

西藏蜂胶抑菌活性及对金钗石斛茄病镰刀菌抑菌机理探究

王芳^{1,2}, 张硕^{1,2*}, 杜琳¹, 唐榆婷¹, 覃悦¹, 王岚¹

(1. 成都师范学院化学与生命科学学院, 成都 611130;

2. 成都师范学院特色园艺生物资源开发与利用四川省高等学校重点实验室, 成都 611130)

摘要: 为探究西藏蜂胶的抑菌活性及对金钗石斛茄病镰刀菌作用机理, 以2种细菌3种真菌为供试菌, 采用牛津杯法、菌饼法、最低抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC)对西藏蜂胶的抑菌活性进行评价。通过研究西藏蜂胶处理后金钗石斛茄病镰刀菌菌丝形态、生长速率、细胞膜通透性及呼吸强度探究其抑菌机理。结果表明: (1) 西藏蜂胶具有广谱抑菌性, 其抑菌能力显著强于市售蜂胶。(2) 以80%乙醇提取剂在pH为6的条件下提取的西藏蜂胶对5种供试菌抑菌效果最佳。(3) 西藏蜂胶浓度为 $10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时对金钗石斛茄病镰刀菌抑制率达89%, 抑菌中浓度(EC_{50})为 $2.552\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; 菌丝体细胞形态由饱满破裂到干瘪, 细胞膜通透性增强, 内容物泄漏; 呼吸强度增大, 能量代谢受阻, 抑制菌丝体生长。综上所述, 西藏蜂胶为天然广谱抑菌剂, 利用其防治茄病镰刀菌所引起的植物性病害具有良好的开发前景及研究潜力。

关键词: 西藏蜂胶; 抑菌活性; 金钗石斛; 茄病镰刀菌; 抑菌机理

中图分类号: S896.6

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X(2023)05-0847-08

Study on the antibacterial activity of Tibetan propolis and the inhibitory mechanism of *Haematonectria haematococca* of *Dendrobium nobile*

WANG Fang^{1,2}, ZHANG Shuo^{1,2}, DU Lin¹, TANG Yuting¹, QIN Yue¹, WANG Lan¹

(1. College of Chemistry and Life Sciences, Chengdu Normal University, Chengdu 611130; 2. Sichuan Provincial Key Laboratory for Development and Utilization of Characteristic Horticultural Biological Resources, Chengdu Normal University, Chengdu 611130)

Abstract: The purpose of this study is to look into the antibacterial activity of Tibetan propolis and the inhibitory mechanism in *Haematonectria haematococca* of *Dendrobium nobile*. To evaluate the antibacterial activity of Tibetan propolis, two types of bacteria and three types of fungi were studied with the Oxford cup method, the fungus cake method, the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal/fungicidal concentration (MBC), respectively. The hyphal morphology, growth rate, cell membrane permeability, and respiration intensity of *H. haematococca* after treatment with Tibetan propolis were used to investigate the antifungal mechanism. The results showed that: (1) Tibetan propolis that had broad-spectrum antibacterial activity was significantly stronger than that of commercially available propolis. (2) On the five tested strains, Tibetan propolis extracted with 80% ethanol at pH 6 had the best antibacterial activity. (3) At a concentration of $10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ of Tibetan propolis, the mycelial growth inhibition rate was 89%, and the EC_{50} was $2.552\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; under these conditions, the morphology of the mycelium cells changed from full rupture to shriveling, which increased the cell membrane permeability and content leakage. Furthermore, the respiration intensity increased, which blocked the energy metabolism and inhibited the mycelium growth. In summary, Tibetan propolis is a natural broad-spectrum antibacterial agent with promising the development and research potential for controlling plant diseases caused by *H. haematococca*.

Key words: Tibetan propolis; antibacterial activity; *Dendrobium nobile*; *Haematonectria haematococca*; inhibitory mechanism

收稿日期: 2022-11-08

基金项目: 成都师范学院校级项目(CS18ZD02)和教育部大学生创新创业训练计划支持项目(S202114389186)共同资助。

作者简介: 王芳, 博士, 讲师。E-mail: wangfangbia@163.com

* 通信作者: 张硕, 副教授。E-mail: 15388114168@163.com

蜂胶是蜜蜂收集天然植物嫩芽、树脂分泌物、花粉和土壤,将其与自身的腺体分泌物混合,修复并保护蜂箱免受外界侵袭时收集的一种树脂物质^[1],具有抑菌、保肝、抗病毒、抗癌、防辐射及促进组织再生等生物活性^[2]。研究已证实蜂胶对细菌、酵母、真菌及病毒等多种微生物具有良好的抑制效果^[3],其抑菌活性与气候、不同地区的植被、蜂胶收获季节、地理来源^[4]、提取方式、提取剂浓度、pH等^[5]有关。西藏地区海拔3 600~5 100 m,气候干燥,太阳照射时间长,蜂场高度罕见,远离污染。该地区含有至少28种珍贵野花,以草木樨、红景天和藏黄芪为主^[6]。据悉全球仅西藏和澳洲2处养蜂基地无寄生虫蜂螨生存。西藏蜂不受蜂螨的影响,所得蜂胶产品可能有其独特功效,研究西藏蜂胶抑菌特性显得尤为重要。目前有关西藏蜂胶的研究报告甚是局限,开展该领域研究弥足珍贵。

金钗石斛(*Dendrobium nobile*)是兰科石斛属(*Dendrobium*)的一种多年生附生草本名贵药用植物,其药用成分生物碱和多糖可缓解胃病、发烧、炎症和疼痛^[7]。目前,已报道了几种金钗石斛真菌病,包括根腐病、茎基腐病、炭疽病、叶斑病等,给金钗石斛产量和品质带来了极大的损失^[8-9]。研究显示植物根腐病是由世界性土传真菌镰刀菌侵染引起,素有“植物癌症之称”^[10]。镰刀菌常能引起小麦茎基腐病^[11]、板栗内腐病^[12]和铁皮石斛根腐病^[10]等,带来巨大的经济损失。茄病镰刀菌是(*Haematonectria haematococca*)分离自金钗石斛根部,是镰刀菌的一种,对金钗石斛原球茎和幼苗表现出高致病性^[13]。目前,石斛根腐病防治仍过分依赖化学防治,这种措施在控制病虫害的同时带来了病虫害抗药性、农药残留、种植环境污染等诸多风险。因此,寻找毒性较小、环境友好、可持续性和成本可控的新型生物农药及制剂刻不容缓。蜂胶作为抗菌效能极佳的生物抗菌剂,是蜂巢防病、治虫的重要组成部分。西藏养蜂基地无寄生虫蜂螨生存,该实例给了我们重要启发,是否可以将西藏优质蜂胶有效成分应用到金钗石斛的病虫害防治上将成为我们寻找金钗石斛生物安防的重要模式样本。

