



Wpływ pochodzenia geograficznego propolisu na jego właściwości przeciwdrobnoustrojowe



**Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**



Wydział Nauk o Żywności

**Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii
i Oceny Żywności**



Zakład Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności

mgr inż. Piotr Robert NOWOTNIK

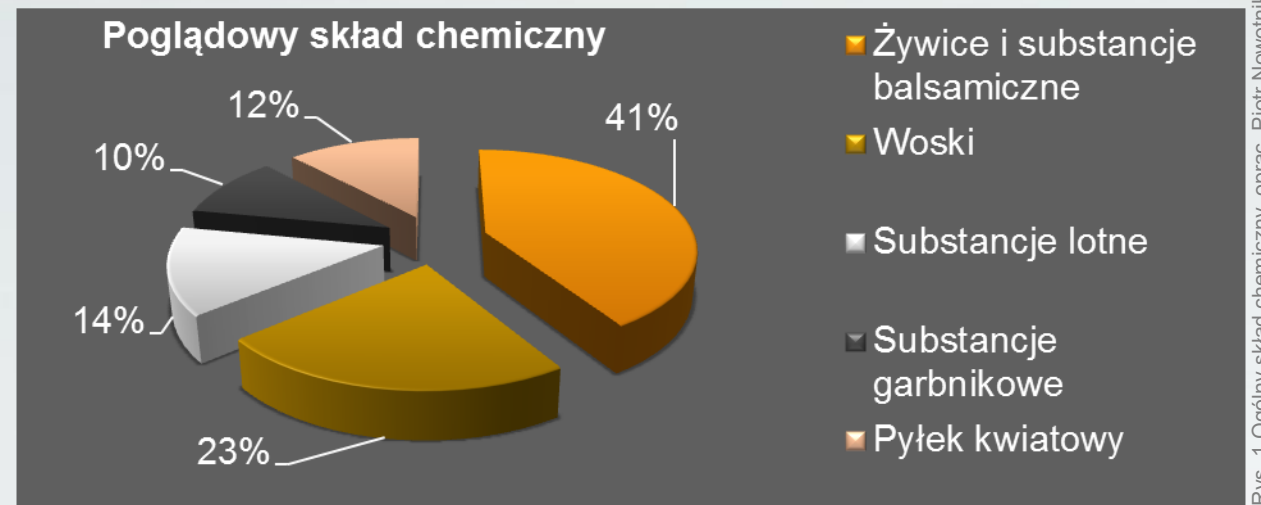
piotr_nowotnik@mail.sggw.pl

nowotnik.piotr@wp.pl

56 Naukowa Konferencja Pszczelarska - 6 marca 2019, Kazimierz Dolny

Charakterystyka propolisu

- Kit pszczeli to mieszanina gum naturalnych i żywicznych oraz smolistych, balsamicznych i woskowych substancji powlekających młode pączki drzew, krzewów i roślin zielonych (pączki: liściowe, kątowe, wierzchołkowe, kwiatowe);
- Substancjami tymi są: żywice, balsamy, tłuszcze, śluzy, gummy, kleje, lateksy oraz woski - chronią tkanki roślinne przed mrozem, pasożytami, szkodnikami i infekcjami;
- Popularnym źródłem botanicznym są np. świerki, jodły, sosny, modrzewie, brzozy, olchy, topole czy osiki;
- Barwa obnóży żywicznych: jasnożółte, zielone, czerwone, czerwono-brązowe, bursztynowo-pomarańczowe, brązowe;
- Substancje propoliso-twórcze przy użyciu żuwaczek i siły przednich nóg są zgryzane, zlizywane, zczesywane i formowane w grudki z dodatkiem śliny, całość w formie obnóży ulokowywana jest na 3 parze odnóży robotnicy;



Rys. 2 Kierunkowa aktywność biologiczna propolisu, oprac. Piotr Nowotnik



Cel i zakres pracy

Celem pracy była:

- analiza fizyko-chemiczna próbek propolisu z różnych części Europy,
- określenie i porównanie ich właściwości przeciwdrobnoustrojowych, mogących odnaleźć zastosowanie w konserwowaniu i zabezpieczaniu żywności przed aktywnością szkodliwej mikroflory;

Zakres pracy obejmował:

