المجلة العراقية للعلوم البيطرية، المجلد ٢٦، عدد إضافي ٢، ٢٠١٢ (١٢٥-١٢٨)
وقائع المؤتمر العلمي السادس، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل

تأثير مستخلص العكبرالعراقي على جراثيم الايشريكيا القولونية المعزولة من اللحوم المفرومة

منتهى غازي حسن، تقى احمد عبد الله و أيثم سعدي الدباغ

فرع الصحة العامة البيطرية، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل، العراق

الخلاصة

تم في هذه الدراسة عزل وتشخيص جراثيم الايشريكيا القولونية من اللحوم المفرومة المحلية حيث عزلت هذه الجراثيم بنسبة (٨٨%) وكانت (٢٤%) منها ممثلة بالنمط المصلي *E. coli*.O157:H7 و(٦٤%) منها تعود لأنماط أخرى من جراثيم الايشريكيا القولونية. واختبرت حساسية عترات الـ *E. coli*.O157:H7 المعزولة لبعض المضادات الحيوية وكانت حساسة للسايبروفلوكساسين بالتركيز ٥ مايكرو غرام. تم البحث عن فعالية مستخلص العكبرالعراقي المضادة للجراثيم باستخدام تراكيز مختلفة ممثلة بالتراكيز (١، ١.٥، ٢) مايكروغرام وقورنت بحساسية هذه الجراثيم للمضاد الحيوي السيبروفلوكسا سين، فقد أظهر المستخلص الكحولي للعكبر العراقي فعالية مضادة للجراثيم ضد عترات الـ *E. coli*.O157:H7 بالتركيز ٢ مايكرو غرام حيث أعطى قطرا تثبيطيا لنمو هذه الجراثيم بمعدل (١٩,٢٧ ± ٠,٣٨) مقارنة بالمضاد الحيوي السايبروفلوكساسين (٢١± ٠,٣٢) في حين إن هذه العترات لم تكن حساسة للعكبر بالتراكيز الأخرى. وهذا يدلل على أن المستخلص الكحولي للعكبر العراقي فعال ضد جراثيم الايشريكيا القولونية بالتراكيز العالية.

Effect of Iraqi propolis extract on *Escherichia coli* isolated from minced meat

M.G. Hassan, T.A. Abdulla and A.S. Al- Dabbagh

Department of Veterinary Public Health, College of Veterinary Medicine, University of Mosul, Mosul, Iraq

Abstract

In this study, *Escherichia coli* was isolated and detected from minced meat at a ratio (88%), (24%) was represented by E.coli.O157:H7, the others (64%) was related to another serotypes of *E. coli*. The sensitivity of E.coli.O157:H7 strains to antibiotic was tested and revealed that all strains was sensitive to ciprofloxacin (5 µg). The antibacterial effects of Iraqi propolis was tested using different concentrations represented by (1 µg, 1.5µg, 2µg) and compared with the sensitivity of these strains to ciprofloxacin. The results showed that the Iraqi ethanolic extract of propolis (EEP) has antibacterial effects against E.coli.O157:H7 strains at 2 µg which gave inhibition zones at (19.27±0.38) compared with the inhibition zones of ciprofloxacin (21±0.32) while these strains are not sensitive to EEP at the other concentrations, these results referred to that Iraqi EEP active against *E. coli* strains isolated from meat at high concentrations.

Available online at http://www.vetmedmosul.org/ijvs

المقدمة

العكبر هو مزيج معقد من مادة صمغية تجمع من قبل نحل العسل من نضح الأشجار والبراعم وهو مادة حيوية في خلية النحل للدفاع عن الخلية والمحافظة على بيئة خلية النحل وحمايتها من الحشرات والجراثيم والفطريات (١). أستخدم العكبر كمادة معقمة ومضادة للالتهابات ولشفاء الجروح والحروق وهو من المواد الطبيعية الفعالة جدا لخصائصه المضادة للجراثيم والفطريات (٢-٤) وقد حدد التأثير المضاد للجراثيم للعكبر بمحتواه من المركبات الكيميائية متمثلة بالفلافونيدات والمتضمنة لكل من phenolic acid , flavone , flavonone (٥-٦) وبالأخص السترات والحوامض الفينولية التي تمتلك الخواص المضادة للأكسدة (٧،٨) فضلا عن محتواه من quinines , coumarius والأحماض الامينية والستيرويدات والمركبات اللاعضوية والتي تختلف تبعا للمنشأ الجغرافي (٩). يمتاز العكبر بتأثيراته الواسعة جدا كمادة حافظة في الصناعات الغذائية (١٠). إن لمستخلصات

