

*Elżbieta Hołderna-Kędzia

Działanie przeciwbakteryjne etanolowych ekstraktów z propolisu (EEP)

Antibacterial activity of ethanolic extracts of propolis (EEP)

Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich – Państwowy Instytut Badawczy, Poznań
p.o. Dyrektora Instytutu: dr n. med. inż. biotech. Rafał Spachacz

SUMMARY

Introduction. Strong biological properties, especially antimicrobial characteristics, are the reason for the increased demand for propolis and its extracts in industry. Ethanol propolis extract (EEP), after concentration to approx. 67-70% by weight is a material for producing all propolis preparations available on the market.

Aim. The paper compares the antimicrobial activity of ethanol propolis extract samples tested from 1979-2022.

Material and methods. One hundred forty-five samples of concentrated ethanol extracts from propolis were investigated. The microbiological standardization in force in our country was followed. The determinations were performed using the method of serial dilutions in the liquid medium, determining the lowest concentration of the extract in $\mu\text{g/ml}$ that inhibited the growth of the standard strain of *Staphylococcus aureus* (MIC – minimum inhibitory concentration). Test samples were diluted in a liquid bacteriological medium (Tryptic Soy Broth, Merck) at 300 $\mu\text{g/ml}$ concentration. The obtained stock solutions were used to prepare rows of dilutions ranging from 30 to 300 $\mu\text{g/ml}$, to which a culture of the standard *Staphylococcus aureus* 209P FDA strain with a cell density of 10^4 - 10^5 /ml was added. The lowest concentrations of propolis extracts that inhibit the growth of the reference strain were read after 18 hours. incubation of samples at 37°C.

Results. The results were assessed based on the requirements of the relevant company standards and the Polish Standard (not more than 270 $\mu\text{g/ml}$, not less than 3700 J.A./g). Among 145 tested ethanol extracts from propolis, the most significant number of samples, i.e., 45 (31.47%), showed activity MIC = 120 $\mu\text{g/ml}$; 8.300 IU/g, 35 trials (24.47%) – MIC = 90 $\mu\text{g/ml}$; 11,100 IU/g and 16 samples (6.99%) – MIC = 150 $\mu\text{g/ml}$; 6.670 J.A./g. Among the remaining 47 samples of extracts, there were extract samples with both low (MIC = 400-500 $\mu\text{g/ml}$; 2500-2000 J.A./g) and high antibacterial activity (MIC = 30-100 $\mu\text{g/ml}$; 33,000-10,000 J.A./g).

Conclusions. Most of the concentrated ethanol extracts of propolis (137; 94.41%) were characterized by high and medium microbiological activity and met the normative requirements.

Keywords: ethanolic extracts of propolis (EEP), antibacterial activity, minimum inhibitory concentration, antibiotic units

STRESZCZENIE

Wprowadzenie. Silne właściwości biologiczne, a zwłaszcza przeciwdrobnoustrojowe, są przyczyną wzrostu zapotrzebowania przemysłu na propolis i uzyskane z niego ekstrakty. Otrzymany etanolowy ekstrakt z propolisu (EEP) po zagęszczeniu do ok. 67-70% s.m. stanowi podstawę do wytwarzania wszystkich obecnych na rynku preparatów propolisowych.

Cel pracy. Badania miały na celu ocenę aktywności przeciwbakteryjnej ekstraktów etanolowych z propolisu na przestrzeni lat 1979-2022.

Materiał i metody. W badaniach uwzględniono 145 próbek zagęszczonych ekstraktów etanolowych z propolisu (EEP). Oznaczenia wykonywano metodą seryjnych rozcieńczeń w podłożu płynnym, określając najmniejsze stężenie ekstraktu w $\mu\text{g/ml}$ hamujące wzrost szczepu standardowego gronkowca złocistego – *Staphylococcus aureus* (MIC – minimum inhibitory concentration). Badane próbki rozcieńczano w płynnym podłożu bakteriologicznym (Tryptic Soy Broth, Merck) w stężeniu 300 $\mu\text{g/ml}$. Otrzymane roztwory podstawowe służyły do przygotowania rzędów rozcieńczeń w zakresie od 30 do 300 $\mu\text{g/ml}$, do których dodawano hodowlę szczepu wzorcowego *Staphylococcus aureus* 209P FDA o gęstości komórek 10^4 - 10^5 /ml. Odczyty najmniejszych stężeń ekstraktów propolisowych hamujących wzrost szczepu wzorcowego wykonywano po 18 godz. inkubacji próbek w temperaturze 37°C.

Wyniki. Wyniki oceniano w oparciu o wymagania zawarte w normach zakładowych i Normie Polskiej (nie więcej niż 270 $\mu\text{g/ml}$, nie mniej niż 3700 J. A./g). Wśród 145 przebadanych ekstraktów etanolowych z propolisu najwięcej prób, tj. 45 (31,47%), wykazało aktywność MIC = 120 $\mu\text{g/ml}$; 8.300 J.A./g, 35 prób (24,47%) – MIC = 90 $\mu\text{g/ml}$; 11.100 J.A./g, a 16 próbek (6,99%) – MIC = 150 $\mu\text{g/ml}$;

6.670 J.A./g. Wśród pozostałych 47 próbek ekstraktów znajdowały się próby ekstraktów zarówno o niskiej (MIC = 400-500 µg/ml; 2500-2000 J.A./g), jak i o wysokiej aktywności przeciwbakteryjnej (MIC = 30-100 µg/ml; 33.000-10.000 J.A./g).

