

TADEUSZ MERESTA

Długotrwałe oddziaływanie ekstraktów propolisu na *Staphylococcus aureus*

Zakład Higieny Weterynaryjnej, ul. Słowicza 2, 20-336 Lublin

Summary

Long-lasting action of propolis extracts on *Staphylococcus aureus*

Five propolis extracts of a known concentration (mg/ml), dissolved in ethyl alcohol, were examined. The extract had high bacteriostatic and bactericidal activity in relation to *S. aureus* 209P (MIC = 0.100-0.120 mg/ml and MBC = 0.160-0.280 mg/ml, respectively). A serial dilution method on a solid medium was used for the determination of bacteriostatic activity (MIC). One hundred and sixty-one cycles were carried out for 40 months.

A long-lasting, permanent action on *S. aureus* 209P of diluted propolis extract of known MIC and MBC values did not reveal any mutants resistant to the action of the compounds contained in these extracts. It was shown *in vitro* that no resistance occurred to the propolis preparations used as antibacterial agents, which is significant in therapy.

Przez długi okres czasu oceniano wartość terapeutyczną kitu pszczelego (propolisu) na podstawie skutków działania, jakie obserwowano w wyniku jego stosowania w różnych schorzeniach ludzi i zwierząt. Te praktyczne obserwacje, wykorzystujące technikę badań mikrobiologicznych, pozwoliły w ostatnich latach na rozwój badań w kierunku określenia wrażliwości wielu gatunków drobnoustrojów na działanie ekstraktów propolisu.

Badania nad wpływem ekstraktów propolisu na różne mikroorganizmy prowadziło wielu autorów. Dotyczyły one: grzybów wywołujących schorzenia skóry (1, 2, 3, 17), *Aspergillus sp.* (16) i *Candida albicans* (8, 11, 16), *Trichomonas vaginalis* i *Toxoplasma gondii* (18, 19), *Staphylococcus aureus* (4, 8, 11, 13), drobnoustrojów najczęściej występujących w przebiegu zapaleń wymion u bydła (4, 11), szczepów *B. larvae* (9, 14), bakterii beztlenowych z rodzaju *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium* (7) oraz drobnoustrojów opornych na rutynowo stosowane antybiotyki (20).

W miarę postępu wiedzy dotyczącej składu chemicznego propolisu wyjaśniono działanie niektórych związków wchodzących w jego skład na szczepach drobnoustrojów: *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *Candida albicans* (10, 15).

Preparaty zawierające ekstrakty propolisu zastosowano z dużą przydatnością w terapii weterynaryjnej: leczeniu trudno gojących się ran u psów i kotów (5, 21), zapaleń wymion u krów na tle zakażenia bakteriami i drożdżakami (4, 12).

Racjonalne podstawy apiterapii są więc możliwe w oparciu o znane siły działania bakteriostatycznego i bakteriobójczego ekstraktów propolisu. Wrażliwość drobnoustrojów na działanie ekstraktów propolisu i aktywność właściwa leku są ze sobą ściśle sprzężone. Istnieje między nimi zależność wynikająca z wzajemnego oddziaływania komórki drobnoustroju i cząsteczek leku propolisowego. Odpowiednie zaś wartości minimalnego stężenia bakteriobójczego i minimalnego stężenia hamującego wzrost danej populacji bakteryjnej stanowią wypadkową tego oddziaływania. W przypadku substancji o działaniu przeciwbakteryjnym, zwłaszcza przy subtelnych dawkach preparatu, w miarę upływu czasu zwiększa się prawdopodobieństwo pojawienia się opornych mutantów. Zmiana wielkości MBC lub MIC świadczy więc o wzroście odporności lub wzroście wrażliwości szczepów chorobotwórczych na ekstrakty propolisu.

Celem pracy było zbadanie czy długotrwałe oddziaływanie ekstraktów propolisu na hodowlę bakteryjną *S. aureus* nie spowoduje pojawienia się mutantów opornych na ten chemioterapeutyk.

