

## МЕТАБОЛИТНЫЙ ПРОФИЛЬ МИКРОМИЦЕТА *LECANICILLIUM GRACILE*, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ ШТУКАТУРКИ И БЕЛОГО КАМНЯ

© 2022 г. К. В. Сазанова<sup>1,2,\*</sup>, В. Б. Понизовская<sup>3,\*\*</sup>

<sup>1</sup>Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, 197376 Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский филиал Архива РАН, 196084 Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия

\*e-mail: ksazanova@binran.ru

\*\*e-mail: v.ponizovskaya@gmail.com

Поступила в редакцию 15.04.2022 г.

После доработки 15.05.2022 г.

Принята к публикации 07.06.2022 г.

*Lecanicillium gracile* — недавно описанный вид микромицетов, изолированный из строительных материалов на минеральной основе (штукатурки и белого камня) внутри помещений памятников культурного наследия на территории России. В данной работе охарактеризован состав метаболитов *L. gracile*, а также выполнен анализ культуральной жидкости гриба. Полученные результаты показали, что *L. gracile* является перспективным объектом для поиска новых соединений, обладающих биологической активностью. В экспоненциальной фазе роста разнообразие метаболитов в мицелии было низким, метаболитный профиль характеризовался преимущественным накоплением в мицелии моносахаридов и полиолов. В стационарной фазе разнообразие метаболитов в мицелии *L. gracile* было высоким; по-видимому, в этой фазе биосинтетические процессы преобладали над энергетическими. *L. gracile* синтезировал экстраклеточные полимерные соединения и изменял pH среды в щелочную область. В случае развития гриба на каменистых субстратах экстраклеточный полимерный матрикс не только способствует формированию биопленок с другими микроорганизмами литобионтных сообществ, но и при щелочных значениях pH он способствует образованию вторичного кальцита на кальцийсодержащих субстратах, таких как известняк и мрамор. Таким образом, *L. gracile* обладает рядом биохимических особенностей, которые способствуют его длительному развитию на каменистых субстратах и отражают специфику воздействия гриба на материалы.

**Ключевые слова:** биоповреждения, метаболомный профайлинг, минеральный субстрат, экстраклеточный полимерный матрикс

DOI: 10.31857/S0026364822050099

### ВВЕДЕНИЕ

Микроскопические грибы, населяющие каменистые субстраты, являются одними из основных компонентов сложных и самоподдерживающихся литобионтных сообществ, развивающихся в виде субаэральных биопленок (Villa et al., 2016; Villa, Cappitelli, 2019). Многие авторы рассматривают деятельность микроскопических грибов как один из главных факторов выветривания горных пород и минералов (Kurakov et al., 1999; Warscheid, Braams, 2000; Gorbushina, 2007; De Leo, Urzi, 2015; Salvadori, Municchia, 2015), а также строительных материалов на минеральной основе, что представляет существенную угрозу сохранности объектов культурного наследия и несет значительный экономический ущерб (Warscheid, Braams, 2000; Gadd, 2017).

Микромицеты, заселяющие каменистые субстраты, могут подвергаться воздействию множе-

ства стрессорных факторов, в том числе недостатка питательных веществ, высокого уровня инсоляции, резких колебаний влажности и температуры. Перечисленные условия окружающей среды способствуют развитию у грибов специализированных метаболических адаптивных реакций. Исследование механизмов адаптации грибов к специфическим экологическим условиям, взаимодействия микромицетов в литобионтных сообществах друг с другом, с другими организмами и с самим субстратом являются приоритетными направлениями для комплексного понимания функционирования субаэральных биопленок (Villa et al., 2016; Villa, Cappitelli, 2019; Prieto et al., 2020). Это, в свою очередь, является важным шагом к пониманию процессов биоповреждения и разработке мер защиты памятников культурного наследия. Поставленные задачи требуют глубокого понимания особенностей метаболизма конкретных видов гри-

Таблица 1. Характеристика штаммов *Lecanicillium gracile*

Номер штамма	Номер штамма в международных коллекциях	Номер в Генбанке	Объект культурного наследия	Места отбора проб	Тип материала
57-9-2	CBS 142816	LT598647; MN602797	Государственная Третьяковская галерея, главное здание (XX в.), экспозиционные залы, г. Москва	откосы окон, участки с шелушением и отслоением красочного слоя	штукатурка
G4-5	VKPM F-1421	MF682449; MN602799	Бывший путевой дворец Елизаветы Петровны (XVIII – XIX вв.), подвальное помещение, г. Москва	участки стен с осыпанием красочного слоя и штукатурки	штукатурка
Kd1	CBS 142821, ex-type	MF682448; MN602801	Церковь Бориса и Глеба (XII в.), село Кидекша, Владимирская область	участок стены с размягченным материалом и обильным выходом солей	белый камень известняк

бов, формирующих литобионтное сообщество. В настоящее время перспективным инструментом для такого рода исследований является метаболомный профайлинг (Fiehn, 2002; Smedsgaard, Nielsen, 2005; Guy et al., 2008; Okazaki et al., 2012). В отличие от целевого анализа конкретных соединений, результаты метаболомного профайлинга позволяют получить информацию о совокупности малых органических молекул в организмах, что представляет особый интерес для литобионтных грибов, учитывая широкий спектр их адаптивных реакций.

