

## 意大利蜜蜂陈年巢脾水提和醇提液抗菌活性的比较

程茂盛<sup>1</sup>, 琚大伟<sup>1</sup>, 殷玲<sup>2</sup>, 吉挺<sup>2</sup>, 余林生<sup>1\*</sup>, 刘在芳<sup>3</sup>, 刘苏燕<sup>3</sup>

(1. 安徽农业大学蜂业研究所, 合肥 230036; 2. 扬州大学动物科学与技术学院, 扬州 225009;

3. 安徽刘氏蜂产品有限公司, 宿松 246433)

**摘要:** 分别采用滤纸扩散法和试管二倍稀释法测定了意大利蜜蜂陈年巢脾(已使用3年)水提液和醇提液对金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、铜绿假单胞菌、乙型溶血性链球菌、肺炎链球菌的抑制作用和抑菌效果。结果表明, 意大利蜜蜂陈年巢脾水提液和醇提液均对试验菌株有良好的抑制效果, 且醇提液抑菌效果优于水提液。

**关键词:** 意大利蜜蜂; 陈年巢脾; 抑菌活性

中图分类号: S896.9

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2011)05-0683-05

### Antibacterial activities of the old *Apis mellifera* honeycomb water and alcohol extracts

CHENG Mao-sheng<sup>1</sup>, JU Da-wei<sup>1</sup>, YIN Ling<sup>2</sup>, JI Ting<sup>2</sup>, YU Lin-sheng<sup>1</sup>, LIU Zai-fang<sup>3</sup>, LIU Su-yan<sup>3</sup>

(1. Apiculture Research Institute, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009;

3. Liu Bee Products Co. LTD., Susong 246433)

**Abstract:** The antibacterial activity of the old *Apis mellifera* honeycomb (been used for 3 years) water extracts and ethanol extracts were to determined by using disk diffusion method and dilution method. The results show that the *Apis mellifera* honeycomb water extracts and the ethanol extracts have antibacterial activities against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus hemolyticus* and *Streptococcus pneumoniae*. The water extracts perform better antibacterial activity than the ethanol extracts.

**Key words:** *Apis mellifera*; old honeycomb; antibacterial activity

蜜蜂巢脾是蜜蜂栖息、繁衍育子、贮存食物的场所, 含有大量的生物活性成分<sup>[1]</sup>。近年来研究蜜蜂巢脾具有治疗鼻炎、乙型肝炎等炎症、抑菌杀菌、促进机体免疫功能等生物学功能和药理学价值<sup>[2-5]</sup>。过敏性鼻炎 (allergic rhinitis) 又称变应性鼻炎, 是鼻腔粘膜的变应性疾病, 并可引起多种并发症。由于机体对某种物质过敏而引起的(吸入灰尘、花粉或感染霉菌), 并伴随过敏性症状, 过敏性鼻炎不易治愈, 目前治疗过敏性鼻炎的药物疗效均不理想。蜂巢作为一种天然产品, 可以有效预防和缓解过敏性鼻炎的症状, 减少发病时间, 其作用是能够改善鼻塞、嗅觉, 减少鼻涕, 缓解头痛、头昏, 以及增强机体抵抗力。在民间, 蜂巢也作为一种偏方, 可用于治疗过敏性鼻炎。巢脾单一作为药物制品、生物

制品、食品等的开发不多。从目前来看, 对巢脾有效成分及其药理的研究还是经验多, 科学验证少, 定性定量研究少, 蜜蜂蜂巢具有治疗鼻炎特别是变应性鼻炎的作用, 然而药效成分和作用机理还不是十分清楚。为此, 作者选取与鼻炎相关菌类做了巢脾提取液的抑菌研究, 为分析蜂巢治疗鼻炎的有效成分, 为巢脾的进一步开发利用提供试验依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料和试剂

陈年意蜂巢脾(已使用3年), 由扬州大学实验蜂场提供, 原产地江苏。金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, 26112株), 铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*, 10211株), 表皮葡萄