本研究利用抑菌圈、抑制率、MIC和MBC探究西藏蜂胶乙醇提取物对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、酿酒酵母菌、绿色木霉菌和金钗石斛茄病镰刀菌的抑菌活性,同时考察了不同极性萃取、提取剂浓度、pH等因素对西藏蜂胶抑菌作用效果的影响。通过西藏蜂胶处理后金钗石斛茄病镰刀菌菌丝形态、生长速率、细胞膜通透性及呼吸强度探究其抑

菌机理,为进一步探究西藏蜂胶在生物防治金钗石斛病原菌和食品安全保藏方面提供基础数据,也为西藏蜂胶资源的综合开发利用寻找出路。

1 材料与方法

1.1 材料

西藏蜂胶(原料蜂胶)由成都四十一度蜂业有限公司于2019年5月至7月期间从西藏乃东区(海拔3 560 m,北纬28°44'~29°36',东经91°32'~92°02')的蜂箱中采集,贮藏于-20℃冰箱冷冻。市售蜂胶,来源于汪氏蜜蜂园,常温下贮藏于棕色瓶。

试剂:蛋白胨、牛肉膏、琼脂、硫胺素和葡萄糖均为生化试剂,无水乙醇、醋酸乙酯、石油醚、氯化钠、氢氧化钠、磷酸二氢钾和七水硫酸镁均为分析纯。

供试菌种:大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、酿酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)和绿色木霉菌(*Trichoderma viride*)均由成都师范学院实验室提供。金钗石斛茄病镰刀菌(*Haematonectria haematococca* (Berk. & Broome) Samuels & Rossman)由北纳生物(BNCC)提供。培养基包括营养肉汤(NB)培养基、马铃薯琼脂培养基(PDA)和综合培养基(CPDA)。

仪器:LDZX-50KBS型立式压力蒸汽灭菌锅,上海申安医疗器械厂;DW-YL270抽屜型低温保存箱,长虹美菱股份有限公司;DH-600A电热恒温培养箱,北京中兴伟业仪器有限公司;VS-840-1型净化工作台,上海博迅有限公司;JA3003精密电子天平,上海良平仪器仪表有限公司;UV754型紫外分光光度计,上海菁华科技仪器有限公司;SKY-100C型恒温培养振荡器,济南凯尼自动化科技公司;RE-52CS旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;DDS-11C型电导率仪,上海精科仪器设备有限公司;JPSJ-605F型溶解氧分析仪,上海仪电科学仪器股份有限公司;JSM-7500F型扫描电镜,日本电子株式会社(JEOL)。

1.2 方法

1.2.1 菌种活化与菌悬液制备 大肠埃希氏菌和金黄色葡萄球菌分别接于NB液体培养基,37℃培养18~24 h;酿酒酵母、木霉菌分别接于PDA培养基、茄病镰刀菌接种至CPDA培养基,28℃恒温摇床振荡培养24~48 h。

1.2.2 西藏蜂胶提取物的制备 挑选出西藏蜂胶中的蜜蜂尸体,将蜂胶放入-18℃低温冰箱中,冷藏

24 h, 用破壁机打碎, 过 60 目筛, 称取 1.00 g 蜂胶于小烧杯中, 用提取剂溶解, 磁力搅拌器 20 °C 下搅拌 48 h, 置于 4 °C 冰箱过夜, 滤膜过滤, 40 °C 旋转蒸发后定容至 100 mL。倒入棕色瓶中备用。

市售蜂胶样液: 称取 1.00 g 市售蜂胶于小烧杯, 加入 80% 乙醇定容至 100 mL, 倒入棕色瓶备用 (因市售蜂胶为除杂除蜡后的浓缩精胶, 因此用相应溶剂溶解定容备用)。

1.2.3 抑菌试验 1) 细菌。牛津杯法^[14]: 将灭菌后的固体培养基倒平板, 厚度约 3 ~ 5 mm, 固结后用无菌枪头取 200 μL 菌悬液于培养基, 用玻璃涂布棒涂抹均匀。将牛津杯放入培养基 (每平板 3 个), 用无菌枪头取 180 μL 蜂胶样液于牛津杯内, 在 37 °C 培育 18 ~ 24 h, 用游标卡尺测抑菌圈的直径。

2) 真菌。菌饼法^[15-16]: 将灭菌后的培养基倒平板, 厚度约 3 ~ 5 mm, 加入 1 mL 蜂胶样液混合均匀, 待凝固后将用 6 mm 灭菌金属打孔器打好的待测菌饼放置于平板中央, 含菌面朝下, 每皿 1 块, 每个浓度重复 3 次, 放置培养箱中培养至对照组长满后, 使用十字交叉法量取生长直径, 除去菌饼本身大小, 取平均值, 按公式 (1) 计算菌落直径, 按公式 (2) 计算抑制率。

菌落直径 (mm) = 测量菌落直径平均值 - 菌饼直径 (1)

抑制率 (%) = (对照组菌落直径 - 处理组菌落直径) / 对照组菌落直径 × 100 (2)

