

МИКРОМИЦЕТЫ В БИОПЛЕНКАХ НА КАМЕННЫХ ПАМЯТНИКАХ САНКТ-ПЕТЕРБУРГА

© 2020 г. К. В. Сазанова^{1,*}, М. С. Зеленская^{2,**}, С. Ю. Бобир^{3,***}, Д. Ю. Власов^{1,2,****}

¹ Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, 197376 Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский государственный университет, 199034 Санкт-Петербург, Россия

³ Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена, 191186 Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: ksazanova@binran.ru

**e-mail: marsz@yandex.ru

***e-mail: sv_bobir@mail.ru

****e-mail: dmitry.vlasov@mail.ru

Поступила в редакцию 15.04.2020 г.

После доработки 01.05.2020 г.

Принята к публикации 11.05.2020 г.

В статье рассматриваются особенности структуры сообществ микромицетов на памятниках из различных типов камня в Санкт-Петербурге. Показано, что группы доминирующих видов в целом сходны на различных горных породах, использованных для создания памятников. Особенности разнообразия грибов в литобионтных сообществах связаны главным образом с редко встречающимися и случайными видами. Карбонатные породы характеризовались более высоким разнообразием микромицетов, чем силикатные. Выявлено 90 видов микромицетов, подавляющее большинство из которых составляют анаморфные аскомицеты. Различия по содержанию органических веществ в биопленках и наслоениях на поверхности камня мало влияют на формирование групп доминирующих и часто встречающихся видов, но согласуются с особенностями структуры комплексов микромицетов в изученных местообитаниях. Нахождение оксалатов кальция в исследованных образцах поврежденного камня доказывает роль микроорганизмов в процессах современного минералообразования.

Ключевые слова: биоминерализация, биопленки, биоповреждения, микромицеты, памятники из камня

DOI: 10.31857/S0026364820050104

ВВЕДЕНИЕ

В Санкт-Петербурге и его пригородах сосредоточено уникальное собрание памятников, созданных из мрамора, известняка, гранита и других разновидностей природного камня, которые подвергаются интенсивной биологической колонизации и разрушению в городской среде. Многие авторы рассматривают деятельность микроскопических грибов как один из главных факторов повреждения горных пород, минералов и строительного камня (Kurakov et al., 1999; Warscheid, Braams, 2000; Gorbushina et al., 2002; Salvadori, Municchia, 2015; De Leo, Urzi, 2015). Грибы могут оказывать как химическое, так и физическое (механическое) воздействие на камень. Однако, сложность наблюдения и изучения процессов, происходящих на поверхности минерального субстрата под влиянием микроскопических грибов, объясняет недостаточную изученность микодеструкции природного камня. Исследования роли грибов в процессах минералообразования на поверхности камня являются частью развиваемого в последние годы

геомикологического направления (Sterflinger, 2000; Gadd, 2007).

В Санкт-Петербурге на протяжении ряда лет проводились целенаправленные исследования разнообразия микромицетов на памятниках из мрамора, известняка и гранита. Основное внимание было уделено скульптурным памятникам некрополей Государственного музея городской скульптуры Санкт-Петербурга, где стационарные микологические исследования ведутся с 1998 года (Vlasov et al., 2002, Monuments..., 2016; The effect..., 2019). За этот период было обследовано более 300 монументов, экспонирующихся на открытом воздухе. Результаты этой работы внесены в Базу данных по состоянию скульптурных памятников Санкт-Петербурга (<http://opticalcomponents.ru/>).

Очевидно, что грибы развиваются на каменных памятниках не изолированно, а в тесной взаимосвязи с другими организмами (микроскопическими водорослями, хемотрофными и органотрофными бактериями, лишайниками, простейшими). Такие взаимодействия увеличивают круг место-

обитаний, эффективность использования источников питания, скорость роста, защиту от внешних воздействий (Benoit et al., 2015; Martino et al., 2016).

Микроорганизмы на каменных памятниках в городской среде образуют биопленки сложного состава, нередко покрывающие значительную поверхность. Клетки микроорганизмов в биопленке погружены в органический матрикс микробного происхождения, который представлен полимерными веществами. Он выполняет интегрирующую функцию, а также способствует прикреплению к субстрату (Martino et al., 2016). Биопленки на каменных памятниках в городской среде изучались в различных климатических условиях (De Leo, Urzi, 2015; Farooq et al., 2015; Panova et al., 2015). Их состав и структура зависят от свойств субстрата и окружающей среды. Исследования биохимического состава литобионтных биопленок, в которых грибы играют заметную роль, важны для понимания механизмов биогенной трансформации природного камня, использовавшегося для создания памятников культурного наследия (Sazanova et al., 2014, 2016). Во многих случаях развитие биопленок сопряжено с накоплением на поверхности памятников отложений различной химической природы (преимущественно, атмосферные и антропогенные загрязнения). Такие органоминеральные образования часто описываются термином “наслоения” (The effect..., 2019).

Цель настоящего исследования — сравнительная оценка разнообразия микромицетов на памятниках из карбонатных и силикатных пород в Санкт-Петербурге на основании данных культуральных исследований, а также анализе участия грибов в литобионтных биопленках и поверхностных наслоениях, различающихся по составу низкомолекулярных соединений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материал для исследований был собран в Санкт-Петербурге на территории музейных некрополей Государственного музея городской скульптуры (музейные некрополи XVIII в., Мастеров искусств, “Литераторские мостки”). Обследовали памятники из силикатных (гранит, габбро, гнейс) и карбонатных (мрамор и известняк) горных пород, которые подвергались биологическому обрастанию. Визуальная оценка каменного материала позволяла выделить несколько типов разрушения камня:

- дезинтеграция поверхности, приводящая к потере элементов камня (в основном характерно для однородного мрамора, хотя встречается и на гранитах);

- отслаивание фрагментов камня в виде крупных или мелких чешуек (характерно для мрамора, серого гранита, габбро);

- образование поверхностных налетов (био-пленок) с доминированием различных организмов (водорослей, грибов, лишайников);

- образование гипсовой корки серо-черного цвета на поверхности карбонатных пород (со временем корка может отслаиваться, что приводит к сильным нарушениям поверхности камня);

- поверхностные наслоения различной природы.