Materiał i metody

Do badań użyto pięć ekstraktów propolisu w roztworze alkoholu etylowego i określonych stężeniach w mg/ml. Minimalne stężenia hamujące (MIC) dla badanych ekstraktów miały wartość: nr 07=0,120, nr 09=0,120, nr 15=0,100, nr 19=0,100 i nr 35=0,120 mg/ml podłoża; zaś minimalne stężenia bakteriobójcze (MBC): nr 07=0,230, nr 09=0,220, nr 15=0,190, nr 19=0,160 i nr 35=0,280 mg/ml podłoża. Wartości MIC (na podłożu stałym) i MBC (na podłożu płynnym) określono w stosunku do *S. aureus* 209P, metodą podaną uprzednio (6, 13). Skład podłoża (6, 13) zapewniał optymalny wzrost zastosowanego szczepu *S. aureus* 209P. Do oznaczania działania bakteriostatycznego (MIC) badanych ekstraktów propolisu, zastosowano metodę płytkową – seryjnych rozcieńczeń, na podłożu stałym. W metodzie tej można używać podłoża zawierających nieprzejrzyste składniki, co umożliwi badania ilościowe propolisu-wrażliwych drobnoustrojów o wysokich wymaganiach odżywczych. Ponadto, stosując

metodę płytkową, można szybko wykryć ewentualne zanieczyszczenia hodowli testowanego szczepu innymi mikroorganizmami, a także wykryć pojawienie się spontanicznie powstających mutantów opornych na działanie związków zawartych w ekstrakcie propolisu, a był to przecież główny cel badania.

Minimalne stężenie hamujące (MIC) dla każdego badanego ekstraktu propolisu oznaczano na podłożach i według metodyki podanej we wcześniejszych pracach (6, 13). Natomiast inokulum nr 1 stanowiła 20 godz. hodowla *S. aureus* 209P na podłożu płynnym z dodatkiem roztworu ekstraktu propolisu o stężeniu połowy wartości MIC dla każdej próby: 07=0,060, 09=0,060, 15=0,050, 19=0,050, 35=0,060 mg/ml podłoża. Za minimalne stężenie hamujące (MIC) przyjmowano najniższe stężenie końcowe ekstraktów propolisu, poszczególnych prób, które hamowało całkowicie wzrost szczepu *S. aureus* 209P (pasaż nr 1), po upływie 20-24h inkubacji w temperaturze 37°C. Szereg rozcieńczeniowy inkubowano ponownie przez 20h, gdyż jak wykazały badania (13), istnieje zależność między wartością MIC, a czasem odczytu wyników, przy oznaczaniu tych wartości dla ekstraktów kitu pszczelego. Wzrost kolonii bakteryjnych na płytkach o stężeniach najniższego stężenia hamującego (wartość po 20h inkubacji) danej próby, po kilku dniach służył do hodowli inokulum nr 2. (z dodatkiem ekstraktu propolisu), dla każdej próby oddzielnie. Po czym następował posiew na szereg rozcieńczeniowy na podłożu stałym (posiew nr 2) – inkubacja – odczyt wyników – ponowna inkubacja – był to cykl (pasaż) nr 2. Następnie następował pasaż 3, 4, 5 itd., aż do końca badania. Jeden cykl badania trwał przez 7-10 dni dla jednego ekstraktu. Wykonano ogółem 161 pasaży, przez okres czterdziestu miesięcy.

Wyniki i omówienie

Przez cały czas doświadczenia, populacja bakteryjna była pod stałym oddziaływaniem roztworu ekstraktu propolisu, hamującym namnażanie się hodowli bakteryjnej. Wartość MIC i MBC badanych ekstraktów przez okres doświadczenia, tzn. po 10, 20, 30 i 40 miesiącach nie zmieniła się, została zachowana aktywność początkowa. Nie doszło też do załamania się aktywności przeciwbakteryjnej badanych ekstraktów propolisu.

W dostępnym piśmiennictwie nie spotkano prac omawiających ujawnianie się u szczepów bakteryjnych oporności na preparaty propolisowe. Natomiast ekstrakty propolisu okazały się skutecznym preparatem w leczeniu zapaleń wymion u krów (12) i otitis externa u psów (21) na tle zakażeń drobnoustrojami antybiotykoopornymi.

Reasumując można stwierdzić, że długotrwałe, trwające czterdzieści miesięcy, stałe działanie roztworu etanolowego ekstraktów propolisu o wartościach MIC=0,100 – 0,120 mg/ml podłoża (5 prób) i wartościach MBC=0,160 – 0,280 mg/ml podłoża na populację bakteryjną *S. aureus* 209P, nie spo-

wodowało pojawienia się mutantów opornych na działanie związków zawartych w badanych preparatach propolisowych. Wykazano *in vitro*, że przy stosowaniu jako czynnika przeciwbakteryjnego preparatów propolisowych, nie zachodzi zjawisko propolisoporności, co ma istotne znaczenie w terapii.