العكبر تأثيرا فعالا يعزى إلى إزالة بعض المواد أثناء الاستخلاص تاركة المركبات الفينولية الفعالة (١١) وأهمها مركب Caffeic acid phenathyl ester (CAPE) الذي يعمل على تثبيط eicosanoids وتثبيط تكوين حامض النتريك والـarachidonic acid بالإضافة إلى lipoxygenase مما ينجم عنه فعالية مضادة للجراثيم (١٣،١٢). وذكر الباحث (١٤) إن مركب CAPE يعمل على إيقاف الكرب التاكسدي الناجم عن جراثيم الايشريكيا القولونية المسببة للالتهاب الكلوى القيحي في الفئران pyelonephritis. ان وجود جراثيم الايشريكيا القولونية في الغذاء يعتبرمؤشرا على التلوث البرازي للغذاء حيث تعتبر الابقار الخازن الرئيسي للـ E.coli.O157:H7 (١٥) فقد عزلت هذه الجرثومة بنسبة ٢٨% من براز الابقار (١٦) واعتبرت لحوم الابقار عامل خطورة لحدوث حالات الاصابة بالتهاب القولون النزفي وحالات التسمم الغذائي الناجمة عن استهلاك لحوم الابقار ومنتجاتها غير المطبوخة بشكل جيد (١٧). أجريت الدراسة الحالية للوقوف على الفعالية المضادة للمستخلص الكحولي للعكبر العراقي EEP على عترات جراثيم الايشريكيا القولونية النمط المصلي O 157:H7.

المواد وطرائق العمل

تم وزن ٣٠ غم من العكبر العراقي الذي تم جمعه من المناطق المحيطة بمحافظة نينوى وهي الشيخان وربيعة ومنطقة الغابات، بعد تجميده وبرشه وإذابته في ٧٠ مل من الكحول الاثيلي بتركيز ٩٥ % وباستخدام خلاط بدون تسخين وتم مزج الخليط لمدة ثلاثة أيام بعدها رشح المحلول بقطعة قماش ناعمة ونظيفة لعدة مرات ومن ثم استخدمت أوراق الترشيح للتخلص من جميع الجزيئات العالقة في المحلول.

حفظ المحلول الراشح في قناني نظيفة لونها داكن بعيدا عن الضوء لمدة أسبوع و تم تبخير الراشح بجهاز الاستخلاص Rotary للتخلص من الكحول ومن ثم تم تجفيد المستخلص باستخدام جهاز Lyophilizer. حضر المستخلص الكحولي للعكبر بالتراكيز ١٠%، ١٥%، ٢٠% عن طريق إذابة المستخلص الكحولي في Dimethyl sulfoxide بدالة حامضية ٧ وعقم بالترشيح عبر مرشحات في 0.22 مايكروميتر وحضرت أقراص التراكيز باستخدام أوراق ترشيح بقطر ٦ ملم غمرت بهذه التراكيز (١٨،١٩).

جمعت ٥٠ عينة من اللحوم المفرومة المستوردة في الأسواق المحلية، تم عزل جراثيم الايشريكيا القولونية باستخدام وسط مرق الماكونكي وحضنت بدرجة ٣٧ °م لمدة ٢٤ ساعة ثم نقلت على وسط أكار الماكونكي و حضنت بدرجة ٣٧ °م لمدة ٢٤ – ٤٨ ساعة بعدها نقيت المستعمرات النامية من خلال تنميتهاعلى أكار الايوسين المثلين الأزرق وحضنت بدرجة ٣٧ °م لمدة ٢٤ ساعة. وتم اخذ المستعمرات النامية على وسط الايوسين المثلين الأزرق وصبغت بصبغة كرام للتأكد من شكل وتصبغ الجرثومة وشخص النمط المصلي O 157:H7 بالاعتماد على العدة التشخيصية Latex agglutination test (LAT) -شركة (Lorne).