В отношении взаимодействия микромицетов с субстратом показано, что их геохимическая деятельность происходит во многом благодаря экстраклеточно выделяемым продуктам метаболизма, изменению кислотности субстрата и накоплению в нем полимерных соединений (Warscheid, Braams, 2000; Gadd, 2010; Rousk, Bengtson, 2014; Boniek et al., 2017; Sazanova et al., 2020). В связи с этим изучение перечисленных параметров необходимо для понимания роли конкретных видов грибов в качестве агентов биоповреждения.

Одним из представителей литобионтных сообществ является недавно описанный вид *Lecanicillium gracile* V.B. Ponizovskaya, A.A. Grum-Grzhim., Georgieva et Bilanenko (Ponizovskaya et al., 2020). Штаммы этого вида были выделены из минеральных строительных материалов (штукатурки и белого камня известняка) внутри помещений объектов культурного наследия на территории России (Ponizovskaya et al., 2019; Ponizovskaya et al., 2020). При этом численность пропагул этого гриба в материалах была высокой, достигая  $10^5$  КОЕ/г, что свидетельствовало об активном развитии *L. gracile* на штукатурке и белом камне, а, следовательно, его участии в биоповреждении этих материалов

(Ponizovskaya et al., 2019). Исходя из вышесказанного, знания о биохимических особенностях *L. gracile* могут не только внести ясность в вопрос о его воздействии на субстрат, но и в целом пополнить представление о закономерностях функционирования литобионтных грибов.

Цель работы – охарактеризовать метаболомный профиль и состав культуральной жидкости трех штаммов *L. gracile*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Объекты исследования.** Для исследования использованы штаммы микромицета *L. gracile* (*Ascomycota*, *Sordariomycetes*), которые были выделены из деструктурированных минеральных строительных материалов (штукатурки и белого камня известняка) внутри помещений объектов культурного наследия на территории России (Ponizovskaya et al., 2019, 2020). Для выделения гриба из строительных материалов использовали среды Чапека (рН 5.5) и Чапека с крахмалом (рН 7.2–7.4). Методика выделения *L. gracile* подробно описана в работе Ponizovskaya et al. (2019). Характеристика штаммов приведена в табл. 1.

**Культивирование.** Штаммы *L. gracile* культивировали поверхностным способом на жидкой питательной среде Чапека (г/л: глюкоза – 30;  $\text{NaNO}_3$  – 2.0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1.0;  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  – 0.5;  $\text{KCl}$  – 0.5;  $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  – 0.01) при температуре  $25^\circ\text{C}$  в течение 45 суток. Выполняли метаболомный анализ органических соединений в культуральной жидкости и мицелии гриба, определяли количественное содержание экстраклеточных полимерных соединений (ЭПС) в культуральной жидкости и измеряли ее значение рН. Для метаболомного

анализа мицелия и культуральной жидкости использовали культуры в период их экспоненциального (10 сут) и стационарного роста (45 сут). Содержание ЭПС и pH среды измеряли на 7, 14, 21, 28 и 35-е сутки роста. Данные о скорости роста были получены на основании предварительного исследования динамики накопления биомассы в культурах грибов. Опыты выполняли в трех повторностях.

**Метаболомный анализ.** Мицелий растирали в жидком азоте, экстрагировали холодным метанолом ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) и центрифугировали при 4000 об./мин в течение 10 мин, полученный экстракт выпаривали при  $40^{\circ}\text{C}$  на роторном испарителе ИКА. Для анализа метаболитов культуральную жидкость (15 мл) отделяли от мицелия, фильтровали и выпаривали на роторном испарителе при  $40^{\circ}\text{C}$ . Сухие остатки растворяли в пиридине. Далее с использованием N,O-бис-(триметилсилил) трифторацетамида (BSTFA) (Supelco, США) получали ТМС (триметилсилил)-производные. Силилирование выполняли в течение 15 мин при  $100^{\circ}\text{C}$ .

Анализ содержания метаболитов в мицелии и культуральной жидкости проводили методом газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС) на приборе Маэстро (Интерлаб, Россия) с масс-селективным детектором 5975С, колонкой HP-5MS,  $30\text{ м} \times 0.25\text{ мм} \times 0.25\text{ мкм}$ , Agilent (США). Хроматографирование проводили при линейном программировании температуры от  $70^{\circ}\text{C}$  до  $320^{\circ}\text{C}$ , в режиме постоянства потока газа-носителя (гелия) через колонку (1 мл/мин). Сканирование масс-спектров проводилось в диапазоне  $50\text{--}800\text{ m/z}$  с частотой 2 скана/сек. Хроматограммы образцов регистрировали по полному ионному току. Сбор данных осуществляли с помощью программного обеспечения Agilent Chem-Station.

