

УДК 619.611.573.616:092.632.636.578:582.29

## ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ МИКРОМИЦЕТОВ В СОСТАВЕ ЛИШАЙНИКОВЫХ ВЕЩЕСТВ

© 2012 г. Г. П. Кононенко\*, А. А. Буркин\*, Т. Ю. Толпышева\*\*

\*Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии, гигиены и экологии РАСХН,  
Москва, 123022

e-mail: kononenkogp@mail.ru

\*\*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119992

Поступила в редакцию 22.02.2011 г.

В слоевищах кустистых лишайников родов *Cladonia*, *Cetraria*, *Evernia*, *Bryoria* и *Usnea* исследован состав низкомолекулярных биологически активных метаболитов, свойственных микроскопическим грибам. Методом иммуноферментного анализа установлено присутствие стеригматоцистина, эмодаина, микофеноловой кислоты, цитринина, альтернариола и диацетоксисцирпенола, которые встречались регулярно и в большинстве случаев с частотой от 55 до 100%. Наибольшие уровни накопления эмодаина составляли 0.001–0.003%, альтернариола и цитринина – 0.0002%, стеригматоцистина, микофеноловой кислоты – 0.0001%, а диацетоксисцирпенола – 0.00005% от массы воздушно-сухого материала. Другие метаболиты (циклопиазоновая кислота, эргоалкалоиды, охратоксин А, PR-токсин, дезоксиниваленол, зеараленон, фумонизины) обнаруживались у этих лишайников реже, в ряде случаев только при расширении территории сбора образцов, и их содержание не превышало 0.00005%. Обсуждены особенности компонентного состава и уровни накопления грибных метаболитов в лишайниках разной таксономической принадлежности.

Лишайники являются ценными кормовыми растениями, применяются в медицине, диетологии, косметической и парфюмерной промышленности.

Давно сложившееся представление о том, что их функционально однородный организм является продуктом симбиоза гриба и водоросли и (или) цианобактерий, в последующие годы пополнялось новыми сведениями. К настоящему времени известно, что на талломе лишайников могут развиваться не только лишенофильные [1], но и микроскопические грибы, большинство из которых являются свободноживущими и слабо специализированными сапротрофами [2, 3]. При микологических посевах слоевищ после их поверхностной стерилизации было получено значительное видовое многообразие культур, принадлежащих родам *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium* и многим другим [3].

Для метаболитов микроскопических грибов, обладающих физиологической активностью, в последние годы бурное развитие получила методология иммуноферментного анализа (ИФА), которая обеспечивает высокую избирательность и чувствительность их определения в разнообразных объектах растительного и животного происхождения. С помощью этого метода в отобранных на Европейском севере России образцах ягеля, смеси видов лишайников родов *Cladonia* и *Cetraria*, нами было обнаружено несколько микотоксинов,

свойственных несовершенным грибам родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* и *Fusarium* [4].

Цель работы – исследование практически значимых видов кустистых лишайников, принадлежащих семействам *Cladoniaceae* и *Parmeliaceae*, на содержание микотоксинов методом ИФА.

### МЕТОДИКА

Объектами были 4 вида эпигейных лишайников – *Cladonia stellaris* (Opiz) Pouz et Vězda, *Crangiferina* (L.) F.H. Wigg., *C. arbuscula* (Wallr.) Flot, *Cetraria islandica* (L.) Ach. и 4 вида эпифитных лишайников – *Evernia mesomorpha* NyL, *Bryoria chalybeiformis* (L.) Brodo et D. Hawksw., *Usnea filipendula* Stirt., *U. subfloridana* Stirt. Сбор слоевищ производили в 2009 и 2010 гг. на севере (Мурманская область, Карелия) и в средней полосе Европейской части России (Тверская, Московская обл.), в Приморском крае, а также в Швеции и Норвегии с разных субстратов (эпифитные с хвойных и лиственных пород деревьев, эпигейные – с почвы). Образцы укладывали в отдельные бумажные пакеты и хранили до анализа в воздушно-сухом состоянии.

