

Aktywność przeciwdrobnoustrojowa etanolowego ekstraktu propolisu

Antibacterial activity of ethanol extract of propolis

Robert Dariusz Wojtyczka¹, Robert Kubina², Agata Kabała-Dzik²,
Rafał Jakub Bułdak³

STRESZCZENIE

WSTĘP

Propolis (kit pszczeleli) jest żywicznym produktem zbieranym przez pszczoły (*Apis mellifera carnica*) z rozmaitych roślin i jest używany do zamykania otworów w plastrach, pokrywania wewnętrznych ścian i ochrony wejścia przed intruzami. Propolis wykazuje wiele cech farmaceutycznych, takich jak właściwości przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze, przeciwwirusowe, przeciwzapalne, antyutleniające, hepatoprotekcyjne, immunostymulujące, przeciwnowotworowe oraz cytostatyczne.

MATERIAŁ I METODY

W celu określenia działania przeciwbakteryjnego do badań użyto następujących szczepów: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Staphylococcus aureus* ATCC 29123; *Enterococcus faecalis* ATCC 29212; *Escherichia coli* ATCC 11775; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; *Candida albicans* ATCC 60193. Antybakteryjne działanie etanolowego ekstraktu propolisu oceniono metodą seryjnych rozcieńczeń.

WYNIKI

Uzyskane wyniki antybakteryjnego działania sześciu referencyjnych szczepów pokazują większą wrażliwość bakterii Gram-dodatnich (*Staphylococcus aureus*) na działanie EEP niż bakterie Gram-ujemne (*Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*).

WNIOSKI

1. Etanolowy ekstrakt propolisu wykazuje zróżnicowane właściwości przeciwdrobnoustrojowe w zależności od gatunku badanego szczepu i czasu działania.
2. Etanolowy ekstrakt propolisu wykazuje silne działanie przeciwbakteryjne w stosunku do szczepów ziarniaków Gram-dodatnich z gatunku *Staphylococcus aureus*.

¹Katedra i Zakład Mikrobiologii oraz

²Katedra i Zakład Patologii Wydziału Farmaceutycznego

z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej

³Katedra i Zakład Fizjologii Wydziału

Lekarskiego z Oddziałem Lekarsko-

-Dentystycznym w Zabrze

Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

ADRES

DO KORESPONDENCJI:

Mgr Robert Kubina

Katedra i Zakład Patologii

Wydziału Farmaceutycznego

z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej

Śląskiego Uniwersytetu Medycznego

w Katowicach

ul. Ostrogórska 30

41-200 Sosnowiec

tel. 519 051 544

e-mail: rkubina@sum.edu.pl

Ann. Acad. Med. Siles. 2012, 66, 2, 39–48

Copyright © Śląski Uniwersytet Medyczny

w Katowicach

ISSN 0208-5607

SŁOWA KLUCZOWE

etanolowy ekstrakt propolisu, właściwości przeciwdrobnoustrojowe, metoda seryjnych rozcieńczeń

ABSTRACT

INTRODUCTION

Propolis (bee glue) is a resinous hive product collected by honeybees (*Apis mellifera carnica*) from various plant sources and is used to seal holes in their honeycombs, smooth out the internal walls and protect the entrance against intruders. Many pharmaceutical properties including antibacterial, antifungal, antiviral, antiprotozoan, anti-inflammatory, antioxidant, hepatoprotective, immunostimulating, antitumor, and cytostatic activities have been reported for propolis.

MATERIAL AND METHODS

The following microorganisms were used in this study to test antimicrobial activity of propolis. Six bacteria strains obtained from ATCC *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Staphylococcus aureus* ATCC 29123; *Enterococcus faecalis* ATCC 29212; *Escherichia coli* ATCC 11775; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; *Candida albicans* ATCC 60193 strains were used. Antimicrobial activity of propolis ethanol extract was investigated by the Serial Dilution Method.

RESULTS

The present results allow the conclusion that Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus*) are more susceptible than Gram-negative bacteria (*Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*) to ethanolic extract of propolis.

