Рекомендована д.ф.н., професором Т.Г.Ярних

УДК 638.135:001.891.53

МІКРОБІОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ВОДНОГО РОЗЧИНУ ПРОПОЛІСУ (КОД СПЦ-95, ВЕРСІЯ 01, 15.02.2007)

Л.В.Коношевич, О.І.Тихонов

Національний фармацевтичний університет

Наведені результати мікробіологічних досліджень водного розчину прополісу, що являє собою побічний продукт у виробництві настойки прополісу. Згідно з отриманими даними встановлено, що водний розчин прополісу за мікробіологічною чистотою відповідає критерію «А» та усім вимогам Державної фармакопеї України.

При проведенні технологічного процесу в промислових умовах при приготуванні настойки прополісу (ФС 42У-34-19 – 95) утворюється побічний продукт (відходи виробництва) – водний розчин прополісу, що володіє, за попередніми даними, вираженою полівалентною терапевтичною активністю.

Водний розчин прополісу є природним концентратом значної кількості біологічно активних речовин; оксикумаринів, фенолкарбонових кислот, полісахаридів, амінокислот, мікроелементів тощо [3, 5, 8].

У результаті проведених досліджень встановлено, що водний розчин прополісу проявляє противірусну, протизапальну, антиоксидантну активність тощо [4, 6, 7].

У зв'язку з вищенаведеним з метою розробки лікарських препаратів на основі нової біологічно активної субстанції – водного розчину прополісу ми вивчили його антимікробні властивості, тобто визначили мікробіологічну чистоту, розробивши перед цим сучасну промислову технологію його очистки та отримання.

Експериментальна частина

Для дослідження на мікробіологічну чистоту використовували 2 серії водного розчину препарату прополісу (серія 10410 та 20410). В кожній серії було по 3 ампули.

Поживні середовища, що використовувались для проведення дослідницької роботи, були стандартними, а виробник – Махачкалінський завод поживних середовищ. Термін придатності поживного середовища – до вересня 2013 р. Всі середовища готували у відповідності до вимог виробника (кількість порошку на 1 л, pH середовища, умови автоклавування та ін.). Кожне середовище, що використовувалось у ході експерименту, перевірялось на ростові якості відповідно до нормативних документів.

Для проведення випробувань водного розчину прополісу на мікробіологічну чистоту використовували тіогліколеве напіврідинне середовище, рідке середовище Сабуро, тверді поживні середовища: поживний агар, середовище Сабуро.

Для ідентифікації патогенного стафілокока, синьогнійної палички та різних видів ентеробактерій – середовище Чистовича, кров'яний агар на основі поживного агару з додаванням дефібринованої крові або еритроцитарної маси, середовище Ендо.

Результати та їх обговорення

Перед проведенням дослідження на мікробіологічну чистоту проводили випробування на відповідність ростових властивостей поживних середовищ. Поживні середовища інокулювали невеликою кількістю відповідних тест-штамів мікроорганізмів (10-10^2 колонієутворюючих одиниць на мл середовища – КУО/мл). Ріст тест-культури мікроорганізму на даному середовищі через 18-20 год підтверджує його придатність для дослідницької роботи. На середовище Сабуро засівали Candida albicans. На поживний агар – Pseudomonas aeruginosa та Bacillus subtilis, на середовище Чистовича – Staphylococcus aureus, на середовище Ендо – Escherichia coli. Тіогліколеве середовище витримували в термостаті при температурі 35ºС впродовж трьох діб [1, 2]. Дані наведені в табл. 1.

Всі культури мікроорганізмів відповідали таксономічному визначенню штамів, а морфологія колоній при культивуванні на середовищах та морфологія клітин при мікроскопії була типовою. Тіогліколеве середовище відповідало вимогам на стерильність – ріст мікроорганізмів відсутній, середовище прозоре.

Дослідження водного розчину прополісу на мікробіологічну чистоту проводили методом прямого висіву на рідкі середовища накопичення. При цьому розливали стерильно в пробірки тіогліколеве середовище та рідке середовище Сабуро по 10 мл. У кожну з пробірок вносили по 1 мл (1,0 г) досліджуваного водного розчину прополісу. Висіви інкубували впродовж 28 днів на тіогліколеве середовище в термостаті при температурі 35ºС, висіви – на рідке середовище Сабуро при температурі 25ºС. Результати випробувань наведені в табл. 2.

Як свідчать дані табл. 2, через 28 днів інкубації на середовище Сабуро ріст грибів не реєструвався, на тіогліколевому середовищі ріст мікроорганізмів також не спостерігався.

