

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Simona ALIČ KAVČIČ

**PROTIMIKROBNO DELOVANJE ETANOLNIH
EKSTRAKTOV PROPOLISA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Simona ALIČ KAVČIČ

**PROTIMIKROBNO DELOVANJE ETANOLNIH EKSTRAKTOV
PROPOLISA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ETHANOLIC EXTRACTS OF
PROPOLIS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo je zakjuček univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil, Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorico diplomskega dela imenovala izr. prof. dr. Barbaro Jeršek in za recenzentko izr. prof. dr. Heleno Abramovič.

Mentorica: izr. prof. dr. Barbara Jeršek

Recenzentka: izr. prof. dr. Helena Abramovič

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je diplomsko delo rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Simona Alič Kavčič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.24+579.26:638.135(043)=163.6
KG	propolis/rastlinski izvlečki/etanolni ekstrakti/protimikrobova učinkovitost/bakterije/plesni/kvasovke/minimalna inhibitorna koncentracija
AV	ALIČ KAVČIČ Simona
SA	JERŠEK, Barbara (mentorica)/ABRAMOVIČ, Helena (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2016
IN	PROTIMIKROBNO DELOVANJE ETANOLNIH EKSTRAKTOV PROPOLISA
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XII, 58 str., 12 preg., 15 sl., 8 pril., 71 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	V okviru diplomske naloge smo določili protimikrobovo delovanje etanolnih ekstraktov propolisa (FS70 – ekstrakcija s 70 % (v/v) EtOH, FS96 – ekstrakcija s 96 % (v/v) EtOH, OS70 – ostanek po ekstrakciji s 70 % (v/v) EtOH in OS96 – ostanek po ekstrakciji s 96 % (v/v) EtOH) slovenskega porekla na bakterije vrst <i>Staphylococcus aureus</i> ŽMJ346, <i>Staph. aureus</i> ŽMJ72, <i>Streptococcus pyogenes</i> ŽM494, <i>Bacillus cereus</i> ŽMJ164, <i>Enterococcus faecalis</i> ŽMJ90, <i>Listeria monocytogenes</i> ŽM58, <i>L. monocytogenes</i> ŽM70, <i>Escherichia coli</i> ŽM370, <i>E. coli</i> O157 ŽMJ128, <i>Salmonella</i> Typhimurium ŽM375 in <i>Salm.</i> Enteritidis ŽM138, na plesni vrst <i>Penicillium verrucosum</i> ŽMJ23, <i>Penicillium</i> sp. ŽM24, <i>Aspergillus flavus</i> ZIM F70 ter na kvasovke vrst <i>Candida intermedia</i> ŽMJ23 in <i>C. albicans</i> ŽMJ32. Protimikrobovo delovanje etanolnih ekstraktov propolisa in ostankov po ekstrakciji smo ovrednotili z določitvijo minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) za vsak mikroorganizem. Z etanolnim ekstraktom propolisa FS96 smo pri koncentraciji, ki je ustrezala vrednosti MIC, določili rastno krivuljo za bakterije vrst <i>Salm.</i> Enteritidis ŽM138 in <i>L. monocytogenes</i> ŽM70 in za plesni vrste <i>A. flavus</i> ZIM F70. Vsi preiskovani etanolni ekstrakti propolisa so pokazali protimikrobovi učinek. Protimikrobovo najučinkovitejša sta bila etanolna ekstrakta propolisa FS70 in FS96. Dokazali smo, da občutljivost na etanolne ekstrakte propolisa pada v zaporedju kvasovke (MIC $0,60\pm0,12$ mg/ml) > grampozitivne bakterije (MIC $0,89\pm0,99$ mg/ml) > gramnegativne bakterije (MIC $2,16\pm2,26$ mg/ml) > plesni (MIC $2,49\pm2,09$ mg/ml). Etanolne ekstrakte propolisa bi lahko zaradi njihovih protimikrobnih učinkovin potencialno uporabili tudi v živilski industriji kot naravne konzervanse.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
 DC UDC 579.24+579.26:638.135(043)=163.6
 CX propolis/plant extracts/ethanol extracts/antimicrobial activity/bacteria/mold/yeasts/minimal inhibitory concentration
 AU ALIČ KAVČIČ Simona
 AA JERŠEK Barbara (supervisor) / ABRAMOVIČ Helena (reviewer)
 PP SI – Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
 PY 2016
 TI ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ETHANOLIC EXTRACTS OF PROPOLIS
 DT Graduation thesis (University studies)
 NO XII, 58 p., 12 tab., 15 fig., 8 ann., 71 ref.
 LA sl
 AL sl/en
 AB Within the diploma thesis we determined the antimicrobial activity of ethanol extracts of propolis (FS70 – extraction with 70 % (v/v) EtOH, FS96 – extraction with 96 % (v/v) EtOH, OS70 – residue remaining after extraction with 70 % (v/v) EtOH and OS96 – residue remaining after extraction with 96 % (v/v) EtOH) of Slovenian origin on the following bacteria: *Staphylococcus aureus* ŽMJ346, *Staph. aureus* ŽMJ72, *Streptococcus pyogenes* ŽM494, *Bacillus cereus* ŽMJ164, *Enterococcus faecalis* ŽMJ90, *Listeria monocytogenes* ŽM58, *L. monocytogenes* ŽM70, *Escherichia coli* ŽM370, *E. coli* O157 ŽMJ128, *Salmonella Typhimurium* ŽM375 and *Salm. Enteritidis* ŽM138, on the molds: *Penicillium verrucosum* ŽMJ23, *Penicillium* sp. ŽM24, *Aspergillus flavus* ŽMJ7 and *Aspergillus flavus* ZIM F70 as well as on yeasts *Candida intermedia* ŽMJ23 and *C. albicans* ŽMJ32. Antimicrobial activity of ethanol extracts of propolis and residue reamaining after extraction were determined with minimal inhibitory concentration (MIC) for each microorganism. With the concentration of ethanol extract of propolis FS96, which corresponded to the MIC values, we finally determined the growth curves for *Salm. Enteritidis* ŽM138 and *L. monocytogenes* ŽM70 and *A. flavus* ZIM F70. All ethanol propolis extracts, used in the research, showed antimicrobial effect, ethanol extracts of propolis FS70 and FS96 proving the most effective. It was shown that the sensitivity of the ethanol extracts of propolis decreases in the following sequence: yeast (MIC 0.60 ± 0.12 mg/ml) > Gram-positive bacteria (MIC of 0.89 ± 0.99 mg/ml) > Gram-negative bacteria (MIC 2.16 ± 2.26 mg/ml) > mold (MIC of 2.49 ± 2.09 mg/ml). Due to their antimicrobial potential, the ethanol extracts of propolis could be used in the food industry as natural preservatives.

KAZALO VSEBINE

1 UVOD.....	1
1.1 NAMEN NALOGE	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV.....	3
2.1 PROPOLIS	3
2.1.1 Kemijska sestava propolisa	4
2.2 BIOLOŠKE AKTIVNOSTI PROPOLISA	8
2.2.1 Protibakterijska aktivnost propolisa.....	9
2.2.2 Protiglivna aktivnost propolisa.....	11
3 MATERIAL IN METODE.....	14
3.1 POTEK DELA.....	14
3.2 MATERIAL	15
3.2.1 Mikroorganizmi	15
3.2.2 Etanolni ekstrakti propolisa.....	15
3.2.3 Mikrobiološka gojišča.....	16
3.2.4 Druge kemikalije in dodatki	19
3.2.5 Laboratorijska oprema	19
3.3 METODE DELA	20
3.3.1 Revitalizacija in precepljanje bakterij	20
3.3.2 Priprava inokuluma bakterij za določitev protibakterijskega delovanja etanolnih ekstraktov propolisa.....	20
3.3.3 Revitalizacija in precepljanje plesni in kvasovk	21
3.3.4 Priprava inokuluma plesni in kvasovk za določitev protiglivnega delovanja etanolnih ekstraktov propolisa.....	21
3.3.5 Določanje števila mikrobnih celic v inokulumu	21
3.3.6 Metoda razredčevanja v tekočem gojišču MHB v mikrotitrski ploščici	23
3.3.6.1 Priprava delovnih raztopin etanolnih ekstraktov propolisa	23
3.3.6.2 Priprava bakterijskega inokuluma	23
3.3.6.3 Princip in izvedba metode	23
3.3.7 Metoda razredčevanja v tekočem gojišču MHB	26
3.3.7.1 Priprava delovnih koncentracij etanolnega ekstrakta propolisa	26
3.3.7.2 Priprava bakterijskega inokuluma	26
3.3.7.3 Princip in izvedba metode	27
3.3.8 Metoda difuzije v trdnem gojišču z diskami.....	27
3.3.9 Metoda razredčevanja v tekočem gojišču RPMI-1640 v mikrotitrski ploščici.....	28
3.3.9.1 Priprava delovnih raztopin etanolnih ekstraktov propolisa	28
3.3.9.3 Princip in izvedba metode	29
3.3.10 Rastna krivulja.....	31
3.1.11 Statistična obdelava rezultatov s testom ANOVA	31
4 REZULTATI Z RAZPRAVO.....	33
4.1 PROTIBAKTERIJSKA UČINKOVITOST ETANOLNIH EKSTRAKTOV PROPOLISA	33
4.1.1 Minimalna inhibitorna koncentracija	34
4.1.1.1 Metoda razredčevanja v mikrotitrski ploščici	34

4.1.1.2 Metoda razredčevanja v tekočem gojišču.....	37
4.1.2 Rastna krivulja.....	40
4.2 PROTIGLIVNA UČINKOVITOST ETANOLNIH EKSTRAKTOV PROPOLISA 42	
4.2.1 Protiglivna aktivnost, določena z metodo difuzije v trdnem gojišču z diski	43
4.2.2 Minimalna inhibitorna koncentracija	44
4.2.3 Rastna krivulja.....	49
5 SKLEPI.....	50
6 POVZETEK	51
7 VIRI	53
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Razvrstitev fenolnih spojin (Abram, 2000)	5
Preglednica 2: Vrste propolisa, razvrščene glede na različno geografsko poreklo (Sforcin in Bankova, 2011).....	5
Preglednica 3: Fenolne spojine etanolnega ekstrakta propolisa (FS96) slovenskega porekla, ki izvira iz Dolenjske regije, letnik 2008, določene z LC-MS (Mavri in sod., 2012).....	7
Preglednica 4: Minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) ekstrakta propolisa in natrijevega benzoata v sadnih sokovih in v gojišču RPMI-1640 (Koc in sod., 2007)..	12
Preglednica 5: Izbrani mikroorganizmi za določitev protimikrobnega delovanja propolisa.....	15
Preglednica 6: Etanolni ekstrakti propolisa.....	16
Preglednica 7: Laboratorijska oprema.....	19
Preglednica 8: Negativne (NK) in pozitivne kontrole (PK) pri metodi razredčevanja v mikrotitrski ploščici za določitev vrednosti MIC etanolnih ekstraktov propolisa za bakterije.....	25
Preglednica 9: Negativne (NK) in pozitivne (PK) kontrole pri metodi razredčevanja v mikrotitrski ploščici za določitev vrednosti MIC etanolnih ekstraktov propolisa za plesni in kvasovke.....	31
Preglednica 10: Vrednosti MIC etanolnih ekstraktov in ostankov ekstrakta propolisa, določene z metodo razredčevanja v mikrotitrski ploščici v gojišču MHB za različne vrste bakterij	36
Preglednica 11: Vrednosti MIC etanolnih ekstraktov propolisa in ostankov ekstrakta propolisa, določene z metodo razredčevanja v gojišču MHB za različne vrste bakterij	38
Preglednica 12: Vrednosti MIC etanolnih ekstraktov propolisa in ostankov ekstrakta propolisa, določene z metodo razredčevanja v mikrotitrski ploščici v gojišču RPMI-1640 za različne vrste plesni in kvasovk	46

KAZALO SLIK

Slika 1: Propolis (Propoli, 2016)	3
Slika 2: Shema določanja protimikrobnega učinka etanolnih ekstraktov propolisa.....	14
Slika 3: Primer priprave mikrotitrsko ploščice za določanje protimikrobnega učinka pri bakterijah.....	24
Slika 4: Shema določitve protiglivne aktivnosti etanolnih ekstraktov propolisa z metodo difuzije v trdnem gojišču z diskami	27
Slika 5: Primer priprave mikrotitrsko ploščice za določanje protiglivnega učinka pri kvasovkah in plesnih.....	29
Slika 6: Primer vrednotenja rezultatov pri metodi razredčevanja v mikrotitrski ploščici v gojišču MHB z raztopino TTC	35
Slika 7: Vrednosti MIC etanolnih ekstraktov propolisa in ostankov ekstrakta propolisa za grampozitivne in gramnegativne bakterije, določene z metodo razredčevanja v mikrotitrski ploščici z raztopino TTC in z raztopino resazurin	37
Slika 8: Vrednosti MIC etanolnih ekstraktov propolisa za grampozitivne in gramnegativne bakterije, določene z metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB	39
Slika 9: Rast bakterij seva <i>Salm. Enteritidis</i> ŽM138 v tekočem gojišču MHB z etanolnim ekstraktom propolisa FS96 (koncentracija ekstrakta v gojišču 1,17 mg/ml).....	41
Slika 10: Rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> ŽM70 v tekočem gojišču MHB z etanolnim ekstraktom propolisa FS96 (koncentracija ekstrakta v gojišču 1,17 mg/ml).....	42
Slika 11: Primer rezultatov pri metodi difuzije v trdnem gojišču sladni ekstrakt pri kvasovkah vrste <i>C. intermedia</i> ŽMJ23	43
Slika 12: Primer rezultatov pri metodi difuzije v trdnem gojišču sladni ekstrakt pri kvasovkah vrste <i>C. albicans</i> ŽMJ32	44
Slika 13: Vrednosti MIC etanolnih ekstraktov propolisa za plesni in kvasovke (2 dni), določene z metodo razredčevanja v mikrotitrski ploščici v gojišču RPMI-1640	47
Slika 14: Vrednosti MIC etanolnih ekstraktov propolisa za plesni, določene z metodo razredčevanja v mikrotitrski ploščici v gojišču RPMI-1640 po različnih časih inkubacije	48

Slika 15: Rast plesni vrste *A. flavus* ZIM F70 v tekočem gojišču RPMI-1640 z etanolnim ekstraktom propolisa FS96 (koncentracija ekstrakta v gojišču 1,82 mg/ml)..... 49

KAZALO PRILOG

Priloga A: Povprečne vrednosti MIC posameznih etanolnih ekstraktov propolisa za grampozitivne in gramnegativne bakterije, določene z metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB v mikrotitrski ploščici z raztopino TTC

Priloga B: Povprečne vrednosti MIC posameznih etanolnih ekstraktov propolisa za grampozitivne in gramnegativne bakterije, določene z metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB v mikrotitrski ploščici z raztopino resazurin

Priloga C: Povprečne vrednosti MIC etanolnih ekstraktov propolisa za grampozitivne in gramnegativne bakterije, določene z metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB v mikrotitrski ploščici z raztopino TTC in z raztopino resazurin

Priloga D: Povprečne vrednosti MIC posameznih etanolnih ekstraktov propolisa za grampozitivne in gramnegativne bakterije, določene z metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB

Priloga E: Povprečne vrednosti MIC etanolnih ekstraktov propolisa za grampozitivne in gramnegativne bakterije določene z metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB

Priloga F: Povprečne vrednosti MIC etanolnih ekstraktov propolisa za plesni in kvasovke, določene z metodo razredčevanja v tekočem gojišču RPMI-1640 v mikrotitrski ploščici z raztopino INT

Priloga G: Povprečne vrednosti MIC etanolnih ekstraktov propolisa za plesni in kvasovke, določene z metodo razredčevanja v tekočem gojišču RPMI-1640 v mikrotitrski ploščici z raztopino INT

Priloga H: Povprečne vrednosti MIC etanolnih ekstraktov propolisa za plesni inkubirane 2 in 8 dni, določene z metodo razredčevanja v tekočem gojišču RPMI-1640 v mikrotitrski ploščici z raztopino INT

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ALOA	selektivno gojišče za bakterije rodu <i>Listeria</i> (ang. Agar Listeria selon Ottaviani & Agosti)
ATCC	tipski sev zbirke mikroorganizmov (ang. American Type Culture Collection)
BP	selektivno gojišče BP (ang. Baird Parker Agar Base)
ΣC	vsota kolonij na vseh števnih ploščah
CAE	ekvivalent klorogenske kisline
CAPE	fenetilni ester kavne kisline
CBS	zbirka gliv (ang. Fungal biodiversity centre, Nizozemska)
cfu	kolonijska enota
dH ₂ O	destilirana voda
EMB	selektivno gojišče EMB (ang. Eosin Methylene Blue)
EtOH	etanol
FS70	etanolni ekstrakt propolisa pridobljen s 70 % EtOH (v/v)
FS96	etanolni ekstrakt propolisa pridobljen s 96 % EtOH (v/v)
IHM	Inštitut za higieno in mikrobiologijo, Wuerzburg, Nemčija
INT	2-p-iodofenil-3-p-nitrofenil-5-fentil tetrazolijev klorid
M	molarna koncentracija (mol/l)
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija
n MIC	n-kratna minimalna inhibitorna koncentracija (n: ½, 2)
MIC _{MTP}	minimalna inhibitorna koncentracija, določena z metodo razredčevanja v tekočem gojišču v mikrotitrski ploščici z raztopino TTC
MHB	tekoče gojišče Mueller Hinton
N	število mikroorganizmov (cfu/ml)
NK	negativna kontrola (gojišče in protimikrobeno sredstvo brez mikrobne kulture)
OS70	ostanek ekstrakta propolisa po ekstrakciji s 70 % EtOH (70 : 30 v/v)
OS96	ostanek ekstrakta propolisa po ekstrakciji s 96 % EtOH (96 : 4 v/v)
PK	pozitivna kontrola (gojišče in mikrobnna kultura, brez protimikrobnega sredstva)
RNA	ribonukleinska kislina
RPMI-1640	osnovno gojišče RPMI-1640 (ang. Roswell Park Memorial Institute)
SB	selektivno gojišče SB (ang. Slanetz-Bartley medium)
SD	standardna deviacija
TSA	gojišče triptični sojin agar
TSB	gojišče triptični sojin bujon
TTC	2,3,5-trifenil tetrazolijev klorid
v/v	ml/100 ml
WSBC	zbirka mikroorganizmov (ang. Weihenstephan <i>B. cereus</i> Culture Collection, Muenchen, Nemčija)
XLD	ksiloza lizin deoksiholatno gojišče
ZIM	Zbirka industrijskih mikroorganizmov na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete
ŽM	Mikrobiološka zbirka Laboratorija za živilsko mikrobiologijo na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete

ŽMJ

Mikrobiološka zbirka Laboratorija za živilsko mikrobiologijo na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete

1 UVOD

Zdravje je najvišja vrednota v življenju. Vzroki za številna nalezljiva in nenalezljiva kronična obolenja so pogosto v nezdravem življenjskem slogu. Po priporočilih Svetovne zdravstvene organizacije (WHO) je zdrava prehrana tisti del zdravega načina življenja, ki človeka krepi, preprečuje bolezni in vpliva na visoko delovno storilnost. Z znanjem in zavedanjem o pomenu zdravstveno ustrezne hrane primerne prehranske in gastronomiske kakovosti lahko tudi vsak posameznik veliko prispeva k zdravju in prehranski kulturi družbe (Suwa Stojanović, 2009).

Povpraševanje po naravnih in neoporečnih živilih temelji na zavračanju industrijskih izdelkov, ki vsebujejo sintetične aromatične snovi, barvila in konzervanse, ki povzročajo vse več alergijskih reakcij in celo neozdravljenih alergij (Jedlovčnik in sod., 2009). Kemijski konzervansi se v živilski industriji uporabljajo že veliko let za preprečitev kvarjenja živil, ki ga lahko povzročajo različni mikroorganizmi. Uporabljajo se kemijski konzervansi, kot sta natrijev benzoat in kalijev sorbat, ki sta priznana kot varna konzervansa (Fleet, 1992; Erkmen in sod., 2008).

Propolis je pridobil svojo vrednost v živilski industriji kot naraven konzervans in kot bioaktivna sestavina v živilskih izdelkih in napitkih ter v biofarmaciji v kozmetičnih izdelkih (Osés in sod., 2016). Varni vnos propolisa za človeka je 1,4 mg/kg telesne teže na dan (Burdock, 1998). Na trgu so že živila, ki v kombinaciji z medom vsebujejo 3 % propolisa, a vedeti moramo, da visoka vsebnost fenolnih spojin v propolisu povzroča okus grenkobe, trpkosti in zapozneli priokus, ki ga pusti v kombinaciji z drugimi živili (Osés in sod., 2016). V živilski industriji se uporablja propolis tudi kot kemijski konzervans v mesnih izdelkih, v izdelkih z daljšo obstojnostjo in v zmrznenih izdelkih (Netíková in sod., 2013).

V diplomske nalogi smo obravnavali protimikrobeno učinkovitost etanolnih ekstraktov propolisa slovenskega porekla. Protimikrobeno aktivnost smo določili za izbrane grampozitivne in gramnegativne bakterije, plesni in kvasovke, ki so lahko povzročiteljice obolenj ali zastrupitev.

1.1 NAMEN NALOGE

Glavni namen diplomskega dela je bila določitev protimikrobnega delovanja različnih etanolnih ekstraktov propolisa. Protimikrobeno delovanje etanolnih ekstraktov propolisa smo določali za bakterije, plesni in kvasovke. Določili smo tudi, kakšen učinek ima izbran etanolni ekstrakt propolisa na rast bakterij vrst *Salm. Enteritidis ŽM138* in *L. monocytogenes ŽM70* ter plesni vrste *A. flavus* ZIM F70.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Pričakovali smo, da bodo imeli etanolni ekstrakti propolisa:

- protibakterijski učinek na grampozitivne in gramnegativne bakterije,
- večji protibakterijski učinek na grampozitivne kot na gramnegativne bakterije,
- protiglivni učinek,
- protimikrobna učinkovitost etanolnih ekstraktov propolisa bo padla od grampozitivnih in gramnegativnih bakterij, kvasovk do plesni,
- različen protimikroben učinek glede na sestavo ekstrakta,
- različne vrednosti MIC (minimalna inhibitorna koncentracija) glede na metodo določanja vrednosti MIC.

2 PREGLED OBJAV

2.1 PROPOLIS

Že od nekdaj je veljalo prepričanje, da so čebele svete živali in božje poslanke, kajti že od nekdaj so tesno povezane s človekom in njegovim življenjem. Pomembne vloge ne igrajo samo pri oprševanju, ampak tudi pri pridobivanju raznovrstnih produktov, kot so med, matični mleček, propolis, vosek (Božnar, 2002).

Čebelji pridelek propolis je v zadnjih treh desetletjih dobil veliko veljavo v strokovni javnosti in široki uporabi. Propolis je sijoča, lepljiva smolnata snov od svetlo rumene, rdeče, rjave do temno rjave barve, včasih je tudi zelenkastega odtenka (slika 1). Aroma je prijetna, diši po rastlinskih popkih, medu, vosku in smoli. V ustih okus propolisa zagreni. Barva, vonj in kemijske lastnosti propolisa so odvisne predvsem od vrste rastlin, ki so v dosegu čebel (Pušnik, 2016).



Slika 1: Propolis (Propoli, 2016)

Propolis je sestavljen iz različnih rastlinskih smol, ki jih nabirajo le posamezne čebele, ne mlajše od 15 dni. Smole nabirajo na smolnatih popkih različnih dreves, kot so topol, breza, vrba, divji kostanj, brest, hrast, bor in jelša. Čebela s tipalnicami odkrije smolo in jo delček prime s čeljustmi. Košček smole najprej gnete s prednjimi nožicami ter ji dodaja izločke žlez, obogatene z encimi, nato nastalo snov predene iz sprednjih nožic v koška za cvetni prah na zadnjih nožicah. Z napolnjenimi koški se vrne v panj, kjer se s precejšnjim trudom znebi svojega tovora. V panju tovor prevzamejo druge čebele, ki mu dodajo še vosek, da snov postane lepljivejša.

Čebele nabirajo smole pozno poleti in jeseni med 10. in 16. uro, ko se temperatura dvigne na najmanj 20 °C, saj je pri tej temperaturi smola lepljiva in se lažje gnete. Pozno poleti dobimo iz panja 100–150 g propolisa na čebeljo družino. Različne vrste čebel zberejo različno količino propolisa. Karpatska čebela ga zbere tudi več kot 250 g na čebeljo družino. Poleg vrste čebel vplivajo na donos propolisa tudi klimatske razmere, lega čebelnjaka in rastlinje v okolini čebelnjaka. Umetno propolisa ni mogoče izdelati (Pedrotti, 2003; Jedlovčnik in sod., 2009; Pušnik, 2016).

V življenju čebelje družine igra propolis pomembno zaščitno vlogo. Čebele ga uporabljajo kot gradbeno in dezinfekcijsko snov, s katero čebele razkužujejo in polirajo satne celice in utrjujejo satje. S propolisom si zadelajo manjše razpoke, od tod ime zadelavina, in zmanjšujejo odprtine pred zimskim vetrom in morebitnimi nepovabljenimi gosti v panji. Ob prihodu sovražnika v panji, ga čebele s piki ubijejo, nato balzamirajo, da ga obvarujejo pred gnitjem (Pedrotti, 2003; Pušnik 2016).

Propolis lahko pridobivamo priložnostno ali načrtno. Priložnostno se pridobiva ob hladnejših jesenskih dneh ob čiščenju panja oziroma njegovih delov. Tako zbrani propolis je uporaben v tehnične namene za razne premaze, saj vsebuje različne primesi lesa, mrtve čebele in lahko tudi kovinske delce. Pri načrtnem pridobivanju propolisa uporabimo rešetke iz umetne mase, katerih odprtine so manjše kot 5 mm. Najlažje zberemo propolis iz rešetk tako, da prvotno rešetke s propolisom zamrznemo in nato z zvijanjem rešetk odstranimo z njih propolis. Tako pridobljen propolis je primeren za izdelavo različnih izdelkov, kot so tinkture in kreme (Meglič, 2004; Sforcin in Bankova, 2011).

2.1.1 Kemijska sestava propolisa

Propolis je zelo kompleksen, saj vsebuje več kot 500 spojin (Huang in sod., 2014). Na splošno je kemijska sestava propolisa naslednja: rastlinske smole (50 %), voski (30 %), eterična olja (10 %), cvetni prah (5 %) ter ostale organske snovi (5 %) (Mavri in sod., 2012; Kurek-Górecka in sod., 2014). Propolis je tudi bogat vir mineralov, kot so kalcij, magnezij, kalij, natrij, železo, cink, mangan in baker (Saeed in sod., 2016). Poleg mineralov vsebuje tudi vitamine skupine B, vitamin C, vitamin D, vitamin E ter provitamin A (Kurek-Górecka in sod., 2014). Kemijska sestava, fiziološke lastnosti, zdravilne lastnosti in sama kakovost propolisa so odvisne od geografskega porekla, vegetacije – vrste rastline in letnega časa nabiranja smol (Bankova, 2005; Kalogeropoulos in sod., 2009; Graikou in sod., 2016).

V rastlinskih smolah najdemo fenolne spojine, ki so definirane kot spojine, ki imajo najmanj en aromatski obroč, na katerega je vezana ena ali več hidroksilnih skupin (-OH). Fenolne spojine so sekundarni metaboliti rastlin, ki so pomembne pri rasti in reprodukciji rastlin, predstavljam pa tudi zaščito pred patogeni, insekti in ultravijoličnim sevanjem (Abramovič, 2011). Fenolne spojine lahko razdelimo v različne skupine glede na njihovo kemijsko strukturo, povezano z ogljikovimi hidrati, substituente v osnovni strukturi in stopnjo polimerizacije. Priporoča se uporaba razdelitve po številu C-atomov v molekuli (preglednica 1) (Abram, 2000).