Piśmiennictwo

1. Beheimer H., Braun W., Friedrich E., Kala H., Metzner J., Schneidewind E., Schweiberger R., Woźniak K. D.: Derm. Nachr. 159, 443, 1973.
2. Cizmark I., Trupl I.: Pharmazie 30, 406, 1975.
3. Cizmark I., Trupl I.: Pharmazie 31, 55, 1976.
4. Dutko P.: Badania nad czynnikami etiologicznymi, leczeniem i zwalczaniem zapaleń gruczołu mlekowego krów. Praca dokt., AR, Lublin 1987.
5. Gabryś A., Winiowska L., Zahaczewska M.: Medycyna Wet. 29, 530, 1973.
6. Gliński Z., Meresta T.: Medycyna Wet. 49, 27, 1993.
7. Kędzia A.: Herba Pol. 32, 53, 1986.
8. Lindenfelser A.: Am. Bee J. 107, 90, 1967.
9. Lindenfelser A.: J. Invertebr. Path. 12, 129, 1968.
10. Meresta L., Meresta T.: Bull. Vet. Inst. Puławy 28, 1, 1985.
11. Meresta L., Meresta T.: Medycyna Wet. 41, 489, 1985.
12. Meresta L., Meresta T., Burdziński J., Chmurzyński P.: Medycyna Wet. 45, 392, 1989.
13. Meresta T.: Badania nad czynnikami wpływającymi na aktywność przeciwbakteryjną ekstraktów kitu pszczelego (propolisu). Praca dokt., AR, Lublin 1986.
14. Meresta T., Meresta L.: Medycyna Wet. 44, 169, 1988.
15. Metzner J., Schneidewind E. M.: Mykosen 21, 257, 1978.
16. Popoljniak S., Jalseniak I., Maysinger D.: Pharmazie 27, 439, 1982.
17. Popescu A., Braileanu C., Ghiorghiu A.: Dermat. Venerol. 12, 57, 1967.
18. Starzyk J., Scheller S., Starzyk-Kozińska I., Drozdowicz D.: Biul. XVIII Zjazdu PTM, Lublin 1975, s. 300.
19. Starzyk J., Scheller S., Moskwa M.: Biul. XVIII Zjazdu PTM, Lublin 1975, s. 301.
20. Starzyk J., Doleżał M.: V Między. Symp. Apiterapii, Kraków 1985, s. 116.
21. Stojko A., Furowicz A. J.: Medycyna Wet. 36, 110, 1980.

Adres autora: dr inż. Tadeusz Meresta, ul. Husarska 1/11, 20-555 Lublin

SOECOL V. T., SOTOMAIOR C., SOUZA F. P., CASTRO E. A., PERSOA SILVA M. C., MILCZEWSKI V.: Występowanie oporności na leki przeciw pasożytnicze u owiec w stanie Parana w Brazylii. (Occurrence of resistance to anthelmintics in sheep in Parana state, Brazil). Vet. Rec. 139, 421-422, 1996 (17)

Oporność na leki stosowane w zwalczaniu pasożytniczych nicieni odgrywa ważną rolę w krajach gdzie występują zarażenia endemiczne *Haemonchus contortus*. W stanie Parana, w których w ciągu kilku lat zintensyfikowano hodowlę owiec, często występuje ostra forma hemonchozy, powodująca z reguły padanie zarażonych zwierząt. Badania przeprowadzono w 6 stadach liczących ponad 100 sztuk owiec, w których przed przystąpieniem do eksperymentów liczba jaj pasożyta w 1 g kału przewyższała 200. Przez 30 dni nie stosowano żadnych leków przeciw pasożytniczych. W każdym ze stad u 10 owiec zastosowano jeden z 7 leków, a mianowicie closantel (15 mg/kg), difosfenol-tetramisole (6,1 mg/kg), tetramisole (7,4 mg/kg), levamisole (7,5 mg/kg) albendazole (10 mg/kg), fenbendazole (7,5 mg/kg) i ivermectin (200 g/kg). Po 14 dniach po podaniu preparatów określono ilość jaj w kale. W większości stad *H. contortus* był oporny na 2-4 leków. Jedynie levamisole cechowała 90% efektywność.

G.