CONCLUSIONS

1. Ethanol extract of propolis demonstrates diverse antimicrobial properties depending on species of the examined strain and activity time.
2. Ethanol extract of propolis demonstrates strong antimicrobial activities regarding Gram-positive cocci strains belonging to *Staphylococcus aureus* species.

KEY WORDS

ethanolic extract of propolis, antimicrobial activity, Serial Dilution Method

WSTĘP

Etanolowy ekstrakt propolisu (*ethanolic extract of propolis* – EEP) jest jednym z najbogatszych źródeł kwasów fenolowych oraz flawonoidów. Dzięki obecności związków fenolowych EEP wykazuje rozmaite właściwości biologiczne, w tym działanie przeciwdrobnoustrojowe. Uzyskiwany jest na drodze ekstrakcji propolisu, w wyniku czego następuje wyodrębnienie składników fenolowych oraz flawonoidów do ekstrahenta, jakim jest etanol.

Propolis jest żywicowatą, lepłą substancją, produkowaną przez pszczoły, stanowiącą

połączenie woskowej wydzieliny owadów z żywicą zebraną z roślin. Liczne badania naukowe wykazały, że propolis ma wiele cennych leczniczo właściwości: działa przeciwbakteryjnie, przeciwzapalnie, antyutleniająco, ochronnie na mięsz wątroby i przeciwnowotworowo [1].

Skład chemiczny propolisu jest niezwykle złożony. Zawiera około 300 różnych substancji chemicznych, w tym pochodne kwasów cynamonowego i benzoowego oraz flawonoidy. Polski propolis pochodzi przede wszystkim z pączków lisiciowych topoli czarnej (*Populus nigra*).

W licznych badaniach wykazano, że propolis może hamować wzrost bakterii, takich jak: Gram-dodatnie ziarenkowce *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* [2], *Staphylococcus mutans* [3], *Staphylococcus epidermidis* [4], *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus xylosus* [5] *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus warnerii*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus auricularis* [6], *Streptococcus pyogenes* [7], *Streptococcus viridans* [6], *Enterococcus* spp. [8], *Streptococcus pneumoniae* [9], *Streptococcus mutans* [10], *Streptococcus sobrinus*, *Micrococcus luteus* [4], laseczki *Bacillus subtilis* [11], *Bacillus cereus* [5], prątków *Mycobacterium smegmatis* [11], pałeczek *Listeria monocytogenes* [12] oraz Gram-ujemnych pałeczek: *Escherichia coli* [13], *Pseudomonas aeruginosa* [8], *Enterobacter aerogenes* [4], *Pseudomonas mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* [14], *Proteus vulgaris*, *Helicobacter pylori* [15], *Haemophilus influenzae* [7], *Serratia marcescens*, *Providencia stuartii*, *Providencia rettgeri*, *Morganella morgani*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolitica* [5,16], a także dwoinki *Neisseria meningitidis* [9].

Wrażliwość na działanie kitu pszczelego wykazują szczególnie ziarenkowce Gram-dodatnie. Liczne doniesienia sugerują, iż kit pszczeli zawierający małe stężenia np. galanginy wykazuje działanie zarówno przeciwko gronkowcom wrażliwym na penicyliny, jak i w stosunku do szczepów MRSA. Stwierdzono ponadto znacznie słabsze działanie EEP w przypadku szczepów *Staphylococcus aureus* opornych na antybiotyki z grupy chinolonów [8].

Liczne doniesienia literaturowe podają, iż kit pszczeli wykazuje działanie przeciwgrzybiczne. Wśród grzybów wykazujących wrażliwość na EEP należy wymienić: *Candida albicans*, *Candida crusei* [14], *Paracoccidioides brasiliensis*, *Sporothrix schenckii* [9], *Malessezia pachydermatis*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus neoformans* [2].

CEL BADAŃ

Celem naszych badań jest ocena aktywności przeciwdrobnoustrojowej etanolowego ekstraktu propolisu, zależnie od gatunku badanego szczepu, stężenia EEP oraz czasu inkubacji badanych szczepów.