Обработку и интерпретацию масс-спектрометрической информации проводили с использованием программы AMDIS (<http://www.amdis.net>), базы данных NIST 2011 и базы данных масс-спектрометрической информации, созданной в Ботаническом институте им. В.Л. Комарова РАН. Определение индексов удерживания (RI) проводили методом калибровки по стандартным предельным углеводородам. Полуколичественную интерпретацию метаболитного профиля осуществляли по площадям пиков полного ионного тока методом внутреннего стандарта с помощью программы UniChrom ([www.unichrom.com](http://www.unichrom.com)). В качестве внутреннего стандарта использовался трикозан, добавляемый в пробу на стадии растворения ее в пиридине. Следует особо отметить, что данные о количественном содержании отдельных соединений являются не более чем оценочной характеристикой содержания метаболитов в экстрактах, и могут использоваться только для построения метаболитной матрицы, которая и является формальным результатом профайлингового

анализа и используется для статистического моделирования изучаемого явления. Статистическая обработка результатов проведена с использованием программ Microsoft Excel и MetaboAnalist.

**Определение содержания ЭПС.** Анализ содержания ЭПС в культуральной жидкости проводили по методике, описанной Savadogo et al. (2004). Предварительно отфильтрованную культуральную жидкость центрифугировали при 4000 об./мин в течение 10 мин. Супернатант смешивали с равным объемом охлажденного до  $-20^{\circ}\text{C}$  этанола и инкубировали при  $4^{\circ}\text{C}$  в течение 24 ч. Охлажденный раствор центрифугировали при 2500 об./мин в течение 20 мин. Полученный осадок ресуспендировали в дистиллированной воде вместе с равным объемом холодного этанола. Затем раствор снова центрифугировали при 2500 об./мин в течение 20 мин. Полученный конечный осадок сушили при  $60^{\circ}\text{C}$  и взвешивали.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Метаболомный профайлинг мицелия *L. gracile*.** Результаты метаболомного анализа для идентифицированных в мицелии соединений визуализированы в виде тепловой карты (рис. 1). Полученные данные показали, что состав метаболомного профиля *L. gracile* существенно зависит от стадии роста, а также от штамма гриба. Так, в экспоненциальной фазе роста доминирующими соединениями были моносахара (в основном глюкоза и фруктоза) и полиолы (главным образом, маннит). В значительно меньшей концентрации присутствовали дисахариды (целлобиоза, трегалоза и мальтоза), жирные кислоты и эргостерин. Органические кислоты (янтарная, яблочная, фумаровая, глицериновая) были обнаружены в следовых количествах.

В стационарной фазе роста разнообразие соединений значительно увеличивалось. В составе экстрактов было обнаружено более 150 метаболитов, около 60 из которых были идентифицированы. Наиболее распространенными были дисахара (трегалоза, целлобиоза, мальтоза, а также неидентифицированные дисахара), полиолы (эритрит, маннит, рибит, мио-инозит), сахарокислоты (глюконовая, треоновая, арабиновая), карбоновые кислоты – промежуточные продукты энергетического обмена (пировиноградная, яблочная, янтарная, глицериновая, фумаровая, лимонная), жирные кислоты (линолевая, олеиновая, стеариновая, бегеновая, лигноцереновая), стерины (эргостерин, ланостерин). Фенольные соединения были обнаружены только в стационарной стадии роста. Концентрация моносахаридов и полиолов в метаболомном профиле стационарной фазы роста существенно снижалась по сравнению с экспоненциальной, в то время как дисахаридов (в основном трегалозы), напротив, увеличивалась. Из-



**Рис. 1.** Тепловая карта идентифицированных метаболитов мицелия *Lecanicillium gracile*. Красный цвет характеризует высокую относительную концентрацию соединений, синий – низкую. \*Содержание дисахаридов посчитано суммарно.

вестно, что трегалоза является не только запасным дисахаридом у грибов, но также участвует в их адаптации к различным стрессорным воздействиям, включая перепады температуры и влажности (Perfect et al., 2017), характерные для каменистых поверхностей. Таким образом, с увеличением возраста культур гриба, возможно, уже в условиях истощенной питательной среды, метаболомный профиль *L. gracile* становится богаче, по-видимому, биосинтетические процессы гриба начинают преобладать над энергетическими.

Начальная стадия роста гриба в условиях высокого содержания сахаров в среде характеризовалась активным накоплением сахаров в мицелии. Одним из возможных механизмов, обуславливающим значительно большее разнообразие метаболомного профиля *L. gracile* в стационарной фазе роста по сравнению с экспоненциальной, по-видимому, может быть так называемая катаболитная репрессия. В условиях высокого содержания сахаров на ранних сроках культивирования может происходить подавление экспрессии генов ряда ферментов, что обеспечивает максимальную ассимиляцию глюкозы (Portnoy et al., 2011). В стационарной фазе роста при снижении концентрации сахаров в питательной среде ферментативная активность восстанавливается. Тем не менее, не исключены другие физиологические механизмы, определяющие различия метаболомного профиля на разных стадиях роста.

Преимущественное накопление моносахаридов в экспоненциальной, а дисахаридов в стационарной фазе роста соответственно было описано также для ксилотрофных базидиомицетов (Sazanova et al., 2018, 2021). Однако если у базидиальных грибов кислоты цикла Кребса накапливались в мицелии в основном на ранних стадиях роста колонии, а далее их концентрация снижалась, то у *L. gracile* органические кислоты, напротив, накапливались с возрастом культур.

