

Katarzyna Wolska^{1*}, Alina Górska¹, Alina Adamiak¹

¹Katedra Dietetyki i Oceny Żywności, Instytut Nauki o Zdrowiu Uniwersytetu Przyrodniczo-Humanistycznego w Siedlcach

Wpłynęło w listopadzie 2015 r.
Zaakceptowano w kwietniu 2016 r.

1. Wstęp. 2. Ogólna charakterystyka propolisu. 3. Aktywność przeciwbakteryjna propolisu. 4. Podsumowanie

Antibacterial properties of propolis

Abstract: Propolis is a natural product which honey bees (*Apis mellifera*) manufacture from balsamic resins, actively secreted by plants on leaf buds and barks. The chemical composition of propolis is highly variable. More than 300 compounds, such as polyphenols, phenolic aldehydes, sesquiterpene, quinines, coumarins, amino acids, steroids and inorganic compounds, have been identified in propolis samples. The content depends on the specific local flora at the site of collection, on the season of collection and also on the local climate. Propolis is a complex mixture of balsams, resins, waxes, essential oils, pollen and other substances which are used by bees in the construction, repair and protection of their hives, mainly thanks to its mechanical properties, antiseptic efficacy and antimicrobial activity. Because of the broad spectrum of biological activities, propolis is still used in traditional medicine. In this article, we review the current knowledge about propolis geographic diversity and its antimicrobial activity.

1. Introduction. 2. General characteristics of propolis. 3. The antimicrobial activity of propolis. 4. Conclusion

Słowa kluczowe: aktywność przeciwbakteryjna, propolis, substancje farmakologiczne
Keywords: antimicrobial activity, pharmacological substances, propolis

1. Wstęp

W związku ze wzrostem oporności bakterii na antybiotyki, rośnie zainteresowanie zastosowaniem propolisu, jako produktu pszczelego o najwyższej aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Naukowcom udało się dowiedzieć, że działanie antybiotyczne ekstraktów propolisu zapewniają liczne flawonoidy oraz kwasy fenolowe i ich estry. Ponieważ propolis zawiera kilkadziesiąt różnych substancji bakteriobójczych, wyklucza to możliwość nabycia przez drobnoustroje oporności w stosunku do całego spektrum tych substancji. Godne podkreślenia jest występowanie synergistycznego działania propolisu i wielu antybiotyków. Skuteczność działania takich leków, jak cefalosporyny, gentamycyna, oksytetracyklina, erytromycyna, wankomycyna i bacytracyna w obecności ekstraktu propolisu wzrasta od 10 nawet do 100 razy. Jest to doskonały sposób, aby zmniejszyć dawkowanie antybiotyku, a tym samym uniknąć skutków jego działania niepożądanego [4, 45, 56, 86, 88, 92].

2. Ogólna charakterystyka propolisu

Propolis jest wysoce złożonym, naturalnym kompleksem biologicznym, składającym się z mieszaniny wytworzonej przez pszczoły z roślinnych substancji żywicznych, wosku pszczelego, pyłku kwiatowego, pierzgi, wydzieliny gruczołowej pszczół oraz domieszek mechanicznych. W zbiorze propolisu bierze udział wyspecjalizowana niewielka grupa (od 10 do 30)

pszczół zdrowych i silnych, doświadczonych w pracach polowych, zwykle w wieku powyżej 15 dni. Najlepiej propolis zbiera rozpowszechniona w Europie Wschodniej pszczoła kaukaska *Apis mellifera caucasica*. Pszczoły zbierają balsamiczne substancje z pączków niektórych drzew, np. topoli, brzozy, wierzby, olchy i kasztanowca oraz żywic występujących na uszkodzonych częściach tych drzew. Zbierają je przede wszystkim od początku lata do jesieni, w najcieplejszych godzinach dnia, między 10.00 a 16.00 przy sprzyjających temperaturach (powyżej 20°C), kiedy substancje żywiczne są dostatecznie miękkie [3, 21, 24, 51].

2.1. Wykorzystanie propolisu przez pszczoły

Gromadzenie się olbrzymiej liczby owadów społecznych na bardzo ograniczonej powierzchni, stwarza podwyższone ryzyko pojawienia się chorób zakaźnych, zwłaszcza nosemozy i zgnilca amerykańskiego. Głównym czynnikiem, który gwarantuje obronę przed zachorowalnością pszczół jest magazynowanie w ulu propolisu. Słowo „propolis” jest pochodzenia greckiego i oznacza dosłownie „przedmurze miasta”. Pszczoły budują barierę propolisową tuż za otworem wejściowym, czyli „przedmurze przed swoim domem”. Jest ono tak zbudowane, że wszyscy mieszkańcy muszą przez nie przejść wchodząc do ula lub z niego wychodząc. W ten sposób jakby przechodzą przez barierę dezynfekcyjną czy matę odkażającą, by nie wnieść do „domu” bakterii, pleśni i innych zarazków. Pszczoły pokrywają warstwą

* Autor korespondencyjny: Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny, Instytut Nauk o Zdrowiu, 08-110 Siedlce, ul. Prusa 14; tel. 25 643 12 86; e-mail: kwolska@uph.edu.pl

propolisu komórki plastra przed złożeniem do nich przez matkę jaj lub pokrywają jego warstwą uśmierconych jadom szkodniki, których nie są w stanie usunąć z ula, a których produkty rozkładu stanowiłyby zagrożenie dla całego roju [3, 24, 51].

Propolis stanowi dla pszczół materiał budulcowy i izolacyjny. Jest wykorzystany do powlekania wewnętrznych ścian ula i wszystkich jego części cienką warstwą o grubości od 0,3 do 0,5 mm, a także do przymocowania luźnych części. Pszczoły za pomocą propolisu uszczelniają gniazdo, zasklepiają wszelkie otwory o szerokości mniejszej niż 4,5 mm oraz zmniejszają wielkość otworu wylotowego w okresach chłódów, mając na celu ochronę gniazda przed zimnem, wiatrem i przeciągiem [24, 51].