Для экстракции к навескам слоевищ добавляли 10-кратный избыток (г/мл) смеси ацетонитрила и воды в объемном соотношении 84 : 16, плотно закрывали, интенсивно встряхивали, выдержи-

вали 14–16 ч при комнатной температуре и ещё раз перемешивали. В экстрактах после 10-кратного разбавления 0.15М фосфатно-солевым буфером рН 7.5, состоящим из 0.01 М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.14 М NaCl и 0.05% Твин 20 (ФСБ-т), определяли микотоксины методом непрямого конкурентного ИФА. Аналитические характеристики и метрологические показатели иммуноферментных тест-систем описаны в следующих работах: Т-2 токсин (Т-2) [5], диацетоксисцирпенол (ДАС) [6], дезоксиниваленол и его моноацетаты (ДОН) [7], зеараленон (ЗЕН) [8], фумонизины группы В (ФУМ) [9], афлатоксин В<sub>1</sub> (АВ<sub>1</sub>) [10], стеригматоцистин (СТЕ) [11], охратоксин А (ОА) [12], цитринин (ЦИТ) [13], циклопиазоновая кислота (ЦПК) [14], микофеноловая кислота (МФК) [15], PR-токсин (PR) [16], эргоалкалоиды (ЭА) [17], альтернариол (АОЛ) [18], эмодин (ЭМО) [19] и роридин А (РОА) [20]. Нижний предел количественных измерений считали по 85%-ному уровню связывания антител.

В работе использовали препараты атранорина и усниновой кислоты, полученные на кафедре микологии и альгологии МГУ, а также препарат (+)-усниновой кислоты, приобретенной через фирму “Sigma” (США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для лишайников характерно накопление в слоевищах значительных количеств продуктов собственного метаболического обмена, объединяемых общим термином “лишайниковые вещества”, среди которых представлены депсиды замещенных фенолкарбоновых кислот, а также модифицированные дибензофураны, такие, как усниновые кислоты [21, 22].

ИФА свойственна высокая специфичность в отношении веществ, для которых он предназначен и, как правило, у тест-систем для избирательного определения практически полностью исключена возможность распознавания даже их ближайших структурных аналогов. Располагая препаратами депсида атранорина и (+)-усниновой кислоты, мы провели проверку сохранения нормального функционирования тест-систем для определения метаболитов микромицетов в присутствии избыточных количеств этих веществ. По данным УФ-спектров растворов в ацетонитриле были рассчитаны молярные коэффициенты поглощения для трех основных максимумов: (+)-усниновая кислота – 193 (ε 27620), 233 (ε 34744), 281 нм (ε 25350); атранорин – 210 (ε 34900), 250 (ε 35100), 320 нм (ε 7480). Далее в экспериментах использовали исходные растворы этих веществ в ацетонитриле с концентрациями

100 мкг/мл, рассчитанными по величинам оптической плотности на длинноволновых максимумах поглощения. Для проверки специфичности тест-систем исходные растворы разбавляли в 10 раз ФСБ-т и затем в 100 и 1000 раз ФСБ-т, содержащим 10% ацетонитрила.

В условиях конкурентного анализа иммуноферментные тест-системы не обнаруживали атранорин и (+)-усниновую кислоту в концентрации 10 мкг/мл, превышающей на 3–4 порядка концентрации специфически определяемых метаболитов. Таким образом, перекрестная реактивность антител в отношении этих лишайниковых веществ была ниже 0.01%. Все это свидетельствовало о сохранении специфичности анализа и принципиальной возможности использования тест-систем для избирательного определения свойственных им свободных антигенов.

Сумма извлеченных веществ, полученная при экстракции, не создавала помех для конкурентного анализа. Для каждого вида объектов в одной или нескольких тест-системах находили “нулевые” образцы, у экстрактов которых аналитические показатели (% связывания антител) были равны или превышали 85%.

