تأثير العكبر العراقي (Iraqi propolis) في بعض انواع الخمائر المسببة لتلف عصائر الفواكه

زياد طارق السدرة
جامعة ديالى – كلية الزراعة

الخلاصة

يهدف هذا البحث الى معرفة قابلية المستخلص الكحولي للعكبر العراقي على تثبيط نمو ثلاثة انواع من الخمائر المعزولة من عصائر فواكه تالفة وهي Candida tropicalis و Debaryomyces hansenii و Pichia tropicalis .اظهرت النتائج ان التركيز المثبط الادنى (MIC – Minimum Inhibition Concentration) للمستخلص الكحولي للعكبر بلغ 0.1 ، 0.4 ، 0.1 ملغم/مل تجاه الخمائر Candida tropicalis و Debaryomyces hansenii و Pichia tropicalis على التوالي في عصير البرتقال و 0.4 ، 0.8 ، 0.2 ملغم/مل على التوالي في عصير التفاح ، في حين كان التركيز المثبط الادنى (MIC) لبنزوات الصوديوم قد بلغ 40 ، 160 ، 80 مايكروغرام/مل على التوالي في عصير البرتقال و 320 ، 640 ، 320 مايكروغرام/مل على التوالي في عصير التفاح .بينت نتائج الكشف الكيميائي النوعي احتواء العكبر على الراتنجات (Resins) والفلافونويدات (Flavonoids) والفينولات (Phenoles) كمكونات فعالة .

الكلمات المفتاحية : العكبر العراقي ، تثبيط الخمائر ، عصائر الفواكه ، Candida tropicalis و Debaryomyces hansenii و Pichia tropicalis

المقدمة

استخدم العكبر (Propolis) في الحضارات القديمة المصرية والاغريقية ومازال حتى اليوم يستخدم لعلاج الاصابات الجلدية وتقرحات الفم وفي مستحضرات التجميل (Kosalic واخرون ، 2005) ، وهو خليط من مواد راتنجية (Resinous) مع الشمع يجمعها نحل العسل من النباتات ويستخدمها لغلق الفتحات والتشققات في الخلية وكذلك لتغطية الحشرات الميتة داخل الخلية والتي تكون احجامها اكبر من استطاعة النحل على حملها الى الخارج (Bankova ، 2005 و Eshraghi و Valafar ، 2008) .اكد Savickas واخرون (2005) ان الفلافونويدات والحوامض الفينولية والشموع والزيوت المتطايرة هي من اهم مكونات العكبر ، كما بين Alencar واخرون (2007) وجود مواد اخرى مثل الالديهايدات واسترات حامض الكافييك وبعض السكريات والفيتامينات والمعادن .يشكل التلف بالاحياء المجهرية مشكلة مهمة جدا في تصنيع الاغذية ذات المحتوى السكري بسبب التلوث بالفطريات ذات المقدرة على النمو في هذه الاغذية اثناء التصنيع والتداول ، اذ يمكن ان تتواجد في الاغذية ذات الاس الهيدروجيني المنخفض والاغذية الحاوية على مواد حافظة كونها تتحمل الظروف البيئية القاسية اكثر من البكتريا (Macrae واخرون ، 1993) ، هذا وان عصائر الفواكه تحتوي تراكيزا مختلفة من السكروز الذي يمثل مكونا مهما جدا في البيئات الغذائية للخمائر (Palou واخرون ، 1998) .

تستخدم المواد الكيميائية الحافظة واهمها بنزوات الصوديوم وسوربات البوتاسيوم لمنع تلف الاغذية بالاحياء المجهرية ، الا ان استخدام المواد الطبيعية ذات التأثير المضاد لنمو الاحياء المجهرية يمكن ان يكون بديلا لاستخدام المواد الكيميائية ، ومن هذه المواد الطبيعية البهارات والاعشاب والنباتات الحاوية على الزيوت العطرية (Fleet ، 1992 و Palou واخرون ، 2002) .تزايد الاهتمام في البلدان المتقدمة مؤخرا باستخدام العكبر كأحد المواد الطبيعية المانعة لنمو الاحياء المجهرية (Ozcan واخرون ، 2004) ومادة مانعة للاكسدة (Kolankaya واخرون ، 2002) ومادة مضادة للسرطان (Ozkul واخرون ، 2005) ولكن المحاولات لاستخدام هذه المادة في حفظ الاغذية مازالت قليلة حتى الان (Han واخرون ، 2001) .