Что касается штаммовых различий, *L. gracile* Kd-1 характеризовался наибольшим накоплением низкомолекулярных органических кислот – промежуточных продуктов энергетического обмена, но при этом меньшим содержанием жирных кислот, стероидов и фенольных соединений. В то же время *L. gracile* 57-9-2 отличался наибольшим разнообразием и количественным содержанием фенольных соединений, а штамм G4-5 накапливал наибольшие количества жирных кислот.

Кроме того, характерной особенностью штаммов *L. gracile* 57-9-2 и G4-5 явилось накопление в мицелии соединения, предварительно идентифицированного с использованием стандартной библиотеки NIST 2011 как производное бензоксантиола. Некоторые соединения бензоксантиола обладают противовоспалительным, антибактериальным, антифунгальным, а также противоопухолевым действием (Ja et al., 2008; Kim et al., 2008; Parizi et al.,

**Таблица 2.** Содержание ЭПС и значения pH в культуральной жидкости *Lecanicillium gracile*

Сутки роста	Штамм <i>L. gracile</i>		Штамм <i>L. gracile</i>	
	57-9-2	Kd-1	57-9-2	Kd-1
	Значение pH		Содержание ЭПС*, мг/мл	
7	6.8	6.8	–	–
14	7.5	7.0	1.1 ± 0.3	0.8 ± 0.2
21	8.1	7.2	2.4 ± 0.5	1.3 ± 0.3
28	8.6	7.4	9.1 ± 2.0	5.0 ± 0.8
35	9.0	7.8	18.8 ± 3.4	10.0 ± 2.3

Примечание. \*Среднее значение ± стандартное отклонение.

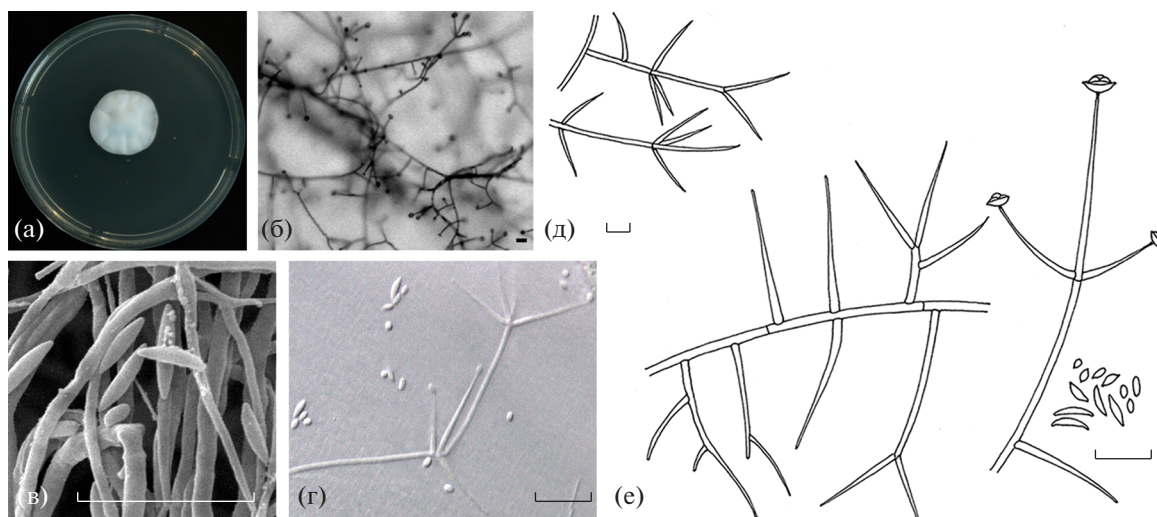
2019). Уточнение структуры данного вещества, также как и некоторых других неидентифицированных соединений, требует дополнительного анализа в дальнейшем.

**Состав культуральной жидкости *L. gracile*.** Среди низкомолекулярных метаболитов культуральной жидкости *L. gracile* были идентифицированы, главным образом, сахара и полиолы, доминирующими соединениями были эритрит и арабит. Кроме того, обнаружены пропионовая и гидроксипропионовая кислоты, аминокислота оксипролин. При переходе к стационарной фазе роста, также как и в метаболомном профиле мицелия гриба, в культуральной жидкости наблюдалось преобладание дисахаров и снижение концентрации моносахаров.

Анализ содержания ЭПС в культуральной жидкости был выполнен для двух штаммов: *L. gracile* 57-9-2 и Kd-1. Обнаружено, что оба штамма выделяют ЭПС начиная с 14-х суток роста, причем концентрация ЭПС в питательной среде увеличивалась с возрастом культур (табл. 2).

Культуральная жидкость имела тенденцию к защелачиванию с самого начала развития на ней культур. На 35-е сутки роста штамма *L. gracile* 57-9-2 pH питательной среды достигал 9, а штамма Kd-1 – 7.5. Интенсивное защелачивание среды при развитии *L. gracile* 57-9-2 коррелировало с максимумом накопления в ней ЭПС на 35-е сутки наблюдения.