Судя по результатам анализа, у лишайника *C. stellaris* по всех образцах присутствовал СТЕ, очень часто, за редкими исключениями – ЭМО, МФК, ДАС и несколько реже – АОЛ и ЦИТ (табл. 1). Эти данные вполне соответствовали ранее описанным для образцов ягеля из Мурманской области и Карелии [4]. Такой же набор из 6 регулярно обнаруживаемых компонентов имели и другие представители семейства Cladoniaceae рода *Cladonia* секции *Cladina* (*C. rangiferina* и *C. arbuscula*), а также все другие исследованные виды, принадлежащие семейству Parmeliaceae (табл. 1).

Самые высокие уровни накопления были установлены для ЭМО – 10000–33000 нг/г или 0.001–0.003% и встречались у представителей видов *C. stellaris*, *Cetraria islandica* и *Evernia mesomorpha*. Наибольшие количества АОЛ у всех видов *Cladonia* и у *C. islandica* были на порядок ниже (1244 до 3550 нг/г, в среднем 2214 нг/г). По-видимому, накопление этих веществ в относительно высоких количествах может объяснить ранее описанные факты обнаружения ЭМО в составе вторичных продуктов метаболического обмена у *Xanthoria parietina* [23], *X. aureola*, *X. ulophyllodes* [24], *Asahinea chrysantha* [25] и *C. cucullata* [26], а также АОЛ – у *Graphis cognate* [27]. Определение этих метаболитов в слоевищах лишайников, выполненное методами хроматографии на силикагеле и сефадексе LH-20 с последующей УФ- и масс-спектрометрией, можно рассматривать, как под-

**Таблица 1.** Уровни накопления регулярно обнаруживаемых в лишайниках метаболитов микроскопических грибов

Вид лишайника (число исследованных проб)	Число положительных проб, количество вещества, нг/г (мин.-макс.), среднее					
	СТЕ (≥8)*	ЭМО (≥40)	МФК(≥40)	ЦИТ (≥40)	АОЛ (≥40)	ДАС (≥100)
<i>Cladonia stellaris</i> (71)	71 (11–1585) 234	62 (65–11220) 1722	64 (35–316) 75	39 (40–257) 70	49 (37–1549) 254	60 (100–400) 197
<i>C. rangiferina</i> (28)	25 (9–1260) 257	27 (40–3310) 646	23 (40–184) 68	14 (40–347) 89	20 (40–3550) 449	9 (124–355) 217
<i>C. arbuscula</i> (11)	11 (37–562) 134	11 (417–8815) 2347	11 (56–211) 106	6 (40–79) 60	11 (62–2512) 667	6 (100–214) 130
<i>Cetraria islandica</i> (31)	27 (8–631) 129	29 (50–32818) 1576	13 (40–245) 88	13 (40–407) 65	23 (50–1244) 358	11 (100–305) 178
<i>Evernia mesomorpha</i> (8)	8 (19–95) 48	8 (1351–10585) 3714	8 (195–1259) 363	8 (133–2399) 647	8 (100–733) 283	5 (105–380) 274
<i>Bryoria chalybeiformis</i> (16)	16 (18–115) 44	16 (195–7479) 1318	16 (46–1259) 399	14 (40–122) 82	16 (76–977) 368	3 (124, 178, 240) 181
<i>Usnea filipendula</i> (4)	4 (62–106) 80	4 (750–1262) 1055	4 (251–479) 340	4 (66–188) 115	4 (61–224) 102	4 (123–214) 163
<i>U. subfloridana</i> (3)	3 (60, 64, 64) 63	3 (794, 1350, 1622) 1255	3 (107, 158, 298) 188	3 (64, 66, 116) 82	2 (40, 50) 45	2 (100, 224) 162

\* В табл. 1 и 2 – нижний предел измерения вещества, нг/г.

тверждение результатов, полученных иммунохимическим анализом.