Wnioski. Większość przebadanych próbek ekstraktów propolisowych (137; 94,41%) odznaczała się wysoką aktywnością przeciwbakteryjną i odpowiadała wymaganiom normatywnym.

Słowa kluczowe: etanolowe ekstrakty propolisowe (EEP), działanie przeciwbakteryjne, najmniejsze stężenie hamujące, jednostki antybiotyczne

Wprowadzenie

Zainteresowanie propolisem ze względu na jego zróżnicowany skład chemiczny i wszechstronne właściwości biologiczne utrzymuje się niezmiennie od szeregu lat. Składniki biologicznie aktywne zawarte w ekstraktach zapewniają szerokie spektrum aktywności w zakresie działania przeciwdrobnoustrojowego, przeciwzapalnego, ułatwiającego gojenie ran i oparzeń, przeciwbólowego, przeciwutleniającego i wielu innych. Wśród właściwości biologicznych propolisu ważne miejsce zajmuje jego silne działanie przeciwdrobnoustrojowe. Z tego względu stanowi on naturalną alternatywę dla antybiotyków i preparatów przeciwdrobnoustrojowych. Szczególne znaczenie zyskują wówczas ekstrakty i preparaty wytworzone na bazie propolisu. Ważnym powodem skierowania zainteresowań świata medycznego propolisem jest również problem narastania antybiooporności o różnym mechanizmie działania (szczepy MRSA – *methicillin resistant Staphylococcus aureus*, ESBL – *Enterobacteriaceae susceptibility B-lactamase*, MDR – *multidrug resistant bacteria*). Uważa się, że aktywność przeciwbakteryjna propolisu jest wypadkową synergistycznego działania flawonoidów, kwasów aromatycznych i seskwiterpenów. Wśród szczególnie wartościowych właściwości ekstraktów propolisowych wymienić można działanie antybiotyczne (bakterie, grzyby, wirusy chorobotwórcze dla człowieka i zwierząt), odnawiające tkanki, w tym miękką, łączną, chrzęstną i zębową, wzmagające ziarninowanie, gojenie i bliznowacenie ran (1), możliwości wykorzystania propolisu w ochronie zdrowia ludzi i zwierząt (1, 2). W badaniach klinicznych potwierdzono jego wspomagające działanie w leczeniu różnych chorób skóry, w tym: oparzeń i odleżyn, owrzodzeń żyłakowych podudzi i egzemu skórnych (3). Jest ono przyczyną wzrostu zapotrzebowania przemysłu na surowy propolis i uzyskane z niego ekstrakty. Silna aktywność w tym zakresie warunkuje wyjątkową skuteczność preparatów propolisu w leczeniu chorób zewnętrznych o etiologii drobnoustrojowej. Do celów leczniczych szczególnie przydatne są ekstrakty z propolisu odznaczające się wysoką aktywnością biologiczną. Istotne jest użycie do ekstrakcji próbek surowca wysokiej

jakości, tj. o odpowiedniej zawartości substancji biologicznie aktywnych, zapewniających szerokie spektrum działania na drobnoustroje. Warunkiem pozyskania wartościowego, aktywnego antybiotycznie produktu pszczelego jest przede wszystkim zrównoważona gospodarka pasieczna. Dla zachowania równowagi pszczelarz nie powinien pobierać od jednej rodziny pszczelej więcej niż 80 do 100 g surowego propolisu. W przeciwnym razie pozyskany propolis nie gwarantuje wysokiej aktywności otrzymanych ekstraktów.

Skład chemiczny propolisu

Według Wojtackiego (4) w składzie surowego propolisu znajdują się następujące grupy substancji naturalnych: substancje żywiczne (45%), substancje balsamiczne (12%), wosk roślinny (8%), wosk pszczepli (25%) i zanieczyszczenia mechaniczne (10%), co zamieszczono w tabeli 1. Aby wykorzystać propolis do celów praktycznych (profilaktycznych, leczniczych i innych), należy go oczyścić, aby usunąć składniki nierozpuszczalne za pomocą ekstrakcji etanolem 70%. W ten sposób otrzymuje się etanolowy ekstrakt z propolisu (EEP) pozbawiony wosku pszczelego i zanieczyszczeń mechanicznych, który może być wykorzystany do dalszego przerobu technologicznego.