2.2. Właściwości fizyczne propolisu

Właściwości fizyczne propolisu zależą od regionu pochodzenia i rodzaju roślin. Jest on produktem bezpostaciowym, o ostrym, cierpkim, piekącym i gorzkawym smaku. Świeży propolis jest silnie aromatyczny. Zapach jest słodkawy, przypominający nieco korzenny, cynamonowy, zapach pączków topoli, kadzidła bądź bukietu kwiatowego. W bardzo starych próbkach lub zanieczyszczonych dużą zawartością wosku zapach jest słabo wyczuwalny, przypomina bardziej zapach wosku i miodu. Propolis ma różne barwy, od żółtej poprzez żółto-zieloną, zielonkawą, pomarańczową, czerwoną, ciemnobrązową do prawie czarnej. Barwa propolisu zależy od gatunku rośliny, z której jest zbierany (np. topola-brązowy, olsza-żółty, brzoza-czarny, kasztanowiec-czerwony) oraz od ilości domieszanego przez pszczoły wosku. Zwykle propolis jest koloru żółtego i brązowego. Podczas przechowywania próbki propolisu ciemnieją. Propolis dobrze rozpuszcza się w alkoholu etylowym, acetonie, eterze etylowym i chloroformie. W ostatnich latach opracowano technologię przetwarzania propolisu na rozpuszczalny w wodzie proszek propolisowy. Konsystencja propolisu zależy głównie od temperatury. Jest on dużo twardszy i odporniejszy na temperaturę niż wosk. W temperaturze 15°C propolis jest twardy i kruchy, w 34,5–36°C (temperatura gniazda) staje się miękki i plastyczny, a w temperaturze ponad 45°C – lepki i kleisty. Jest płynny w temperaturze 70–80°C, chociaż dla niektórych próbek propolisu punkt topnienia wynosi powyżej 100°C. Gęstość propolisu mieści się w przedziale od 1,20 do 1,27 g/cm³, jest więc cięższy od wosku pszczelego (0,96 g/cm³) [24, 51].

2.3. Skład chemiczny propolisu

Skład chemiczny propolisu jest zróżnicowany i uzależniony od roślinności obszaru geograficznego, z którego pochodzi, od pory roku i rasy pszczół. Ogól-

nie w skład propolisu wchodzi: żywice (50%), olejki eteryczne (10%), woski (30%), pyłki kwiatowe (5%) i domieszki mechaniczne (5%). Dotychczas wyodrębniono ponad 300 substancji wchodzących w jego skład. Znalezione w składzie propolisu substancje należą do tzw. substancji grupy GRAS (generally recognized as safe), ogólnie uznanych za bezpieczne. Polski propolis pochodzi przede wszystkim z pączków liściowych topoli czarnej (*Populus nigra*). Znajduje się w nim ok. 65% substancji biologicznie czynnych. Substancje uznane za lecznicze to głównie flawonoidy, których zawartość w propolisie wynosi od 3,0 do 8,5% i różne substancje fenolowe oraz aromatyczne (około 77%). Wśród kwasów aromatycznych należy wymienić: cynamonowy, kawowy, ferulowy, benzoesowy, salicylowy, *p*-kumarowy. Do najważniejszych estrów aromatycznych zalicza się estry etylowe i fenyloetylowe kwasu cynamonowego i kawowego. Najczęściej wykrywa się w propolisie następujące flawonoidy: chryzynę, tektochryzynę, pinostrobinę, pinocembrynę, galanginę i chalkon pinostrobinowy, rzadziej kemferol, kwercetynę, apigeninę, genkwaninę czy pinobanksynę. Z pozostałych związków występujących w polskim propolisie warto wymienić: związki lotne (geraniol, nerol, farnezol, β -eudesmol, kariofilen, patchulen, skwalen) i inne związki aromatyczne (kumaran, wanilinę) oraz węglowodory (eikosan, trikosan, pentakosan, heksadekanol), alkohole triterpenowe (cholinasterol, fukosterol, stigmasterol), enzymy (amylazy, esterazy), biopierwiastki, m.in.: wapń, magnez, mangan, cynk, cyna, miedź, krzem, żelazo, glin, srebro, sód, potas, chrom, stront i witaminy: B1, B2, B5, B6, C, D, E, prowitaminę A [3, 5, 21, 24, 25].

Propolis wykazuje różnorodność aktywności farmakologicznej. Jest najaktywniejszy biologicznie wśród produktów pszczelich. Najważniejsze i najbardziej znane właściwości propolisu to działanie przeciwdrobnoustrojowe oraz przeciwzapalne, antyoksydacyjne, przeciwnowotworowe i immunostymulacyjne [51].

3. Aktywność przeciwbakteryjna propolisu

Propolis wykazuje szerokie spektrum aktywności, zarówno przeciwko bakteriom tlenowym i beztlenowym, Gram-dodatnim, jak również, chociaż w mniejszym stopniu Gram-ujemnym (Tabela I). Jest to spowodowane m.in. złożoną budową ściany komórkowej u tej grupy bakterii, niską przepuszczalnością błony zewnętrznej oraz występowaniem systemu efflux, białek membranowych odpowiadających za aktywny transport z komórki leków i innych substancji chemicznych, w tym składników propolisu. Warto podkreślić, że wchodzące w skład propolisu żywice i zawarte w nich substancje są wydzielane przez rośliny do ich ochrony przed patogenami, głównie bakteriami Gram-dodatnimi [44, 49].

