

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201601039

引文格式: 赵能,原晓龙,华梅,等. 地衣型真菌次级代谢产物抗菌活性初步研究 [J]. 广西植物, 2017, 37(2):242-247

ZHAO N, YUAN XL, HUA M, et al. Antimicrobial activity of secondary metabolites from lichen forming fungi [J]. Guihaia, 2017, 37(2):242-247

地衣型真菌次级代谢产物抗菌活性初步研究

赵能^{1,2}, 原晓龙^{2,3}, 华梅^{2,3}, 李苏雨^{1,2}, 王娟^{2,3}, 王毅^{2,3*}

(1. 西南林业大学 林学院, 昆明 650224; 2. 云南省林业科学院 云南省森林植物培育与开发利用重点实验室, 国家林业局 云南珍稀濒危森林植物保护和繁育实验室, 昆明 650201; 3. 云南省林业科学院, 昆明 650201)

摘要: 地衣是一种传统的民族药物,能产生多种具有活性的物质。该研究对地衣型真菌(*Xanthoria elegans*, *Myelochroa indica*, *Ramalina peruviana*, *Cladonia macilenta*, *Nephromopsis pallescens*, *Cladonia coccifera*)进行液体培养,2个月后,培养液用乙酸乙酯萃取后获得初提物。该研究采用抑菌圈法评价地衣型真菌初提物对7种致病细菌(*Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*)的抗菌活性,并测定最低抑菌浓度(MIC)。结果表明:6种地衣型真菌的初提物均具有一定的抗菌活性,且不同培养基对地衣型真菌产生抗菌物质有显著影响。其中,*R. peruviana*在MY液体培养基中所产生的次级代谢产物对金黄色葡萄球菌、藤黄微球菌、溶血性葡萄球菌、铜绿假单胞菌具有抑制效果,但在YMG培养基中所得初提物对供试7种致病细菌不具有抑菌效果。*X. elegans*在YMG培养基中所得初提物对枯草芽孢杆菌具有明显抗菌活性,其抑菌圈直径可达17.77 mm。该研究证实不同地衣型真菌液体培养初提物具有抗菌活性,不同的培养基也直接影响地衣型真菌抗菌效果。该研究结果为地衣型真菌的进一步研究及民族药的开发利用奠定了基础。

关键词: 地衣型真菌, 次级代谢产物, 抗菌活性, 抑菌圈法, 液体培养

中图分类号: Q939.92 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2017)02-0242-07

Antimicrobial activity of secondary metabolites from lichen forming fungi

ZHAO Neng^{1,2}, YUAN Xiao-Long^{2,3}, HUA Mei^{2,3}, LI Su-Yu^{1,2}, WANG Juan^{2,3}, WANG Yi^{2,3*}

(1. College of Forestry, Southwest Forestry University, Kunming 650204, China; 2. Key Laboratory of Rare and Endangered Forest Plants of State Forestry Administration, Yunnan Academy of Forestry, Kunming 650204, China; 3. Key Laboratory of Forest Plants Cultivation and Utilization, Yunnan Academy of Forestry, Kunming 650204, China)

Abstract: Lichen is a traditional ethnic medicine, which produces numerous active components. Thus, lichens have high research value. Most of antimicrobial ingredients from lichens were produced by lichen forming fungi. In order to detect the antimicrobial activity of secondary metabolites from lichen forming fungi, the fungi (*Xanthoria elegans*, *Myelochroa indica*, *Ramalina peruviana*, *Cladonia macilenta*, *Nephromopsis pallescens* and *Cladonia coccifera*) were cultured in liquid medium for two months. The secondary metabolites of lichen forming fungi were obtained by extracting with ethyl acetate, and then the extracts were weighed and dissolved in DMSO. Seven kinds of pathogenic bacteria (*Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and

收稿日期: 2016-01-27 修回日期: 2016-04-19

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金(31400488); 云南省应用基础研究计划面上项目[Supported by the National Natural Science Foundation of China(31400488); the Science and Technology Planning Program of Yunnan Province].

作者简介: 赵能(1991-), 男(苗族), 昆明人, 硕士研究生, 主要从事植物化学的研究, (E-mail) 247677981@qq.com.

*通信作者: 王毅, 博士, 助理研究员, 研究方向为植物学和分子生物学研究, (E-mail) 22825818@qq.com.