ونظرا لقلة الدراسات المتعلقة بمادة العكبر في العراق فقد ارتأينا القيام بهذا البحث لمعرفة قابلية المستخلص الكحولي للعكبر العراقي على تثبيط نمو بعض انواع الخمائر المعزولة من عصائر فواكه تالفة وبالتالي امكانية استخدام هذه المادة في حفظ عصائر الفواكه .

المواد وطرائق البحث

استخلاص العكبر:

تم الحصول على العكبر من جمعية النحالين العراقيين / فرع ديالى للفترة من شهر مايس لغاية شهر تشرين الثاني 2009، وتم حفظ النموذج بالتجميد لتسهيل تكسيره الى قطع ناعمة جدا عند الاستخلاص .

سحق نموذج العكبر الى قطع صغيرة جدا واستخلصت باضافتها الى الكحول الاثيلي 80% بنسبة 10:1 وزن/حجم ، ووضع في دورق مغلق في درجة حرارة الغرفة لمدة 48 ساعة مع الرج بين فترة واخرى ، رشح بعدها المحلول باستخدام ورق ترشيح واتمان رقم 41 ثم بخر الراشح حتى الحصول على مادة كثيفة جدا هي المستخلص الكحولي للعكبر (yaghobi واخرون ، 2007) .

الكشف الكيميائي النوعي عن بعض المجاميع الفعالة في العكبر :

الكشف عن الراتنجات (Resins) :

وزن 10 غم من مسحوق العكبر واضيف الى 50 مل من الكحول الأثيلي 95% وترك مدة دقيقتين في حمام مائي بدرجة 100°م . رشح المحلول واضيف له 100 مل ماء محمض بحامض الهيدروكلوريك 4% , ان ظهور عكارة في المحلول تعد دليلاً على وجود الراتنجات (Shihata ، 1951) .

الكشف عن الفلافونويدات (Flavonoids):

حضر المحلول (A) باذابة 10 غم من مسحوق العكبر في 50 مل من الكحول الأثيلي95% ثم رشح المحلول ، وحضر المحلول (B) باضافة 10 مل من الكحول الأثيلي 50% الى 10 مل من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم 50% ، مزجت

حجوم متساوية من كلا المحلولين ، ظهور اللون الأصفر يعد دليلاً على وجود الفلافونويدات (Jaffer واخرون ، 1983) .

الكشف عن الفينولات (Phenoles):

اضيف 3 مل من مستخلص العكبر الى 2 مل من محلول 1% كلوريد الحديديك . ظهور لون أخضر مزرق يعد دليلاً على وجود الفينولات (Harborne ، 1973) .

الفحوصات الفيزيوكيميائية لعصائر الفواكه:

تم قياس الاس الهيدروجيني باستخدام جهاز pH-meter ، وجرى قياس الحموضة بالتسحيح باستخدام هيدروكسيد الصوديوم (NaOH , 0.1 N) بوجود دليل الفينولفثالين وعبر عن النتائج كنسبة مئوية لحامض الستريك (للبرتقال) وحامض الماليك (للتفاح) ، وحدد تركيز العصائر بجهاز Refractometer .

عزل وتشخيص الخمائر :

تم الحصول على برتقال وتفاح تالف من الاسواق المحلية ، ثم استخلص العصير منها بوساطة اجهزة عصر منزلية معقمة ، وحفظت العصائر في قناني معقمة ووضعت في الثلاجة بدرجة حرارة 4م° لحين الاستخدام . اخذت غمسة ابرة ذات العقدة (Loop) من العصير وزرعت بطريقة التخطيط على الوسط الغذائي Sabouraud -Dextrose Agar (شركة Himedia) وحضنت الاطباق بدرجة حرارة 30م° لمدة 48 ساعة ، بعدها اخذت مستعمرات منفردة وحفظت في انابيب مائلة (Slants) للوسط SDA بدرجة حرارة 4م° لحين الاستخدام .اختيرت المستعمرات التي اظهرت اختلافا في الخواص المجهرية وجرى تشخيصها بفحص الخصائص المجهرية (المورفولوجية) والفسيولوجية والكيميوحيوية ، وحددت النتائج اعتمادا على المفاتيح التصنيفية الواردة في Barnett (2000) و Pincus (2009) .