Tabela I
Wpływ ekstraktu etanolowego z propolisu na bakterie

Bakterie Gram-dodatnie tlenowe	MIC mg/ml	Bakterie Gram-ujemne tlenowe	MIC mg/ml
<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus</i> spp. (<i>S. epidermidis</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. hominis</i> , <i>S. warnerii</i> , <i>S. auricularis</i> , <i>S. capitis</i>)	0,05–1	<i>Escherichia coli</i>	≥ 2,56
		<i>Salmonella</i> spp. (<i>S. Enteritidis</i> , <i>S. Typhi</i> , <i>S. Typhimurium</i>)	≥ 2,56
<i>Streptococcus</i> spp. (<i>S. pyogenes</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>S. mutans</i> , <i>S. sorbinus</i> , <i>S. viridans</i>)	0,05–1	<i>Proteus vulgaris</i> , <i>P. mirabilis</i>	≥ 2,56
<i>Enterococcus</i> spp. (<i>E. faecalis</i>)	0,5–5	<i>Shigella dysenteriae</i> , <i>S. sonnei</i>	≥ 2,56
<i>Micrococcus luteus</i>	0,05–1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	≥ 5,12
<i>Bacillus cereus</i> , <i>B. subtilis</i>	0,125–0,5	<i>Enterobacter aerogenes</i>	≥ 5,12
<i>Mycobacterium</i> spp.	≥ 1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	≥ 2,56
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	≥ 2–5	<i>Aeromonas hydrophila</i>	≥ 2,56
<i>Corynebacterium</i> spp.	0,05–1	<i>Helicobacter pylori</i>	≥ 5,12
		<i>Campylobacter jejuni</i>	≥ 5
		<i>Hemophilus influenzae</i>	≥ 5
<i>Listeria monocytogenes</i>	≥ 2,56	<i>Brucella abortus</i> , <i>B. melitensis</i>	≥ 5,12
Bakterie Gram-dodatnie beztlenowe	MIC mg/ml	Bakterie Gram-ujemne beztlenowe	MIC mg/ml
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	0,01–0,5	<i>Actinobacillus oralis</i> , <i>A. gingivalis</i>	0,06
<i>Peptococcus</i> spp.	1–3	<i>Porphyromonas anaerobius</i> , <i>P. melaninogenica</i>	0,05
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	0,5–1	<i>Bacteroides</i>	0,01–0,5
<i>Eubacterium</i> spp.	0,5–1	<i>Prevotella intermedia</i>	0,05
<i>Propionibacterium</i> spp.	0,5–1	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	0,01–0,06
<i>Arachnia</i> spp.	0,5–1	<i>Veillonella parvula</i>	1–3
<i>Actinomyces</i> spp.	1–3	<i>Leptotricha</i>	1–3
<i>Clostridium</i> spp.	1–3		

MIC – minimalne stężenie propolisu hamujące wzrost bakterii, na podstawie: [17, 16, 19, 20, 35, 39, 40]

Występuje korelacja między aktywnością przeciwbakteryjną propolisu a jego składem chemicznym, który jest zależny od pochodzenia. Fakt ten przyczynił się do wydzielenia określonych typów chemicznych propolisu [30]. Pomimo zróżnicowanego składu chemicznego, wszystkie zbadane dotąd typy propolisu wykazują podobnie wysoką aktywność przeciwbakteryjną [4, 5, 44]. W propolisie europejskim, północnoamerykańskim i azjatyckim klimatu umiarkowanego, którego głównym źródłem roślinnym jest topola, zwłaszcza topola czarna (*Populus nigra*), podstawowymi związkami bakteriobójczymi są flawony, flawanony, kwasy fenolowe i ich estry. Flawony i flawonole (inne niż w propolisie topolowym) występują w brzozie brodawkowatej (*Betula verrucosa*), z której otrzymuje się propolis rosyjski. Natomiast w Ameryce Pd., głównie w Brazylii, popularny jest propolis zielony, który jest zbierany przez pszczoły miodne z *Baccharis dracunculifolia*, rośliny typowej dla regionu tropikalnego. W propolisie *Baccharis*, flawonoidy są obecne w małych ilościach, natomiast przeważają prenylowe pochodne kwasu kawowego i *p*-kumarowego oraz pochodne kwasu cynamonowego, zwłaszcza artepilina C i bakcharyna, a także kwasy diterpenowe. Inny typ pro-

polisu, o którym należy wspomnieć, to propolis czerwony występujący w Brazylii i na Kubie, a pochodzący z rośliny *Dalbergia ecastophyllum* [21, 24, 33, 37, 42]. Ważne związki bioaktywne propolisu europejskiego oraz brazylijskiego zielonego i czerwonego zostały wymienione w tabeli II.

Ze względu na złożony skład propolisu, nie może on być stosowany bezpośrednio w stanie surowym. Dlatego istotny wpływ na aktywność propolisu mają rozpuszczalniki stosowane do jego ekstrakcji. Wiele z substancji bakteriobójczych rozpuszcza się w alkoholu lub/i wodzie, a niektóre w innych rozpuszczalnikach (Tabela III). Efekt przeciwbakteryjny propolisu zależy ponadto od stężenia i jest do niego wprost proporcjonalny. Duży wpływ na wrażliwość na propolis ma również pochodzenie szczepów bakteryjnych (ludzkie, zwierzęce), ich zjadliwość, oporność na antybiotyki oraz metodyka przeprowadzonych badań (działanie bakteriostatyczne lub bakteriobójcze, wielkość inokulum, użyte podłoże bakteriologiczne, warunki inkubacji) [2, 31].

Właściwości przeciwbakteryjne propolisu zostały potwierdzone w licznych badaniach. Zdaniem Stojko i wsp. [45] wysoce aktywny propolis to ten, który w stężeniu 0,15–0,6 mg/ml hamuje wzrost szczepu

Tabela II
Główne składniki europejskiego propolisu topolowego [3], brazylijskiego propolisu zielonego [31] i czerwonego [42]

Związki chemiczne	Zawartość (mg/g)	Związki chemiczne	Zawartość (mg/g)	Związki chemiczne	Zawartość (mg/g)
Propolis topolowy		Propolis zielony		Propolis czerwony	
Chryzyna	8,4	Artepilina C	82,96	Formononetyna	10,2
Octan 3-pinobanksyny	8,0	Octan 3-pinobanksyny	13,92	Izolikwirytygenina	4,8
Galangina	7,8	Kemferyd	11,6	Pinocebryna	3,3
Pinocebryna	7,2	Galangina	9,75	Likwirytygenina	1,8
Pinobanksyna	3,7	Sakuranetyna	5,57	Octan 3-pinobanksyny	1,7
Estry pentenyłowe kwasu kawowego	3,3	Kwas kumarowy	3,56	Pinobanksyna	1,7
Estry benzylowe kwasu kawowego	3,0	Chryzyna	3,51	Luteolina	1,2
Estry fenyletyłowe kwasu kawowego	2,8	Kemferol	1,77	Rutyna	0,7
Glicerydy fenolowe	1,1	Kwas cynamonowy	1,66	Kwercetyna	0,5
		Kwercetyna	1,38	Daidzeina	0,3
		Izoramnetyna	0,91		

Tabela III
Substancje zawarte w ekstraktach propolisowych w zależności od zastosowanego rozpuszczalnika [11]