Preglednica 1: Razvrstitev fenolnih spojin (Abram, 2000)

ŠT. C ATOMOV	OSNOVNI SKELET	SKUPINA
6	C ₆	Fenoli ali benzokinoni
7	C ₆ C ₁	Fenolne kisline
8	C ₆ C ₂	Fenilocetne kisline
9	C ₆ C ₃	Hidroksicimetne kisline, fenilpropeni, kumarini, izokumarini, kromoni
10	C ₆ C ₄	Naftokinoni
13	C ₆ C ₁ C ₆	Ksantoni
14	C ₆ C ₂ C ₆	Stilbeni, antrakinoni
15	C ₆ C ₃ C ₆	Flavonoidi
18	(C ₆ C ₃) ₂	Lignani, neolignani
30	(C ₆ C ₃ C ₆) ₂	Biflavonoidi
	(C ₆ C ₃) _n	Lignini
n	(C ₆) _n	Melanini
	(C ₆ C ₃ C ₆) _n	kondenzirani tanini

Legenda: n: ≥ 3

V zadnjih desetih letih je bilo veliko objav o biološki aktivnosti propolisa, a žal je veliko izmed teh objav nekoristnih, kljub temu da so potrdili »močno«, »izjemno«, »pomembno« biološko aktivnost propolisa. Razlog je v pomanjkanju podatkov o kemijski sestavi propolisa za lažje vrednotenje rezultatov. Zavedati se moramo, da je propolis naravna sestavina, ki nima stalne kemijske sestave in ga ni mogoče vključiti v sistem s kemijsko formulo. Zaradi geografskih razlik imajo vzorci propolisa različne kemijske sestavine. Vse več člankov združuje kemijsko sestavo propolisa z botaničnim izvorom in biološko aktivnostjo propolisa (Jedlovčnik in sod., 2009; Sforcin in Bankova, 2011). Poleg kemijske sestave propolisa je v objavah zaželena tudi vsebnost težkih kovin in pesticidov, saj bi lahko propolis uporabili kot indikator onesnaženosti okolja (Orsi in sod., 2006).

Poznamo več vrst propolisa, glede na geografsko poreklo propolisa (preglednica 2), a žal do sedaj še niso naredili svetovno priznane klasifikacije propolisa (Sforcin in Bankova, 2011).

Preglednica 2: Vrste propolisa, razvrščene glede na različno geografsko poreklo (Sforcin in Bankova, 2011)

VRSTA PROPOLISA	POREKLO	ZNAČILNA SESTAVINA
Topolov	Evropa	
	Severna Amerika	Flavoni
	netropska Azija	flavanoni
	Nova Zelandija	hidroksicimetne kisline in njihovi estri
Zelen propolis	Brazilija	prenilirane <i>p</i> -kumarne kisline diterpenske kisline
Brezov	Rusija	flavonoli* flavoni*

se nadaljuje...

Nadaljevanje preglednice 2: Vrste propolisa, razvrščene glede na različno geografsko poreklo (Sforcin in Bankova, 2011)

VRSTA PROPOLISA	POREKLO	ZNAČILNA SESTAVINA
Rdeči propolis	Kuba	
	Brazilija	izoflavonoide (izoflavane in pterokarpane)
	Mehika	
Mederanski	Grčija	
	Sicilija	diterpeni
	Kreta	
	Malta	
Clusia	Kuba	poliprenilirani benzofenoni
	Venezuela	
Pacifiški	Okinava	
	Tajvan	C-prenil-flavanoni
	Indonezija	

Legenda: * različni kot pri topolovi vrsti propolisa

Propolis vsebuje različne fenolne kisline in flavonoide. V brazilskem propolisu so Salomão in sod. (2004) identificirali predvsem fenolne kisline (cimetno kislino in njene derivate, ferulno in kavno kislino), dietil metil sukcinat, isobutilkuinolin, geranil acetat, mentol, amirizin in samo en flavonoid, pinostrobin (1 %).

V bolgarskem propolisu so za razliko od brazilskega propolisa prevladovali ravno flavonoidi (42 %), kot so pinostrobin, pinocembrin, hrizin in serija pinobanksinov. Fenolnih kislin, kot je ferulna kislina, izoferulična kislina, kavna kislina in njenih estrov je vseboval 12 % (Salomão in sod., 2004).

Propolis, katerega geografsko poreklo zajema Grčijo, grške otoke, Hrvaško, Ciper in Alžirijo, imenujemo mediteranska vrsta propolisa. Značilne fenolne spojine za mediteransko vrsto propolisa so diterpeni, kar so tudi potrdili Bankova in sod. (2002), Kartal in sod. (2002), Popova in sod. (2011) in Velikova in sod. (2000). Značilno diterpensko noto propolisu, ki izvira iz Malte, Sicilije, Turčije, Alžirije in iz različnih regij v Grčiji (Melliou in Chinou, 2004; Popova in sod., 2009, 2010), dajo smole cipres vrste *Cupressus sempervirens* (Popova in sod., 2012). Poleg diterpenov vsebuje mediteranska vrsta propolisa flavonoide in sladkorje v višjih koncentracijah in majhno vsebnost estrov fenolnih kislin (Graikou in sod., 2016).

Med fenolnimi spojinami, ki so jih identificirali v slovenskem propolisu, so najznačilnejše kavna kislina, p-kumarna, ferulna kislina in derivati kavne kisline. Poleg fenolnih kislin so visoko zastopani flavonoidi pinobanskin-3-O-acetat, pinocembrin in hrizin, ki so obenem tudi količinsko najbolj zastopana skupina (preglednica 3) (Mavri in sod., 2012).

Preglednica 3: Fenolne spojine etanolnega ekstrakta propolisa (FS96) slovenskega porekla, ki izvira iz Dolenjske regije, letnik 2008, določene z LC-MS (Mavri in sod., 2012)

FENOLNA SPOJINA	t _R ^a (min)	96 % EIP ^b (µg/ml)
galna kislina	4,13	0,49
klorogenska kislina	12,45	v sledeh
kavna kislina	15,7	359,67
p-kumarna kislina	21,61	465,26
ferulna kislina	23,16	225,56
rutin	24,1	1,17
elaginska kislina	24,69	10,34
miricetin	29,18	8,93
luteolin	33,84	53,51
kvercetin	34,07	96,72
formononetin ^c	35,09	11,98
benzilni ester kavne kisline ^c	36,45	148,12
pinobanksin ^c	36,73	292,28
apigenin	37,98	151,61
kamferol	38,64	161,15
izoprenilni ester kavne kisline ^c	42,24	448,12
izoprenilni ester kavne kisline ^c	42,83	571,65
CAPE	44,98	501,32
pinobanksin-3-O-acetat ^c	45,15	292,19
kamferid ^c	45,5	104,65
krizin	45,55	233,37
pinocembrin	45,88	226,57
galangin	46,8	188,17
cinamilni ester kavne kisline ^c	47,92	342,13

^a retencijski čas

^b propolis, ekstrahiran z zmesjo etanol / voda (96 : 4 v/v)

^c identifikacija na podlagi MS/MS podatkov

Rdeča vrsta propolisa je ime dobila po intenzivno rdeči barvi propolisa. Izvira iz območja, kjer rastejo mangrove. Njegova kemijska sestava je bogata s flavonoidi (pinocembrin, luteolin, rutin, kvercetin, formononetin) in ferulno kislino (Neves in sod., 2016). Mendonca in sod. (2015) so dokazali, da je doprinos rdečega propolisa brazilskega porekla v deževnih mesecih (od aprila do septembra) manjši 45–92 g, kot v sušnem obdobju (od oktobra do marca) 95–109 g. Formononetin se uporablja kot »kemijski marker« za rdeči propolis (Cuesta-Rubio in sod., 2007) in je bil identificiran samo v vzorcih brazilskega porekla (Cabral in sod., 2009) in v vzorcih propolisa iz Kube (Cuesta-Rubio in sod., 2007). Novak in sod. (2014) so obogatili redeči propolis s formononetinom in ga naredili učinkovitejšega v citotoksični aktivnosti kot originalni rdeči propolis brez obogativitve s formononetinom.

2.2 BIOLOŠKE AKTIVNOSTI PROPOLISA

Pozitivni učinki propolisa na človekovo zdravje so znani že iz antičnih časov (Bankova, 2005). V zadnjih treh desetletjih pa je propolis zelo popularen v farmacevtski, kemijski in živilski industriji. Biološka in farmakološka učinkovitost propolisa je odvisna od medsebojnega razmerja različnih substanc v propolisu in pridobivanja. Biološka aktivnost propolisa je povezana predvsem s farmakološko dejavnimi molekulami. Glavne bioaktivne spojine v propolisu so večinoma flavonoidi, fenolne kisline in njihovi estri, dokazano je bilo, da tudi terpenoidi (Castaldo in Capasso, 2002; Mendes da Silva in sod., 2006; Graikou in sod., 2016).

Uporaba propolisa v ljudski medicini je zelo raznolika, saj je spekter biološke aktivnosti propolisa zelo obsežen. Klinične študije o biološki dejavnosti propolisa so pokazale, da propolis spodbuja trofične (življenske) funkcije in tudi izboljša delovanje imunskega sistema. Propolis se uporablja tudi kot dodatek k živilom in napitkom za izboljšanje zdravja in preprečevanju bolezni (Saeed in sod, 2016). Uporaba propolisa je privredla do razvoja različnih prehranskih dopolnil, ki se uporabljajo kot naravna zdravila. V domači rabi lahko propolis uporabljamo kot alkoholno raztopino oziroma tinkturo propolisa za zdravljenje slabokrvnosti, pri obolenjih dihal in dihalnih poti, kot so angina, vnetje žrela in grla, nahod, vnetje obnosnih votlin in vnetje srednjega ušesa, pri vnetju dlesni in ustne votline ter pri zobobolu. Lahko pa uporabimo propolis tudi v obliki mazila pri različnih obolenjih kože, kot so rane, udarnine, opeklne, sončne opeklne, kuperoza, ozeblbine, razpoke na koži, ognojki, žulji in mnogih drugi zunanjih obolenjih. Znano je, da pospešuje epitelizacijo in celjenje ran, pomaga pri zdravljenju vnetij, deluje kot blag anestetik (Banskota in sod., 2001; Pedrotti, 2003; Jedlovčnik in sod., 2009; Pušnik, 2016).

V medicini je predmet raziskav tudi protirakava aktivnost propolisa, ki je bila dokazana na različnih obolenjih, kot so rak grla, rak na dojkah, rak na debelem črevesju, melanom, rak na prostatni in tudi tumor na možganih - glioblastoma. Inhibicija angiogeneze, metastaze rakavih celice je odvisna od fenetilnega estra kavne kisline (ang. caffeyc acid phenethyl ester – CAPE). Analize so pokazale, da je zdravljenje s CAPE zmanjšalo število celic glioma v fazi mitoze in proliferacije (Saeed in sod., 2016).

Propolis deluje protivirusno med drugim tudi na rastlinske viruse, zato ga uporabljajo pri ekološkem kmetovanju za različne pripravke, ki učinkovito preprečujejo ali zdravijo različne rastlinske bolezni (Shimizu in sod., 2008; Schnitzler in sod., 2010). Vendar niso vsi ekstrakti propolisa enako učinkoviti, kar so Shimizu in sod. (2008) tudi preizkusili. Organizmu so po okužbi z virusom influence dodali trinajst različnih ekstraktov propolisa, a so le širje preprečili nadaljnji razvoj bolezni. Učinkovitost ekstrakta propolisa proti virusom se poveča sorazmerno s povečanjem koncentracije ekstrakta propolisa (Shimizu in sod., 2008).

Antioksidativni učinek propolisa (Kalogeropoulos in sod., 2009; Kuraja, 2009; Mavri in sod., 2012) pripisujejo sestavinam CAPE, kavni kislini, kvercetinu, kampferolu, galanginu in estru cimetne kisline. Antioksidativna učinkovitost propolisa, ki je vseboval CAPE, je bila večja, kot učinkovitost propolisa brez CAPE. Izkazalo se je tudi, da je CAPE učinkovitejši antioksidant kot galangin (Sud'ina in sod., 1993). Na sestavo propolisa in posledično na njegovo antioksidativno učinkovitost vpliva tudi izbira ekstrakcijskega

topila. Ekstrakt, pripravljen z bolj polarnim topilom zmes etanol/voda (70:30 v/v), je v primerjavi z manj polarnim topilom zmes etanol/voda (96:4 v/v) pokazal boljšo redukcijsko sposobnost, večjo sposobnost lovljenja superoksidnega anionskega radikala in večjo učinkovitost pri zaviranju oksidacije linolne kisline, emulgirane v vodi. Etanolnemu ekstraktu propolisa zmes etanol/voda (70:30 v/v) slovenskega porekla so določili višjo redukcijsko sposobnost (68 ± 1 mg/ml) kot etanolnemu ekstraktu propolisa zmes etanol/voda (96:4 v/v), ki je znašala (65 ± 1 mg/ml) (Kuraja, 2009).

Ekstrakti propolisa lahko vsebujejo hidroksicimetne kisline in njihove estre, stilbene, flavonoide (flavonole, flavone, flavanone, dihidroflavanole, halkone), terpene, aromatične aldehyde in alkohole, maščobne kisline in β -steroid (Gardana in sod., 2007). Kljub mnogim komponentam v propolisu se predpostavlja, da so glavne bioaktivne sestavine v propolisu fenolne spojine, kot so hidroksicimetne kisline in njihovi estri ter flavonoidi (Castaldo in Capasso, 2002).

V svoji raziskavi so Salomão in sod. (2004) dokazali, da v evropskem propolisu pripomorejo k biološki aktivnosti predvsem prisotnost flavonoidov, fenolnih kislin in estrov. V brazilskem propolisu pa k biološki aktivnosti pripomorejo poleg fenolnih kislin in njihovih derivatov tudi amirizin, za katerega so potrebne še dodatne raziskave.

2.2.1 Protibakterijska aktivnost propolisa

Opaziti je znatno povečanje odpornosti patogenih bakterij proti antibiotikom. To je posledica čezmerne in nepravilne rabe antibiotikov, ki je privedla do razvoja več zelo odpornih sevov bakterij, kot so na primer MRSA (proti meticilinu odporne bakterije vrste *Staph. aureus*). Posledično se je povečalo zanimanje za naravne sestavine, ki bi imele inhibitoren učinek na mikroorganizme (Bankova in sod., 2000). Številna poročila o propolisu dokazujo širok spekter njegovega protibakterijskega delovanja (Kalogeropoulos in sod., 2009; Mavri in sod., 2012; Osés in sod., 2016; Graikou in sod., 2016). Kljub različni sestavi vsak propolis različnega geografskega porekla kaže protibakterijsko aktivnost. Protibakterijsko aktivnost propolisa pripisujemo predvsem sestavinam, kot so pinocembrin, galangin, pinobanksin, pinobanksin-3-acetat, parakumarična kislina, benzilni ester in estri kavne kisline (Mohammadzadeh in sod., 2007). Po do sedaj znanih rezultatih raziskav so si znanstveniki enotni, da je propolis manj učinkovit od specifičnih farmacevtskih antibiotikov in drugih zdravil, vendar manj toksičen in ne povzroča razvoja mikrobne odpornosti. Ugodna lastnost propolisa je tudi, da ne vpliva na porušenje ravnotežja črevesne mikrobiote, ki jo povzročajo antibiotiki. Protimikrobeno učinkovine propolisa se pri višjih temperaturah ne uničijo in njihove učinkovitosti se v treh, štirih letih ne zmanjšajo (Jedlovčnik in sod., 2009; Pušnik, 2016).

Saeed in sod. (2016) navajajo širok spekter grampozitivnih in gramnegativnih bakterij, na katere propolis deluje inhibitoryno.

- Grampozitivne bakterije: *Bacillus cereus*, *B. mesentericus*, *Corynebacterium spp.*, *Corynebacterium implexum*, *Diplococcus pneumoniae*, *Enterococcus spp.*, *Mycobacteria sp.*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Staph. aureus*, *Strep. critecus*, *Strep. epidermidis*, *Strep. faecalis*, *Strep. mutans*, *Strep. pyogenes*, *Strep. viridans* in *Strep. sobrinus*.

- Gramnegativne bakterije: *Branhamella catarrhalis*, *E. coli*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella ozaemae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salm. choleraesuis*, *Salm. imple*, *Salm. enteritidis*, *Salm. exneri*, *Salm. gallinarum*, *Salm. pullorum*, *Salm. paratyphi-A*, *Salm. paratyphi-b*, *typh*; *I Shigella dysenteriae*, *Shigella sonnei*.

Propolis ima večjo protibakterijsko učinkovitost na grampozitivne bakterije kot na gramnegativne bakterije (Sforcin in sod., 2002; Stepanović in sod., 2003; Mavri in sod., 2012). Mavri in sod. (2012) so pokazali tudi različno učinkovitost propolisa znotraj skupine gramnegativnih bakterij. Tako je propolis učinkovitejši proti bakterijam rodu *Campylobacter* (minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) vrednosti MIC 0,27–0,38 mg ekvivalenta klorogenske kislina (CAE/ml)) kot proti bakterijam vrste *E. coli* in rodu *Salmonella* (MIC 0,66–0,78 mg CAE/ml). Vrednosti MIC za grampozitivne bakterije so določili med 0,49–0,59 mg CAE/ml.

Posamezne fenolne spojine propolisa, kot so klorogenska kislina, kavna kislina, ferulna kislina, pinocembrin in kvercetin, niso imele protimikrobne aktivnosti pri bakterijah vrst *Strep. pyogenes* in *Salm. Enteritidis* (Mavri in sod., 2012). Propolis z večjo vsebnostjo flavonoida pinocembrina učinkovitejše zavira rast bakterij kot povečana vsebnost polifenolov v propolisu (Chaillou in Nazareno, 2009). Stepanović in sod. (2003) so v svoji raziskavi uporabili propolis v kombinaciji s protimikrobnimi učinkovinami, kot so ampicilin, ceftriakson, doksiciklin, amikacin, in dokazali, da v kombinaciji s propolisom povečajo protimikroben učinek na bakterije.

Kalogeropoulos in sod. (2009) so pokazali, da so bakterije vrst *Staph. aureus*, *B. cereus* in *L. monocytogenes* občutljivejše na propolis kot bakterije vrste *Staph. epidermidis*. Pokazali so tudi, da propolis ni imel inhibitornega učinka na različne mlečnokislinske bakterije, je pa inhibiral rast širšega spektra mikroorganizmov kot nizin, ki ga v Ameriki uporablajo kot protimikrobo snov v živilih. Vpliv na to biološko aktivnost propolisa pripisujejo terpenom v propolisu. Z uporabo naravne protimikrobne učinkovine, kot je propolis, bi lahko selektivno ustavili rast patogenih bakterij in hkrati omogočili rast starterskim kulturam, kot so na primer mlečnokislinske bakterije (Kalogeropoulos in sod., 2009).

Havsteen (1983) in Oksuz in sod. (2005) so izpostavili specifično sestavino propolisa, ki inhibira sintezo proteinov in bakterijsko rast s preprečitvijo celične delitve. Rezultat je bila tvorba pseudo-večcelične bakterijske oblike. Galangin in kavna kislina iz propolisa sta encimska inhibitorja odgovorna za inhibicijo bakterijske rasti in delitve celic. Zaradi aktivnih substanc lahko propolis poruši integriteto citoplazmatske membrane in celične stene, kar vodi v delno ali popolno lizo bakterijskih celic. Flavonoidi učinkujejo na membrano tako, da se poveča prepustnost membrane. Poleg delovanja propolisa na citoplazmatsko membrano in celično steno bakterijske celice je njegova protimikrobo aktivnost vezana tudi na delovanje v citoplazmi, kjer inhibira sintezo proteinov. Mehanizem zaporednih reakcij je kompleksen in odvisen od sinergističnega delovanja aktivnih substanc propolisa (Mavri in sod., 2012).

Raziskave so potrdile, da so bakterije vrste *Staph. aureus* naravno dovzetne za propolis (Krol in sod., 1993) in da propolis deluje sinergistično z antibiotiki. Oksuz in sod. (2005) so potrdili sinergističen učinek propolisa in ciprofloksacina pri zdravljenju z bakterijami vrste *Staph. aureus* povzročenega kreatritisa (vnetje očesne roženice). Prav tako poročajo,

da je propolis zmanjšal odpornost bakterijske celične stene proti antibiotikom (amoksiklin, ampicilin, cefaleksin) in da je imel sinergističen učinek z antibiotiki, ki delujejo na ribosome (kloramfenikol, tetraciklin, neomicin), ne stopi pa v interakcijo z antibiotiki, katerih delovanje je usmerjeno na DNA (ciprofloksacin, norfloksacin) ali na biosintezo folne kisline (kortimoksazole) (Orsi in sod., 2012). Mehanizem protibakterijskega delovanja propolisa je povezan z njegovimi sestavinami. Bakteriostatičen in bakteriociden učinek propolisa je povezan z združeno reakcijo inhibicije sinteze proteinov in bakterijske rasti s preprečitvijo celične delitve (Havsteen, 1983; Oksuz in sod., 2005).

Junior in sod. (2012) so v svoji raziskavi analizirali rdeči propolis in določili protibakterijski učinek na vse grampozitivne bakterije, vključene v analizo, in 62,5 % na gramnegativne bakterije, vključene v analizo. Neves in sod. (2016) so prav tako uporabili rdeči propolis in določili vrednosti MIC za vse grampozitivne in gramnegativne bakterije, vključene v analizo. Cabral in sod. (2009) so analizirali rdeči propolis s frakcijo kloroforma in njegove podfrakcije so imele večje vrednosti MIC 15,8–31,7 µg/ml kot etanolni ekstrakt z vrednostmi MIC 62,5–125 µg/ml. Sklepali so, da razlog za protimikroben aktivnost rdečega propolisa ni v sinergističnem učinku sestavin propolisa, ampak v posameznih sestavinah v propolisu, kot je formononetin, ki je ena izmed glavnih sestavin propolisa.

2.2.2 Protiglivna aktivnost propolisa

Številna so poročila o propolisu, ki dokazujejo širok spekter protibakterijske aktivnosti propolisa, a poročila o protiglivnem delovanju propolisa so redka (Saeed in sod., 2016). Raziskave o protiglivnem delovanju propolisa so večinoma opravljene s sevi kvasovk rodu *Candida* (Ota in sod., 2001; Neves in sod., 2016). Saeed in sod. (2016) pa navajajo širok spekter gliv, na katere propolis deluje inhibitorno, in sicer:

- Glice: *Candida albicans*, *C. guiliermondi*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *Cryptococcus* sp., *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Madurella mycetomi*, *Phialophora jeanselmei*, *Sacharomyces* sp., *Trichosporon cutaneum*, *Microsporum audouinii*, *Microsporum canis*, *Microsporum cepleo*, *Microsporum distortum*, *Microsporum ferrugineum*, *Microsporum gypseum*, *Piedra hortae*, *Tricophyton* sp., *Tricophyton mentagrophytes*, *Tricophyton rubrum*.

Protiglivna učinkovitost etanolnega ekstrakta propolisa FS96 je bila v raziskavi, ki so jo opravili Mavri in sod., (2012), enaka tako pri kvasovkah vrst *C. albicans* in *C. intermedia* (MIC 0,46 mg CAE/ml) kot pri plesnih vrst *A. flavus*. ŽMJ7, *A. flavus* ŽMJ25 (MIC 0,46 mg CAE/ml. Plesni vrst *Penicillium* sp. ŽMJ24 in *P. verrucosum* CBS 302 48 so imele dvakrat večjo vrednost MIC (0,91 mg CAE/ml) kot plesni *A. falvus* ŽMJ7 in *A. flavus* ŽMJ25 (MIC 0,46 mg CAE/ml). Posamezne fenolne spojine propolisa, kot so klorogenska kislina, kavna kislina, ferulna kislina, pinocembrin in kvercetin, niso imele protiglivne aktivnosti pri plesnih vrst *Penicillium* sp. (Mavri in sod., 2012).

Protiglivno aktivnost na plesni vrste *Penicillium italicum* so določali tudi s pinocembrinom, izoliranem iz propolisa. Pinocembrin je zaviral dihalno verigo, rast spor in micelija pri plesnih vrst *P. italicum*. Po 24-urni izpostavitvi pinocembrinu so bile hife plesni poškodovane in možen je bil prehod ionov in topnih proteinov iz micelija.

Pinocembrin bi lahko bila obetavna bioaktivna spojina za zdravljenje zemlje, kontaminirane s plesnimi vrste *P. italicum*, kjer rastejo citrusi (Peng in sod., 2012).

V analizi, kjer so analizirali 80 sevov kvasovk rodu *Candida*, od tega 20 sevov kvasovk vrste *Candida albicans*, 20 sevov kvasovk vrste *Candida tropicalis*, 20 sevov kvasovk vrste *Candida crusei* in 15 sevov kvasovk vrste *Candida guilliermondii*, so ugotovili, da propolis deluje protiglivno v zaporedju *C. albicans* > *C. tropicalis* > *C. crusei* > *C. guilliermondii*. Dokazali so tudi, da propolis v kombinaciji z drugimi protimikotičnimi sredstvi še poveča protiglivno aktivnost pri kvasovkah vrste *C. albicans* (Ota in sod., 2001).

Mendonca in sod. (2015) so v rdečem propolisu brazilskega porekla določili protiglivno delovanje na kvasovke. Občutljivost kvasovk na rdeči propolis narašča v zaporedju *C. albicans* > *C. parapsilosis* > *C. glabrata*. Protiglivno učinkovitost ekstrakta propolisa pripisujejo predvsem sestavini formononetin.

Kontaminiranost živil z kvasovkami je v splošnem narasla zaradi manjših koncentracij konzervansov in milejših postopkov v živilski industriji, v želji proizvesti živila višje kakovosti (Beuchat in sod., 1989). Sadni sokovi in pijače so hitro pokvarljiva živila s strani kvasovk, plesni in tudi bakterij. Etanolni ekstrakti propolisa turškega porekla so pokazali protiglivni učinek na kvasovke vrst *C. kefyr*, *V. parapsilosis*, *C. famata*, *C. glabrata*, *C. pelliculosa* in *P. ohmeri*, izoliranih iz štirih nepasteriziranih sokov iz jabolk, pomaranč, belega grozdja in mandarin. Etanolni ekstrakt propolisa je inhibiral rast teh kvasovk pri vrednosti MIC 0,01–0,375 mg/ml (preglednica 4) (Koc in sod., 2007).

Preglednica 4: Minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) ekstrakta propolisa in natrijevega benzoata v sadnih sokovih in v gojišču RPMI-1640 (Koc in sod., 2007)

KVASOVKE	SADNI SOK	ETANOLNI EKSTRAKT PROPOLISA		Na-BENZOAT	
		24h	48h	24h	48h
		MIC (µg/ml)		MIC (µg/ml)	
<i>C. kefyr</i>	Mandarinin sok	90	185–375	80–320	160–320
	Pomarančni sok	20–90	20–185	80–640	160–640
	Jabolčni sok	40–185	185–375	160–320	80–320
	Sok iz belega grozdja	40–90	90–185	40–80	80
	Gojišče RPMI-1640	40–185	90–375	320–640	320–1280
<i>C. parapsilosis</i>	Mandarinin sok	40	90	80	160
	Pomarančni sok	10–40	10–90	80–160	80–320
	Jabolčni sok	90	90	80–160	160
	Sok iz belega grozdja	20–40	20–40	40	40
	Gojišče RPMI-1640	90–185	185–375	640	640–1280
<i>C. famata</i>	Mandarinin sok	20–40	90–185	80–160	160
	Pomarančni sok	10–40	20–40	40–160	40–160
	Jabolčni sok	90	90–375	80–160	160

se nadaljuje...

