

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ ЭКСТРАКТОВ ЛИШАЙНИКОВ
И ЛИХЕНОФИЛЬНЫХ ГРИБОВ НА РОСТ *IN VITRO* КЛИНИЧЕСКИ
ЗНАЧИМЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

© 2023 г. Т. А. Панкратов^а*, Р. Е. Щербатов^б, А. А. Дельцов^б

^а Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, 119071 Россия

^б Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА
имени К.И. Скрябина, Москва, 109472 Россия

*e-mail: tpankratov@gmail.com

Поступила в редакцию 30.05.2023 г.

После доработки 05.07.2023 г.

Принята к публикации 05.07.2023 г.

Исследована активность этанольных экстрактов лишайников (ЭЛ) и культур лихенофильных (эндобионтных) грибов лишайников (ЭГЛ), а также их этанольных экстрактов в отношении тест-культур *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecium*, *Paenibacillus* sp., *Candida parapsilosis*. Выявлена избирательная активность ЭЛ и ЭГЛ в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также дрожжей. Большая часть экстрактов лишайников и культур грибов не были активны в отношении грамотрицательных бактерий. Экстракты *Cladonia rangiferina* были неактивны в отношении всех тестируемых культур. Выявлен и подтвержден ранее описанный эффект локуса на активность метаболитов одного вида лишайников. Методом агаровых блоков выявлена избирательная активность 23 из 61 проанализированного штамма грибов в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, 8 — в отношении дрожжей. Этанольные экстракты шести культур были способны угнетать рост *St. aureus*, *M. luteus*, *Paenibacillus* sp. и *E. coli*. Штамм NM10F28209 из лишайника *Stereocaulon paschale* проявлял наибольшую ингибирующую активность в отношении *Ca. parapsilosis* и *Y. lipolytica* и выбран для приоритетной разработки фунгицидного препарата.

Ключевые слова: биоциды, лишайники, эндобионты лишайников, этанольные экстракты

DOI: 10.31857/S002636562360027X, EDN: BPNRES

Проблема применения антибиотиков в здравоохранении и ветеринарии становится все более актуальной на фоне увеличения частоты встречаемости резистентных к традиционно используемым антибиотикам штаммов микроорганизмов. Эта проблема носит общемировой характер. В 2019 г. в мире зарегистрировано 4.95 млн смертей, связанных с антибиотикорезистентными бактериями (АРБ). Шесть патогенов-лидеров по смертности, связанной с резистентностью (*Escherichia coli*, затем *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa*), были ответственны за 929 тысяч смертей, связанных с АРБ (Antimicrobial Resistance Collaborators, 2022). По прогнозам Всемирной организации здравоохранения смертность от инфекций, связанных антибиотикорезистентными микроорганизмами, может достигнуть к 2050 г. 10 млн человек (de Kraker et al., 2016).

В этой связи поиск новых биоцидных препаратов, преодолевающих резистентность патогенных микроорганизмов, становится все более актуальным. В методиках, применяемых для оценки биоцидности препаратов, классическими тест-объектами являются *Staphylococcus aureus* (в том числе, метициллин-резистентные), *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* (Ефименко и соавт., 2018; Демьянкова и соавт., 2021). Для решения задач, которые связаны с поиском биоцидных препаратов, выбор тест-культур может быть определен не только их ролью в клинической практике, но и с учетом перспектив использования на пищевом производстве, в ветеринарии и сельском хозяйстве. В этом случае спектр используемых тест-объектов может меняться и включать, в том числе, штаммы, выделенные из природных сред.

В последние десятилетия внимание биотехнологов и медиков привлекают лишайники как источни-

ки биологически активных соединений, способных регулировать численность патогенных организмов и проявлять противоопухолевую активность (Molnára, Farkas, 2010; Noh et al., 2021a). Лишайники являются сырьем для получения усниновой, проточетраровой, физодовой и других “лишайниковых кислот” (Molnára, Farkas, 2010). Вместе с тем, существуют ограничения, связанные с использованием природного растительного сырья и необходимостью сохранения среды обитания зависимых от лишайников видов животных. Альтернативой экстракции биологически активных соединений из природного сырья является биотехнологический подход: поиск микроорганизмов, образующих в процессе роста на лабораторных питательных средах сходные с лишайниковыми кислотами соединения, проявляющие бактерицидную и фунгицидную активность. На основе таких препаратов возможно создание комбинированных лекарственных средств, сочетающих в себе классические антибиотики и усиливающие их активность адаптогены. При этом, как показала практика, применение таких препаратов приводит к преодолению проблемы резистентности (Nikolaev et al., 2020). Таким образом, значимость и актуальность разработки новых препаратов, заменяющих или дополняющих известные на данный момент антибиотики, не вызывает сомнений.