Woda	Metanol	Etanol	Chloroform	Eter	Dichlorometan	Aceton
Antocyjany	Antocyjany	Taniny	Terpeny	Terpeny	Terpeny	Flawonole
Skrobia	Terpeny	Polifenole	Flawonoidy	Taniny	Kumaryny	
Taniny	Saponiny	Poliacetyleny		Polifenole	Alkaloidy	
Saponiny	Garbniki	Flawonole		Poliacetyleny	Kwasy tłuszczowe	
Terpeny	Xanthoxyllina	Terpeny		Flawonole		
Poli-peptydy	Quassinoidy	Sterole		Sterole		
Lektyny	Totarol	Alkaloidy		Alkaloidy		
	Laktony					
	Flawony					
	Fenony					
	Polifenole					
	Poli-peptydy					
	Lektyny					

wzorcowego *S. aureus* P 209 (Oxford). Zbadano aktywność etanolowych ekstraktów z propolisu (EEP, ethanolic extract of propolis) zbieranego z 18 regionów w Rosji wobec *Staphylococcus aureus* i *Bacillus cereus* jako przedstawicieli bakterii Gram-dodatnich oraz *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa* – bakterii Gram-ujemnych. W badaniach zastosowano test rozcieńczeń i określono najmniejsze stężenie propolisu całkowicie hamujące wzrost, co odpowiada MIC (minimal inhibitory concentration) tego propolisu wobec badanej bakterii. Stwierdzono, że próbki propolisu o stężeniu 0,125–0,5 mg/ml hamowały wzrost *S. aureus* i *B. cereus*, natomiast nie miały wpływu na wzrost *E. coli* i *P. aeruginosa* nawet w stężeniu wyższym niż 1,0 mg/ml [40]. Badania Kędzi [18] dały podobne efekty. Na EEP były wrażliwe głównie bakterie Gram-dodatnie z rodzaju *Staphylococcus*, *Streptococcus* i *Corynebacterium* (MIC=0,05–1,0 mg/ml).

Mniejszą podatność na propolis wykazywały paciorkowce kałowe z rodzaju *Enterococcus* (0,5–5,0 mg/ml), natomiast niską jelitowe pałeczki Gram-ujemne fermentujące z rodzaju *Escherichia*, *Klebsiella* i *Proteus* oraz pałeczki niefermentujące z rodzaju *Pseudomonas* (MIC=0,5–10,0 mg/ml). W badaniach użyto szczepów wyizolowanych z materiału szpitalnego.

Inne doświadczenia potwierdzają aktywność propolisu w stężeniu 0,5–1,0 mg/ml przeciwko 106 szczepom *S. aureus*. Ponadto, propolis wykazał synergistyczne działanie z następującymi antybiotykami: benzopenicylinami, tetracyklinami i erytromycyną oraz był aktywny wobec szczepów opornych na te leki [41]. Z badań przeprowadzonych w Turcji wynika, że spośród bakterii Gram-dodatnich najbardziej wrażliwy na 45 różnych próbek propolisu okazał się wywołujący próchnicę zębów *Streptococcus mutans*, a z bakterii Gram-ujem-

nych – pałeczka czerwonki *Shigella sonnei*. Zastosowane ekstrakty propolisu w DMSO (dimetylsulfoksyd) wykazywały większą aktywność w porównaniu z ekstraktami acetonowymi, z wyjątkiem wpływu na *Brucella melitensis*, bezwzględnego pasożyta wewnątrzkomórkowego zwierząt i ludzi. Propolis turecki posiadał taką samą, a nawet większą aktywność niż antybiotyki podawane w zakażeniach szczepami *S. mutans*, *Salmonella* Typhi, *S. sonnei* i *P. aeruginosa* [50].

Kolejne prace także potwierdzają różnice we wrażliwości na propolis chorobotwórczych bakterii tlenowych Gram-dodatnich i Gram-ujemnych [12, 16, 23, 26]. W badaniach Grange i Daweya [23], zastosowany EEP całkowicie hamował wzrost *S. aureus*, *Enterococcus* spp. i *B. cereus*, a częściowo *E. coli* i *P. aeruginosa*. Nie wykazywał natomiast działania inhibicyjnego wobec *Klebsiella pneumoniae*. Badania przeprowadzone w Iraku wykazały także wyższą aktywność propolisu wobec bakterii Gram-dodatnich oraz przewagę w działaniu bakteriobójczym EEP nad wodnym ekstraktem z propolisu (EAP, aqua extract of propolis). Minimalne stężenie EEP hamujące wzrost *S. aureus* i *Streptococcus pyogenes* wyniosło $\geq 1,28$ mg/ml, zaś dla *Listeria monocytogenes*, *E. coli*, *S. Typhi* i *P. aeruginosa* było to $\geq 2,56$ mg/ml. Największe wartości MIC zanotowano dla *Enterobacter aerogenes*, *K. pneumoniae* i *Helicobacter pylori* – $\geq 5,12$ mg/ml. Natomiast MIC EAP dla szczepów *S. aureus*, *S. pyogenes* i *E. coli* wyniósł $\geq 2,56$ mg/ml, a dla pozostałych badanych gatunków bakterii był $\geq 5,12$ mg/ml [16]. Z badań Łazebnika i wsp. [26] wynika z kolei, że wodny ekstrakt z propolisu o stężeniu 1,2 mg/ml hamował wzrost dwóch szczepów wzorcowych *H. pylori* i jednego szczepu wyizolowanego z materiału klinicznego.

Wysokie stężenia EEP były konieczne do zahamowania wzrostu ludzkich patogenów opornych na antybiotyki. Wartości MIC propolisu libańskiego były następujące: 6,25 mg/ml dla szczepu *S. aureus* metycylinoopornego (MRSA) i 12,5 mg/ml dla szczepu *K. pneumoniae* ESBL-dodatniego [8]. Duże zróżnicowanie we wrażliwości na propolis wykazują prątki kwasooporne z rodzaju *Mycobacterium*. Scheller i wsp. [39] stwierdzili u 6 (37,5%) z 13 klinicznych szczepów *Mycobacterium* spp., zahamowanie wzrostu w obecności propolisu o stężeniu 1,8 mg/ml. Do zahamowania rozwoju pozostałych 7 szczepów wymagane były stężenia EEP wielokrotnie wyższe (MIC > 10 mg/ml). Rojas-Hernandez i wsp. [35] dowodzą, że wszystkie szczepy szpitalne *Mycobacterium* spp. (n = 30) były hamowane przez EEP już w stężeniu 1,0 mg/ml. Znacznie mniej wrażliwe były szczepy prątka gruźlicy (*M. tuberculosis*), zastosowany EEP w stężeniach 2,0–5,0 mg/ml zahamował wzrost tylko 30% z nich.