- Wykonanie etanolowych ekstraktów propolisu;
- Analizę jakościową próbek propolisu;
- Określenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej poprzez wyznaczenie MIC, MBC, MFC względem drobnoustrojów wzorcowych (bakterii, drożdży i pleśni);
- Wyznaczenie krzywej śmierci (*ang. time-kill*) bakterii pod wpływem etanolowych ekstraktów z propolisu (EEP);
- Oznaczanie całkowitej zawartości polifenoli i flawonoidów w EEP;



Materiał i metodyka pracy -1

Tabela 1. Materiał pracy

Kraj pochodzenia	Rasa pszczół	Data pobrania z ula
Włochy	<i>Apis mellifera ligustica</i>	05/2017
Wielka Brytania	<i>Apis mellifera buckfast-hybrid</i> Scottish Buckfast	07/2017
Polska	<i>Apis mellifera carnica</i> car Prima	08/2017

Tabela 2. Materiał biologiczny – testowane szczepy bakterii

Gramowość	Nazwa systematyczna	Szczep
Gram-dodatnie	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778
	<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 7644
	<i>Listeria monocytogenes</i>	PZH-NIZP
	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 33090
Gram-ujemne	<i>Salmonella Enteritidis</i>	ATCC 13076
	<i>Shigella sonnei</i>	PZH-NIZP „S”
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	ATCC 700728
	<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 35659
	<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 8090
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13048



Fot. 1 Komora laminarna, fot. Piotr Nowotnik

Materiał i metodyka pracy -2

Tabela 3. Materiał biologiczny – testowane szczepy grzybów

Rodzaj	Nazwa systematyczna	Szczep
drożdże	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATCC 9763
	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	ATCC 66034
	<i>Candida krusei</i>	ATCC 14243
	<i>Candida albicans</i>	ATCC 90028
pleśnie	<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 9142
	<i>Aspergillus ochraceus</i>	KKP 124
	<i>Aspergillus wentii</i>	LOCK
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	ATCC 10136
	<i>Penicillium expansum</i>	KKP 774
	<i>Fusarium solani</i>	ATCC 36031
	<i>Rhizopus stolonifer</i>	ATCC 14037
	<i>Botrytis cinerea</i>	IOR 2110
	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	ATCC 16022
	<i>Alternaria solani</i>	ATCC 16022
	<i>Mucor mucedo</i>	ATCC 38694
	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	DSM 62146

Przegląd najważniejszych podłoży i odczynników chemicznych:

- Podłoże bakteriologiczne Mueller-Hinton do wyznaczania wartości MIC i MBC u szczepów bakteryjnych;
- Bulion wzbogacony do hodowli i namnażania mikroorganizmów;
- Podłoże mikrobiologiczne YPG do hodowli i oznaczania liczebności drożdży i pleśni;
- Podłoże diagnostyczne RPMI 1640 do oznaczania oporności grzybów z materiału biologicznego;
- Podłoże mikrobiologiczne Sabouranda do izolacji i hodowli grzybów, służące do wyznaczania wartości MFC;
- Resazuryna – wskaźnik pH i redoks, odczynnik służył do wybarwiania komórek martwych i żywych;



Materiał i metodyka pracy -3

Analiza jakościowa – chemiczno-fizyczna próbek surowego propolisu:

- Opis miejsca pobrania, twardości, koloru, konsystencji próbek propolisu [Kasote i wsp. 2017];
- Charakterystyka mikroskopowa próbek propolisu [Sosa-Lopez i wsp. 2017];
- Określenie zawartości wody w próbkach propolisu [Feas i wsp. 2014];
- Określenie pH w próbkach EEP [Feas i wsp. 2014];
- Określenie rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych substancji w próbkach propolisu [Feas i wsp. 2014];
- Określenie ilości substancji rozpuszczalnych w 70% etanolu w próbkach propolisu;
- Określenie zawartości wosku w próbkach propolisu [Hogendoorn i wsp. 2013];
- Oznaczenie gęstości EEP;
- Oznaczenie całkowitej zawartości polifenoli i flawonoidów w EEP [Al-Ani i wsp. 2018];

Ekspertyza przeciwdrobnoustrojowa [CLSI M07-A9, CLSI M27-A3, CLSI M38-A2, Jorgensen i Ferraro 2009]:

- Oznaczanie minimalnego stężenia hamującego (MIC);
- Oznaczanie minimalnego stężenia bakteriobójczego (MBC) i grzybobójczego (MFC) EEP (32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5 mg/cm³) metodą mikrorozcieńczeń;
- Oznaczanie liczby drobnoustrojów w zależności od czasu działania EEP włoskiego [Al-Ani i wsp. 2018];



Fot. 2 96-dółkowa płytką do wyznaczania MIC, fot. Piotr Nowotnik



Omówienie i dyskusja wyników -1

Nazwa szczepu	EEP włoski		EEP angielski		EEP polski	
	[mg/cm ³]					
Bakterie Gram-dodatnie	MIC	MBC/MFC	MIC	MBC/MFC	MIC	MBC/MFC
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	4	>32	2	32	4	>32
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	8	>32	8	32	8	32
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	4	>32	2	>32	1	>32
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	4	>32	2	>32	2	>32
<i>Listeria monocytogenes</i> PZH-NIZP	2	>32	4	>32	8	32
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	4	16	4	8	4	8
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	2	>32	4	>32	8	32
Bakterie Gram-ujemne						
<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076	32	>32	32	>32	32	>32
<i>Shigella sonnei</i> PZH-NIZP „S”	8	32	8	32	8	32
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	4	>32	16	>32	16	>32
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	4	>32	8	>32	8	32
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	8	>32	16	32	16	>32
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 700728	16	32	16	>32	32	>32
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659	8	8	8	16	16	16
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	2	4	2	16	4	32
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	32	>32	32	>32	32	32
Drożdże						
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	1	2	2	4	4	4
<i>Candida krusei</i> ATCC 14243	1	4	2	8	2	16
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	1	1	2	8	8	32
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> ATCC 66034	1	2	2	8	4	32