При дослідженні методом глибокого висіву, суть якого полягала в додаванні препарату в кількості 1,0 г (1 мл) в агар з наступним поверхневим висівом (1,0 г або 1 мл) на агар, розподіляли кількість життєздатних клітин мікроорганізмів та грибів. Дослідження глибокого та поверхневого висіву водного розчину прополісу на чашках Сабуро показали відсутність росту грибів. При культивуванні на поживному агарі

Таблиця 1

Ростові властивості поживних середовищ при інокуляції тест-мікроорганізмів перед випробуванням на мікробіологічну чистоту

Тест-штами	Поживні середовища	Умови культивування		Заключення
		температура, °С	тривалість культивування, год	
Staphylococcus aureus ATCC 6538	Чистовича	35	24-72	Морфологія колоній та клітин типова
Escherichia coli ATCC 25922	Ендо	35	24-72	Морфологія колоній та клітин типова
Bacillus subtilis ATCC 6633	Поживний агар	35	24-72	Морфологія колоній та клітин типова
Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027	Поживний агар	35	24-72	Морфологія колоній та клітин типова
Candida albicans ATCC 885/653	Сабуро	25	24-120	Морфологія колоній та клітин типова
х	Тіогліколеве для контролю стерильності	35	24-72	Ріст мікроорганізмів відсутній

Примітка: х – мікроорганізми не засівали

Таблиця 2

Ростові властивості поживних середовищ при інокуляції тест-мікроорганізмів перед випробуванням на мікробіологічну чистоту

Номер серії препарату	Середовища та умови культивування	
	Тіогліколеве середовище 28 днів при 35°С	Рідке середовище Сабуро 28 днів при 25°С
Серія 10410	Ріст мікроорганізмів відсутній	Ріст грибів відсутній
	Ріст мікроорганізмів відсутній	Ріст грибів відсутній
	Ріст мікроорганізмів відсутній	Ріст грибів відсутній
Серія 20410	Ріст мікроорганізмів відсутній	Ріст грибів відсутній
	Ріст мікроорганізмів відсутній	Ріст грибів відсутній
	Ріст мікроорганізмів відсутній	Ріст грибів відсутній

був відмічений ріст мікроорганізмів. Результати проведених досліджень представлені в табл. 3.

Як свідчать дані табл. 3, ріст грибів та мікроорганізмів був відсутній при дослідженні всіх зразків препарату.

Критерієм оцінки ефективності водного препарату прополісу було зменшення кількості життєздатних колоній клітин мікроорганізмів за певний період після контамінації. У відповідності до вимог ДФУ в препаратах для парентерального застосування, а також для офтальмологічних засобів логарифм зменшення кількості життєздатних колоній бактерій через 6 год повинен складати не менше 2-х, через 24 год – не менше 3-х, а в подальшому кількість життєздатних клітин бактерій не повинна збільшуватись. Логарифми зменшення кількості життєздатних клітин грибів через 7 діб – не менше 2-х. Ці показники відповідають критерію «А».

У відповідності до критерію «В» в препаратах для парентерального застосування та офтальмологічних засобів логарифм кількості життєздатних колоній мікроорганізмів через 24 год повинен складати не менше 1-го, через 7 діб – не менше 3-х, а в подальшому кількість життєздатних колоній не повинна збільшуватись. Логарифм зменшення кількості життєздатних грибів за 14 діб повинен складати не менше 1-го та в подальшому не збільшуватись.

Таблиця 3

Дослідження на мікробіологічну чистоту водного розчину прополісу методом прямого висіву на чашках

Номер серії препарату	Кількість мікроорганізмів за десятинним логарифмом ступеня росту мікроорганізмів на твердих поживних середовищах			
	метод глибокого висіву 1,0 г (1 мл) препарату (х10)		метод поверхневого висіву 1,0 г (1 мл) препарату (х10)	
	Поживний агар 35°С 3 доби	Сабуро 25°С 5 діб	Поживний агар 35°С 3 доби	Сабуро 25°С 5 діб
Серія 10410	Ріст мікроорганізмів відсутній	Ріст грибів відсутній	Ріст мікроорганізмів відсутній	Ріст грибів відсутній
Серія 20410	Ріст мікроорганізмів відсутній	Ріст грибів відсутній	Ріст мікроорганізмів відсутній	Ріст грибів відсутній