Nadaljevanje preglednice 4: Minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) ekstrakta propolisa in natrijevega benzoata v sadnih sokovih in v gojišču RPMI (Koc in sod., 2007)

KVASOVKE	SADNI SOK	ETANOLNI EKSTRAKT PROPOLISA		Na-BENZOAT	
		24h	48h	24h	48h
		MIC (µg/ml)		MIC (µg/ml)	
<i>C. famata</i>	Sok iz belega grozdja	20–40	40–90	40–80	40–80
	RPMI gojišče-1640	90–185	185	320–640	640
<i>C. gabrata</i>	Mandarinin sok	90	185	80	160
	Pomarančni sok	40	40	40	40
	Jabolčni sok	90	185	160	160
	Sok iz belega grozdja	90	185	160	160
	Gojišče RPMI-1640	90	185	0	640
<i>C. pelliculosa</i>	Mandarinin sok	40	90	80	160
	Pomarančni sok	90	90	80	80
	Jabolčni sok	/	40	80	160
	Sok iz belega grozdja	40	40	80	80
	Gojišče RPMI-1640	90	185	320	640
<i>Pichia ohmeri</i>	Mandarinin sok	40	90	80	160
	Pomarančni sok	40	40	40	80
	Jabolčni sok	/	90	160	160
	Sok iz belega grozdja	20	40	80	80
	Gojišče RPMI-1640	185	185	640	640

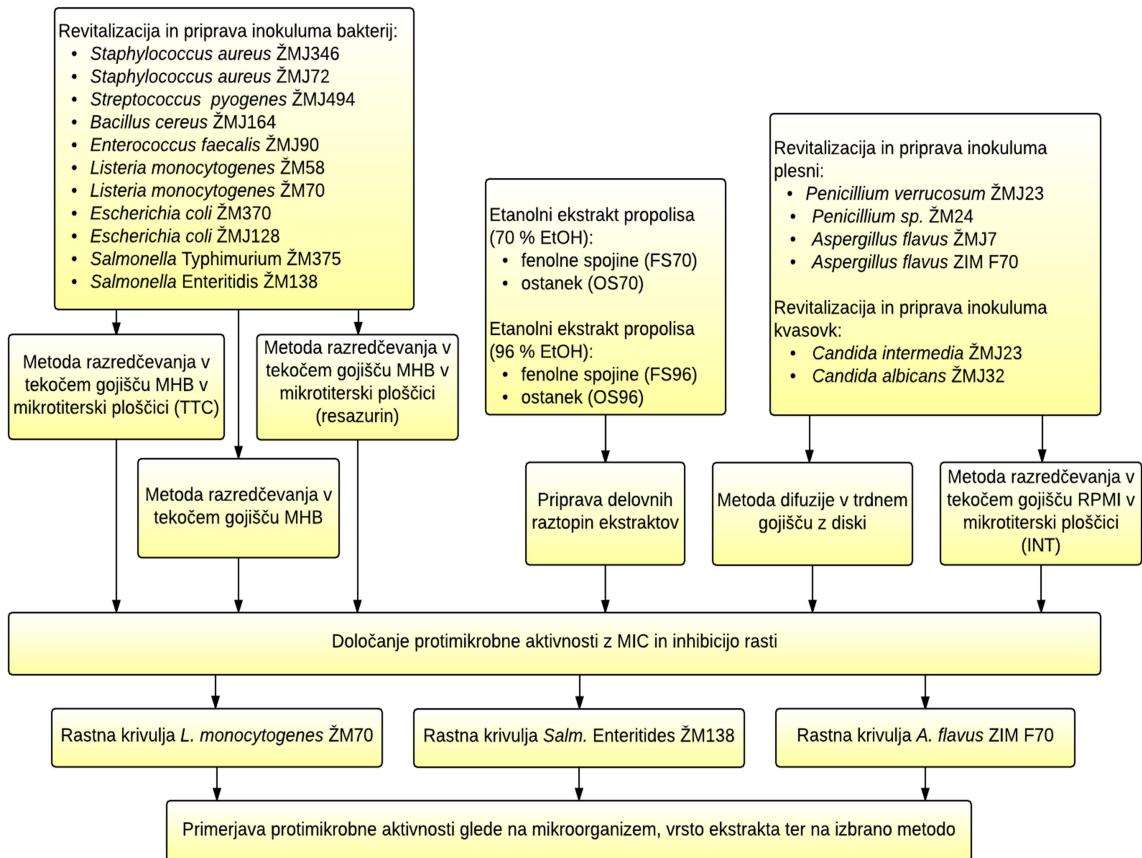
Legenda: /: neaktivno

V mnogih državah je dovoljena uporaba natrijevega benzoata in kalijevega sorbata kot konzervansa v živilih, kot so kumarice in gazirane pijače do 0,1 % (Banks in sod., 1988; Turantas in sod., 1999). V svoji raziskavi so Koc in sod. (2007) dokazali, da je ekstrakt propolisa aktivnejši proti kvasovkam, izoliranim iz kontaminiranega sadnega soka od natrijevega benzoata, pri katerem so bile vrednosti MIC od 40–1280 µg/ml. Majhne vrednosti MIC 0,01 µg/ml za propolis turškega porekla na patogene kvasovke so že določili Silici in sod. (2005). Zanimivo je, da je 216 mg/ml ekstrakta propolisa brazilskega porekla potrebno za inhibicijo rasti kvasovk (Salomão in sod., 2004). Taka razlika v koncentracijah propolisa je možna zaradi različne kemijske sestave propolisa iz različnega geografskega porekla (Koc in sod., 2007).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 POTEK DELA

Namen našega dela je bil določiti, ali imajo etanolni ekstrakti propolisa protimikroben učinek na grampozitivne in gramnegativne bakterije, kvasovke ter plesni. Potek raziskovalnega dela je shematsko prikazan na sliki 2.



Slika 2: Shema določanja protimikrobnega učinka etanolnih ekstraktov propolisa

Legenda: **FS96:** etanolni ekstrakt fenolnih spojin, pridobljen iz propolisa s 96 % (v/v) etanolom, **OS96:** ostanek ekstrakta propolisa po ekstrakciji s 96 % etanolom, **FS70:** etanolni ekstrakt fenolnih spojin, pridobljen iz propolisa s 70 % (v/v) etanolom, **OS70:** ostanek ekstrakta propolisa po ekstrakciji s 70 % etanolom, **MHB:** tekoče gojišče Mueller Hinton, **TTC:** 2,3,5-trifenil tetrazolijev klorid, **RPMI-1640:** osnovno gojišče RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute), **INT:** 2-p-iodofenil-3-p-nitrofenil-5-fentil tetrazolijev klorid, **MIC:** minimalna inhibitorna koncentracija

3.2 MATERIAL

3.2.1 Mikroorganizmi

Za izvedbo eksperimentalnega dela smo uporabili 11 vrst bakterij, od tega 7 grampozitivnih in 4 gramnegativnih bakterij, 2 vrsti kvasovk in 4 vrste plesni (preglednica 5).

Preglednica 5: Izbrani mikroorganizmi za določitev protimikrobnega delovanja propolisa

SKUPINA	VRSTA MIKROORGANIZMA, OZNAKA SEVA	VIR SEVA
GRAMPOZITIVNE BAKTERIJE	<i>Staphylococcus aureus</i> ŽMJ346	Humani izolat
	<i>Staphylococcus aureus</i> ŽMJ72	ATCC25923
	<i>Streptococcus pyogenes</i> ŽM494	Humani izolat
	<i>Enterococcus faecalis</i> ŽMJ90	Humani izolat
	<i>Listeria monocytogenes</i> ŽM58	4b, IHM, Wuerzbug
	<i>Listeria monocytogenes</i> ŽM70	Humani izolat
GRAMNEGATIVNE BAKTERIJE	<i>Bacillus cereus</i> ŽMJ164	WSBC 10530
	<i>Escherichia coli</i> ŽM370	ATCC 11229
	<i>Escherichia coli</i> O157 ŽMJ128	Humani izolat
	<i>Salmonella Typhimurium</i> ŽM375	ATCC 14028
PLESNI	<i>Salmonella Enteritidis</i> ŽM138	Humani izolat
	<i>Penicillium verrucosum</i> ŽMJ23	CBS 302.48
	<i>Penicillium</i> sp. ŽM24	Izoliran iz hrenovke (Pivka)
	<i>Aspergillus flavus</i> ŽMJ7	/
KVASOVKE	<i>Aspergillus flavus</i> ZIM F70	/
	<i>Candida intermedia</i> ŽMJ23	/
	<i>Candida albicans</i> ŽMJ32	/

Legenda: ATCC: tipski sev zbirke American Type Culture Collection; ŽMJ, ŽM: mikrobiološka zbirka Laboratorijsa za živilsko mikrobiologijo na Oddelku za živilstvo, Biotehniške fakultete; IHM: Inštitut za higieno in mikrobiologijo, Wuerzburg, Nemčija; WSBC: tipski sev zbirke Weihenstephan *B. cereus* Culture Collection, Muenchen (Nemčija); CBS: zbirka gliv Fungal biodiversity centre (Nizozemska) ZIM: Zbirka industrijskih mikroorganizmov na Oddelku za živilstvo, Biotehniške fakultete; /: ni podatka

3.2.2 Etanolni ekstrakti propolisa

Za eksperimentalno delo smo uporabili propolis, ki izvira iz Dolenjske regije, letnik 2008, oziroma iz njega pripravljene ekstrakte. Ekstrakti propolisa so bili pripravljeni v sodelovanju s Katedro za biokemijo in kemijo živil Oddelka za živilstvo, Biotehniške fakultete (Kuraja, 2009). Ekstrakti propolisa so bili pridobljeni z ekstrakcijo z dvema ekstrakcijskima topiloma, in sicer ekstrakt, pridobljen s 70 % (v/v) EtOH, in ekstrakt, pridobljen s 96 % (v/v) EtOH. Po ekstrakciji s 70 % (v/v) EtOH so v ekstraktu propolisa

dobili nekoliko višjo vsebnost fenolnih spojin kot v ekstraktu propolisa, ki so ga pridobili s topilom s 70 % (v/v) EtOH. To pomeni, da je ekstrakcija s 70 % EtOH učinkovitejša od ekstrakcije s 96 % EtOH (Mavri in sod., 2012). Etanolna ekstrakta propolisa sta bila prečiščena z ekstrakcijo na trdni fazi. V obeh prečiščenih ekstraktih so prevladovale fenolne spojine in smo ju označili kot FS70 in FS96 (preglednica 6). Tako je koncentracija skupnih fenolnih spojin v ekstraktu FS70 znašala 34 ± 1 mg/ml, v FS96 pa 29 ± 4 mg/ml (Kuraja, 2009). Pri obeh ekstrakcijah sta ostala t. i. ostanka po ekstrakciji, ki smo ju označili kot OS70 in OS96 (preglednica 6).

Preglednica 6: Etanolni ekstrakti propolisa

TOPILO	ETANOLNI EKSTRAKT PROPOLISA OZ. OSTANEK	OKRAJŠAVA
70 % etanol (v/v)	fenolne spojine 70 % EtOH ostanek 70 % EtOH	FS70 OS70
96 % etanol (v/v)	fenolne spojine 96 % EtOH ostanek 96 % EtOH	FS96 OS96

3.2.3 Mikrobiološka gojišča

Selektivno gojišče BP

Sestavine:

- osnovno gojišče BP (ang. Baird Parker Agar Base, Biolife, 401116, Italija).

Priprava:

V 1000 ml steklenico smo natehtali 29 g gojišča BP, dodali 475 ml destilirane vode in dobro premešali. Nato smo gojišče 20 minut sterilizirali pri 121 °C. Po sterilizaciji smo gojišče aseptično razlili v sterilne petrijevke ter jih shranili v hladilniku.

Selektivno gojišče EMB

Sestavine:

- osnovno gojišče EMB (angl. Eosin Methylene Blue, Biolife, 40145012, Italija).

Priprava:

V 1000 ml steklenico smo natehtali 18 g gojišča EMB, dodali 500 ml destilirane vode in dobro premešali. Nato smo gojišče 15 minut sterilizirali pri 121 °C. Po sterilizaciji smo gojišče aseptično razlili v sterilne petrijevke ter jih shranili v hladilniku.

Selektivno gojišče SB

Sestavine:

- osnovno gojišče SB (ang. Slanetz-Bartley medium, Biolife, 4020462, Italija).

Priprava:

V 1000 ml steklenico smo odtehtali 21 g gojišča SB, dodali 500 ml destilirane vode in dobro premešali. Nato smo gojišče 10–15 minut sterilizirali pri 105 °C. Po sterilizaciji smo gojišče aseptično razlili v sterilne petrijevke ter jih shranili v hladilniku.

Neselektivno gojišče TSA

Sestavine:

- triptični soja agar (TSA, Oxoid, CM0131, Anglija),
- dikalijevhidrogenfosfat (K_2HPO_4 , Kemika, 1116108, Hrvaška),
- D-(+)-glukoza (Kemika, 0705007, Hrvaška),
- kvasni ekstrakt (Biolife, 4122202, Italija).

Priprava:

V 1000 ml steklenico smo odtehtali 20 g gojišča TSA, 1,25 g K_2HPO_4 , 1,25 g D-(+)-glukoze in 3 g kvasnega ekstrakta ter dodali 500 ml destilirane vode. Vse smo dobro premešali in 20 minut sterilizirali v avtoklavu pri 121 °C. Po sterilizaciji smo gojišče aseptično razlili v sterilne petrijevke ter jih shranili v hladilniku.

Neselektivno gojišče MHB

Sestavine:

- osnovno gojišče Mueller Hinton (Oxoid, CM0405, Anglija).

Priprava:

V 1000 ml steklenico smo odtehtali 10 g gojišča Mueller Hinton, dodali 500 ml destilirane vode in dobro premešali. Nato smo gojišče nalili v epruvete po 5 ml in 9 ml ter sterilizirali 20 minut pri 121 °C.

Neselektivno gojišče TSB

Sestavine:

- triptični soja bujon (TSB, Oxoid, CM0129, Anglija).

Priprava:

V 1000 ml steklenico smo natehtali 15 g gojišča TSB, dodali 500 ml destilirane vode in dobro premešali. Nato smo gojišče 20 minut sterilizirali pri 121 °C.

Gojišče krompirjev glukozni agar

Sestavine:

- osnovno gojišče krompirjev glukozni agar (Merck, 1.10130.0500 KGaA, Nemčija).

Priprava:

V 1000 ml steklenico smo odtehtali 20 g gojišča krompirjev glukozni agar, dodali 500 ml destilirane vode in dobro premešali. Nato smo gojišče segrevali 10–15 minut pri 100 °C v avtoklavu in nato sterilizirali 15 minut pri 121 °C. Po sterilizaciji smo gojišče aseptično razlili v sterilne petrijevke ter jih shranili v hladilniku.

Gojišče sladni ekstrakt

Sestavine:

- osnovno gojišče sladni ekstrakt (Merck, 1.05398.0500 KGaA, Nemčija).

Priprava:

V 1000 ml steklenico smo natehtali 24 g gojišča sladni ekstrakt, dodali 500 ml destilirane vode in dobro premešali. Nato smo gojišče 10 minut sterilizirali pri 121 °C. Po sterilizaciji smo gojišče aseptično razlili v sterilne petrijevke ter jih shranili v hladilniku.

Gojišče RPMI-1640

Sestavine:

- osnovno gojišče RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) (Sigma, R6504),
- reagent za uravnavanje vrednosti pH (MOPS, Sigma, M1254).

Priprava:

V 1000 ml stekleničko smo natehtali 5,2 g gojišča RPMI-1640, dodali 500 ml destilirane vode in dobro premešali. Pripravili smo 0,165 M MOPS in uravnali pH gojišča RPMI-1640 na pH=7,0. Gojišče smo sterilizirali tako, da smo ga filtrirali prek filtra z velikostjo por 0,2 µm.

Fiziološka raztopina

Sestavine:

- KH₂PO₄ (Kemika, 11161, Hrvaška).

Priprava:

3,4 g KH₂PO₄ smo raztopili v 100 ml destilirane vode (pH=7,2). 1,25 ml te raztopine smo razredčili v 1000 ml destilirane vode. Po 9 ml tako pripravljene raztopine smo odpipetirali v epruvete in jih nato 20 minut sterilizirali v avtoklavu pri 121 °C.

Raztopina TTC

Sestavine:

- TTC (2,3,5-trifenil tetrazolijev klorid, Sigma-Aldrich T8877).

Priprava:

V 10 ml merilno bučko smo k 0,2 mg TTC dodali dvakrat destilirano vodo (do 10 ml) in dobro premešali. Raztopino smo sterilizirali s filtracijo prek filtra z velikostjo por 0,2 µm v 2,0 ml epruvete in jih shranili v hladilniku.

Raztopina INT

Sestavine:

- INT (2-p-iodofenil-3-p-nitrofenil-5-fentil tetrazolijev klorid, Sigma-Aldrich, I8377-5G, USA).

Priprava:

V 10 ml merilno bučko smo k 0,2 mg INT dodali dvakrat destilirano vodo (do 10 ml) in dobro premešali. Raztopino smo sterilizirali s filtracijo prek filtra z velikostjo por 0,2 µm v 2,0 ml epruvete in jih shranili v hladilniku.

3.2.4 Druge kemikalije in dodatki

- Etanol (96 % EtOH, Merck, 1.00983.1000, Nemčija),
- Barvilo Resazurin CellTiter-Blue® (Promega Corporation, G8080/1/2 ZDA),
- Diski premera 6 mm (BD, 231039, Francija),
- Filtri za enkratno uporabo s porami velikosti 0,2 µm (Sartorius, 16534, Nemčija).

3.2.5 Laboratorijska oprema

Aparature, ki smo jih uporabljali pri eksperimentalnem delu, so navedene v preglednici 7.

Preglednica 7: Laboratorijska oprema

APARATURA	OZNAKA	PROIZVAJALEC
Avtoklav	Tip 250	Sutjeska, Beograd
Čitalec mikrotitrskih plošč	Safire 2	Tecan, Švica
Digestorij	TIP382	Medilab Ravh, Slovenija
Digitalna tehtnica	PB1502-S	Mettler Toledo, Švica
Hladilnik	/	LTH, Slovenija
Inkubator	I-105CK	Kambič, Slovenija
Inkubator	Sutjeska	Sutjeska, Beograd
Mikrovalovna pečica	Cook'n grill 1300	Sanyo, Japonska
Plinski gorilnik	/	/
Stresalnik	Vibriomix 314 EVT	Tehtnica, Slovenija

se nadaljuje...

Nadaljevanje preglednice 7: Laboratorijska oprema

APARATURA	OZNAKA	PROIZVAJALEC
Tehtnica	Sartorius analytic	Sartorius, Nemčija
Vrtinčno mešalo	Vibriomix 104EV	Tehtnica, Slovenija
Zmrzovalnik	/	LTH, Slovenija

Poleg aparatur, ki so navedene v preglednici 7, smo uporabljali še cepilne zanke, epruvete, petrijeve plošče (Labortehnika Golias, Slovenija), injekcijske brizgalke (2,5 ml), parafilm (PM 992, American National Can), 12-kanalno pipeto (Eppendorf), kad za tekoče gojišče (Eppendorf), avtomatske pipete in nastavke (P10, P100, P1000, Gilson, Francija, Eppendorf), laboratorijske steklenice (50 ml, 100 ml, 1000 ml) (Duran, Nemčija), plastične lončke (Labortehnika Golias), plastične kivete, merilne valje (Plastibrand, Nemčija), pincete, sterilne zobotrebce, Al-folijo in programsko opremo Microsoft Office, Corel Draw (verzija 12).

3.3 METODE DELA

3.3.1 Revitalizacija in precepljanje bakterij

Izolati bakterij so bili pred začetkom eksperimentalnega dela shranjeni pri -20 °C kot suspenzije glicerola (0,15 ml) in čiste kulture v tekočem gojišču (0,85 ml). Vsak izolat smo prenesli v 9 ml gojišča MHB in vsebino premešali na vrtinčnem mešalu. Sledila je 24-urna inkubacija na stresalniku (100 obratov/minuto) pri 37 °C.

Bakterijske kulture smo v času raziskovalnega dela vsak teden znova precepili na novo gojišče TSA, inkubirali 24 ur pri 37 °C ter nato kulturo na gojišču hranili v hladilniku.

3.3.2 Priprava inokuluma bakterij za določitev protibakterijskega delovanja etanolnih ekstraktov propolisa

0,1 ml 24-urne kulture bakterij vrste *Staph. aureus* v gojišču MHB (3.3.1) smo prenesli na selektivno gojišče BP in ga 24 ur inkubirali pri 37 °C. Na gojišču BP so zrasle za stafilokoke značilno črno obarvane kolonije. V sveže sterilno gojišče MHB (9 ml) smo nato s cepilno zanko prenesli eno kolonijo iz gojišča BP, vsebino premešali na vrtinčnem mešalniku in suspenzijo 24 ur inkubirali na stresalniku (100 obratov/minuto) pri 37 °C. Po inkubaciji smo 0,1 ml kulture bakterij vrste *Staph. aureus* razmazali na sterilno gojišče TSA in inkubirali 24 ur pri 37 °C. Nato smo eno zraslo kolonijo iz gojišča TSA prenesli v gojišče MHB (5 ml), premešali na vrtinčnem mešalu in 15–20 ur inkubirali na stresalniku (100 obratov/minuto) pri 37 °C. Iz gojišča MHB smo po inkubaciji odpipetirali 150 µl bakterijske kulture v 10 ml svežega gojišča MHB in dobro premešali na vrtinčnem mešalu. Tako pripravljen inokulum smo uporabili za določitev protibakterijskega delovanja etanolnih ekstraktov propolisa (preglednica 6).

Priprava inokuluma drugih bakterij (*L. monocytogenes*, *Salm. Enteritidis*, *Salm. Typhimurium*, *Strep. pyogenes*, *B. cereus*, *Ent. faecalis*, *E. coli*) se je od priprave inokuluma stafilokokov razlikovala le v izbiri selektivnega gojišča. Za pripravo bakterij

vrste *B. cereus* smo uporabili gojišče BC, za kulture salmonel gojišče XLD, za listerije gojišče ALOA, za bakterije vrste *E. coli* gojišče EMB in za bakterije vrste *Ent. faecalis* gojišče SB.

3.3.3 Revitalizacija in precepljanje plesni in kvasovk

Izolati plesni in kvasovk so bili pred začetkom eksperimentalnega dela shranjeni pri 4 °C na trdnih gojiščih. Izolata kvasovk vrst *C. intermedia* ŽMJ23 in *C. albicans* ŽMJ32 smo preceplili na gojišče sladni ekstrakt in 5 dni inkubirali pri 28 °C. Vsak izolat plesni vrst *Penicillium verrucosum* ŽMJ23, *Penicillium* sp. ŽM24, *A. flavus* ŽMJ7 in *A. flavus* ZIM F70 smo preceplili s sterilnim zobotrebcem iz plošče v hladilniku na sveže gojišče krompirjev glukozni agar. S sterilnim zobotrebcem smo naredili luknjice v gojišče krompirjev glukozni agar, v katero smo z istim zobotrebcem prenesli plesen, petrijevo ploščo smo nato ovili s parafilmom in inkubirali 10 do 14 dni pri 28 °C. Izolate kvasovk smo vzdrževali na gojišču sladni ekstrakt in izolate plesni na gojišču krompirjev glukozni agar, tako da smo jih precepljali vsakih sedem do 14 dni.

3.3.4 Priprava inokuluma plesni in kvasovk za določitev protiglivnega delovanja etanolnih ekstraktov propolisa

Za metodo difuzije v trdnem gojišču z diskami smo pripravili inokulum plesni tako, da smo petrijevo ploščo, kjer so rasle 10–14 dni stare kulture plesni (3.3.3), prelili z 9 ml fiziološke raztopine in s cepilno zanko podrgnili konidije. Iz te petrijeve plošče smo nato odpipetirali 1 ml suspenzije in jo prenesli v novih 9 ml fiziološke raztopine ter jo dobro premešali. Postopek razredčevanja smo nadaljevali do primernega začetnega števila konidijev.

Za metodo difuzije v trdnem gojišču z diskami smo inokulum kvasovk pripravili tako, da smo s sterilno ezo vzeli 5 dni staro kolonijo (3.3.3) in jo prenesli v 9 ml fiziološke raztopine, dobro premešali in suspenzijo razredčevali do primernega začetnega števila kvasovk.

Inokulum plesni za metodo razredčevanja v tekočem gojišču RPMI-1640 smo pripravili tako, da smo 10 do 14 dni stare kolonije plesni prelili z 9 ml fiziološke raztopine in s cepilno zanko strgali konidije. Nato smo odpipetirali 100 µl raztopine s konidiji v 9 ml gojišča RPMI-1640. Prav tako smo naredili inokulum kvasovk s to razliko, da smo pri kvasovkah s sterilno ezo vzeli kolonijo in jo prenesli v 9 ml gojišča RPMI-1640 in dobro premešali.

3.3.5 Določanje števila mikrobnih celic v inokulumu

Ker je za vsako uporabljeni metodo določanja protimikrobnega delovanja pomembna koncentracija celic, smo določali število bakterij, plesni oziroma kvasovk v vsakem inokulumu. Za določanje števila bakterij, plesni in kvasovk smo uporabili metodo štetja kolonij na trdnem gojišču (SIST EN ISO 4833, 2003). Število celic smo določili kot koncentracijo celic (cfu: kolonijska enota) v mililitru vzorca (cfu/ml), na gojišču TSA za

bakterije, na gojišču krompirjev glukozni agar za plesni in na gojišču sladni ekstrakt za kvasovke.

Metoda štetja kolonij na trdnem gojišču za bakterije:

Po 24-urni inkubaciji smo iz tekočega gojišča MHB (3.3.2) aseptično odpipetirali 1 ml inokuluma v 9 ml fiziološke raztopine. Vsebino smo premešali na vrtinčnem mešalniku. Postopek razredčevanja vzorca smo ponavljali do razredčitev 10^{-7} in 10^{-8} . Po 0,1 ml tako razredčenega vzorca smo odpipetirali na gojišče TSA in ga s stekleno palčko enakomerno razmazali po gojišču. Petrijeve plošče smo 24 ur inkubirali pri 37 °C. Po inkubaciji smo prešteli zrasle kolonije in izračunali število bakterij (N). Prešteli smo samo tista gojišča, kjer je zraslo od 15 do 300 kolonij in uporabili enačbo 1.

$$N = \frac{\Sigma C}{(n_1 + 0,1x n_2) \times R} \quad \dots(1)$$

Legenda:

ΣC vsota kolonij na vseh števnih ploščah,
 n_1 število petrijevk pri prvi upoštevani razredčitvi,
 n_2 število petrijevk pri drugi upoštevani razredčitvi,
 R faktor razredčitve pri prvi upoštevani razredčitvi,
 N število mikroorganizmov (cfu/ml).

Metoda štetja kolonij na trdnem gojišču za plesni:

Po 10 do 14-dnevni inkubaciji smo krompirjev glukozni agar s plesnimi (3.3.4) prelili z 9 ml fiziološke raztopine in z ezo podrgnili konidije. Iz petrijeve plošče smo aseptično odpipetirali 1 ml inokuluma v 9 ml fiziološke raztopine. Vsebino smo premešali na vrtinčnem mešalniku. Postopek razredčevanja vzorca smo ponavljali do razredčitve 10^{-6} . Po 0,1 ml tako razredčenega vzorca smo odpipetirali na krompirjev glukozni agar in ga s stekleno palčko enakomerno razmazali po gojišču. Gojišča smo inkubirali 10 do 14 dni pri 28 °C. Po inkubaciji smo prešteli zrasle kolonije (na gojiščih, kjer je zraslo od 15 do 150 kolonij) in izračunali število plesni (N) po enačbi 1.