Tabela 4. Wartości MIC, MBC, MFC w EEP



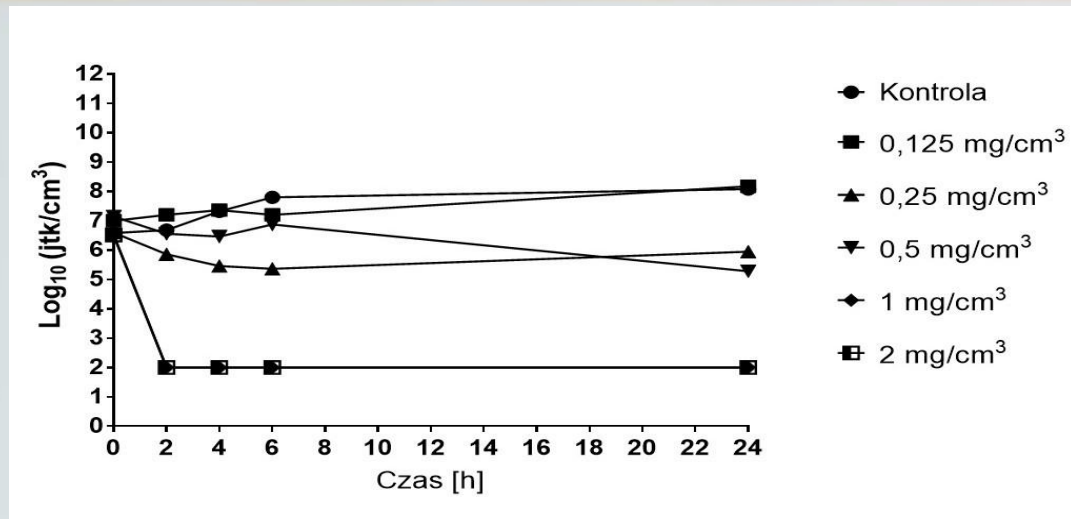
Omówienie i dyskusja wyników -2

Tabela 5. Wartości MIC i MFC w EEP

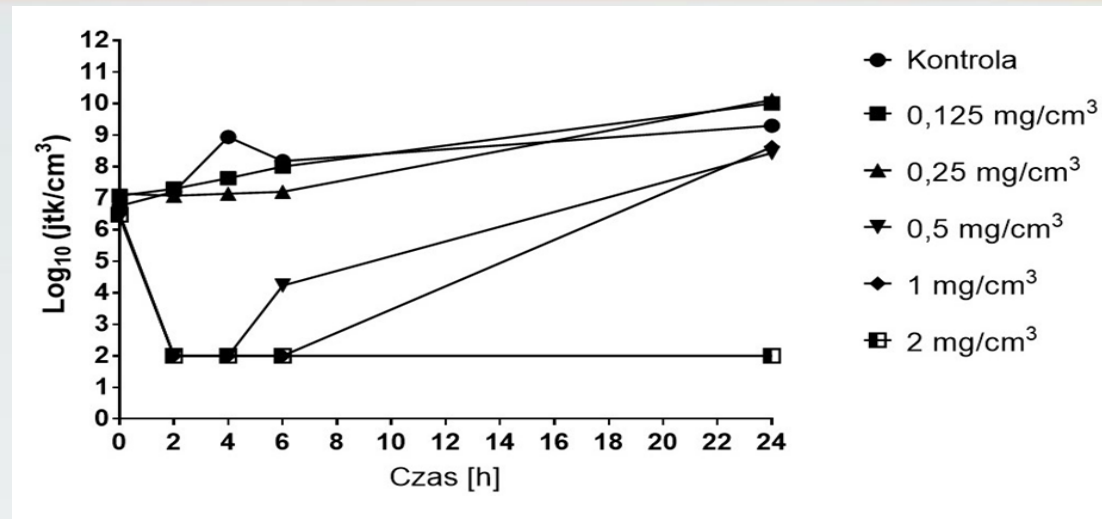
Nazwa szczepu	EEP włoski		EEP angielski		EEP polski	
	[mg/cm ³]					
	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 9142	1	1	2	2	4	8
<i>Aspergillus ochraceus</i> KKP 124	2	2	4	4	8	8
<i>Aspergillus wenti</i> LOCK	16	>32	32	>32	>32	>32
<i>Penicillium chrysogenum</i> ATCC 10136	4	8	4	8	8	32
<i>Penicillium expansum</i> KKP 774	2	2	4	4	8	8
<i>Fusarium solani</i> ATCC 36031	2	2	4	8	16	16
<i>Rhizopus stolonifer</i> ATCC 14037	1	4	2	8	1	16
<i>Botrytis cinerea</i> IOR 2110	1	2	2	2	2	2
<i>Cladosporium cladosporoides</i> ATCC 16022	1	2	4	4	4	8
<i>Alternaria solani</i> ATCC 16022	2	2	4	4	2	2
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> DSM 62146	1	1	1	1	2	2