MATERIAŁ I METODY

OTRZYMYWANIE ETANOLOWEGO EKSTRAKTU PROPOLISU ORAZ JEGO ROZTWORÓW W ETANOLU I DIMETYLOSULFOTLENKU

Po mechanicznym rozdrobnieniu propolisu do kolby płaskodennej dodano 10 g kitu pszczelego oraz 100 g 95% etanolu w celu uzyskania ekstraktu etanolowego. Kolbę na 2 tygodnie umieszczono na wytrząsarce w ciemnym pomieszczeniu w temperaturze pokojowej. Następnie ekstrakt schładzano do temperatury 4°C i przechowywano przez 24 godziny w celu wytrącenia nierozpuszczalnych substancji, po czym filtrowano. Uzyskany filtrat odparowano na wyparce próżniowej w temperaturze 40°C. W ten sposób otrzymano ciągliwą brązową substancję, którą na 7 dni umieszczono w cieplarni w temperaturze 37°C na okres 7 dni w celu odparowania pozostałości etanolu. Otrzymaną po tym czasie określoną część suchej masy EEP rozpuszczono w etanolu, otrzymując stężenie 50 mg EEP/ml etanolu. Analogicznie postępowano z dimetylosulfotlenkiem, otrzymując roztwór EEP w DMSO o stężeniu 50 mg/ml.

OZNACZENIE AKTYWNOŚCI PRZECIWDROBNOUSTROJOWEJ ALKOHOLOWEGO EKSTRAKTU PROPOLISU

Do analizy mikrobiologicznej użyto szczepów wzorcowych pochodzących z American Type Culture Collection (ATCC), wybierając: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Staphylococcus aureus* ATCC 29123; *Enterococcus faecalis* ATCC 29212; *Escherichia coli* ATCC 11775; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; *Candida albicans* ATCC 60193.

W pierwszym etapie oceniano czystość szczepów wzorcowych, a następnie sporządzono zawiesiny bakterii w 0,9% roztworze NaCl o gęstości optycznej 0,5 w skali McFarlanda, przy użyciu densytometru (DensiLaMeter Pliwa Lachem, Brno), co odpowiada $1,5 \times 10^8$ CFU/ml. Następnie dokonano rozcieńczenia liczby drobnoustrojów do $1,0 \times 10^6$ CFU/ml 0,9% roztworem NaCl.

W kolejnym etapie przygotowano szereg rozcieńczeń w 2 ml podłoża płynnego Müllera-Hintona (Müller-Hinton Broth), w wyniku czego uzyskano rozcieńczenia propolisu od 0,78 do 50 mg/ml. Do każdej próbki z szeregu rozcieńczeń dodano po 100 µl zawiesiny bakteryjnej i wymieszano. Całość ponownie inkubowano 18 godzin w temperaturze

37°C w atmosferze tlenowej. Po inkubacji z każdej probówki pobrano 100 µl zawiesiny na jałowe szalki Petriego i zalano podłożem agarowym Müllera-Hintona (Müller-Hinton Agar). Całość ponadto inkubowano 18 godzin w temperaturze 37°C w atmosferze tlenowej, a następnie określano liczbę wyrosłych koloni bakterii. Hodowlę kontrolną stanowiło 100 µl zawiesiny bakteryjnej inkubowanej w 2 ml podłoża płynnego Müllera-Hintona bez dodatku propolisu.

OZNACZANIE STOPNIA REDUKCJI LICZBY DROBNOUSTROJÓW W ZALEŻNOŚCI OD CZASU DZIAŁANIA PROPOLISU

W celu oznaczenia stopnia redukcji drobnoustrojów z szeregu rozcieńczeń pobierano po 100 µl zawiesiny na jałowe szalki Petriego w odstępach czasowych: po 1, 4, 8, 12 oraz 24 godzinach inkubacji. Szalki zalewano podłożem Müllera-Hintona (Müller-Hinton Agar). Całość inkubowano 18 godzin w temperaturze 37°C w atmosferze tlenowej, a następnie zliczano wyrosłe kolonie.