Для остальных регулярно обнаруживаемых микотоксинов интенсивность накопления была ниже. Уровень содержания ЦИТ, равный 2399 нг/г, наблюдался только у *E. mesomorpha*. Наибольшие количества СТЕ у *C. stellaris* (1585 нг/г) и *C. rangiferina* (1260 нг/г) соответствовали уровню содержания 0.0001%. Близкий порог накопления МФК, равный 1259 нг/г, достигался у представи-

телей родов *Evernia* и *Bryoria*. Для ДАС не отмечено случаев превышения концентрации 400 нг/г. Обнаружение в лишайниках ЦИТ, СТЕ, МФК, ЦИТ и ДАС, о котором в этой работе сообщается впервые, оказалось возможным благодаря высокой чувствительности и избирательности метода ИФА. Самый верхний порог накопления этих метаболитов находится гораздо ниже сообщенного для лишайниковых веществ, по меньшей мере, на 2–3 порядка. Судя по доступным нам сведениям, количество атранорина в слоевищах *C. rangiferina*

**Таблица 2.** Уровни накопления нерегулярно обнаруживаемых в лишайниках метаболитов микроскопических грибов

Вид лишайника (число исследованных проб)	Число положительных проб, количество вещества, нг/г (мин.-макс.), среднее						
	ЦПК(≥100)	ЭА (≥10)	ОА (≥8)	PR(≥100)	ДОН(≥40)	ЗЕН(≥40)	ФУМ(≥100)
<i>Cladonia stellaris</i> (71)	7 (100–316) 181	4 (18–100) 50	–	1 158	–	1 40	–
<i>C. rangiferina</i> (28)	12 (100–355) 222	7 (11–63) 34	–	4 (105–155) 131	1 100	3 (54, 81, 100) 78	–
<i>C. arbuscula</i> (11)	6 (100–200) 142	2 (24, 41) 33	2 (10, 32) 21	–	1 100	–	–
<i>Cetraria islandica</i> (31)	18 (100–569) 289	3 (13, 20, 22) 18	–	3 (141, 155, 188) 161	3 (158, 158, 200) 172	–	1 200
<i>Evernia mesomorpha</i> (8)	3 (245, 245, 251) 247	2 (20, 32) 26	3 (12, 20, 32) 21	2 (100, 143) 122	–	6 (41–95) 71	–
<i>Bryoria chalybeiformis</i> (16)	9 (114–316) 172	–	1 8	7 (100–279) 144	4 (100–132) 119	–	5 (61–151) 104
<i>Usnea filipendula</i> (4)	2 (129, 184) 157	1 60	–	1 162	1 105	–	–
<i>U. subfloridana</i> (3)	2 (119, 200) 160	–	–	–	–	–	–

составляет 0.25% от веса сухого материала, а усниновой кислоты у *C. stellaris* в зависимости от места и времени сбора – от 0.37 до 2.17% [28].

Провести сравнение показателей встречаемости этих метаболитов у конкретных видов лишайников в рамках этой работы не представляется возможным, так как нижние пределы их обнаружения были неодинаковыми – 8 нг/г для СТЕ, 40 нг/г для ЭМО, МФК, АОЛ, ЦИТ и 100 нг/г для ДАС. Случаи совпадения минимально-обнаруживаемых количеств с нижними пределами определения метода отмечены для всех этих веществ, хотя чаще всего для ЦИТ и ДАС, реже для АОЛ и МФК и в единичных случаях для СТЕ и ЭМО.

Тем не менее, сама по себе возможность аналитической работы в этих диапазонах измерения позволила установить регулярный характер встречаемости этих веществ в организмах, принадлежащих разным таксономическим группам. Этот новый научный факт вполне согласуется с современной концепцией заселения лишайников устойчивым сообществом ассоциированных микроорганизмов [29].