Badania biochemiczne wykazały, że w ekstrakcie z propolisu reprezentowane najliczniej są takie związki, jak: flawonoidy z grup: flawonów, flawonoli, flawanonów i flawanonoli, aglikony: chryzyna, tektochryzyna, pinostrobin, apigenina, chalkon pinostrobinowy, kwasy aromatyczne (kwasy fenolowe: benzoesowy, cynamonowy, kawowy, ferulowy), estry alkoholi i kwasów aromatycznych. Średnia zawartość związków fenolowych wynosi ok. 50%, w tym samych kwasów fenolowych do 22% oraz do kilkunastu

Tab. 1. Skład surowego propolisu (4)

Grupy składników aktywnych	Zawartość (%)
Substancje żywiczne	45
Substancje balsamiczne	12
Wosk roślinny	8
Wosk pszczeli	25
Zanieczyszczenia	10

Tab. 2. Składniki biologicznie aktywne EEP

Składniki	Średnia zawartość (%)
Związki aromatyczne – kwasy aromatyczne – kwasy fenolowe, alkoholofenole, estry i eter aromatyne	77
Flawonoidy (chryzyna, tektochryzyna, akacetyna, galangina, kemferol, kwercetyna, pinostrobin, pinocembryna, pinobanksyna)	8
Terpeny (frakcja lotna: geraniol, nerol, borneol)	1
Substancje lipidowo-woskowe – kwasy tłuszczowe nienasycone – estry metylowe i etylowe kwasu kawowego, cynamonowego	10
Biopierwiastki (mangan, cynk, miedź, żelazo, krzem, glin)	1
Inne substancje (witaminy z gr. B, białka i enzymy, wolne aminokwasy, cukry)	3

procent pochodnych tych związków (m.in. ester fenylloetylowy kwasu kawowego – CAPE). W mniejszych ilościach znajdują się: kwasy tłuszczowe, terpeny, węglowodory, aminokwasy, enzymy i biopierwiastki (5-8). Skład chemiczny etanolowego ekstraktu z propolisu przedstawiono w tabeli 2.

Działanie przeciwdrobnoustrojowe propolisu

Według obszernych danych literaturowych, ekstrakty z propolisu hamują rozwój takich grup drobnoustrojów, jak: bakterie Gram-dodatnie (*Staphylococcus aureus*, *Diplococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecium*, *Bacillus cereus*), bakterie Gram-ujemne (*Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*), grzyby drożdżoidalne (*Candida albicans*), grzyby pleśniowe (*Aspergillus flavus*, *Penicillium italicum*) (5, 9-11). Piśmiennictwo zawiera również informacje dotyczące podwyższenia aktywności antybiotycznej antybiotyków i chemioterapeutyków w wyniku stosowania ich łącznie z propolisem (12).

Przygotowywanie ekstraktów

Na przestrzeni wielu lat, począwszy od lat 70. XX wieku, przygotowywano i analizowano pod względem składu chemicznego i aktywności przeciwdrobnoustrojowej ekstrakty z propolisu sporządzone przy użyciu różnych rozpuszczalników. Do tego celu najczęściej stosowano: roztwory etanolu w wodzie (7,5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 40%, 60%, 70%, 80%, 95%, 96%), metanol, chlorek metylenu (7,5%), eter, wodę i olej. Badania te wykonywano m.in. w Zakładzie Farmakognozji AM w Poznaniu, gdzie propolis był także tematem prac magisterskich (13, 14). Prowadzono m.in. badania ekstrakcyjne zmierzające do otrzymania biologicznie aktywnych frakcji z propolisu. W Pracowni Mikrobiologicznej ówczesnego Instytutu Roślin i Przetworów Zielarskich wykonywano natomiast oznaczenia aktywności przeciwbakteryjnej

wspomnianych frakcji. Uzyskane wyniki prezentowano następnie podczas obrad V Międzynarodowego Sympozjum Apiterapii w Krakowie (15, 16).

Doświadczalnie wykazano, że najlepszym rozpuszczalnikiem do ekstrakcji surowego propolisu jest 70% alkohol etylowy, który daje znacznie lepsze efekty ekstrakcyjne w porównaniu z 96% etanolem (17-19).

Otrzymany etanolowy ekstrakt z propolisu (EEP) po zagęszczeniu do ok. 67-70% suchej masy tego surowca (przeciętnie 65% s.m.) jest produktem wyjściowym do wytwarzania wszystkich obecnych na rynku preparatów propolisowych. Sposób ten umożliwia dogodną standaryzację preparatu, która polega na oznaczaniu aktywności mikrobiologicznej ekstraktu. W celu przygotowania handlowych postaci płynnych, zagęszczony ekstrakt etanolowy rozcieńcza się w 70% alkoholu etylowym do uzyskania roztworu o odpowiednim stężeniu (20).