**Роль *L. gracile* в биоповреждении строительных материалов на минеральной основе.** *L. gracile* является представителем комплексов грибов, активно развивающихся на минеральных строительных материалах (штукатурке и белом камне известняка) внутри архитектурных объектов культурного наследия (Ponizovskaya et al., 2019, 2020). Гриб обладает *Acremonium*-подобной морфологией, что характерно для грибов этих комплексов (Karpovich-Tate, Rebrikova, 1990; Ponizovskaya et al., 2019). Основные морфологические признаки *L. gracile*



**Рис. 2.** *Lecanicillium gracile* (Kd-1, CBS 142821, ex-type): а – 14-суточная колония на среде КГА; б – простратные конидиеносцы с фиалидами; в – конидии (СЭМ); г – простратные конидиеносцы, несущие пучки фиалид; д, е – схема простратных конидиеносцев с фиалидами и конидиями. Масштаб – 10 мкм (по: Ponizovskaya, 2020).

представлены на рис. 2. Колонии гриба белого цвета, ватообразные. Микромицет формирует диморфные конидии в головках на кончиках фиалид, расположенных одиночно, реже пучками на простратных конидиеносцах (Ponizovskaya et al., 2020).

Исходя из биохимических особенностей *L. gracile*, можно предположить механизмы взаимодействия гриба с минеральными строительными материалами и с другими представителями комплекса микроорганизмов, обитающих на этих субстратах. Так, богатый метаболомный профиль *L. gracile* в стационарной фазе его роста свидетельствует о том, что этот гриб обладает высокой ферментативной активностью. В целом, высокая ферментативная активность характерна для представителей рода *Lecanicillium*: среди них обычны микофилы и энтомопатогены (Zage, Gams, 2001). Исходя из высокой численности гриба в пробах штукатурки и белого камня, было высказано предположение, что микромицет способен длительное время развиваться на этих субстратах, бедных легкодоступными сахарами, и, следовательно, способен разлагать широкий спектр питательных веществ (Ponizovskaya et al., 2020). Это могут быть частички членистоногих и продукты их жизнедеятельности, растительные остатки, бактерии и другие грибы (Gorbushina, Petersen, 2000).

Более того, ранее нами было показано (Ponizovskaya et al., 2019), что *L. gracile* способен развиваться в широком диапазоне значений pH (4–10). Это также может давать преимущество при колонизации штукатурки и белого камня, поскольку pH этих субстратов может варьироваться в зависимости от степени их повреждения, увлажнения и других факторов от слабокислых значений до ще-

лочных (pH 6–9) (Verdier et al., 2014; Ponizovskaya et al., 2019). При развитии на каменных субстратах мицелий микромицетов оказывает на них механическое давление, что ведет к ослаблению и разрушению структуры материала. Более того, рост мицелия провоцирует транспорт воды и химических соединений вглубь субстратов, что облегчает развитие в них бактерий и одновременно вызывает биохимическое разрушение (Warscheid, Braams, 2000; Gorbushina, Krumbein, 2004; Fernandes, 2006).

Далее, в настоящей работе выявлена способность *L. gracile* к образованию экстраклеточных полисахаридов, входящих в состав матрикса биопленок. По данным литературы (Zhu et al., 2016), в состав матрикса биопленок входят также протеины, гликопротеины, липиды, гликолипиды, жирные кислоты и ферменты. В целом, образование экстраклеточного полимерного матрикса характерно для многих микроорганизмов, включая грибы и бактерии (Martino, 2016). Известно, что этот матрикс обеспечивает “сцепление” микроорганизмов с поверхностью субстрата, а также участвует во взаимодействии микроорганизмов друг с другом, обеспечивая ионный обмен между ними, что приводит к формированию биопленок (Morton, Surman, 1994; Warscheid, Braams, 2000; Martino, 2016; Villa et al., 2016; Zhu et al., 2016). Таким образом, путем образования ЭПС *L. gracile* предположительно может участвовать в процессе формирования биопленок на каменных субстратах. Стоит подчеркнуть, что, объединяясь в виде биопленки, микроорганизмы, и грибы в частности, повышают устойчивость к факторам стресса, таким как высокий осмотический потенциал субстрата и недостаток воды (Morton, Sur-



man, 1994; Harding et al., 2009; Grum-Grzhimaylo et al., 2016; Kozlova et al., 2019), а также к воздействию биоцидов (Sand, 1997). Слизистые вещества ЭПС закупоривают поры в материале, препятствуя испарению воды, и аккумулируют пылевые частицы из воздуха, способствуя обогащению субстрата органическими веществами. Все это благоприятствует дальнейшему развитию на нем микроорганизмов (Morton, Surman, 1994; Sand, 1997; Gaylarde, Morton, 1999). Циклы набухания и усыхания слизистых веществ расшатывают структуру минеральных материалов (Gadd, 2007).

Еще одной особенностью *L. gracile* является его способность менять pH субстрата в щелочную область. Это, во-первых, дает преимущество развитию щелочеустойчивым микроорганизмам на материале, а во-вторых, влияет на химические процессы, происходящие на каменном субстрате. Так, при щелочных значениях pH среды за счет электрического взаимодействия отрицательно заряженных функциональных карбоксильных, фосфатных и аминогрупп, входящих в состав ЭПС, с ионами кальция, присутствующими в материале, создаются высокие локальные концентрации ионов кальция (Anbu et al., 2016; Zhu et al., 2016). Это приводит к кристаллизации вторичного кальцита на поверхности материала (Anbu et al., 2016; Zhu et al., 2016; Sazanova et al., 2020). Следовательно, способность *L. gracile* образовывать ЭПС и защелачивать среду может привести к вторичной кристаллизации кальцита в условиях развития гриба на минеральных субстратах, богатых кальцием.