Отбор проб с поврежденных участков каменных памятников проводился в летние и осенние периоды 2007–2019 гг. Пробы для микологического исследования можно условно разделить на 2 группы: образцы самих разрушающихся материалов и пробы, отобранные неповреждающими методами с поверхности изучаемого объекта. Когда на исследуемом памятнике имелись значительные повреждения поверхности, наблюдалась фрагментация, отслаивание и осыпание каменного материала, отбор фрагментов камня производили в стерильные контейнеры для последующего лабораторного исследования (фрагменты материала были взяты по согласованию с сотрудниками Государственного музея городской скульптуры). С особо ценных памятников пробы отбирали методом отпечатка с поверхности на агаризованную питательную среду Чапека–Докса с 1%-м содержанием глюкозы, а также путем соскоба или мазка при помощи стерильной ватной палочки (в стерильные контейнеры). Полученные при этом фрагменты биопленок и крошки камня в лабораторных условиях переносили на поверхность питательной среды.

Выделение, культивирование и идентификацию микромицетов осуществляли с использованием методов, описанных ранее (Vlasov et al., 2001). Для первичной изоляции микромицетов применяли прямой посев крошек камня, фрагментов биопленки и поверхностных наслоений на поверхность питательной среды. Выделение медленнорастущих микроколониальных грибов осуществляли методом селективной изоляции колоний с поверхности субстрата, состоящим в переносе колоний с помощью инъекционной иглы на поверхность питательной среды. Использовали следующие питательные среды: агаризованную среду Чапека–Докса, агаризованный овсяный отвар с добавлением глюкозы, картофельно-глюкозный агар, 2%-й мальт-агар. Идентификацию микроскопических грибов проводили с применением стандартных методик.

Для исследования особенностей распределения грибов и других микроорганизмов в поверхностном слое камня использовали метод сканирующей электронной микроскопии. Материалом для исследования служили небольшие фрагменты камня (отслоившиеся кусочки или чешуйки камня размером от 0.5 до 0.8 мм) с признаками биологического повреждения, которые готовили для СЭМ исследования по специальной методике

(Wollenzien, 1995), напыляли золотом (слой напыления – 20 нм). Образцы просматривали в сканирующем электронном микроскопе Hitachi TM3000 в “Ресурсном центре микроскопии и микроанализа” (СПбГУ).

С помощью метода газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС) был выполнен анализ содержания малых органических молекул в типовых биопленках. Образцы фиксировали холодным метанолом (15 мл, –25°C), полученный экстракт собирали, а образцы экстрагировали повторно метанолом при комнатной температуре в течение 6 часов. Далее экстракты объединяли и выпаривали при 40°C, растворяли в пиридине и получали ТМС-производные с помощью N, O-Бис(триметилсилил)-F-ацетамида. Анализ экстрактов проводили на приборе Agilent с масс-селективным детектором MSD5975 (США), колонка HP-5MS, 30 м × 0.25 мм. Хроматографирование проводили при линейном программировании температуры от 70 до 320°C со скоростью 4°C/мин. Сбор данных осуществляли с помощью программного обеспечения Agilent ChemStation. Обработку и интерпретацию масс-спектрометрической информации проводили с использованием программы AMDIS (<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. Количественную интерпретацию метаболомного профиля осуществляли по площадям пиков полного ионного тока методом внутреннего стандарта с помощью программы UniChrom (www.unichrom.com).

Статистическая обработка результатов была выполнена методами мультивариантной статистики с использованием программ Microsoft Excel; Multibase2015; Origin Pro.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований на каменных памятниках в Санкт-Петербурге было выявлено 90 видов микроскопических грибов из 52 родов. Большая часть из них (57 видов) выявлена на поврежденных памятниках из итальянского мрамора. На уральском и карельском мраморах было отмечено 37 и 42 вида микромицетов соответственно (табл. 1). На известняке выявлено 49 видов грибов. На силикатных породах видовое разнообразие микромицетов было меньше (41 вид), чем на карбонатных (80 видов). На сердобольском (сером) граните и розовом граните было выявлено по 32 и 31 виду микромицетов соответственно, на габбро – 24, а на гнейсе – 15 видов микромицетов. Общими для всех сравниваемых горных пород оказались 10 видов грибов. Общими для карбонатных пород были 19 видов грибов, а для силикат-

ных 12 видов. Полученные результаты свидетельствуют о том, что на изученных каменных субстратах преобладают анаморфные аскомицеты.

Наиболее богатым по числу видов оказались роды *Penicillium* и *Aspergillus* – по восемь видов. Роды *Acremonium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Exophiala*, *Fusarium*, *Mucor* содержали от трех до четырех видов. Остальные роды были представлены 1–2 видами. Значительную часть видового списка составили темноокрашенные микромицеты (около 60%), в том числе дрожжеподобные.

На рис. 1 показано распределение в пространстве главных компонент комплексов микромицетов, выявленных на различных типах камня культуральными методами (для расчетов использовали показатель встречаемости). Комплексы микромицетов на силикатных и карбонатных породах четко расходятся в пространстве главных компонент, формируя разные кластеры. При этом группы доминирующих видов для разных типов каменного субстрата оказались довольно близкими. Известняк по видовому составу микромицетов значительно отличался от мрамора, что может быть связано с неоднородной структурой известняка, позволяющей грибам находить микроусловия для своего развития. Виды *Acremonium felinum*, *A. hyalinulum*, *A. potronii*, *Acrostalagmus luteoalbus*, *Clonostachys rosea*, *Mucor plumbeus*, *Myrmecridium schulzeri*, *Oidiodendron tenuissimum*, *Pleurostoma repens*, *Pseudogymnoascus pannorum*, *Saprochaete suaveolens*, *Staphylotrichum coccosporum* и *Trichocladium asperum* были выявлены только на известняке. Отмечены определенные различия для разных типов мраморов (уральского, карельского, итальянского). Так, видовые комплексы микромицетов уральского и карельского мраморов группируются наиболее близко друг к другу (рис. 1), в то время как итальянский мрамор несколько удален от них.