Целями настоящего исследования были: изучение биоцидной активности этанольных экстрактов лишайников различных видов в зависимости от их географической локализации; выделение из лишайников различных географических зон лишайниковых грибов в чистые культуры и анализ спектра их биоцидной активности; оценка влияния этанольных экстрактов и культуральной жидкости полученных культур грибов на рост грамположительных и грамотрицательных бактерий и дрожжей *Ca. parapsilosis*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Образцы лишайников и экстракция. Талломы эпигейных и эпиксильных лишайников были собраны в период 2020–2022 гг. в различных регионах России (табл. 1). Определение родовой и видовой принадлежности образцов проводили по определителям (Определитель лишайников России, 1996; Цуриков, Корчиков, 2018).

Для получения спиртовых экстрактов сухие талломы измельчали в ступке. Измельченный материал (1 г) помещали в стеклянные пробирки с притертой пробкой и заливали 5 мл 95% этанола. Оставляли для экстракции на 10 сут при температуре 45°C. Полученный экстракт фильтровали, сливали в новые пробирки и далее хранили в холодильнике при 4°C не более 1 мес. Для более длительного периода хранения экстракты замораживали при –18°C и хранили не более 6 мес.

Тестирование экстрактов лишайников. Для проверки биоцидных свойств экстрактов применяли диско-диффузионный метод (Егоров, 1965). Этанольные экстракты наносили на стерильные бумажные диски (фильтр синяя лента) диаметром 6 мм. После испарения этанола в стерильном ламинарном боксе диски помещали в стерильные пенициллиновые флаконы и хранили при 4°C до использования не более 5 сут.

Бактериальные суспензии (50 мкл, ОП₆₀₀ 0.1–0.2) распределяли шпателем Дригальского по агаризованной среде LB (модификация Miller, 5 г/л NaCl). Далее бумажные диски, содержащие сухой экстракт, располагали на агаровой пластинке в количестве 6 штук (по одному диску на сектор). Инкубацию проводили при температуре 30°C в течение 1 сут. Измерение зон ингибирования проводили согласно методике (Егоров, 1965; Efimenko et al., 2018).

Культуры грибов. Изоляцию культур грибов из талломов лишайников проводили с использованием гомогенизатора, как это описано ранее (Качалкин и соавт., 2017). Полученные культуры подерживали пересевом на глюкозно-пептонно-дрожжевую среду – ГПД (4 г глюкозы, 1 г дрожжевого экстракта, 1 г триптона, 15 г агара, 1 л воды).

Тестирование биоцидной активности грибов и их экстрактов осуществляли двумя способами.

1 способ. Тестирование проводили методом наложения агаровых блоков (цилиндров), вырезанных из агара (диаметр 6 мм), густо засеянного мицелиальным грибом или дрожжами на 10 сут роста (Егоров, 1965). Для предварительного скрининга активности культур использовали агаровые блоки диаметром 8 мм. Оценка активности проводили, измеряя зоны ингибирования роста тест-культур при наложении агаровых блоков диаметром 6 мм.

2 способ. Культуры грибов выращивали в жидкой среде ГПД в колбах с перемешиванием на шейкере (30°C, 120 об./мин) в течение 10 сут. Далее жидкость отфильтровывали и собирали в отдельные емкости для дальнейшего использования. Мицелий промывали дистиллированной водой в процессе фильтрации на воронке Бюхнера с бумажным фильтром под вакуумом (насос KNF 86, Германия, –80 кПа). Далее мицелий помещали в стеклянный флакон 100 мл и заливали 20 мл 95% этанола. Экстракцию проводили в течение 10 сут при температуре 30°C при перемешивании на шейкере (120 об./мин). Экстракты концентрировали отгонкой этанола до объема 2 мл и хранили при 4°C не более 10 сут.

Спиртовые экстракты, полученные из биомассы, наносили на бумажные диски (10 мкл на один диск), высушивали в стерильном ламинарном боксе и располагали на поверхности засеянного тест-культурой LB агара, как это указано выше.