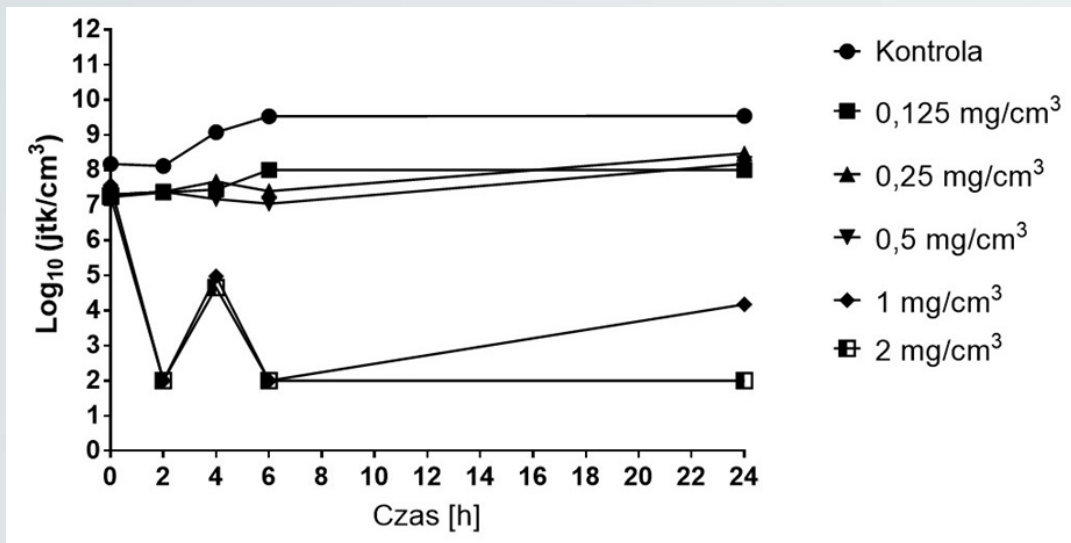
Omówienie i dyskusja wyników -3



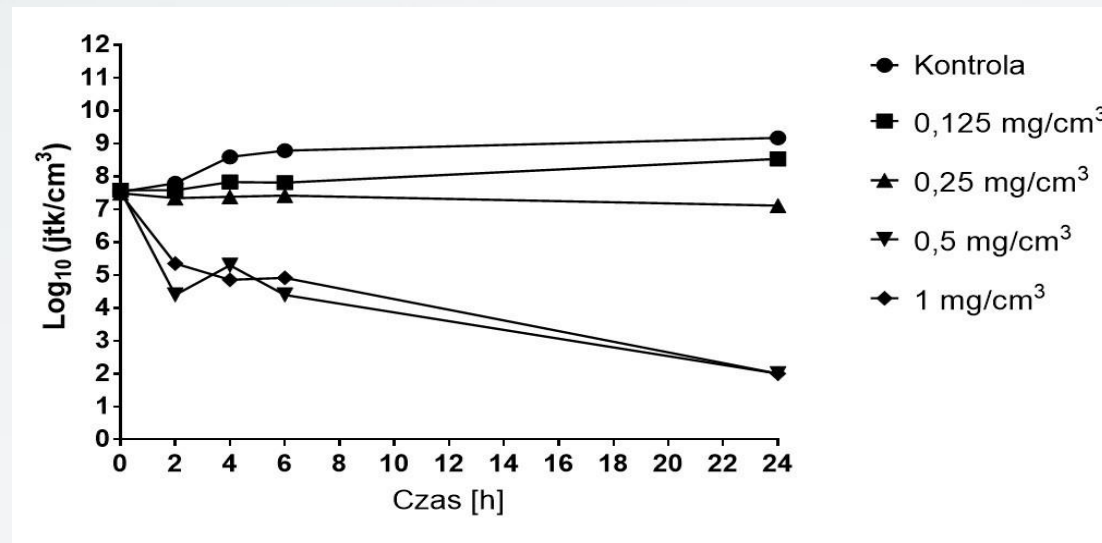
Rysunek 3. Krzywa zabicia określająca zależność pomiędzy stężeniem EEP a czasem jego oddziaływania na żywotność komórek bakteryjnych *Staphylococcus aureus* ATCC 25923



Rysunek 4. Krzywa zabicia określająca zależność pomiędzy stężeniem EEP a czasem jego oddziaływania na żywotność komórek bakteryjnych *Bacillus cereus* ATCC 11778

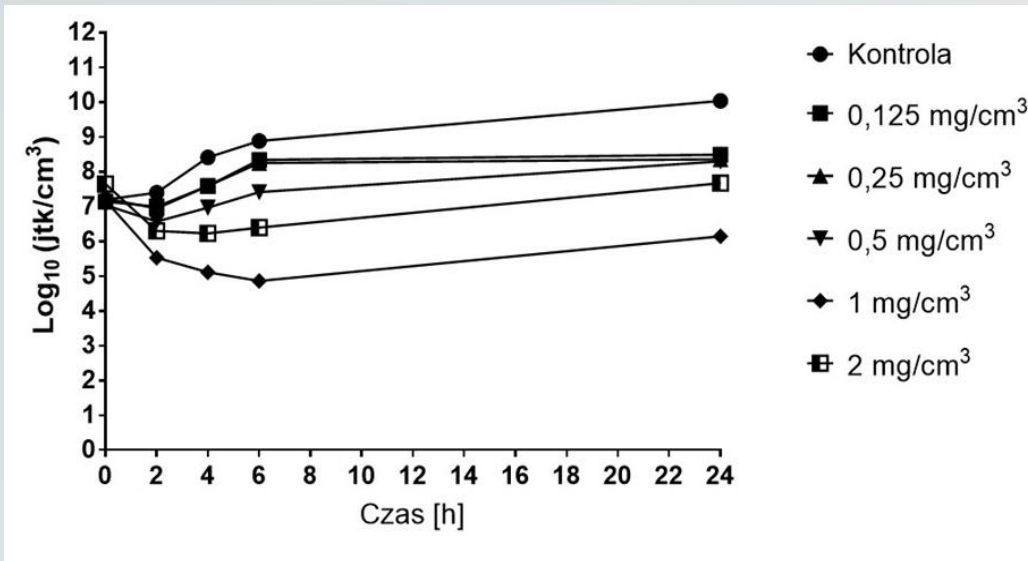


Rysunek 5. Krzywa zabicia określająca zależność pomiędzy stężeniem EEP a czasem jego oddziaływania na żywotność komórek bakteryjnych *Listeria monocytogenes* ATCC 7644