EEP jest skuteczny wobec bakterii beztlenowych. Największą aktywność wykazywał wobec bakterii

z rodzaju *Bacteroides* i *Peptostreptococcus* (MIC = 0,01–0,5 mg/ml), nieznacznie mniejszą w stosunku do *Propionibacterium*, *Arachnia* i *Eubacterium* (MIC = 0,5–1,0 mg/ml), natomiast najmniej efektywny był wobec sporującej laseczki *Clostridium* (MIC = 1,0–3,0 mg/ml) [19]. W innych badaniach [20], EEP o stężeniach 0,01–3 mg/ml był aktywny wobec 690 szczepów bakterii beztlenowych wyizolowanych ze zmian zapalnych w obrębie jamy ustnej i jamy brzusznej. Z tymże bakterie z rodzaju *Bacteroides*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Actinomyces*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Leptotricha*, *Veilonella* były mniej podatne na EEP (najwięcej szczepów wrażliwych tylko na wyższe stężenia EEP: 1,0–3,0 mg/ml) niż bakterie z rodzaju *Fusobacterium* (najwięcej szczepów wrażliwych na niskie stężenia EEP: 0,01–0,06 mg/ml).

Do oceny wrażliwości danej bakterii na propolis, badacze stosują często dwie metody: krążkową i studzienkową. W pierwszej mierzy się wielkość strefy zahamowania wzrostu bakterii wokół krążka nasączonego określoną ilością propolisu, a w drugiej metodzie stosuje się rezerwuarki wypełnione propolisem. Według obowiązującej zasady, ekstrakt propolisowy wykazuje pozytywny efekt działania na bakterie, gdy strefa wokół krążka jest większa od 6 mm. Hendi i wsp. [16] zastosowali obie te metody i stwierdzili, że szczepy *S. aureus* charakteryzowały się większą wrażliwością niż inne badane bakterie Gram-dodatnie, a przede wszystkim bakterie Gram-ujemne, z wyjątkiem szczepu wzorcowego *E. coli*. W metodzie studzienkowej przy zastosowaniu 10% EEP otrzymano następujące wyniki: *S. aureus* – 25 mm, *S. pyogenes* – 14 mm, *L. monocytogenes* – 18 mm, *E. coli* – 15 mm, *S. Typhi* – 12 mm, *E. aerogenes* – 10 mm, *K. pneumoniae* – 12 mm, *P. aeruginosa* – 10 mm i *H. pylori* – 10 mm. Wielkość strefy zahamowania wzrostu bakterii wzrastała proporcjonalnie do zastosowanego wyższego stężenia EEP, 20 i 30%. W metodzie krążkowej średnica strefy zahamowania wzrostu była mniejsza dla większości badanych gatunków bakterii i wyniosła od 10 do 13 mm dla bakterii Gram-dodatnich oraz od 7 do 12 mm dla bakterii Gram-ujemnych. Doświadczenia przeprowadzone z EAP dowiodły, że ma on dużo niższą aktywność przeciwbakteryjną niż EEP. Tylko trzy gatunki bakterii wykazywały wrażliwość (*S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*), a wielkość strefy zahamowania wzrostu tych bakterii wokół studzienek wypełnionych 10% EAP była kolejno następująca: 11, 13 i 11 mm. W metodzie krążkowej, 10% EAP wykazywał właściwości przeciwbakteryjne wyłącznie wobec szczepów *S. aureus* (9 mm) i *E. coli* (7 mm) [35]. W badaniach przeprowadzonych przez El-Shouny i wsp. [11] stwierdzono, że wzrost dwóch dominujących patogenów, paciorkowca ropotwórczego (*S. pyogenes*) i pałeczki *Hemophilus influenzae* izolowanych z wymazu z gardła od dzieci chorych

na zakażenie górnych dróg oddechowych, w obecności 20% EEP uległ zahamowaniu. Średnia wartość strefy wokół krążków była dla wymienionych szczepów kolejno następująca: 24 mm i 17 mm.

Zbadano aktywność 30% EEP z Bułgarii wobec 38 szczepów klinicznych *H. pylori* izolowanych od chorych z wrzodami żołądka i dwunastnicy. Średnia wielkość strefy zahamowania wzrostu bakterii wokół studzienki przy zastosowaniu kolejno 30, 60 i 90 μ l 30% EEP oraz 30 μ l etanolu jako kontroli wyniosła odpowiednio: 17,8; 21,2; 28,2 i 8,5 mm. EEP okazał się znacznie bardziej aktywny niż etanol w zahamowaniu wzrostu szczepów *H. pylori* ($p < 0,001$). Wyniki otrzymane metodą krążkową były zbliżone, choć wartości nieco niższe [7]. Metodę krążkową do zbadania wpływu 10% EEP na 26 szczepów *H. pylori* i 18 szczepów *Campylobacter jejuni*, Gram-ujemną bakterię, która u człowieka wywołuje zapalenie jelit, zastosowali Kimoto i wsp. [22]. Uzyskana średnia wielkość strefy zahamowania wzrostu dla szczepów *H. pylori* wyniosła 12,4 mm, a dla *C. jejuni* – 11,6 mm. Z kolei Dobrowolski i wsp. [9] stwierdzili, że średnice stref zahamowania wzrostu bakterii z rodzaju *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Diplococcus* i *Corynebacterium* wokół krążków bibułowatych zawierających 10% EEP są większe (12–17 mm) w porównaniu do stref zahamowania wzrostu bakterii z rodzaju *Escherichia*, *Salmonella* i *Shigella* (11–13 mm). Także inni autorzy stosując te same techniki badawcze wykazali nieco większą wrażliwość na EEP bakterii Gram-dodatnich niż Gram-ujemnych [3, 10, 24].

3.1. Mechanizm działania propolisu

Mechanizm działania bakteriobójczego propolisu jest złożony i nie da się go odnieść do działania jakiegokolwiek antybiotyku. Jest to bowiem suma działań wszystkich zawartych w propolisie substancji bioaktywnych, zwłaszcza związków fenolowych i flawonoidów. Odpowiadają one m.in. za uszkodzenie struktury i funkcji ściany komórkowej oraz błony cytoplazmatycznej. Inaktywują białka enzymatyczne zlokalizowane w błonie cytoplazmatycznej oraz zaburzają transport substancji pokarmowych przez błonę, a także syntezę składników komórkowych. Substancje te mają także wpływ na permeabilizację błony komórkowej, w wyniku czego dochodzi do nadmiernej utraty jonów wodorowych i potasowych, a w rezultacie obniża się potencjał błonowy. Następstwem tego jest zaburzenie funkcjonowania pompy protonowej oraz związanego z tym zmniejszenia energii w postaci ATP, która jest niezbędna dla ruchu rzęsek, w ten sposób bakterie urzęsione wykazują zmniejszony ruch lub jego brak. Propolis również hamuje syntezę białka i atakuje materiał genetyczny, powodując dezintegrację i fragmentację DNA. Wszystkie zaburzenia prowadzą do lizy i śmierci komórki bakteryjnej [29, 47].