收稿日期: 2011-06-14

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金 (CARS-45) 资助。

作者简介: 程茂盛, 男, 硕士研究生。

\* 通讯作者: 余林生, 男, 博士, 教授。E-mail: yulinsheng@yahoo.com.cn

球菌 (*Staphylococcus epidermidis*, 26 069 株), 乙型溶血性链球菌 (*Streptococcus hemolytic-β*, 32 210 株), 肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*, 31 001 株), 以上菌株均购自中国药品生物制品菌检定所; 氯霉素, 无水乙醇。

**1.1.1 试剂配制** 普通肉汤培养基: 牛肉膏 5 g, 蛋白胨 10 g, 氯化钠 5 g, 磷酸氢二钾 1 g, 加蒸馏水 1 000 mL, 调节 pH 至 7.2~7.6, 121°C 高压灭菌 30 min。

血清肉汤培养基: 于肉汤培养基中加入 10% (10:1) 灭菌血清 (羊或兔血清) 即成。

普通琼脂培养基: 在普通肉汤中加入 20 g 琼脂溶化, 过滤, 高压灭菌即可。

**1.1.2 仪器** 粉碎机, 碾钵, 二十目筛, Nanodrop 1000 分光光度计 (NanoDrop Technologies, Inc.), 高压灭菌锅, 超净工作台, 恒温培养箱, 电子分析天平, 752 紫外可见风光光度计 (上海欣茂仪器有限公司), 电热鼓风干燥箱, 可调试移液器, 麦氏比浊管 (每套 6 支), 打孔器, 旋转蒸发仪。

## 1.2 试验方法

**1.2.1 菌悬液的制备** 活化后的菌种分别挑取一环接种至 5 mL 血清肉汤中, 37°C 培养 24 h, 离心 (2 000 r·min<sup>-1</sup>) 10 min, 弃去上清液; 以无菌生理盐水洗涤, 再次离心; 各管沉淀以无菌盐水稀释。采用比浊法使 5 种菌悬液浓度比浊至麦氏五管。

**1.2.2 蜜蜂巢脾提取液的制备** 巢脾→-20°C 冷冻→粉碎→过 20 目筛→水提 60 min (固液比为 1:10 (w:v), 沸水浴), 70% 乙醇提取 24 h (固液比为 1:8 (w:v) →过滤→除蜡→浓缩→0.22 μm 滤膜过滤。

分别称取 100 g 巢脾粉用 10 倍水和 8 倍 70% 乙

醇溶液提取除蜡浓缩至 100 mL, 0.22 μm 滤膜过滤备用。

**1.2.3 抑菌圈试验方法 (琼脂扩散法<sup>[6]</sup>)** 用无菌移液枪吸取 0.1 mL 悬菌液, 加入已倒好培养基的平皿中涂布均匀。高压蒸汽灭菌, 将直径为 6 mm 的无菌滤纸片分别浸入蜜蜂巢脾提取液中, 取出, 晾干。用镊子夹取滤纸片放置于含菌平皿上, 每皿 3 个, 呈正三角形均匀分散放置于平皿中央, 每个菌种做 3 组平行。以无菌蒸馏水和青霉素分别做阴阳性对照。暗室培养 (37°C, 24 h)。测定抑菌圈直径, 取平均值。

**1.2.4 提取液抑菌率试验方法 (二倍稀释法<sup>[7]</sup>)** 取高压灭菌后干燥洁净试管 7 支。除第 1 支试管外, 每支试管内加血清肉汤培养基 1 mL, 在第 1 和第 2 支试管中加入蜜蜂房提取液 1 mL, 第 2 管混匀后吸出 1 mL 加入到第 3 管中, 依次对倍稀释至第 6 管, 第 6 管混匀后均吸出 1 mL 丢弃。蜜蜂巢脾提取液浓度依次为 1、0.5、0.25、0.125、0.0625 和 0.031 25 g·mL<sup>-1</sup>。第 7 管作为血清肉汤对照。每支试管中再加入 1 mL 血清肉汤培养基和 50 μL 菌悬液, 取 100 μL 测 460、560 和 600 nm 处 OD 值。每个样品与每种菌株均设 3 个重复, 暗室培养 (37°C, 24 h) 后测其 460 nm、560 nm、600 nm 处 OD 值, 取其平均值, 按下列公式计算抑菌率。