Количество видов, отмеченных на всех субстратах, оказалось относительно небольшим. На всех породах, с которых отбирали микологические пробы, присутствовали *Alternaria alternata*, *A. chartarum*, *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium cladosporioides*, *C. sphaerospermum*, *Didymella glomerata*, *Epicoccum nigrum*, *Penicillium brevicompactum*, *Sydowia polyspora*, *Trichoderma viride*. Можно отметить обилие микромицетов, обычно упоминаемых в связи с растительными субстратами (фитопатогены или сапротрофы на растительных остатках). Вероятно, их находки обусловлены попаданием спор грибов с окружающих растений на каменный субстрат.

При СЭМ исследовании поверхности каменного субстрата с признаками биологического повреждения были отмечены микроколонии и гифы микроскопических грибов на всех изученных типах мрамора, известняка и гранита. Во многих случаях микромицеты входили в состав биопленок (сообществ), объединяющих различные микроорга-

Таблица 1. Микромицеты на каменных памятниках музейных некрополей в Санкт-Петербурге

Виды микромицетов	Карбонатные породы				Силикатные породы			
	Итальянский мрамор	Уральский мрамор	Карельский мрамор	Известняк	Сердобольский (серый) гранит	Розовый гранит	Габбро	Гнейс
<i>Acremoniella atra</i> (Corda) Sacc.					+			
<i>Acremonium felinum</i> (Marchal) Kiyuna, K.D. An, Kigawa et Sugiy				+	+			
<i>A. hyalinulum</i> (Sacc.) W. Gams				+				
<i>A. potronii</i> Vuill.				+				
<i>Acrostalagmus luteoalbus</i> (Link) Zare, W. Gams et Schroers				+				
<i>Alternaria alternariae</i> (Cooke) Woudenberg et Crous		+	+					
<i>A. alternata</i> (Fr.) Keissl.	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. chartarum</i> Preuss	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. chlamydospora</i> Mouch.	+							
<i>A. oudemansii</i> (E.G. Simmons) Woudenb. et Crous					+	+	+	+
<i>Arthrimum arundinis</i> (Corda) Dyko et B. Sutton	+							
<i>A. phaeospermum</i> (Corda) M.B. Ellis	+	+		+	+	+		
<i>Aspergillus clavatus</i> Desm.	+							
<i>A. flavus</i> Link	+							
<i>A. fumigatus</i> Fresen.	+							
<i>A. glaucoaffinis</i> Samson et W. Gams	+			+				
<i>A. niger</i> Tiegh.	+	+	+	+	+	+	+	
<i>A. ochraceus</i> G. Wilh.	+			+				
<i>A. ustus</i> (Bainier) Thom et Church	+	+						
<i>A. versicolor</i> (Vuill.) Tirab.	+		+	+		+	+	
<i>Aureobasidium pullulans</i> (de Bary et Löwenthal) G. Arnaud	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bisifusarium dimerum</i> (Penz.) L. Lombard et Crous	+							
<i>Botrytis cinerea</i> Pers.	+		+	+	+	+		
<i>Cadophora fastigiata</i> Lagerb. et Melin					+			
<i>C. melinii</i> Nannf.		+	+					
<i>Candida albicans</i> (C.P. Robin) Berkhout	+	+	+					
<i>Chaetomium globosum</i> Kunze	+	+	+	+	+	+		+
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. herbarum</i> (Pers.) Link	+	+	+	+	+	+	+	
<i>C. sphaerospermum</i> Penz.	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Clonostachys rosea</i> (Link) Schroers, Samuels, Seifert et W. Gams				+				
<i>Coniosporium</i> sp.	+	+	+	+		+	+	+
<i>Cordyceps javanica</i> (Bally) Kepler, B. Shrestha et Spatafora				+	+			
<i>Cunninghamella echinulata</i> (Thaxt.) Thaxt. ex Blakeslee	+	+						
<i>Curvularia pallescens</i> Boedijn	+	+	+					
<i>C. clavata</i> B.L. Jain	+							
<i>Didymella glomerata</i> (Corda) Qian Chen et L. Cai	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Epicoccum nigrum</i> Link	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Exophiala exophialae</i> (de Hoog) de Hoog	+	+	+					
<i>E. jeanselmei</i> (Langeron) McGinnis et A.A. Padhye	+	+	+					

Таблица 1. Продолжение

Виды микромицетов	Карбонатные породы				Силикатные породы			
	Итальянский мрамор	Уральский мрамор	Карельский мрамор	Известняк	Сердобольский (серый) гранит	Розовый гранит	Габбро	Гнейс
<i>E. moniliae</i> de Hoog	+			+				
<i>Fusarium chlamydosporum</i> Wollenw. et Reinking					+			
<i>F. oxysporum</i> Schltdl.	+	+	+	+		+	+	+
<i>F. sporotrichioides</i> Sherb.	+	+	+	+				
<i>Gibellulopsis nigrescens</i> (Pethybr.) Zare, W. Gams et Summerb.	+	+						
<i>Histoplasma capsulatum</i> Darling	+							
<i>Microascus brevicaulis</i> S.P. Abbott			+					
<i>Monodictys levis</i> (Wiltshire) S. Hughes						+		
<i>Mortierella lignicola</i> (G.W. Martin) W. Gams et R. Moreau	+							
<i>Mucor hiemalis</i> Wehmer	+		+	+	+			
<i>M. plumbeus</i> Bonord.				+				
<i>M. racemosus</i> Fresen.	+	+	+	+	+	+		
<i>M. ramosissimus</i> Samouts.	+	+		+				
<i>Myrmecridium schulzeri</i> (Sacc.) Arzanlou, W. Gams et Crous				+				
<i>Neocosmospora solani</i> (Mart.) L. Lombard et Crous					+	+	+	+
<i>Oidiodendron flavum</i> Svilv.			+					
<i>O. tenuissimum</i> (Peck) S. Hughes				+				
<i>Paecilomyces divaricatus</i> (Thom) Samson, Houbraken et Frisvad	+		+					
<i>P. variotii</i> Bainier						+		
<i>Penicillium aurantiogriseum</i> Dierckx	+	+	+					
<i>P. brevicompactum</i> Dierckx	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. chrysogenum</i> Thom					+	+	+	
<i>P. citrinum</i> Thom				+	+			
<i>P. commune</i> Thom		+						
<i>P. decumbens</i> Thom						+	+	
<i>P. expansum</i> Link	+		+					
<i>P. herquei</i> Bainier et Sartory			+	+	+		+	
<i>Phaeosclera dematioides</i> Sigler, Tsuneda et J.W. Carmich.	+	+	+					
<i>Phaeotheca</i> sp.	+	+	+					
<i>Phialophora asteris</i> (Dowson) Burge et I. Isaac	+	+	+	+				
<i>Phoma herbarum</i> Westend.	+				+	+		
<i>Ph. leveillei</i> Boerema et G.J. Bollen	+	+						
<i>Pleurostoma repens</i> (R.W. Davidson) Réblová et Jaklitsch				+				
<i>Pseudogymnoascus pannorum</i> (Link) Minnis et D.L. Lindner				+				
<i>Rhizopus stolonifer</i> (Ehrenb.) Vuill.	+	+	+	+		+		
<i>Saprochaete suaveolens</i> (Krzemecki) de Hoog et M.T. Sm.				+				
<i>Sarcinomyces</i> sp.	+		+					
<i>Sarocladium strictum</i> (W. Gams) Summerb.			+	+		+	+	
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) de Bary	+		+	+				
<i>Scytalidium lignicola</i> Pesante	+		+	+	+	+	+	