1.2.4 最小抑菌浓度 (MIC) 和最小杀菌浓度 (MBC) 的测定 1) 细菌。用试管二倍稀释法^[4]将样液稀释成所需浓度。试管内加入 10 mL 灭菌后的液体培养基、1 mL 样液和 200 L 的菌悬液, 充分混合培养箱内培养 18 ~ 24 h 后用分光光度计进行测定, 其中每个浓度都需做相应的空白对照。测得吸光值小于正常菌液吸光值中浓度最低的则为最小抑菌浓度 (MIC)。将通过试管二倍稀释法测出的 MIC 值所对应的前后液体培养物取 1 mL 加入固体平板中培养 16 h 后观察。平板中菌落数少于 5 所对应的样液浓度则为最小杀菌浓度 (MBC)。

2) 真菌。采用平板二倍稀释法^[7], 将相应的培养基加入培养皿中, 再加入不同浓度的蜂胶样液混合均匀后静置, 待凝固后分别加入 180 mL 相应菌液 (1.5×10^8), 涂布均匀。28 °C 培养 72 h 后观察, 以没有菌生长对应的蜂胶样液中最小的浓度称最小抑菌浓度 (MIC)。把没有菌生长的接着培育 72 h 后观察, 以没有菌生长对应的蜂胶样液中最小的浓度为最小杀菌浓度 (MBC)。

1.2.5 不同影响因素对西藏蜂胶提取物抑菌活性的影响 在保持其他条件不变的情况下, 选择不同萃取相 (蒸馏水、乙醇、乙酸乙酯和石油醚)、乙醇浓度 (65%、70%、80% 和 95%)、pH (5、6、7 和 8) 对西藏蜂胶进行提取。制得提取液于棕色瓶中备用, 采用 1.2.3 的方法进行抑菌试验, 每个处理 3 个重复, 以相应溶剂做空白对照。

1.2.6 西藏蜂胶对金钗石斛茄病镰刀菌抑菌机理研究 1) 西藏蜂胶对金钗石斛茄病镰刀菌菌丝表面形态的影响。通过扫描电子显微镜 (SEM) 观察西藏蜂胶对金钗石斛茄病镰刀菌菌丝表面形态的变化。用 2.5% 戊二醛溶液固定金钗石斛茄病镰刀菌菌丝体, 置于 4 °C 放置 10 h, 磷酸盐缓冲液洗涤 3 次弃去上清液。用 100%、90%、70%、50% 和 30% 乙醇进行梯度脱水并冷冻干燥。采用 JSM-7500F 型扫描电镜进行检测。

2) 西藏蜂胶对金钗石斛茄病镰刀菌菌丝生长抑制效果及毒力回归分析。将西藏蜂胶提取液配制不同浓度梯度 (10、5、2.5、1.25 和 0.625 mg·mL⁻¹), 分别取 1.0 mL 蜂胶提取液加入培养基内, 充分混合。菌饼法同 1.2.3 (2), 定期测定菌落直径, 计算抑制率。使用 80% 乙醇溶液作为对照。利用 GraphPad Prism7 软件进行毒力回归分析。

3) 金钗石斛茄病镰刀菌菌丝体细胞膜透性的测定。参考杨书珍^[8]的方法。将 100 mL 蒸馏水、等量的菌丝体和 10 mg·mL⁻¹ 蜂胶提取液分别加入三角瓶内, 置于摇床上 28 °C 恒温培养。使用电导率仪间隔一定时间分别测定未加入菌丝体的空白电导率 (P_0) 和加入菌丝体的电导率 (P_1)。将菌丝体放置于电炉上煮沸 15 min, 静置, 冷却至 28 °C, 测定杀死菌丝体后的电导率 (P_k)。每个处理设置重复 3 次, 使用 80% 的乙醇溶液作为对照, 其他操作均相同。相对电导率计算按公式 (3) 进行:

$$\text{相对电导率}(\%) = (P_1 - P_0) / (P_k - P_0) \times 100 \quad (3)$$

4) 金钗石斛茄病镰刀菌菌丝体培养过程中呼吸强度的测定。参考杨书珍^[8]的方法。从长出的菌落边缘挑取一定量的菌丝体放入三角瓶内, 加入 100 mL 的 10 mg·mL⁻¹ 蜂胶提取液, 每个处理设置重复 3 次, 对照使用等量的 80% 的乙醇溶液代替蜂胶提取液, 均匀混合, 28 °C 摇床培养, 使用溶解氧分析仪在 28 °C 恒温水浴的条件下测定密闭环境下持续搅拌的反应体系中的溶解氧量, 计算耗氧速度, 绘制耗氧曲线。