抑菌率 (%) = [对照管 OD 值 - (样品管 OD 值 - 培养前 OD 值)] / 对照管 OD 值 × 100%

## 2 结果与分析

### 2.1 蜜蜂巢脾提取液抑菌圈试验结果

蜜蜂巢脾提取液的抑菌圈试验结果 (表 1) 表

表 1 蜜蜂巢脾提取液的抑菌圈试验结果  
Table 1 Bacteriostatic circle test result of old *Apis mellifera* honeycomb extracts

菌株 Strain	抑菌效果 Antibacterial activities						氯霉素 Chloramphenicol	ddH <sub>2</sub> O
	水提液 Water extracts			醇提液 Ethanol extracts				
	原液 Stock solution	50%	25%	原液 Stock solution	50%	25%		
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	++	+	-	++	+	-	+++	-
铜绿假单胞菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	-	++	+	-	+++	-
表皮葡萄球菌 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	+	-	++	+	-	+++	-
乙型溶血性链球菌 <i>Streptococcus hemolytic-β</i>	+	+	-	++	+	-	+++	-
肺炎链球菌 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	+	+	-	+	+	-	+++	-

注: 滤纸片抑菌圈实验判定标准: 抑菌圈直径 ≥ 15 mm+++; 10-15 mm++; 7-9 mm+; < 7 mm-。

Note: Judgement standard of filter paper bacteriostatic circle test was defined as follows: +++, antibacterial circle diameter = 15-20 mm; ++, 10-15 mm; +, 7-9 mm; -, < 7 mm.

明, 蜜蜂巢脾提取液对所选几种菌种作用不同, 对细菌都有一定抑制作用, 其中醇提原液对铜绿假单胞菌、表皮葡萄球菌乙型溶血性链球菌强于水提液。在对 5 种菌的空白对照以及灭菌双蒸水对照的平板中, 没有检测到抑菌圈, 氯霉素 ( $3.00 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 对照抑菌圈极明显。

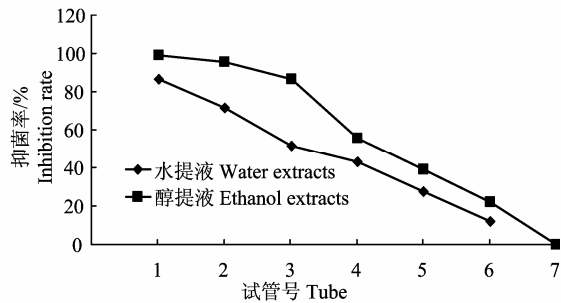


图 1 不同提取液对金黄色葡萄球菌抑菌率

Figure 1 The inhibition rates of *Staphylococcus aureus* by water extracts and ethanol extracts

表 2 金黄色葡萄球菌抑菌率数据  $q$  检验分析

Table 2 Analysis of the inhibition rates of *Staphylococcus aureus* by  $q$  test

不同抑菌液 Extract solution	抑菌率 Inhibition rate	差异显著性 Significant difference	
		0.05	0.01
水提 1 Water extract 1	86.36	a	A
水提 2 Water extract 2	71.74	b	B
水提 3 Water extract 3	51.52	c	C
水提 4 Water extract 4	42.77	d	D
水提 5 Water extract 5	27.75	e	E
水提 6 Water extract 6	12.12	f	F
对照 CK	0	g	G
醇提 1 Ethonal extract 1	98.90	a	A
醇提 2 Ethonal extract 2	95.45	a	A
醇提 3 Ethonal extract 3	86.36	b	B
醇提 4 Ethonal extract 4	55.49	c	C
醇提 5 Ethonal extract 5	39.13	d	D
醇提 6 Ethonal extract 6	21.97	e	E
对照 CK	0	f	F

注: 每组试验平行做 3 次, 取其平均值。下同。

Note: The data are the average values of triplicates. The same below.