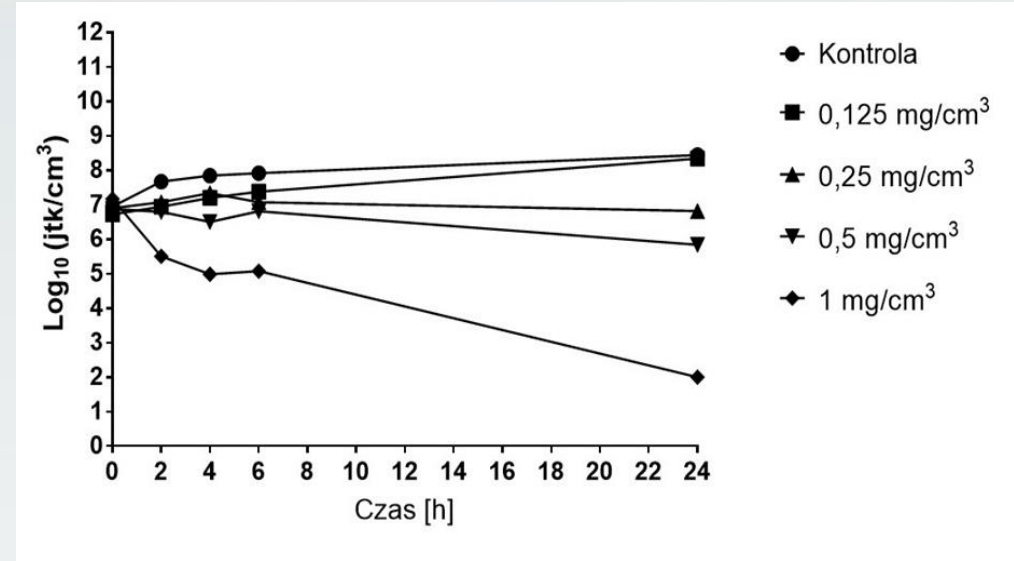


Rysunek 6. Krzywa zabicia określająca zależność pomiędzy stężeniem EEP a czasem jego oddziaływania na żywotność komórek bakteryjnych *Listeria innocua* ATCC 33090