ANALIZA STATYSTYCZNA

Analizę statystyczną wyników przeprowadzono za pomocą testu nieparametrycznego Wilcoxon dla par obserwacji, pozwalającego na porównanie danych zebranych przed i po eksperymencie, w celu określenia, czy istnieje istotna statystycznie zmiana badanego parametru. Istotność statystyczną przyjęto na poziomie $p < 0,05$. Do obliczeń statystycznych wzrost zlewny przyjęto jako 1000 kolonii bakterii. W analizie porównywano: kontrolę – rozpuszczalnik DMSO z EEP w roztworze DMSO ($p < 0,05$) dla każdego użytego stężenia i czasu ekspozycji na EEP; kontrolę – etanol z etanolowym roztworem EEP ($p < 0,05$) oraz etanolowy roztwór EEP z dimetylosulfotlenkowym roztworem EEP ($p < 0,05$). Różnice istotne statystycznie uzyskano przy współczynniku zgodności $K \geq 1$

WYNIKI

Otrzymane wyniki badań pozwalają zaobserwować duże zróżnicowanie w działaniu przeciwdrobnoustrojowym badanego EEP w zależności od szczepu i czasu działania.

Największą aktywność EEP (w roztworze DMSO) o stężeniu 760 µg/ml wykazywał w 12 godzinie badania w stosunku do ziarniaków

Gram-dodatnich *Staphylococcus aureus*, powodując całkowite zahamowanie wzrostu obu badanych szczepów. Działanie to zauważalne jest już w 8 godzinie badania dla szczepu ATCC 25923 oraz w 12 godzinie dla drugiego badanego szczepu. Podobną tendencję można zaobserwować przy stężeniach 1,56 oraz 3,12 mg/ml, w których w 8 godzinie inkubacji bakterii z EEP następuje całkowite zahamowanie wzrostu ziarniaków Gram-dodatnich. W stężeniach tych nie zaobserwowano natomiast inhibicji wzrostu dla szczepów *Escherichia coli* ATCC 11775, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 oraz grzybów drożdżoidalnych *Candida albicans*. Wzrost szczepu *Candida albicans* został całkowicie zahamowany w 24 godzinie przy zastosowaniu EEP o stężeniu 6,25 mg/ml, natomiast już w 8 godzinie nastąpiła inhibicja wzrostu badanego szczepu. Podobną tendencję zanotowano dla szczepu *Enterococcus faecalis*, gdzie zaobserwowano jedynie pojedyncze kolonie już w 12 godzinie inkubacji bakterii z EEP.

Analizując działanie EEP (roztwór w DMSO) w stosunku do szczepu wzorcowego *Pseudomonas aeruginosa* obserwowano – już po 1 godzinie badania – zahamowanie wzrostu, jednak dopiero przy użyciu wysokich stężeń EEP (rzędu 12,5 mg/ml), co potwierdza dane literaturowe. Podobną sytuację wykazano w przypadku szczepu *Escherichia coli*, jednak czas działania bakteriobójczego był wydłużony i zahamowanie wzrostu nastąpiło w 8 godzinie badania. Wyniki były istotne statystycznie w porównaniu z kontrolą stanowiącą rozpuszczalnik–dimetylosulfotlenek. Otrzymane wyniki aktywności przeciwdrobnoustrojowej EEP (w roztworze DMSO) zebrano w tabeli II. Kontrolę rozpuszczalnika–dimetylosulfotlenku zaprezentowano w tabeli I.

Analogiczne badania przeprowadzono używając jako rozpuszczalnika etanolu 95%. Dla roztworu etanolowych EEP w stężeniu 760 µl/ml zaobserwowano całkowite zahamowanie wzrostu szczepów *Staphylococcus aureus* w 12 godzinie badania. Wyniki te są więc zbliżone z EEP (roztwór DMSO). W analizie statystycznej wykazano, iż etanolowy roztwór EEP wykazywał silniejsze zahamowanie wzrostu bakterii.