Варьирование уровней содержания СТЕ, ЭМО и АОЛ оказалось весьма значительным и соответствовало диапазону в 2–3 порядка (табл. 1). По нашему мнению, это свидетельствует в пользу предположения о том, что образование этих ве-

ществ осуществляется ассоциированными микроскопическими грибами. Вполне возможно, что вклад в накопление микотоксинов в слоевищах вносят не только ассоциированные грибы, но и грибы, развивающиеся на поверхности лишайников, в частности альтернариин. Сравнимые уровни загрязненности АОЛ от десятков до тысяч мкг/кг известны для зерновых, травяных культур и других видов природных субстратов [30]. Если допустить участие в биосинтезе этих метаболитов лишайнизированного гриба (микобионта), то следует признать крайнюю неустойчивость его биохимического статуса.

Различия в количествах регулярно встречающихся грибных метаболитов могут быть связаны с особенностями заселения лишайников микромицетами, продуцирующими эти вещества, или же их биосинтетическими возможностями, на которые, в свою очередь, могут оказывать влияние факторы, определяющие их видовую принадлежность и субстратную специфичность. Так, эпигейные лишайники (*Cladonia*, *Cetraria*) существенно отличаются от эпифитных по уровням накопления СТЕ (129–257 нг/г и 44–80 нг/г) и МФК (68–106 нг/г и 188–769 нг/г) соответственно. У представителей вида *E. mesomorpha* количество ЦИТ (в среднем 647 нг/г) оказалось большим, чем у всех остальных (60–115 нг/г). У *S. rangiferina* накопление ЭМО (646 нг/г) было выражено гораздо слабее, чем у других исследованных видов (1055–3714 нг/г).

Во всех видах лишайников рода *Cladonia* и *C. islandica*, кроме уже рассмотренных метаболитов с регулярной встречаемостью, были найдены два азотсодержащих микотоксина – ЦПК и ЭА (табл. 2). Ранее в ягеле, собранном на севере, они не были обнаружены [4]. Возможно, расширение спектра идентифицированных компонентов связано с большим охватом экологически неоднородных территорий и появлением дополнительных факторов, влияющих на метаболическую активность грибов. Нижние пределы содержаний ЦПК везде совпадали с нижней границей измерения метода, поэтому можно предположить, что этот метаболит, как и ранее перечисленные, может быть отнесен к регулярно встречающимся. Случаи обнаружения ЦПК были отмечены и для остальных исследованных видов и также в количествах, близких к пределу измерения (114–251 нг/г).

Положительные результаты анализа были получены и в отношении других исследованных микотоксинов, за исключением Т-2, АВ<sub>1</sub> и РОА. В отдельных образцах или в единичных случаях выявляли PR, ОА, ЗЕН, ДОН и ФУМ и, как правило, в количествах, близких к предельным возможно-

**Таблица 3.** Продуценты микотоксинов, встречающиеся в агропродукции

Вид гриба	Микотоксин	Ссылка
<i>Aspergillus nidulans</i> (Eidam) Wint. <i>A. versicolor</i> (Vuill.) Tiraboschi <i>A. sydowii</i> (Bain. and Sart.) Thom and Church	СТЕ	[31]
<i>Penicillium</i> spp. <i>P. brunneum</i> Udagawa <i>Cladosporium</i> spp. <i>Aspergillus</i> spp.	ЭМО	[19, 31]
<i>Penicillium cyclopium</i> Westl. <i>Aspergillus</i> spp.	ЦПК	[14, 31, 32]
<i>Penicillium stoloniferum</i> Thom <i>P. brevicompactum</i> Dierckx <i>P. roqueforti</i> Thom <i>Byssosclamyces nivea</i> Westl.	МФК	[15, 31]
<i>Alternaria</i> spp.	АОЛ	[30]
<i>Fusarium</i> spp.	ДАС	[33]

стям метода. Наибольшие уровни накопления этих метаболитов не превышали 0.0005%. Можно предположить, что их биосинтез грибами индуцируется или активируется лишь при сочетании определенных условий или же попадание продуцентов в число ассоциированных организмов затруднено.