Omówione działania propolisu zależą od szczepu bakteryjnego, stężenia związków bioaktywnych zawartych w propolisie i czasu ekspozycji. Dla przykładu, związki fenolowe w niskich stężeniach wpływają ujemnie na bilans bioenergetyczny błony cytoplazmatycznej, co skutkuje uszkodzeniem ruchu bakterii *Bacillus subtilis*. Natomiast wysokie dawki związków fenolowych powodują denaturację białek bakteryjnych, m.in. enzymów biorących udział w metabolizmie komórkowym [29]. Kwasy kawowy, benzoowy i cynamonowy najprawdopodobniej powodują uszkodzenia strukturalne i funkcjonalne ściany komórkowej i błony cytoplazmatycznej. Flawonoidy zaburzają metabolizm komórkowy poprzez ujemny wpływ na reakcje fosfo- i defosforylacji [28, 29, 47]. Przy pomocy mikroskopii elektronowej stwierdzono, że EEP i zawarte w nim substancje przeciwbakteryjne (flawonoidy i ester fenyloetylowy kwasu kawowego – CAPE, caffeic acid phenethyl ester) hamowały podziały komórkowe bakterii z rodzaju *Streptococcus agalactiae*, konsekwencją tego było tworzenie struktur pseudo-wielokomórkowych. Metoda kolorymetryczna zaś wykazała zmniejszony poziom białka w komórce bakteryjnej [47]. Liczne składniki propolisu działają na czynniki wirulencji bakterii Gram-dodatnich, m.in. całkowicie hamują aktywność koagulazy gronkowcowej i zmniejszają aktywność lipazy oraz zabezpieczają przed produkcją biofilmu bakteryjnego [38].

3.2. Wpływ składników propolisu na bakterie

Próbki propolisu w zależności od pochodzenia różnią się zawartością flawonoidów. Analizowano 38 próbek propolisu pobranych z różnych regionów Chorwacji i dowiedziono, że te, które zawierały najwięcej flawonu – pinocembryny wykazywały wysoki stopień zahamowania wzrostu *B. subtilis* [32]. Nie tylko stężenie flawonoidów miało wpływ na zahamowanie pięciu szczepów z rodzaju *Mycobacterium*, ale także ich właściwości biologiczne. Szczep *Mycobacterium* spp. 279 okazał się najbardziej wrażliwy, a minimalne stężenie flawonoidów, które spowodowało zahamowanie jego wzrostu wyniosło 9,96 μ g/ml [17]. Koru i wsp. [23] wymieniają także flawonoidy, a wśród nich pinobanksynę, kwercetynę, naryngeninę, galanginę i chryzynę oraz kwasy aromatyczne, m.in. kwas kawowy, jako składniki EEP z Turcji, które działały bakteriobójczo na patogeny jamy ustnej. Wartości MBC (minimal bactericidal concentration) propolisu dla badanych bakterii mieściły się w zakresie od 8 do 512 mg/ml. Śmierć bakterii beztlenowych Gram-dodatnich (*Peptostreptococcus anaerobius*, *P. micros*, *L. acidophilus*, *Actinomyces naeslundii*) obserwowano już po 4 h inkubacji bakterii w obecności EEP, natomiast dla bakterii beztlenowych Gram-ujemnych czas ten był dłuższy i wyniósł 8 h dla *Prevotella oralis*, *P. melaninogenica* i *Porphyromonas gingivalis*; 12 h dla *Fusobacterium nucleatum*, a 16 h

dla *Veilonella parvula*. Propolis wykazuje działanie bakteriobójcze w szerokim zakresie stężeń ($9 \pm 0,3$ do $85 \pm 2,1$ mg/ml) wobec szczepów *Lactobacillus fermentum*, wyizolowanych od pacjentów z próchnicą zębów. Przeprowadzona analiza chromatograficzna pozwoliła na identyfikację związków polifenolowych o właściwościach przeciwbakteryjnych: kwasu kawowego, CAPE oraz flawonoidów (myrcetyny, kwercetyny, kemferolu, apigeniny, pinocembryny i galanginy) [36].

Próbki propolisu pochodzące z różnych regionów geograficznych Turcji w wysokich stężeniach (rozcieńczenie 1:10) wykazywały silny efekt bakteriobójczy wobec patogenów przenoszonych drogą pokarmową: *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 i *Listeria monocytogenes* ATCC 1462. Głównymi składnikami poszczególnych 25 próbek EEP były: flawonoidy, estry kwasów aromatycznych, alkohole aromatyczne, kwasy aromatyczne, alifatyczne kwasy karboksylowe, terpeny, estry alifatycznych kwasów karboksylowych [44]. Badania dotyczące związku między aktywnością EEP wobec *B. cereus* a zawartością w poszczególnych próbkach propolisu polifenoli, wykazały, że aż w 91% przypadków wysoka zawartość tych związków ($\geq 59\%$) miała wpływ na właściwości przeciwbakteryjne [27]. W innych badaniach stwierdzono, że duże stężenie CAPE, ferulanu benzylu i galanginy występujących w propolisie niemieckim odpowiadały za aktywność przeciwko *S. aureus* i *E. coli* [15]. Podobnie wysoka zawartość związków fenolowych w propolisie portugalskim miała wpływ na zahamowanie wzrostu szczepów izolowanych z materiału klinicznego, takich jak: *S. aureus* (MIC = 15 μ g/ml), *S. mutans* (MIC = 28 μ g/ml), *Actinomyces israelii* (MIC = 1,75 μ g/ml) i *E. faecalis* (MIC = 7 μ g/ml) [14]. Niektóre diterpeny oraz związki fenolowe obecne w propolisie bułgarskim posiadały aktywność wobec *H. pylori* [7].