Таблица 1. Список образцов лишайников

№ образца	Вид лишайника	Место сбора
EK1	<i>Cladonia coniocraea</i> (Flörke) Sprengel	Самарская обл., Ясная поляна
EK2	<i>Cladonia arbuscula</i> (Wallr.) Rabenh.	Самарская обл., Моховое болото
EK3	<i>Cetraria islandica</i> (L.) Acharius s.l.	Самарская обл., Рачейская тайга
EK4	<i>Cladonia rangiferina</i> (L.) F.H. Wigg.	Самарская обл., Моховое болото
EK5	<i>Cladonia furcata</i> (Hudson) Schrader	Самарская обл., Рачейская тайга
EK6	<i>Pseudoevernia furfuracea</i> (L.) Zopf R. Murto	Самарская обл., Рачейская тайга
EK7	<i>Evernia prunastri</i> (L.) Ach.	Оренбургская обл., Бузулукский бор
EK8	<i>Ramalina franea</i> (L.) Ach.	Крым, пещера Горшенина
EK9	<i>Cladonia stellaris</i> (Opiz) Pouzar et Vězda	Самарская обл., Рачейская тайга
EK10	<i>Cetraria islandica</i> (L.) Ach.	Крым, плато Чатыр-Даг
EK11	<i>Anaptychia ciliaris</i> (L.) Körb.	Самарская обл., Ясная поляна
EK12	<i>Hypogymnia physodes</i> (L.) Nyl.	Самарская обл., Кинельский р-он
EK13	<i>Cladonia monomorpha</i> Aptroot, Sipman & Herk	Самарская обл., Малоусинский сосняк
SIV-1	<i>Parmelia</i> sp. Ach.	ЯНАО, Приуральский р-он
SIV-2	<i>Cladonia gracilis</i> (L.) Willd.	
SIV-3	<i>Cladonia</i> sp. P. Browne	
SIV-4	<i>Cladonia rangiferina</i> (L.) F.H. Wigg.	
SIV-5	<i>Usnea</i> sp. Dill. ex Adans.	
NM1	<i>Flavocetraria cucullata</i> (Bellardi) Kärnefelt et A. Thell	г. Нарьян-Мар, Ненецкий автономный округ
NM2	<i>Cetraria islandica</i> subsp. <i>crispiformis</i> (Räsänen) Kärnefelt	
NM3	<i>Flavocetraria nivalis</i> (L.) Kärnefelt et A. Thell	
NM4	<i>Peltigera aphtosa</i> (L.) Willd.	
NM5	<i>Cladonia rangiferina</i> (L.) F.H. Wigg.	
NM6	<i>Peltigera malacea</i> (Ach.) Funck	
NM7	<i>Cladonia uncialis</i> (L.) Weber ex F.H. Wigg.	
NM8	<i>Cladonia stellaris</i> (L.) Ach.	
NM9	<i>Cladonia arbuscula</i> (Wallr.) Rabenh.	
NM10	<i>Stereocaulon paschale</i> (L.) Hoffm.	
CH1	<i>Sphaerophorus</i> sp. Pers.	Мурманская область, г. Апатиты
ALT1	<i>Cladonia stellaris</i> (Opiz) Pouzar et Vězda	Алтайский край, пос. Северка, оз. Петухово
ALT2	<i>Cladonia arbuscula</i> (Wallr.) Rabenh.	
ALT3	<i>Cladonia rangiferina</i> (L.) F.H. Wigg.	
ALT4	<i>Cladonia stellaris</i> (Opiz) Pouzar et Vězda	Алтайский край, пос. Ерназар
ALT5	<i>Cladonia arbuscula</i> (Wallr.) Rabenh.	
ALT9	<i>Cladonia stellaris</i> (Opiz) Pouzar et Vězda	Алтайский край, пос. Озерно-Кузнецово, оз. Кузнецово
ALT10	<i>Cladonia rangiferina</i> (L.) F.H. Wigg.	
ALT11	<i>Cladonia arbuscula</i> (Wallr.) Rabenh.	

Биоцидную активность диагностировали по величине зоны ингибирования.

Культуральную жидкость тестировали, внося ее в лунки (50 мкл), как это описано ранее (Егоров, 1965).

Использованные тест-культуры. Для тестирования биоцидной активности метаболитов лишайников и грибов использовали культуры грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* RY1, *Micrococcus luteus* C01, *Enterococcus faecium* M3185, *Paenibacillus* sp. ALT11; грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* K12, *Pseudomonas aeruginosa* 481, *Salmonella typhimurium* TA 1535; дрожжей *Candida parapsilosis* 134.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследование активности спиртовых экстрактов лишайников. Наиболее распространенным и нетоксичным растворителем для экстракции из растительного сырья является этанол. Наряду с ацетоном, этилацетатом, бензолом, хлороформом он широко используется для экстракции биологически активных молекул из растительного сырья. В данной работе мы провели оценку биоцидности этанольных экстрактов лишайников и лишайнофильных грибов в отношении набора бактериальных тестовых культур и дрожжей *Ca. parapsilosis*.

Спиртовые экстракты EK1 *Cl. coniocraea*, EK4 *Cl. rangiferina*, EK5 *Cl. furcata*, EK6 *Ps. furfuracea*, EK7 *E. prunastri*, EK8 *R. franacea*, EK10 *C. islandica*, EK11 *An. ciliaris*, EK13 *Cl. monomorpha*, NM4 *P. aph-tosa*, NM5 *Cl. rangiferina*, NM6 *P. malacea*, ALT3 и ALT10 *Cl. rangiferina* не проявляли бактерицидной и фунгицидной активности. Все экстракты не угнетали рост дрожжей *Ca. parapsilosis*.