Таблица 1. Окончание

Виды микромицетов	Карбонатные породы				Силикатные породы			
	Итальянский мрамор	Уральский мрамор	Карельский мрамор	Известняк	Сердобольский (серый) гранит	Розовый гранит	Габбро	Гнейс
<i>Stachybotrys chartarum</i> (Ehrenb.) S. Hughes	+	+						
<i>Staphylotrichum coccosporum</i> J.A. Mey. et Nicot				+				
<i>Sydowia polyspora</i> (Bref. et Tavel) E. Müll.	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Taenionella</i> sp.	+		+	+				
<i>Talaromyces diversus</i> (Raper et Fennell) Samson, N. Yilmaz et Frisvad							+	
<i>T. purpureogenus</i> Samson, Yilmaz, Houbraken, Spierenb., Seifert, Peterson, Varga et Frisvad	+			+	+			
<i>Trichocladium asperum</i> Harz				+				
<i>T. griseum</i> (Traaen) X. Wei Wang et Houbraken		+	+	+	+	+		
<i>Trichoderma koningii</i> Oudem.	+				+	+	+	
<i>T. viride</i> Pers.	+	+	+	+	+	+	+	+
Итого:	57	37	42	49	32	31	24	15
	80				41			

низмы. Доминирующей формой существования грибов на различных породах камня по данным СЭМ исследования оказались микроколони (рис. 2).

Можно выделить несколько типов микроколони. Мелкие компактные скопления (от 20 до 100 мкм), состоящие из округлых толстостенных клеток, занимающих небольшие углубления на поверхности камня. Часто в состав микроколони входят частицы самого каменного субстрата. Более крупные колонии (от 100 до 500 мкм) вклю-

чают округлые толстостенные клетки и короткие гифы. Иногда такие колонии состоят только из цепочек толстостенных клеток. Грибы способны проникать по микротрещинам, порам и углублениям в толщу каменного субстрата, вызывая при этом ослабление поверхностного слоя горной породы. При этом характер колонизации камня во многом зависит от свойств субстрата, внешних условий, а также состава литобионтного сообщества (рис. 2, а–е). Так, на поверхности гранита микроколони и четкообразные короткие гифы, состоящие из округлых утолщенных клеток, развивались преимущественно, по полевому шпату, где имеются углубления и неоднородные участки (рис. 2, а). На крупнозернистом (уральском) мраморе структуры грибов (типичные гифы и микроколони) были приурочены к бороздам вокруг кристаллов кальцита (рис. 2, б). Поверхность мелкозернистого мрамора локально была покрыта плотным сплетением гиф и микроколони (рис. 2, в), образующих сплошную биопленку в местах интенсивной деструкции поверхностного слоя камня. В пространствах вокруг кристаллов кальцита были отмечены типичные микроколони с отходящими от них проникающими гифами (рис. 2, г). На поверхности известняка, характеризующейся наибольшей неоднородностью, микромицеты концентрировались в углублениях, кавернах, микротрещинах (рис. 2, д, е).

Таким образом, данные СЭМ исследования показывают, что на поверхности каменных памятников Санкт-Петербурга микромицеты образуют

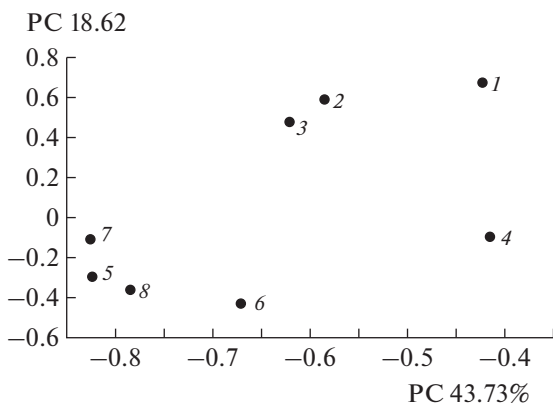


Рис. 1. Распределение в пространстве главных компонент комплексов микромицетов, выявленных на памятниках из различных горных пород: 1 – итальянский мрамор; 2 – уральский мрамор; 3 – карельский мрамор; 4 – известняк; 5 – розовый гранит; 6 – сердобольский (серый) гранит; 7 – гнейс; 8 – габбро.