Przeprowadzone w ostatnim czasie badania własne wskazują ponadto na skuteczne działanie na drobnoustroje poszukiwanych na rynku preparatów bezalkoholowych z propolisu. Do tego celu wykorzystuje się ekstrakty otrzymane przy pomocy takich rozpuszczalników, jak: glikol propylenowy, glicerol lub inny nośnik. Zgodnie z danymi piśmiennictwa w pierwszym etapie przygotowuje się ekstrakt etanolowy z propolisu, a następnie po zagęszczeniu w warunkach próżniowych rozpuszcza się pozostałość w odpowiednim rozpuszczalniku w proporcji 1:10 i uzyskuje tzw. 10% kompleks bezalkoholowy. Taki proces zapewnia wysoką aktywność biologiczną uzyskanych preparatów, porównywalną z aktywnością ekstraktów etanolowych. Przyjmuje się je w dawkach podobnych jak w przypadku etanolowych kropli z tego produktu (21). Natomiast w celu otrzymania ekstraktów wodnych z propolisu surowiec ekstrahuje się przy użyciu wody destylowanej w określonej temperaturze 25-121°C, w czasie trwania ekstrakcji (10 min-96 godz.) oraz przy odpowiednim stosunku surowca do wody (1:1 – 1:37,5), z zastosowaniem dodatkowych procesów wspomagających ekstrakcję (mieszanie, ultradźwięki, solubilizacja) (22-25). Ze względu na niską zawartość związków flawonoidowych w ekstraktach wodnych, podaje się je w wyższych dawkach w porównaniu z ekstraktami etanolowymi (25). Do celów kosmetycznych wykorzystuje się często ekstrakty wodne, glikolowe i olejowe.

Metody standaryzacji propolisu

Do standaryzacji preparatów propolisowych stosuje się obecnie metody: chemiczną lub mikrobiologiczną. Najczęściej wykorzystuje się metodę mikrobiologiczną, która opiera się na ocenie aktywności przeciwbakteryjnej. Nieco rzadziej używa się metody chemicznej polegającej na oznaczaniu ilościowym zawartości

związków flawonoidowych w przeliczeniu na kwercetynę lub chryzynę (26). W Rumuni za odpowiednie do wytwarzania preparatów propolisowych uważa się ekstrakty o zawartości flawonoidów w zakresie 5-10% w przeliczeniu na chryzynę. Natomiast zgodnie z wymaganiami obowiązującymi we Włoszech zagęszczone ekstrakty z propolisu powinny zawierać nie mniej niż 14-15% tych związków, przy czym minimum 2,17% galanginy w puli flawonoidowej. Istnieją ponadto inne metody standaryzacji propolisu: farmakologiczne, biochemiczne oraz oparte na oznaczeniach innych grup chemicznych niż flawonoidy. Badania porównawcze nad wykorzystaniem powyższych metod nie wykazały wzajemnych korelacji. Żadna z podanych metod nie jest zadowalająca, gdyż nie odzwierciedla aktywności terapeutycznej ekstraktów niezależnie od drogi ich podania. Wysoką ocenę przydatności standaryzacyjnej otrzymały metody: farmakologiczna (oznaczanie aktywności przeciwwzapalnej) i biochemiczna (oznaczanie aktywności przeciwutleniającej). Metoda farmakologiczna mogłaby okazać się szczególnie korzystna przy standaryzacji preparatów do użytku wewnętrznego. Jak dotychczas w kraju podstawę standaryzacji ekstraktów i preparatów z propolisu stanowią oznaczenia mikrobiologiczne, co podyktowane jest szerokim wykorzystaniem propolisu do celów zewnętrznych i dostępnością w handlu szerokiej gamy preparatów do użytku zewnętrznego (27). Mikrobiologiczna metoda standaryzacji stosowana w kraju polega na określeniu najmniejszego stężenia ekstraktu (ang. *minimum inhibitory concentration* – MIC), które hamuje rozwój szczepu standardowego gronkowca złocistego *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P (28). W innych krajach w charakterze szczepu wzorcowego używane są przetrwalniki tlenowe *Bacillus cereus* 8035 (Rosja), *Bacillus subtilis* IP-5832 (Chorwacja) i *Bacillus subtilis* ATCC 663 B (Instytut Pszczelnictwa w Puławach) (18, 29, 30).

Cel pracy

Celem pracy było zestawienie i porównanie oznaczeń aktywności przeciwbakteryjnej ekstraktów etanolowych z propolisu prowadzonych na przestrzeni lat 1979-2022, wyrażonych w postaci MIC ($\mu\text{g/ml}$) i w przeliczeniu na jednostki antybiotyczne (J.A./g).

Materiał i metody

Szczepy użyte w badaniach

W latach 1979-2006 oznaczenia aktywności przeciwbakteryjnej wykonywano wobec szczepu standardowego *Staphylococcus aureus* 209P FDA, a w okresie 2007-2022 z wykorzystaniem szczepu *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P.

Badane ekstrakty

W pracy porównano aktywność przeciwbakteryjną próbek etanolowych ekstraktów z propolisu różnego pochodzenia na przestrzeni ponad 40 lat (1979-2022). Badaniem objęto 145 próbek zagęszczonych ekstraktów etanolowych z propolisu. Postępowano zgodnie z obowiązującą w naszym kraju standaryzacją mikrobiologiczną. Pierwsze analizy miały na celu wstępne rozpoznanie aktywności pozyskiwanych ekstraktów i wypracowanie zasad standaryzacji tego produktu. Badania wykonywano metodą seryjnych rozcieńczeń w podłożu płynnym, określając najmniejsze stężenie ekstraktu w $\mu\text{g/ml}$ hamujące wzrost szczepu standardowego gronkowca złocistego – *Staphylococcus aureus* (MIC).