Micrococcus luteus) were used to screen activity of the extracts. Inoculating inhibition zone was used to evaluate the antibacterial activity of the extracts, and the minimum inhibitory concentration with antibacterial activity was also detected. The results showed that all of primary extract of lichen forming fungi had extensive antibacterial activity, and the antibacterial activity of the same fungi cultured showed significantly difference in different media. The secondary metabolites produced by *Ramalina peruviana* cultured in MY liquid medium had inhibitory effect to *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Micrococcus luteus*. It showed that the primary extract from *Ramalina peruviana* had extensive antibacterial effect. But the secondary metabolites of *R. peruviana* cultured in YMG liquid medium had not inhibitory effect to all of these pathogenic bacteria. Extracts from all of lichen forming fungi cultured in YMG liquid medium, Only the extract of *Cladonia coccifera* inhibited the *Staphylococcus aureus* which is gram-negative bacteria. The primary extract produced by *Xanthoria elegans* cultured in YMG medium had antibacterial effect to *Bacillus cereus*, the diameter of inhibition zone was up to 17.77 mm. Our results confirmed that the secondary metabolites of lichen forming fungi have antimicrobial activity and the lichen forming fungi can produce bioactive secondary metabolites in laboratorial culture conditions. Experiment results also showed that different media can stimulate different lichen forming fungi to produce different components. The innovation of this study was that different media were used to culture lichen forming fungi and lichen forming fungi had the characteristics of one strain many compounds. This study provides the groundwork to identify the active ingredients from lichens and provides an important information for culturing mass lichens to obtain bioactive compounds.

Key words: Lichen forming fungi, secondary metabolites, antimicrobial activity, inoculating inhibition zone, liquid culture

地衣是共生菌与共生藻经过漫长的生物演化过程共生联合形成的一类具有高度遗传稳定性的生物有机体,其生物学特性主要是菌藻共生体中真菌的体现(Moreira et al, 2015)。藻类为地衣型真菌提供光合产物,地衣型真菌为藻类提供水和无机盐,同时,地衣型真菌还产生次级代谢产物保护地衣体免受辐射和病原微生物侵入(韩乐琳等, 2009)。地衣长期作为民族药使用(Behera et al, 2001; 王立松等, 2012; 魏江春, 1982), 近年, 化学分析及活性研究也证实地衣具有巨大的潜在药用价值(Moreira et al, 2015; Ranković & Kosanić, 2015; Stocker-wörgötter, 2008)。松萝酸在 1950 年就被证明具有抗革兰氏阳性菌的活性物质(Francolini et al, 2004), 其后又发现地衣中的酚类物质大多都具有抗菌活性, 随着研究不断深入, Sushil et al(2003)发现, *Parmalia cirrhatum* 地衣水提液具有抗菌活性, 当浓度达到 10% 时对哺乳动物皮肤无副作用且该水提液抗菌活性可保留长达 2 a 时间。Nashi (2008); Stocker-wörgötter (2008)发现, 具有生物活性的地衣产物, 比如松萝酸, 缩酚酸及缩酚酸环醚等都是由地衣型真菌合成, 这些独特的次生代谢产物在抗菌、抗肿瘤、抗病毒等方面具有很好的药用价值(Molnár & Farkas, 2010; Luo et al, 2013; Xu et al, 2016)。国内从 1975 年开始至今一直对地衣体抗菌活性有报道(木全章和丁靖凯, 1975; 董原等, 2010; 党悦方等, 2014), 但由于

分离地衣型真菌难度较大且培养时间漫长, 因此国内对于地衣型真菌的活性研究鲜有报道。地衣中虽然有很多活性成分, 对地衣的研究也不断深入, 加之地衣本身生长缓慢的特性以及地衣生长环境恶化, 地衣资源势必面临萎缩(房敏峰等, 2011)。地衣中的抗菌成分都是由地衣型真菌产生, 要想大量获得地衣型真菌中的有效成分, 必然不能从自然环境中采集新鲜地衣以免加速地衣资源的萎缩, 而通过培养地衣型真菌并从而得到地衣型真菌的次级代谢产物可有效地解决地衣资源利用和保护的矛盾(Stocker-wörgötter, 2008)。