## 2.2 蜜蜂巢脾提取液抑菌率测定结果

本试验采用二倍稀释法对水提及醇提 2 种提取方式下的意大利蜜蜂陈年巢脾提取液的抑菌率进行了检测, 检测结果如图 1~图 5 所示。结果显示, 2 种提取液对 5 种细菌均有较强的抑菌作用, 抑菌效

果呈浓度依赖性, 且醇提液抑菌效果优于水提液。

对表 2 的  $q$  检验进行分析可以得出, 在  $\alpha=0.01$  水平下, 不同的水提液对金黄色葡萄球菌抑菌率间的差异都是极显著; 在  $\alpha=0.01$  水平下, 醇提液 1 和醇提液 2 对金黄色葡萄球菌抑菌率的差异不显著, 而其它各组之间的差异都极显著。

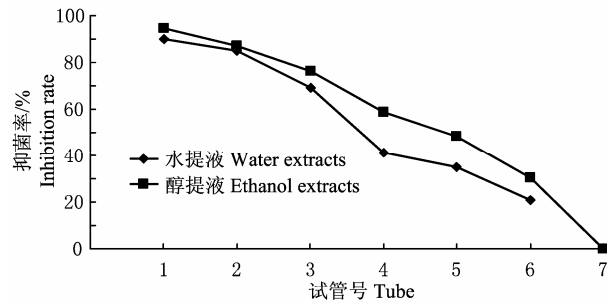


图 3 不同提取液对铜绿假单胞菌抑菌率

Figure 3 The inhibition rate of *Pseudomonas aeruginosa* by water extracts and ethanol extracts

表 3 铜绿假单胞菌抑菌率数据  $q$  检验分析

Table 3 Analysis of the inhibition rates of *Pseudomonas aeruginosa* by  $q$  test

不同抑菌液 Extract solution	抑菌率 Inhibition rate	差异显著性 Significant difference	
		0.05	0.01
水提 1 Water extract 1	89.90	a	A
水提 2 Water extract 2	84.87	b	B
水提 3 Water extract 3	69.32	c	C
水提 4 Water extract 4	41.27	d	D
水提 5 Water extract 5	34.92	e	E
水提 6 Water extract 6	21.00	f	F
对照 CK	0	g	G
醇提 1 Ethonal extract 1	94.40	a	A
醇提 2 Ethonal extract 2	86.97	b	B
醇提 3 Ethonal extract 3	76.19	c	C
醇提 4 Ethonal extract 4	58.82	d	D
醇提 5 Ethonal extract 5	48.32	e	E
醇提 6 Ethonal extract 6	30.50	f	F
对照 CK	0	g	G

对表 4 的  $q$  检验进行分析可以得出, 在  $\alpha=0.01$  水平下, 不同的水提液对表皮葡萄球菌抑菌率间的

差异都是极显著；在  $\alpha=0.01$  水平下，不同醇提液对表皮葡萄球菌抑菌率间的差异也都为极显著。

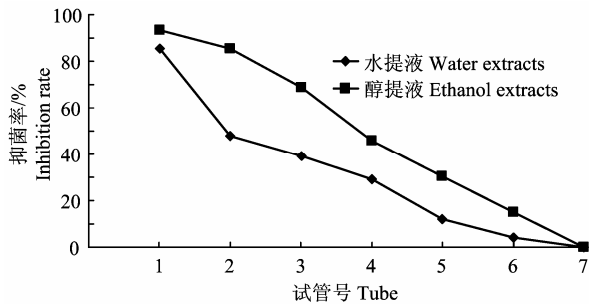


图 3 不同提取液对表皮葡萄球菌抑菌率

Figure 3 The inhibition rates of *Staphylococcus epidermidis* by water extracts and ethonal extracts

