

EKSPERIMENTINIAI TYRIMAI

Tirštojo ir išgryninto propolio ekstrakto antimikrobinis aktyvumas

Alvydas Pavilonis, Algirdas Baranauskas¹, Ligita Puidokaitė², Žaneta Maželienė,
Arūnas Savickas¹, Raimondas Radžiūnas¹

Kauno medicinos universiteto Mikrobiologijos katedra,

¹Vaistų technologijos ir socialinės farmacijos katedra, ²UAB „Valentis“

Raktažodžiai: propolis, antimikrobinis aktyvumas, fenoliniai junginiai.

Santrauka. Tikslas. Nustatyti tirštojo ir išgryninto propolio ekstrakto antimikrobinį aktyvumą.

Tyrimo medžiaga ir metodai. Nustatytas tirštojo propolio ekstrakto ir išgryninto propolio ekstrakto antimikrobinis aktyvumas su etaloninėmis bakterijų: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 33499, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus mirabilis* ATCC 12459, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* ATCC 8035 ir grybų – *Candida albicans* ATCC 60193 kultūromis. Mikrobiologinis tyrimas atliktas aseptinėmis sąlygomis. Nustatyta propolio ekstrakto mažiausia slopinamoji koncentracija – didžiausias preparato praskiedimas (mažiausia preparato koncentracija), kuris dar slopina konkrečios etaloninės mikroorganizmų kultūros augimą.

Tyrimo rezultatai. Fenolinių junginių koncentracija tirštajame propolio ekstrakto, veikiančiame antibakteriškai gramteigiamąsias (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*) ir gramneigiamąsias bakterijas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ir *Proteus mirabilis*), yra $0,587 \pm 0,054$ mg ir $0,587 \pm 0,054$ – $0,394 \pm 0,022$ mg ($p > 0,05$), o išgrynintame propolio ekstrakto yra $0,427 \pm 0,044$ mg ir $0,256 \pm 0,02$ mg ($p > 0,05$). *Klebsiella pneumoniae* atspariausia tirštajam propolio ekstraktui, kai fenolinių junginių koncentracija yra $1,119 \pm 0,152$ mg, ir išgrynintam propolio ekstraktui, kai fenolinių junginių koncentracija yra $1,013 \pm 0,189$ mg ($p > 0,05$). Sporinės bakterijos *Bacillus subtilis* jautresnės tirštajam ir išgrynintam propolio ekstraktui, kai fenolinių junginių koncentracija yra $0,134 \pm 0,002$ mg ir $0,075 \pm 0,025$ mg, o *Bacillus cereus*, kai fenolinių junginių koncentracija $0,394 \pm 0,022$ – $0,256 \pm 0,02$ mg ($p > 0,05$). Grybų *Candida albicans* jautrumas tirštajam ir išgrynintam propolio ekstraktui yra kaip ir *Bacillus subtilis*.

Tirštojo propolio ekstrakto ir išgryninto propolio ekstrakto antimikrobiniam poveikiui atspariausios yra kapsulinės bakterijos *Klebsiella pneumoniae*, lyginant su gramteigiamosiomis *Staphylococcus aureus* ir *Enterococcus faecalis* ($p < 0,05$), gramneigiamosioms *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ir *Proteus mirabilis* ($p < 0,05$), sporinėms *Bacillus subtilis* ir *Bacillus cereus* ($P < 0,05$) bakterijomis ir *Candida albicans* ($p < 0,05$) grybais. Nėra statistiškai reikšmingo skirtumo tarp tirštojo ir išgryninto propolio ekstrakto antimikrobinio poveikio gramteigiamosioms, gramneigiamosioms, sporinėms bei kapsulinėms bakterijoms ir *Candida* grybams.

Išvados. Tirštasis propolio ekstraktas ir išgrynintas propolio ekstraktas yra antimikrobiškai aktyvūs, juos galima rekomenduoti vartoti kaip natūralius konservantus farmacinių produktų gamybai.