Таким образом, данное исследование показывает, что *L. gracile* может оказывать многоплановое воздействие на каменные субстраты, а также отражает специфику функционирования грибов в литобионтных сообществах.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования показали вариабельность штаммов *L. gracile* по особенностям их метаболизма и, в частности, по биосинтезу специфичных вторичных метаболитов. В целом богатое разнообразие метаболомного профиля *L. gracile* характерно для стационарной фазы роста, что свидетельствует о высокой ферментативной активности гриба в этой фазе. Штаммы *L. gracile* 57–9–2 и G4–5 характеризуются большим разнообразием низкомолекулярных органических соединений, в том числе вторичных фенольных соединений, чем штамм Kd–1. *L. gracile* образует экзополисахариды и изменяет pH среды в щелочную область, что может способствовать образованию вторичного кальцита в случае развития гриба на кальцийсодержащем субстрате. Формирование кальцитовой корки имеет значение для устойчивости биопленок, а также изменяет структуру по-

верхности минералов. Полученные данные показывают, что *L. gracile* может оказывать повреждающее воздействие на каменные субстраты, а также является интересным объектом для поиска новых соединений, обладающих биологической активностью.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 21-74-00031 “Грибы и бактерии в биогеохимических циклах: трофические и аллелопатические взаимодействия, роль в детоксикации металлов”).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- AMDIS. 2022. <http://www.amdis.net/index.html>. Accessed on 15.04.2022.
- Anbu P., Kang C.H., Shin Y.J. et al. Formations of calcium carbonate minerals by bacteria and its multiple applications. Springerplus. 2016. V. 5 (250). <https://doi.org/10.1186/s40064-016-1869-2>
- Boniek D., MendesIsolda I.C., Abreu C.M. et al. Ecology and identification of environmental fungi and metabolic processes involved in the biodeterioration of Brazilian soapstone historical monuments. Lett. Appl. Microbiol. 2017. V. 65 (5). P. 1–8. <https://doi.org/10.1111/lam.12794>
- De Leo F., Urzi C. Microfungi from deteriorated materials of cultural heritage. In: J.K. Misra et al. (eds). Fungi from different substrates. CRC Press, Taylor and Francis group, N.Y., 2015, pp. 144–158.
- Fernandes P. Applied microbiology and biotechnology in the conservation of stone cultural heritage materials. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006. V. 73. P. 291–296. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0599-8>
- Fiehn O. Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. Plant molecular biology. 2002. V. 48. P. 155–171. <https://doi.org/10.1023/A:1013713905833>
- Gadd G.M. Geomicrobiology of the built environment. Nat. Microbiol. 2017. V. 2 (4). P. 1–9. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.275>
- Gadd G.M. Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. Mycol. Res. 2007. V. 111 (1). P. 3–49. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2006.12.001>
- Gadd G.M. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. Microbiology. 2010. V. 156 (3). P. 609–643. <https://doi.org/10.1099/mic.0.037143-0>
- Gaylarde C.C., Morton L.G. Deteriogenic biofilms on buildings and their control: a review. Biofouling. 1999. V. 14. P. 59–74. <https://doi.org/10.1080/08927019909378397>
- Gorbushina A.A. Life on the rocks. Environ. Microbiol. 2007. V. 9. P. 1613–1631. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01301.x>
- Gorbushina A.A., Krumbein W.E. Role of organisms in wear down of rocks and minerals. In: Varma A., Buscot F. (eds.). Microorganisms in soils: roles in genesis and functions. Springer, Berlin, 2005, pp. 59–84. [https://doi.org/10.1007/3-540-26609-7\\_3](https://doi.org/10.1007/3-540-26609-7_3)