人类的生活环境中充斥着各种各样的致病细菌。随着医学技术的发展, 抗生素的滥用导致许多致病菌都具有一定的耐药性, 普通的抗生素已经不能很好的起到治疗疾病的作用(周威等, 2015), 例如, 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是临床上常见致病菌, 但随着抗生素大量、广泛的应用, 其耐药率也逐年上升(王爽等, 2004)。Francolini et al (2004)年发现地衣中的松萝酸能够直接杀死金黄色葡萄球菌, 因此, 大量培养地衣型真菌, 获得其次生代谢产物, 得到一系列具有抗菌效果的产品, 这将对地衣资源的开发利用及获得抗生素替代品起到至关重要的作用。本研究在选取试验用地衣型真菌之前进行了大量的预实验, 之后选出 6 种生长速度快, 具有一定活性的地衣型真菌(*Xanthoria elegans*, *My-*

elochroa indica, *Ramalina peruviana*, *Cladonia macilenta*, *Nephromopsis pallescens*, *Cladonia coccifera*), 获得乙酸乙酯粗提物并分别对 7 种致病菌进行活性筛选, 以期找到具有抗菌效果的初提物, 为下一步大量培养地衣型真菌, 分离提纯活性化合物及功能基因的研究作铺垫。

1 材料与方 法

1.1 研究材料

地衣型真菌(*Xanthoria elegans*, *Myelochroa indica*, *Ramalina peruviana*, *Cladonia macilenta*, *Nephromopsis pallescens*, *Cladonia coccifera*) 样本, 由韩国地衣资源中心赠送。6 种地衣均采自于中国云南, 凭证标本分别保存在昆明植物研究所标本馆和韩国地衣资源中心, *Xanthoria elegans* (馆藏号 041247); *Myelochroa indica* (馆藏号 041562); *Ramalina peruviana* (馆藏号 Chy040302); *Cladonia macilenta* (馆藏号 CH050136); *Nephromopsis pallescens* (馆藏号 CH050089); *Cladonia coccifera* (馆藏号 CH050056)。对新鲜的地衣体采用孢子分离法获得地衣型真菌后, 通过比对地衣型真菌和地衣体 ITS 序列, 确定所分离得到的真菌为地衣型真菌。地衣型真菌于 MY (麦芽糖提取物 20 g, 葡萄糖 6 g, 酵母提取物 2 g, 琼脂 8 g, 用水定容至 1 L) 培养基上 15 °C 培养, 并定期转接。获得足够的菌丝体后, 接种于体积为 300 mL 的 MY (麦芽糖提取物 20 g, 葡萄糖 6 g 酵母提取物 2 g 每升) 与 YMG (胰蛋白胨 10 g; 麦芽糖 5 g; 葡萄糖 10 g) 液体培养基中, 置于 15 °C, 转速为 150 r · min⁻¹ 摇床中培养 2 个月。

1.2 供试菌种

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、蜡样芽孢杆菌 (*B. cereus*)、副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*)、溶血性葡萄球菌 (*Staphylococcus haemolyticus*)、铜尿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*) 由昆明市食品药品检验所提供。

1.3 提取物制备

将所得培养物过滤后, 按体积比 1 : 1 加入乙酸乙酯振荡混匀, 30 min 超声 2 次, 倒入分液漏斗静置过夜。放出水相, 上层乙酸乙酯层用旋转蒸发仪浓缩致干, 称重后, 加入二甲基亚砜 (DMSO) 备用。

1.4 抑菌活性检测

供试菌株悬浮液制备: 将 6 种供试菌种分别接种于固体肉汤培养基中, 37 °C 恒温培养 24 h。用接种钩挑取已进行菌种斜面活化的培养基表面的菌块, 加入无菌生理盐水, 在组织研磨器中研磨均匀, 将菌悬液浓度调到 1 × 10⁶ ~ 6 × 10⁶ cfu · mL⁻¹。

抑菌试验: 配制 LB 固体培养基, 将固体培养基溶化倒入培养皿中冷却, 凝固后用无菌棉拭子分别蘸取各试验菌悬液, 均匀涂布培养基表面, 制成含菌平板, 每个菌种重复 3 次。采用滤纸片法 (王军等, 2013), 将直径 5 mm 的滤纸圆片, 经高压灭菌处理后干燥, 分别滴加 10 μL 供试 8 种地衣所得不同溶剂的乙酸乙酯浓缩液作为试验样片, 滴加 DMSO 液作为阴性对照片, 用无菌镊子将样片和 1 片阴性对照样片贴放于每个培养皿表面, 盖好培养皿, 于 37 °C 培养 24 h, 每个萃取浓缩物重复 3 次。