Įvadas

Propolis (bičių pikis) – tai dervinga medžiaga, kurią bitės surenka nuo įvairių medžių (beržų, tuopų, pušų, alksnių ir gluosnių) lapų pumpurų bei pažeistų vietų. Tokia bičių surinkta medžiaga yra praturtinta jų seilėmis bei fermentais. Bitės propolį vartoja apsi-

saugoti nuo infekcijų sukėlėjų, balzamuoti ir sutvirtinti korius, užtaisyti avilių plyšius. Propolio gydomąsias savybes lemia daugybė jame esančių biologiškai veiklių junginių (apie 200) (1, 2). Biologiškai aktyvių medžiagų sudėtis yra labai skirtinga, ji priklauso nuo daugelio veiksnių (3). Be to, skirtinguose propolio

mėginiuose nustatoma ne tik skirtinga veikliųjų medžiagų sudėtis, bet ir jų kiekiai, o tai lemia skirtingą farmakologinį ir antimikrobinį poveikį (4).

Propolis yra vienas stipriausių gamtinių antibiotikų, turintis platų antimikrobinį veikimą. Jis pasižymi ne tik stipriu antibakteriniu, antioksidaciniu, antigrybeliniu, antivirusiniu poveikiu, bet stiprina imunitetą, slopina skausmą bei uždegimą, skatina žaizdų gijimą, antioksidantiniu poveikiu (2, 5–7). Bandymai *in vitro* parodė, kad bičių pikis pasižymi stipriomis antimikrobinėmis savybėmis prieš įvairias patogenines bakterijas: gramteigiamąsias (stafilokokus, streptokokus) ir gramneigiamąsias (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris* bei *Pseudomonas aeruginosa*), *Helicobacter pylori* (8–11). Šiam natūraliam bičių produktui jautrios ne tik bakterijos (4, 8), bet ir pirmuonys, grybai (*Candida albicans*), virusai (5, 7).

UAB „Valentis“ bendradarbiaujant su Kauno medicinos universiteto Farmacijos fakulteto Vaistų technologijos ir socialinės farmacijos katedros mokslininkais sukurta išgryninto propolio ekstrakto gamybos technologija. Išgrynintas propolio ekstraktas kaip natūralus konservantas gali būti vartojamas farmaciniam produktams gaminti.

Tyrimo tikslas – nustatyti tirštojo ir išgryninto propolio ekstrakto antimikrobinį aktyvumą.

Tyrimo medžiaga ir metodai

Ištirtas tirštojo propolio ekstrakto ir išgryninto propolio ekstrakto antimikrobinis aktyvumas.

Išgryninto propolio gamyba. Tirštasis propolio ekstraktas buvo valomas nuo priemaišų ir vaško. Tam tikslui pagal sukurtą technologiją buvo vartojamas etanolis 80 proc., žema temperatūra, atitinkamas slėgis ir filtravimo būdas. Išgrynintame propolio ekstrakto vaško gali būti ne daugiau kaip 0,5 proc.

Tirštojo ir išgryninto propolio antimikrobinio aktyvumo nustatymas. Tirštojo propolio ekstrakto ir išgryninto propolio ekstrakto antimikrobinis aktyvumas nustatytas su etaloninėmis mikroorganizmų (bakterijomis – *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 33499, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus mirabilis* ATCC 12459, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* ATCC 8035 ir grybais – *Candida albicans* ATCC 60193) kultūromis.

Etaloninės mikroorganizmų kultūros ir bakterijų klinikinės padermės buvo auginamos komercinėse standartizuotose BBL (angl. *Becton Dickinson and Company*) mitybinėse terpėse – triptozės sojos agare (bakterijos) ir Saburo agare (*Candida albicans*). Bak-

terijų kultūros triptozės sojos agare augintos 24 val., esant 37°C temperatūrai, o *Candida albicans* – Saburo agare 24 val., esant 25°C temperatūrai. Išaugusios mikroorganizmų kultūros nuplaautos steriliu natrio chlorido 0,9 proc. tirpalu ir paruoštos jų suspensijos [10^5 KSV (kolonijas sudarančių vienetų)/1 ml].