Ważnym związkiem przeciwbakteryjnym zidentyfikowanym w propolisie zielonym jest artepilina C, pochodna 3,5-diprenylo-4-hydroksylowa kwasu cynamonowego. Wysoką aktywność tego związku stwierdzono w stosunku do *B. cereus*, *E. aerogenes* i *Arthrododerma benhamiae*. Wskazuje się również na flawonoidy: galanginę, sakuranetynę, kemferol, pinocembrynę i pinobanksynę, jako związki o silnym działaniu przeciwbakteryjnym [1]. Hashimoto i wsp. [13] w 1998 r. zaobserwowali, że najsilniejszym działaniem na *H. pylori* odznaczał się kwas *p*-kumarowy, składnik chloroformowego ekstraktu z propolisu *Baccharis*, który hamował wzrost dwóch szczepów wzorcowych w stężeniu 15 μ g/ml. Trzy lata później inni naukowcy, Banskota i wsp. [6] z metanolowego ekstraktu wydzielili 8 związków zdolnych do zahamowania wzrostu trzech wzorcowych szczepów *H. pylori* w stężeniach 130–1000 μ g/ml. Najsilniejszym działaniem inhibicyjnym odznaczał się ester metylowy kwasu agatowego. Oprócz kwasów fenolowych i flawonoidów również di-

i triterpeny izolowane z propolisu brazylijskiego, ale także i kreteńskiego wykazują aktywność wobec szerokiego spektrum drobnoustrojów chorobotwórczych [34].

Należy jednak podkreślić, że działanie natywnego ekstraktu z propolisu jest zdecydowanie silniejsze niż poszczególnych jego frakcji.

4. Podsumowanie

Propolis jest skuteczny w stosunku do bakterii chorobotwórczych Gram-dodatnich, tlenowych i bez-tlenowych. Wiele bakterii Gram-ujemnych jest także wrażliwych na ten produkt. Jego właściwości przeciwbakteryjne są wypadkową działania flawonoidów, kwasów aromatycznych i ich estrów oraz seskwiterpenów.

Podsumowując, propolis wykazuje potencjalne możliwości wykorzystania w terapii przeciwbakteryjnej, jako alternatywy dla dziś stosowanych farmaceutyków.

Piśmiennictwo

1. Aga H., Shibuya T., Sugimoto T., Kurimoto M., Nakajima S.: Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**, 945–946 (1984)
2. Awale S., Shrestha S.P., Tezuka Y., Ueda J.Y., Matsushige K., Kadota S.: Neoflavonoids and related constituents from Nepalese propolis and their nitric oxide production inhibitory activity. *J. Nat. Prod.* **68**, 858–864 (2005)
3. Bankova V.S., Castro D.S.L., Marcucci M.C.: Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, **31**, 3–15 (2000)
4. Bankova V.S.: Recent trends and important developments in propolis research. *Evidence-based Complementary Altern. Med.* **2**, 29–32 (2005)
5. Bankova V.S., Popova M., Trusheva B.: Plant origin of propolis: Latest developments and importance for research and medicinal use (w) Apicultura – De la stiinta la agribusiness si apiterapie, red. L.A. Marghitas, D. Dezmirean, Editura Academic Pres, Cluj Napoca, 2007, s. 40–46
6. Banskota A.H., Tezuka Y.Y., Kadota S.: Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytoter. Res.* **15**, 561–571 (2001)
7. Boyanova L., Derejian S., Koumanova R., Katsarov N., Gergova G., Mitov I., Nikolov R., Krastev Z.: Inhibition of *Helicobacter pylori* growth in vitro by Bulgarian propolis: preliminary report. *J. Med. Microbiol.* **52**, 417–419 (2003)
8. Chamandi G., Olama Z., Holail H.: Antimicrobial effect of propolis from different geographic origins in Lebanon. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* **4**, 328–342 (2015)
9. Dobrowolski J.W., Vohora S.B., Sharma K., Shah S.A., Naqvi S.A., Dandiya P.C.: Antibacterial, antifungal antiameobic, antinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *J. Ethnopharmacol.* **35**, 77–82 (1991)
10. Dota K.F.D., Consolaro M.E.L., Svidzinski T.I.E., Bruschi M.L.: Antifungal activity of brazilian propolis microparticles against yeasts isolated from vulvovaginal candidiasis. *Evidence-based Complementary Altern. Med.* DOI: 10.1093/ecam/nea029 (2011)
11. El-Shouny W., Muagam F., Sadik Z., Hamza W.: Antimicrobial activity of propolis extract on URT infections in pediatric patients admitted to Al-Thowrah hospital, Hodeidah City, Yemen. *World J. Med. Sci.* **7**, 172–177 (2002)

