev E.N. Molecular mapping of sorbent selectivities with respect to isolation of arctic dissolved organic matter as measured by fourier transform mass spectrometry // *Environmental Science & Technology*. 2014. V. 48. N 13. P. 7461–7468.
- Piccolo A. The supramolecular structure of humic substances // *Soil Science*. 2001. V. 166. N 11. P. 810–832.
- Rochfort S.J., Ezernieks V., Yen A.L. NMR-based metabolomics using earthworms as potential indicators for soil health // *Metabolomics*. 2009. V. 5. N 1. P. 95–107.
- Sardans J., Penuelas J., Rivas-Ubach A. Ecological metabolomics: overview of current developments and future challenges // *Chemoecology*. 2011. V. 21. N 4. P. 191–225.
- Sardans J., Rivas-Ubach A., Peñuelas J. The elemental stoichiometry of aquatic and terrestrial ecosystems and its relationships with organismic lifestyle and ecosystem structure and function: a review and perspectives // *Bio-geochemistry*. 2012. V. 111. N 1–3. P. 1–39.
- Schaumann G.E. Soil organic matter beyond molecular structure I. Macromolecular and supramolecular characteristics // *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 2006. V. 169. P. 145–156.
- Sevin D.C., Kuehne A., Zamboni N., Sauer U. Biological insights through nontargeted metabolomics // *Current Opinion in Biotechnology*. 2015. V. 34. P. 1–8.
- Simpson A.J., Kingery W.L., Hayes M.H.B., Spraul M., Humpfer E., Dvortsak P., Kerssbaum R., Godejohann M., Hofmann M. Molecular structures and associations of hu-

mic substances in the terrestrial environment // *Naturwissenschaften*. 2002. V. 89. N 2. P. 84–88.

Simpson A.J., Simpson M.J., Soong R. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and its key role in environmental research // *Environmental Science & Technology*, 2012. V. 46. N 21. P. 11488–11496.

Soper F.M., Paungfoo-Lonhienne C., Brackin R., Rentsch D., Schmidt S., Robinson N. Arabidopsis and *Lobelia anceps* access small peptides as a nitrogen source for growth // *Functional Plant Biology*. 2011. V. 38. N 10. P. 788–796.

Stenson A., Marshall A.G., Cooper W.T. Exact masses and chemical formulas of individual Suwannee River fulvic acids from ultrahigh resolution electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectra // *Analytical Chemistry* 2003. V. 75. P. 1275–1284.

Sumner L.W., Mendes P., Dixon R.A. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era // *Phytochemistry*. 2003. V. 62. N 6. P. 817–836.

Swift R.S. Macromolecular properties of soil humic substances: fact, fiction, and opinion // *Soil Science*. 1999. V. 164. N 11. P. 790–802.

Waegele B., Witting M., Schmitt-Kopplin P., Suhre K. MassTRIX reloaded: combined analysis and visualization of transcriptome and metabolome data. // *PLoS ONE*. 2012. DOI:10.1371/journal.pone.0039860. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0039860>.

Warren C.R. Potential organic and inorganic N uptake by six Eucalyptus species // *Functional Plant Biology*. 2006. V. 33. N 7. P. 653–660.

Warren C.R. Quaternary ammonium compounds can be abundant in some soils and are taken up as intact molecules by plants // *New Phytologist*. 2013. V. 198. N 2. P. 476–485.

Metabolomics of forest ecosystems: challenges and perspectives

**N.V. Lukina¹, M.A. Orlova¹, I.V. Perminova², V.S. Khusainova¹, D.N. Vorob'eva¹,
N.A. Artemkina³**

¹*Center for Forest Ecology and Productivity of the Russian Academy of Sciences
Profsoyuznaya st. 84/32 bldg. 14, Moscow, 117997*

E-mail: lukina@cepl.rssi.ru

²*Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University
Leninskiye gory 1 bldg.3, Moscow, 119991*

³*Institute of Industrial Ecology Problems of the North, Kola Science Centre, Russian Academy of Sciences
Fersmana st. 14a, Apatity, Murmansk Oblast, 184200*

Received 19.04.2016

We reviewed the perspectives of ecometabolomics, which consider dynamics of metabolites and metabolomes of ecosystem components in changing environment. The approaches, methods and urgent issues were analyzed. We focused on the contemporary techniques of non-targeted metabolomics, including the spectroscopy of nuclear-magnetic resonance and Fourier transform ion cyclotron resonance. Apart of the challenges of improvement of instrumental methods, to develop forest metabolomics the special tasks need to be solved. They include the justification of sampling and extraction of metabolites from soils, and waters filling soils, crowns and trunks. The studies of metabolome of soils and soil waters are obviously related to studies of soil organic matter and humus. Extracts of forest soils and soil waters provide informative matrix to character metabolome of forest ecosystems, because they reflect multiple interactions of biotic and biotic components. Extracts of soils and soil waters contain metabolites originating from exudates flushed from above and belowground parts of plants, and those forming from modification of litter by soil biota, and namely all substances emitted by biota to environment in response to any natural or anthropogenic impacts. This widens the horizons and gives new opportunity of estimation of the effect of environment on forests, and also the effect of forest biota on the environment. Sampling of atmospheric precipitation and soil waters is efficient with soil lysimeters (percolation gauges), however there is a challenge to choose a sorbent. Systematic studies of sorbents efficiency in sampling different substances are necessary. Metabolomics of forest ecosystems is currently developing as a new branch of science. Assessment of metabolomes of forest ecosystems gives new insight on biogeochemical cycles, soil processes, trophic networks, and global changes.

Ecometabolomics, method, forest ecosystem, challenge, perspective.