Mikrobiologinis tyrimas atliktas aseptinėmis sąlygomis. To paties preparato mikrobiologinis tyrimas kartotas su penkiais jo mėginiais. Kiekvienam tirštojo propolio ekstrakto tyrimui buvo sveriama 0,8 g preparato, o išgryninto propolio ekstrakto – 0,4 g preparato. Mikrobiologinio tyrimo metu nustatyta tirto preparato mažiausia slopinamoji koncentracija – didžiausias preparato praskiedimas (mažiausia preparato koncentracija), kuris dar slopina konkrečios etaloninės mikroorganizmų kultūros augimą. Pasvertas preparatas (0,8 g tirštojo propolio ekstrakto ar 0,4 g išgryninto propolio ekstrakto) buvo tirpinamas 10 ml etanolyje 96 proc. – tai pirmasis pagrindinis tiriamo preparato skiedinys (1-asis mėgintuvėlis). Po to 2 ml pagrindinio tirpalo iš pirmojo mėgintuvėlio buvo perpilti į antrąjį mėgintuvėlį su 8 ml (4 ml fiziologinio + 4 ml etanolio 96 proc.) tirpalo ir gautas antrasis pagrindinis preparato skiedinys. Iš antrojo mėgintuvėlio 4 ml antrojo pagrindinio preparato skiedinio buvo perpilti į trečiąjį mėgintuvėlį su 4 ml (3 ml fiziologinio + 1 ml etanolio 96 proc.) tirpalo ir gautas trečiasis pagrindinis preparato skiedinys. Ruošiant ketvirtąjį pagrindinį preparato skiedinį, 4 ml trečiojo pagrindinio preparato skiedinio buvo perpilti į ketvirtąjį mėgintuvėlį su 4 ml (3 ml fiziologinio + 1 ml etanolio 96 proc.) tirpalo. Iš ketvirtojo mėgintuvėlio 4 ml ketvirtojo pagrindinio preparato skiedinio buvo perpilta į penktąjį mėgintuvėlį su 4 ml (3 ml fiziologinio + 1 ml etanolio 96 proc.) tirpalo ir gautas penktasis pagrindinis preparato skiedinys. Kadangi propolio ekstraktas gerai tirpsta tik etanolyje 96 proc., o vandeniniame tirpale susidaro nuosėdos, todėl, vengiant nuosėdų susidarymo, į sterilų fiziologinį tirpalą buvo pilamas tam tikras ir etanolio 96 proc. kiekis. Be to, vengiant etanolio 96 proc. antimikrobinio poveikio, skiediniai buvo ruošiami taip, kad Petrio lėkštelėse su Miulero-Hintono agaru etanolio koncentracija būtų mažesnė nei 9 proc., kuri neslopina mikroorganizmų augimo.

Paruošus tiriamųjų preparatų pagrindinius tirpalus, toliau buvo ruošiami darbiniai preparatų skiediniai (1 ir 2 lentelė) 10 ml Miulero-Hintono agaro (*Muller-Hinton Agar*; *Becton, Dickinson and Company*), kuriuose nustatytas tiriamų preparatų slopinamasis poveikis (MSK) etaloninių mikroorganizmų augimui: 1–4 skiedinys buvo ruoštas iš antrojo pagrindinio preparato skiedinio; 1–7 skiedinys buvo ruoštas iš

1 lentelė. Tirštojo propolio ekstrakto antimikrobinio aktyvumo tyrimo duomenys

Tirštojo propolio ekstrakto skiediniai/kartai	Etaloninės mikroorganizmų kultūros								
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 33499	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12459	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 8035	<i>Candida albicans</i> ATCC 60193
1 skiedinys/100 kartų	N*	N	N	N	N	N	N	N	N
2 skiedinys/286 kartus	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3 skiedinys/380 kartų	N	N	N	A**	N	N	N	N	N
4 skiedinys/545 kartus	N	N	N	A	N	N	N	N	N
5 skiedinys/600 kartų	A	A	A	A	N	A	N	N	N
6 skiedinys/812 kartų	A	A	A	A	N	A	N	N	N
7 skiedinys/1000 kartų	A	A	A	A	A	A	N	A	N
8 skiedinys/1200 kartų	A	A	A	A	A	A	N	A	N
9 skiedinys/1500 kartų	A	A	A	A	A	A	N	A	N
10 skiedinys/1800 kartų	A	A	A	A	A	A	N	A	N
11 skiedinys/2100 kartų	A	A	A	A	A	A	N	A	N
12 skiedinys/2386 kartus	A	A	A	A	A	A	N	A	N
13 skiedinys/2700 kartus	A	A	A	A	A	A	A	A	A

