

Uticaj propolisa i njegovih aktivnih sastojaka na rast i razmnožavanje gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija

Ispitivan je uticaj propolisa, preparata na bazi propolisa (tinktura, smolasta i suva materija) i izolovanih aktivnih sastojaka na rast i razmnožavanje gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija. Korišćene su bakterijske kulture gram-pozitivnih bakterija Staphylococcus aureus i Enterococcus, kao i gram-negativni sojevi Proteus mirabilis i Escherichiae coli. Dobijeni rezultati su pokazali da ispitivani preparati pokazuju dejstvo na gram pozitivne bakterije Staphylococcus aureus i Enterococcus, dok na rast i razmnožavanje gram negativnih bakterija sojeva Proteus mirabilis i Escherichiae coli nemaju nikakvog uticaja.

Uvod

Propolis je smolasta materija koju proizvode pčele radilice. Sastav i boja propolisa zavise od biljnih vrsta sa kojih pčele prikupljaju materijal kao i od godišnjeg doba. Sadrži 55–60% smolastih materija, 8–10% eteričnih ulja, oko 30% voska, 8–10% polena, vitamina, antibiotika i više elemenata u tragovima, kao što su kalijum, kalcijum i dr. Iz velikog broja veoma različitih sastojaka se izdvajaju: flavoni, flavonoli i flavanoni (zbirno nazvani flavonoidi), kao i različiti fenoli i aromati.

Zahvaljujući propolisu, odnosno njegovim anti-septičnim, bakteriostatičnim, anestetičnim i antitoksičnim svojstvima, unutrašnjost košnice predstavlja najsterilniju poznatu sredinu u prirodi. Zdravstvene institucije u celom svetu danas pokazuju poseban interes za njega pošto pomaže pri tuberkulozi pluća, hemijskim i termičkim opekotinama, teško zaras-

tajućim čirevima i ranama, angini, tonzilitisu, faringitisu, bronhitisu, zapaljenju pluća i bolestima želudačno crevnog trakta.

Gram pozitivne bakterije korišćene u istraživanju pripadaju sojevima *Staphylococcus aureus* i *Enterococcus*. *S. aureus* produkuje beta-laktamaze i poseduje druge mehanizme rezistencije na antibiotike. Zbog toga se *S. aureus* smatra jednim od najznačajnijih agenasa u humanoj medicini. *Enterococcus* ima izraženu otpornost na antibiotike, posebno penicilin i cefalosporin, i iz tog razloga je jedan od vodećih uzroka intrahospitalnih infekcija.

Za procenu antimikrobnog delovanja propolisa na gram negativne bakterije korišćene su sojevi *Escherichiae coli* i *Proteus Mirabilis*. *E. coli* je najvažniji pripadnik normalne rezidualne crevne flore čoveka i kao takva, ova bakterija je uslovno patogena. *Proteus mirabilis* je ubikvitaran mikroorganizam i zbog svoje široke rasprostranjenosti teško je sprečiti infekcije ovom bakterijom, naoročito u bolničkim uslovima. Sojevi *P. mirabilis* su osetljivi na ampicilin, karbencilin, cefalosporine.

Cilj rada je ispitivanje uticaja propolisa i njegovih aktivnih sastojaka na rast i razmnožavanje gram-pozitivnih (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp.) i gram-negativnih bakterija (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*).

Zbog potencijalno snažnog antibakterijskog dejstva i malo raspoloživih podataka ispitivano je dejstvo flavona propolisa.

Materijal i metode

Za ispitivanje antibakterijskih svojstava propolisa korišćena je difuziona metoda.

Princip ove metode sastoji se u tome da antibakterijske supstance difunduju u hranljivu podlogu i deluju inhibitorno u većoj ili manjoj meri na razmnožavanje bakterija. Merenjem zone inhibicije oko

Iva Janjić (1990), Beograd, učenica 2. razreda XIII beogradske gimnazije u Beogradu

MENTOR: Vera Kozarski, Institut za imunologiju i virusologiju Torlak, Beograd.

papirnog diska ili tablete na koji je naneta susptanca od interesa, može se utvrditi opseg antibakterijskog dejstva.