Badane próbki rozcieńczano w płynnym podłożu bakteriologicznym (Tryptic Soy Broth, Merck) w stężeniu 300 $\mu\text{g/ml}$. Otrzymane roztwory podstawowe służyły do przygotowania rzędów rozcieńczeń w zakresie MIC od 30 do 300 $\mu\text{g/ml}$, do których dodawano hodowlę gronkowca złocistego o gęstości komórek 10^4 - 10^5 /ml. Badania prowadzono wobec szczepu *Staphylococcus aureus* 209P FDA (1979-2006) oraz *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P (2007-2022). Wyniki oznaczeń najmniejszych stężeń propolisu hamujących wzrost komórek gronkowca złocistego odczytywano po 18 godz. inkubacji próbek w temperaturze 37°C (nie więcej niż 270 $\mu\text{g/ml}$, nie mniej niż 3700 J.A./g).

Ocena aktywności antybiotycznej ekstraktów

Aktywność antybiotyczną badanych zagęszczonych ekstraktów etanolowych z propolisu oceniano w oparciu o wymagania zawarte w Normach Zakładowych i Normie Polskiej PN-A-77627 (31-33). Zgodnie z wymaganiami za próbki aktywne mikrobiologicznie przyjmuje się takie, dla których uzyskane wartości najmniejszego stężenia hamującego MIC wynoszą nie więcej niż 270 $\mu\text{g/ml}$, co w przeliczeniu na jednostki antybiotyczne odpowiada wartościom nie mniejszym niż 3700 J.A./g (MIC \leq 270 $\mu\text{g/ml}$; \geq 3.700 J.A./g). Przy ocenie aktywności badanych ekstraktów zastosowano następujące przedziały aktywności, które zilustrowano w tabeli 3. Zgodnie z przyjętym kryterium oceny, wysokiej aktywności antybiotycznej badanych ekstraktów odpowiadały próbki o wartościach

Tab. 3. Kryteria aktywności antybiotycznej zagęszczonych etanolowych ekstraktów z propolisu

Aktywność antybiotyczna	MIC ($\mu\text{g/ml}$)
Wysoka	30-100
Średnia	120-180
Niska	> 210
Łącznie	30-> 210

MIC = 30-100 µg/ml; średniej – 120-180 µg/ml i niskiej – MIC > 210 µg/ml.

Wyniki i wnioski

Aktywność przeciwbakteryjna 72 ekstraktów etanolowych z propolisu przebadanych w latach 1979-2006 mieściła się w zakresie MIC = 30-500 µg/ml, co odpowiada 33.300-2.000 J.A./g (tab. 4). Zgodność z normami wykazało aż 69 (95,8%) próbek.

Tab. 4. Aktywność etanolowych ekstraktów z propolisu wobec *Staphylococcus aureus** w latach 1979-2006

MIC (µg/ml)	J.A./g	Liczba ekstraktów	Procent
500,0	2.000	2	2,78
400,0	2.500	1	1,39
240,0	4.170	1	1,39
210,0	4.760	2	2,78
180,0	5.560	3	4,17
150,0	6.670	7	9,72
120,0	8.300	22	30,56
100,0	10.000	4	5,56
90,0	11.100	19	26,39
75,0	13.300	5	6,94
60,0	16.700	5	6,94
30,0	33.300	1	1,39
30,0-500,0	2.000-33.300	łącznie 72	1,39-30,56

**Staphylococcus aureus* 209P FDA

Ekstrakty z propolisu oznaczane w późniejszym okresie (2007-2022) w liczbie 73 próbek były także zróżnicowane pod względem uzyskanych wartości MIC w granicach 50-500 µg/ml (20.000-2.000 J.A./g), co zilustrowano w tabeli 5. W grupie tej wymaganiom normatywnym odpowiadało 66 oznaczanych ekstraktów (93,06%).

Podsumowując uzyskane wartości aktywności przeciwbakteryjnej wszystkich 145 ekstraktów badanych na przestrzeni lat 1979-2022, można stwierdzić, że były one zróżnicowane i mieściły się w zakresie MIC od 30 do 500 µg/ml (33.300-2.000 J.A./g). Zgodnie z przyjętym kryterium oceny aktywności 58 (40%) próbek mieściło się w granicach wysokiej aktywności antybiotycznej (MIC = 30-100 µg/ml), 70 (48,3%) próbek – średniej aktywności (MIC = 120-180 µg/ml) i 17 (11,7%) próbek odpowiadało niskiej aktywności antybiotycznej (MIC > 210 µg/ml), co zawarto w tabeli 6.

Wśród 145 przebadanych ekstraktów etanolowych z propolisu najwięcej próbek, tj. 45 (31,47%), wykazało aktywność MIC = 120 µg/ml; 8.300 J.A./g, 35 próbek (24,47%) – MIC = 90 µg/ml; 11.100 J.A./g, a 16 próbek (6,99%) – MIC = 150 µg/ml; 6.670 J.A./g.