最小抑菌活性 (MIC) 的测定: 采用二倍稀释法, 测定相应具有活性培养物 MIC 值。

2 结果与分析

2.1 乙酸乙酯萃取得率及备试液浓度

6 种地衣型真菌培养液经乙酸乙酯 (300 mL) 萃取后得率及 DMSO 溶解后备试液浓度如表 1 所示。表 1 中, NP 代表 *Nephromopsis pallescens*, CC 代表 *Cladonia coccifera*, Xe 代表 *Xanthoria elegans*, MI 代表 *Myelochroa indica*, RP 代表 *Ramalina peruviana*, CMA 代表 *Cladonia macilenta*。MY, YMG 为培养基代号。从表 1 可以, 看出相同地衣型真菌在不同培养基中所得萃取物得率差别很大, 不同地衣型真菌在相同培养中所得萃取物得率差别也非常显著。

2.2 六种地衣型真菌在 MY、YMG 液体培养基下抑菌活性比较

将 6 种共生菌在 MY 液体培养基中进行培养, 用乙酸乙酯萃取后初提物的抑菌效果如表 2 所示。从表 2 看出, 6 种共生菌在 MY 液体培养基中所得培养物抑菌活性差别很大, Xe 与 MI 共生菌在 MY 培养基中虽然其乙酸乙酯萃取浓缩物得率高, 但是不能产生对供试 7 种致病菌达到抑制作用的有效成分, RP 共生菌在 MY 培养基培养物中能够产生对 2 种革兰氏阳性菌及 2 种革兰氏阴性菌产生抑制作用的有效成分。CMA 在 MY 中乙酸乙酯萃取物得率虽低, 但其对枯草芽孢杆菌存在抑制效果。

将6种共生菌在YMG液体培养基中培养,用乙酸乙酯萃取培养物物抑菌效果如表3所示。

表1 6种地衣型真菌萃取液得率及备试液浓度

Table 1 Six kinds of lichen forming fungi extraction yield and concentration of the test solution

名称 Name	净重 Net weight (g)	得率 Yield ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	备试液浓度 Concentration of the test solution ($\mu\text{g} \cdot 10\mu\text{L}^{-1}$)
NP-MY	0.0297	99	198
NP-YMG	0.0524	174.7	349.3
CC-MY	0.0808	269.3	538.7
CC-YMG	0.0453	151	302
Xe-MY	0.0763	254.3	508.7
Xe-YMG	0.0131	43.7	87.3
MI-MY	0.227	756.7	1513.3
MI-YMG	0.0053	17.7	35.3
RP-MY	0.1307	435.7	871.3
RP-YMG	0.0061	20.3	40.7
CMA-MY	0.0004	1.3	2.7
CMA-YMG	0.0007	2.3	4.7

从表3可以看出,6种地衣型真菌在YMG液体培养基中所得培养物抑菌活性差别很大。其中,Xe所得培养物对枯草芽孢杆菌的抑制最为敏感,抑菌圈半径最大,但Xe所得培养物不能够对其他6种参试致病菌产生抑制。6种地衣型真菌在YMG培养基中所得培养物对革兰氏阴性菌抑制效果较差,只有CC能对溶血性葡萄球菌产生抑制。CMA在YMG中乙酸乙酯萃取物含量极低,但能对三种革兰氏阳性菌产生抑制。

对比表2表3发现,同种地衣型真菌在不同培养基中培养其抑菌活性差别很大,NP在MY中培养能对两种致病菌产生抑制,但NP在YMG中培养对参试7种致病菌都没有抑制效果,RP在两种不同培养基中培养抑菌作用差别最为显著,RP在MY中培养能对4种致病菌产生抑制,其中包括革兰氏阴性菌,而在YMG培养基中,对7种供试菌无抑制效果,其它4种地衣型真菌在两种培养基中抑菌活性均有改变。