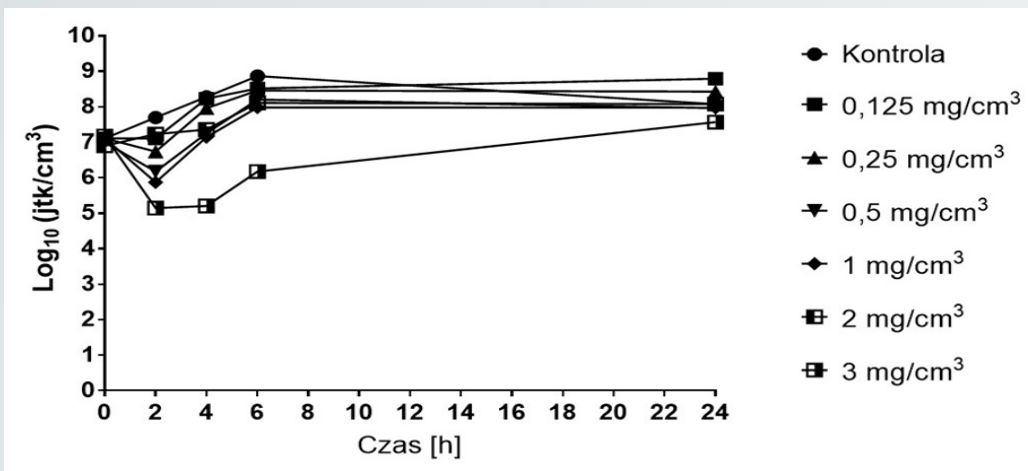
Omówienie i dyskusja wyników -4



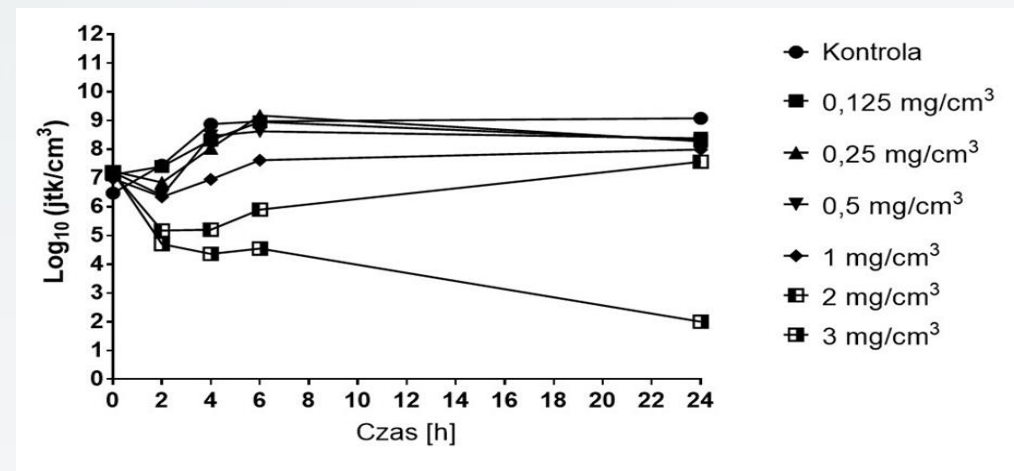
Rysunek 7. Krzywa zabicia określająca zależność pomiędzy stężeniem EEP a czasem jego oddziaływania na żywność komórek bakteryjnych *Salmonella Enteritidis* ATCC 13076



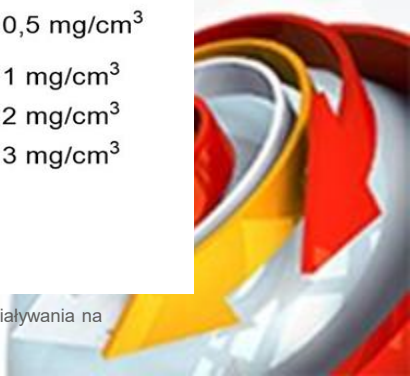
Rysunek 8. Krzywa zabicia określająca zależność pomiędzy stężeniem EEP a czasem jego oddziaływania na żywność komórek bakteryjnych *Shigella sonnei* PZH-NIZP "S"



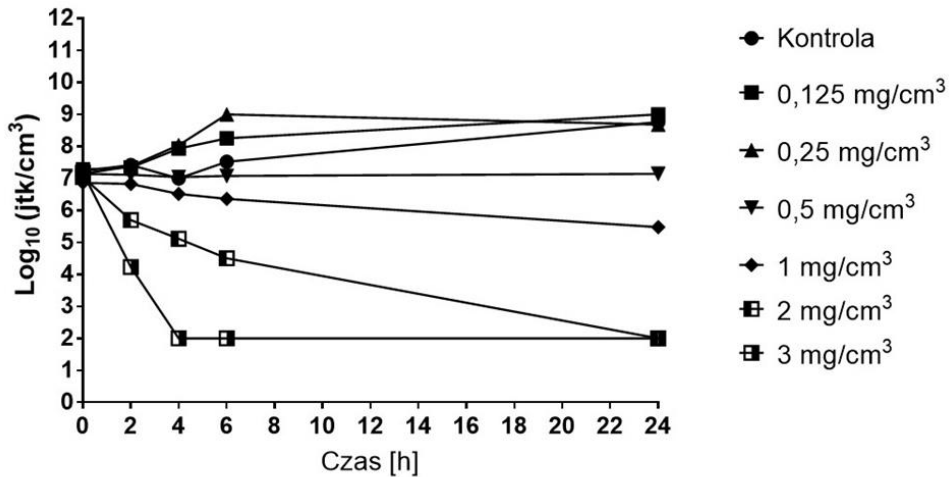
Rysunek 9. Krzywa zabicia określająca zależność pomiędzy stężeniem EEP a czasem jego oddziaływania na żywność komórek bakteryjnych *Escherichia coli* ATCC 25922