Čiste kulture ispitivanih bakterijskih vrsta zasejane su na krvnom agru. Sa agra su kulture tri puta presejavane na podloge i to gram-pozitivne na krvni agar, a gram-negativne na Miler-Hintonov agar. Presejavanje je vršeno radi dobijanja čistih bakterijskih kultura.

Na hranljive podloge u Petri šoljama su zasejane bakterije tako da se dobije konfluentan rast, a potom su na podlogu postavljani diskovi i tablete sa antibakterijskim supstancama. Za svaki bakterijski soj korišćeno je po deset zasejanih podloga sa po sedam raspoređenih tableta ili diskova. Gram-pozitivne bakterije zasejavane su na krvni agar, a gram-negativne na Miler Hintonov. Posle inkubacije od 24 h na 37°C očitani su prečnici zone inhibicije. Širina zone inhibicija predstavlja stepen osetljivosti bakterija. Ako je bakterija otporna na dejstvo leka zona inhibicije je uska ili uopšte ne postoji.

Merenje prečnika zone inhibicije vršeno je milimetarskom hartijom i tumačeno prema preporuci proizvođača diska i tablete (Torlak, Beograd).

Kao pozitivne kontrole korišćena su tri antibiotika: ofloksacin, penicilin, amoksicilin.

Ofloksacin (*Ofloxacin*) spada u grupu fluorohinolona. Ovi preparati inhibiraju sintezu i replikaciju DNK vezujući se za A podjedinicu DNK-giraze. Imaju baktericidan efekat na brojne gram-negativne bakterije (enterobakterije), najserije, hlamidije kao i na pojedine gram-pozitivne bakterije (klostridije, mikobakterije, stafilokoke, streptokoke).

Penicilin (*Penicilin G*) je prirodni penicilin dobijen ekstrakcijom iz gljive *Penicillium chrisogenum*. Spada u beta-laktame, antibiotike čiji je ključni mehanizam delovanja inhibicija sinteze peptidoglikana ćelijskog zida bakterija. Baktericidan efekat ostvaruje na gram-pozitivne i gram-negativne koke, dok je bez efekta na *Staphylococcus aureus* i gram-negativne bacile.

Amoksicilin (*Amoxycillin*) spada u polusintetske peniciline širokog spektra dejstva. Ima prošireno dejstvo na gram-negativne bacile (*E. Coli*, *Proteus*, *Haemophilus*), ali je osetljiv na dejstvo beta-laktamaza koje ove bakterije u velikoj meri proizvode.

Sve tablete i diskovi su imali prečnik od 9 mm. Antibakterijsko dejstvo propolisa ispitivano je njegovim nanošenjem na podloge u više oblika:

1. smola propolisa (50 µL po disku),

2. tinkture propolisa (30% alkoholni rastvor propolisa, 50 µL po disku),
3. suva materija propolisa (tablete) i
4. ekstrahovani flavoni iz propolisa (50 µL po disku).

Za negativne kontrole korišćeni su metanol i fiziološki rastvor (50 µL po disku).

Ekstrahovanje flavona propolisa

Smolasta materija propolisa izlagana je niskoj temperaturi 24 h posle čega je usitnjena. Dodat je 70% etanol. Uzorak je proceđen i stavljen u vakuum uparavač na temperaturu od 60°C. Ovako dobijen primarni ekstrakt propolisa dalje je razdvajanjem hromatografijom na tankom sloju. Kao čvrsta faza korišćen je silika gel G60, dok je mobilnu fazu činio sistem rastvarača dihlormetan:metanol 19:1.

Hromatografija je vršena na sloju silika gela debljine 1 mm, a uzorak je nanošen u obliku crte na oko 1 cm od ivice ploče. Po ploči je nanošeno oko 1 mL uzorka. Nakon izvršene hromatografije vršena je detekcija razdvojenih jedinjenja, na osnovu bojene reakcije i Rf vrednosti.