حضر المعلق الجرثومي لجراثيم الايشريكيا القولونية O 157:H7 في أنابيب حاوية على المحلول الملحي الفسيولوجي وتمت مقارنة كثافة هذا المعلق الجرثومي بالتركيز١٠ ^{٦} خلية جرثومية /سم^{٣} مع الأنبوب الأول من أنابيب ماكفرلاند القياسية. لقحت أطباق وسط المولر-هنتون بالمعلق الجرثومي وتم اختبار حساسية عترات جراثيم الايشريكيا القولونية لبعض المضادات الحياتية المتمثلة بـ Gentamycin (GN)10 مايكروغرام و Chloramphenicol (C) 30 مايكروغرام و Ciprofloxacin (CIP) 5 مايكروغرام و 20 Amoxicillin(AMX)مايكروغرام + Clavulanic Acid والمجهزة من شركة Bioanalyze و 30 Neomycin(N) مايكروغرام المجهزمن شركة Vapco وحسب طريقة K irby &Bauer المحورة بالاعتماد على (١٩).

حضرت اقراص الحساسية المشبعة بالمستخلص الكحولي للعكبر وفق (١٥) و ثبتت اقراص العكبر بالتراكيز ١٠%، ١٥%، ٢٠% مع وضع قرص المضاد الحيوي السايبروفلوكساسين Ciprofloxacine بالتركيز (5 مايكروغرام) كقرص سيطرة وحضنت الأطباق بدرجة ٣٧ °م لمدة ١٦-١٨ ساعة وتم قراءة النتائج بالاعتماد على قطر منطقة التثبيط الجرثومي واعتبرت العزلات التي أعطت منطقة تثبيط بقطر ١٤ ملم أو اقل مقاومة للعكبر (٢٠،٢١).

النتائج

تبين من الدراسة ان نسبة عزل جراثيم الايشريكيا القولونية من اللحوم المفرومة من الأسواق المحلية كانت بنسبة ٨٨% وكانت ٢٤% تعود للنمط المصلي O157:H7 و ٦٤% لأنماط مصلية أخرى من جراثيم الايشريكيا القولونية (الجدول ١). وأشارت نتائج اختبار الحساسية للمضادات الحيوية باستخدام تقنية انتشار المضاد الحيوي بالقرص أن هناك تباينا في حساسية جراثيم الايشريكيا القولونية O157 : H7 المعزولة من اللحوم المفرومة للمضادات الحيوية. فقد اظهرت بعض العزلات حساسية عالية لكل من الـ Neomycin , Ciprofloxacin واظهر البعض الاخر حساسية ضعيفة للـ Gentamycin و الـ Chlormphenicol في حين كانت جميع العزلات مقاومة وبنسبة ١٠٠ % للمضاد الحيوي الـ Amoxicillin واعتمادا على قطر منطقة التثبيط (الجدول ٢).

عند مقارنة حساسية عزلات جراثيم الايشريكيا القولونية النمط المصلي O157 : H7 للـ Ciprofloxacin بالتركيز(5 مايكروغرام) مع حساسية هذه العزلات لمستخلص العكبر بالتراكيز (١، ١.٥، ٢) مايكروغرام لوحظ بأن هذه العزلات كانت حساسة بالتركيز (2 مايكروغرام) وبنسبة مقاربة لحساسية هذه الجراثيم للمضاد الحيوي Ciprofloxacin بالتركيز(5 مايكروغرام) اعتمادا على قطر منطقة التثبيط (الجدول ٣).

الجدول (١) نسبة عزل جراثيم الايشريكيا القولونية الكلية من اللحوم المفرومة.

عدد العينات المفحوصة	عدد العزلات E.coli		النسبة المئوية
٥٠	O157:H7	١٢	%٢٤
	أنماط مصلية أخرى	٣٢	%٦٤
	العزلات السالبة	٦	%١٢
المجموع		٥٠	%١٠٠

الجدول (٢) حساسية جراثيم E.coli.O157:H7 المعزولة من اللحوم المفرومة للمضادات الحياتية.

المضاد الحيوي	التركيز	معدل قطر التثبيط بالملم
Neomycin	٣٠ مايكرو غرام	١٨
Chlormphenicol	٣٠ مايكرو غرام	١٠
Ciprofloxacin	٥ مايكرو غرام	٢٠
Gentamycin	١٠ مايكرو غرام	٨
Amoxicillin+ Clavulanic Acid	٢٠ مايكرو غرام + ٥ مايكرو غرام	-

الجدول (٣) معدل قطر تثبيط النمو الجرثومي بالتراكيز المختلفة للعكبر والسايبروفلوكساسين.