- Gorbushina A.A., Petersen K. Distribution of microorganisms on ancient wall paintings as related to associated faunal elements. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 2000. V. 46. P. 277–284.  
[https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(00\)00103-7](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(00)00103-7)
- Grum-Grzhimaylo A.A., Georgieva M.L., Bondarenko S.A. et al. On the diversity of fungi from soda soils. *Fungal Divers.* 2016. V. 76. 27–74.  
<https://doi.org/10.1007/s13225-015-0320-2>
- Guy C., Kaplan F., Kopka J. et al. Metabolomics of temperature stress. *Physiologia Plantarum.* 2008. V. 132 (2). P. 220–235.  
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.00999.x>
- Harding M.W., Marques L.L., Howard R.J. et al. Can filamentous fungi form biofilms? *Trends Microbiol.* 2009. V. 17 (11). P. 475–480.  
<https://doi.org/10.1016/j.tim>
- Ja E.K., Hong S.K., Shin Y.J. et al. LYR71, a derivative of trimeric resveratrol, inhibits tumorigenesis by blocking STAT3-mediated matrix metalloproteinase 9 expression. *Experim. Molec. Medicine.* 2008. V. 40 (5). P. 514–522.
- Karpovich-Tate N., Rebrikova N.L. Microbial communities on damaged frescoes and building materials in the cathedral of the Nativity of the Virgin in the Pafnutii-Borovskii monastery, Russia. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 1990. V. 27. P. 281–296.
- Kim B.H., Roh E., Lee H.Y. et al. Benzoxathiole derivative blocks lipopolysaccharide-induced nuclear factor- $\kappa$ B activation and nuclear factor- $\kappa$ B-regulated gene transcription through inactivating inhibitory  $\kappa$ B kinase beta. *Mol. Pharmacol.* 2008. V. 73 (4). P. 1309–1318.  
<https://doi.org/10.1124/mol.107.041251>
- Kozlova M.V., Bilanenko E.N., Grum-Grzhimaylo A.A. et al. An unusual sexual stage in the alkaliphilic ascomycete *Sodiomyces alkalinus*. *Fungal Biol.* 2019. V. 123 (2). P. 140–150.  
<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2018.11.010>
- Kurakov A.V., Somova N.G., Ivanovskiy R.N. Micromycetes populating limestone and red brick surfaces of the Novodevichiy convent masonry. *Microbiology.* 1999. V. 68 (2). P. 273–282.
- Liu B., Fu R., Wu B. et al. Rock-inhabiting fungi: terminology, diversity, evolution and adaptation mechanisms. *Mycology.* 2021. V. 13 (1). P. 1–31.  
<https://doi.org/10.1080/21501203.2021.2002452>
- Martino P.D. What about biofilms on the surface of stone monuments? *The Open Conference Proceedings Journal.* 2016. V. 9. P. 14–28.  
<https://doi.org/10.2174/2210289201607020014>
- Morton L.H.G., Surman S.B. Biofilms in biodeterioration – a review. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 1994. V. 34. P. 203–221.  
[https://doi.org/10.1016/0964-8305\(94\)90083-3](https://doi.org/10.1016/0964-8305(94)90083-3)
- Okazaki Y., Saito K. Recent advances of metabolomics in plant biotechnology. *Plant Bio-Tech.* 2012. V. 6 (1). P. 1–15.  
<https://doi.org/10.1007/s11816-011-0191-2>
- Parizi M.H., Sharifi I., Farajzadeh S. et al. Tioxolone niosomes exert antileishmanial effects on *Leishmania tropica* by promoting promastigote apoptosis and immunomodulation. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 2019. V. 12 (8). P. 365–374.  
<https://doi.org/10.4103/1995-7645.262566>
- Perfect J.R., Tenor J.L., Miao Y. et al. Trehalose pathway as an antifungal target. *Virulence.* 2017. 8 (2). P. 143–149.  
<https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1195529>
- Ponizovskaya V.B., Bilanenko E.N., Mokeeva V.L. et al. Micromycetes as colonizers of mineral building materials in historic monuments and museums. *Fungal Biol.* 2019. V. 123 (4). P. 290–306.  
<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.01.002>
- Ponizovskaya V.B., Grum-Grzhimaylo A.A., Georgieva M.L. et al. *Lecanicillium gracile* (Cordycipitaceae), a new species isolated from mineral building materials. *Phytotaxa.* 2020. V. 443 (3). P. 265–278.  
<https://doi.org/10.11646/phytotaxa.443.3.3>
- Portnoy T., Margeot A., Linke R. et al. The CRE1 carbon catabolite repressor of the fungus *Trichoderma reesei*: a master regulator of carbon assimilation. *BMC Genomics.* 2011. V. 12. P. 269.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-269>
- Prieto B., Vázquez-Nion D., Fuentes E. et al. Response of sub-aerial biofilms growing on stone-built cultural heritage to changing water regime and CO<sub>2</sub> conditions. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 2020. V. 148.  
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.104882>
- Rousk J., Bengtson P. Microbial regulation of global biogeochemical cycles. *Front. Microbiol.* 2014. V. 5 (103).  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00103>
- Salvadori O., Municchia A.C. The role of fungi and lichens in the biodeterioration of stone monuments. *Open Conf. Proc. J.* 2015. V. 6 (Suppl. S1). P. 70–82.  
<https://doi.org/10.2174/2210289201607020039>
- Sand W. Microbial mechanisms of deterioration of inorganic substrates – a general mechanistic overview. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 1997. Vo. 40. (2–4). P. 183–190.  
[https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(97\)00048-6](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(97)00048-6)
- Savado A.C., Ouattara A.T., Savado P.W. et al. Identification of exopolysaccharides-producing lactic acid bacteria from Burkina Faso fermented milk samples. *Afr. J. Biotechnol.* 2004. V. 3 (3). P. 189–194.  
<https://doi.org/10.5897/AJB2004.000-2034>
- Sazanova K., Psurtseva N., Shavarda A. Metabolomic changes in wood inhabiting filamentous fungi during ontogenesis. In: *Metabolomics. Methodology and applications in medical sciences and life sciences.* London, UK: IntechOpen, 2021. P. 137–156.
- Sazanova K.V., Frank-Kamenetskaya O.V., Vlasov D.Y. et al. Carbonate and oxalate crystallization by interaction of calcite marble with *Bacillus subtilis* and *Bacillus subtilis*–*Aspergillus niger* association. *Crystals.* 2020. V. 10. P. 756.  
<https://doi.org/10.3390/cryst10090756>
- Sazanova K.V., Psurtseva N.V., Shavarda A.L. Cultural and metabolomic studies of a new phthalides producer, *Lignomyces vetlinianus* (Agaricomycetes). *Int. J. Medicinal Mushrooms.* 2018. V. 20 (11). P. 1031–1045.  
<https://doi.org/10.1615/intjmedmushrooms.2018028687>
- Sazanova K.V., Zelenskaya M.S., Bobir S.Yu. et al. Micromycetes in biofilms on stone monuments of St. Petersburg. *Mikologiya i fitopatologiya.* 2020. V. 54 (5). P. 329–339.
- Sazanova K.V., Zelenskaya M.S., Vlasov A.D. et al. Microorganisms in superficial deposits on the stone monuments