Prskanjem ploča 2M NaOH detektovane su linije koje pripadaju flavonima. Delovi ploče na kojim su detektovani flavoni su sastrugani u erlenmajere i flavoni su reekstrahovani sa 10 mL metanola. Nakon ekstrakcije silika gel je odstranjen centrifugiranjem (5 minuta na 3000 rpm) i dekantovanjem.

Izdvojeno je ukupno šest flavona. Koncentracija flavona je određena spektrofotometrijski. Izmerena je apsorbanca uzoraka na talasnoj dužini od 505 nm (Cintra 10, GBC Spectral, Melbourne), a koncentracija flavona je dobijena primenom formule:

$$C = 532 \cdot \text{Abs.} + 0.40$$

Rezultati i Diskusija

U tabeli 1 su prikazane dobijene apsorbance i preračunate koncentracije flavona.

Preliminarnim ispitivanjima je utvrđeno da antibiogram tablete ofloksacina, amoksicilina i penicilina pokazuju zonu inhibicije u opsegu koju je naveo proizvođač. Ovaj podatak pokazuje da je postavka eksperimenta dobra i da sojevi bakterija nisu izmenjene rezistencije usled neke mutacije.

Rezultati su navedeni prema dejstvu na pojedinačne sojeve mikroorganizama.

Tabela 1. Apsorbance i koncentracije flavona

	Apsorbanca	C [mg/L]
Flavon 1	0.8072	463.25
Flavon 2	0.5292	281.93
Flavon 3	0.4792	255.33
Flavon 4	1.3640	726.05
Flavon 5	0.9137	498.88
Flavon 6	1.1003	585.76

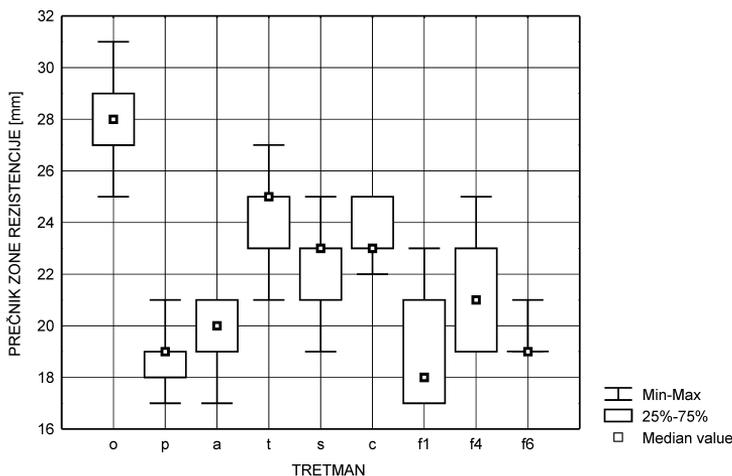
Staphylococcus aureus

Uporednim posmatranjem tabele za očitavanje senzitivnosti i grafikona za soj *Staphylococcus aureus* uočeno je da je bakterija senzitivna na dejstvo ofloksacina (Zona Inhibicije (ZI) prečnika

28 mm), dok je dejstvo amoksilina i penicilina srednje jačine (ZI redom 19 i 20 mm) Preparati na bazi propolisa (tinktura, smolasta materija i suva materija) u korišćenim koncentracijama pokazuju prečnike zona inhibicija u opsegu između amoksilina i ofloksacina, što znači da ostvaruju snažno antibakterijsko dejstvo. Flavon 4 pokazuje intermedijerno dejstvo na *Staphylococcus Aureus* (ZI 19 mm), dok ostali izolovani flavoni ne pokazuju značajnije dejstvo.