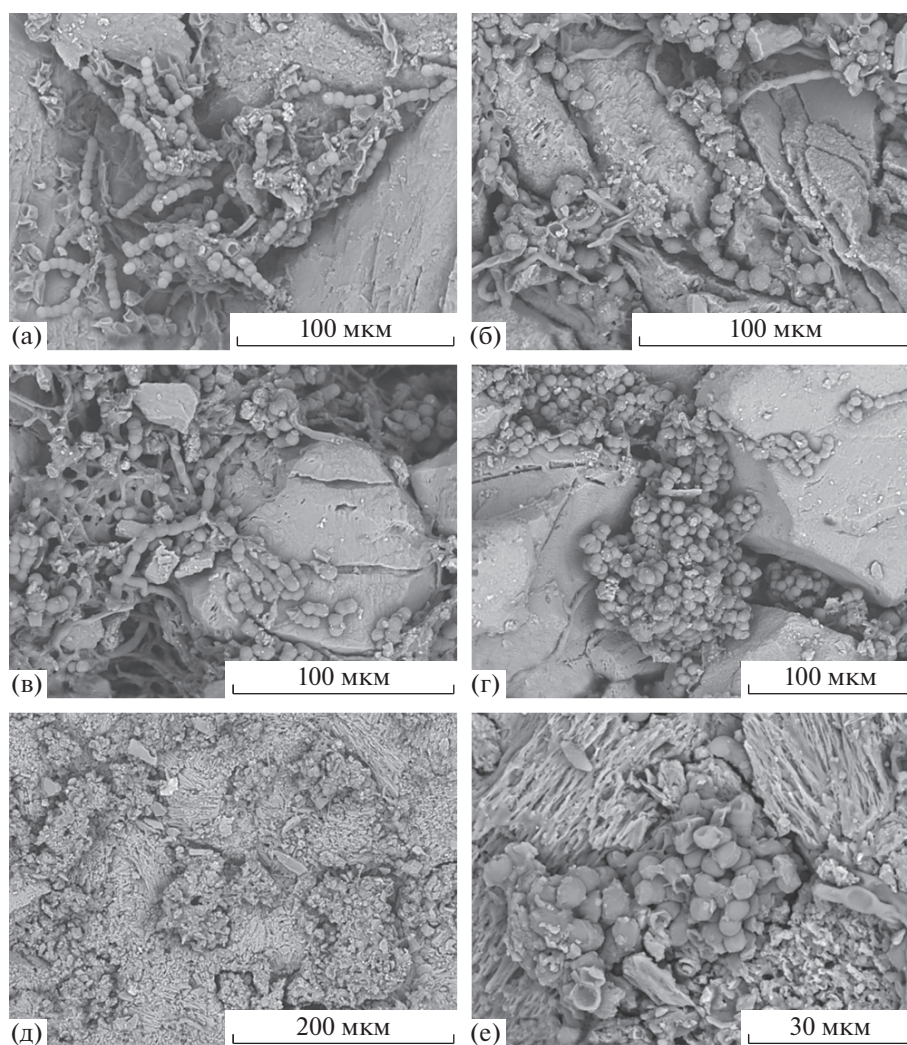


Рис. 2. Микроколонии и гифы микромицетов на поверхности каменных памятников (сканирующая электронная микроскопия): а — розовый гранит; б — крупнозернистый уральский мрамор; в, г — каррарский мелкозернистый мрамор; д, е — известняк.

как типичные гифальные структуры, так и характерные для микобиоты каменных субстратов микроколонии. При этом размеры микроколоний обусловлены размерами межкристаллического пространства.

Выше мы отмечали, что микромицеты на каменных памятниках встречаются не изолированно, а в составе биопленок или наслоений различной природы (рис. 3, а–е). Для оценки приуроченности грибов к определенным типам поверхностных образований на каменных памятниках был проведен микологический анализ:

- серо-черных биопленок с доминированием грибов;
- зеленых и серо-зеленых биопленок с доминированием аэрофитных водорослей *Chlorophyta*;

- биопленок с доминированием накипных лишайников (*Verrucaria* spp., *Lecanora* spp., *Acarospora* spp., *Candelariella* sp., *Caloplaca* sp.);

- поверхностных наслоений неопределенного состава (атмосферные и антропогенные загрязнения);

- гипсовых корок, широко встречающихся на памятниках из мрамора и известняка;

- отделяющихся от основной породы и находящихся на поверхности камня мелких фрагментов каменного материала (“выкрашивание”).

При СЭМ исследовании биопленок и наслоений (рис. 3) были отмечены кристаллы оксалатов кальция на границе биопленки серо-зеленого цвета (рис. 3, а–б) и кристаллы гипса, из которых сложена гипсовая корка (рис. 3, в–г). Рост грибных гиф наблюдался среди кристаллов гипса (рис. 3, г — врезка). По результатам выделения грибов из гип-