1.3 统计分析

采用 GraphPad Prism7 制图, 使用 SPSS 22.0 进

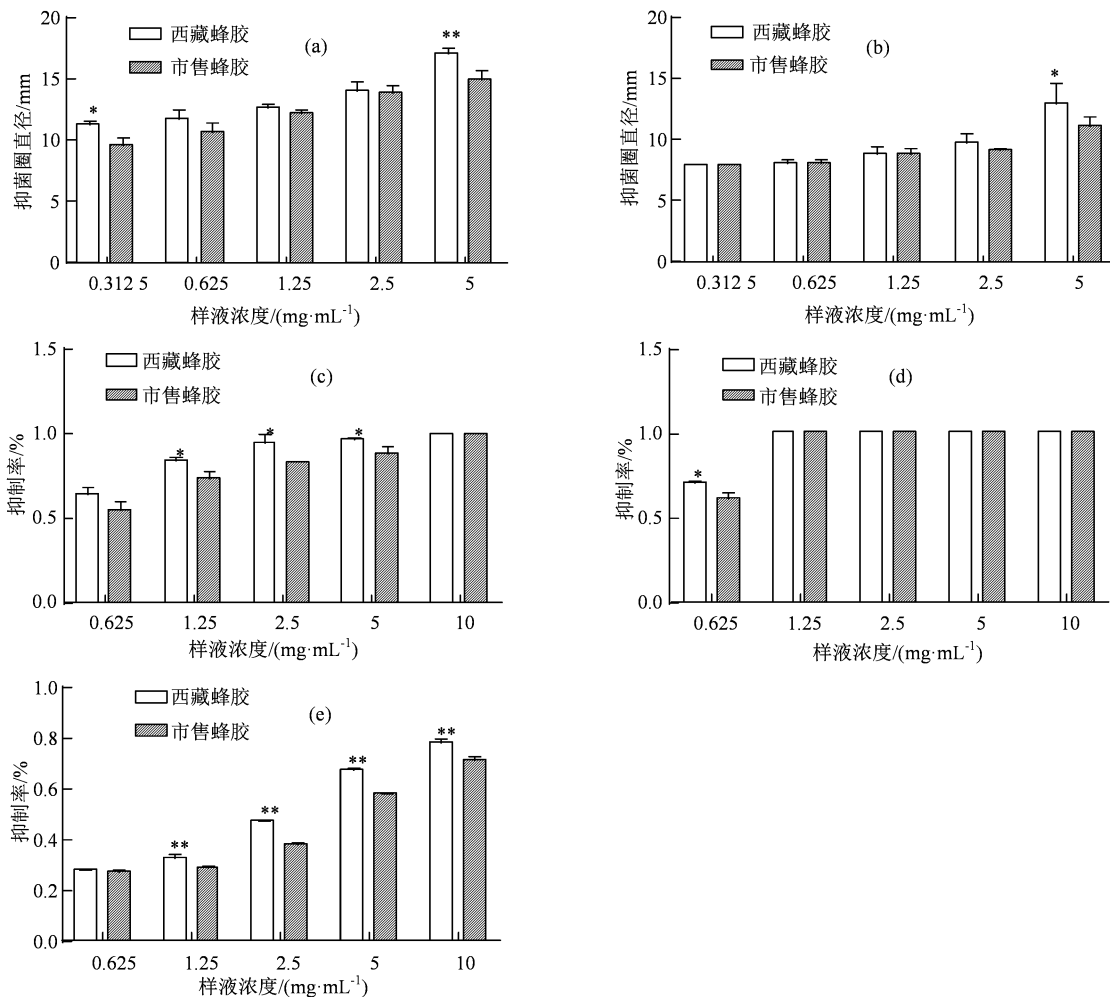
行单因素方差分析和显著性检验,计算MIC和MBC。

2 结果与分析

2.1 西藏蜂胶抑菌活性测定

2.1.1 西藏蜂胶抑菌活性 西藏蜂胶对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌活性试验结果显示(图1(a)和1(b)),随着样液浓度的增加,西藏蜂胶抑菌性逐渐增强。同一样液浓度下,西藏蜂胶对金黄色葡萄球菌的抑菌性极显著高于大肠埃希氏菌($P < 0.01$)。与市售蜂胶相比,西藏蜂胶对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑制作用在 $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的样液浓度下极显著增强($P < 0.01$),对金黄色葡萄球菌在 $0.3125 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的样液浓度下显著增强($P < 0.05$)。

西藏蜂胶对酿酒酵母、木霉菌和茄病镰刀菌的抑菌性结果表明(图1(c)、1(d)和1(e)),随着样液浓度的增加,西藏蜂胶和市售蜂胶对酿酒酵母、木霉菌和茄病镰刀菌的抑菌性逐渐增强。在 5 、 2.5 和 $1.25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,西藏蜂胶对木霉菌的抑菌性显著高于酿酒酵母和茄病镰刀菌($P < 0.05$),对酿酒酵母的抑菌性极显著高于茄病镰刀菌($P < 0.01$)。与市售蜂胶相比,西藏蜂胶对酿酒酵母的抑制效果在 1.25 、 2.5 和 $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的样液浓度下显著增强($P < 0.05$),对木霉菌的抑制效果在 $0.625 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的样液浓度下显著增强($P < 0.05$),对茄病镰刀菌的抑制效果在 10 、 5 、 2.5 和 $1.25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的样液浓度下极显著增强($P < 0.01$)。



(a) 金黄色葡萄球菌; (b) 大肠杆菌; (c) 酿酒酵母; (d) 木霉菌; (e) 茄病镰刀菌。

*和**分别为0.05及0.01水平上的显著性差异。

图1 西藏蜂胶的抑菌性

Figure 1 Antibacterial activity of Tibet propolis

2.1.2 MIC和MBC 最小抑菌浓度(MIC)能够作为评判体外抑菌作用大小的指标,若值越小,则说明该样品抑制作用越强^[19]。5种受试菌MIC的结果见表1。所有测试的菌株都对蜂胶敏感,对比市售

蜂胶,西藏蜂胶抑制真菌的能力(酿酒酵母和木霉菌)表现更为突出,且对金黄色葡萄球菌、木霉菌及酿酒酵母的抑制作用最强,MIC均为 $0.3125 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$;总体MIC在 $0.3125 \sim 0.6250 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

MBC 是杀死供试微生物的最小浓度, 是反映抗菌活性的重要指标。由表 1 可知, 西藏蜂胶对大肠杆菌、酿酒酵母和木霉菌的杀菌效果较市售蜂胶更强。表现为对金黄色葡萄球菌的杀菌效果最佳,

MBC 为 $0.625\ 0\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 其次为大肠杆菌与木霉菌, MBC 为 $1.250\ 0\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 酿酒酵母 MBC 为 $2.500\ 0\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

表 1 西藏蜂胶对 5 种受试菌的 MIC 和 MBC 抑菌活性

Table 1 Antibacterial activity of Tibetan propolis against MIC and MBC of five tested strains ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)

菌株名称	MIC		MBC	
	西藏蜂胶	市售蜂胶	西藏蜂胶	市售蜂胶
金黄色葡萄球菌	0.312 5	0.312 5	0.625 0	0.625 0
大肠杆菌	0.625 0	0.625 0	1.250 0	2.500 0
酿酒酵母	0.312 5	0.625 0	2.500 0	5.000 0
木霉菌	0.312 5	0.625 0	1.250 0	2.500 0
茄病镰刀菌	0.625 0	0.625 0	5.000 0	5.000 0

表 2 西藏蜂胶不同试剂提取相对 5 种受试菌的抑制效果

Table 2 Antibacterial activity of Tibetan propolis with different solvents to five kinds of strains