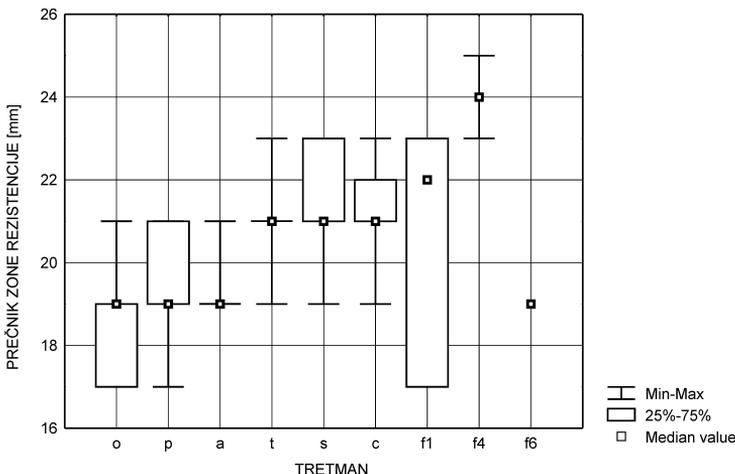
Enterococcus

Bakterija *Enterococcus* pokazuje osetljivost na penicilin (ZI 19 mm) dok druga dva korišćena antibiotika ne ostvaruju dovoljno snažno dejstvo. Preparati na bazi propolisa (tinktura smolasta materija i suva materija) flavon 1 i flavon 4 pokazuju zone in-



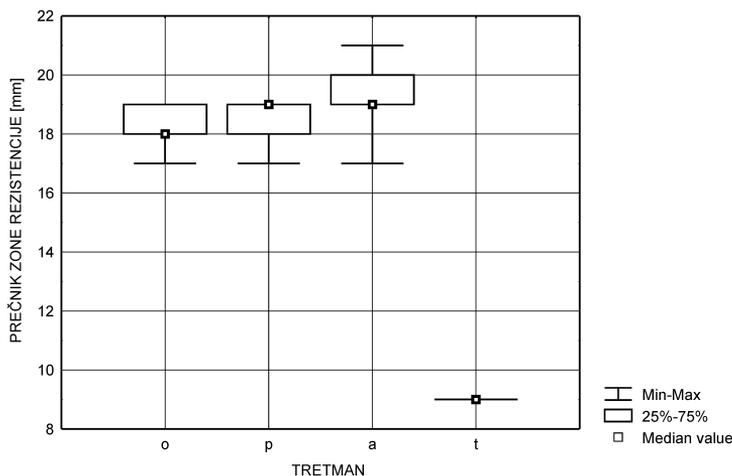
Slika 1.
Rezultati antibiograma za soj *Staphylococcus aureus*
o – ofloksacin
p – penicilin
a – amoksilin
t – tinktura propolisa
s – smolasta materija
c – suva materija
f1-f6 – izolovani flavoni

Figure 1.
Antibiogram results for *Staphylococcus aureus*
o – ofloxacin
p – penicilin
a – amoxicillin
t – propolis tincture
s – resin
c – dry matter
s1-f6 – flavones



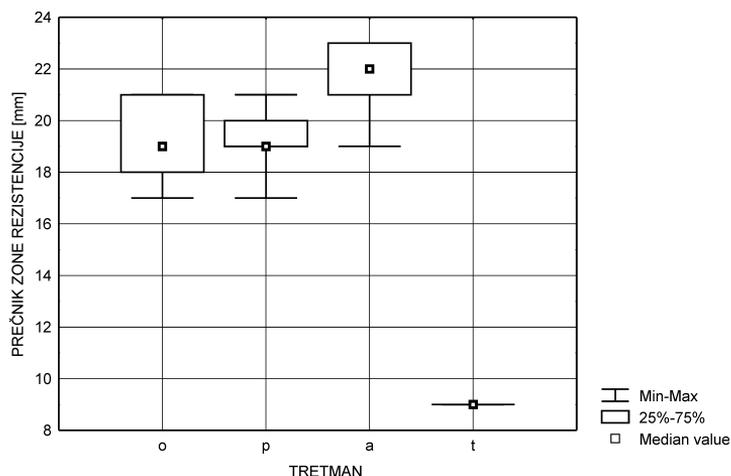
Slika 2.
Rezultati antibiograma za soj *Enterococcus*
(oznake iste kao na slici 1)

Figure 2.
Antibiogram results for *Enterococcus*
(the same marks as on Figure 1)



Slika 3.
Rezultati antibiograma za soj *Proteus mirabilis*
o – ofloksacin
p – penicilin
a – amoksicilin
t – tinktura propolisa

Figure 3.
Antibiogram results for *Proteus mirabilis*
o – ofloxacin
p – penicilin
a – amoxicillin
t – propolis tincture



Slika 4.
Rezultati antibiograma za soj *Escherichiae coli*
(oznake iste kao na slici 3)

Figure 4.
Antibiogram results for *Escherichiae coli*
(the same marks as on Figure 3)

hibicije veće od antibiotika korišćenih za pozitivnu kontrolu. Flavon 6 je ostvario dejstvo koje je približno istog intenziteta kao penicilin.