2.3 抗菌活性初提物 MIC

挑取具有抗菌活性培养物的相应备试液与相应致病菌进行MIC的测定(表4)。从表4中可以看出,各个地衣型真菌培养物乙酸乙酯浓缩物的最低抑制浓度各不相同,其中CMA的MIC最低。说明CMA在两种培养基中能产生的抑菌有效成分对供试的这几种菌较为敏感,仅需较低浓度就能对供试的3种革兰氏阳性菌产生抑制。而抑菌范围最广泛的为RP-MY,RP-MY的缺陷在于虽然RP-MY得率高,但RP-MY的浓度也较高,说明其虽然有较广泛的抑制效果,但对能抑制的4种菌抑制效果并不敏感,可能是其中的有效成分含量较低。

3 讨论

本研究首次采用不同成分液体培养发酵的方法,培养得到地衣型真菌,并首次将地衣型真菌用于液体中培养。地衣真菌培养液经乙酸乙酯处理后得初提物,对地衣真菌初提物进行抑菌活性研究发现,*Ramalina peruviana*在MY培养基中有较广泛的抑菌活性,能抑制革兰氏阳性菌及革兰氏阴性菌,可以考虑将*Ramalina peruviana*置于MY培养基中进行大量培养,之后分离得到相应有效成分加以鉴定。*Cladonia macilenta*在YMG培养基中虽然其乙酸乙酯萃取物得率低,但它在低浓度下依然有较好的抑菌效果,因此*Cladonia macilenta*也同样能置于YMG中进行大量培养,之后分离鉴定出相应有效成分。其余地衣型真菌由于能抑制的致病菌较少,因此暂不考虑对其余地衣型真菌进行大量培养。此外,可以考虑增加致病菌种类别,再次判断剩余暂无活性的地衣型真菌的抑菌活性。本研究的6种地衣型真菌活性相较于地衣体活性较弱,可能是由于液体培养时间较短,仅为2个月且培养体积只有300 mL,因此次级代谢产物低于成熟地衣体。

本研究还发现,同种地衣型真菌在不同培养基中得到的抑菌效果差别显著,因此可以初步判断他们产生的化合物并不相同。这也首次在国内印证了地衣型真菌次级代谢产物对培养条件的影响非常敏感,在不同培养条件下会刺激地衣型真菌得到不同的次级代谢产物(Deduke et al, 2012),这一特点正体现出地衣型真菌单菌多产物的优势(OSMAC)。利用这一优势在不同培养条件下使得地衣型真菌的不同功能基因表达能够得到更多结构多样的代谢产

表 2 MY 液体培养基乙酸乙酯萃取物抑菌活性
Table 2 Antibacterial activity of ethyl acetate extracts from MY liquid medium

名称 Name	革兰氏阳性 Gram-positive				革兰氏阴性 Gram-negative			对照 CK
	蜡样芽 孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	金黄色 葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	藤黄 微球菌 <i>Micrococcus luteus</i>	枯草芽 孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	副溶血 性弧菌 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	溶血性 葡萄球菌 <i>Staphylococcus haemolyticus</i>	铜尿假 单胞菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
NP-MY	7.27±0.083	-	-	-	-	-	7.31±0.24	-
CC-MY	7.30±0.12	-	-	-	-	8.04±0.17	-	-
Xe-MY	-	-	-	-	-	-	-	-
MI-MY	-	-	-	-	-	-	-	-
RP-MY	-	6.29±0.41	7.27±0.2	-	7.83±0.33	-	6.91±0.21	-
CMA-MY	-	-	-	7.51±0.15	-	-	-	-

注：“-”：无抑菌活性；抑菌圈直径以 mm 计。抑菌圈直径±s, n=3。下同。

Note: “-”. No inhibition effect; Diameter of inhibition zone is in in millimeters. Diameter of inhibition zone ± s, n=3. The same below.

表 3 YMG 液体培养基乙酸乙酯萃取物抑菌活性
Table 3 Antibacterial activity of ethyl acetate extracts from YMG liquid medium

名称 Name	革兰氏阳性 Gram-positive				革兰氏阴性 Gram-negative			对照 CK
	蜡样芽 孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	金黄色 葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	藤黄 微球菌 <i>Micrococcus luteus</i>	枯草芽 孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	副溶血 性弧菌 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	溶血性 葡萄球菌 <i>Staphylococcus haemolyticus</i>	铜尿假 单胞菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
NP-YMG	-	-	-	-	-	-	-	-
CC-YMG	6.56±0.42	-	-	-	-	8±0.21	-	-
Xe-YMG	-	-	-	17.77±0.18	-	-	-	-
MI-YMG	-	8.27±0.15	-	8.91±0.31	-	-	-	-
RP-YMG	-	-	-	-	-	-	-	-
CMA-YMG	8.94±0.75	7.96±0.23	-	10.09±0.16	-	-	-	-