المضاد الحيوي	التراكيز	المعدل±الخطأ القياسي
مستخلص العكبر E.E.P	١ مايكرو غرام	٩ ± ٠,٣٦
	١,٥ مايكرو غرام	١٣,١٨ ± ٠,٤٤
	٢ مايكرو غرام	١٩,٢٧ ± ٠,٣٨
Ciprofloxacin	٥ مايكرو غرام	٢١± ٠,٣٢

المناقشة

تعد جراثيم الايشريكيا القولونية النمط المصلي O157 : H7 إحدى أهم جراثيم التسمم الغذائي والتي مصدرها تداول واستهلاك لحوم ملوثة مما ينجم عنه خطورة على صحة المستهلك. حيث تعد جراثيم الايشريكيا القولونية أكثر خطورة في حدوث التهاب القولون ألنزفي ومتلازمة البيلة الدموية Uremic HUS (Hemolytic Syndrom) (٢٣،٢٢). ظهر من نتائج الدراسة ان نسبة عزل جراثيم E. coli O157 : H7 من اللحوم المفرومة في السوق المحلية لمدينة الموصل بلغت (24%) وتعزى هذه النسبة المرتفعة إلى قلة الوعي الصحي لدى متداولين هذه اللحوم وعدم توافر الشروط الصحية من حيث الأدوات المستخدمة في تقطيع اللحوم وفرمها ومن حيث سلامة الباعة والقصابين من هذه الأمراض فضلا عن غياب الرقابة الصحية الدائمة. وعند تسليط الضوء على حساسية عترات هذه الجراثيم المعزولة من اللحوم المفرومة للمستخلص الكحولي للعكبر EEP وهذا ما أشارت اليه العديد من البحوث حول فعاليةالعكبر المضادة للجراثيم وخاصة ضد جراثيم التسمم الغذائي (٢٥،٢٤)، إضافة لتأثيره المضاد للجراثيم ضد الجراثيم المعوية وخاصة جراثيم S. typhi (٢٦) تبين بأن عترات جراثيم E.coli. O 157:H7 حساسة للمستخلص الكحولي للعكبر بالتركيز 2 مايكروغرام ممثلا بنطاق التثبيط الذي وصل قطره إلى 19.27 ملم وكان هذا الاختلاف معنويا إحصائيا قياسا لبقية التراكيز المستخدمة عند مستوى معنوية ($P<0.05$) وقد يعزى التأثير المثبط للعكبر إلى دوره الفعال في تثبيط انقسام الخلية وتأثيره على وظيفة كل من السايتوبلازم وغشاء الخلية مؤديا الى انكماش جدار الخلية كما و يعمل العكبر على تحلل البكتريا وتثبيط تصنيع البروتين من خلال تثبيط إنزيم RNA – polymerase (٢٧). وتؤثر المواد الداخلة في تركيب العكبر كا لغلانجين والبينوسامبرين و CAPE والكيورسين على غشاء الخلية الجرثومية مما يعطل وظيفته (٢٨،٦) وقد يعزى سبب حساسية جراثيم الايشريكيا القولونية للعكبر بهذا التركيز إلى قلة استخدام العكبر من قبل المرضى المصابين بحالات التسمم الغذائي لعدم وجود المنتج بشكل دواء ليتسنى للاطباء وصفه ولقلة كميته ولكلفته العالية الأمر الذي أدى زيادة حساسية O157 : H7 E. coli للعكبر مقارنة بالاستخدام الغزير لبقية المضادات الحيوية المنخفضة الكلفة لذا ينصح باستخدامه كعلاج امثل في معالجة حالات التسمم الغذائي (٢٩) إضافة إلى كفاءته كمضاد للفيروسات وهذه الخاصية يفتقر إليها المضاد الحيوي (٣٠) ولم تتفق هذه النتائج مع الباحثين (٣١،٧) الذين سجلوا إن مستخلص العكبر غير كفوء ضد جراثيم الايشريكيا القولونية، بينما أثبتت بعض البحوث حساسية جراثيم الايشريكيا القولونية للعكبر (٣٣،٣٢،٨) حيث أعطت عترات جراثيم E. O157 : H7 coli حساسية ضعيفة ضد التراكيز المخفضة من EEPواتفقت هذه النتائج مع (٣٤) الذي أشار إلى إن مستخلص العكبر كفوء في تأثيره المضاد للجراثيم وخصوصا على جراثيم سالبة الكرام وبتراكيز عالية. إن التباين في فعالية العكبرالمضادة للجراثيم قد يعزى إلى الاختلاف في مكوناته الكيميائية (٣٥) وخاصة من حيث محتواه من الفلافونيدات التي تختلف باختلاف أنواع العكبرمن حيث موسم جمعه ومن حيث منشأه الجغرافي (٣٧،٣٦)، كما وتؤثر طريقة الاستخلاص وبشكل كبير في تحديد أهمية العكبر المضادة للجراثيم حيث أن الطرق المختلفة في الاستخلاص تؤدي إلى استخلاص بعض المركبات الكيميائية المختلفة والتي هي أصلا ضمن تركيب العكبرالامر الذي من شأنه أن يزيد أو يقلل من حساسية الجراثيم المختلفة للعكبروفعاليته المضادة للجراثيم (٣٨). ومن مجمل النتائج أعلاه يمكننا القول بان العكبر العراقي المستخدم في هذه الدراسة له فعالية مضادة للجراثيم ضد جراثيم E. coli O157 : H7 ضمن التركيز (2 مايكروغرام) وهذه النتيجة قد تكون مفيدة و مهمة في الدراسات السريرية والوبائية.