Экстракты из остальных исследованных лишайников проявляли бактерицидную активность в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий избирательно (табл. 2).

Большая часть экстрактов лишайников (далее ЭЛ) угнетали рост грамположительных бактерий, однако их активность зависела от места отбора образца лишайника, а также от вида. Так, например, ЭЛ *Cl. arbuscula*, собранного на болоте в Самарской области, не подавлял рост *M. luteus* и *E. faecium*, в отличие от образцов того же вида, собранных в г. Нарьян-Маре и на Алтае (табл. 2). При этом ЭЛ всех представителей рода *Cladonia* (кроме уже упомянутой *Cl. rangiferina*, а также NM2 *C. islandica* subsp. *crispiformis*), независимо от региона сбора образцов, подавляли рост *S. aureus* ATCC 6538 и почти все (за исключением *Cl. stellaris* EK9, Самарская обл.) ингибировали рост *Paenibacillus* sp. ALT11. Большая часть проанализированных ЭЛ проявляла ингибирующую активность в отношении *E. faecium* (кроме EK2 *Cl. arbuscula* и EK3 *C. islandica*). Только ЭЛ NM1 *Fl. cucullata*, NM2

C. islandica subsp. *crispiformis* и NM3 *Fl. nivalis* ингибировали рост грамотрицательных бактерий *E. coli* и *Sm. typhimurium*, при этом максимальной активностью обладал ЭЛ из NM1 *Fl. cucullata* (25 мм).

Оценка активности грибов методом агаровых блоков и методом цилиндров. Был проанализирован 61 штамм грибов, выделенных из различных видов лишайников, собранных в территориально удаленных локациях. Культуральные жидкости всех исследованных штаммов не обладали ингибирующей активностью в отношении тест-культур.

Метод агаровых блоков позволил выявить избирательную активность 23 штаммов грибов в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, а 8 из них — в отношении дрожжей (табл. 3). Если в отношении бактерий грибы проявляли заметную или достаточно высокую активность, то в отношении дрожжей ингибирующий эффект был слабым, за исключением одного штамма, NM10F28209, выделенного из лишайника *Stereocaulon paschale* (г. Нарьян-Мар) и обладающего высокой фунгицидной активностью. Только 4 штамма грибов были антагонистами *Paenibacillus* sp. ALT11. Наиболее чувствительными к ингибирующему воздействию грибов оказались культуры *E. coli* K12 и *S. aureus* ATCC 6538.

Определение активности этанольных экстрактов биомассы грибов. Этанольные экстракты оказались слабо активными в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, и совсем не проявляли ингибирующей активности в отношении дрожжей. Только несколько экстрактов (табл. 4) ингибировали рост *E. coli* K12, *S. aureus* ATCC 6538, *M. luteus* C01 и *Paenibacillus* sp. ALT11. Рост остальных тест-культур не подавлялся.

ОБСУЖДЕНИЕ

На данный момент вторичные метаболиты лишайников хорошо изучены (Huneck, Yoshimura, 2012; Xu, 2016). Накоплены данные о бактерицидных и фунгицидных эффектах экстрактов из лишайников разных видов (Molnár, Farkas, 2010). Однако, как правило, исследования образцов лишайников проводили без учета их географической локализации. В этой работе анализ активности ЭЛ показал, что в целом, независимо от географической локализации, лишайники одного вида сохраняют ингибирующую активность в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий. Только некоторые образцы различаются профилем бактерицидности. В частности, экстракт лишайника *Cl. arbuscula*, собранного на болоте в Самарской области, обладает меньшей ингибирующей активностью, чем экстракты из этого же вида, если образцы получены из более засушливых местобитаний. Однако эта закономерность не просле-

Таблица 2. Определение эффекта ингибирования роста тест-культур этанольными экстрактами лишайников