表 4 备试液相应 MIC 测定 ($\mu\text{g} \cdot 10 \mu\text{L}^{-1}$)
Table 4 Minimum inhibitory concentration of test solution ($\mu\text{g} \cdot 10 \mu\text{L}^{-1}$)

名称 Name	革兰氏阳性 Gram-positive				革兰氏阴性 Gram-negative	
	蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	藤黄微球菌 <i>Micrococcus luteus</i>	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	溶血性葡萄球菌 <i>Staphylococcus haemolyticus</i>	铜尿假单胞菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
NP-MY	12.375	-	-	-	-	49.5
CC-MY	134.675	-	-	-	75.5	-
RP-MY	-	217.825	108.913	-	54.456	871.3
CMA-MY	-	-	-	0.675	-	-
CC-YMG	151	-	-	-	37.75	-
Xe-YMG	-	-	-	2.728	-	-
MI-YMG	-	8.825	-	8.825	-	-
CMA-YMG	0.294	1.175	-	0.588	-	-

物,从而有效解决了利用地衣资源与保护的矛盾(Wang et al,2014)。

本次研究通过分离得到的地衣型真菌并对其进行液体培养发现地衣型真菌中存在抗菌活性成分

的,这一结果与 Nashi (2008) 的结果相同。虽然地衣具有很高的研究价值,但是地衣在自然环境下生长缓慢,而且由于地衣被环境影响较大,要在野外得到大量地衣型真菌难度极大,为了获得地衣中的有效成分,可以先分离得到地衣型真菌,然后对其进行液体培养,通过模仿自然界中的营养成分,把共生菌中需要的糖类、有机和无机氮化合物、无机盐和一些微量元素等即共生菌在生长过程中的所必须的营养物质混合在水溶液中,通过供氧进行菌丝体的大量培养繁殖(周勇,2008),液体培养将加快菌丝体生长速度且能得到大量菌丝体(张建辉等,2002),并且得到大量的次级代谢产物。

本研究证实在实验室条件下培养地衣型真菌是切实可行的。虽然培养地衣型真菌能够获得具有抗菌活性的有效成分,但是在工业生产上难以分离纯化得到大量有效成分,因此,从地衣型真菌中确定有效成分后定位其功能基因,将功能基因转化到容易培养的真菌中发酵培养得到具有活性的地衣产物(王毅等,2015),以期用此途径在将来进行工业生产以推动地衣资源药用开发。

参考文献:

BEHERA BC, MAKHIJA U, 2001. Effect of various culture conditions on growth and production of salazinic acid in *Bulbothrix setschwanensis* (lichenized ascomycetes) *in vitro* [J]. *Curr Sci India*, 80(11): 1424-1427.

DANG YF, TIAN J, SHANG J, et al, 2014. The antimicrobial activity of four medicinal lichens from Taibai Mountain [J]. *Nat Sci J NW Univ*, 44(3): 433-438. [党悦方, 田娇, 尚娇, 等, 2014. 太白山 4 种药用地衣抑菌活性研究 [J]. *西北大学学报(自然科学版)*, 44(3): 433-438.]

DEDUKE C, TIMSINA B, PIERCEY-NORMORE MD, 2012. Effect of environmental change on secondary metabolite production in lichen-forming fungi [M]. *Intech Open Access Publisher*: 197-230.

DONG Y, WANG SF, LIU Z, et al, 2010. Study on antibacterial activity of crude extract of 4 kinds of foliose lichen on 3 kinds of bacteria [J]. *J Anhui Agric Sci*, 38(10): 5080-5081. [董原, 王世发, 刘卓, 等, 2010. 4 种叶状地衣粗提液对 3 种细菌的抑菌活性研究 [J]. *安徽农业科学*, 38(10): 5080-5081.]

FANG MF, WANG QL, HU ZH, 2011. Advances in studies on chemical constituents from lichen and their pharmacological effects [J]. *Chin Trad Herb Drugs*, 42(12): 2571-2576. [房敏峰, 王启林, 胡正海, 2011. 地衣化学成分和药理作用研究进展 [J]. *中草药*, 42(12): 2571-2576.]