Metoda štetja kolonij na trdnem gojišču za kvasovke:

Po 5-dnevni inkubaciji gojišča sladni ekstrakt s kvasovkami (3.3.3) smo s sterilno ezo eno kolonijo kvasovk prenesli v 9 ml fiziološke raztopine. Vsebino smo premešali na vrtinčnem mešalu. Postopek razredčevanja smo ponavljali do razredčitve 10^{-6} . Po 0,1 ml tako razredčenega vzorca smo odpipetirali na gojišče sladni ekstrakt in ga s stekleno palčko enakomerno razmazali po gojišču. Gojišča smo inkubirali 5 dni pri 28 °C. Po inkubaciji smo prešteli zrasle kolonije (na gojiščih, kjer je zraslo od 15 do 300 kolonij) in izračunali število kvasovk (N) po enačbi 1.

3.3.6 Metoda razredčevanja v tekočem gojišču MHB v mikrotitrski ploščici

3.3.6.1 Priprava delovnih raztopin etanolnih ekstraktov propolisa

Delovno raztopino vsakega etanolnega ekstrakta propolisa (FS70, FS96) in ostanka ekstrakta propolisa (OS70, OS96) smo pripravili tako, da smo v 1,5 ml epruveto odpipetirali ustrezeni volumen etanolnega ekstrakta ali ostanka ekstrakta propolisa, katerega smo premešali na vrtinčnem mešalu in mu nato po steni epruvete dodali ustrezeni volumen gojišča MHB, predhodno ogretega na 37 °C. Raztopino smo dobro premešali na vrtinčnem mešalu. Delovno raztopino etanolnega ekstrakta in ostanka ekstrakta propolisa smo vedno pripravili, tik preden smo ga dodali v mikrotitrsko ploščico.

Začetne koncentracije delovnih raztopin etanolnih ekstraktov propolisa (FS70, FS96) in ostankov ekstrakta propolisa (OS70, OS96) v gojišču MHB, s katerimi smo določili protibakterijsko aktivnost, so bile:

- etanolni ekstrakt propolisa FS70: 2,70 mg/ml,
- etanolni ekstrakt propolisa FS96: 2,33 mg/ml,
- ostanek ekstrakta propolisa OS70: 7,32 mg/ml,
- ostanek ekstrakta propolisa OS96: 7,13 mg/ml.

3.3.6.2 Priprava bakterijskega inokuluma

Bakterijski inokulum smo pripravili, kot je opisano v 3.3.2. Iz epruvete z 10 ml gojišča MHB in kulture smo v vdolbinice na mikrotitrski ploščici nanašali 50 µl bakterijskega inokuluma. Pred vsakim dodatkom bakterijskega inokuluma v vdolbinico smo tudi to vsebino dobro premešali na vrtinčnem mešalu.

3.3.6.3 Princip in izvedba metode

Mikrotitrskica ima 96 vdolbinic, razporejenih v 12 kolon, ki so označene s številkami od 1 do 12, in 8 vrstic, ki so označene s črkami A, B, C, D, E, F, G, H (slika 3). V eni ploščici smo opravili analizo z eno bakterijsko kulturo in etanolnima ekstraktoma propolisa in ostankoma ekstrakta propolisa v dveh paralelkah (slika 3).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NK MHB	PK	2,70 mg/ml	1,35 mg/ml	0,68 mg/ml	0,34 mg/ml	0,17 mg/ml	0,08 mg/ml	0,04 mg/ml	0,02 mg/ml	0,01 mg/ml	0,005 mg/ml
B	NK MHB	PK	2,70 mg/ml	1,35 mg/ml	0,68 mg/ml	0,34 mg/ml	0,17 mg/ml	0,08 mg/ml	0,04 mg/ml	0,02 mg/ml	0,01 mg/ml	0,005 mg/ml
C	NK 8 % EtOH	PK 8 % Et- OH	2,33 mg/ml	1,17 mg/ml	0,58 mg/ml	0,29 mg/ml	0,15 mg/ml	0,07 mg/ml	0,04 mg/ml	0,02 mg/ml	0,01 mg/ml	0,005 mg/ml
D	NK 8 % EtOH	PK 8 % Et- OH	2,33 mg/ml	1,17 mg/ml	0,58 mg/ml	0,29 mg/ml	0,15 mg/ml	0,07 mg/ml	0,04 mg/ml	0,02 mg/ml	0,01 mg/ml	0,005 mg/ml
E	NK FS70	PK	7,32 mg/ml	3,66 mg/ml	1,83 mg/ml	0,92 mg/ml	0,46 mg/ml	0,23 mg/ml	0,11 mg/ml	0,06 mg/ml	0,03 mg/ml	0,01 mg/ml
F	NK FS96	PK	7,32 mg/ml	3,66 mg/ml	1,83 mg/ml	0,92 mg/ml	0,46 mg/ml	0,23 mg/ml	0,11 mg/ml	0,06 mg/ml	0,03 mg/ml	0,01 mg/ml
G	NK OS70	PK 8 % Et- OH	7,13 mg/ml	3,56 mg/ml	1,78 mg/ml	0,89 mg/ml	0,45 mg/ml	0,22 mg/ml	0,11 mg/ml	0,06 mg/ml	0,03 mg/ml	0,01 mg/ml
H	NK OS96	PK 8 % Et- OH	7,13 mg/ml	3,56 mg/ml	1,78 mg/ml	0,89 mg/ml	0,45 mg/ml	0,22 mg/ml	0,11 mg/ml	0,06 mg/ml	0,03 mg/ml	0,01 mg/ml

Slika 3: Primer priprave mikrotitrskih ploščic za določanje protimikrobnega učinka pri bakterijah

Legenda: NK: negativna kontrola, MHB: 100 µl gojišča MHB, NK 8 % Et-OH: 100 µl gojišča MHB z 8 % etanola, NK FS70: 100 µl gojišča MHB z 2,70 mg/ml etanolnega ekstrakta propolisa, dobljenega s 70 % EtOH, NK FS96: 100 µl gojišča MHB z 2,33 mg/ml etanolnega ekstrakta propolisa, dobljenega s 96 % EtOH, NK OS70: 100 µl gojišča MHB z 7,32 mg/ml ostanka ekstrakta propolisa po ekstrakciji s 70 % EtOH, NK OS96: 100 µl gojišča MHB z 7,13 mg/ml ostanka ekstrakta propolisa po ekstrakciji s 96 % EtOH, PK: pozitivna kontrola: 50 µl gojišča MHB + 50 µl inokuluma, PK 8 % Et-OH: 50 µl gojišča MHB z 16 % Et-OH + 50 µl inokuluma, 3A in 3B: paralelki s 50 µl gojišča MHB z 2,70 mg/ml etanolnega ekstrakta propolisa, dobljenega s 70 % EtOH + 50 µl bakterijske kulture, 4A in 4B: paralelki s 50 µl gojišča MHB z 1,35 mg/ml etanolnega ekstrakta propolisa, dobljenega s 70 % EtOH + 50 µl bakterijske kulture, 5A, 5B do 12A, 12 B: paralelki s 50 µl bakterijske kulture in koncentracija etanolnega ekstrakta ali ostanka ekstrakta propolisa, ki je bila analogno zmanjšana, vrstici A in B od 3 do 12 etanolni ekstrakt propolisa, dobljen s 70 % EtOH, vrstici C in D od 3 do 12 etanolni ekstrakt propolisa, dobljen s 96 % EtOH, vrstici E in F od 3 do 12 ostanek ekstrakta propolisa po ekstrakciji s 70 % EtOH, vrstici G in H od 3 do 12 ostanek ekstrakta propolisa po ekstrakciji s 96 % EtOH

V prvi koloni mikrotitrskih ploščic (slika 3) so bile negativne kontrole (preglednica 8), s katerimi smo preverjali, da gojišče MHB, etanolni ekstrakti in ostanki ekstrakta propolisa niso kontaminirani. V drugi koloni (slika 3) smo naredili pozitivne kontrole (preglednica 8) tako, da smo v vdolbinice dodali samo gojišče s kulturo, pozitiven rezultat je potrdil, da je bila uporabljena kultura metabolično aktivna. Podobno smo naredili tudi v vdolbinicah, v katere smo poleg gojišča in kulture dodali še 8 % EtOH. S tem poizkusom smo testirali, ali ima dodatek etanola vpliv na rast bakterij.

Preglednica 8: Negativne (NK) in pozitivne kontrole (PK) pri metodi razredčevanja v mikrotitrski ploščici za določitev vrednosti MIC etanolnih ekstraktov propolisa za bakterije

OZNAKA VDOLBINICE NA MIKROTITRSKI PLOŠČICI	DODANI REAGENTI V POSAMEZNI VDOLBINICI
NK MHB (1A, 1B)	100 µl gojišča MHB
NK 8 % EtOH (1C, 1D)	100 µl gojišča MHB z 8 % etanolom (96 % in 70 %)
NK FS70 (1E)	100 µl gojišča MHB in etanolni ekstrakt propolisa FS70 2,70 mg/ml
NK FS96 (1F)	100 µl gojišča MHB in etanolni ekstrakt propolisa FS96 2,33 mg/ml
NK OS70 (1G)	100 µl gojišča MHB in ostanek ekstrakta propolisa OS70 7,32 mg/ml
NK OS96 (1H)	100 µl gojišča MHB in ostanek ekstrakta propolisa OS96 7,13 mg/ml
PK (2A, 2B, 2E, 2F)	50 µl gojišča MHB in 50 µl inokuluma
PK 8 % EtOH (2C, 2D, 2G, 2H)	50 µl gojišča MHB in 16 % etanola in 50 µl inokuluma

V vdolbinice v tretji koloni (slika 3) smo z avtomatsko pipeto dodali po 100 µl že prej pripravljene delovne raztopine etanolnih ekstraktov propolisa (točka 3.3.6.1). V vse ostale vdolbinice (4A do 12H) smo dodali po 50 µl gojišča MHB. Iz vdolbinic (3A, 3B, 3C, 3D, 3E, 3F, 3G in 3H), v katere smo dodali največjo koncentracijo etanolnega ekstrakta in ostanka ekstrakta propolisa, smo po mešanju z avtomatsko pipeto z 10-kratnim potegom prenesli 50 µl suspenzije v naslednjo vdolbinico (4A in analogno), katera je že imela 50 µl gojišča MHB, (npr. v vdolbinico 3A smo dodali 100 µl etanolnega ekstrakta propolisa FS70 začetne koncentracije, katerega smo z 10-kratnim potegom z avtomatsko pipeto previdno premešali. Odpipetirali smo 50 µl premešane raztopine in jo prenesli v vdolbinico 4A, katera je že vsebovala 50 µl gojišča MHB. Vsebino smo previdno premešali z avtomatsko pipeto z 10-kratnim potegom in odpipetirali 50 µl v vdolbinico 5A. Tako smo ponavljali vse do vdolbinice 12A, kjer smo višek raztopine – to je 50 µl, zavrgli.) Tak način priprave razredčitev nam je zagotovil, da se je koncentracija etanolnega ekstrakta in ostanka ekstrakta propolisa zmanjševala za polovico po vrstici. Končni volumen v vseh vdolbinicah je bil 50 µl. Ko smo pripravili ustrezne razredčitve, smo v vse vdolbinice na mikrotitrski ploščici, razen v prvo kolono, dodali po 50 µl bakterijskega inokuluma (3.3.2). Mikrotitrsko ploščico smo pokrili, premešali na mešalu (500 vrtljajev/min, 1 minuto) in jo nato 20–24 ur inkubirali pri 37 °C.

Odčitavanje pri metodi razredčevanja v tekočem gojišču MHB z raztopino TTC:

Po 20–24 urni inkubaciji smo v vsako vdolbinico dodali 10 µl raztopine TTC in premešali na mešalu (500 vrtljajev/min, 1 minuto). Sledila je 30 do 60 minutna inkubacija pri 37 °C. Pozitivni rezultat je pomenil metabolno aktivne celice in smo ga odčitali za vdolbinice, v katerih je nastala rdeča barva. Obarvanje je pomenilo, da etanolni ekstrakt propolisa ni imel vpliva na zmanjšano rast bakterij. Negativen rezultat je pomenil metabolno neaktivne celice, ki smo ga določili v vdolbinicah, pri katerih je bila barva nespremenjena (različni odtenki rumene barve). Prva nespremenjena, rumena barva vdolbinice je predstavljala vrednost MIC, torej minimalno inhibitorno koncentracijo, pri kateri je naša koncentracija etanolnega ekstrakta inhibirala rast testne bakterije.

Odčitavanje po metodi razredčevanja v tekočem gojišču MHB z raztopino resazurin:

Po 20–24 urni inkubaciji smo v vsako vdolbinico dodali po 15 µl reagenta CellTiter-Blue®, ki se uporablja za določanje živih celic. Sledila je 2 urna inkubacija v temi pri 37 °C. Reagent CellTiter-Blue® vsebuje indikatorsko barvilo resazurin, ki meri metabolično kapaciteto celic – je indikator živosti. Žive celice ohranijo sposobnost redukcije resazurina v resorufin, ki močno fluorescira. Nežive celice hitro izgubijo metabolično kapaciteto, ne reducirajo indikatorskega barvila in tako ne proizvajajo fluorescentnega signala. Količina proizvedene fluorescence je sorazmerna številu živih celic. Linearno območje in nizka meja detekcije sta odvisna od vrste mikroorganizma in njegove sposobnosti redukcije resazurina. Indikatorsko barvilo resazurin je temno modre barve in ima majhno intrinzično fluorescenco, dokler ni reducirano v resorufin, ki je rožnate barve in močno fluorescira. Živost se lahko spreminja na osnovi fluorescence ali absorbance (Riss in Moravec, 2003). Fluorescenco smo izmerili s čitalcem mikrotitrskih plošč Tecan Safire 2. Uporabili smo naslednje parametre:

- valovna dolžina vzbujanja: 550 nm,
- valovna dolžina merjenja emitirane fluorescence: 595 nm,
- razmak med valovnimi dolžinami: 20 nm,
- z-pozicija: 7169 µm,
- »optimal gain«: 41.

Vrednosti MIC so bile določene pri največji spremembi fluorescence.

3.3.7 Metoda razredčevanja v tekočem gojišču MHB

Z metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB smo hoteli potrditi minimalne inhibitorne koncentracije etanolnih ekstraktov in ostankov ekstrakta propolisa, dobljene z metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB v mikrotitrski ploščici. Za metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB smo vzeli koncentracijo etanolnih ekstraktov in ostankov ekstrakta propolisa, kjer smo določili vrednost MIC pri metodi razredčevanja v tekočem gojišču MHB v mikrotitrski ploščici in eno večjo koncentracijo, kot je bila določena pri vrednosti MIC. Analize smo izvedli v paralelkah, rezultate pa podali kot njihovo povprečje.

3.3.7.1 Priprava delovnih koncentracij etanolnega ekstrakta propolisa

Delovno koncentracijo etanolnega ekstrakta in ostanka ekstrakta propolisa smo pripravili enako kot pri metodi razredčevanja v tekočem gojišču MHB v mikrotitrski plošči (3.3.6.1), le začetne delovne raztopine so bile različne za vsako bakterijsko kulturo.

3.3.7.2 Priprava bakterijskega inokuluma

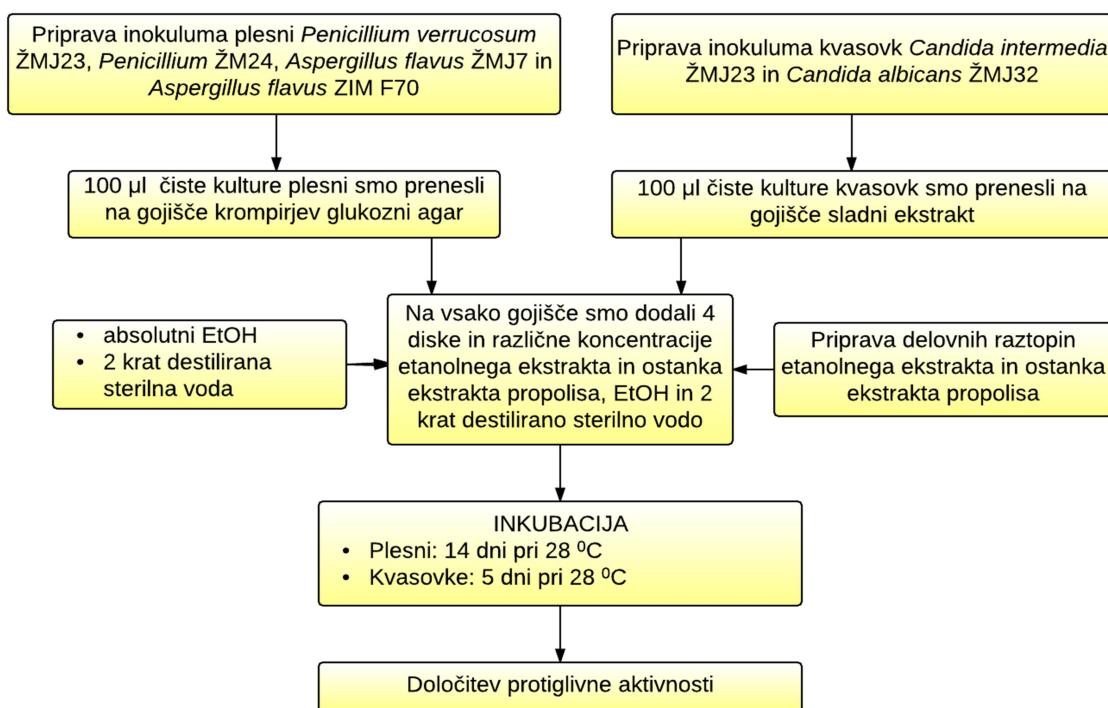
Za pripravo bakterijskega inokuluma smo prenesli 0,2 ml namnožene 15–20 urne bakterijske kulture (3.3.2) v epruveto, v kateri je bilo 1,5 ml gojišča MHB. Tu je bilo zelo pomembno, da smo 15–20 urno kulturo pred dodatkom v gojišče MHB dobro premešali, da smo tako dosegli homogeno razporeditev mikrobnih celic po celotnem volumnu.

3.3.7.3 Princip in izvedba metode

V 5 ml-epruvete smo odpipetirali po 2,8 ml gojišča MHB in mu dodali 0,2 ml etanolnega ekstrakta propolisa ustrezne koncentracije (eno večjo koncentracijo, kot je bila predhodno določena vrednost MIC (3.3.6)). Raztopino smo premešali na vrtinčnem mešalu in od 3 ml odpipetirali 1,5 ml v drugo epruveto (označeno z MIC) z 1,5 ml MHB gojišča in dobro premešali. Tako smo dobili ustrezne koncentracije etanolnih ekstraktov propolisa, katerim smo dodali po 0,2 ml bakterijske kulture. Nato smo z metodo štetja kolonij na trdnem gojišču določili število bakterij (3.3.5). Vzporedno smo naredili še pozitivno kontrolo, kjer smo vzorec pripravili enako, le da nismo dodali etanolnega ekstrakta in ostanka ekstrakta propolisa.

3.3.8 Metoda difuzije v trdnem gojišču z diskami

Z metodo difuzije v gojišču krompirjev glukozni agar za plesni in gojišču sladni ekstrakt za kvasovke smo določili protiglivno aktivnost etanolnih ekstraktov in ostankov ekstrakta propolisa. Shema eksperimentalnega dela je prikazana na sliki 4.



Slika 4: Shema določitve protiglivne aktivnosti etanolnih ekstraktov propolisa z metodo difuzije v trdnem gojišču z diskami

Legenda: **absolutni EtOH:** absolutni etanol (96 %); **MIC:** minimalna inhibitorna koncentracija

Na gojišče sladni ekstrakt smo dodali 100 µl inokuluma kvasovk (3.3.4) in ga po gojišču razporedili s stekleno palčko. Prav tako smo naredili za plesni s to razliko, da smo uporabili gojišče krompirjev glukozni agar. Nato smo petrijevko razdelili na 4 dele in na vsak del namestili po en sterilni disk. Na vsak disk smo dodali 10 µl etanolnega ekstrakta ali ostanka ekstrakta propolisa ustrezne koncentracije. Za negativno kontrolo smo uporabili 2-krat destilirano vodo, preverili smo tudi učinek absolutnega etanola (96 %). Petrijeve

plošče smo 48 ur inkubirali pri 28 °C. Po inkubaciji smo odčitali inhibicijske cone, tako da smo z optičnim čitalcem izgled gojišča z diskami prenesli v digitalno obliko in z računalniškim programom Corel Draw natančno izmerili polmere inhibicijskih koncentracij. Meritve smo uporabili kot merilo za določitev protiglivnega učinka različnih koncentracij etanolnega ekstrakta in ostankov ekstrakta propolisa. Analize smo izvajali v dveh paralelkah, rezultate pa smo podali kot njihovo povprečje.

Delovne raztopine etanolnega ekstrakta in ostanka ekstrakta propolisa smo pripravili tako, da smo odvzeli primeren volumen etanolnega ekstrakta ali ostanka ekstrakta propolisa, katerega smo dobro premešali in mu dodali ustrezni volumen absolutnega etanola, glede na začetno koncentracijo etanolnega ekstrakta in ostanka ekstrakta propolisa. Pripravljeno raztopino smo vedno dobro premešali na vrtinčnem mešalu, preden smo jo dali na diske. Preizkušene koncentracije:

- FS70: 4,23 mg/ml; 2,11 mg/ml; 1,05 mg/ml; 0,53 mg/ml; 0,26 mg/ml; 0,13 mg/ml; 0,07 mg/ml; 0,03 mg/ml; 0,02 mg/ml; 0,01 mg/ml,
- FS96: 3,65 mg/ml; 1,82 mg/ml; 0,91 mg/ml; 0,46 mg/ml; 0,23 mg/ml; 0,11 mg/ml; 0,06 mg/ml; 0,03 mg/ml; 0,01 mg/ml; 0,01 mg/ml,
- OS70: 11,44 mg/ml; 5,72 mg/ml; 2,86 mg/ml; 1,43 mg/ml; 0,72 mg/ml; 0,36 mg/ml; 0,18 mg/ml; 0,09 mg/ml; 0,05 mg/ml; 0,02 mg/ml,
- OS96: 11,14 mg/ml; 5,57 mg/ml; 2,78 mg/ml; 1,39 mg/ml; 0,70 mg/ml; 0,35 mg/ml; 0,17 mg/ml; 0,09 mg/ml; 0,04 mg/ml; 0,02 mg/ml.

3.3.9 Metoda razredčevanja v tekočem gojišču RPMI-1640 v mikrotitrski ploščici

3.3.9.1 Priprava delovnih raztopin etanolnih ekstraktov propolisa

Delovno raztopino etanolnega ekstrakta in ostanka ekstrakta propolisa smo pripravili tako, da smo v 1,5 ml-epruveto odpipetirali ustrezni volumen etanolnega ekstrakta propolisa, ki smo ga premešali na vrtinčnem mešalu in mu nato po steni epruvete dodali ustrezni volumen gojišča RPMI-1640, predhodno ogretega na 37 °C. Raztopino smo dobro premešali v vrtinčnem mešalu. Delovno raztopino etanolnega ekstrakta in ostanka ekstrakta propolisa smo vedno pripravili, tik preden smo ga dodali v mikrotitrsko ploščico.

Začetne koncentracije delovnih raztopin etanolnih ekstraktov propolisa (FS70, FS96) in ostankov ekstrakta propolisa (OS70, OS96) v gojišču RPMI-1640, s katerimi smo določili protiglivno aktivnost, so bile:

- etanolni ekstrakt propolisa FS70: 4,22 mg/ml,
- etanolni ekstrakt propolisa FS96: 3,65 mg/ml,
- ostanek ekstrakta propolisa OS70: 11,44 mg/ml,
- ostanek ekstrakta propolisa OS96: 11,14 mg/ml.

3.3.9.2 Priprava inokuluma kvasovk in inokuluma plesni

Inokulum plesni za metodo razredčevanja v tekočem gojišču RPMI-1640 (3.3.4.) smo pripravili tako, da smo 10 do 14 dni stare kolonije plesni prelili z 9 ml fiziološke raztopine

in z ezo strgali konidije. 100 µl raztopine s konidiji smo prenesli v 9 ml gojišča RPMI-1640. Prav tako smo naredili inokulum za kvasovke (3.3.4) s to razliko, da smo pri kvasovkah s sterilno ezo vzeli kolonijo in jo prenesli v 9 ml gojišča RPMI-1640 in vsebino dobro premešali. Iz tako pripravljenega inokuluma smo v vdolbinice na mikrotitrski ploščici nanašali po 50 µl inokuluma. Pred vsakim dodatkom raztopine v vdolbinico smo inokulum dobro premešali na vrtinčnem mešalu.

3.3.9.3 Princip in izvedba metode

Mikrotitrsko ploščico smo razdelili tako, da smo v njej opravili analize s kulturami kvasovk ali plesni z etanolnima ekstraktoma propolisa in ostankoma ekstrakta propolisa v dveh paralelkah (slika 5).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NK RPMI-1640	PK	4,22 mg/ml	2,11 mg/ml	1,05 mg/ml	0,53 mg/ml	0,26 mg/ml	0,13 mg/ml	0,07 mg/ml	0,03 mg/ml	0,02 mg/ml	0,01 mg/ml
B	NK RPMI-1640	PK	4,22 mg/ml	2,11 mg/ml	1,05 mg/ml	0,53 mg/ml	0,26 mg/ml	0,13 mg/ml	0,07 mg/ml	0,03 mg/ml	0,02 mg/ml	0,01 mg/ml
C	NK 12,5 % EtOH	PK 12,5 % Et-OH	3,65 mg/ml	1,82 mg/ml	0,91 mg/ml	0,46 mg/ml	0,23 mg/ml	0,11 mg/ml	0,06 mg/ml	0,03 mg/ml	0,01 mg/ml	0,01 mg/ml
D	NK 12,5 % EtOH	PK 12,5 % Et-OH	3,65 mg/ml	1,82 mg/ml	0,91 mg/ml	0,46 mg/ml	0,23 mg/ml	0,11 mg/ml	0,06 mg/ml	0,03 mg/ml	0,01 mg/ml	0,01 mg/ml
E	NK FS70	PK	11,44 mg/ml	5,72 mg/ml	2,86 mg/ml	1,43 mg/ml	0,72 mg/ml	0,36 mg/ml	0,18 mg/ml	0,09 mg/ml	0,05 mg/ml	0,02 mg/ml
F	NK FS96	PK	11,44 mg/ml	5,72 mg/ml	2,86 mg/ml	1,43 mg/ml	0,72 mg/ml	0,36 mg/ml	0,18 mg/ml	0,09 mg/ml	0,05 mg/ml	0,02 mg/ml
G	NK OS70	PK 12,5 % Et-OH	11,14 mg/ml	5,57 mg/ml	2,78 mg/ml	1,39 mg/ml	0,70 mg/ml	0,35 mg/ml	0,17 mg/ml	0,09 mg/ml	0,04 mg/ml	0,02 mg/ml
H	NK OS96	PK 12,5 % Et-OH	11,14 mg/ml	5,57 mg/ml	2,78 mg/ml	1,39 mg/ml	0,70 mg/ml	0,35 mg/ml	0,17 mg/ml	0,09 mg/ml	0,04 mg/ml	0,02 mg/ml

Slika 5: Primer priprave mikrotitrskih ploščic za določanje protiglivnega učinka pri kvasovkah in plesnih Legenda: NK: Negativna kontrola:100 µl gojišča RPMI-1640, NK 12,5 % Et-OH: 100 µl gojišča RPMI-1640 z 12,5 % etanola, NK FS70: 100 µl gojišča RPMI-1640 z 4,22 mg/ml etanolnega ekstrakta propolisa, dobljenega s 70 % EtOH, NK FS96: 100 µl gojišča RPMI-1640 z 3,65 mg/ml etanolnega ekstrakta propolisa, dobljenega s 96% EtOH, NK OS70: 100 µl gojišča RPMI-1640 z 11,44 mg/ml ostanka ekstrakta propolisa po ekstrakciji s 70 % EtOH, NK OS96: 100 µl gojišča RPMI-1640 z 11,14 mg/ml ostanka ekstrakta propolisa po ekstrakciji s 96 % EtOH, PK: pozitivna kontrola: 50 µl gojišča RPMI-1640 + 50 µl inokuluma, PK 12,5 % Et-OH: 50 µl gojišča RPMI-1640 (25 % Et-OH) + 50 µl inokuluma, 3A in 3B: 50 µl raztopine gojišča RPMI-1640 z 4,22 mg/ml etanolnega ekstrakta propolisa, dobljenega s 70 % EtOH + 50µl kulture plesni ali kvasovk, 4A in 4B: 50 µl raztopine gojišča RPMI-1640 z 2,11 mg/ml etanolnega ekstrakta propolisa, dobljenega s 70 % EtOH + 50µl kulture plesni ali kvasovk, 5A, 5B do 12A, 12B: 50 µl kulture plesni ali kvasovk in koncentracija etanolnega ekstrakta ali ostanka ekstrakta propolisa, ki je bila analogno zmanjšana, vrstici A in B od 3 do 12 etanolni ekstrakt propolisa, dobljen s 70 % EtOH, vrstici C in D od 3 do 12 etanolni ekstrakt propolisa, dobljen s 96 % EtOH, vrstici E in F od 3 do 12 ostanek ekstrakta propolisa

po ekstrakciji s 70 % EtOH, vrstici **G in H od 3 do 12** ostanek ekstrakta propolisa po ekstrakciji s 96 % EtOH

V prvi koloni mikrotitrsko ploščice (slika 5) so bile negativne kontrole (preglednica 9), tako smo zagotovili, da gojišče RPMI-1640, etanolni ekstrakti propolisa in ostanki ekstrakta propolisa niso kontaminirani. V drugi koloni (slika 5) smo naredili pozitivne kontrole (preglednica 9) tako, da smo v vdolbinice dodali samo gojišče RPMI-1640 s kulturo, pozitiven rezultat je potrdil, da je bila uporabljeni kultura metabolično aktivna. Podobno smo naredili tudi v vdolbinicah, v katere smo poleg gojišča in kulture dodali še 12,5 % EtOH. S tem poizkusom smo testirali, ali ima dodatek etanola vpliv na rast kvasovk ali plesni.