Образец лишайника	Величина зоны ингибирования роста, мм						
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>S. aureus</i> RY1	<i>M. luteus</i>	<i>Paenibacillus</i> sp.	<i>E. faecium</i>	<i>Sm. typhimurium</i>	<i>E. coli</i>
EK2 <i>Cl. arbuscula</i>	10 ± 0.2	0	0	10 ± 0.2	0	0	0
EK3 <i>Cl. islandica</i>	0	0	0	8 ± 0.2	0	0	0
EK9 <i>Cl. stellaris</i>	8.5 ± 0.3	8 ± 0.2	10 ± 0.2	0	8.5 ± 0.2	0	0
EK12 <i>H. physodes</i>	13.5 ± 0.2	13 ± 0.2	11 ± 0.2	11 ± 0.2	10 ± 0.2	0	0
SIV-1 <i>Parmelia</i> sp.	16 ± 0.3	15 ± 0.3	14 ± 0.3	9 ± 0.2	12 ± 0.2	0	0
SIV-2 <i>Cl. gracilis</i>	19 ± 0.2	23 ± 0.2	18 ± 0.2	10 ± 0.2	15 ± 0.3	0	0
SIV-3 <i>Cladonia</i> sp.	15 ± 0.3	20 ± 0.3	14 ± 0.3	10 ± 0.2	20 ± 0.3	0	0
SIV-4 <i>Cl. rangiferina</i>	12 ± 0.2	11.5 ± 0.15	16 ± 0.3	8 ± 0.2	11 ± 0.3	0	0
SIV-5 <i>Usnea</i> sp.	8 ± 0.2	8 ± 0.2	11 ± 0.2	0	9 ± 0.2	0	0
CH1 <i>Spherophorus</i> sp.	9 ± 0.2	12 ± 0.2	22 ± 0.3	8.5 ± 0.2	13 ± 0.2	0	0
NM1 <i>Fl. cucullata</i>	25 ± 0.3	24 ± 0.3	30 ± 0.3	16 ± 0.2	14 ± 0.2	0	25 ± 0.3
NM2 <i>C. islandica</i> subsp. <i>crispiformis</i>	0	9 ± 0.2	12 ± 0.2	8 ± 0.2	7 ± 0.2	0	17 ± 0.2
NM3 <i>Fl. nivalis</i>	15 ± 0.2	16 ± 0.2	17 ± 0.2	11 ± 0.3	15 ± 0.3	0	17 ± 0.2
NM7 <i>Cl. uncialis</i>	22 ± 0.3	18 ± 0.3	16 ± 0.3	9 ± 0.2	12 ± 0.2	0	0
NM8 <i>Cl. stellaris</i>	23 ± 0.3	20 ± 0.3	18 ± 0.2	12 ± 0.3	17 ± 0.2	0	0
NM9 <i>Cl. arbuscula</i>	25 ± 0.2	22 ± 0.3	20 ± 0.2	11 ± 0.2	22 ± 0.3	0	0
NM10 <i>S. paschale</i>	12 ± 0.2	14 ± 0.2	14 ± 0.2	10 ± 0.2	17 ± 0.3	0	0
ALT1 <i>Cl. stellaris</i>	7 ± 0.2	НД	16 ± 0.2	10 ± 0.2	26 ± 0.4	0	0
ALT2 <i>Cl. arbuscula</i>	13 ± 0.2	НД	14 ± 0.2	14 ± 0.3	21 ± 0.2	0	0
ALT3 <i>Cl. rangiferina</i>	0	НД	0	0	0	0	0
ALT4 <i>Cl. stellaris</i>	11 ± 0.3	НД	10 ± 0.2	10 ± 0.3	21 ± 0.3	0	0
ALT5 <i>Cl. arbuscula</i>	21 ± 0.3	НД	16 ± 0.3	13 ± 0.3	26 ± 0.25	0	0
ALT9 <i>Cl. stellaris</i>	16 ± 0.2	НД	14 ± 0.3	12 ± 0.2	24 ± 0.25	0	0
ALT10 <i>Cl. rangiferina</i>	0	НД	0	0	0	0	0
ALT11 <i>Cl. arbuscula</i>	12 ± 0.2	НД	14 ± 0.2	14 ± 0.2	22 ± 0.3	0	0

Примечание. НД – данные отсутствуют.

живается во ношении *Cl. stellaris*. Экстракты из этого лишайника демонстрируют близкие значения величин ингибирования. Этот результат слабо согласуется с ранее полученными данными (Корчиков и соавт., 2021).

Грамположительные бактерии ингибируются этанольными экстрактами большинства изученных видов лишайников. Этот результат хорошо согласуется с данными, полученными ранее (Oh et al., 2018). В то же время только ЭЛ трех видов ингибировали грамотрицательные бактерии. Shrestha и соавт. (2014) исследовали 34 вида лишайников и также не обнаружили активности метанольно-ацетоновых экстрактов против *E. coli*. Этому феномену в литературе не уделяется достаточного внимания,

хотя он интересен для понимания механизмов селекции бактерий в лишайниковые симбиозы. Известно, что в лишайниках доминируют грамотрицательные бактерии (Noh et al., 2020; Noh et al., 2021b), приспособленные к выживанию и активному функционированию в кислой среде (pH 4–5), при дефиците влаги и минеральных солей.