شكر وتقدير

تم دعم البحث من قبل كلية الطب البيطري -جامعة الموصل.

المصادر

1. Cheng PC, Wong G. Honeybee propolis: Prospects in Medicine. Bee World, 1996; 77:8-15.
2. Ghilsalberti EL. Propolis: a review. Bee World, 1979;60:59-84.
3. Krell R. Value added products from beekeeping FAO Agricultural Services BulletinNo.124.1996;http://www.fao.org/docrep/w0076e/w0076e00.htm.
4. Marcucci MC. Propolis: chemical composition, biological properties and the therapeutic activity. Apidologie 1995; 26: 83-99.
5. Astudillo S, Avila LR , Morrison FR,Gutierrez M, Bastida J, Codina C, Schmeda-Hirschmann G. Biologically active compounds from Chilean propolis. Bol. Soc. Chil. Quím. 2000; 45:577-581
6. Marcucci MC, Ferreres F, Garcia-Viguera C, Bankova VS, DeCastro SL, Dantas AP. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. J Ethnopharmacol. 2001; 74(2): 105-112.
7. Gonsales GZ, Orsi RO, Fernandes JR A , Rodrigues P, Funeari SRC. Antibacterial activity of propolis collected in different regions of Brazil. J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop.Dis., 2006; 12:276-84.
8. Grange JM , Davey RW. Antibacterial properties of propolis (bee glue). J. R. Soc. Med. 1990; 83: 159-60.
9. 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. 1999;64: 235-240.
10. Ramanauskiene K , Inkeniene AM ,Savickas A, Masteikova R ,Valdemaras B. Analysis of the antimicrobial activity of propolis and lysozyme in semisolid emulsion systems.Acta polonia pharmaceutica-drug research.2009; 66 (6) :681-688.
11. Pietta PG, Gardana C, Pietta AM. Analytical methods for quality control of propolis. Fitoterapia.2002; 73 Suppl. 1, S7-S20.
12. Nagaoka T , Bankota AH , Tesuka Y, Midorikawa N , Matsushige K, Kadota S. Caffeic acid phenyl ester CAPE analogues: potent nitric oxides inhibitors from Netherlands propolis. Biol. Pharm. Bull. 2003; 26:487-491.
13. Havsteen B. The biochemistry and medicinal significance of e flavonoids. Pharmacol. and Therapeu. 2002; 96: 67-202.
14. Celik S , Gorur S, Aslantas O , Erdogan S, Ocak S, Hakverdi S. Caffeic acid phenethyl ester suppresses oxidative stress in Escherichia coli-induced pyelonephritis in rats. Mol Cell Biochem.2007; 297(1-2): 131-8.
15. Elder RO, Keen JE, Siragusa GR, Barkocy-Gallagher GA, Koohmaraie M, Laegreid WW.Correlation of enterohemorrhagic Escherichia coli O157 prevalence in feces, hides, andcarcasses of beef cattle during processing. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2000; 97:2999-3003.
16. Meng J, Doyle MP, Zhao T, Zhao S. Enterohemorrhagic Escherichia coli. In Food microbiology: fundamentals and frontiers. American Society of Microbiology Press, 2001. Washington, DC.
17. Le Saux N, Spika JS, Friesen B, Johnson I, Melnychuck D, Anderson C, Dion R, Rahman M, Tostowaryk W. Ground beef consumption in noncommercial setting is a risk factor for sporadic Escherichia coli O157:H7 infection in Canada. J. Infect. Dis. 1993;167: 500–502.
18. Bauer AW, Kirby WN, Sheris JC, Tuck M. Antibiotic susceptibility by standard single disc method. Am. J. Clin. Pathol. 1966; 36: 493-496.
19. Krell, R. Value added products from beekeeping FAO Agricultural Services Bulletin (1996). No.12. http://www.fao.org/docrep/w0076e/w0076e00.htm
20. Carter GR , Wise DG. Essentials of Veterinary Bacteriology and Mycology. 6 thed Iowa State Press. USA. 2004; 82: 83.
21. National Committee for Clinical Laboratory Standards,NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing;14th informational supplement Wayne,PA,U.S.A. 2004; M100-S14,24(1).