Mikrobiologinis tyrimas atliktas penkis kartus (pateikti duomenys – MSK vidurkis). Kiekvienam tyrimui buvo pasveriami 0,8 g tirštojo propolio ekstrakto.

Tyrimo duomenų įvertinimas:

*N – mikroorganizmų kultūra neauga (preparatas slopina jų augimą).

**A – mikroorganizmų kultūra auga.

MSK – mažiausia slopinamoji koncentracija konkrečios etaloninės mikroorganizmų kultūros atžvilgiu –

trečiojo pagrindinio preparato skiedinio; 8–10 skiedinys buvo ruoštas iš ketvirtojo pagrindinio preparato skiedinio; 11–13 skiedinys buvo ruoštas iš penktojo pagrindinio preparato skiedinio.

Po to, sterilia bakteriologine kilpele paruošta mikroorganizmų suspensija sėjama į standžią mitybinę terpę – Miulero-Hintono agarą Petrio lėkštelėje su tam tikra preparato koncentracija. Bakterijų pasėliai inkubuoti 24 val. esant 37°C temperatūrai. Po inkubavimo vertinama, ar pasėlio vietoje mikroorganizmai auga, ar jų augimas yra slopinamas. Mikroorganizmai, kurie augo pasėlio vietoje, buvo atsparūs tiriamojo preparato tam tikram skiediniui. Jeigu mikroorganizmai pasėlio vietoje neaugo, jie buvo jautrūs tiriamojo preparato tam tikram skiediniui, t. y. preparatas slopintų jų dauginimąsi.

Statistinė analizė. Duomenys vertinti naudojant programinį paketą „Statistika 5.5“. Apskaičiuotas

eksperimentinių rodmenų aritmetinis vidurkis ir jų vidutinės kvadratinės paklaidos. Skirtumai tarp vidurkių vertinti Stjudento (t) kriterijumi. Duomenų skirtumas statistškai reikšmingas, kai $p < 0,05$.

Tyrimų rezultatai

Tirštojo propolio ekstrakto ir išgryninto propolio ekstrakto antimikrobinio tyrimo duomenys pateikiami 1 ir 2 lentelėje. Tyrimo duomenys rodo, kad visi tirti mikroorganizmai yra jautrūs tam tikrai tiriamųjų preparatų koncentracijai. Mažiausiai jautrios tirtiems preparatams yra *Klebsiella pneumoniae* ATCC 33499. Vidutiniškai jautrios tirštajam ir išgrynintam ekstraktui yra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus mirabilis* ATCC 12459 ir *Bacillus cereus* ATCC 8035. *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ir

2 lentelė. Išgryninto propolio ekstrakto antimikrobinio aktyvumo tyrimo duomenys

Išgryninto propolio ekstrakto skiediniai/kartai	Etaloninės mikroorganizmų kultūros								
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 33499	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12459	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6623	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 8035	<i>Candida albicans</i> ATCC 60193
1 skiedimas/158 kartus	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2 skiedinys/300 kartų	N	N	*N	**A	N	N	N	N	N
3 skiedinys/375 kartus	N	N	N	A	N	N	N	N	N
4 skiedinys/550 kartų	A	A	A	A	N	A	N	N	N
5 skiedinys/624 kartus	A	A	A	A	N	A	N	N	N
6 skiedinys/800 kartų	A	A	A	A	A	A	N	A	N
7 skiedinys/1000 kartų	A	A	A	A	A	A	N	A	N
8 skiedinys/1200 kartų	A	A	A	A	A	A	N	A	N
9 skiedinys/1500 kartų	A	A	A	A	A	A	N	A	N
10 skiedinys/1800 kartų	A	A	A	A	A	A	N	A	N
11 skiedinys/2128 kartus	A	A	A	A	A	A	N	A	N
12 skiedinys/2400 kartų	A	A	A	A	A	A	A	A	A
13 skiedimas/2700 kartų	A	A	A	A	A	A	A	A	A

Mikrobiologinis tyrimas atliktas penkis kartus (pateikti duomenys – MSK vidurkis). Kiekvienam tyrimui buvo pasverama 0,4 g išgryninto propolio ekstrakto.