Kontrola rozpuszczalnika (etanolu) wykazała, iż nie można interpretować wyników z użyciem etanolu powyżej stężenia 6,25 % (v/v), gdyż sam alkohol etylowy powoduje zahamowanie wzrostu badanych szczepów bakteryjnych (tab. III).

AKTYWNOŚĆ PRZECIWDROBNOUSTROJOWA EKSTRAKTU PROPOLISU

Tabela I. Ocena aktywności przeciwdrobnoustrojowej różnych stężeń DMSO (kontrola rozpuszczalnika) zależnie od czasu działania
Table I. Evaluation of the antibacterial activity of different concentrations of the dimethylsulfoxide (control of solvent) depending on the action time

Nazwa szczepu drobnoustroju	Stężenie DMSO (% v/v)	Liczba kolonii po:				
		15 min	1 godz.	8 godz.	12 godz.	24 godz.
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	25 %	ZI	ZI	ZI	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29123		ZI	ZI	> 1000	426	25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853		ZI	15	15	0	0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775		ZI	369	0	ZI	0
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212		ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Candida albicans</i> ATCC 60193		ZI	4	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	12,5 %	ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29123		ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853		ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775		ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212		ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Candida albicans</i> ATCC 60193		ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	6,25 %	ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29123		ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853		ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775		ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212		ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Candida albicans</i> ATCC 60193		ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	3,12 %	ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29123		ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853		ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775		ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212		ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Candida albicans</i> ATCC 60193		ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	1,56 %	ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29123		ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853		ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775		ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212		ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Candida albicans</i> ATCC 60193		ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0,76 %	ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29123		ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853		ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775		ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212		ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Candida albicans</i> ATCC 60193		ZI	ZI	ZI	ZI	ZI

ZI – wzrost zlewny

Tabela II. Ocena aktywności przeciwdrobnoustrojowej różnych stężeń EEP (roztwór w dimetylosulfotlenku) zależnie od czasu działania
Table II. Evaluation of the antibacterial activity of different concentrations of EEP (dimethylsulfoxide solution) depending on the action time

Nazwa szczepu drobnoustroju	Stężenie EEP	Liczba kolonii po:				
		15 min	1 godz.	8 godz.	12 godz.	24 godz.
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	25 mg/ml	> 1000	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29123		> 1000	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853		ZI	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775		ZI	0	0	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212		ZI	0	0	0	0
<i>Candida albicans</i> ATCC 60193		0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	12,5 mg/ml	0	1	8	12	24
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29123		ZI	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853		ZI	poj.	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775		ZI	>1000	7	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212		ZI	ZI	500	320	0
<i>Candida albicans</i> ATCC 60193		ZI	ZI	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	6,25 mg/ml	ZI	432	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29123		ZI	> 1000	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853		ZI	ZI	ZI	> 1000	ZI
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775		ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212		ZI	ZI	> 1000	poj.	0
<i>Candida albicans</i> ATCC 60193		ZI	ZI	10	69	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	3,12 mg/ml	ZI	> 1000	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29123		ZI	ZI	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853		ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775		ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212		ZI	ZI	> 1000	> 1000	ZI
<i>Candida albicans</i> ATCC 60193		ZI	ZI	ZI	ZI	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	1,56 mg/ml	ZI	ZI	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29123		ZI	ZI	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853		ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775		ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212		ZI	ZI	> 1000	>1000	ZI
<i>Candida albicans</i> ATCC 60193		ZI	ZI	ZI	ZI	> 1000
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0,76 mg/ml	ZI	ZI	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29123		ZI	ZI	9	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853		ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775		ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212		ZI	ZI	> 1000	>1000	ZI
<i>Candida albicans</i> ATCC 60193		ZI	ZI	ZI	ZI	ZI

ZI – wzrost zlewny

AKTYWNOŚĆ PRZECIWDROBNOUSTROJOWA EKSTRAKTU PROPOLISU

Tabela III. Ocena aktywności przeciwdrobnoustrojowej różnych stężeń etanolu (kontrola rozpuszczalnika) zależnie od czasu działania
Table III. Evaluation of the antibacterial activity of different concentrations of the ethanol (control of solvent) depending on the action time