Способность к активному продуцированию этих метаболитов известна для многих представителей родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium*, паразитирующих на самых разнообразных природных субстратах. Сведения относительно видов потенциальных грибов-продуцентов, выделенных из кормовой агропродукции, суммированы в табл. 3. По аналогии с тем, что микобионты при изолированном культивировании часто образуют метаболиты, не идентичные найденным в лишайниках [34], можно предположить, что и несовершенные грибы в ассоциированном состоянии приобретают иные биосинтетические возможности, чем в условиях свободного обитания. Так, при

фузариозном поражении растений ДАС редко обнаруживается в них и, как правило, вместе с Т-2, а известные случаи загрязненности природных объектов СТЕ, ЦИТ, ЦПК, МФК и PR не часты. Применение ИФА открывает широкие перспективы для дальнейшего изучения биосинтетических возможностей грибов, включенных в жизненный цикл лишайников.

Лишайники традиционно рассматриваются, как перспективные источники физиологически активных веществ, применение которых в медицине, диетологии, парфюмерии, косметологии и других областях получает все большее развитие [35]. Выявленный нами новый факт присутствия в этих организмах метаболического фона из веществ, среди многообразия свойств которых известны и негативные формы воздействия на биосистемы, несомненно, следует учитывать при расширении сферы их практического использования.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Журбенко М.Л. // Новости систематики низших растений. 1998. Т. 32. С. 28–40.
2. Petrini O., Hake U., Dreyfuss M.M. // Mycologia. 1990. V. 82. № 4. P. 444–451.
3. Girlanda M., Isocrono D., Bianco C., Luppi-Mosca A.M. // Mycologia. 1997. V. 89. № 4. P. 531–536.
4. Буркин А.А., Кононенко Г.П. // Докл. Россельхоз-академии. 2011. № 2. С. 54–56.
5. Burkin A.A., Zorjan V.G., Soboleva N.A., Kononenko G.P. // Baltic J. Laboratory Animal Sci. 2000. V. 10. № 1. С. 26–32.
6. Буркин А.А., Кононенко Г.П., Токарев С.В. // Докл. Россельхозакадемии. 2007. № 6. С. 28–30.
7. Кононенко Г.П., Буркин А.А. // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2009. № 2. С. 16.
8. Буркин А.А., Кононенко Г.П., Соболева Н.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2002. Т. 38. № 3. С. 305–311.
9. Буркин А.А., Кононенко Г.П. // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2010. № 1. С. 187.
10. Буркин А.А., Кононенко Г.П., Соболева Н.А., Зотова Е.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2000. Т. 36. № 1. С. 93–97.
11. Кононенко Г.П., Буркин А.А., Соболева Н.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2003. Т. 39. № 1. С. 116–121.
12. Буркин А.А., Кононенко Г.П., Соболева Н.А. // Докл. Россельхозакадемии. 2005. № 2. С. 47–49.
13. Кононенко Г.П., Буркин А.А. // Журн. аналит. химии. 2007. Т. 62. № 7. С. 769–774.
14. Кононенко Г.П., Буркин А.А. // Микология и фитопатология. 2008. Т. 42. № 2. С. 178–184.
15. Буркин А.А., Кононенко Г.П. // Прикл.биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 5. С. 592–598.
16. Буркин А.А., Кононенко Г.П., Конкина Г.А., Озерская С.М. // Прикл.биохимия и микробиология. 2007. Т. 43. № 4. С. 505–510.
17. Буркин А.А., Кононенко Г.П. // Современная микология в России. М.: Национальная академия микологии, 2008. С. 245.
18. Буркин А.А., Кононенко Г.П. // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2009. № 2. С. 7–8.
19. Кононенко Г.П., Буркин А.А. // Успехи медицинской микологии. Т. 9. М.: Национальная академия микологии, 2007. С. 88–89.
20. Буркин А.А., Кононенко Г.П., Зорян В.Т., Соболева Н.А., Зотова Е.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2000. Т. 36. № 4. С. 428–432.
21. Равинская А.П. // Новости систематики низших растений. 1984. Т. 21. С. 160–179.
22. Дембицкий В.М., Толстиков Г.А. Органические метаболиты лишайников. Новосибирск: СО РАН филиал “Гео”, 2005. 135 с.
23. Кривошекова О.Е., Максимов О.Б., Мищенко Н.П., Степаненко Л.С. // Химия природных соединений. 1981. № 1. С. 96–97.
24. Plattelli M., Nicola M.G. // Phytochemistry. 1968. V. 7. № 7. P. 1183–1187.
25. Мищенко Н.П., Степаненко Л.С., Кривошекова О.Е., Максимов О.Б. // Химия природных соединений. 1980. № 2. С. 160–165.
26. Krivoshechkova O.E., Maximov O.B., Stepanenko L.S., Mishchenko N.P. // Phytochemistry. 1982. V. 21. № 1. P. 193–196.
27. Tanahashi T., Takenaka Y., Nagakura N., Hamada N. // Phytochemistry. 2003. V. 62. № 1. P. 71–75.
28. Равинская А.П., Вайнштейн Е.А. // Новости систематики низших растений. 1975. Т. 12. С. 266–273.
29. Lawrey J.D., Diederich P. // Bryologist. 2003. V. 106. P. 81–120.
30. Буркин А.А., Кононенко Г.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. № 1. С. 79–83.
31. Moreau C. Moulds, Toxins and Food. Chichester-New York-Brisbane-Toronto: John Wiley & Sons, 1979. 477 p.
32. Буркин А.А., Пирязева Е.А., Кононенко Г.П., Малиновская Л.С. // Успехи медицинской микологии. Т. 7. М.: Национальная академия микологии, 2006. С. 94–95.
33. Буркин А.А., Пирязева Е.А., Малиновская Л.С., Кононенко Г.П. // Успехи медицинской микологии. Т. 7. М.: Национальная академия микологии, 2006. С. 95–96.
34. Miyagawa K., Yamashita M., Ueno Y., Hamada N. // Phytochemistry. 1997. V. 46. № 7. P. 1289–1291.
35. Muggia L., Schmitt L., Grube M. // SIM News. 2009. V. 59. № 3. P. 85–97.