V vdolbinice v tretji koloni (slika 5) smo z avtomatsko pipeto dodali po 100 µl že prej pripravljene raztopine etanolnih ekstraktov propolisa (3.3.8.1). V vse ostale (4A, 5A, 6A, 7A, 8A, 9A, 10A, 11A, 12A, 4B, 5B, 6B, 7B, 8B, 9B, 10B, 11B, 12B, 4C, 5C, 6C, 7C, 8C, 9C, 10C, 11C, 12C, 4D, 5D, 6D, 7D, 8D, 9D, 10D, 11D, 12D, 4E, 5E, 6E, 7E, 8E, 9E, 10E, 11E, 12E, 4F, 5F, 6F, 7F, 8F, 9F, 10F, 11F, 12F, 4G, 5G, 6G, 7G, 8G, 9G, 10G, 11G, 12G, 4H, 5H, 6H, 7H, 8H, 9H, 10H, 11H in 12H) vdolbinice smo dodali po 50 µl gojišča RPMI-1640. V vdolbinice (3A, 3B, 3C, 3D, 3E, 3F, 3G in 3H), v katere smo dodali največjo koncentracijo etanolnega ekstrakta in ostanka ekstrakta propolisa, smo previdno premešali z avtomatsko pipeto z 10-kratnim potegom in prenesli 50 µl raztopine v naslednjo vdolbinico vodoravno, katera je že imela 50 µl gojišča RPMI-1640, Npr. v vdolbinico 3A smo dodali 100 µl etanolnega ekstrakta propolisa FS70 začetne koncentracije, ki smo ga z 10-kratnim potegom z avtomatsko pipeto previdno premešali. Odpipetirali smo 50 µl premešane raztopine in jo prenesli v vdolbinico 4A, katera je že vsebovala 50 µl gojišča RPMI-1640. Vsebino smo previdno premešali z avtomatsko pipeto z 10-kratnim potegom in odpipetirali 50 µl v vdolbinico 5A. Tako smo ponavljali vse do 12. vdolbinice, kjer smo preostanek raztopine 50 µl zavrgli. Tak način priprave razredčitev nam je zagotovil, da se je koncentracija etanolnega ekstrakta propolisa zmanjševala za polovico po koloni vodoravno. Končni volumen v vseh vdolbinicah je bil 50 µl. Ko smo napravili ustrezne razredčitve, smo v vse vdolbinice na mikrotitrski ploščici, razen v prvo kolono, dodali po 50 µl čiste kvasne ali plesne kulture. Mikrotitrsko ploščico smo pokrili in premešali na mešalu (500 vrtljajev/min, 1 minuto) in jo inkubirali 24 ur pri 25 °C. Po 48 urni ali po 192 urni inkubaciji smo v vsako vdolbinico dodali 10 µl raztopine INT s koncentracijo 0,02 mg/ml in premesali na mešalu (900 vrtljajev/min, 1 minuto). Ponovno je sledila inkubacija, 30 minut do 1 ure pri 25 °C. Potem smo določili vrednost MIC glede na obarvanost suspenzije v posamezni vdolbinici mikrotitrsko ploščico. Pozitivni rezultat, glivna aktivnost je bila določena s spremembbo barve gojišča v rdečo barvo. Prva neobarvana suspenzija v posamezni vrstici je predstavljala vrednost MIC etanolnega ekstrakta ali ostanka ekstrakta propolisa (Klančnik in sod., 2009).

Preglednica 9: Negativne (NK) in pozitivne (PK) kontrole pri metodi razredčevanja v mikrotitrski ploščici za določitev vrednosti MIC etanolnih ekstraktov propolisa za plesni in kvasovke

OZNAKA VDOLBINICE NA MIKROTITRSKI PLOŠČICI	DODANI REAGENTI V POSAMEZNI VDOLBINICI
NK RPMI-1640 (1A, 1B)	100 µl gojišča RPMI-1640
NK 12,5 % EtOH (1C, 1D)	100 µl gojišča RPMI-1640 z 12,5 % etanolom (96 %)
NK FS70 (1E)	100 µl gojišča RPMI-1640 in etanolni ekstrakt propolisa FS70 4,22 mg/ml
NK FS96 (1F)	100 µl gojišča RPMI-1640 in etanolni ekstrakt propolisa FS96 3,65 mg/ml
NK OS70 (1G)	100 µl gojišča RPMI-1640 in ostanek ekstrakta propolisa OS70 11,44 mg/ml
NK OS96 (1H)	100 µl gojišča RPMI-1640 in ostanek ekstrakta propolisa OS96 11,38 mg/ml
PK (2A, 2B, 2E, 2F)	50 µl gojišča RPMI-1640 in 50 µl inokuluma
PK 8 % EtOH (2C, 2D, 2G, 2H)	50 µl raztopine gojišča RPMI-1640 in 16 % etanola in 50 µl inokuluma

3.3.10 Rastna krivulja

Za rastne krivulje smo uporabili etanolni ekstrakt propolisa FS96 in bakterije vrst *L. monocytogenes* ŽM70 in *Salm. Enteritidis* ŽM138 ter plesni vrste *A. flavus* ZIM F70.

Inokulum bakterij smo pripravili tako, da smo 1 ml 24-urne kulture (3.3.2) prenesli v 20 ml gojišča MHB. V 20 ml gojišča MHB smo dodali tudi 1 ml FS96 (1,17 mg/ml). Raztopino smo dobro premešali.

Inokulum za plesni smo pripravili tako, da smo petrijevo ploščo, preraslo s plesnimi (3.3.3), prelili z 9 ml fiziološke raztopine, postrgali konidije, premešali in odpipetirali 1 ml raztopine v 20 ml gojišča RPMI-1640. V 20 ml gojišča RPMI-1640 s kulturo smo dodali 1 ml FS96 (1,82 mg/ml) in ponovno dobro premešali.

Pri rastnih krivuljah za bakterije vrst *L. monocytogenes* ŽM70 in *Salm. Enteritidis* ŽM138 ter plesni vrste *A. flavus* ZIM F70 smo naredili pozitivno kontrolno rasti, s katero smo določili njihovo optimalno rast v danih razmerah.

V času 0 ter po 2, 4, 6, 8, 10, 24 in 48 urah smo določili število bakterij in plesni z metodo štetja kolonij na trdnem gojišču (3.3.5).

3.1.11 Statistična obdelava rezultatov s testom ANOVA

Značilnosti statističnih metod je, da v začetni fazi postavijo domneve, nato jih preverijo in na podlagi dobljenih rezultatov na koncu domnevo zavržejo ali sprejmejo. V začetni fazi moramo postaviti osnovno domnevo oz. H_1 . Domneva H_1 trdi, da se vrednosti med seboj statistično razlikujejo. Poleg osnovne domene je potrebno postaviti nasprotnoč domnevo H_0 , ki trdi, da med vrednostmi ni razlik. Preden preverimo domneve, je potrebno postaviti

zgornjo mejo tveganja (α), pri kateri zavremo H_0 , saj želimo potrditi H_1 . Najpogosteje se uporablja 5 % (0,05), 1 % (0,01) in 0,1 % (0,001) stopnjo tveganja. H_0 zavrnemo, če je izračunana vrednost tveganja manjša od predpostavljene stopnje tveganja in sprejmemo H_1 (Adamič, 1989).

ANOVA – analiza variance je parametrična metoda, ki trdi, da so porazdelitve posameznih vzorcev ene statistične spremenljivke normalne in da se variance statističnih vzorcev med seboj statistično ne razlikujejo. Analiza variance proučuje variabilnost vseh statističnih vzorcev hkrati. Z merjenjem vsote kvadratov odklonov opazovanih vrednosti od aritmetične sredine določa skupno variabilnost, ki jo nato razčleni na dele, opredeljene z različnimi viri variiranja. Celotno varianco enot iz vseh vzorcev tako razstavi na varianco enot v posameznem vzorcu in varianco med temi vzorci (Košmelj in sod., 2002).

Ničelna domneva trdi, da vsi vzorci izhajajo iz populacije z enakimi povprečji in da varianca med skupinami ni večja od variance znotraj teh skupin. Osnovna domneva trdi, da obstajata dva vzorca, katerih povprečji se statistično razlikujeta. Kadar je vrednost p manjša od 0,05, sklepamo, da vzorci pripadajo različnim populacijam, oz. obstaja en par, ki ima različni povprečji. Tako zavrzemo ničelno hipotezo, ki trdi, da razlike ne obstajajo (Adamič, 1989).

Vrednosti so podane kot povprečje s standardnim odklonom. Statistično značilna razlika med vzorci je bila določena s testom ANOVA in je na slikah označena kot *($p<0,05$), **($p<0,01$) in *** ($p<0,001$).

4 REZULTATI Z RAZPRAVO

Predpostavili smo, da bodo imeli etanolni ekstrakti propolisa protibakterijski učinek na grampozitivne bakterije in gramnegativne bakterije. Da bi ugotovili koncentracije etanolnih ekstraktov propolisa, ki inhibirajo rast in razmnoževanje teh bakterij (vrednosti MIC), smo uporabili metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB v mikrotitrski ploščici z raztopino TTC in metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB v mikrotitrski ploščici z raztopino resazurin.

Ko smo z metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB v mikrotitrski ploščici z raztopino TTC določili vrednosti MIC, smo poskus naredili tudi z metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB, tako da smo uporabili vrednosti MIC, določene z metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB v mikrotitrski ploščici z raztopino TTC in še vrednosti 2 MIC.

Ko smo z metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB v mikrotitrski ploščici določili vrednosti MIC za etanolni ekstrakt propolisa FS96, smo te koncentracije uporabili za spremljanje rasti bakterij vrst *L. monocytogenes* ŽM70 in *Salm. Enteritidis* ŽM138.

Predpostavili smo tudi, da bodo imeli etanolni ekstrakti propolisa protigiven učinek na plesni in kvasovke. Da bi ugotovili koncentracije etanolnih ekstraktov propolisa, ki inhibirajo rast in razmnoževanje plesni in kvasovk, smo uporabili metodo difuzije v trdnem gojišču z diskami in metodo razredčevanja v tekočem gojišču RPMI-1640 v mikrotitrski ploščici z raztopino INT.

Ko smo z metodo razredčevanja v tekočem gojišču RPMI-1640 v mikrotitrski ploščici z raztopino INT določili vrednosti MIC za etanolni ekstrakt propolisa FS96, smo te koncentracije uporabili za spremljanje rasti plesni vrste *A. flavus* ZIM F70.

4.1 PROTIBAKTERIJSKA UČINKOVITOST ETANOLNIH EKSTRAKTOV PROPOLISA

Za etanolne ekstrakte propolisa smo predpostavili, da bodo imeli protibakterijski učinek in to smo preverili z bakterijami vrst *Staph. aureus* ŽMJ346, *Staph. aureus* ŽMJ72, *Strep. pyogenes* ŽM494, *B. cereus* ŽMJ164, *Ent. faecalis* ŽMJ90, *L. monocytogenes* ŽM58, *L. monocytogenes* ŽM70, *E. coli* ŽM370, *E. coli* O157 ŽMJ128, *Salm. Typhimurium* ŽM375 in *Salm. Enteritidis* ŽM138. Da bi ugotovili koncentracije etanolnih ekstraktov propolisa, ki inhibirajo rast in razmnoževanje teh bakterij (vrednosti MIC), smo uporabili metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB v mikrotitrski ploščici z raztopino TTC v prvem delu eksperimentov.

V drugem delu eksperimentov smo uporabili metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB v mikrotitrski ploščici z raztopino resazurin. Na podlagi vrednosti MIC, pridobljenih z metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB z uporabo raztopine TTC, smo poskus naredili tudi z metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB. Vse poskuse smo izvajali v paralelkah in rezultate podali kot povprečje paralelk.

Z etanolnim ekstraktom propolisa FS96 (pri koncentraciji, ki je ustrezala vrednosti MIC) smo nato določili še rastno krivuljo za bakterije vrst *Salm. Enteritidis* ŽM138 in *L. monocytogenes* ŽM70.

4.1.1 Minimalna inhibitorna koncentracija

4.1.1.1 Metoda razredčevanja v mikrotitrski ploščici

Pri metodi razredčevanja v tekočem gojišču MHB smo rezultate kvantificirali z raztopino TTC in z raztopino resazurin in tako določili protibakterijsko delovanje etanolnih ekstraktov propolisa (FS70, OS70, FS96 in OS96) pri 7 grampozitivnih in 4 gramnegativnih bakterijah. Primerjali smo razliko v protibakterijski učinkovitosti etanolih ekstraktov propolisa (FS70, OS70, FS96 in OS96) med posameznimi bakterijskimi vrstami in sevi z določitvijo minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) posameznega etanolnega ekstrakta propolisa za posamezen bakterijski sev. Za vsak sev smo uporabili 10 koncentracij vsakega etanolnega ekstrakta propolisa v koncentracijah (FS70 0,005–2,70 mg/ml; FS96 0,01–2,33 mg/ml; OS70 0,01–7,32 mg/ml; OS96 0,01–7,13 mg/ml).

Za pozitivne kontrole smo uporabili:

- gojišče MHB in bakterijsko kulturo,
- gojišče MHB z 8 % etanolom in z bakterijsko kulturo.

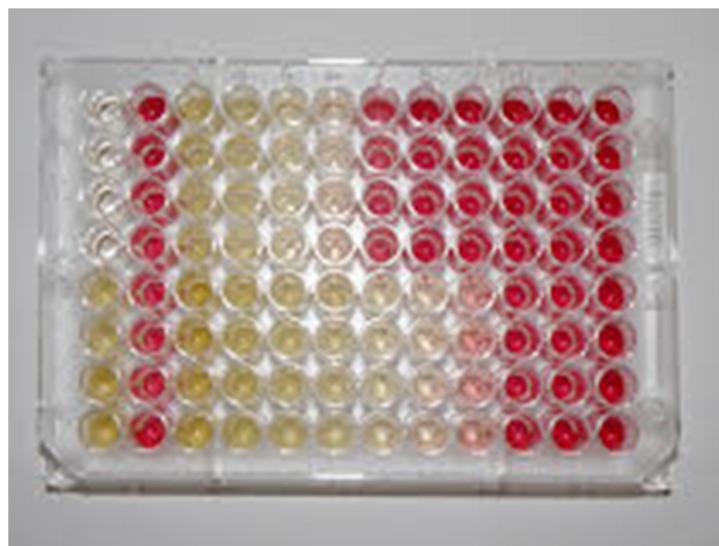
S pozitivnimi kontrolami smo preverili, da je uporabljeni kultura metabolično aktivna in da dodatek etanola nima vpliva na rast bakterij.

Za negativne kontrole smo uporabili:

- gojišče MHB,
- gojišče MHB z 8 % etanolom,
- gojišče MHB z 8 % etanolnim ekstraktom propolisa (FS70, FS96, OS70 in OS96).

Z negativnimi kontrolami smo zagotovili, da gojišče MHB, etanolni ekstrakti in ostanki ekstrakta propolisa niso kontaminirani.

Primer vrednotenja rezultatov je prikazan na sliki 6. Rdečkasto-roza obarvane vdolbinice (npr. vse vdolbinice v koloni 2), kažejo, da so v njih žive mikrobne celice. Vrednost MIC predstavlja zadnja neobarvana vdolbinica v vrstici (npr. kolona 7, vrstica 5). Dodane reagente in koncentracije etanolnih ekstraktov propolisa prikazuje slika 3.



Slika 6: Primer vrednotenja rezultatov pri metodi razredčevanja v mikrotitrski ploščici v gojišču MHB z raztopino TTC

Legenda: **MHB:** tekoče gojišče Mueller Hinton; **TTC:** 2,3,5-trifenil tetrazolijev klorid

Iz preglednice 10 je razvidno, da smo z metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB z raztopino TTC določili, da etanolni ekstrakti propolisa in ostanki ekstrakta propolisa delujejo protibakterijsko, saj smo vrednosti MIC določili za vse bakterije, z izjemo bakterij vrste *Ent. faecalis* ŽMJ90, za katere nismo določili vrednosti MIC, saj raztopina TTC ni obarvala gojišča z dodano bakterijsko kulturo (pozitivna kontrola).

Za vsak sev smo uporabili 10 koncentracij vsakega etanolnega ekstrakta propolisa v koncentracijah (FS70 0,005–2,70 mg/ml; FS96 0,01–2,33 mg/ml; OS70 0,01–7,32 mg/ml; OS96 0,01–7,13 mg/ml).

Prav tako kot pri metodi razredčevanja v tekočem gojišču MHB z raztopino TTC smo rezultate kvantificirali z metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB z raztopino resazurin in tako določili protibakterijsko delovanje etanolnih ekstraktov propolisa (FS70, OS70, FS96 in OS96) na 7 grampozitivnih in 4 gramnegativnih bakterijah. Primerjali smo razliko v protibakterijski učinkovitosti etanolnih ekstraktov propolisa (FS70, OS70, FS96 in OS96) med posameznimi bakterijskimi vrstami in sevi z določitvijo minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) posameznega etanolnega ekstrakta propolisa za posamezen bakterijski sev. Za vsak sev smo uporabili 10 koncentracij vsakega etanolnega ekstrakta propolisa v koncentracijah (FS70 0,005–2,70 mg/ml; FS96 0,01–2,33 mg/ml; OS70 0,01–7,32 mg/ml; OS96 0,01–7,13 mg/ml).

Za pozitivne kontrole smo uporabili:

- gojišče MHB in bakterijsko kulturo,
- gojišče MHB z 8 % etanolem in z bakterijsko kulturo.

Pri pozitivnih kontrolah smo preverili, da je uporabljenata kultura metabolično aktivna in da dodatek etanola nima vpliva na rast bakterij.

Za negativne kontrole smo uporabili:

- gojišče MHB,

- gojišče MHB z 8 % etanolom,
- gojišče MHB z 8 % etanolnim ekstraktom propolisa (FS70, FS96, OS70 in OS96).

Z negativnimi kontrolami smo zagotovili, da gojišče MHB, etanolni ekstrakti in ostanki ekstrakta propolisa niso kontaminirani.

Preglednica 10: Vrednosti MIC etanolnih ekstraktov in ostankov ekstrakta propolisa, določene z metodo razredčevanja v mikrotitrski ploščici v gojišču MHB za različne vrste bakterij

BAKTERIJE	MIC (mg/ml)							
	UPORABA TTC				UPORABA RESAZURINA			
	FS70	FS96	OS70	OS96	FS70	FS96	OS70	OS96
<i>Staph. aureus</i> ŽMJ346	0,17	0,15	0,11	0,57	0,68	0,58	3,66	0,45
<i>Staph. aureus</i> ŽMJ72	0,34	0,29	0,11	0,11	0,68	2,33	7,32	3,56
<i>B. cereus</i> ŽMJ164	0,17	0,29	0,11	0,11	0,34	0,29	0,92	0,22
<i>Ent. faecalis</i> ŽMJ90	/	/	/	/	1,35	1,17	0,92	0,89
<i>Strep. pyogenes</i> ŽM494	1,35	1,17	3,66	3,56	> 2,70	> 2,33	> 7,32	> 7,13
<i>L. monocytogenes</i> ŽM58	0,34	0,15	0,92	0,22	0,34	0,29	0,92	0,45
<i>L. monocytogenes</i> ŽM70	0,34	0,15	0,92	0,22	0,34	0,29	0,92	0,45
<i>E. coli</i> ŽM370	0,34	0,29	0,23	0,22	> 2,70	> 2,33	> 7,32	> 7,13
<i>E. coli</i> O157 ŽMJ128	0,68	0,58	0,23	0,22	> 2,70	> 2,33	> 7,32	> 7,13
<i>Salm. Typhimurium</i> ŽM375	1,35	1,17	3,66	3,56	> 2,70	> 2,33	> 7,32	> 7,13
<i>Salm. Enteritidis</i> ŽM138	1,35	1,17	3,66	3,56	> 2,70	> 2,33	> 7,32	> 7,13

Legenda: **FS70:** etanolni ekstrakt propolisa, dobljen s 70 % EtOH; **FS96:** etanolni ekstrakt propolisa dobljen s 96 % EtOH; **OS70:** ostank ekstrakta propolisa po ekstrakciji s 70 % EtOH; **FS96:** ostank ekstrakta propolisa po ekstrakciji s 96 % EtOH; **MIC:** minimalna inhibitorna koncentracija; **Uporaba TTC:** metoda razredčevanja v tekočem gojišču MHB v mikrotitrski ploščici z dodatkom raztopine TTC; **Uporaba resazurina:** metoda razredčevanja v tekočem gojišču MHB v mikrotitrski ploščici z dodatkom raztopine resazurin; **/:** TTC ni obarval raztopine in pozitivne kontrole

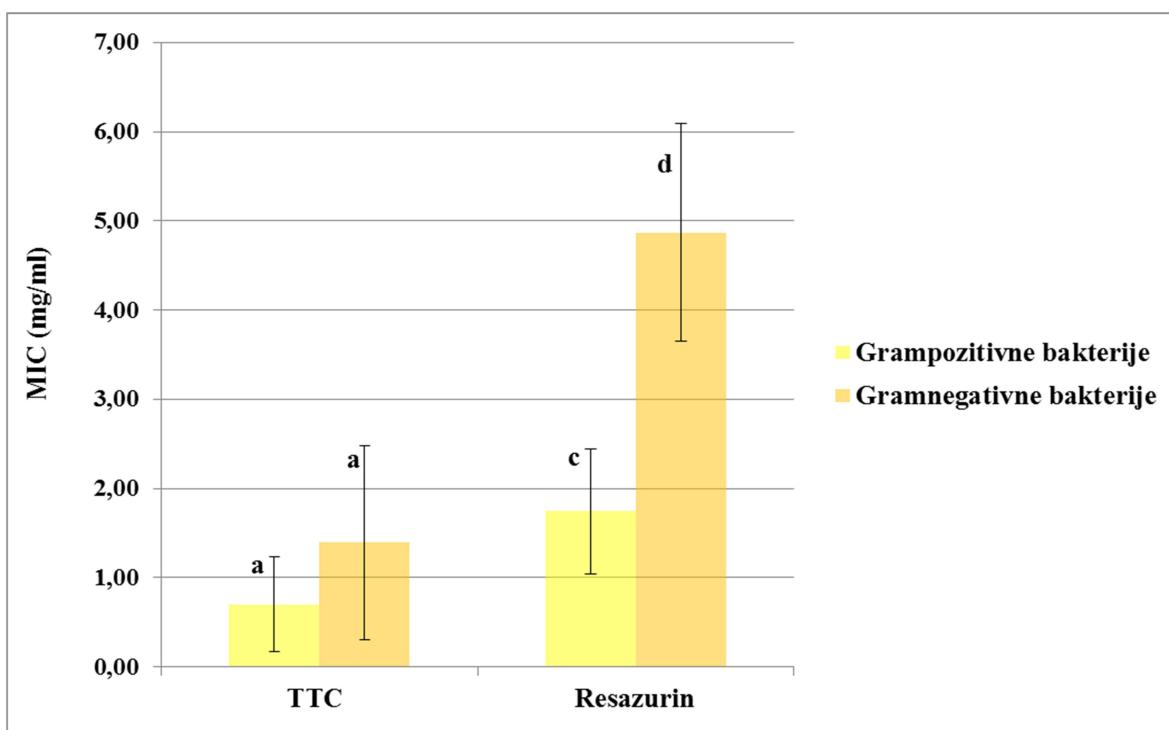
Analiza in primerjava vrednosti MIC:

Z različnimi primerjavami dobljenih rezultatov – vrednosti MIC smo ugotovili, da:

- z metodo razredčevanja v mikrotitrski ploščici z raztopino TTC nismo določili razlik v delovanju etanolnih ekstraktov propolisa in ostankov ekstrakta propolisa na grampozitivne bakterije ($p>0,05$) (povprečne vrednosti MIC za vse grampozitivne bakterije od $0,41\pm0,43$ mg/ml do $0,98\pm1,54$ mg/ml) in enako nismo določili razlik v delovanju etanolnih ekstraktov propolisa in ostankov ekstrakta propolisa na gramnegativne bakterije ($p>0,05$) (povprečne vrednosti MIC za vse gramnegativne bakterije od $0,80\pm0,44$ mg/ml do $1,95\pm0,98$ mg/ml) (priloga A);
- z metodo razredčevanja v mikrotitrski ploščici z raztopino resazurin ni bilo razlik v delovanju etanolnih ekstraktov propolisa in ostankov ekstrakta propolisa na grampozitivne bakterije ($p>0,05$) (povprečne vrednosti MIC za vse grampozitivne

bakterije od $0,92\pm0,86$ mg/ml do $3,14\pm3,03$ mg/ml), medtem ko so etanolni ekstrakti propolisa in ostanki ekstrakta propolisa imeli različno protibakterijsko učinkovitost pri gramnegativnih bakterijah ($p<0,001$) (povprečne vrednosti MIC za vse gramnegativne bakterije za FS70 2,70 mg/ml, za FS96 2,33 mg/ml, za OS70 7,32 mg/ml in za OS96 7,13 mg/ml) (priloga B);

- so vrednosti MIC za grampozitivne in gramnegativne bakterije različne, ko smo jih določili z metodo razredčevanja v mikrotitrski ploščici z resazurinom ($p<0,001$) (vrednosti MIC za grampozitivne bakterije $1,74\pm2,17$ mg/ml in vrednosti MIC za gramnegativne bakterije $4,87\pm2,44$ mg/ml), medtem ko ni razlik med vrednostmi MIC za grampozitivne in gramnegativne bakterije pri uporabi TTC ($p>0,05$) (vrednosti MIC za grampozitivne bakterije $0,70\pm1,06$ mg/ml in za gramnegativne bakterije $1,39\pm1,39$ mg/ml) (slika 7, priloga C).