Nazwa szczepu drobnoustroju	Stężenie Etanolu [% v/v]	Liczba kolonii po:				
		15 min	1 godz.	8 godz.	12 godz.	24 godz.
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	25 %	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29123		0	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853		0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775		0	0	0	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212		0	0	0	0	0
<i>Candida albicans</i> ATCC 60193		0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	12,5 %	> 1000	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29123		> 1000	253	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853		ZI	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775		ZI	0	0	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212		ZI	> 1000	0	0	0
<i>Candida albicans</i> ATCC 60193		ZI	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	6,25 %	ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29123		ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853		ZI	ZI	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775		ZI	ZI	860	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212		ZI	ZI	ZI	ZI	0
<i>Candida albicans</i> ATCC 60193		ZI	ZI	10	69	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	3,12 %	ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29123		ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853		ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775		ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212		ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Candida albicans</i> ATCC 60193		ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	1,56 %	ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29123		ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853		ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775		ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212		ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Candida albicans</i> ATCC 60193		ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0,76 %	ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29123		ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853		ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775		ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212		ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Candida albicans</i> ATCC 60193		ZI	ZI	ZI	ZI	ZI

ZI – wzrost zlewny

Uzyskane przez nas wyniki wskazują, że na aktywność przeciwdrobnoustrojową EEP – oprócz odpowiedniego stężenia – wpływa także czas działania. Można stwierdzić, że preparaty zawierające w składzie odpowiednie stężenia

EEP, przy odpowiednim czasie działania, mogą być alternatywnym sposobem terapii schorzeń powodowanych przez szczepy *Staphylococcus spp.*, a w niektórych przypadkach mogą stanowić uzupełnienie antybiotykoterapii.

Tabela IV. Ocena aktywności przeciwdrobnoustrojowej różnych stężeń EEP (roztwór etanolowy) zależnie od czasu działania
Table IV. Evaluation of the antibacterial activity of different concentrations of EEP (ethanol solution) depending on the action time

Nazwa szczepu drobnoustroju	Stężenie EEP	Liczba kolonii po:				
		15 min	1 godz.	8 godz.	12 godz.	24 godz.
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	25 mg/ml	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29123		0	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853		0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775		0	0	0	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212		0	0	0	0	0
<i>Candida albicans</i> ATCC 60193		0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	12,5 mg/ml	> 1000	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29123		> 1000	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853		712	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775		65	0	0	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212		ZI	0	0	0	0
<i>Candida albicans</i> ATCC 60193		ZI	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	6,25 mg/ml	ZI	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29123		ZI	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853		ZI	ZI	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775		568	> 1000	612	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212		ZI	ZI	0	0	0
<i>Candida albicans</i> ATCC 60193		ZI	260	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	3,12 mg/ml	ZI	> 1000	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29123		ZI	> 1000	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853		ZI	ZI	436	253	0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775		ZI	> 1000	> 1000	367	168
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212		ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Candida albicans</i> ATCC 60193		ZI	ZI	5	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	1,56 mg/ml	ZI	> 1000	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29123		ZI	> 1000	340	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853		ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775		ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212		ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Candida albicans</i> ATCC 60193		ZI	ZI	> 1000	1	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0,76 mg/ml	ZI	ZI	620	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29123		ZI	ZI	ZI	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853		ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775		ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212		ZI	ZI	ZI	ZI	ZI
<i>Candida albicans</i> ATCC 60193		ZI	ZI	ZI	ZI	ZI

ZI – wzrost zlewny

DYSKUSJA

Problemy z nadużywaniem antybiotyków oraz trudności z pozyskiwaniem nowych związków o aktywności przeciwdrobnoustrojowej prowadzą do powrotu wielu stosowanych już metod leczenia. Od dawna wiadomo, iż propolis wykazuje silne właściwości przeciwdrobnoustrojowe, oddziałując wyjątkowo silnie na gronkowce, paciorkowce i maczugowce, słabiej zaś na drobnoustroje z rodzaju *Enterococcus* oraz pałeczki z rodzajów *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus* i *Pseudomonas* [4,6,17].