Tyrimo duomenų įvertinimas:

*N – mikroorganizmų kultūra neauga (preparatas slopina jų augimą).

**A – mikroorganizmų kultūra auga.

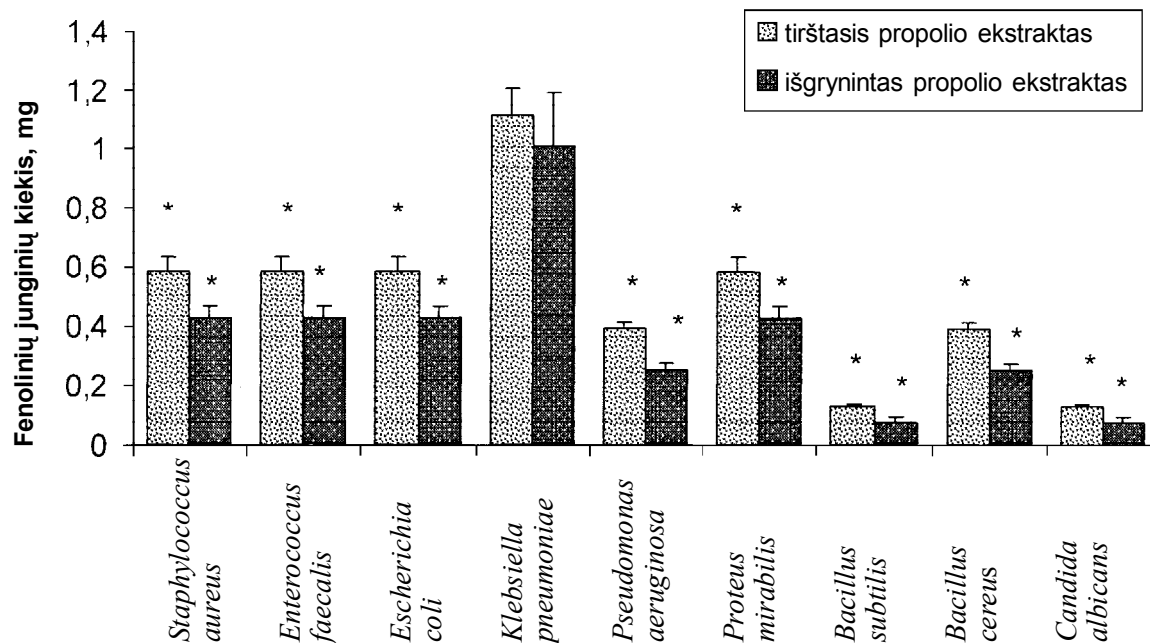
MSK – mažiausia slopinamoji koncentracija konkrečios etaloninės mikroorganizmų kultūros atžvilgiu –

Candida albicans ATCC 60193 yra jautriausios tirtų tirštojo ir išgryninto propolio ekstraktams. Lyginant tirštojo ir išgryninto propolio antimikrobinį aktyvumą tirtų mikroorganizmų atžvilgiu, galima konstatuoti, kad juose yra panaši fenolinių junginių koncentracija 1 mg ir jų antimikrobinis poveikis tirtoms etaloninėms mikroorganizmų kultūroms yra panašus ($p < 0,05$) (pav.)