表 4 表皮葡萄球菌抑菌率数据  $q$  检验分析

Table 4 Analysis of the inhibition rates of *Staphylococcus epidermidis* by  $q$  test

不同抑菌液 Extract solution	抑菌率 Inhibition rate	差异显著性 Significant difference	
		0.05	0.01
水提 1 Water extract 1	85.35	a	A
水提 2 Water extract 2	47.77	b	B
水提 3 Water extract 3	39.13	c	C
水提 4 Water extract 4	29.30	d	D
水提 5 Water extract 5	12.10	e	E
水提 6 Water extract 6	4.30	f	F
对照 CK	0	g	G
醇提 1 Ethonal extract 1	93.48	a	A
醇提 2 Ethonal extract 2	85.35	b	B
醇提 3 Ethonal extract 3	68.79	c	C
醇提 4 Ethonal extract 4	45.65	d	D
醇提 5 Ethonal extract 5	30.43	e	E
醇提 6 Ethonal extract 6	15.13	f	F
对照 CK	0	g	G

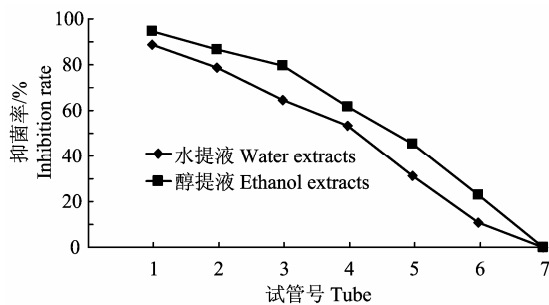


图 4 不同提取液对溶血链球菌抑菌率

Figure 4 The inhibition rates of *Streptococcus hemolytic-beta* by water extracts and ethonal extracts

对表 5 的  $q$  检验进行分析可以得出，在  $\alpha=0.01$  水平下，不同水提液乙型溶血性链球菌抑菌率间的差异都是极显著；在  $\alpha=0.01$  水平下，不同醇提液对乙型溶血性链球菌抑菌率间的差异也都为极显著。

表 5 溶血链球菌抑菌率数据  $q$  检验分析

Table 5 Analysis of the inhibition rates of *Streptococcus hemolytic-beta* by  $q$  test

不同抑菌液 Extract solution	抑菌率 Inhibition rate	差异显著性 Significant difference	
		0.05	0.01
水提 1 Water extract 1	88.75	a	A
水提 2 Water extract 2	78.75	b	B
水提 3 Water extract 3	64.38	c	C
水提 4 Water extract 4	53.33	d	D
水提 5 Water extract 5	31.25	e	E
水提 6 Water extract 6	10.67	f	F
对照 CK	0	g	G
醇提 1 Ethonal extract 1	94.67	a	A
醇提 2 Ethonal extract 2	86.54	b	B
醇提 3 Ethonal extract 3	79.38	c	C
醇提 4 Ethonal extract 4	61.54	d	D
醇提 5 Ethonal extract 5	45.33	e	E
醇提 6 Ethonal extract 6	23.08	f	F
对照 CK	0	g	G

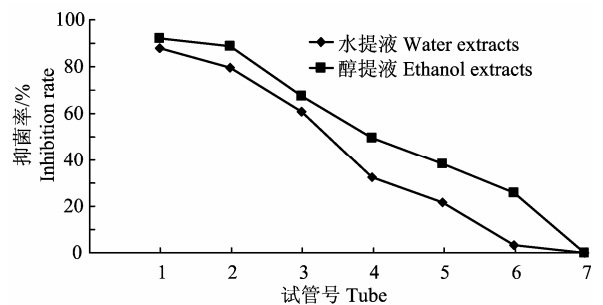


图 5 不同提取液对肺炎链球菌抑菌率

Figure 5 The inhibition rates of *Streptococcus pneumoniae* by water extracts and ethonal extracts