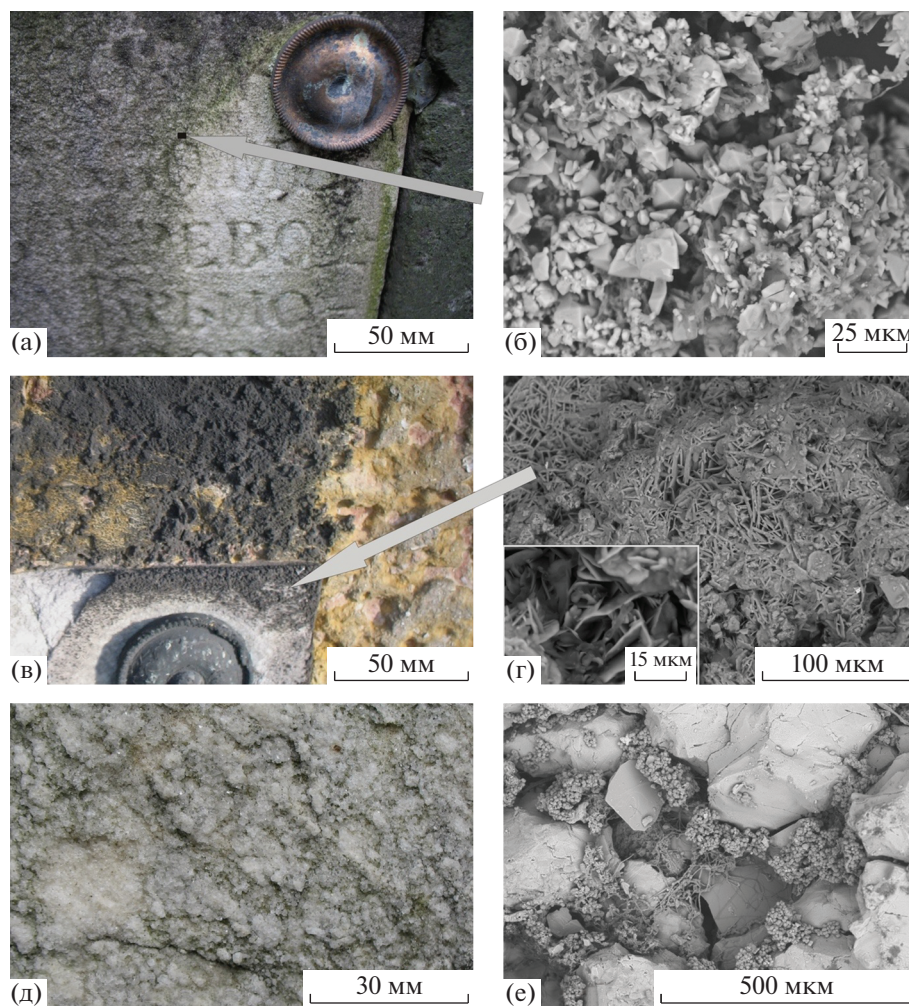


Рис. 3. Биопленки и наслоения на поверхности каменных памятников из карбонатных пород: а, б — кристаллы оксалата кальция в биопленке на поверхности мелкозернистого мрамора (музейный некрополь “Литераторские мостки”); в, г — гипсовая корка на поверхности известняка и мрамора (музейный некрополь “Литераторские мостки”); д, е — “выкрашивание” мелкозернистого итальянского мрамора (музейный некрополь XVIII в.).

совой корки чаще всего отмечали *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium cladosporioides*, *C. sphaeropermium*, *Coniosporium* sp. Эти грибы выявляются на всех стадиях формирования гипсовой корки. Однако наибольшее развитие микромицетов можно наблюдать при “выкрашивании” мелкозернистого мрамора (рис. 3, д–е), при котором микроколонии и гифы грибов разрастаются вокруг кристаллов камня. Здесь также преобладают темноокрашенные микромицеты, упомянутые выше.

Наиболее богатыми по видовому составу оказались биопленки с доминированием грибов, биопленки с доминированием лишайников и наслоения неопределенной природы — по 36 видов микромицетов (рис. 4). Меньше всего видов было отмечено в образцах гипсовых корок (22 вида). Интересно отметить, что доминирующие группировки видов для всех типов биопленок и наслоений оказались очень близки. Абсолютным доми-

нантом по встречаемости был микромицет *Aureobasidium pullulans*.

На рис. 5 представлены результаты анализа методом главных компонент (МГК) комплексов микромицетов, выявленных в различных типах биопленок и наслоений на каменных памятниках музейных некрополей в Санкт-Петербурге. Для расчетов использовали показатели встречаемости каждого вида. Результаты показывают обособленное положение комплексов микромицетов гипсовой корки по отношению к другим типам биопленок и наслоений. Пробы с доминированием грибов и образцы “выкрашивания” поверхности камня располагаются близко друг к другу. Это вполне согласуется с результатами СЭМ анализа, которые указывают на непосредственное участие микромицетов в проявлении данного типа разрушения памятников. Образцы наслоений неопределенной природы занимают промежуточное положение по

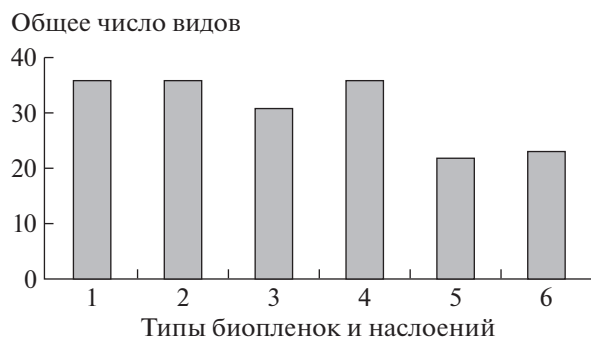


Рис. 4. Число видов микромицетов в типовых биопленках и наслоениях: 1 — биопленка с доминированием грибов; 2 — биопленка с доминированием лишайников; 3 — биопленка с доминированием водорослей; 4 — наслоения неопределенного состава; 5 — гипсовая корка; 6 — “выкрашивание” камня.

составу микромицетов и незначительно обособлены от биопленок с доминированием грибов и водорослей. Биопленки с доминированием водорослей и лишайников располагаются довольно близко, что может быть связано с общими особенностями биохимического состава этих наслоений.

С помощью ГХ-МС был выполнен анализ содержания малых органических молекул в перечисленных выше типах биопленок и наслоений. Выявленные соединения могут являться как внутриклеточными метаболитами литобионтных организмов, так и выделяться ими во внешнюю среду. В биопленках, сформированных микроскопическими грибами, водорослями и лишайниками, а также в пробах “выкрашивания” поверхностного слоя камня было выявлено около 60 различных низкомолекулярных соединений: моно-, ди- и трисахариды, карбоновые кислоты алифатического ряда (янтарная кислота, глицериновая кислота, эритроновая кислота, жирные кислоты (пеларгоновая, каприновая, ундециловая, лауриновая, миристиновая, пальмитиновая, линолевая, олеиновая, стеариновая, арахидоновая, бегеновая, лигноцербиновая, азе-лаиновая), полиолы (глицерол, эритритол, арабитол, маннитол, хиро-инозитол, мио-инозитол, глюко-инозитол), стериды (холестерол, кампостерол, сигмистерол, ситостерол), фосфат, глицерол-3-Р, токоферол, абиетиновая кислота, фенольные соединения.

В биопленках с доминированием водорослей количество моно- и дисахаров, аминокислот и органических кислот в свободной форме было значительно выше в сравнении с другими типами биопленок и наслоений. В биопленках с доминированием грибов и в пробах “выкрашивания” поверхностного слоя камня количество органических кислот было ниже по сравнению с пробами, в которых доминировали водоросли, а концентрации полиолов, наоборот, оказались значительно выше (доминировали по количественному содер-

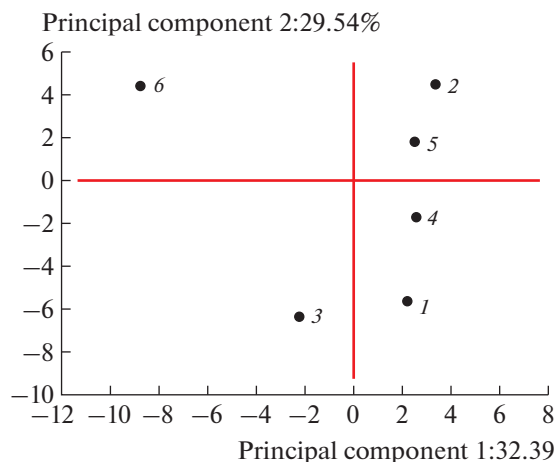


Рис. 5. Распределение в пространстве главных компонент различных типов биопленок и наслоений в соответствии с видовым составом выявленных в них микромицетов: 1 — биопленки с доминированием водорослей; 2 — биопленки с доминированием грибов; 3 — биопленки с доминированием лишайников; 4 — наслоения неопределенного состава; 5 — “выкрашивание” камня; 6 — гипсовая корка.