Rezultatų aptarimas

Tirštasis propolio ekstraktas ir išgrynintas propolio ekstraktas yra natūralios augalinės kilmės, kuriuos sudaro propolis. Be to, propolio cheminė sudėtis ir biologinis aktyvumas priklauso nuo aplinkos augalijos. Propolio antimikrobinį aktyvumą lemia jo sudėtyje esantys flavonoidai, benzoinė ir kavos rūgštys, kiti cheminiai junginiai, šių medžiagų kiekybinė sudė-

tis ir jų sinergistinis poveikis (2, 4). Literatūros duomenimis, propolis yra netoksiškas antimikrobinis preparatas (8, 9, 10, 12), kuris veikia gramteigiamąsias ir gramneigiamąsias bakterijas ir kurio antimikrobinis poveikis bakterijoms priklauso nuo bakterijų ląstelės sienelės struktūros bei jų genotipinės savybės nepalankiomis aplinkos sąlygomis sudaryti sporas (8–10). Tirštojo propolio ekstrakto ir išgryninto propolio ekstrakto antibakterinis poveikis gramteigiamosioms (*Staphylococcus aureus* ir *Enterococcus faecalis*) ir gramneigiamosioms (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ir *Proteus mirabilis*) bakterijoms panašus (pav.): fenolinių junginių koncentracija tirštojo propolio ekstrakto skiediniuose, veikiančiuose antibakteriškai gramteigiamąsias ir gramneigiamąsias bakterijas, yra $0,587 \pm 0,054$ mg ir $0,587 \pm 0,054 - 0,394 \pm 0,022$ mg ($p > 0,05$), o išgryninto propolio ekstrakto



Pav. Tirštojo ir išgryninto propolio ekstrakto antimikrobinio aktyvumo priklausomumas nuo fenolinių junginių kiekio (mg)

* $p < 0,05$ lyginant su *Klebsiella pneumoniae*.

skiediniuose, veikiančiuose antibakteriškai gramteigiamąsias ir gramneigiamąsias bakterijas, yra $0,427 \pm 0,044$ mg ir $0,256 \pm 0,02$ mg ($p > 0,05$). Nors kokių (stafilokokų ir enterokokų) ir lazdelės formos bakterijų (ešerichijų ir pseudomonų) ląstelės sienelės struktūra skiriasi, tačiau ryškaus skirtumo tarp jų jautrumo tirštajam propolio ekstraktui ir išgrynintam propolio ekstraktui nėra ($p > 0,05$).

Vienas iš bakterijų patogeniškumo veiksnių yra kapsulė, kuri didina bakterijų atsparumą antimikrobinėms medžiagoms, taip pat ir propoliui. Kapsulę bakterijos sudaro metaboliškai aktyviausiu savo augimo laikotarpiu, kai įvairios medžiagos turi didžiausią žalojamąjį poveikį bakterijai. Šiuo atveju polisacharidinė kapsulė apsaugo klebsielės nuo fenolinių junginių neigiamo poveikio bakterijai. *Klebsiella pneumoniae* sudaro kapsulę ir, mūsų tyrimo duomenimis, yra atspariausia tirštajam, kai fenolinių junginių koncentracija yra $1,119 \pm 0,152$ mg, ir išgrynintam, kai fenolinių junginių koncentracija yra $1,013 \pm 0,189$ mg, propolio ekstraktui ($p > 0,05$).

Dalis bakterijų, apsisaugodamos save nuo nepalankių aplinkos veiksnių poveikio, sudaro sporas, kurios atsparios aukštai temperatūrai (iki 160°C) ir cheminiams veiksniams. Tačiau mūsų tirtos sporinės bakterijos – *Bacillus subtilis* ir *Bacillus cereus* buvo jautresnės tirštajam ir išgrynintam propolio ekstraktui, lyginant su sporų nesudarančiomis bakterijomis:

fenolinių junginių koncentracija skiedinyje, antibakteriškai veikiančiame *Bacillus subtilis*, buvo $0,134 \pm 0,002$ mg ir $0,075 \pm 0,025$ mg, o skiedinyje, antibakteriškai veikiančiame *Bacillus cereus*, buvo $0,394 \pm 0,022$ – $0,256 \pm 0,02$ mg ($p > 0,05$). Daugiasluoksnis storas sporos apvalkalas susidaro sporinei bakterijai esant ramybės stadijoje, kai metabolizmo procesai yra silpni – bakterija nei auga, nei dauginasi. Todėl sporinė būseną neapsaugo bakterijos nuo fenolinių junginių neigiamo poveikio. Grybų – *Candida albicans* jautrumas tirštajam ir išgrynintam propolio ekstraktui buvo toks pat kaip ir *Bacillus subtilis*. Literatūroje nurodoma, kad propolio antimikrobinis poveikis priklauso nuo flavonoidų kiekio ir jis veikia gramteigiamuosius kokus, tuberkuliozės sukėlėjus bei gramneigiamąsias bakterijas (12, 13). Be to, propolio antimikrobinį aktyvumą lemia ne tik gamtos sąlygos, bet ir regionas, kuriame jis surinktas (4, 7, 14, 15).

Tirštasis propolio ekstraktas ir išgrynintas propolio ekstraktas yra antimikrobiškai aktyvūs, šiuose ekstraktuose yra pakankama neigiamai veikianti mikroorganizmus fenolinių junginių koncentracija.

Išvados

1. Tirštojo propolio ekstrakto ir išgryninto propolio ekstrakto antimikrobiniam poveikiui atspariausios yra kapsulinės bakterijos – *Klebsiella pneumoniae*, lyginant su gramteigiamosiomis *Staphylococcus aureus*

ir *Enterococcus faecalis* ($p < 0,05$), gramneigiamosioms *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ir *Proteus mirabilis* ($p < 0,05$), sporinėms *Bacillus subtilis* ir *Bacillus cereus* ($p < 0,05$) bakterijomis ir *Candida albicans* ($p < 0,05$) grybais.

2. Nerasta statistiškai reikšmingo skirtumo tarp tirštojo propolio ekstrakto ir išgryninto propolio

ekrakto antimikrobinio poveikio gramteigiamosioms, gramneigiamosioms, sporinėms bei kapsulinėms bakterijoms ir *Candida* grybams.

3. Tirštasis propolio ekstraktas ir išgrynintas propolio ekstraktas yra antimikrobiškai aktyvūs, juos galima rekomenduoti vartoti kaip natūralius konservantus farmacinių produktų gamybai.

Antimicrobial activity of soft and purified propolis extracts

Alvydas Pavilonis, Algirdas Baranauskas¹, Ligita Puidokaitė², Žaneta Maželienė, Arūnas Savickas¹, Raimondas Radžiūnas¹

Department of Microbiology, ¹Department of Pharmaceutical Technology and Social Pharmacy, Kaunas University of Medicine, ²JSC Valentis, Lithuania

Key words: propolis; antimicrobial activity; phenolic compounds.

Summary. Objective. To evaluate the antimicrobial activity of soft and purified propolis extracts.

Study object and methods. Antimicrobial activity of soft and purified propolis extracts was determined with reference cultures of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 33499, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus mirabilis* ATCC 12459, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* ATCC 8035, and fungus *Candida albicans* ATCC 60193. Microbiological tests were performed under aseptic conditions. Minimum inhibitory concentration (MIC) – the highest dilution of preparation (the lowest concentration of preparation) that suppresses growth of reference microorganisms – was determined.

Results. Concentration of phenolic compounds in soft propolis extract that possesses antimicrobial activity against gram-positive (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*) and gram-negative bacteria (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Proteus mirabilis*) is 0.587 ± 0.054 mg and 0.587 ± 0.054 – 0.394 ± 0.022 mg ($P > 0.05$) and in purified propolis extract – 0.427 ± 0.044 mg and 0.256 ± 0.02 mg ($P > 0.05$). *Klebsiella pneumoniae* is most resistant to soft propolis extract when the concentration of phenolic compounds is 1.119 ± 0.152 mg and to purified propolis extract when the concentration of phenolic compounds is 1.013 ± 0.189 mg ($P > 0.05$). Spore-forming *Bacillus subtilis* bacteria are more sensitive to soft and purified propolis extracts when the concentration of phenolic compounds is 0.134 ± 0.002 mg and 0.075 ± 0.025 mg, respectively, and *Bacillus cereus* – when the concentration is 0.394 ± 0.022 mg and 0.256 ± 0.02 mg ($P > 0.05$). Sensitivity of fungus *Candida albicans* to soft and purified propolis extracts is the same as *Bacillus subtilis*.