Slika 7: Vrednosti MIC etanolnih ekstraktov propolisa in ostankov ekstrakta propolisa za grampozitivne in gramnegativne bakterije, določene z metodo razredčevanja v mikrotitrski ploščici z raztopino TTC in z raztopino resazurin

Legenda: MIC: minimalna inhibitorna koncentracija; TTC: 2,3,5-trifenil tetrazolijev klorid; a, c, d: vrednosti z različnimi oznakami se statistično značilno razlikujejo ($p<0,05$)

4.1.1.2 Metoda razredčevanja v tekočem gojišču

Z metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB smo želeli potrditi vrednosti MIC za etanolne ekstrakte propolisa (FS70, OS70, FS96 in OS96), pridobljene z metodo razredčevanja v tekočem gojišču z raztopino TTC (4.1.1.1). Za metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB smo uporabili koncentracijo etanolnih ekstraktov in ostankov ekstrakta propolisa, kjer smo določili vrednost MIC pri metodi razredčevanja v tekočem gojišču MHB v mikrotitrski ploščici z raztopino TTC in še 2 MIC. Analize smo izvedli v

paralelkah, rezultate pa podali kot njihovo povprečje v preglednici 11. V preglednici 11 so podane vrednosti MIC za grampozitivne bakterije in gramnegativne bakterije, določene z metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB v mikrotitrski ploščici z raztopino TTC (MIC_{MTP}) (4.1.1.1), in vrednosti MIC, določene z metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB. Pri nekaterih bakterijah, kot so npr. bakterije vrste *Staph. aureus* ŽMJ346, z metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB nismo določili protibakterijskega učinka pri nobeni od preizkušenih koncentracij etanolnih ekstraktov propolisa. Pri bakterijah vrst *Staph. aureus* ŽMJ72, *Ent. faecalis* ŽMJ90, *Strep. pyogenes* ŽM494 in *Salm. Enteritidis* ŽM138 smo določili pri vseh etanolnih ekstraktih propolisa enake vrednosti MIC ali vrednosti 2 MIC kot pri metodi razredčevanja v mikrotitrski ploščici.

Preglednica 11: Vrednosti MIC etanolnih ekstraktov propolisa in ostankov ekstrakta propolisa, določene z metodo razredčevanja v gojišču MHB za različne vrste bakterij

BAKTERIJE	$\text{MIC}_{\text{MTP}}/\text{MIC}$ (mg/ml)			
	FS70	FS96	OS70	OS96
<i>Staph. aureus</i> ŽMJ346	0,17/> 0,34	0,15/> 0,29	0,11/> 0,23	0,57/> 0,11
<i>Staph. aureus</i> ŽMJ72	0,34/0,34	0,29/0,29	0,11/0,11	0,11/0,11
<i>B. cereus</i> ŽMJ164	0,17/0,34	0,29/0,29	0,11/> 0,23	0,11/> 0,22
<i>Ent. faecalis</i> ŽMJ90	0,00/1,35	0,00/2,33	0,00/0,92	0,00/1,78
<i>Strep. pyogenes</i> ŽM494	1,35/1,35	1,17/2,33	3,66/3,66	3,56/3,56
<i>L. monocytogenes</i> ŽM58	0,34/> 0,68	0,15/> 0,29	0,92/0,92	0,22/> 0,45
<i>L. monocytogenes</i> ŽM70	0,34/> 0,68	0,15/> 0,29	0,92/0,92	0,22/> 0,45
<i>E. coli</i> ŽM370	0,34/> 0,68	0,29/> 0,29	0,23/> 0,46	0,22/> 0,45
<i>E. coli</i> O157 ŽMJ128	0,68/1,35	0,58/1,17	0,23/> 0,46	0,22/> 0,45
<i>Salm. Typhimurium</i> ŽM375	1,35/> 2,70	1,17/> 2,34	3,66/7,32	3,56/7,13
<i>Salm. Enteritidis</i> ŽM138	1,35/1,35	1,17/1,17	3,66/3,66	3,56/3,56

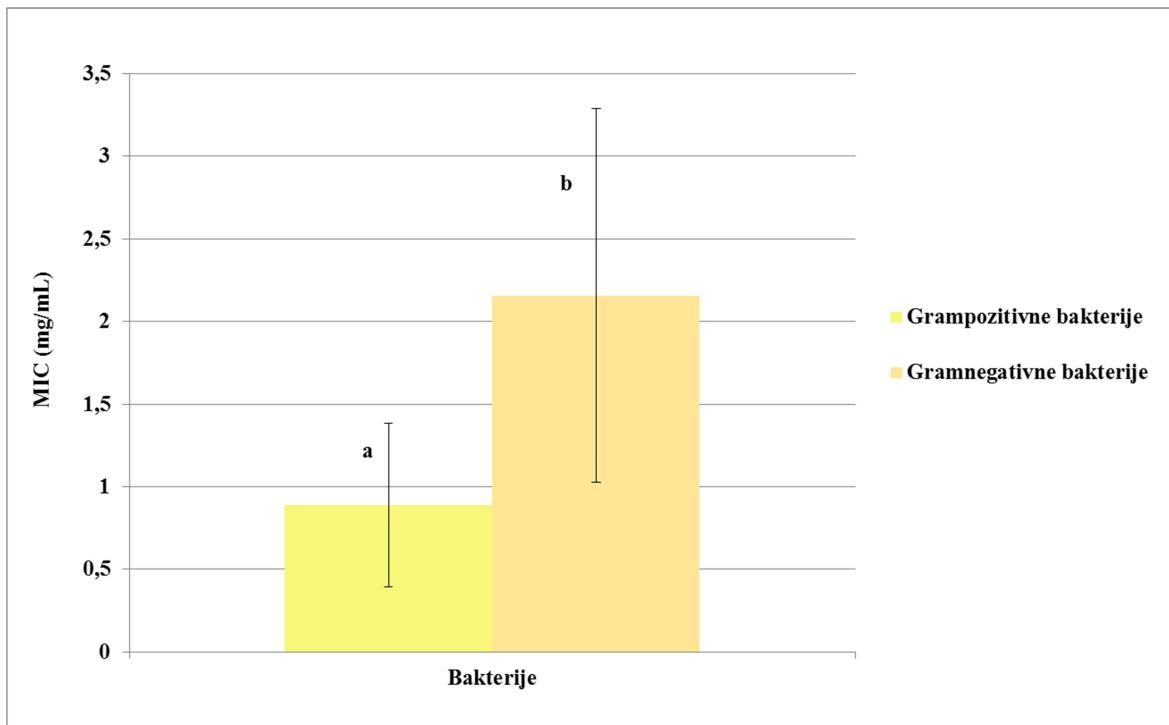
Legenda: MIC_{MTP} : minimalna inhibitorna koncentracija, določena z metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB v mikrotitrski ploščici z raztopino TTC (4.1.1.1); MIC: minimalna inhibitorna koncentracija, določena z metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB; FS70: etanolni ekstrakt propolisa, dobljen s 70 % EtOH, FS96: etanolni ekstrakt propolisa, dobljen s 96 % EtOH, OS70: ostanek ekstrakta propolisa po ekstrakciji s 70 % EtOH, FS96: ostanek ekstrakta propolisa po ekstrakciji s 96 % EtOH

Analiza in primerjava vrednosti MIC:

Z različnimi primerjavami rezultatov – vrednosti MIC z metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB smo ugotovili, da:

- ni razlik v delovanju etanolnih ekstraktov propolisa in ostankov ekstrakta propolisa na grampozitivne bakterije ($p>0,05$) ((povprečne vrednosti MIC za vse grampozitivne bakterije od $0,72\pm0,45$ mg/ml do $1,00\pm1,23$ mg/ml) in ni razlik v delovanju etanolnih ekstraktov propolisa in ostankov ekstrakta propolisa na gramnegativne bakterije ($p>0,05$) (povprečne vrednosti MIC za vse gramnegativne bakterije od $1,24\pm0,84$ mg/ml do $2,98\pm3,27$ mg/ml) (priloga D);

- med vrednostmi MIC za grampozitivne in gramnegativne bakterije so razlike v delovanju etanolnih ekstraktov propolisa (povprečne vrednosti MIC za grampozitivne bakterije $0,89\pm0,99$ mg/ml in povprečne vrednosti MIC za gramnegativne bakterije $2,16\pm2,26$ mg/ml) ($p\leq0,05$), (slika 8, priloga E).



Slika 8: Vrednosti MIC etanolnih ekstraktov propolisa za grampozitivne in gramnegativne bakterije, določene z metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB

Legenda: MIC: minimalna inhibitorna koncentracija; a, b: vrednosti MIC z različnimi oznakami se statistično značilno razlikujejo ($p<0,05$)

Znano je, da so gramnegativne bakterije splošno odpornejše proti bioaktivnim spojinam kot grampozitivne bakterije. To dejstvo pripisujemo slabi penetraciji bioaktivne spojine, kot strukturi in zgradbi celične stene mikroorganizma (Maillard, 2002.). Učinkovitost etanolnih ekstraktov propolisa znotraj skupine grampozitivnih bakterij in znotraj gramnegativnih bakterij, določena z metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB v mikrotitrski ploščici z raztopino TTC in uporabo resazurina, je različna. Etanolni ekstrakti propolisa so bili učinkovitejši na grampozitivne bakterije *Staph. aureus* ŽMJ346, *Staph. aureus* ŽMJ72, *B. cereus* ŽMJ164, *L. monocytogenes* ŽM58, *L. monocytogenes* ŽM70, kot na grampozitivne bakterije *Ent. faecalis* ŽMJ90 in *Strep. pyogenes* ŽM494 (preglednica 10).

Občutljivost bakterij znotraj skupine gramnegativnih bakterij na etanolne ekstrakte propolisa je bila tudi različna. Tako je propolis učinkovitejši proti bakterijam vrst *E. coli* ŽM370 in *E. coli* O157 ŽMJ128 vrednosti MIC (FS70 0,34–0,68 mg/ml; FS96 0,29–0,58 mg/ml; OS70 0,23 mg/ml; OS96 0,22 mg/ml) kot proti bakterijam *Salm. Typhimurium* ŽM375 in *Salm. Enteritidis* ŽM138 (FS70 1,35 mg/ml; FS96 1,17 mg/ml; OS70 3,66 mg/ml; OS96 3,56 mg/ml). Prav tako so Mavri in sod. (2012) pokazali različno učinkovitost propolisa znotraj skupine gramnegativnih bakterij. Tako je propolis učinkovitejši proti bakterijam rodu *Campylobacter* vrednosti (MIC 0,27–0,38 mg

ekvivalenta klorogenske kisline (CAE/ml)), kot proti bakterijam vrste *E. coli* in rodu *Salmonella* (MIC 0,66–0,78 mg CAE/ml). Vrednosti MIC za grampozitivne bakterije so določili med 0,49–0,59 mg CAE/ml.

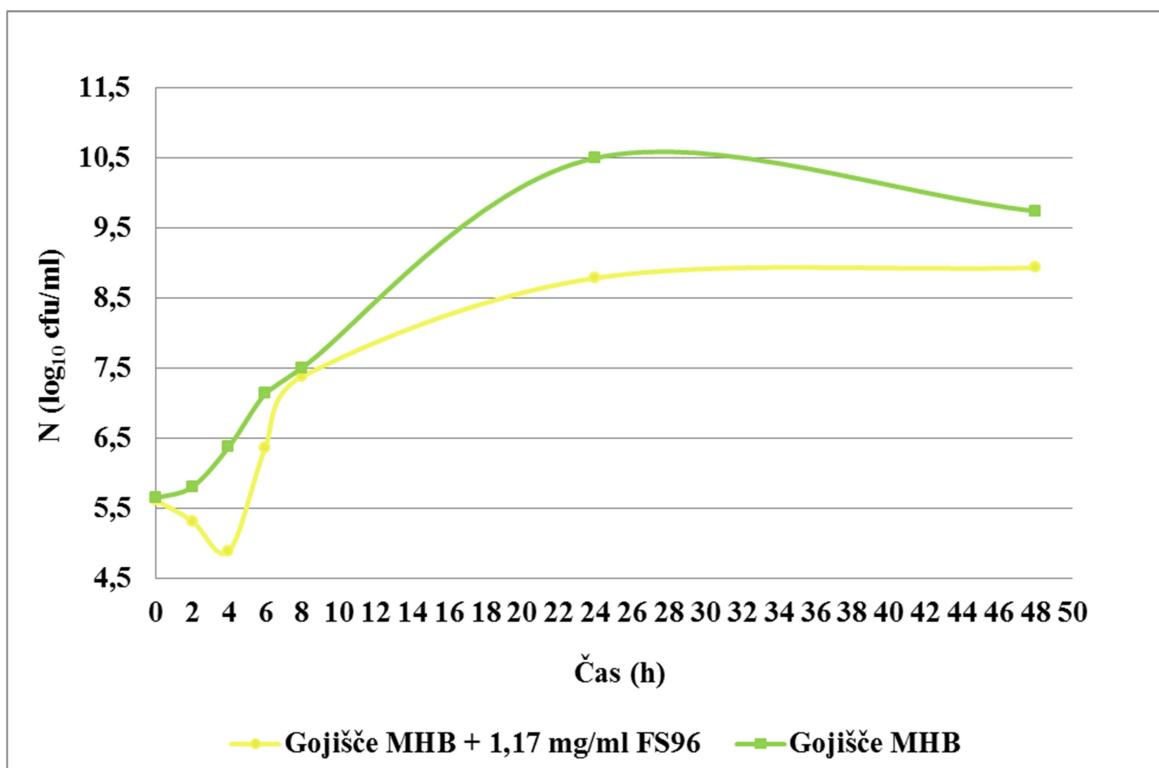
Kalogeropoulos in sod. (2009) so pokazali, da so bakterije vrst *Staph. aureus*, *B. cereus* in *L. monocytogenes* občutljivejše na propolis kot bakterije vrste *Staph. epidermidis*. V naši raziskavi smo tudi potrdili občutljivost bakterij *B. cereus*, *L. monocytogenes* in *Staph. aureus* na etanolne ekstrakte propolisa. Tudi Mohammadzadeh in sod., (2007) so pokazali, da so bakterije, kot so *Staph. aureus* (vrednosti MIC 125 µg/ml), *Staph. epidermidis* (vrednosti MIC 125 µg/ml) in bakterije *B. cereus* (vrednosti MIC 250 µg/ml), občutljivejše na ekstrakt propolisa kot *P. aeruginosa* (vrednosti MIC 500 µg/ml) in *E. coli* (vrednosti MIC 500 µg/ml). Serra in Escola (1995) sta določila, da je bilo potrebno 60–80 µg/ml propolisa za inhibicijo rasti bakterij *Bacillus subtilis* in *Staph. aureus* in 600–800 µg/ml za inhibicijo *E. coli*.

Vrednosti MIC, pridobljene z metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB v mikrotitrski ploščici z raztopino TTC (grampozitivne bakterije MIC $0,70\pm1,06$ mg/ml; gramnegativne bakterije $1,39\pm1,39$ mg/ml) ali resazurinom (grampozitivne bakterije MIC $1,74\pm2,17$ mg/ml; gramnegativne bakterije $4,87\pm2,44$ mg/ml), se razlikujejo. Prav tako se razlikujejo vrednosti MIC, pridobljene z metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB (grampozitivne bakterije MIC $0,89\pm0,99$ mg/ml; gramnegativne bakterije $2,16\pm2,26$ mg/ml). So pa pri vseh treh metodah določitve protimikrobne aktivnosti bakterij občutljivejše grampozitivne bakterije.

Heimbach in sod. (2016) so v svoji raziskavi dokazali, da tudi ostanki vodno alkoholnih ekstraktov zelenega in rjavega propolisa učinkujejo protibakterijsko na grampozitivne in gramnegativne bakterije v krmi prežvekovalcev. Potrdili so, da dodatek ostanka ekstrakta propolisa v krmo prežvekovalcev pripomore k boljšemu zdravju prežvekovalcev. Prav tako kot mi so dokazali večji zaviralni učinek ostanka ekstrakta na grampozitivne bakterije (*Staph. aureus*, *Staph. intermedius*) kot na gramnegativne bakterije (*E. coli*, *Salmonella* in *Klebsiella*). Nobenega učinka ni imel ostanek ekstrakta na bakterije rodu *Pseudomonas*, katere v naši raziskavi nismo analizirali.

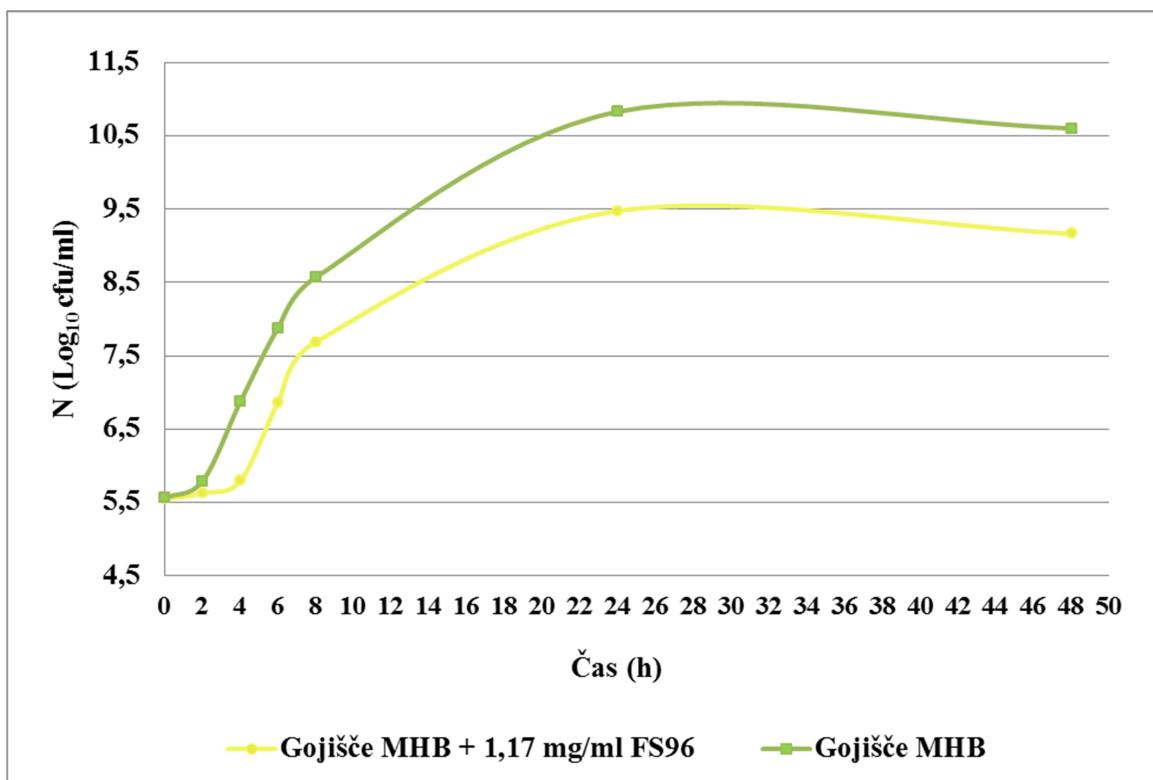
4.1.2 Rastna krivulja

Rast bakterij vrste *Salm. Enteritidis* ŽM138 smo 48 ur spremljali v tekočem gojišču MHB z etanolnim ekstraktom propolisa FS96 (1,17 mg/ml). Rezultati na sliki 9 kažejo, da so bakterije v gojišču MHB z dodanim etanolnim ekstraktom FS96 v začetku približno od 1 do 4 ure odmirale, nato pa so prešle v fazo eksponentne rasti od 4. ure do 8. ure. Število bakterij v gojišču MHB z dodanim etanolnim ekstraktom propolisa FS96 in število bakterij v gojišču MHB brez etanolnega ekstrakta propolisa FS96 se po 8 urah skoraj izenači, vendar pa je število bakterij po 24 urah občutno nižje v primerjavi s kontrolo, kjer v gojišču MHB ni bilo prisotnega etanolnega ekstrakta propolisa FS96. Po 48 urah je opaziti zmanjšanje in odmiranje bakterijskih celic v obeh gojiščih, z in brez etanolnega ekstrakta propolisa FS96, le da je število bakterijskih celic z dodatkom etanolnega ekstrakta FS96 manjše. Etanolni ekstrakt propolisa FS96 pri koncentraciji 1,17 mg/ml zmanjša rast bakterij *Salm. Enteritidis* ŽM138.



Slika 9: Rast bakterij seva *Salm. Enteritidis* ŽM138 v tekočem gojišču MHB z etanolnim ekstraktom propolisa FS96 (koncentracija ekstrakta v gojišču 1,17 mg/ml)

V tekočem gojišču MHB z etanolnim ekstraktom propolisa FS96 (1,17 mg/ml) smo 48 ur spremljali tudi rast bakterij vrste *L. monocytogenes* ŽM70. Na sliki 10 vidimo, da je število bakterij v začetni fazi rasti v gojišču MHB brez etanolnega ekstrakta propolisa FS96 malenkostno večje in da je faza lag krajša za 2 uri v primerjavi z bakterijami v gojišču MHB z etanolnim ekstraktom propolisa FS96, kjer traja faza lag 4 ure. Nadaljnja rast bakterij v gojišču MHB brez etanolnega ekstrakta propolisa FS96 in rast bakterij v gojišču MHB z etanolnim ekstraktom propolisa FS96 se razlikuje v številu bakterijskih celic, katero je občutno manjše v gojišču MHB z dodanim etanolnim ekstraktom propolisa FS96. Etanolni ekstrakt propolisa (FS96, 1,17 mg/ml) malenkostno zmanjša rast in deluje inhibitorno na bakterije vrste *L. monocytogenes* ŽM70.



Slika 10: Rast bakterij vrste *L. monocytogenes* ŽM70 v tekočem gojišču MHB z etanolnim ekstraktom propolisa FS96 (koncentracija ekstrakta v gojišču 1,17 mg/ml)

Salomão in sod. (2004) so v svoji raziskavi potrdili protimikroben delovanje etanolnega ekstrakta propolisa. Ekstrakt propolisa so pridobili s 70 % etanolom (1:10, v/v). Vrednosti MIC, določene za brazilske propolise za bakterije vrst *Staph. aureus* (1638,4 µg/ml) in *Staph. aureus* (MRSA) (6553,6 µg/ml), so v primerjavi z vrednostmi MIC, določenimi za bolgarski propolis za bakterije vrst *Staph. aureus* (102,4 µg/ml) in *Staph. aureus* MRSA (409,6 µg/ml), občutno večje. To je lahko v povezavi z dejstvom, da so v brazilskem propolisu identificirali malo flavonoidov (Salomão in sod., 2004). Flavonoidi, kot so flavonon pinocembrin in flavonol galangin in fenetilni ester kavne kisline, inhibirajo delovanje RNA polimeraze (Takaisi in Sejoncjer, 1994). Cushine in Lamb (2005), pa menita, da je mehanizem delovanja flavonoidov, kot je galangin, v zmanjšanju citoplazemske membrane bakterijske celice, kar vodi k zmanjšanju koncentracije kalijevega iona in posledično je bakterijska celica primorana k avtolizi.

4.2 PROTIGLIVNA UČINKOVITOST ETANOLNIH EKSTRAKTOV PROPOLISA

Predpostavili smo, da bodo etanolni ekstrakti propolisa imeli protiglivni učinek na plesni vrst *P. verrucosum* ŽMJ23, *Penicillium* sp. ŽM24, *A. flavus* ZIM F70, *A. flavus* ŽMJ7 ter na kvasovke vrst *C. intermedia* ŽMJ23 in *C. albicans* ŽMJ32. Da bi ugotovili koncentracije etanolnih ekstraktov propolisa (preglednica 6), ki inhibirajo rast in razmnoževanje gliv, smo uporabili metodo difuzije v trdnem gojišču z diskami (3.3.8).

Poleg metode difuzije v trdnem gojišču z diskami smo protiglivni učinek etanolnih ekstraktov propolisa določili tudi z metodo razredčevanja v mikrotitrski ploščici v tekočem gojišču RPMI-1640 z indikatorjem INT (3.3.9). S koncentracijo etanolnega ekstrakta propolisa

FS96, ki je ustrezala vrednosti MIC, pridobljeni z metodo razredčevanja v tekočem gojišču RPMI, smo nato določili še rastno krivuljo za plesni vrste *A. flavus* ZIM F70 (3.3.10).

4.2.1 Protiglivna aktivnost, določena z metodo difuzije v trdnem gojišču z diskami

Z metodo difuzije v gojišču krompirjev glukozni agar (3.3.8) smo določali protiglivno učinkovitost štirih etanolnih ekstraktov propolisa pri plesnih vrst *P. verrucosum* ŽMJ23, *Penicillium* sp. ŽMJ24, *A. flavus* ŽMJ7 in *A. flavus* ZIM F70.

Prav tako smo z metodo difuzije v gojišču sladni ekstrakt določali protiglivno učinkovitost štirih etanolnih ekstraktov propolisa pri kvasovkah vrst *C. intermedia* ŽMJ23 in *C. albicans* ŽMJ32.

Primerjali smo razliko v protiglivni učinkovitosti etanolnih ekstraktov propolisa (preglednica 6) med posameznimi vrstami plesni in kvasovk ter določili minimalno inhibitorno koncentracijo posameznega ekstrakta.

Za določitev vrednosti MIC smo uporabili 10 koncentracij vsakega etanolnega ekstrakta in ostanka ekstrakta propolisa v koncentracijskem območju FS70 4,22–0,01 mg/ml, FS96 3,65–0,01 mg/ml, OS70 11,44–0,02 mg/ml in za OS96 11,14–0,02 mg/ml. Za negativno kontrolo smo uporabili 2 krat destilirano vodo, preverili smo tudi učinek absolutnega etanola (96 %).

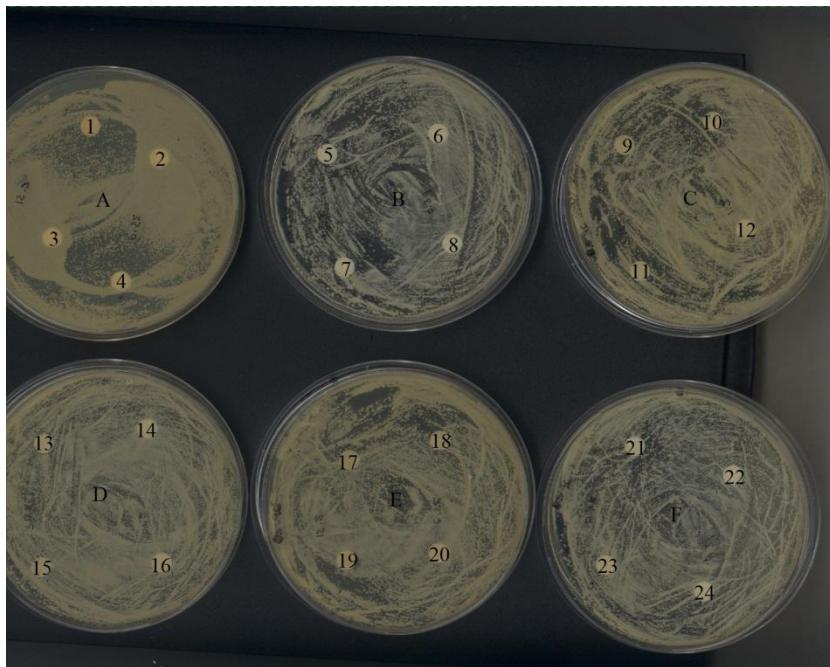
Iz rezultatov (slika 11) je bilo razvidno, da ima absolutni etanol protiglivni učinek na kvasovke vrste *Candida intermedia* ŽMJ23. Zaradi pozitivnega rezultata pri negativnem kontrolnem vzorcu metode difuzije v trdnem gojišču pri kvasovkah vrste *C. intermedia* ŽMJ23 nismo uporabili.