жанию в метаболомном профиле). В биопленках с доминированием лишайников преобладали полиолы и фенольные соединения. Доминирование полиолов скорее всего определяется процессами метаболизма грибов. Известно, что сахароспирты синтезируются и выполняют физиологические функции в растениях, но в большей степени они характерны для грибов, отчасти заменяя сахара (Bielecki, 1982).

Образцы гипсовой корки были наименее богаты по составу низкомолекулярных органических соединений. В этих пробах присутствовало небольшое количество органических веществ: сахара (фруктоза, ксилоза, глюкоза, дисахариды), полиолы (глицерол, сорбитол, мио-инозитол, арабитол) а также глюконовая кислота. В некоторых образцах были обнаружены также щавелевая и лимонная кислоты в количествах до 10 мкг/г. В поверхностных наслоениях неопределенной природы содержание низкомолекулярных органических веществ было представлено главным образом жирными кислотами, сахароспиртами и сахарами. В целом разнообразие малых органических молекул в подобных наслоениях оказалось значительно меньше, чем в биопленках с доминированием грибов, водорослей или лишайников, но их количественное содержание было сопоставимо. Щавелевая кислота была обнаружена лишь в отдельных пробах гипсовой корки и практически не содержалась в свободной форме в образцах биопленок. Тем не менее, в биопленках с доминированием грибов и лишайников на карбонатных породах часто можно было видеть характерные кристаллы оксалата кальция. Это можно объяснить присут-

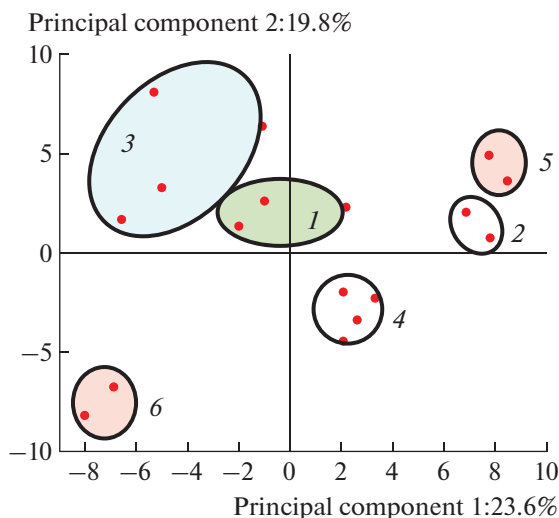


Рис. 6. Распределение в пространстве главных компонент различных типов биопленок и наслоений в соответствии с составом низкомолекулярных органических веществ: 1 — биопленки с доминированием водорослей; 2 — биопленки с доминированием грибов; 3 — биопленки с доминированием лишайников; 4 — наслоения неопределенного состава; 5 — “выкрашивание” камня; 6 — гипсовая корка.

ствием в биопленках грибов, которые являются активными продуцентами щавелевой кислоты. Особенно активная продукция оксалата характерна для грибов родов *Penicillium* и *Aspergillus* (Sazanova et al., 2016). Кроме того, образование щавелевой кислоты характерно и для некоторых видов лишайников (Seaward, 2015).

Статистический анализ полученных данных с использованием МГК показал, что типы биопленок и наслоений четко кластеризуются на основании данных по количественному содержанию низкомолекулярных соединений (рис. 6), что, вероятно, связано с биохимической активностью доминирующих организмов. Сопоставление полученного распределения с кластеризацией биопленок по составу микромицетов демонстрирует заметное сходство полученных распределений. Вероятно, это сходство связано с трофическими потребностями определенных видов грибов, прежде всего, быстрорастущих видов, нуждающихся в достаточном количестве углерода.

Высокие концентрации сахаров и полиолов, обнаруженные в биопленках и наслоениях на поверхности памятников, представляют собой доступный источник углерода для развития микромицетов и других микроорганизмов, и, таким образом, могут участвовать в процессах кометаболизма литобионтного сообщества.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект “Современное минералообразование при участии микроорганизмов”, № 19-17-00141). СЭМ исследования вы-