Таблиця 4

Результати визначення ефективності водного розчину прополісу

Експозиція	Вимоги ДФУ		Логарифм кількості мікроорганізмів (КУО/мл)		
	кількість бактерій КУО/мл Lg зменшення	кількість грибів КУО/мл Lg зменшення	Staphylococcus aureus ATCC 6538	Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027	Candida albicans ATCC 885/653
Мікробне навантаження	10^6	10^6	$2,2\times10^5$ (5,34)	$2,3\times10^5$ (5,36)	$2,5\times10^5$ (5,39)
Первинний висів Lg	-	-	$5,1\times10^4$ (0,64)	$5,2\times10^4$ (0,76)	$5,3\times10^4$ (0,67)
6 годин	2	-	$4,1\times10^3$ (1,73)	$2,4\times10^3$ (1,96)	$1,6\times10^4$ (1,19)
24 години	3	-	$1,2\times10^2$ (3,24)	$1,5\times10^2$ (3,19)	$4,5\times10^3$ (1,74)
7 діб	-	2	НВ	$0,2\times10^2$ (4,06)	$1,2\times10^2$ (3,05)
14 діб	–	–	НВ	НВ	НВ
28 діб	НЗ	НЗ	НВ	НВ	НВ

Примітка: НЗ – кількість мікроорганізмів не збільшилась; НВ – мікроорганізми або гриби не виділяються.

Після контамінації мікроорганізмами субстанцію через певні проміжки часу висівали на агар для визначення кількості життєздатних клітин. Відсутність росту на агарі або не збільшення кількості колоній через 14 днів інкубації вказували на те, що препарат відповідає вимогам ДФУ.

Як видно з даних, наведених у табл. 4, через 6 год культивування логарифм кількості життєздатних клітин грибів склав 1,19 для Candida albicans. Через 24 год контамінації логарифм кількості життєздатних клітин грибів склав для Candida albicans – 1,74, на 7-му добу 3,05. Клітини Candida albicans не виділяються через 14 діб культивування. Через 6 год культивування логарифм кількості колоній мікроорганізмів був менше 2-х та склав 1,73 для Staphylococcus aureus і 1,96 для Pseudomonas aeruginosa. Через 24 год ці показники склали 3,24 та 3,19; на 7-му добу інкубації колонії Staphylococcus aureus не реєструвались, для Pseudomonas aeruginosa логарифм кількості життєздатних клітин склав 4,06; на 14-добу мікроорганізми не виділялись. Проведені дослідження водного розчину прополісу показали, що даний препарат відповідає критерію «А» у відповідності до вимог ДФУ.

ВИСНОВКИ

1. Життєздатних клітин грибів та мікроорганізмів у досліджуваних зразках водного розчину прополісу не виявлено.
2. Штами стафілококів, ентеробактерій, синьогнійної палички не виявлені.
3. Всі зразки водного розчину прополісу відповідають критерію «А» відповідно до вимог ДФУ.
4. Водний розчин прополісу за мікробіологічною чистотою відповідає вимогам Державної фармакопеї України.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Бактеріологічний контроль поживних середовищ. Інформаційний лист МОЗ України №05,4,1/1670, Київ, 2001.*
2. *Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Х.: РІРЕГ, 2001. – 556 с.*
3. *Тихонов О.І., Мурашко А.М. // Апітерапія: досягнення та перспективи розвитку: матер. III з'їзду апітерапевтів України (28-30 вересня 2006 р., м. Харків) / Ред. кол.: В.П.Черних, О.І.Тихонов, Т.Г.Ярних. – Х.: Вид-во НФаУ; Золоті сторінки, 2006. – С. 358-366.*
4. *Тихонов О.І., Ярних Т.Г., Сятиня М.Л. та ін. // Вісник фармації. – 1999. – №2 (20). – С. 59-64.*
5. *Тихонов А.И., Ярных Т.Г., Черных В.П. и др. Теория и практика производства лекарственных препаратов прополиса / Под ред. А.И.Тихонова. – Х.: Основа, 1998. – 384 с.*
6. *Bergman A., Yanai J., Weiss J. et al. // Am. J. Surgery. – 1983. – №145. – P. 374-376.*
7. *Imtinen Ben Haj Jilani, Schweitzer P., Mohamed Larbi Khoujja et al. // Apiacta. – 2008. – Vol. 43. – P. 38-48.*
8. *Krell R. Value-added products from beekeeping. – Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1996. – 392 p.*

УДК 638.135:001.891.53

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ВОДНОГО РАСТВОРА ПРОПОЛИСА

Л.В.Коношевич, А.И.Тихонов

Приведены результаты микробиологических исследований водного раствора прополиса, который представляет собой побочный продукт, образующийся в производстве настойки прополиса. Согласно полученным данным установлено, что водный раствор прополиса по микробиологической чистоте соответствует критерию «А» и требованиям Государственной фармакопеи Украины.

UDC 638.135:001.891.53

MICROBIOLOGICAL STUDIES OF THE AQUEOUS SOLUTION OF PROPOLIS

L.V.Konoshevich, O.I.Tikhonov

The result of the microbiological research of the aqueous solution of propolis, which is by-product in production of the tincture of propolis is given. On the basis of the experimental data obtained it has been found that the aqueous solution of propolis by its microbiological purity corresponds to the criterion «A» and the requirements of the State Pharmacopeia of Ukraine.