FRANCOLINI I, NORRIS P, PIOZZI A, et al, 2004. Usnic acid, a natural antimicrobial agent able to inhibit bacterial biofilm formation on polymer surfaces [J]. *Antimicrob Agent Chemoth*, 48(11): 4360-4365.

HAN LL, WEI JC, 2009. A preliminary study on antioxidant ability

of two antarctic lichen species extracts [J]. *Anim Feed Sci Technol*, 28(6): 846-849. [韩乐琳, 魏江春, 2009. 两种南极地衣提取物抗氧化能力的初步研究. *畜牧与饲料科学*, 28(6): 846-849.]

HUNECK S, YOSHIMURA I, 1996. Identification of lichen substances [M]. Berlin Heidelberg: Springer.

LUO H, LI C, KIM JC, et al, 2013. Biruloquinone, an acetylcholinesterase inhibitor produced by lichen-forming fungus *Cladonia macilenta* [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 23(2): 161-166.

MOLNÁR K, FARKAS E, 2010. Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review [J]. *Zeitschrift Fur Naturforschung C*, 65(3-4): 157-173.

MOREIRA ASN, BRAZ-FILHO R, MUSSI-DIAS V, et al, 2015. Chemistry and biological activity of ramalina lichenized fungi [J]. *Molecules*, 20(5): 8952-8987.

MU QZ, DING JK, 1975. Antibacterial substances of the chemical composition from Lichen-Usnic acid [J]. *Plant Divers & R*, (2). [木全章, 丁靖凯, 1975. 地衣化学成分的研究抗菌物质-松萝酸. *植物分类与资源学报*, (2).]

NASHI TH, 2008. *Lichen Biology* [M]. Cambridge: CUP.

NIU DL, WANG LS, ZHANG YJ, et al, 2007. Secondary metabolites and bioactivities of lichens [J]. *Nat Agric Prod Res Dev*, 19(6): 1079-1086. [牛东玲, 王立松, 张颖君, 等, 2007. 地衣次级代谢产物及其生物活性研究进展 [J]. *天然产物研究与开发*, 19(6): 1079-1086.]

RANKOVIĆ B, KOSANIĆ M, 2015. Lichens as a potential source of bioactive secondary metabolites [M] // *Lichen Secondary Metabolites*. Springer International Publishing: 1-26.

STOCKER-WÖRGÖTTER E, 2008. Metabolic diversity of lichen-forming ascomycetous fungi: culturing, polyketide and shikimate metabolite production, and PKS genes [J]. *Nat Prod Rep*, 25(1): 188-200.

SUSHIL KS, PATRA M, DIKSHIT A, et al, 2003. *Parmelia cirrbatum*; a potential source of broad spectrum natural antifungal [J]. *Phytother Res*, 17: 399-400.

WANG J, YAN LK, LI HF, et al, 2013. Identification of *Archangium gephyra* NX0045 (Myxobacteria) and study on antimicrobial activities of its metabolites [J]. *Nat Sci J NW Univ*, 43(3): 437-441. [王军, 闫立昆, 李宏铎, 等, 2013. 一株黏细菌 *Archangium gephyra* 的鉴定及其代谢产物抑菌活性的研究 [J]. *西北大学学报(自然科学版)*, 43(3): 437-441.]

WANG LS, QIAN ZG, 2012. *Illustrated medicinal lichens of China* [M]. Kunming: Yunnan Science & Technology Press: 1-176. [王立松, 钱子刚, 2012. *中国药用地衣图鉴* [M]. 昆明: 云南科技出版社: 1-176.]

WANG S, LI D, FAN X, et al, 2004. Drug-resistance dynamics of *Staphylococcus aureus* [J]. *J Microbiol*, 24(4): 53-55. [王爽, 李冬, 范霞, 等, 2004. 金黄色葡萄球菌耐药性变迁 [J]. *微生物学杂志*, 24(4): 53-55.]

WANG WJ, LI DY, LI YC, et al, 2014. Caryophyllene sesquiterpenes from the marine-derived fungus *Ascotricha* sp. ZJ-M-5 by the one strain-many compounds strategy [J]. *J Nat Prod*, 77(6): 1367-1371.

WANG Y, WANG CC, ZHOU X, et al, 2015. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of the lichen forming fungus *Cladonia metacorrallifera* [J]. *Mycosystema*, 34(2): 246-251. [王