12. Grange J.M., Davey R.W.: Antibacterial properties of propolis (bee glue). *J. Royal Soc. Med.* **83**, 159–160 (1990)
13. Hashimoto T., Aga H., Abchi A.: Anti-*Helicobacter pylori* compounds in Brazilian propolis. *Nat. Med.* **52**, 518–520 (1998)
14. Havsteen B.I.I.: The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Therapeut.* **96**, 67–202 (2002)
15. Hegazi A.G., Abd El Hady F.K.: Egyptian propolis: antioxidant, antimicrobial activities and chemical composition of propolis from reclaimed lands. *Z. Naturforsch.* **57**, 395–402 (2002)
16. Hendi N.K.K., Naher H.S., Al-Charrakh A.H.: *In vitro* antibacterial and antifungal activity of Iraqi propolis. *J. Med. Plant Res.* **5**, 5058–5066 (2011)
17. Józwiak Z., Trytek J.: The effect of propolis extracts containing flavonoid compounds on acid-resistant saprophytic bacilli. *Pszczel. Zesz. Nauk.* **29**, 47–65 (1985)
18. Kędzia B.: Przeciwdrobnoustrojowe działanie etanolowego ekstraktu z propolisu (EEP). Dokumentacja tematu 3/73. Inst. Rośl. Przetw. Ziel. Poznań, 1974
19. Kędzia A.: Działanie wyciągu etanolowego z propolisu na bakterie beztlenowe. *Herba Pol.* **32**, 53–57 (1986)
20. Kędzia A.: Wrażliwość bakterii bezwzględnie beztlenowych na wyciąg etanolowy z propolisu. *Herba Pol.* **34**, 267–272 (1988)
21. Kędzia B.: Skład chemiczny i aktywność biologiczna propolisu pochodzącego z różnych rejonów świata. *Post. Fitoterapii*, **1**, 23–35 (2006)
22. Kimoto T, Arai S, Kohguchi M, Aga M., Nomura Y., Micallef M.J., Kurimoto M., Mito K.: Apoptosis and suppression of tumor growth by artemisinin C extracted from Brazilian propolis. *Cancer Detect. Prev.* **22**, 506–515 (1998)
23. Koru O., Toksoy F., Acikel C.H., Tunca Y.M., Baysallar M., Uskudar Guclu A.: *In vitro* antimicrobial activity of propolis samples from different geographical origins against certain oral pathogens. *Anaerobe*, **13**, 140–145 (2007)
24. Kujumgiev A., Tsvetkova I., Serkedjieva Y., Bankova V., Christov R., Popov S.: Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J. Ethnopharmacol.* **64**, 235–240 (1999)
25. Lotfy M.: Biological activity of bee propolis in health and disease. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* **7**, 22–31 (2006)
26. Łazebnik L.B., Dubtsova E.A., Kasianenko V.I., Komissarenko I.A.: Composition and some biological effects of propolis. *Eksp. Klin. Gastroenterol.* **2**, 112–116 (2006)
27. Malimon G.L., Shub T.A., Kagramanova K.A., Kivman G.Y.A.: Comparative study of alcoholic extracts of propolis from different geographic zones by spectrophotometric and antimicrobial-lactation. *Khimiko-farmatsevticheskii Zhurnal.* **14**, 114–117 (1980)
28. Marcucci M.C.: Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, **26**, 83–99 (1995)
29. Mirzoeva O.K., Grishanin R.N., Balder P.C.: Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiol. Res.* **152**, 239–246 (1997)
30. Nostro A., Cellini L., di Bartolomeo S., Cannatelli M.A., di Campli E., Procopio F., Grande R., Marzio L., Alonzo V.: Effects of combining extracts (from propolis or Zingiber officinale) with clarithromycin on *Helicobacter pylori*. *Phytother. Res.* **20**, 187–190 (2006)
31. Park Y.K., Alencar S.M., Aguiar C.L.: Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 2502–2506 (2002)
32. Pepeljnjak S., Jalsenjak I., Maysinger D.: Flavonoid content in propolis extracts and growth inhibition of *Bacillus subtilis*. *Pharmazie*, **40**, 122–123 (1985)
33. Piccinelli A.L., Lotti C., Campone L., Cuesta-Rubio O., Campo Fernandez M., Rastrelli L.: Cuban and Brazilian red propolis: botanical origin and comparative analysis by highperformance liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 6484–6491 (2011)
34. Popova M.P., Chinou I.B., Marekov I.N., Bankova V.S.: Terpenes with antimicrobial activity from Cretan propolis. *Phytochem.* **70**, 1262–1271 (2009)
35. Rojas-Hernandez N.M., Candelario M., Olivares E.: Antimicrobial activity of propolis against representatives of the genus *Mycobacterium*. *Rev. Biol. (Habana)*, **7**, 69–75 (1993)
36. Saavedra N., Barrientos L., Herrera C.L., Alvear M., Montenegro G., Salazar L.A.: Effect of Chilean propolis on cariogenic bacteria *Lactobacillus fermentum*. *Cienc. Investig. Agrar.* **38**, 117–125 (2011)
37. Sawaya A.C., Barbosa da Silva Cunha I., Marcucci M.C.: Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. *Chem. Cent. J.* **5**, 27 (2011)
38. Scazzocchio F., D'Auria F.D., Alessandrinia D., Pantanella F.: Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. *Microbiol. Res.* **161**, 327–333 (2006)
39. Scheller S., Kowalski H., Oklek K., Dworniczak S., Matsunoc T., Waldemar-Klimmek K., Rajca M., Shanid J.: Correlation between virulence of various strains of mycobacteria and their susceptibility to ethanolic extract of propolis (EEP). *Z. Naturforsch.* **53**, 1040–1044 (1998)
40. Shub T.A., Kagramanova K.A., Kivman G.Y.A., Tikhonov A.I., Gritsenko V.I.: Antimicrobial activity of propolis extracts. *Pharm. Chem. J.* **11**, 1242–1244 (1978)
41. Shub T.A., Kagramanova K.A., Voropaeva S.D., Kivman G.Y.A.: Effect of propolis on strains of *Staphylococcus aureus* resistant to antibiotics. *Antibiotiki*, **26**, 268–271 (1981)
42. Silva B.B., Rosalen P.L., Cury J.A., Ikegaki M., Souza V.C., Esteves A., Alencar S.M.: Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis. *Evid. Based Compl. Alt.* **5**, 313–316 (2008)
43. Speciale A, Costanzo R., Puglisi S., Musumeci R., Catania M.R., Caccamo F, Iauk L.: Antibacterial activity of propolis and its active principles alone and in combination with macrolides, β -lactams and fluoroquinolones against microorganisms responsible for respiratory infections. *J. Chemother.* **18**, 164–171 (2006)
44. Stepanović S., Antić N., Dakić I., Svabić-Vlahović M.: *In vitro* antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. *Microbiol. Res.* **158**, 353–357 (2003)
45. Stojko A., Scheller S., Szwarnowiecka I., Tustanowski J., Ostach H., Obuszko Z.: Biological properties and clinical application of propolis. *Arzneimittel-Forsch.* **28**, 35–37 (1978)
46. Sytnik I.A., Kovalik P.V.: Combined effect of propolis and different antibiotics on staphylococci. *Vestn. Otorinolaringol.* **6**, 47–50 (1983)
47. Takasi K., Kikuni N.B., Schiller H.: Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of propolis. *Provenance Planta Med.* **60**, 222–227 (1994)
48. Temiz A., Sener A., Ozkok Tüylü A., Sorkung K., Salih B.: Antibacterial activity of bee propolis samples from different geographical regions of Turkey against two foodborne pathogens, *Salmonella* Enteritidis and *Listeria monocytogenes*. *Turk. J. Biol.* **35**, 503–511 (2011)
49. Tosi B., Donini A., Romagnoli C., Bruni A.: Antimicrobial activity of some commercial extracts of propolis prepared with different solvents. *Phytother. Res.* **10**, 335–336 (1996)
50. Ugur A., Arslan T.: An *in vitro* study on antimicrobial activity of propolis from Mugla province of Turkey. *Med. Food.* **7**, 90–94 (2004)
51. Wagh V.D.: Propolis: a wonder bees product and its pharmacological potentials. *Advances in Pharmacol. Sci.* DOI: 10.1155/2013/308249 (2013)