Tab. 5. Aktywność etanolowych ekstraktów z propolisu wobec *Staphylococcus aureus** w latach 2007-2022

MIC (µg/ml)	J.A./g	Liczba ekstraktów	Procent
500,0	2.000	3	4,11
400,0	2.500	2	2,75
240,0	4.170	3	4,11
210,0	4.760	3	4,11
180,0	5.460	4	5,48
150,0	6.670	11	15,06
120,0	8.300	23	31,51
100,0	10.000	1	1,37
90,0	11.100	16	21,92
60,0	16.700	6	8,22
50,0	20.000	1	1,37
50,0-500,0	2.000-20.000	łącznie 73	1,37-31,51

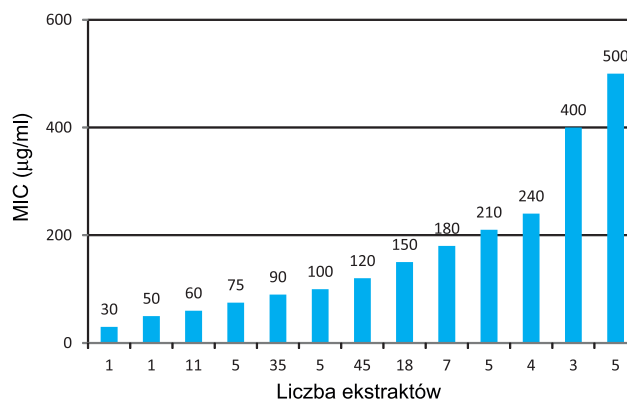
**Staphylococcus aureus* ATCC 6538P

Tab. 6. Aktywność antybiotyczna zagęszczonych etanolowych ekstraktów z propolisu według przyjętych kryteriów

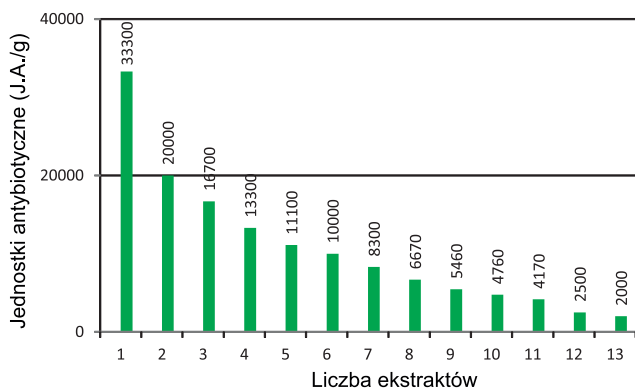
Kryterium oceny aktywności	MIC (µg/ml)	Liczba prób	Procent
Wysoka	30-100	58	40,0
Średnia	120-180	70	48,3
Niska	> 210	10	11,7
Łącznie	30 -> 210	145	100,0

Wśród pozostałych 47 próbek ekstraktów znajdowały się takie zarówno o niskiej (MIC = 400-500 µg/ml; 2.500-2.000 J.A./g), jak i o wysokiej aktywności przeciwbakteryjnej (MIC = 30-100 µg/ml; 33.000-10.000 J.A./g). Zbiorcze zestawienie aktywności przeciwbakteryjnej zagęszczonych ekstraktów etanolowych z propolisu w ujęciu graficznym przedstawiono na rycinach 1 i 2.

Przeprowadzone badania wskazują, że większość przebadanych w latach 1979-2022 etanolowych ekstraktów z propolisu (EEP) odznaczało się średnią



Ryc. 1. Aktywność przeciwbakteryjna etanolowych ekstraktów z propolisu na przestrzeni lat 1979-2022 wyrażona w postaci MIC (µg/ml)



Ryc. 2. Aktywność przeciwbakteryjna etanolowych ekstraktów z propolisu na przestrzeni lat 1979-2022 wyrażona w postaci J.A./g

i wysoką aktywnością przeciwbakteryjną i spełniało wymagania obowiązujących norm. Na łączną liczbę 145 ekstraktów z propolisu, 137 (94,41%) prób odpowiadało wymaganiom normatywnym. Jedynie 8 prób propolisu nie spełniało powyższych kryteriów.

Wyniki badań innych autorów wskazują również na znaczne zróżnicowanie aktywności przeciwbakteryjnej zagęszczonych ekstraktów etanolowych z propolisu. W grupie 475 przebadanych prób ekstraktów, 77% prób oznaczało się wysoką aktywnością przeciwbakteryjną (MIC = 60-220 µg/ml), 15% prób – średnią aktywnością (MIC = 230-300 µg/ml) i 8% prób – niską aktywnością przeciwbakteryjną (MIC = 310-430 µg/ml) (34). Ze względu na niedogodność związaną z określaniem aktywności za pomocą wartości MIC, Instytut Leków zaproponował do powyższej oceny używanie jednostek antybiotycznych/g (J.A./g). Wówczas wyższej liczbie jednostek odpowiada wyższa aktywność antybiotyczna (28). Wcześniejsze nieopublikowane badania własne prowadzone w latach 1981-2010 (Kędzia B., Hołderna-Kędzia E.) z użyciem 102 prób ekstraktów pochodzących z obrotu handlowego również wskazują na dużą rozpiętość w uzyskanych wartościach MIC (MIC = 30-1500 µg/ml). Najwięcej prób (83; 81,3%) znajdowało się w zakresie wartości MIC od 60 do 150 µg/ml, zdecydowanie mniej w zakresie MIC = 160-1500 µg/ml (17 prób; 16,7%), najwyższą aktywność – 30 µg/ml – uzyskano tylko dla jednej próbki ekstraktu (0,98%). Oznaczenia aktywności przeciwbakteryjnej prowadzone w poszczególnych okresach badań wskazują na duży odsetek prób odpowiadających wymaganiom normatywnym (tab. 7). W latach 1981-2010 na 102 ekstrakty wymagania normy spełniało 98 prób (96,1%), w okresie 1979-2006 na 72 ekstrakty – 69 prób (95,8%), a w latach 2007-2022 w grupie 73 ekstraktów – 68 (93,2%) prób odpowiadało wymaganiom normatywnym.