22. Hendrix CM. Laboratory Procedures for Veterinary Technicians.4thed Mosby , USA. 2002: 217 -218.
23. Nystrom EA , Melton – Celsa AR , Pohlenz JF, Moon LHW, O'Brien AD. Comparative pathogenecity of E. coli. 0157 and intimin – negative non – 0157 Shiga toxin – producing E. coli. Strains in neonatal pigs. Infect. Immun. 2003; 71: 6526 – 6533.
24. Khan AS, Yamasaki T, Sato T, Ramamurthy A, Pal S, Datta NR ,Chowdhury SC, Das A, Sikdar T, Tsukamoto SK, Bhattachrya Y, Takeda Nair GB. Prevalence and genetic profiling of virulence determinantsmof non – 0157 Shiga toxin producing E. coli. Isolated from cattle, beef, and humans, Calcutta, India. Emerg. Infect. Dis. 2002; 8: 54 – 62.
25. Abd El Hady F, Hegazi A. Egyptian propolis: 2. chemical composition, antiviral and antimicrobial activities of east nile delta propolis. Z Naturforsch; 2002;56(3-42): 386-394.
26. Pires G, da Silva Ribeiro de Rezende1 Fabiana Cristina Pimenta2 Luciane Ribeirode Rezende Sucasas daJSosta. Antimicrobial activity of two Brazilian commercial propolis extracts. Brazilian Journal of Oral Sciences, 2006; 5, 16:967-970.
27. Orsi RO, Sforcin JM , Rall VLM , Funari SRC, Barbosa L, Fernandes JRA. Susceptibility profile of Salmonella against the antibacterial activity of propolis produced in two regions of Brazil. J.Venom.Anim. Toxins incl. Trop.Dis.2005;11:109-16.
28. Takaisi-Kikuni NB, Schilcher H. Electron microscopy and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. Planta. Medica. 1994;60:222-227.
29. Kartal M, Yildiz S, Kaya S, Kurucu S, Topcu G. Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia. J. Ethnopharmacol. 2003;86: 69-73.
30. Ophori EA, Wemabu EC. Antimicrobial activity of propolis extract on bacteria isolated from nasopharynx of patients with upper a respiratory tract infection admitted to Central Hospital, Benin City, Nigeria. African Journal of Microbiology Research. 2010; 4(16) : 1719-1723.
31. Gebara ECE , Lima LA , Mayer MPA. Propolis antimicrobial activity against periodontopathic bacteria. Braz. J. Microbiol. 2002; 33(4):1517.
32. Ivan KM , Pepeljnjak S, Bakmaz M , Vladmir-Knezevic S. Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis products. Acta Pharm., 2005; 55:423-30.
33. Hegazi A , Abd el Hady FK. Egyptian Propolis: 3. Antioxidant, antimicrobial Activities and chemical composition of propolis from reclaimed lands.Z. Naturforsch. 2002; 57, 395- 402.
34. Fernandes JRA, Lopes CAM, Sforcin JM, Naqvi SA , Ddiya PC , Funari SRC. Population analysis of susceptibility of propolis in reference strains of Staphylococcus aureus and Escherichia coli.JVenom.Anim.Toxins,1997;3:287- 94.
35. Sforcin JM, Fernandes JA, Lopes CAM, Bankova V, Funari SRC. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. J Ethnopharmacol 2000; 73: 243- 249.
36. Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). Food Chem Toxicol 1998; 36: 347-363.
37. Hikmet K , Nazime M. Antimicrobial activity and chemical compositions of Turkish propolis from different region. African Journal of Biotechnology. 2006; 5(11):1151-1153.
38. Pepeljnjak S, Jalsenjak I, Maysinger D. Flavonoid content in propolis extracts and growth inhibition of Bacillus subtilis. Pharmazie 1985; 40: 122-123.
39. Keskin N, Hazir S, Baser KH, Kurkcuoglu M. Antibacterial activity and chemical composition of Turkish propolis. Z. Naturforsch., 2001; 56:1112-15.