полнялись в “Ресурсном центре микроскопии и микроанализа” (СПбГУ).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Benoit I., van den Esker M.H., Patyshakuliyeva A. et al. *Bacillus subtilis* attachment to *Aspergillus niger* hyphae results in mutually altered metabolism. *Environmental Microbiol.* 2015. V. 17 (6). 2099–2113.
- Bielecki R.L. Sugar alcohols. In: Loewus F.A., Tanner W. (eds). *Plant carbohydrates I: Intracellular carbohydrates*, encyclopedia of plant physiology, 13A. Springer, N.York., 1982, pp. 158–192.
- De Leo F., Urzi C. Microfungi from deteriorated materials of cultural heritage. In: Misra J.K. et al. (eds). *Fungi from different substrates*. CRC Press, Taylor and Francis group, N.Y., 2015, pp. 144–158.
- Farooq M., Hassan M., Hassan M., Gul F. Mycobial deterioration of stone monuments of Dharmarajika, Taxila. *J. Microbiol. Experimentation.* 2015. V. 2 (1). P. 29–33.
- Gadd G.M. Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycol. Res.* 2007. № 111. P. 3–49.
- Kurakov A.V., Somova N.G., Ivanovskii R.N. Micromycetes populating limestone and red brick surfaces of the Novodevichii convent masonry. *Microbiology.* 1999. V. 68 (2). P. 273–282 (in Russ.).
- Martino P.D. What about biofilms on the surface of stone monuments? The open conference proceedings journal. 2016. V. 6. (Suppl 1: M2). P. 14–28.
- Monuments of museum necropoli of Saint Petersburg. Existence, materials, diagnostics of the preservation. Vlasov D.Yu., Rytikova V.V., Frank-Kamenetskaya O.V. (eds). SPb., 2016 (in Russ.).
- Panova Ye.G., Vlasov A.D., Popova T.A. et al. Biological weathering of granite in urban environments. *Biosphere.* 2015. V. 7 (1). 61–79 (in Russ.).
- Rytikova V.V. Springer nature Switzerland AG, 2019.
- Salvadori O., Municchia A.C. The role of fungi and lichens in the biodeterioration of stone monuments. The Open Conference Proceeding Journal. 2015. № 6 (Suppl 1: M 4). P. 70–82.
- Sazanova K.V., Shchiparev S.M., Vlasov D.Yu. Formation of organic acids by fungi isolated from the surface of stone monuments. *Microbiology.* 2014. V. 83 (5). C. 516–522.
- Sazanova K.V., Vlasov D.Yu., Osmolovskaya N.G. et al. Significance and regulation of acids production by rock-inhabited fungi. In: Frank-Kamenetskaya O.V. et al. (eds). *Biogenic – abiogenic interactions in natural and anthropogenic Systems*. Springer, 2016, pp. 379–392.
- Sazanova K.V., Vlasov D.Yu., Shavarda A.L. et al. Metabolo-mic approach to studying lythobiontic communities. *Biosphere.* 2016. V. 8 (3). P. 291–300 (in Russ.).
- Seaward M.R.D. Lichens as agents of biodeterioration. In: Upreti D.K., Divakar P.K., Shukla V., Bajpai R. (eds). *Recent advances in lichenology*. V. 1. Springer India, New Delhi., 2015, pp. 189–211.
- Sterfvinger K. Fungi as geologic agents. *Geomicrobiology Journal.* 2000. V. 17. P. 97–124.
- The effect of the environment on Saint Petersburg’s cultural heritage. Results of monitoring the historical necropolis

- monuments / Frank-Kamenetskaya O.V., Vlasov D.Yu., Rytikova V.V. Springer Nature Switzerland AG, 2019.
- Vlasov D.Yu., Gorbushina A.A., Zelenskaya M.S. et al. A review of research methods of fungi that damage monuments of architecture and art. In: Cherepanova N.P. (ed.). Actual problems in mycology. N 47. SPb., 2001, pp. 88–100 (in Russ.).
- Vlasov D.Yu., Zelenskaya M.S., Frank-Kamenetskaya O.V. Micromycetes on marble monuments of Alexander-Nevskaya lavra museum necropolis (St. Petersburg). Mikologiya i fitopatologiya. 2002. V. 36 (3). P. 7–10 (in Russ.).
- Warscheid Th., Braams J. Biodeterioration of stone: a review. International Biodeterioration and Biodegradation. 2000. V. 46. P. 343–368.
- Wollenzien U., de Hoog G.S., Krumbein W.E. et al. On the isolation of microcolonial fungi occurring on and in marble and other calcareous rocks. Sci. Total Environ. 1995. № 167. P. 287–294.
- Власов Д.Ю., Зеленская М.С., Горбушина А.А. и др. (Vlasov et al.) Обзор методов исследования грибов, повреждающих памятники архитектуры и искусства. Под ред. Н.П. Черепановой Актуальные проблемы микологии. СПб., 2001, № 47. С. 88–100.
- Власов Д.Ю., Зеленская М.С., Франк-Каменецкая О.В. (Vlasov et al.) Микромикеты на мраморных памятниках музейных некрополей Александро-Невской Лавры (Санкт-Петербург) // Микология и фитопатология. 2002. Т. 36 (3). С. 7–10.
- Кураков А.В., Сомова Н.Г., Ивановский Р.Н. (Kurakov et al.) Микромикеты – обитатели поверхности белокаменных и кирпичных сооружений Новодевичьего монастыря // Микробиология. 1999. Т. 68. № 2. С. 273–282.
- Памятники музейных некрополей Санкт-Петербурга. Бытование, материалы, диагностика сохранности: Монография (Monuments). СПб., Изд-во ВВМ, 2016.
- Панова Е.Г., Власов А.Д., Попова Т.А. и др. (Panova et al.) Биологическое выветривание гранита в условиях городской среды // Биосфера. 2015. Т. 7 (1). С. 61–79.
- Сазанова К.В., Щупарев С.М., Власов Д.Ю. (Sazanova et al.) Образование органических кислот грибами, изолированными с поверхности памятников из камня // Микробиология. 2014. Т. 83. № 5. С. 1–9.
- Сазанова К.В., Власов Д.Ю., Шаварда А.Л. и др. (Sazanova et al.) Метаболический подход в изучении литобионтных сообществ. Биосфера. 2016. Т. 8. № 3. С. 291–300.

Micromycetes in the Biofilms on Stone Monuments of Saint Petersburg

K. V. Sazanova^{a,#}, M. S. Zelenskaya^{b,##}, S. Yu. Bobir^{c,###}, and D. Yu. Vlasova^{a,b,####}

^a Komarov Botanical Institute of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

^b Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

^c A.I. Herzen Russian State Pedagogical University, St. Petersburg, Russia

[#]e-mail: ksazanova@binran.ru

^{##}e-mail: marsz@yandex.ru

^{###}e-mail: sv_bobir@mail.ru

^{####}e-mail: dmitry.vlasov@mail.ru

The paper discusses the structural features of micromycete communities on monuments of various types of stone in Saint Petersburg. It has been shown that the groups of dominant species are generally similar on the different rocks used to create the monuments. Peculiarities of fungal diversity in lithobiont communities are mainly associated with rare and random species. Carbonate rocks were characterized by a higher diversity of micromycetes than silicate rocks. Identified 90 species of micromycetes, the vast majority of which are anamorphic ascomycetes. Differences in the content of organic substances in biofilms and stratifications on the stone surface have little effect on the formation of groups of dominant and frequently occurring species, but are consistent with the structural features of micromycete complexes in the studied habitats. The presence of calcium oxalates in the studied samples of damaged stone proves the role of microorganisms in the processes of modern mineral formation.

Keywords: biodeterioration, biofilms, biomineralization, micromycetes, stone monuments