Encapsulated bacterium *Klebsiella pneumoniae* is most resistant to antimicrobial action of soft and purified propolis extracts as compared with gram-positive *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* bacteria ($P < 0.05$), gram-negative *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Proteus mirabilis* ($P < 0.05$), spore-forming *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* bacteria ($P < 0.05$), and fungus *Candida albicans* ($P < 0.05$).

There is no statistically significant difference between antimicrobial effect of soft propolis extract and purified propolis extract on gram-positive bacteria, gram-negative bacteria, spore-forming bacteria, encapsulated bacteria, and *Candida* fungus.

Conclusions. Soft and purified propolis extracts possess antimicrobial activity. They could be recommended as natural preservatives in the manufacture of pharmaceutical products.

Correspondence to A. Baranauskas, Department of Pharmaceutical Technology and Social Pharmacy, Kaunas University of Medicine, A. Mickevičiaus 9, 44307 Kaunas, Lithuania. E-mail: baranauskas@med.kmu.lt

Literatūra

1. Marcucci MC, Ferreres F, Garcia-Viguera C, Bankova VS, de Castro SL, Dantas AP, et al. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. J Ethnopharmacol 2001;74:105-12.
2. Castaldo S, Capasso F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. Fitoterapia 2002;73(Suppl 1):1-6.
3. Salatino A, Teixeira EW, Negri G, Message D. Origin and

- chemical variation of Brazilian propolis. *Evid Based Complement Alternat Med* 2005;2:33-8.
4. Savickas A, Majienė D, Ramanauskienė K, Pavilionis A, Muselik J, Masteikova R, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of Lithuanian and Czech propolis. *Biologija* 2005;4:59-63.
 5. Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem Toxicol* 1998;36:347-63.
 6. Amoros M, Simoes CMO, Girre L. Sinergistic effect of flavones and flavonols against *Herpes simplex* virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. *J Nat Prod* 1992;55(12):1732-40.
 7. Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Y, Bankova V, Christov R, Popov S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol* 1999;64:235-40.
 8. Čerkašinas G, Gendrolis A, Pavilionis A, Klimas R. Lietuvoje surinkto propolio antimikrobinis aktyvumas. (Antimicrobial activity of propolis collected in Lithuania.) *Medicina (Kaunas)* 1997;33(12):1193-8.
 9. Pavilionis A, Čerkašinas G, Gendrolis A. Propomedo antimikrobinio aktyvumo tyrimai. (Analysis of propomedi antimicrobial activity.) *Medicina (Kaunas)* 1999;34(2):223-8.
 10. Gendrolis A, Pavilionis A, Lasinskaitė-Čerkašina A, Ivanauskas L. Prokalmento tirpalo antimikrobinio aktyvumo tyrimai. (The antimicrobiological analysis of procalment solution.) *Medicina (Kaunas)* 2005;41(3):221-5.
 11. Kosalec I, Pepeljnjak S, Bakmaz M, Vladimir-Knežević S. Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis products. *Acta Pharm* 2005;55:423-30.
 12. Grange JM, Davey RN. Antibacterial properties of propolis (bee glue). *J Royal Soc Medicine* 1990;83(3):159-60.
 13. Sawaya ACHF, Souza KS, Marcucci MC, Cunha IBS, Shimizu MT. Analysis of the composition of Brazilian propolis extracts by chromatography and evaluation of their *in vitro* activity against gram-positive bacteria. *Braz J Microbiol* 2004;35:104-9.
 14. Katircioglu H, Mercan N. Antimicrobial activity and chemical compositions of Turkish propolis from different region. *Afr J Biotechnol* 2006;5(11):1151-3.
 15. Kartal M, Kaya S, Kurucu S. GC-MS analysis of propolis samples from two different regions of Turkey. *Z Naturforsch* 2002;57:905-9.

Straipsnis gautas 2008 05 16, priimtas 2008 06 11

Received 16 May 2008, accepted 11 June 2008