W naszych badaniach zaobserwowaliśmy duże zróżnicowanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej etanolowego ekstraktu propolisu, stwierdzając że – zgodnie z danymi literaturowymi – działa on silniej w stosunku do ziarniaków Gram-dodatnich niż w stosunku do pałeczek *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa* paciorkowców kałowych *Enterococcus faecalis* oraz grzybów drożdżoidalnych z rodzaju *Candida*.

Szczepy *Staphylococcus spp.* wykazały bardzo wysoką wrażliwość na niskie stężenia propolisu. W 24 godzinie inkubacji, już przy stężeniu 760 µl/ml, EEP powodował całkowite zahamowanie wzrostu obu szczepów *Staphylococcus aureus*. Podobne wyniki zanotowali Scazzocchio i wsp. [6], uzyskując dla 35 szczepów *Staphylococcus aureus* wartość 1,25 mg/ml dla MIC₅₀ i MIC₉₀.

Cardoso i wsp. [2] badając 69 szczepów gronkowców koagulazo-dodatnich wykazali, że minimalne stężenie bakteriobójcze (*minimal bactericidal concentration* – MBC) ekstraktu propolisu dla szczepów *Staphylococcus aureus* wynosi około 13,3 mg/ml, a dla szczepu *Staphylococcus intermedius* 16 mg/ml.

Aktywność propolisu zależy od wielu czynników. Miorin i wsp. [11] potwierdzili działanie przeciwbakteryjne propolisu pochodzącego od pszczoły miodnej *Apis mellifera* oraz *Tetragonisca angustula*, wykazując przy tym, że wiąże się ono z czasem pobierania próbki oraz miejscem pochodzenia. W badaniach wspomnianych autorów wartości MIC w stosunku do szczepu *Staphylococcus aureus* mieściły się w zakresie 0,36–3,65 mg/ml. Nasze badania EEP potwierdziły te wyniki.

Z kolei Silici i wsp. [18] zwrócili uwagę na znaczne różnice w aktywności propolisu

w stosunku do różnych gatunków bakterii. Analizując etanolowe ekstrakty propolisu uzyskane od trzech rodzajów pszczoły miodnej, wykazali ich różną aktywność przeciwdrobnoustrojową. Zanotowane przez nich wartości MIC mieściły się w zakresach: 117–234 µg/ml dla szczepów *Staphylococcus aureus*; 1875–7500 µg/ml dla szczepów *Pseudomonas aeruginosa*; 1875–3750 µg/ml dla szczepów *Escherichia coli* oraz 468–1875 dla grzybów drożdżoidalnych *Candida albicans*.

Niejednorodne działanie propolisu związane jest z różnicą w zawartości występujących w nim substancji aktywnych. Salomao i wsp. [19] potwierdzili największą aktywność próbek propolisu o dużej zawartości galanginy, pinocembryny lub pochodnych kwasu kawowego. Wykazali, iż propolis pochodzący z Bułgarii charakteryzował się silniejszym niż propolis pochodzący z Brazylii działaniem w stosunku do *Candida albicans*, *Sporothrix schenckii* oraz *Paracoccidioides brasiliensis*, a wartości MIC dla szczepu *Neisseria meningitidis* wynosiły 12,8 µg/ml oraz 102,4 µg/ml dla *Staphylococcus aureus*. Najslabiej badane roztwory propolisu działały na szczepy MRSA.

WNIOSKI

1. Etanolowy ekstrakt propolisu wykazuje zróżnicowane właściwości przeciwdrobnoustrojowe, zależnie od gatunku badanego szczepu i czasu działania.
2. Etanolowy ekstrakt propolisu wykazuje silne działanie przeciwbakteryjne w stosunku do szczepów ziarniaków Gram-dodatnich z gatunku *Staphylococcus aureus*.
3. Etanolowy ekstrakt propolisu o stężeniu 0,76 mg/ml powoduje całkowite zahamowanie wzrostu badanych szczepów *Staphylococcus aureus* w 12 godzinie inkubacji.
4. Etanolowy ekstrakt propolisu w wysokich stężeniach (powyżej 6,25 mg/ml) powoduje inhibicję wzrostu szczepów *Candida albicans* i *Enterococcus faecalis* dopiero w 24 godzinie inkubacji.
5. Szczepy *Pseudomonas aeruginosa* oraz *Escherichia coli* wykazują oporność na EEP w analizowanych stężeniach.