Slika 11: Primer rezultatov pri metodi difuzije v trdnem gojišču sladni ekstrakt pri kvasovkah vrste *C. intermedia* ŽMJ23

Legenda: 1, 2: 2-krat destilirana voda, 3, 4: absolutni etanol

Pri kvasovkah vrste *C. albicans* ŽMJ32, smo določili vrednost MIC za etanolni ekstrakt propolisa FS70, in sicer pri 4,218 mg/ml. Pri ostalih koncentracijah etanolnega ekstrakta in ostanka ekstrakta propolisa ni bilo cone inhibicije rasti (slika 12).



Slika 12: Primer rezultatov pri metodi difuzije v trdnem gojišču sladni ekstrakt pri kvasovkah vrste *C. albicans* ŽMJ32

Legenda: **A, B, D:** gojišča sladnega ekstrakta in kvasovke vrste *Candida albicans* ŽMJ32, **1 in 3:** 11,44 mg/ml ostanka ekstrakta propolisa po ekstrakciji s 70 % EtOH, **2 in 4:** 5,72 mg/ml ostanka ekstrakta propolisa po ekstrakciji s 70 % EtOH, **5 in 7:** 0,78 mg/ml ostanka ekstrakta propolisa po ekstrakciji s 70 % EtOH, **6 in 8:** 0,36 mg/ml ostanka ekstrakta propolisa po ekstrakciji s 70 % EtOH, **13 in 15:** 2,86 mg/ml ostanka ekstrakta propolisa po ekstrakciji s 70 % EtOH, **14 in 16:** 1,43 mg/ml ostanka ekstrakta propolisa po ekstrakciji s 70 % EtOH, **C, E, F:** gojišča sladnega ekstrakta in kvasovke vrste *Candida albicans* ŽMJ32, **9 in 11:** 2,78 mg/ml ostanka ekstrakta propolisa po ekstrakciji s 96 % EtOH, **10 in 12:** 1,39 mg/ml ostanka ekstrakta propolisa po ekstrakciji s 96 % EtOH, **17 in 19:** 11,14 mg/ml ostanka ekstrakta propolisa po ekstrakciji s 96 % EtOH, **18 in 20:** 5,57 mg/ml ostanka ekstrakta propolisa po ekstrakciji s 96 % EtOH, **21 in 23:** 0,70 mg/ml ostanka ekstrakta propolisa po ekstrakciji s 96 % EtOH, **22 in 24:** 0,39 mg/ml ostanka ekstrakta propolisa po ekstrakciji s 70 % EtOH

Ugotovili smo, da ima absolutni etanol (96 %) protiglivni učinek na plesni vrst *P. verrucosum* ŽMJ23 in *Penicillium* sp. ŽM24. Zaradi pozitivnega rezultata pri negativnih kontrolnih vzorcih metode difuzije v trdnem gojišču pri plesnih vrst *P. verrucosum* ŽMJ23 in *Penicillium* sp. ŽM24 nismo uporabili.

Pri plesnih vrst *A. flavus* ŽMJ7 in *A. flavus* ZIM F70 absolutni etanol (96 %) ni imel inhibitornega učinka na rast plesni. Etanolni ekstrakti in ostanki ekstrakta propolisa v preizkušenih koncentracijah tudi niso inhibirali rasti plesni vrst *A. flavus* ŽMJ7 in *A. flavus* ZIM F70.

4.2.2 Minimalna inhibitorna koncentracija

Z metodo razredčevanja v mikrotitrski ploščici v tekočem gojišču RPMI-1640 z indikatorjem metabolne aktivnosti INT (3.3.9) smo ugotavljali protiglivno delovanje etanolnih ekstraktov propolisa (FS70, FS96, OS70 in OS96) pri 4 vrstah plesni in 2 vrstah kvasovk. Primerjali smo razliko v protiglivni učinkovitosti etanolnih ekstraktov propolisa (FS70, FS96, OS70 in OS96) med posameznimi vrstami plesni in kvasovk ter določili

minimalno inhibitorno koncentracijo (MIC) posameznega etanolnega ekstrakta propolisa. Za vsako vrsto plesni ali kvasovk smo uporabili 10 koncentracij vsakega etanolnega ekstrakta propolisa v koncentracijah FS70 4,22–0,01 mg/ml, FS96 3,65–0,01 mg/ml, OS70 11,44–0,02 mg/ml in za OS96 11,14–0,02 mg/ml.

Za pozitivno kontrolo smo uporabili:

- gojišče RPMI-1640 in kulturo plesni ali kvasovk,
- gojišče RPMI-1640 z 12,5 % etanolom in s kulturo plesni ali kvasovk.

S pozitivnimi kontrolami smo preverili, da je uporabljeni kultura metabolično aktivna in da dodatek 12,5 % etanola nima vpliva na njihovo rast.

Za negativne kontrole smo uporabili:

- gojišče RPMI-1640,
- gojišče RPMI-1640 z 12,5 % etanolom,
- gojišče RPMI-1640 z 12,5 % etanolnim ekstraktom propolisa (FS70, OS70, FS96 in OS96).

Z negativnimi kontrolami smo zagotovili, da gojišče RPMI-1640, etanolni ekstrakti propolisa in ostanki ekstrakta propolisa niso kontaminirani.

Določili smo vrednosti MIC glede na obarvanost suspenzije v posamezni vdolbinici mikrotitrsko ploščice. Prva neobarvana suspenzija v posamezni vrstici je predstavljala MIC etanolnega ekstrakta propolisa (Klančnik in sod., 2009).

Iz preglednice 12 je razvidno, da imajo vsi etanolni ekstrakti in ostanki ekstrakta propolisa protiglivni učinek na plesni vrst *P. verrucosum* ŽMJ23, *Penicillium* sp. ŽM24, *A. flavus* ŽMJ7 in *A. flavus* ZIM F70 in na kvasovke vrst *C. intermedia* ŽMJ23 in *C. albicans* ŽMJ32. Razvidno je tudi, da so vrednosti MIC za plesni oz. kvasovke posameznega rodu za etanolne ekstrakte propolisa FS70, FS96, OS70 in OS96 enake.

Iz preglednice 12 je razvidno, da pri kvasovkah vrst *C. intermedia* ŽMJ23 in *C. albicans* ŽMJ32 po 8 dneh inkubacije ni rasti, kar za plesni ne moremo trditi. Protiglivni učinek etanolnega ekstrakta propolisa po 8 dneh na plesni vrst *P. verrucosum* ŽMJ23, *Penicillium* sp. ŽM24, *A. flavus* ŽMJ7 in *A. flavus* ZIM F70 se zmanjša, saj so vse vrednosti MIC večje kot po dveh dneh inkubacije.

Preglednica 12: Vrednosti MIC etanolnih ekstraktov propolisa in ostankov ekstrakta propolisa, določene z metodo razredčevanja v mikrotitrski ploščici v gojišču RPMI-1640 za različne vrste plesni in kvasovk

PLESNI IN KVASOVKE	VREDNOST MIC (mg/ml)							
	ODČITAVANJE PO 2 DNEH				ODČITAVANJE PO 8 DNEVIH			
	FS 70	FS 96	OS 70	OS 96	FS 70	FS 96	OS 70	OS 96
<i>P. verrucosum</i> ŽMJ23	1,05	0,91	5,72	5,57	2,11	1,82	11,44	11,14
<i>Penicillium</i> sp. ŽM24	1,05	0,91	5,72	5,57	2,11	1,82	11,44	11,14
<i>A. flavus</i> ZIM F70	0,53	0,46	2,86	2,78	2,11	1,82	11,44	11,14
<i>A. flavus</i> ŽMJ7	0,53	0,46	2,86	2,78	2,11	1,82	11,44	11,14
<i>C. albicans</i> ŽMJ32	0,53	0,46	0,72	0,70	/	/	/	/
<i>C. intermedia</i> ŽM23	0,53	0,46	0,72	0,70	/	/	/	/

Legenda: **FS70:** etanolni ekstrakt propolisa, dobljen s 70 % EtOH; **FS96:** etanolni ekstrakt propolisa, dobljen s 96 % EtOH; **OS70:** ostanek ekstrakta propolisa po ekstrakciji s 70 % EtOH; **OS96:** ostanek ekstrakta propolisa po ekstrakciji s 96 % EtOH; **MIC:** minimalna inhibitorna koncentracija; /: ni rasti

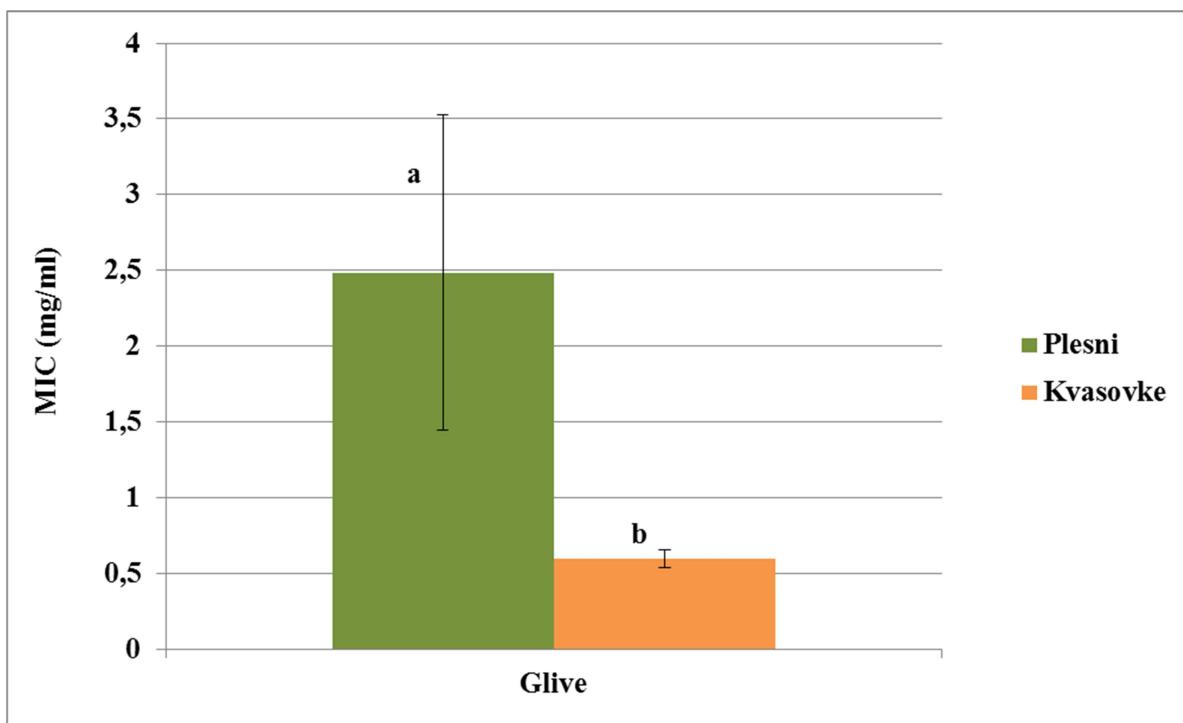
Analiza in primerjava vrednosti MIC:

Z različnimi primerjavami rezultatov – vrednosti MIC, dobljenih z metodo razredčevanja v mikrotitrski ploščici v tekočem gojišču RPMI, smo ugotovili, da:

- sta etanolna ekstrakta propolisa protiglivno učinkovitejša kot ostanka ekstrakta propolisa pri kvasovkah ($p<0,001$) in pri plesnih ($p<0,001$) (za kvasovke so vrednosti MIC FS od $0,46\pm0,00$ mg/ml do $0,53\pm0,00$ mg/ml in vrednosti MIC OS od $0,70\pm0,00$ mg/ml do $0,72\pm0,00$ mg/ml; v povprečju so za plesni vrednosti MIC FS od $0,68\pm0,26$ mg/ml do $0,79\pm0,30$ mg/ml in vrednosti MIC OS od $4,18\pm1,61$ mg/ml do $4,29\pm1,65$ mg/ml) (priloga F);
- so razlike v delovanju etanolnih ekstraktov propolisa (FS70, FS96, OS70 in OS96) na kvasovke in plesni, inkubirane 2 dni, in na plesni, inkubirane 8 dni ($<0,001$); v povprečju so za kvasovke vrednosti MIC (FS70 $0,53\pm0,00$ mg/ml; FS96 $0,46\pm0,00$ mg/ml; OS70 $0,72\pm0,00$ mg/ml in OS96 $0,70\pm0,00$ mg/ml); za plesni, inkubirane 2 dni, so vrednosti MIC (FS70 $0,79\pm0,30$ mg/ml; FS96 $0,68\pm0,26$ mg/ml; OS70 $4,29\pm1,65$ mg/ml in OS96 $4,18\pm1,61$ mg/ml) in za plesni, inkubirane 8 dni, so vrednosti MIC (FS70 $2,11\pm0,00$ mg/ml; FS96 $1,82\pm0,00$ mg/ml; OS70 $11,44\pm0,00$ mg/ml in OS96 $11,14\pm0,00$ mg/ml) (priloga F);
- je za kvasovke etanolni ekstrakt propolisa FS96 učinkovitejši kot FS70 ($<0,001$) (vrednosti MIC FS96 $0,46\pm0,00$ mg/ml in FS70 $0,53\pm0,00$ mg/ml) in da je ostanek etanolnega ekstrakta propolisa OS96 učinkovitejši kot OS70 ($\leq0,01$) (vrednosti MIC OS96 $0,70\pm0,00$ mg/ml in OS70 $0,72\pm0,00$ mg/ml) (priloga F);
- ni razlik v delovanju etanolnega ekstrakta propolisa FS70 in FS96 na plesni, inkubirane 2 dni ($>0,05$), in prav tako ni razlik ($>0,05$) v delovanju ostankov etanolnega ekstrakta propolisa OS70 in OS96 na plesni, inkubirane 2 dni (vrednosti

MIC FS70 $0,79\pm0,30$ mg/ml, FS96 $0,68\pm0,26$ mg/ml; OS70 $4,29\pm1,65$ mg/ml; OS96 $4,18\pm1,61$ mg/ml) (priloga F);

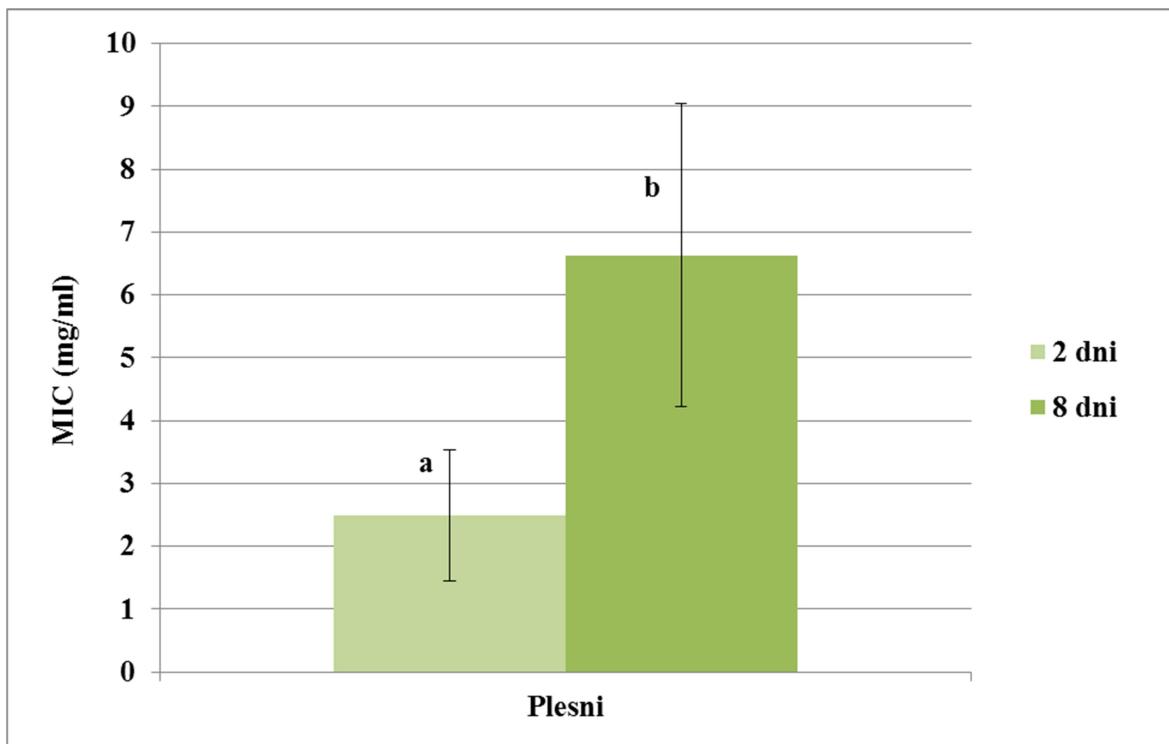
- je za plesni, inkubirane 8 dni, etanolni ekstrakt propolisa FS96 učinkovitejši kot FS70 ($<0,001$) in da je ostanek etanolnega ekstrakta propolisa OS96 učinkovitejši kot OS70 ($<0,001$) (vrednosti MIC FS96 $1,82\pm0,00$ mg/ml, FS70 $2,11\pm0,00$ mg/ml, OS96 $11,14\pm0,00$ mg/ml, OS70 $11,44\pm0,00$ mg/ml) (priloga F);
- imata etanolna ekstrakta propolisa po 2 dnevni inkubaciji večjo protiglivno aktivnost pri kvasovkah kot pri plesnih ($p<0,001$) (vrednosti MIC za kvasovke $0,60\pm0,12$ mg/ml in vrednosti MIC za plesni, inkubirane 2 dni, $2,49\pm2,09$ mg/ml) (slika 13, priloga G).



Slika 13: Vrednosti MIC etanolnih ekstraktov propolisa za plesni in kvasovke (2 dni), določene z metodo razredčevanja v mikrotitrski ploščici v gojišču RPMI-1640

Legenda: MIC: minimalna inhibitorna koncentracija; a, b: vrednosti z različnimi oznakami se statistično značilno razlikujejo ($p<0,05$)

- so vrednosti MIC etanolnih ekstraktov propolisa za plesni, inkubirane 2 dni, manjše kot vrednosti MIC za plesni, inkubirane 8 dni ($p<0,001$) (vrednosti MIC za plesni inkubirane 2 dni $2,49\pm2,09$ mg/ml in vrednosti MIC za plesni, inkubirane 8 dni $6,63\pm4,82$ mg/ml) (slika 14, priloga H).



Slika 14: Vrednosti MIC etanolnih ekstraktov propolisa za plesni, določene z metodo razredčevanja v mikrotitrski ploščici v gojišču RPMI-1640 po različnih časih inkubacije

Legenda: MIC: minimalna inhibitorna koncentracija; a, b: vrednosti z različnimi oznakami se statistično značilno razlikujejo ($p<0,05$)

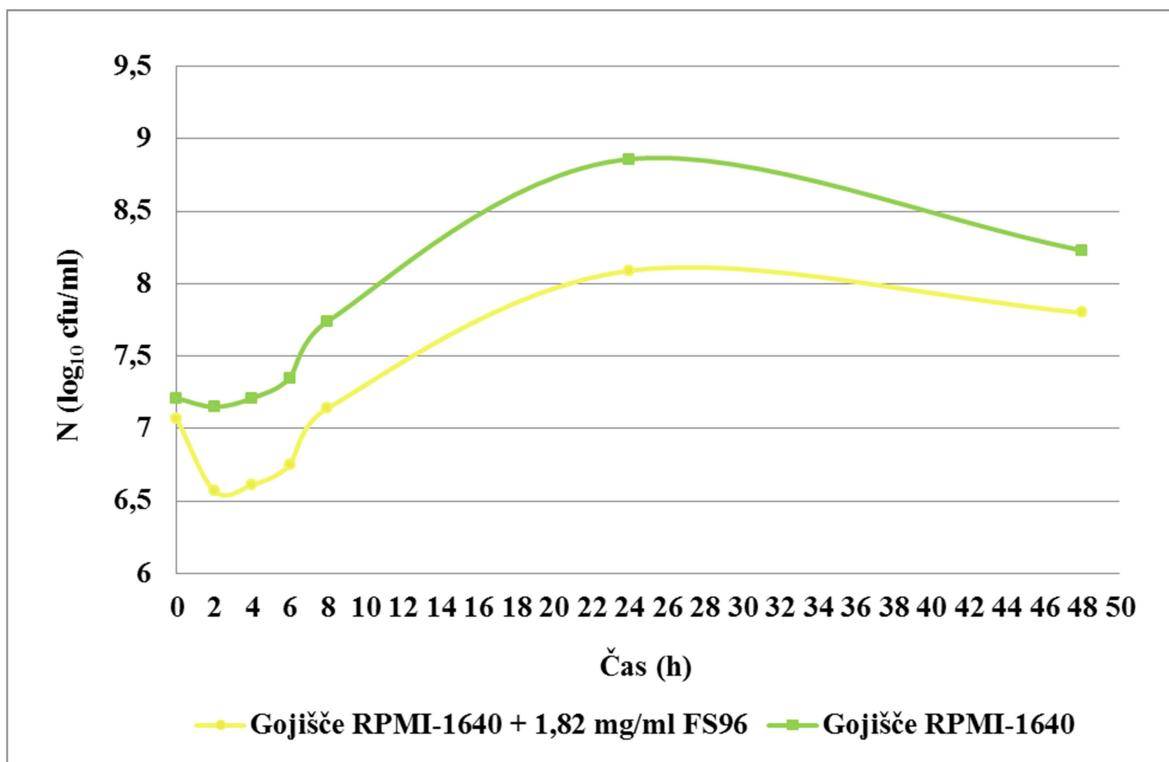
Veliko občutljivost kvasovk na propolis so dokazali v vseh raziskavah, kjer so proučevali protiglivno učinkovitost propolisa proti kvasovkam vrst *Candida* (Koc in sod., 2007; Mavri in sod., 2012). Prav tako so Neves in sod. (2016) določili majhne vrednosti MIC 256 µg/ml za 12 vrst kvasovk *Candida*. Ekstrakt propolisa, ki so ga v svoji raziskavi uporabili Salomão in sod. (2004), so pridobili s 70 % etanolom (1:10, v/v). Protiglivno aktivnost so določili za kvasovke vrste *Candida albicans* in med vrednostmi MIC, dobljenimi z brazilskim propolisom ($21,00\pm1,4$ mg/ml) in bolgarskim propolisom (MIC $20,5\pm2,1$ mg/ml), ni bistvene razlike, kljub temu da so v sami sestavi propolisa očitne razlike (Salomão in sod., 2004). Tako so potrdili, da so poleg flavonoidov tudi ostale komponente propolisa, kot so fenolne kisline in mogoče tudi amirizin, odgovorne za protiglivno delovanje propolisa.

Protiglivna aktivnost propolisa, ki smo jo izrazili kot povprečno vrednost MIC, je pri kvasovkah vrst *C. albicans* ŽMJ32 in *C. intermedia* ŽM23 $0,60\pm0,12$ mg/ml in pri plesnih vrst *P. verrucosum* ŽMJ23, *Penicillium* sp. ŽM24, *A. flavus* ZIM F70 in *A. flavus* ŽMJ7 $2,49\pm2,09$ mg/ml. Kvasovke so občutljivejše na etanolne ekstrakte propolisa od plesni. To so v svoji analizi dokazali Mavri in sod. (2012). Pri kvasovkah vrst *C. albicans* in *C. intermedia* so določili vrednosti MIC $0,53$ mg CAE/ml in pri plesnih vrst *A. flavus*. ŽMJ7, *A. flavus* ŽMJ25 vrednosti MIC $0,53$ mg CAE/ml. Plesni vrst *Penicillium* sp. ŽMJ24 in *P. verrucosum* CBS 302 48 so imele večjo vrednost MIC $1,10$ mg CAE/ml (Mavri in sod. 2012). Plesnim vrst *P. verrucosum* ŽMJ23 in *Penicillium* sp. ŽM24, *A. flavus* ZIM F70 in *A. flavus* ŽMJ7 smo po osmih dneh inkubacije določili večje vrednosti MIC kot po dveh dneh (vrednosti MIC FS70 $0,53$ mg/ml; FS96 $0,46$ mg/ml; OS70 $2,86$ mg/ml in OS96 $2,78$

mg/ml). Mohammadzadeh in sod. (2007) so v svojo raziskavo poleg kvasovk vrste *C. albicans* vključili plesni vrste *A. niger* in dokazali, da ekstrakt propolisa deluje inhibitorno na rast kvasovk in na rast plesni. Za kvasovke vrste *C. albicans* so določili vrednosti MIC 250 µg/ml in za plesni vrste *A. niger* vrednosti MIC 500 µg/ml. Protiglivno učinkovitost propolisa na kvasovke vrste *C. albicans* pripisujejo alifatskim in aromatskim kislinam, kavnim estrom in veliki vsebnosti flavanonov, kot so pinostrobin, pinocembrin, pinobanksin in pinobanksin-3-acetat. Prav tako so poleg Mohammadzadeh in sod. (2007) tudi Mertzner in sod. (1979) dokazali protiglivno delovanje propolisa. Protimikrobo učinkovanje propolisa pripisujejo spojinam, kot so pinocembrin, galangin, pinobanksin, pinobanksin-3-acetat, para-kumarna kislina, benzilnim estrom in estru kavne kisline.

4.2.3 Rastna krivulja

Rast plesni vrste *A. flavus* ZIM F70 smo 48 ur spremljali v gojišču RPMI-1640 z etanolnim ekstraktom propolisa FS96 1,82 mg/ml. Na sliki 15 je razvidno, da število plesni v gojišču RPMI-1640 z dodanim etanolnim ekstraktom propolisa FS96 v prvih dveh urah občutno pade. Nato od 2. ure do 8. ure število plesni eksponentno narašča vse do stacionarne faze rasti, ki traja približno do 27. ure. Po 27. uri rasti se začne faza odmiranja celic, tako v gojišču RPMI-1640 z etanolnim ekstraktom propolisa FS96 kot v gojišču RPMI-1640 brez etanolnega ekstrakta propolisa FS96. Skozi celoten potek rastne krivulje je razvidno, da etanolni ekstrakt propolisa FS96 zavira rast plesni *A. flavus* ZIM F70.



Slika 15: Rast plesni vrste *A. flavus* ZIM F70 v tekočem gojišču RPMI-1640 z etanolnim ekstraktom propolisa FS96 (koncentracija ekstrakta v gojišču 1,82 mg/ml)

5 SKLEPI

Glede na dobljene rezultate lahko povzamemo, da:

- imajo etanolni ekstrakti propolisa (FS70, OS70, FS96 in OS96) protimikroben učinek na izbrane grampozitivne in gramnegativne bakterije ter plesni in kvasovke;
- imajo etanolni ekstrakti propolisa (FS70, OS70, FS96 in OS96) večjo protibakterijsko aktivnost na grampozitivne bakterije kot na gramnegativne bakterije;
- protimikrobnna učinkovitost etanolnih ekstraktov propolisa pada od kvasovk, grampozitivnih in gramnegativnih bakterij do plesni;
- sta bila etanolna ekstrakta FS70 in FS96 učinkovitejša v protimikrobnem delovanju kot ostanka etanolnega ekstrakta propolisa OS70 in OS96;
- vrednosti MIC, ki smo jih določili pri bakterijah z različnimi metodami razredčevanja, so različne, saj so vrednosti MIC etanolnih ekstraktov propolisa, ki smo jih določili bakterijam z metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB z raztopino TTC, nižje kot vrednosti MIC, določene z metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB z raztopino resazurin.