Tab. 7. Zestawienie badanych ekstraktów z propolisu w poszczególnych okresach i ich zgodność z Polską Normą (badania własne)

Autorzy publikacji	Liczba prób	Liczba prób zgodnych z PN	Procent
Kędzia B., Hołderna-Kędzia E. (1981-2010; dane nieopublikowane)	102	98	96,1
Kędzia B., Hołderna-Kędzia E. (1979-2006)	72	69	95,8
Kędzia B., Hołderna-Kędzia E. (2007-2022)	73	68	93,2
Łącznie (1979-2022)	145	137	94,5

Podsumowanie

Przeprowadzone badania wskazują na wysoką aktywność przeciwbakteryjną oznaczanych na przestrzeni ponad 40 lat ekstraktów propolisowych. Ze względu na niesłabnące zapotrzebowanie przemysłu na etanolowe ekstrakty z propolisu, istnieje pilna potrzeba prowadzenia ich standaryzacji. Szczególnie poszukiwane są próby surowego propolisu wysokiej jakości, zwłaszcza o wysokiej aktywności przeciwbakteryjnej. Potencjał i możliwości wykorzystania wytworzonych w oparciu o ekstrakty propolisowe preparatów leczniczych i suplementów diety są znaczące w wielu dziedzinach. Propolis nadal cieszy się ugruntowaną pozycją naturalnego produktu prozdrowotnego i zainteresowaniem badaczy ze względu na silne właściwości biologiczne ukierunkowane na różne narządy i układy organizmu, w tym: działanie antybiotyczne, przeciwzapalne, przeciwutleniające, przyspieszające odnowę tkanek, immunostymulujące.

Badania własne prowadzone w ostatnim okresie wskazują ponadto na właściwości przeciwdrobnoustrojowe (działanie na bakterie, grzyby drożdżoidalne i dermatofity) ekstraktów z propolisu uzyskanych przy pomocy innych rozpuszczalników w celu otrzymania pożądanego na rynku ekstraktów bezalkoholowych (glikol propylenowy, glicerol) lub wodnych. Jak wynika z przedstawionego przeglądu, mimo zainteresowania wodnymi i innymi bezalkoholowymi preparatami z propolisu, ekstrakty etanolowe nadal cieszą się dużą popularnością i zastosowaniem w różnych dziedzinach przemysłu. Analiza działania przeciwbakteryjnego zagęszczonych ekstraktów etanolowych z propolisu badanych na przestrzeni ponad 40 lat wskazuje w większości przypadków na średnią, niekiedy wysoką aktywność przeciwdrobnoustrojową, odpowiadającą obowiązującym w kraju wymaganiom mikrobiologicznym zawartym w odpowiednich dokumentach normatywnych.