Этанольные экстракты лишайников, содержащие, главным образом, растворимые в полярных растворителях лишайниковые кислоты, угнетают рост бактерий, но не дрожжей, в то время как среди грибов, выделенных из лишайников, присутствуют штаммы, обладающие фунгицидной активностью. Это противоречие может быть устранено, если предположить, что фунгицидные метаболиты лишайни-

Таблица 3. Результаты тестирования ингибирующей активности грибных изолятов методом агаровых блоков

Номер штамма	Источник выделения	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>M. luteus</i>	<i>Paenibacillus</i> sp.	<i>E. coli</i>	<i>Sm. typhimurium</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Ca. parapsilosis</i>
1037CtrNIG01	<i>Cetraria nigricans</i>	0	0	0	0	0	0	+
1037CtrNIG54	<i>Cetraria nigricans</i>	+	0	0	+	0	0	0
1037CtrNIG55	<i>Cetraria nigricans</i>	0	0	0	+	0	0	0
1037FlcNIV60	<i>Flavocetraria nivalis</i>	+	0	0	0	0	0	0
ANFlcSP-08	<i>Flavocetraria nivalis</i>	0	0	+	0	0	0	0
BP6-01STR	<i>Flavocetraria nivalis</i>	12 ± 0.2	0	13 ± 0.2	0	0	0	+
CtlDL11	<i>Cetrariella delisei</i>	0	0	0	20 ± 0.2	0	0	0
CtlDL12	<i>Cetrariella delisei</i>	+	0	0	24 ± 0.2	0	0	0
CtrNig01	<i>Cetraria nigricans</i>	0	0	0	+	0	0	0
CtrNig02	<i>Cetraria nigricans</i>	0	0	0	15 ± 0.2	0	0	0
EG3-02	<i>Cladonia arbuscula</i> ssp. <i>arbuscula</i>	0	0	0	0	0	0	+
NM10F28209	<i>Stereocaulon paschale</i>	0	0	0	0	0	0	16 ± 0.2
NM10F28211	<i>Stereocaulon paschale</i>	0	0	0	0	0	0	+
NM5F17203	<i>Cladonia rangiferina</i>	14 ± 0.2	11 ± 0.2	0	+	0	0	0
NM5F17206	<i>Cladonia rangiferina</i>	+	0	0	+	0	0	0
NM9F24307	<i>Cladonia arbuscula</i>	18 ± 0.2	0	0	26 ± 0.2	0	0	0
PsphPub01	<i>Pseudephebe pubescens</i>	32 ± 0.3	0	0	25 ± 0.2	0	0	0
T2CtlDL08	<i>Cetrariella delisei</i>	+	0	0	0	0	0	0
T2CtrDL11	<i>Cetrariella delisei</i>	0	0	0	0	0	0	+
T3CtrNIG04	<i>Cetraria nigricans</i>	32 ± 0.3	0	0	0	0	0	+
T6PsphPUB01	<i>Pseudephebe pubescens</i>	+	18 ± 0.3	+	0	0	0	0
T6PsphPUB02	<i>Pseudephebe pubescens</i>	0	0	0	0	0	0	+
T6PsphPUB251101	<i>Pseudephebe pubescens</i>	0	16 ± 0.2	+	0	0	0	+

Примечание. “+” – Наблюдается “гало” лизиса клеток. Диаметр агаровых блоков 6 мм. Величина зон ингибирования роста дана в миллиметрах с учетом диаметра агарового блока. Жирным шрифтом выделены значения диаметра зон ингибирования более 15 мм.

ков не растворяются в полярных растворителях, или активность комменсальных грибов в здоровых, активно растущих талломах подавлена. По всей видимости, сами микобионты не выделяют фунгицидных соединений, способных растворяться в этаноле. Еще одним интересным и статистически достоверным результатом является отсутствие у этанольных экстрактов *Cl. rangiferina* антибактериальной активности. В то же время, существуют данные о том, что экстракция ацетоном выявляла в лишайниках этого вида антибактериальные соединения (Kosanić et al., 2018)

Отсутствие антибактериальной активности у 38 штаммов эндофитных грибов, выделенных из лишайников, можно попытаться объяснить их комменсализмом. В условиях совместного роста комменсальные грибы остаются физиологически и экологически нейтральными по отношению к

другим членам симбиоза, что исключает выработку ими бактерицидных или фунгицидных соединений. Скрининг такой активности может быть методической основой для выявления в лишайниковом симбиозе грибов с разными экологическими стратегиями. Несмотря на то, что бактерицидная активность грибов в мире активно изучается (Ершова и соавт., 2003; Silva et al., 2022), данных о бактерицидной активности эндофитных грибов из лишайников найти не удалось. Поэтому данная работа является в значительной степени пионерской.