PIŚMIENICTWO

1. Nakajima Y., Shimazawa M., Mishima S., Hara H. Water extract of propolis and its main constituents, caffeoylquinic acid derivatives, exert neuroprotective effects via antioxidant actions. *Life Sci.* 2007; 80: 370–377.
2. Cardoso R., Maboni F., Machado G., Alves S., de Vargas A. Antimicrobial activity of propolis extract against *Staphylococcus coagulase positive* and *Malassezia pachydermatis* of canine otitis. *Vet. Microbiol.* 2010; 142: 432–434.
3. Alencar S., Oldoni T., Castro M. i wsp. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. *J. Ethnopharmacol.* 2007; 113: 278–283.
4. Uzel A., Sorkun K., Onçad O., Cogulu D., Gençay O., Salih B. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiol. Res.* 2005; 160: 189–195.
5. Stepanović S., Antić N., Dakić I., Svabić-Vlahović M. In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. *Microbiol. Res.* 2003; 158: 353–357.
6. Scazzocchio F., D'Auria F., Alessandrini D., Pantanella F. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. *Microbiol. Res.* 2006; 161: 327–333.
7. Drago L., De Vecchi E., Nicola L., Gismondo M. In vitro antimicrobial activity of a novel propolis formulation (Actichelated propolis). *J. Appl. Microbiol.* 2007; 103: 1914–1921.
8. Cushnie T., Hamilton V., Chapman D., Taylor P., Lamb A. Aggregation of *Staphylococcus aureus* following treatment with the antibacterial flavonol galangin. *J. Appl. Microbiol.* 2007; 103: 1562–1567.
9. Salomão K., Dantas A., Borba C. i wsp. Chemical composition and microbicidal activity of extracts from Brazilian and Bulgarian propolis. *Lett. Appl. Microbiol.* 2004; 38: 87–92.
10. Castro M., Vilela W., Zauli R. i wsp. Bioassay guided purification of the antimicrobial fraction of a Brazilian propolis from Bahia state. *BMC Complement Altern. Med.* 2009; 9: 25.
11. Miorin P., Levy Junior N., Custodio A., Bretz W., Marcucci M. Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Microbiol.* 2003; 95: 913–920.
12. Velazquez C., Navarro M., Acosta A. i wsp. Antibacterial and free-radical scavenging activities of Sonoran propolis. *J. Appl. Microbiol.* 2007; 103: 1747–1756.
13. Li-Chang L., Yue-Wen C., Cheng-Chun C. Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Food Microbiol.* 2005; 102: 213–220.
14. Orhan D., Özçelik B., Özgen S., Ergun F. Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. *Microbiol. Res.* 2010; 165: 496–504.
15. Oksuz H., Duran N., Tamer C., Cetin M., Silici S. Effect of propolis in the treatment of experimental *Staphylococcus aureus* Keratitis in Rabbits. *Ophth. Res.* 2005; 37: 328–334.
16. Sforzin J., Fernandes A., Lopes C., Bankova V., Funari S. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *J. Ethnopharmacol.* 2000; 73: 243–249.
17. Kędzia B., Kędzia A., Dudko P., Hołderna-Kędzia E. Działanie propolisu krajowego na drobnoustroje chorobotwórcze pochodzące od ludzi i zwierząt. *Post. Fitoter.* 2009; 2: 98–105.
18. Silici S., Kutluca S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *J. Ethnopharmacol.* 2005; 99: 69–73.
19. Salomão K., Pereira P., Campos L. i wsp. Brazilian Propolis: Correlation between chemical composition and antimicrobial activity. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* 2008; 5: 317–324.