Piśmiennictwo

- Kędzia B. Pozyskiwanie i zagospodarowanie kitu pszczelego (propolisu). Możliwości wykorzystania propolisu w ochronie ludzi i zwierząt. *Mat Konf VI Kraj Nauk-Techn Konf Pszczel, Częstochowa* 06.12.2000; 24-29.
- Kędzia B, Hołderna-Kędzia E. Wpływ propolisu na odnowę tkanki skórnej, kostnej, chrzęstnej i zębowej. *Post Fitoter* 2018; (2):203-11.
- Dzierżewicz Z, Stojko A, Stojko J, Stojko R. Techniki biologii molekularnej, hodowle komórkowe i organotypowe w ocenie właściwości farmakologicznych standaryzowanych frakcji produktów pszczelich. *XLI Nauk Konf Pszczel, Puławy* 2004:130-2.
- Wojtacki M. Produkty pszczele i przetwory miodowe. PWRiL, Warszawa 1988.
- Kędzia B, Hołderna-Kędzia E. Biologiczne właściwości propolisu. I. Działanie wyciągów z propolisu na drobnoustroje. *Herba Polon* 1985; (3-4):219-32.
- Kędzia B, Hołderna-Kędzia E. Skład chemiczny propolisu w świetle dotychczasowych badań. *Herba Polon* 1991; (2):95-110.
- Kędzia B, Hołderna-Kędzia E. Sposoby standaryzacji preparatów propolisowych. *Herba Polon* 1993; (4):227-32.
- Kędzia B. Skład chemiczny i aktywność biologiczna propolisu pochodzącego z różnych rejonów świata. *Post Fitoter* 2006; (1):23-34.
- Kędzia B. Przeciwdrobnoustrojowe działanie etanolowego ekstraktu z propolisu (EEP). Dokumentacja tematu Nr 3-73. *Inst Rośl Przetw Ziel, Poznań* 1974.
- Starzyk J, Doleżał M. Badania nad działaniem propolisu na drobnoustroje bakteryjne odporne na antybiotyki. *V Międzynar Symp Apiter, Kraków* 1985. *Zagadn Wybr Wyd Pol Zw Pszczel, Kamianna* 1986:116-9.
- Kędzia B, Kędzia A, Dutko P i wsp. Działanie propolisu krajowego na drobnoustroje chorobotwórcze pochodzące od ludzi i zwierząt. *Post Fitoter* 2009; (2):98-105.
- Ratajczak M, Kamińska D, Matuszewska E i wsp. Promising antimicrobial properties of bioactive compounds from different honeybee products. *Molecules* 2021; 26 (13):4007.
- Pniewska DE. Poszukiwanie składników propolisu o działaniu biologicznym. Praca magisterska. AM w Poznaniu 1979.
- Toboła E. Związki flawonoidowe propolisu. Praca magisterska. AM w Poznaniu 1979.
- Kędzia B, Ellnain-Wojtaszek M, Bylka W i wsp. Aktywność mikrobiologiczna różnych frakcji propolisu. *V Międzynar Symp Apiter Mat Konf Kraków* 1985:18.
- Żelińska R. Chemiczna analiza frakcji propolisu. Praca magisterska. AM w Poznaniu 1984.
- Lutomski J, Speichert H, Kędzia B i wsp. Ustalenie aktywnych biologicznie komponentów spożywczych i składu chemicznego propolisu w aspekcie preparatów spożywczych, ewentualnie parafarmaceutycznych. Dokumentacja tematu Nr 4/78. *Inst Rośl Przetw Ziel, Poznań* 1978.
- Rybak-Chmielewska H, Szczęśna T. Wpływ różnych rozpuszczalników na aktywność biologiczną propolisu. *Pszczel Zesz Nauk* 1991; 35:55-62.
- Tichonow AI, Jarnych TG, Czernych WP i wsp. Teoria i praktyka wytwarzania leczniczych preparatów propolisowych. *Wyd Apipol-Farma, Myślenice* 2006.
- Kędzia B. Możliwości wykorzystania propolisu w ochronie zdrowia ludzi i zwierząt. *VI Krajowa Nauk-Techn Konf Pszczel, Częstochowa* 2000:24-9.
- Czarnecki R. Propolis w apiterapii. *Kraków* 2015:38-40.
- Scheller S, Rogala D, Stasiak E i wsp. Antibacterial properties of propolis. *Pol Arch Wet* 1968; 11:391-8.
- Salomon B, Sven E. Increasing the solubility of propolis in water. Patent duński. 133584. *Chem Abstr* 1976; 25:198170b.
- Omarow SM. Apiterapija. Produkty pszczołowodstwa w mirie medycyny. *Rostow-na Donu, Wyd Feniks* 2009:120-5.
- Kędzia B, Hołderna-Kędzia E. Wodne ekstrakty z propolisu. *Pasieka* 2019; 5:52-4.
- Ellnain-Wojtaszek M, Marciniak A, Kowalewski Z i wsp. Standaryzacja wyciągów z propolisu za pomocą ilościowego oznaczania flawonoidów. *Herba Polon* 1990; (36):145-53.
- Kędzia B, Mścisz A, Jankowiak J i wsp. Porównanie mikrobiologicznych, chemicznych, farmakologicznych i biochemicznych metod standaryzacji propolisu. *8 Międzynar Symp Apiter, Portoroż* 17-19 września 1998:91.
- Kędzia B, Hołderna-Kędzia E. Sposoby standaryzacji preparatów propolisowych. *Herba Polon* 1993; (4):227-32.
- Kiwman GJ, Kagramanowa KA, Szub TA. Method of determining the antimicrobial activity of propolis. *Antibiotiki* 1978; 9:792.
- Pepelnjak S, Jalsenjak I, Maysinger D. Growth inhibition of bacillus subtilis and composition of various propolis extracts. *Pharmazie* 1982; 37:864.
- Polska Norma PN-A-77627. Koncentrat propolisu, lipiec 1996.
- Norma Zakładowa ZN-91/1-1. Zagęszczony ekstrakt propolisowy, sierpień 1991.
- ZN-97/KP-FA-2 Norma Producenta. Koncentrat Propolisu, czerwiec 1997.
- Meresta T, Meresta L. Zagadnienie oceny aktywności antibakteryjnej ekstraktów propolisu. *V Międzynar Symp Apiter, Wyd Pol Zw Pszczel Kraków-Kamianna* 1986:103-7.

Konflikt interesów

Conflict of interest

Brak konfliktu interesów

None

Adres/address:

*mgr Elżbieta Hołderna-Kędzia
Os. Wł. Jagiełły 12/40, 60-694 Poznań
e-mail: elzbieta.kedzia@iwnirz.pl

otrzymano/received: 30.08.2022

zaakceptowano/accepted: 20.09.2022