Интересно, что те штаммы грибов, которые проявляли антибактериальную активность, также, как и экстракты из лишайников, подавляли рост в основном грамположительных бактерий и *E. coli*, которая является симбионтом кишечника человека и животных. Вместе с тем, эти же экс-

Таблица 4. Влияние этанольных экстрактов лишенобионтных грибов на рост тест-культур (зона ингибирования, мм)

Номер штамма	Источник выделения	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>M. luteus</i>	<i>Paenibacillus</i> sp.	<i>E. coli</i>	<i>Sm. typhimurium</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Ca. parapsilosis</i>
T1UmbPR01	<i>Umbilicaria proboscidea</i>	12 ± 0.2	0	18 ± 0.2	18 ± 0.2	0	0	0
T1UmbPR02	<i>Umbilicaria proboscidea</i>	12 ± 0.2	0	0	18 ± 0.2	0	0	0
T6PspHUB251101	<i>Pseudephebe pubescens</i>	18 ± 0.2	16 ± 0.2	0	0	0	0	0
T6PspHUB01	<i>Pseudephebe pubescens</i>	10 ± 0.2	16 ± 0.2	10 ± 0.2	0	0	0	0
T2CtIDL12	<i>Cetrariella delisei</i>	10 ± 0.2	12 ± 0.2	8 ± 0.1	8 ± 0.1	0	0	0

Примечание. Определение активности проведено диско-диффузионным методом.

тракты не подавляли рост патогенов *Sm. typhimurium* и *P. aeruginosa*. Это возможно объяснить как спецификой биоцидов, продуцируемых грибами, так и различием в величинах минимальных ингибирующих концентраций этих соединений для разных бактериальных культур.

Полученные из лишайников грибные изоляты, способные к подавлению роста клинически значимых бактерий *E. coli*, *S. aureus*, а также дрожжей *Ca. parapsilosis*, будут в дальнейшем исследованы, идентифицированы и использованы как продуценты биоцидных препаратов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят к.б.н. Е.С. Корчикова и к.б.н. О.С. Самылину за сбор и предоставление образцов лишайников, а также к.б.н. А.В. Мелехина за идентификацию некоторых видов лишайников.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа поддержана Министерством образования и науки Российской Федерации.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований, полученных с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Демьянкова М.В., Садыкова В.С., Глухова А.А., Ефименко Т.А., Бойкова Ю.В., Малкина Н.Д., Кормилицина В.Г., Шарапенко С.О., Сумарукова И.Г., Васильева Б.Ф., Иванкова Т.Д., Терехова Л.П., Габриелян Н.И., Ефре-

менкова О.В. Подход к поиску продуцентов антибиотиков, преодолевающих лекарственную устойчивость микроорганизмов // Антибиотики и химиотерапия. 2021. Т. 66. № 7–8. С. 4–12.
<https://doi.org/10.37489/0235-2990-2021-66-7-8-4-12>

Егоров Н.С. Микробы антагонисты и биологические методы определения антибиотической активности. М.: Высшая школа, 1965. 212 с.

Ершова Е.Ю., Тихонова О.В., Лурье Л.М., Ефременкова О.В., Комзолькина О.В., Дудник Ю.В. Антимикробная активность штаммов *Laetiporus sulphureus* в условиях глубокого культивирования // Антибиотики и химиотерапия. 2003. Т. 48. № 1. С. 18–22.

Ефименко Т.А., Ефременкова О.В., Сумарукова И.Г., Васильева Б.Ф., Демкина Е.В., Эль-Регистан Г.И., Петрова М.А. Бактерии, выделенные из вечной мерзлоты Антарктики — эффективные продуценты антибиотиков // Микробиология. 2018. Т. 87. С. 573–580.
<https://doi.org/10.1134/S0026365618050087>

Ефименко Т.А., Ефременкова О.В., Сумарукова И.Г., Васильева Б.Ф., Демкина Е.В., Эль-Регистан Г.И., Петрова М.А. Bacteria isolated from Antarctic permafrost are efficient antibiotic producers // Microbiology (Moscow). 2018. V. 87 P. 692–698.
<https://doi.org/10.1134/S0026261718050089>

Качалкин А.В., Глушак А.М., Панкратов Т.А. Дрожжевое население лишайников полуострова Киндо // Микробиология. 2017. Т. 86. С. 762–769.
<https://doi.org/10.7868/S0026365617060076>

Kachalkin A.V., Glushakova A.M., Pankratov T.A. Yeast population of the Kindo peninsula lichens // Microbiology (Moscow). 2017. T. 86. C. 786–792.
<https://doi.org/10.1134/S0026261717060078>

Корчиков Е.С., Зеленская Е.А., Халикова Л.В., Турченко П.С. Влияние экологических условий на накопление вторичных метаболитов лишайников рода *Cladonia* и семейства *Parmeliaceae* // Самарский научный вестник. 2021. Т. 10. № 3. С. 58–63.
<https://doi.org/10.17816/snv2021103108>

Определитель лишайников России. Вып. 6. Алекториновые, Пармелиевые, Стереокаулоновые. СПб., 1996. 203 с.

Цуриков А.Г., Корчиков Е.С. Определитель лишайников Самарской области. Ч. 1. Листоватые, кустистые и

слизистые виды: учеб. пособие. Самара: Изд-во Самарского ун-та, 2018. 128 с.

Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis // *Lancet*. 2022. V. 399 (10325). P. 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)

Huneck S., Yoshimura I. Identification of lichen substances. Berlin, Heidelberg: Springer, 2012. 493 p.

Kosanić M., Ristić S., Stanojković T., Manojlović N., Ranković B. Extracts of five *Cladonia* lichens as sources of biologically active compounds // *Farmacia*. 2018. V. 66. P. 644–651. <https://doi.org/10.31925/farmacia.2018.4.13>

de Kraker M.E., Stewardson A.J., Harbarth S. Will 10 million people die a year due to antimicrobial resistance by 2050? // *PLoS Med*. 2016. V. 13. Art. e1002184. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002184>

Molnára K., Farkas E. Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review // *Z. Naturforsch. C J. Biosci*. 2010. V. 65. P. 157–173. <https://doi.org/10.1515/znc-2010-3-401>

Nikolaev Y.A., Tutel'yan A.V., Loiko N.G., Buck J., Sidorenko S.V., Lazareva I., Gostev V., Manzen'yuk O.Y., Shemyakin I.G., Abramovich R.A., Huwyler J., El'-Registan G.I. The use of 4-hexylresorcinol as antibiotic adjuvant // *PLoS One*. 2020. V. 15. Art. e0239147. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239147>

Noh H.-J., Lee Y.M., Park C.H., Lee H.K., Cho J.-C., Hong S.G. Microbiome in *Cladonia squamosa* is vertically stratified according to microclimatic conditions // *Front. Microbiol.*

2020. V. 11. Art. 268.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00268>

Noh J.-I., Mun S.-K., Lim E.H., Kim H., Chang D.-J., Hur J.-S., Yee S.-T. Induction of apoptosis in MDA-MB-231 cells treated with the methanol extract of lichen *Physcobia hokkaidensis* // *J. Fungi*. 2021a. V. 7. Art. 188. <https://doi.org/10.3390/jof7030188>

Noh H.-J., Park Y., Hong S.G., Lee Y.M. Diversity and physiological characteristics of Antarctic lichens-associated bacteria // *Microorganisms*. 2021b. V. 9. Art. 607. Doi: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030607>

Oh J.M., Kim Y.J., Gang H.S., Han J., Ha H.H., Kim H. Antimicrobial activity of divaricatic acid isolated from the lichen *Evernia mesomorpha* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* // *Molecules*. 2018. V. 23. Art. 3068. <https://doi.org/10.3390/molecules23123068>

Silva D.P.D., Cardoso M.S., Macedo A.J. Endophytic fungi as a source of antibacterial compounds – a focus on gram-negative bacteria // *Antibiotics*. 2022. V. 11. Art. 1509. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11111509>

Shrestha G., Raphael J., Leavitt S.D., Clair L.L. *In vitro* evaluation of the antibacterial activity of extracts from 34 species of North American lichens // *Pharm. Biol.* 2014. V. 52. P. 1262–1266. <https://doi.org/10.3109/13880209.2014.889175>

Xu M., Heidmarsson S., Olafsdottir E.S., Buonfiglio R., Kogej T., Omarsdottir S. Secondary metabolites from cetrarioid lichens: chemotaxonomy, biological activities and pharmaceutical potential // *Phytomedicine*. 2016. V. 23. P. 441–459. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2016.02.012>

Effect of the Extracts from Lichens and Lichenophilic Fungi on *in vitro* Growth of Clinically Significant Microorganisms

T. A. Pankratov^{1, *}, R. E. Shcherbatov², and A. A. Del'tsov²

¹ Winogradsky Institute of Microbiology, Federal Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

² Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, 109472 Russia

*e-mail: tpankratov@gmail.com

Received May 30, 2023; revised July 5, 2023; accepted July 5, 2023

Abstract—Activity of the ethanol extracts from lichens (LE), of the cultures of lichenophilic (endobiotic) fungi (LFE), and of ethanol extracts from these cultures was tested using the following test organisms: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecium*, *Paenibacillus* sp., and *Candida parapsilosis*. Selective activity of LE and LFE against yeasts and gram-positive and gram-negative bacteria was revealed. The extracts from *Cladonia rangiferina* exhibited no activity against any of the tested cultures. The previously reported locus effect on activity of metabolites of one lichen species was confirmed. Agar block technique was used to detect selective activity of 23 out of 61 analyzed fungal strains against gram-positive and gram-negative bacteria, and of 8 strains, against yeasts. Ethanol extracts of six cultures were shown to suppress growth of *St. aureus*, *M. luteus*, *Paenibacillus* sp., and *E. coli*. Strain NM10F28209 from the lichen *Stereocaulon paschale*, which exhibited inhibitory activity against *Ca. parapsilosis* was selected for priority development of an antifungal preparation.

Keywords: biocidal agents, lichens, lichen endobionts, ethanol extracts