菌株名称与参数	提取剂			
	水	乙醇	乙酸乙酯	石油醚
金黄色葡萄球菌抑菌圈/mm	8.25 ± 0.25^c	17.08 ± 0.52^a	9.58 ± 0.80^b	7.87 ± 0.12^c
大肠杆菌抑菌圈/mm	9.08 ± 0.34^b	15.25 ± 0.50^a	9.17 ± 0.79^b	10.08 ± 0.34^b
酿酒酵母抑制率/%	12.33 ± 0.58^c	72.33 ± 0.57^a	12.67 ± 0.58^c	27.11 ± 0.84^b
木霉菌抑制率/%	9.15 ± 0.57^d	82.00 ± 2.64^a	43.92 ± 0.89^b	22.37 ± 1.06^c
茄病镰刀菌抑制率/%	13.47 ± 0.94^d	77.50 ± 0.74^a	22.70 ± 0.83^b	16.48 ± 0.71^c

注: 同行肩标不同小写字母表示行组间有显著性差异 ($P<0.05$)。下同。

表 3 不同浓度乙醇萃取的西藏蜂胶相对 5 种受试菌的抑制效果

Table 3 Antibacterial activity of extracted Tibetan propolis by different concentrations of ethanol on five kinds of strains

菌株名称与参数	乙醇浓度			
	65%	70%	80%	95%
金黄色葡萄球菌抑菌圈/mm	9.83 ± 0.78^c	10.67 ± 0.44^c	17.13 ± 0.53^a	11.02 ± 0.41^b
大肠杆菌抑菌圈/mm	9.26 ± 0.56^c	10.47 ± 0.89^b	15.70 ± 0.28^a	9.03 ± 0.45^c
酿酒酵母抑制率/%	27.46 ± 1.13^c	54.18 ± 0.74^b	77.37 ± 0.74^a	27.25 ± 0.55^c
木霉菌抑制率/%	69.11 ± 0.84^c	77.90 ± 0.60^b	84.04 ± 0.28^a	75.10 ± 0.68^b
茄病镰刀菌抑制率/%	27.18 ± 0.42^d	59.47 ± 0.49^c	82.19 ± 0.85^a	66.22 ± 1.38^b

表 4 不同 pH 条件下乙醇萃取的西藏蜂胶相对 5 种受试菌的抑制效果

Table 4 Antibacterial activity of Tibetan propolis by ethanol's extraction under different pH values on five kinds of strains

菌株名称与参数	pH 值			
	5	6	7	8
金黄色葡萄球菌抑菌圈/mm	10.89 ± 0.13^c	16.39 ± 0.97^a	12.36 ± 0.05^b	11.53 ± 0.63^{bc}
大肠杆菌抑菌圈/mm	10.35 ± 0.56^{bc}	13.77 ± 0.52^a	11.01 ± 0.43^b	9.93 ± 0.67^c
酿酒酵母抑制率/%	15.13 ± 0.56^d	54.18 ± 0.74^a	50.04 ± 0.17^b	31.59 ± 1.13^c
木霉菌抑制率/%	66.33 ± 0.51^b	74.86 ± 0.58^a	53.59 ± 0.53^c	40.89 ± 0.51^d
茄病镰刀菌抑制率/%	37.18 ± 0.42^d	70.99 ± 0.99^a	62.52 ± 0.93^b	50.67 ± 0.67^c

2.2 不同因素对西藏蜂胶提取物抑菌活性的影响

2.2.1 西藏蜂胶各萃取相的抑菌作用 蜂胶中存在丰富的抑菌活性物质, 采用不同提取剂萃取的蜂胶不同极性活性物质的抑菌作用 (表 2) 表明, 西藏蜂胶的 4 种溶剂提取液在相同浓度下, 对 5 种受试菌都有一定的抑制效果。不同极性溶剂萃取后所得萃取相抑菌效果存在显著差异, 均以蜂胶乙醇提取

液抑制作用最为显著。蜂胶乙醇提取物对金黄色葡萄球菌抑制效果最好, 其次是大肠杆菌, 对真菌的抑制效果则是木霉菌>茄病镰刀菌>酿酒酵母。因此选用乙醇提取剂做进一步研究。

2.2.2 西藏蜂胶不同浓度乙醇萃取相的抑菌作用 西藏蜂胶不同浓度乙醇萃取相对 5 种受试菌的抑制效果见表 3。西藏蜂胶乙醇浓度在 65% ~ 95% 范围

内,对5种供试菌均有一定的抑制作用。不同乙醇浓度对5种受试菌的抑制效果存在显著差异,排序为:80% > 70% > 95% > 65%。80%蜂胶乙醇萃取相对细菌的抑制作用为:金黄色葡萄球菌 > 大肠杆菌;对真菌的抑制作用为:木霉菌 > 茄病镰刀菌 > 酿酒酵母。因此选用80%乙醇做进一步研究。

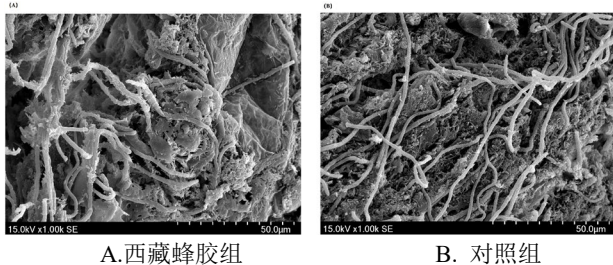


图2 西藏蜂胶提取液处理过的菌体在SEM扫描电镜下的形态

Figure 2 Effects of Tibetan propolis extracts on the morphology of *H. haematococca*

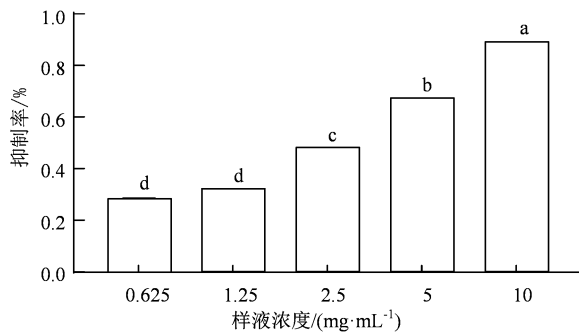


图3 不同浓度西藏蜂胶提取液对金钗石斛茄病镰刀菌抑制率的影响

Figure 3 Effects of different concentrations of Tibetan propolis extracts on the inhibition rates of *H. haematococca*