对表 6 的  $q$  检验进行分析可以得出，在  $\alpha=0.01$  水平下，不同的水提液对肺炎链球菌抑菌率间的差异都是极显著；在  $\alpha=0.01$  水平下，醇提液 1 和醇提液 2 对肺炎链球菌抑菌率的差异不显著，而其它各组之间的差异都极显著。

表 6 肺炎链球菌抑菌率数据 q 检验分析  
Table 6 Analysis of the inhibition rates of *Streptococcus pneumoniae* by q test

不同抑菌液 Extract solution	抑菌率 Inhibition rate	差异显著性 Significant difference	
		0.05	0.01
水提 1 Water extract 1	87.89	a	A
水提 2 Water extract 2	79.78	b	B
水提 3 Water extract 3	60.67	c	C
水提 4 Water extract 4	32.34	d	D
水提 5 Water extract 5	21.84	e	E
水提 6 Water extract 6	3.37	f	F
对照 CK	0	g	G
醇提 1 Ethonal extract 1	92.00	a	A
醇提 2 Ethonal extract 2	88.76	a	A
醇提 3 Ethonal extract 3	67.42	b	B
醇提 4 Ethonal extract 4	49.44	c	C
醇提 5 Ethonal extract 5	38.20	d	D
醇提 6 Ethonal extract 6	25.84	e	E
对照 CK	0	f	F

### 3 讨论

本试验选取了与过敏性鼻炎相关菌类做了蜜蜂巢脾提取液的抑菌研究。结果显示, 其不同提取液均对此 5 种菌有抑制效果, 其中水提液和醇提液对金黄葡萄球菌均有较强抑制作用, 对铜绿假单胞菌、表皮葡萄球菌、乙型溶血性链球菌、肺炎链球菌抑制效果相对较弱, 总体来看醇提液抑制效果优于水

提液, 不同浓度提取液的抑菌率差异显著, 抑菌效果呈浓度依赖效应。为蜜蜂巢脾治疗鼻炎提供了理论依据。我国是世界养蜂大国, 也是蜂产品生产大国, 有丰富的蜜蜂巢脾资源。因此, 深入研究蜜蜂巢脾组成成分、将蜜蜂巢脾除蜂蜡以外的有效成分研制开发成成品, 将为其治疗鼻炎药理药效学研究、有效成分明确化奠定基础, 对蜂产品和中药开发具有重要意义。相信蜜蜂巢脾产品的研究开发利用值得期待。

### 参考文献:

- [1] 匡邦郁, 匡海鸥. 蜜蜂生物学[M]. 昆明: 云南科学技术出版社, 2003: 140-141.
- [2] 闫亚美, 吴珍红, 缪晓青. 蜜蜂巢脾及其开发利用[J]. 山东中医杂志, 2006, 25(8): 555-558.
- [3] 刘小敏. 巢脾提取物及其毒性和抑菌试验[J]. 江西医学院学报, 1994, 34(1): 311.
- [4] 刘元帛. 养蜂蜂巢的生药鉴定[J]. 中药材, 1996, 19(2): 76-77.
- [5] Custodio A R, Ferreira M M C, Negri G, et al. Clustering of comb and propolis waxes based on the distribution of aliphatic constituents[J]. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2003, 14(3): 354-357.
- [6] Piddock L J. Techniques used for determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria [J]. Journal of Applied Bacteriology, 1990, 68: 307-318.
- [7] 陈屹, 章银珠, 孙石磊, 等. 槐花精油的化学成分及其抑菌活性的研究[J]. 现代食品科技, 2008, 24(4): 318-321.