Proteus mirabilis i *Escherichia coli*

Uporednim posmatranjem tabele za očitavanje senzitivnosti i grafikona za soj *Proteus mirabilis* uočeno je da korišćeni antibiotici ostvaruju intermedijarno dejstvo (ZI 18-19 mm), dok je *Escherichia Coli* osetljiva na amoksicilin (ZI 24 mm).

Propolis i preparati na bazi propolisa nisu pokazali nikakav uticaj na rast i razmnožavanje gram-negativnih bakterija. Bakterije su pri svim korišćenim koncentracijama pokazale potpunu rezistentnost.

Uporednim pregledom grafikona koji se odnose na gram-pozitivne sojeve uočeno je da je dejstvo preparata na bazi propolisa jednako ili jače u pore-

denju sa dejstvom antibiogram tableta iz testa, dok je dejstvo različitih oblika propolisa na gram-negativne sojeve izostalo.

Pretpostavlja se da do ovakve razlike u dejstvu dolazi usled velike strukturne razlike u građi ćelijskog zida ove dve grupe bakterija. Gram-negativne bakterije imaju značajno razvijeniji ćelijski zid i bolju kontrolu transporta metabolita, te su bolje zaštićene od dejstva ksenobiotika.

Mehanizam dejstva preparata propolisa za sada nije poznat. Moguća objašnjenja su poremećaji u strukturi ćelijske membrane, kao i narušavanje redoks ravnoteže bakterijske ćelije.

Zaključak

Preparati na bazi propolisa negativno utiču na rast i razmnožavanje gram-pozitivnih bakterija iz soja *Staphylococcus aureus* i *Enterococcus*, tj. navedene bakterije su osjetljive na dejstvo tinkture propolisa, kao i na dejstvo smolaste i suve materije ove supstance. Bakterije su intermedijerno osjetljive prema flavonu 4 i flavonu 6. Ostali izolovani flavoni ne ostvaruju efekat.

Nijedan od ispitivanih preparata na bazi propolisa nema uticaj na rast i razmnožavanje gram-negativnih bakterija *Proteus mirabilis* i *Escherichiae coli*. Radi boljeg razumevanja dejstva propolisa i izolacije ostalih aktivnih principa, neophodno je izvršiti dalja istraživanja

Zahvalnost. Zahvaljujem se saradnicima seminara Molekularne biomedicine Istraživačke stanice Petnica na pomoći pri realizaciji rada i pripremi izveštaja. Takođe se zahvaljujem Borisu Mandiću, asistentu na Hemijskom fakultetu, na obezbeđenom priboru za rad. Posebnu zahvalnost pri izradi ovog rada dugujem dr Veri Kozarski (Institut Torlak) za pomoć pri organizaciji eksperimenta, kao i na obezbeđenim bakterijskim kulturama.

Literatura

Burdock G. A. 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food Chem. Toxicol.*, **36**: 347.

Bankova V., Kuleva L. 1989. Phenolic compounds in propolis from different regions in Bulgaria. *Animal Sciences*, **2**: 94.

Iva Janjić

Effect of Propolis and Its Active Ingredients on Growth and Development of Gram-Positive and Gram-negative Bacteria

The influence on growth and development of bacteria was determined for propolis, propolis-based medicines and isolated active ingredients. *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* were used as model Gram-positive organisms, while strains of *Proteus mirabilis* and *Escherichiae coli* were used to observe the effect on Gram-negative bacteria. The results show that propolis preparations affect the growth of Gram-positive bacteria, whereas the substances used in this research do not influence the Gram-negative bacteria. In order to explain the mechanism of action of propolis, further investigations ought to be performed.