6 POVZETEK

V diplomske nalogi smo etanolnim ekstraktom propolisa (FS70 – ekstrakcija s 70 % EtOH, FS96 – ekstrakcija s 96 % EtOH, OS70 – ostanek po ekstrakciji s 70 % EtOH in OS96 – ostanek po ekstrakciji z 96 % EtOH) slovenskega porekla žeeli določiti protomikrobovo delovanje. Uporabili smo bakterije vrst *Staph. aureus* ŽMJ346, *Staph. aureus* ŽMJ72, *Strep. pyogenes* ŽM494, *B. cereus* ŽMJ164, *Ent. faecalis* ŽMJ90, *L. monocytogenes* ŽM58, *L. monocytogenes* ŽM70, *E. coli* ŽM370, *E. coli* O157 ŽMJ128, *Salm. Typhimurium* ŽM375 in *Salm. Enteritidis* ŽM138, plesni vrst *P. verrucosum* ŽMJ23, *Penicillium* sp. ŽM24, *A. flavus* ZIM F70 ter kvasovke vrst *C. intermedia* ŽMJ23 in *C. albicans* ŽMJ32. Protomikrobovo delovanje in inhibicijo rasti smo določili z vrednostmi MIC (minimalna inhibitorna koncentracija). Za določitev koncentracij etanolnih ekstraktov propolisa, ki inhibirajo rast in razmnoževanje bakterij, smo uporabili:

- metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB v mikrotitrski ploščici z raztopino TTC;
- metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB v mikrotitrski ploščici z raztopino resazurin;
- metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB, tako da smo uporabili vrednosti MIC, določene z metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB v mikrotitrski ploščici z raztopino TTC in še vrednosti 2 MIC.

Ko smo z metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB v mikrotitrski ploščici določili vrednosti MIC za etanolni ekstrakt propolisa FS96, smo te koncentracije uporabili za spremljanje rasti bakterij vrst *L. monocytogenes* ŽM70 in *Salm. Enteritidis* ŽM138.

Za določitev koncentracij etanolnih ekstraktov propolisa, ki inhibirajo rast in razmnoževanje plesni in kvasovk, smo uporabili:

- metodo difuzije v trdnem gojišču z diskami;
- metodo razredčevanja v tekočem gojišču RPMI-1640 v mikrotitrski ploščici z raztopino INT.

Ko smo z metodo razredčevanja v tekočem gojišču RPMI-1640 v mikrotitrski ploščici z raztopino INT določili vrednosti MIC za etanolni ekstrakt propolisa FS96, smo te koncentracije uporabili za spremljanje rasti plesni vrste *A. flavus* ZIM F70.

Vsi preiskovani etanolni ekstrakti propolisa so pokazali protomikrobni učinek. Učinkovitejša v protomikrobnem delovanju sta bila etanolna ekstrakta propolisa FS96 in FS70. Dokazali smo, da občutljivost na etanolne ekstrakte propolisa pada v zaporedju kvasovke (MIC $0,60 \pm 0,12$ mg/ml) > grampozitivne bakterije (MIC $0,89 \pm 0,99$ mg/ml) > gramnegativne bakterije (MIC $2,16 \pm 2,26$ mg/ml) > plesni (MIC $2,49 \pm 2,09$ mg/ml).

Učinkovitost etanolnih ekstraktov propolisa znotraj skupine grampozitivnih bakterij in znotraj gramnegativnih bakterij, določena z metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB v mikrotitrski ploščici z raztopino TTC in uporabo resazurina, je različna. Etanolni ekstrakti propolisa so bili učinkovitejši na grampozitivne bakterije *Staph. aureus* ŽMJ346, *Staph. aureus* ŽMJ72, *B. cereus* ŽMJ164, *L. monocytogenes* ŽM58, *L. monocytogenes* ŽM70 kot na grampozitivne bakterije *Ent. faecalis* ŽMJ90 in *Strep. pyogenes* ŽM494. Občutljivost bakterij znotraj skupine gramnegativnih bakterij na etanolne ekstrakte

propolisa je bila tudi različna. Tako je propolis učinkovitejši proti bakterijam vrst *E. coli* ŽM370 in *E. coli* O157 ŽMJ128 (vrednosti MIC: FS70 0,34–0,68 mg/ml; FS96 0,29–0,58 mg/ml; OS70 0,23 mg/ml; OS96 0,22 mg/ml) kot proti bakterijam *Salm. Typhimurium* ŽM375 in *Salm. Enteritidis* ŽM138 (vrednosti MIC: FS70 1,35 mg/ml; FS96 1,17 mg/ml; OS70 3,66 mg/ml; OS96 3,56 mg/ml).

Protiglivna aktivnost propolisa, določena s povprečno vrednostjo MIC, je pri kvasovkah vrst *C. albicans* ŽMJ32 in *C. intermedia* ŽM23 $0,60 \pm 0,12$ mg/ml in pri plesnih vrst *P. verrucosum* ŽMJ23, *Penicillium* sp. ŽM24, *A. flavus* ZIM F70 in *A. flavus* ŽMJ7 $2,49 \pm 2,09$ mg/ml. Kvasovke so občutljivejše na etanolne ekstrakte propolisa kakor plesni.

Propolis slovenskega porekla bi lahko uporabili kot naravni protimikrobn konzervans v živilski industriji, vendar bi potrebovali visoke koncentracije propolisa in še te bi zavirale rast le določenih bakterij, kvasovk in plesni. Bolj smiselna je uporaba določenih sestavin propolisa, ki imajo sinergističen učinek z antibiotiki v protimikrobnem delovanju.

7 VIRI

- Abram V. 2000. Antioksidativno delovanje flavonoidov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi. Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 23–32
- Abramovič H. 2011. Antioksidanti in metodologija določanja antioksidativne učinkovitosti: učbenik za izbirni predmet na interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Bioznanosti. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 112 str.
- Adamič Š. 1989. Temelji biostatistike. 2. izd. Ljubljana, Medicinska fakulteta Univerze Edvarda Kardelja v Ljubljani: 195 str.
- Bankova V. 2005. Recent trends and important developments in propolis research. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2, 1: 29–32
- Bankova V., Popova M., Bogdanov S., Sabatini A.G. 2002. Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results. Zeitschrift für Naturforschung, Teil C, 57, 5–6: 530–533
- Banks J.G., Morgan S., Stringer M.F. 1988. Inhibition of heated *Bacillus* spores by combinations of potassium sorbat, sodium benzoat, pH and organic acids. Lebensmittel Wissenschaft und Technologie, 21: 250–255
- Banskota A.H., Tezuka Y., Kadota S. 2001. Recent progress in pharmacological research of propolis. Phytotherapy Research, 15: 561–571
- Beuchat L.R., Golden D.A. 1989. Antimicrobials occurring naturally in foods. Food Technology, 43: 134–142
- Božnar M. 2002. Zaklad iz čebeljega panja. Ljubljana, Kmečki glas, 39 str.
- Burdock G.A. 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). Food and Chemical Toxicology, 36: 347–363
- Cabral I.S.R., Oldoni T.L.C., Prado A., Bezerra R.M.N., Alencar S.M. 2009. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. Química Nova, 15: 1–5
- Castaldo S., Capasso F. 2002. Propolis an old remedy used in modern medicine. Fitoterapia, 73, Suppl. 1: S1–S6
- Chaillou L.L., Nazareno A.M. 2009. Bioactivity of propolis from Santiago del Estero, Argentina, related to their chemical composition. LWT-Food Science and Technology, 42: 1422–1427

- Cuesta-Rubio O., Piccinelli A. L., Fernandez M.C., Hernández I.M., Rosado A., Rastrelli L. 2007. Chemical characterization of Cuban propolis by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR: the brown, red, and yellow Cuban varieties of propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 18: 7502–7509
- Cushnie T.P.T., Lamb A.J. 2005. Detection of galangin induced cytoplasmic membrane damage in *Staphylococcus aureus* by measuring potassium loss. *Journal of Ethnopharmacology*, 101: 243–248
- Erkmen O., Ozcan M.M. 2008. Antimicrobial effects of Turkish propolis, pollen, and laurel on spoilage and pathogenic food – related microorganisms. *Journal of Medicinal Food*, 11: 587–592
- Fleet G. 1992. Spoilage yeast. *Critical Review in Biotechnology*, 12: 1–14
- Gardana C., Scaglianti M., Pietta P., Simonetti P. 2007. Analysis of the polyphenolic fraction of propolis from different sources by liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 45, 3: 390–399
- Graikou K., Popova M., Gortzi O., Bankova V., Chinou I. 2016. Characterization and biological evaluation of selected Mediterranean propolis samples. Is it a new type? *LWT-Food Science and Technology*, 65: 261–267
- Havsteen B. 1983. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacology potency. *Biochemical Pharmacology*, 32: 1141–1148
- Heimbach N.S., Itavo Brandão Ferreira C.C., Leal Brito C.R., Itavo Vinhas L.C., Araújo da Silva J., Gonçalves Silva C.P., Costa De Rezende L., Gomes Falcão M. de F. 2016. Propolis extraction residue like bacterial inhibitor “*in vitro*”. *Revista Brasileria de Saude E Producao Animal*, 17, 1: 65–72
- Huang S., Zhang. C.P., Wang K., Q. Li G., Hu F.L. 2014 Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules*, 19: 19610–19632
- Jedlovčnik N., Pušnik V., Kurinčič T. M., Grošelj F. 2009. Propolis. Brdo pri Lukovici, Čebelarska zveza Slovenije: 95 str.
- Junior Bispo W., Miranda O.E., Alvino V., Araujo B., Silva W.D., Porfirio Z. 2012. Atividade antimicrobiana de fracões da própolis vermelha de Alagoas, Brasil. *Semina*, 33: 3–10
- Kalogeropoulos N., Kontoles J.S., Troullidou E., Mourtzinos I., Karathanos T.V. 2009. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chemistry*, 116: 452–461
- Kartal M., Kaya S., Kurucu S. 2002. GC-MS analysis of propolis samples from two different regions of Turkey. *Zeitschrift für Naturforschung, Teil C*, 57: 905–909

Klančnik A., Piskernik S., Jeršek B., Smole Možina S. 2009. Protimikrobnlo delovanje rastlinskih fenolnih izvlečkov na patogene bakterije. V: Protimikrobne snovi. Posvetovanje Pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo:145–157

Koc N.A., Silici S., Mutlu-Sariguzel F., Sagdic O. 2007. Antifungal activity of propolis in four different fruit juices. *Food Technology and Biotechnology*, 45, 1: 57–61

Košmelj B., Arh F, Urbanc D., Ferligoj A., Omladič M. 2002. Statistični terminološki slovar. Razširjena izdaja z dodanim slovarjem ustreznikov v angleščini. 1. izd. Ljubljana, Študentska založba: 15–54

Krol W., Scheller S., Shani J., Pietsz G., Czuba Z. 1993. Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on the growth of *Staphylococcus aureus*. *Arzneimittel Forschung Drug Research*, 43, 607–609

Kuraja A. 2009. *In vitro* ter *in vivo* antioksidativna učinkovitost etanolnih izvlečkov propolisa. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 53 str.

Kurek-Górecka A., Rzepecka-Stojko A., Górecki M., Stojko J., Sosada M., Swierczek-Zieba G. 2014. Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis. *Molecules*, 19: 78–101

Maillard J.Y. 2002 Bacterial target sites for biocide action. *Journal of Applied Microbiology*, 92: 16S–27S

Mavri A., Abramovič H., Polak T., Bertoncelj J., Jamnik P., Smole Možina S., Jeršek B. 2012. Chemical properties, antioxidant and antimicrobial activities of Slovenian propolis. *Chemistry and Biodiversity*, 9: 1545–1558

Meglič M. 2004. Čebelji pridelki: Pridobivanje in trženje. Brdo pri Lukovici, Čebelarska zveza Slovenije: 57–63

Melliou E., Chinou I., 2004. Chemical analysis and antimicrobial activity of Greek propolis. *Planta Medica*, 70: 515–519

Mendes da Silva J.F., De Souza M.C., Matta S.R., De Andrade M., Nova Vidal F.V. 2006. Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis and their antimicrobial and antioxidant activities. *Food Chemistry*, 99: 431–435

Mertzner J., Bekemeier H., Paintz M., Schneidewind E. 1979. Antimicrobial activity of propolis and its constituents. *Pharmazie*, 34: 97–102

Mohammadzadeh S., Shariatpanahi M., Hamed M., Ahmadkhaniha R., Samadi N., Ostad S.N. 2007. Chemical composition, oral toxicity and antimicrobial activity of Iranian propolis. *Food Chemistry*, 103: 1097–1103

- Neves dM. V.M., Silva dS.M.T., Lima OdE, Cunha dL.V.E., Oliveria JdE. 2016. Isoflavone formononetin from red propolis acts as fungicide against *Candida* sp. Brazilian Journal of Microbiology, 47: 159–166
- Netíková L., Bogusch., Heneberg P. 2013. Czech ethanol-free propolis extract displays inhibitory activity against a broad spectrum of bacterial and fungal pathogens. Journal of Food Science, 78: M1421–M1429
- Novak E.M., Silva M.S.C., Marcucci M.C., Sawaya A.C.H.F., López B.G.C., Fortes, M.A.H.Z., Giorgi R.R., Marumo, K. T., Rodrigues R.F., Maria D.A. 2014. Antitumoural activity of Brazilian red propolis fraction enriched with xanthochymol and formononetin: an *in vitro* and *in vivo* study. Journal of Functional Foods, 11: 91–102
- Oksuz H., Duran N., Tamer C., Cetin M., Silici S. 2005. Effect of propolis in the treatment of experimental *Staphylococcus aureus* kreatitis in rabbits. Ophthalmic Research, 37: 328–334
- Orsi R.O., Fernandes Junior A., Bankova V., Sforcin J.M. 2012. Antibacterial effects of Brazilian and Bulgarian propolis and synergistic effects with antibiotics action in the bacterial DNA and folic acid. Natural Product Research, 26: 344–349
- Orsi R.O., Funari S.R.C., Barbattini R., Giovani C., Frilli F., Sforcin J.M., Bankova V. 2006. Radionuclides in honeybee propolis (*Apis mellifera* L.). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 76: 637–640
- Osés S.M., Pascual-Maté A., Fernández-Muiño M.A., López-Díaz T.M., Sancho M.T. 2016. Bioactive properties of honey with propolis. Food Chemistry 196: 1215–1223
- Ota C., Carmelinda U., Vera F., Shimizu M.T. 2001. Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. Mycosemycoses, 44: 375–378
- Peng L., Ynag S., Cheng J.Y., Chen F., Pan S., Fan G. 2012. Antifungal activity and action mode of pinocembrin from propolis against *Penicillium italicum*. Food Science and Biotechnology, 21, 6: 1533–1539
- Pedrotti W. 2003. Med, cvetni prah, matični mleček, propolis in strup: lastnosti in učinki pridelkov čebeljega panja in apiterapija. Ljubljana, Pisanica: 47–52
- Popova M., Chinou I., Marekov I., Bankova V.S. 2009. Terpenes with antimicrobial activity from Cretan propolis. Phytochemistry, 70: 1262–1271
- Popova M., Graikou K., Chinou I., Bankova V.S. 2010. GC-MS profiling of diterpene compounds in Mediterranean propolis from Greece. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58: 3167–3176
- Popova M., Trusheva B., Antonova D., Cutajar S., Mifsud D., Farrugia C., Tsvetkova I., Najdenski H., Bankova V. 2011. The specific chemical profile of Mediterranean propolis from Malta. Food Chemistry, 126, 3: 1431–1435

Popova M., Trusheva B., Cutajar S., Antonova D., Mifsud D., Farrugia C., Bankova V. 2012 Identification of the plant origin of the botanical biomarkers of Mediterranean type propolis. *Natural Product Communications*, 7: 569–570

Propoli. 2016. Trento, Apicoltura Castel Belfort: 1 str.: <http://www.apiculturacastelbelfort.it/prodotti/propoli.htm> (januar 2016)

Pušnik V. 2016. Apiterapija. Ljubljana, Založba kmečki glas, 128 str.

Riss T., Moravec R. 2003. Introducing CellTiter-Blue® cell viability assay. Promega Notes, 83: 10–13

Saeed F., Ahmad S.R., Arshad U.M., Niaz B., Batool R., Naz R., Suleria R.A.H. 2016. Propolis to curb lifestyle related disorders: *International Journal of Food Properties*, 19: 420–437

Salomão K., Dantas A.P., Borba C.M., Campos L.C., Machado D.G., Aquino Neto F.R., deCastro S.L. 2004. Chemical composition and microbicidal activity of extracts from Brazilian and Bulgarian propolis. *Letters in Applied Microbiology*, 38: 87–92

Mendonca L.S., Mendonca M.F.R., Araújo M.F.L.Y., Divino De Araujo E., Ramalho A.S., Narain N., Jain S., Orellana C.S., Padilha F.F., Cardoso C.J. 2015. Chemical markers and antifungal activity of red propolis from Sergipe, Brazil. *Food Science and Technology Campinas*, 35, 2: 291–298

Schnitzler P., Neuner A., Nolkemper S., Zundel C., Nowack H., Sensch K. H., Reichling J. 2010 Antiviral activity and mode of action of propolis extracts and selected compounds. *Phytotherapy Research*, 24, 1: S20–S28

Serra J., Escola R. 1995. A study on the bacteriostatic activity of propolis. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 91: 242–246

Sforcin J.M., Bankova V. 2011 Propolis: is there a potential for the developement of new drugs? *Journal of Ethnopharmacology*, 133, 2: 253–260

Shimizu T., Hino A., Tsutsumi A., Park Y.K., Watanabe W., Kurokawa M. 2008. Antiinfluenza virus activity of propolis *in vitro* and its efficacy against influenza infection in mice. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 19, 1: 7–14

Silici S., Kutluca S. 2005. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *Journal of Ethnopharmacology*, 99: 69–73

SIST EN ISO 4333. Mikrobiologija živil in krme – horizontalna metoda za ugotavljanje števila mikroorganizmov – Tehnika štetja kolonij pri 30 °C. 2003: 9 str.

Sud'ina G.F., Mirzoeva O.K., Pushkareva M.A., Korshunova G.A., Sumbatyan N.V., Varfolomeev S.D. 1993. Caffeic acid phenethyl ester as a lipoxygenase inhibitor with antioxidant properties. *FEBS Letters*, 329: 21–24

Suwa Stanojević M. 2009. Zdrav življenjski slog. Gradivo za 2. letnik. Elektronska knjiga. Ljubljana, Zavod ITC: 33 str.
[http://www.zavod-irc.si/docs/Skruti_dokumenti/
Suwa_Stanojevic.pdf](http://www.zavod-irc.si/docs/Skruti_dokumenti/Suwa_Stanojevic.pdf) - Projekt Impletum (maj 2016) Zdrav_zivljenski_slog-

Stepanović S., Antić N., Dakić I., Švabić-Vlahović M. 2003. *In vitro* antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. *Microbiological Research*, 158, 4: 353–357

Takaisi N.B., Scjoncjer H. 1994. Electron microscopy and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propole provenance. *Planta Medica*, 60: 222–227

Turantas F., Goksungur Y., Dincer A.H., Unluturk A., Guvenc U., Zorlu N. 1999. Effect of potassium sorbate and sodium benzoate on microbial population and fermentation of black olives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79: 1197–1202

Velikova M., Bankova V., Sorkun K., Houcine S., Tsvetkova I., Kujumgiev A. 2000. Propolis from the Mediterranean region: chemical composition and antimicrobial activity. *Zeitschrift für Naturforschung*, Teil C, 55, 790–793

ZAHVALA

Mentorici izr. prof. dr. Barbari Jeršek se iskreno zahvaljujem za pomoč, čas in trud, ki ju je namenila nastanku tega diplomskega dela. Predvsem bi se ji rada zahvalila za razumevanje in njenou potrežljivost v trenutkih, ko sem to najbolj potrebovala.

Zahvaljujem se tudi recenzentki izr. prof. dr. Heleni Abramovič.

Za neprecenljivo pomoč pri izvajanju praktičnega dela v laboratoriju hvala Ani Mavri, Saši Piskernik in Tanji Rožman.

Hvala Lini Burkan in Barbari Slemenik za pregled, urejanje in dokončno oblikovanje diplomske naloge.

Posebna zahvala gre mojemu možu Tomažu in najinim trem sončkom, Meti, Filipu in Tinetu za moralno podporo in bolj zabavno pisanje diplomske naloge.

Hvala mami Ivanka, ki mi je omogočila študij in za moralno podporo tekom študija.

Hvaležna sem tudi Tomaževim staršem za varstvo otrok med pisanjem diplomske naloge in razumevanje.

Hvala tudi vsem, ki so kakorkoli prispevali k nastanku pričajoče diplomske naloge.

PRILOGE

Priloga A: Povprečne vrednosti MIC posameznih etanolnih ekstraktov propolisa za grampozitivne in gramnegativne bakterije, določene z metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB v mikrotitrski ploščici z raztopino TTC

Bakterije	Etanolni ekstrakti propolisa	Povprečna MIC±SD (mg/ml)	p
Grampozitivne bakterije	FS70	0,47±0,50	>0,05
	FS96	0,41±0,43	
	OS70	0,98±1,54	
	OS96	0,92±1,49	
Gramnegativne bakterije	FS70	0,93±0,51	>0,05
	FS96	0,80±0,44	
	OS70	1,95±1,98	
	OS96	1,89±1,93	

Legenda: MIC: minimalna inhibitorna koncentracija, TTC: 2,3,5-trifenil tetrazolijev klorid; **FS70:** etanolni ekstrakt propolisa, dobljen s 70 % EtOH; **FS96:** etanolni ekstrakt propolisa, dobljen z 96 % EtOH; **OS70:** ostanek ekstrakta propolisa po ekstrakciji s 70 % EtOH; **OS96:** ostanek ekstrakta propolisa po ekstrakciji s 96 % EtOH; **SD:** standardni odklon; **p:** stopnja tveganja

Priloga B: Povprečne vrednosti MIC posameznih etanolnih ekstraktov propolisa za grampozitivne in gramnegativne bakterije, določene z metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB v mikrotitrski ploščici z raztopino resazurin

Bakterije	Etanolni ekstrakti propolisa	Povprečna MIC±SD (mg/ml)	p
Grampozitivne bakterije	FS70	0,92±0,86	>0,05
	FS96	1,04±0,94	
	OS70	3,14±3,03	
	OS96	1,88±2,59	
Gramnegativne bakterije	FS70	2,70±0,00	≤0,05
	FS96	2,33±0,00	
	OS70	7,32±0,00	
	OS96	7,13±0,00	

Legenda: MIC: minimalna inhibitorna koncentracija; **FS70:** etanolni ekstrakt propolisa, dobljen s 70 % EtOH; **FS96:** etanolni ekstrakt propolisa, dobljen z 96 % EtOH; **OS70:** ostanek ekstrakta propolisa po ekstrakciji s 70 % EtOH; **OS96:** ostanek ekstrakta propolisa po ekstrakciji s 96 % EtOH; **SD:** standardni odklon; **p:** stopnja tveganja

Priloga C: Povprečne vrednosti MIC etanolnih ekstraktov propolisa za grampozitivne in gramnegativne bakterije, določene z metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB v mikrotitrski ploščici z raztopino TTC in z raztopino resazurin

Bakterije	Reagent	Povprečna MIC±SD (mg/ml)	p
Grampozitivne bakterije	TTC	0,70±1,06	>0,05
Gramnegativne bakterije	TTC	1,39±1,39	
Grampozitivne bakterije	Resazurin	1,74±2,17	<0,001
Gramnegativne bakterije	Resazurin	4,87±2,44	

Legenda: **MIC:** minimalna inhibitorna koncentracija; **TTC:** 2,3,5-trifenil tetrazolijev klorid; **SD:** standardni odklon; **p:** stopnja tveganja

Priloga D: Povprečne vrednosti MIC posameznih etanolnih ekstraktov propolisa za grampozitivne in gramnegativne bakterije, določene z metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB

Bakterije	Etanolni ekstrakti propolisa	Povprečna MIC±SD (mg/ml)	p
Grampozitivne bakterije	FS70	0,72±0,45	>0,05
	FS96	0,88±1,00	
	OS70	1,00±1,23	
	OS96	0,96±1,29	
Gramnegativne bakterije	FS70	1,52±0,85	>0,05
	FS96	1,24±0,84	
	OS70	2,98±3,27	
	OS96	2,90±3,18	

Legenda: **MIC:** minimalna inhibitorna koncentracija; **FS70:** etanolni ekstrakt propolisa, dobljen s 70 % EtOH; **FS96:** etanolni ekstrakt propolisa, dobljen s 96 % EtOH; **OS70:** ostanek ekstrakta propolisa po ekstrakciji s 70 % EtOH; **OS96:** ostanek ekstrakta propolisa po ekstrakciji s 96 % EtOH; **SD:** standardni odklon; **p:** stopnja tveganja

Priloga E: Povprečne vrednosti MIC etanolnih ekstraktov propolisa za grampozitivne in gramnegativne bakterije določene z metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB

Bakterije	Povprečna MIC±SD (mg/ml)	p
Grampozitivne bakterije	0,89±0,99	≤0,05
Gramnegativne bakterije	2,16±2,26	

Legenda: **MIC:** minimalna inhibitorna koncentracija; **SD:** standardni odklon; **p:** stopnja tveganja

Priloga F: Povprečne vrednosti MIC etanolnih ekstraktov propolisa za plesni in kvasovke, določene z metodo razredčevanja v tekočem gojišču RPMI-1640 v mikrotitrski ploščici z raztopino INT

Mikrobnna kultura	Etanolni ekstrakti propolisa	Povprečna MIC±SD (mg/ml)	p
Kvasovke inkubacija 2 dni	FS70	0,53±0,00	<0,001
	FS96	0,46±0,00	
	OS70	0,72±0,00	<0,001
Plesni inkubacija 2 dni	OS96	0,70±0,00	≤0,01
	FS70	0,79±0,30	>0,05
	FS96	0,68±0,26	<0,001
Plesni inkubacija 8 dni	OS70	4,29±1,65	>0,05
	OS96	4,18±1,61	<0,001
	FS70	2,11±0,00	<0,001
	FS96	1,82±0,00	<0,001
	OS70	11,44±0,00	<0,001
	OS96	11,14±0,00	

Legenda: **MIC:** minimalna inhibitorna koncentracija; **FS70:** etanolni ekstrakt propolisa, dobljen s 70 % EtOH; **FS96:** etanolni ekstrakt propolisa, dobljen s 96 % EtOH; **OS70:** ostanek ekstrakta propolisa po ekstrakciji s 70 % EtOH; **OS96:** ostanek ekstrakta propolisa po ekstrakciji s 96 % EtOH; **SD:** standardni odklon; **p:** stopnja tveganja

Priloga G: Povprečne vrednosti MIC etanolnih ekstraktov propolisa za plesni in kvasovke, določene z metodo razredčevanja v tekočem gojišču RPMI-1640 v mikrotitrski ploščici z raztopino INT

Mikrobnna kultura	Povprečna MIC±SD (mg/ml)	p
Plesni inkubacija 2 dni	2,49±2,09	<0,001
Kvasovke inkubacija 2 dni	0,60±0,12	

Legenda: **MIC:** minimalna inhibitorna koncentracija; **SD:** standardni odklon; **p:** stopnja tveganja

Priloga H: Povprečne vrednosti MIC etanolnih ekstraktov propolisa za plesni inkubirane 2 in 8 dni, določene z metodo razredčevanja v tekočem gojišču RPMI-1640 v mikrotitrski ploščici z raztopino INT

Mikrobnna kultura	Povprečna MIC±SD (mg/ml)	p
Plesni inkubacija 2 dni	2,49±2,09	<0,001
Plesni inkubacija 8 dni	6,63±4,82	

Legenda: **MIC:** minimalna inhibitorna koncentracija; **SD:** standardni odklon; **p:** stopnja tveganja