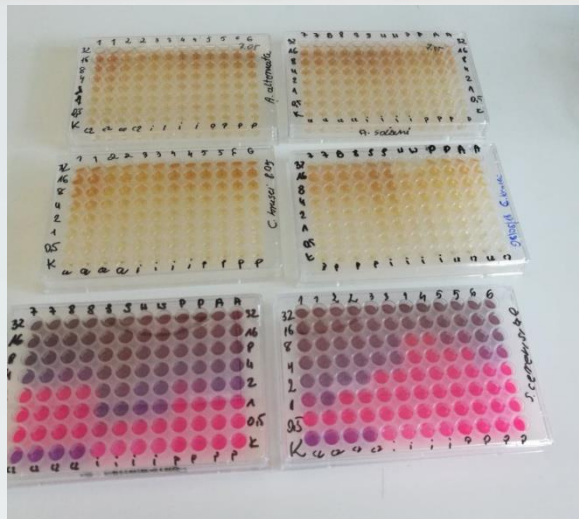
Rysunek 10. Krzywa zabicia określająca zależność pomiędzy stężeniem EEP a czasem jego oddziaływania na żywność komórek bakteryjnych *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 700728



Omówienie i dyskusja wyników -5



Rysunek 11. Krzywa zabicia określająca zależność pomiędzy stężeniem EEP a czasem jego oddziaływania na żywotność komórek bakteryjnych *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853



Fot. 3 Płytki do określenia MIC, fot. Piotr Nowotnik



Fot. 4 Posiew drobnoustrojów do MBC/MFC, fot. Piotr Nowotnik

Tabela 6. Analiza całkowitej zawartości polifenoli oraz flawonoidów w badanych EEP

EEP	polski		włoski		angielski	
	mg CAE/g EEP	mg QE/g EEP	mg CAE/g EEP	mg QE/g EEP	mg CAE/g EEP	mg QE/g EEP
	Polifenole	Flawonoidy	Polifenole	Flawonoidy	Polifenole	Flawonoidy
Próba I	102,71	4,15	130,60	6,51	124,49	6,19
Próba II	101,93	3,77	132,16	6,07	129,60	6,28
Próba III	116,16	3,85	133,82	5,93	120,38	5,93
Średnia ± SD	106,93 ± 8,00	3,93 ± 0,20	132,19 ± 1,61	6,17 ± 0,30	124,82 ± 4,62	6,14 ± 0,18



Podsumowanie i wnioski -1

- ❖ Charakterystyka próbek surowego propolisu pochodzących z Polski, UK i Włoch **wykazała różnice** pomiędzy zawartościami: wody, suchej substancji, substancji nierozpuszczalnych oraz różnice w wartościach pH i gęstości EEP, gdzie największą zawartością tych związków, wyższym pH i większą gęstością odznaczał się propolis włoski;
- ❖ W warunkach *in vitro* wszystkie badane EEP **wykazały** działanie bakteriobójcze, bakteriostatyczne, grzybobójcze i fungistatyczne;



Podsumowanie i wnioski -2

- ❖ **Istnieje zależność** właściwości przeciwdrobnoustrojowych ekstraktów propolisu od pochodzenia geograficznego próbek propolisu – stwierdzono większą aktywność przeciwdrobnoustrojową ekstraktu włoskiego (południowa Europa) niż w przypadku próbek pochodzących z północnej (UK) czy środkowej (Polska) Europy;
- ❖ **Wykazano**, że stężenie 1 mg/cm³ oraz 2 mg/cm³ EEP włoskiego po 2 godzinach ekspozycji zmniejszyło liczbę wszystkich badanych bakterii Gram-dodatnich (za wyjątkiem *Listeria innocua*) o 5 cykli logarytmicznych;
- ❖ **Ustalono**, że bakteriobójcze działanie EEP włoskiego w stosunku do wszystkich badanych bakterii Gram-ujemnych nastąpiło w zakresie stężeń 1-3 mg/cm³ między 2 a 6 godziną działania (spadek liczby komórek bakteryjnych o 2 cykle logarytmiczne i o 5 cykli logarytmicznych w przypadku pałeczek ropy błękitnej);





<https://www.linkedin.com/in/piotr-nowotnik-23336216a/>

Dziękuję
za uwagę!

@Piotr_Nowotnik