## Enzyme Immunoassay of the Secondary Metabolites of Micromycetes as Components of Lichen Substances

G. P. Kononenko<sup>a</sup>, A. A. Burkin<sup>a</sup>, and T. Yu. Tolpysheva<sup>b</sup>

<sup>a</sup> All-Russian Research Institute of Veterinary Sanitary, Hygiene, and Ecology, Russian Academy of Agricultural Sciences, Zvenigorodskoe sh. 5, Moscow, 123022 Russia

e-mail: kononenkogp@mail.ru

<sup>b</sup> Moscow State University, Moscow, 119992 Russia

Received February 22, 2011

**Abstract**—The composition of low-molecular biologically active metabolites typical of microscopic fungi has been studied in blastemas of fruticose lichens of the genera *Cladonia*, *Cetraria*, *Evernia*, *Bryoria*, and *Usnes*. The enzyme immunoassay method showed the presence of sterigmatocystin, emodin, mycophenolic acid, citrinin, alternariol, and diacetoxyscirpenol, which occurred regularly and, in most cases, at a frequency of 55 to 100%. The highest levels of accumulation were 0.001–0.003% for emodin, 0.0002% for alternariol and citrinin, 0.0001% for sterigmatocystin and mycophenolic acid, and 0.00005% of the weight of air-dry material for diacetoxyscirpenol. Other metabolites (cyclopiazonic acid, ergot alkaloids, ochratoxin A, PR toxin, deoxynivalenol, zearalenone, and fumonisins) were detected in these lichens less frequently (sometimes only upon the expansion of the territory of sampling), and their content was no more than 0.00005%. The peculiarities of the component composition and the levels of accumulation of fungal metabolites in lichens of different taxonomic affiliation were discussed.