2.2.3 不同 pH 对西藏蜂胶抑菌作用的影响 不同 pH 对西藏蜂胶抑菌作用的影响结果(表4)显示,在不同 pH 值下提取的蜂胶抑菌作用有一定的差异,其排序为: pH6 > pH7 > pH8 > pH5。pH 为6时,蜂胶乙醇提取物对细菌的抑制作用为:金黄色葡萄球菌 > 大肠杆菌,对真菌的抑制作用为:木霉菌 > 茄病镰刀菌 > 酿酒酵母。因此选用 pH6 做进一步研究。

2.3 西藏蜂胶对金钗石斛茄病镰刀菌抑菌机理研究

2.3.1 西藏蜂胶对金钗石斛茄病镰刀菌菌丝表面形态的影响 通过扫描电子显微镜观察西藏蜂胶对金钗石斛茄病镰刀菌菌丝表面形态的影响,具体如图2所示。对照组的金钗石斛茄病镰刀菌菌丝显示正常形态,生长繁殖茂盛,观察到的数量较多(图2B)。西藏蜂胶处理过的菌体内容物流出,体型皱缩并附在残留的培养物上,观察到的菌体数量较少(图2A)。因此,西藏蜂胶处理对菌丝体细胞结构造成严重破坏。

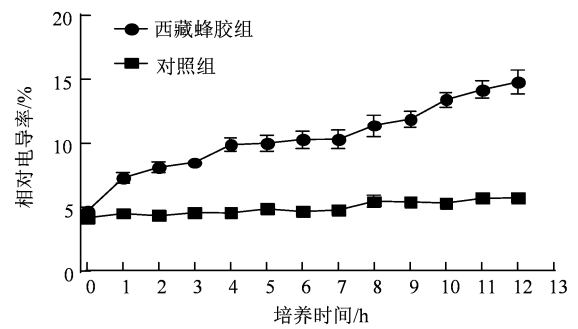


图4 西藏蜂胶提取液处理后菌丝体溶液相对电导率随时间的变化

Figure 4 Effects of Tibetan propolis extracts on the relative conductivity of *H. haematococca*

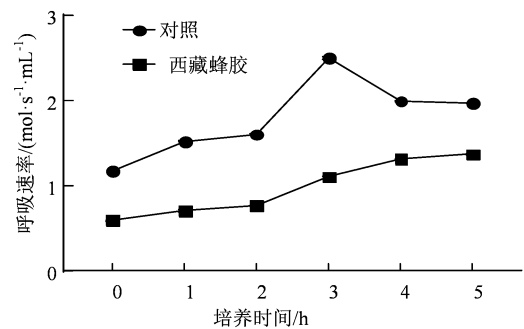


图5 西藏蜂胶提取液对金钗石斛茄病镰刀菌呼吸速率抑制随时间的变化

Figure 5 Effects of Tibetan propolis extracts on the respiration intensity of *H. haematococca*

2.3.2 西藏蜂胶对金钗石斛茄病镰刀菌丝体生长的抑制效果及毒力分析 采用80%乙醇提取剂在 pH 为6的条件下提取的西藏蜂胶对金钗石斛茄病镰刀菌生长进行观察结果(图3)显示,西藏蜂胶对金钗石斛茄病镰刀菌生长有显著抑制作用,除1.25和0.625 mg·mL⁻¹外,其余不同浓度处理组之间差异极显著($P < 0.01$),其抑菌效果随西藏蜂胶浓度升高而显著增强,菌落抑制率逐渐增大,菌落直径逐渐减小。经西藏蜂胶处理后的菌落直径均小于对照组,在样液浓度为10 mg·mL⁻¹时,西藏蜂胶组菌落直径最小,此时抑制率为89%,对菌体破坏最大。

抑菌中浓度(EC₅₀)是指能引起50%最大效应的浓度,是药物安全性指标,表示引起个体中50%有效抑制的浓度,为其拮抗表征^[18]。西藏蜂胶提取液的浓度与其对金钗石斛茄病镰刀菌的抑制率呈明显的线性关系,线性回归方程为: $y = 0.155 \log_2 x + 0.3251$,相关系数为0.9481,达到极显著水平($P < 0.01$)。EC₅₀为2.552 mg·mL⁻¹。

2.3.3 西藏蜂胶对金钗石斛茄病镰刀菌细胞膜通透性的影响 采用外渗电导法测定了金钗石斛茄病镰刀菌菌丝体浸出液相对电导率,测定结果(图4)

显示, 在 12 h 内, 对照组的相对电导率值在整个处理时间内未发生明显变化, 与对照组相比, 处理组的石斛茄病镰刀菌相对电导率随处理时间延长而升高, 表明西藏蜂胶提取液处理后使菌丝体电导率增加, 破坏了金钗石斛茄病镰刀菌菌丝体细胞膜。

2.3.4 西藏蜂胶对金钗石斛茄病镰刀菌呼吸作用的影响 金钗石斛茄病镰刀菌对西藏蜂胶表现出较高的敏感性, 结果见图 5。对照菌丝体的呼吸速率在整个培养过程中呈现先增加后降低趋势, 而经过西藏蜂胶处理的菌丝体整个过程呼吸强度均低于对照, 表明西藏蜂胶抑制了金钗石斛茄病镰刀菌菌丝体的呼吸作用。

3 讨论与结论

西藏蜂胶具有良好的广谱抑菌性。对金黄色葡萄球菌、酿酒酵母和木霉菌的 MIC 为 $0.315 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 对大肠杆菌和茄病镰刀菌的 MIC 为 $0.625 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。研究显示, MIC 在 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 之内属于强抑菌剂, 在 $0.6 \sim 1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内属于中等抑菌剂^[20]。故西藏蜂胶在金黄色葡萄球菌、酿酒酵母和木霉菌抑制方面属于强抑菌剂, 在大肠杆菌和茄病镰刀菌抑制方面属于中等抑菌剂, 较波兰蜂胶^[21]、澳大利亚蜂胶^[22]和巴基斯坦蜂胶油^[23], 抑菌效果显著。