- in Saint Petersburg. *Microorganisms*. 2022. V. 10 (2). P. 316.  
<https://doi.org/10.3390/microorganisms10020316>
- Smedsgaard J., Nielsen J.* Metabolite profiling of fungi and yeast: from phenotype to metabolome by MS and informatics. *J. Experim. Bot.* 2005. V. 56 (410). P. 273–286.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/eri068>
- Taxonomy Browser. 2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>. Accessed 15.04.2022.
- UniChrom. 2022. <http://www.unichrom.com/unichrome.shtml>. Accessed on 15.04.2022.
- Verdier T., Coutand M., Bertron A. et al.* A review of indoor microbial growth across building materials and sampling and analysis methods. *Building and Environment*. 2014. V. 80. P. 136–149.  
<https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2014.05.030>
- Villa F., Cappitelli F.* The ecology of subaerial biofilms in dry and inhospitable terrestrial environments. *Microorganisms*. 2019. V. 7 (10). P. 380.  
<https://doi.org/10.3390/microorganisms7100380>
- Villa F., Stewart P.S., Klapper I. et al.* Subaerial biofilms on outdoor stone monuments: Changing the perspective toward an ecological framework. *BioScience*. 2016. V. 66 (4). P. 285–294.  
<https://doi.org/10.1093/biosci/biw006>
- Warscheid T., Braams J.* Biodeterioration of stone: A review. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 2000. V. 46 (4). P. 343–368.  
[https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(00\)00109-8](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(00)00109-8)
- Zare R., Gams W.* A revision of *Verticillium* sect. *Prostrata*. IV. The genera *Lecanicillium* and *Simplicillium* gen. nov. *Nova Hedwigia*. 2001. V. 73. P. 1–50.
- Zhu T., Dittrich M.* Carbonate precipitation through microbial activities in natural environment, and their potential in biotechnology: A review. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2016. V. 4 (4).  
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2016.00004>
- Сазанова К.В., Зеленская М.С., Бобур С.Ю. и др.* (Sazanova et al.) Микробиоты в биоотходах на каменных памятниках Санкт-Петербурга // Микология и Фитопатология. 2020. Т. 54. № 5. С. 329–339.

## Metabolites Profile of Micromycete *Lecanicillium gracile* Isolated from Limestone and Plaster

K. V. Sazanova<sup>a,b,#,##</sup> and V. B. Ponizovskaya<sup>c,###</sup>

<sup>a</sup>Komarov Botanical Institute of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

<sup>b</sup>Archive of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg Branch, St. Petersburg, Russia

<sup>c</sup>Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

<sup>#</sup>e-mail: [ksazanova@binran.ru](mailto:ksazanova@binran.ru)

<sup>##</sup>e-mail: [barinova-kv@mail.ru](mailto:barinova-kv@mail.ru)

<sup>###</sup>e-mail: [v.ponizovskaya@gmail.com](mailto:v.ponizovskaya@gmail.com)

*Lecanicillium gracile* is the recently described species of micromycetes that was obtained from deteriorated mineral materials, i.e., limestone and plaster, inside the cultural heritage sites in Russia. Composition of metabolites in the mycelium and in the culture fluid of *L. gracile* was characterized and a quantitative analysis of the extracellular polymer matrix excreted by the fungus was performed. The results of metabolomic analysis of the mycelium revealed that *L. gracile* is a promising object for the search for new compounds with biological activity. In the exponential growth phase of *L. gracile*, the diversity of metabolites in the mycelium was low with the predominant accumulation of monosaccharides and polyols. In the stationary growth phase, the diversity of metabolites in the mycelium was high; apparently, biosynthetic processes prevailed over catabolism. *L. gracile* excreted extracellular polymer substances and changed pH of the medium to an alkaline. Extracellular polymer substances excretion not only can contribute to biofilm formation on mineral surfaces but also under alkaline conditions to secondary calcite precipitation in the case of fungal development on Ca-containing materials (i.e., limestone and marble). Obtained results reflect specific biochemical characters of *L. gracile* and its possible mechanisms of mineral materials deterioration.

**Keywords:** biodeterioration, extracellular polymer substances, metabolomic profiling, mineral materials