与 Miorin 等^[24]研究结果类似, 西藏蜂胶对革兰氏阴性菌的抗菌活性相对较弱, 即革兰氏阳性菌比革兰氏阴性菌对西藏蜂胶有更高的敏感性, 这种现象可能与菌种细胞壁的结构差异^[25]和蜂胶中活性物质有关。革兰氏阳性菌的细胞壁具有单一的肽聚糖层结构, 能微弱地阻止外来分子的入侵, 但不能阻止多酚进入细胞^[26]。革兰氏阴性菌的细胞壁结构更复杂, 包括外膜、外膜蛋白、肽聚糖和其他成分, 能较好地阻止外来分子的入侵^[27-29]。蜂胶中抑菌成分(多酚、黄酮、酚酸等)之间的协同作用可能与西藏蜂胶较强的抗细菌活性有关。

西藏蜂胶也表现出较好的抗真菌活性, 其抗真菌的巨大潜力与文献报道类似^[23]。研究表明, 蜂胶抗真菌活性可能与不同蜂胶提取物中抗真菌化合物(芳樟醇、丁香酚和其他酚类)的存在有关^[23]。蜂胶抑菌的化学成分取决于气候、地区植被、收获季节及其地理来源^[30]。西藏属于高原高山气候区, 主要植被为高寒植被。地理位置、气候条件和植被的差异可能是西藏蜂胶抑菌性高于市售蜂胶的原因, 良好的地域环境可能赋予了西藏蜂胶丰富的抗真菌化合物, 未来将进一步挖掘和追踪西藏蜂胶的抗真菌成分。此外, 到目前为止, 还没有关于蜂胶对金

钗石斛茄病镰刀菌抗菌活性的报道, 西藏蜂胶可能在未来将成为抑制金钗石斛病原菌生长的良好生物防治样本。

乙醇浓度和 pH 条件显著影响西藏蜂胶抑菌效果。曹红刚^[31]和陈荷凤^[32]等均发现蜂胶乙醇提取物的抑菌作用最好, 主要与蜂胶中黄酮类化合物更易溶于乙醇有关。而乙醇浓度对黄酮类化合物的溶解性影响显著, 当乙醇浓度增大到 80% 以上时, 黄酮类物质不再溶出^[18]。此外, 谢鹏等^[33]研究发现, 有些酚类化合物及其衍生物一般呈弱酸性, 因此可能在碱性环境下提取物中的某些酚类物质受到影响, 从而引起蜂胶抑菌能力的减弱。

西藏蜂胶对金钗石斛茄病镰刀菌细胞结构和生理代谢均有显著影响。西藏蜂胶提取液对金钗石斛茄病镰刀菌菌丝体的微观结构有显著破坏作用, 影响着菌丝体细胞壁的完整性。细胞壁和细胞膜在真菌细胞结构中都起着至关重要的作用。当细胞结构、渗透性或完整性受损时, 小分子和大分子将依次从细胞中泄漏出来^[34], 导致菌丝体死亡。前人的研究如山苍子精油^[19]、香樟精油^[35]、苯乳酸^[36]等对真菌抑制机理研究也发现类似菌体受到迫害后所得症状的表现。细胞膜是一种半透性膜, 选择性控制营养物质的交换及代谢产物的运送^[37], 因此细胞膜的损害标志着真菌细胞的死亡^[38]。经西藏蜂胶处理的金钗石斛茄病镰刀菌菌丝体相对电导率显著增高, 表明菌丝体细胞膜被破坏, 导致内容物溶出, 破坏了菌丝体细胞膜的选择透过性。此外, 大多真菌抑制剂是通过抑制病原真菌的呼吸作用, 阻止菌丝体的呼吸代谢途径, 抑制真菌新陈代谢, 引起菌丝体死亡^[18]。本研究中, 西藏蜂胶处理组的菌丝体呼吸强度较对照组显著降低, 尤其在西藏蜂胶处理之初呼吸作用抑制明显, 使其能量代谢受阻, 从而抑制其菌体生长。然而, 西藏蜂胶与菌丝体细胞膜产生影响的作用方式如何, 通过何种方式抑制菌丝体呼吸作用方式还需进一步的深入研究。

综上所述, 西藏蜂胶具有显著的抗细菌和抗真菌活性, 不同提取剂及浓度和 pH 对西藏蜂胶抑菌性造成影响, 表现为以 80% 乙醇提取剂在 pH 为 6 的条件下提取的西藏蜂胶对 5 种供试菌抑菌效果最佳。西藏蜂胶对金钗石斛茄病镰刀菌有显著的抑制作用, 其抑菌机理一方面是通过破坏菌体细胞壁和细胞膜结构, 使其内容物外流, 另一方面影响菌体细胞的呼吸作用, 使其能量代谢受阻, 从而抑制菌体生长。以上结果表明, 西藏蜂胶可能在未来农业病害防治、食品安全保藏、石斛病虫害等领域中有

望成为强有力的抑菌材料。

参考文献:

- [1] SILVA J C, RODRIGUES S, FEÁS X, et al. Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis[J]. *Food Chem Toxicol*, 2012, 50(5): 1790-1795.
- [2] 罗照明. 中国蜂胶中多酚类化合物的研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2013.
- [3] BURDOCK G A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis)[J]. *Food Chem Toxicol*, 1998, 36(4): 347-363.
- [4] JIANG X S, TIAN J, ZHENG Y F, et al. A new *Propolis* type from Changbai Mountains in north-east China: chemical composition, botanical origin and biological activity[J]. *Molecules*, 2019, 24(7): 1369.
- [5] 任先伟, 魏晓璐, 黄鑫, 等. 核桃青皮提取物抑菌活性及抑菌机理研究[J]. *食品工业科技*, 2015, 36(18): 93-98.
- [6] 扎罗. 西藏蜂业及蜂蜜特异性研究成果[J]. *蜜蜂杂志*, 2017, 37(9): 42-43.
- [7] ZHANG Y B, BUT P P H, WANG Z T, et al. Current approaches for the authentication of medicinal *Dendrobium* species and its products[J]. *Plant Genet Resour*, 2005, 3(2): 144-148.
- [8] 刘迎, 陈青, 梁晓, 等. 海口羊山地区金钗石斛病虫害种类调查与药剂防治[J]. *热带农业科学*, 2021, 41(3): 106-112.
- [9] 何元梅. 赤水金钗石斛种苗繁育病虫害发生情况调查[J]. *农技服务*, 2020, 37(11): 39-40.
- [10] 孔琼, 郑亚美, 杨石有, 等. 铁皮石斛根腐病原尖孢镰刀菌生物学特性及其有效杀菌剂筛选[J]. *东北农业科学*, 2022, 47(3): 108-112.
- [11] 江航, 祁凯, 马立国, 等. 小麦茎基腐病原假禾谷镰刀菌与赤霉病之间的关系[J]. *麦类作物学报*, 2022, 42(11): 1429-1437.
- [12] 张娜娜, 温晓蕾, 李双民, 等. 三种镰刀菌引起的板栗内腐病原菌鉴定[J]. *中国农业科技导报*, 2022, 24(7): 117-122.
- [13] SARSAIYA S, JAIN A, JIA Q, et al. Molecular identification of endophytic fungi and their pathogenicity evaluation against *Dendrobium nobile* and *Dendrobium officinale*[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(1): 316.
- [14] 张燕, 敖日格乐, 王纯洁, 等. nisin 和 EDTA 对牛源致病性大肠杆菌体外抑菌效果的研究[J]. *中国农业大学学报*, 2016, 21(5): 98-103.
- [15] 王洁菲. 花椒疫霉菌 (*Phytophthora* spp.) 鉴定及其拮抗菌筛选[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2014.
- [16] 郑春英, 陆欣媛, 王满玉, 等. 药用植物五味子内生真菌的分离及其抑菌活性研究[J]. *中国药理学杂志*, 2009, 44(9): 661-664.
- [17] 郭俊花, 张增帅, 马欣, 等. 11 种食药同源植物提取物对果蔬常见腐败菌的抑菌活性研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2019, 31(12): 2025-2031.
- [18] 杨书珍. 蜂胶中抗意大利青霉活性成分的追踪及抑菌作用研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2009.
- [19] 孙畅, 李湘, 王银红, 等. 山苍子精油对柑橘意大利青霉的抑菌活性及作用机制[J]. *食品科学*, 2023, 44(11): 17-25.
- [20] ALIGIANNIS N, KALPOUTZAKIS E, MITAKU S, et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species[J]. *J Agric Food Chem*, 2001, 49(9): 4168-4170.
- [21] POBIEGA, KRAŚNIEWSKA, PRZYBYŁ, et al. Growth biocontrol of foodborne pathogens and spoilage microorganisms of food by Polish *Propolis* extracts[J]. *Molecules*, 2019, 24(16): 2965.
- [22] WANG F, LIU H, LI J Y, et al. Australian propolis ethanol extract exerts antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by mechanisms of disrupting cell structure, reversing resistance, and resisting biofilm[J]. *Braz J Microbiol*, 2021, 52(4): 1651-1664.
- [23] AZIZ S, AKBAR A, GUL Z, et al. Functional potential and chemical profile analysis of *Propolis* oil extracted from *Propolis* of balochistan[J]. *J Food Qual*, 2022, 2022: 4782813.
- [24] MIORIN P L, LEVY JUNIOR N C, CUSTODIO A R, et al. Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*[J]. *J Appl Microbiol*, 2003, 95(5): 913-920.
- [25] CAMPOS J F, DOS SANTOS U P, DOS SANTOS DA ROCHA P, et al. Antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, and cytotoxic activities of *Propolis* from the stingless bee *Tetragonisca fiebrigii* (jatai)[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015: 296186.
- [26] HUBER B, EBERL L, FEUCHT W, et al. Influence of polyphenols on bacterial biofilm formation and quorum-sensing[J]. *Z Naturforsch C J Biosci*, 2003, 58(11/12): 879-884.
- [27] SIKKEMA J, DE BONT J A, POOLMAN B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons[J]. *Microbiol Rev*, 1995, 59(2): 201-222.
- [28] SALTON M R. Studies of the bacterial cell wall. IV. The composition of the cell walls of some Gram-positive and Gram-negative bacteria[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1953, 10(4): 512-523.
- [29] ZHANG Y B, LIU X Y, WANG Y F, et al. Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*[J]. *Food Control*, 2016, 59: 282-289.
- [30] POBIEGA K, KRAŚNIEWSKA K, GNIEWOSZ M. Application of propolis in antimicrobial and antioxidative protection of food quality - A review[J]. *Trends Food Sci Technol*, 2019, 83: 53-62.
- [31] 曹红刚, 范家恒, 李亮梅, 等. 蜂胶提取液对草菇及其污染菌抑制作用的研究[J]. *食品工业科技*, 2013, 34(24): 143-146.
- [32] 陈荷凤, 韩文辉, 李兵, 等. 蜂胶各种溶剂提取物的抑菌效果比较[J]. *食品研究与开发*, 2001, 22(S1): 18-19.
- [33] 谢鹏, 张敏红. 黄酮类化合物抑菌作用的研究进展[J]. *中国动物保健*, 2004, 6(12): 35-37.
- [34] CHEN C Z, COOPER S L. Interactions between dendrimer biocides and bacterial membranes[J]. *Biomaterials*, 2002, 23(16): 3359-3368.
- [35] 陈可欣, 骆郑航, 李玲, 等. 香樟精油抑制灰绿曲霉的活性与机理研究[J]. *中国粮油学报*, 2021, 36(3): 71-78.
- [36] 郭宇道, 洪阳, 邓丽莉, 等. 乳酸菌产苯乳酸对指状青霉的抑菌活性及作用机理[J]. *食品科学*, 2022, 43(15): 21-27.
- [37] STRAHL H, ERRINGTON J. Bacterial membranes: structure, domains, and function[J]. *Annu Rev Microbiol*, 2017, 71: 519-538.
- [38] YUAN Z W, OUYANG P, GU K X, et al. The antibacterial mechanism of oridonin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)[J]. *Pharm Biol*, 2019, 57(1): 710-716.