تحضير عالق الخميرة :

تم تهيئة انابيب اختبار تحتوي الوسط Sabouraud Dextrose Broth المجهز من شركة Himedia والمحضر حسب تعليمات الشركة المنتجة ، ولقحت الانابيب بالخميرة التي سبق ان نميت على نفس الوسط المضاف له الاكار ، وحضنت بدرجة حرارة 30م لمدة 24 ساعة ثم حضرت تخافيف للخميرة باخذ 1 مل منها وتخفيفه ثم قراءة الكثافة الضوئية للمزروع للحصول على عدد على عدد خلايا 4×10 8 خلية/مل عند كثافة ضوئية 0.98 .

تقدير التركيز المثبط الادنى – Minimum Inhibition Concentration – (MIC) :

اتبعت طريقة Kang واخرون (1999) ، اذ حضرت سلسلة من التخافيف للمستخلص الكحولي للعكبر العراقي باستعمال عصائر التفاح والبرتقال ، وكانت التراكيز (0.01 ، 0.02 ، 0.05 ، 0.1 ، 0.2 ، 0.4 ، 0.8 ، 1.6 ، 3.2 ، 6.4 ، 12.8 ملغم/مل) ، كما حضرت بنفس الطريقة تخافيف لمادة بنزوات الصوديوم بتراكيز 5 ، 10 ، 20 ، 40 ، 80 ، 160 ، 320 ، 640 ، 1280 ، 2560 ، 5120 مايكروغرام / مل ، ثم عقمت العصائر بالترشيح بامرارها من خلال مرشحات بقطر 0.45 مايكروميتر ، ثم اضيف لها 0.1 مل من مزروع الخميرة (المحضر في الفقرة السابقة) وبواقع ثلاثة مكررات لكل تركيز ، وحضنت الانابيب بدرجة حرارة 30م لمدة 24 ساعة ، ثم اخذ 0.1 مل من كل تركيز ووضع في طبق زجاجي وصب فوقه الوسط الغذائي SDA بدرجة حرارة 45م وحركت الأطباق للمجانسة وحضنت بدرجة 30م لمدة 24 ساعة ، واحتسب اقل تركيز لم يظهر فيه نمو هو التركيز المثبط الادنى (MIC) .

النتائج والمناقشة

الخواص الفيزيوكيميائية لعصائر البرتقال والتفاح

يتضح من ملاحظة الجدول رقم (1) ان الرقم الهيدروجيني للعصائر التي تم تحضيرها مختبريا بلغ 3.5 و 4.1 والحموضة التسحيحية 0.95% و 0.31% والتركيز 13.3 و15.0 بركس لكل من عصير التفاح وعصير البرتقال على التوالي ، وهي بذلك تكون مشابهة للعصائر المتوفرة تجاريا .

جدول 1 . الخواص الفيزيوكيميائية لعصائر البرتقال والتفاح .

نوع العصير	الرقم الهيدروجيني	الحموضة التسحيحية %	التركيز (Brix)

البرتقال	3.5	0.95	13.3
التفاح	4.1	0.31	15.0

* النتيجة لثلاثة مكررات

عزل وتشخيص الخمائر :

تم عزل وتشخيص ثلاثة انواع من الخمائر المسببة لتلف فاكهتي البرتقال والتفاح هي Candida tropicalis و Debaryomyces hansenii (Candida famata) و Pichia tropicalis (Candida guilliermondii) وذلك باستخدام طريقة التخطيط على الوسط SDA ، ثم جرت عملية تنقية اضافية لبعض المستعمرات المنفردة التي اظهرت اختلافا في الخواص المجهرية ، بعدها جرى تشخيصها من خلال فحص الخصائص المجهرية (المورفولوجية) والفسيولوجية والكيميوحيوية ، وحددت النتائج اعتمادا على المفاتيح التصنيفية الواردة في Barnett (2000) و Pincus (2009) .ان وجود الخمائر اعلاه يتفق مع ماوجده Larone (1993) و Ota واخرون (2001) و Silici واخرون (2005) عند دراستهم لنماذج من الفواكه والعصائر التالفة .

الكشف الكيميائي النوعي عن بعض المجاميع الفعالة في العكبر

اظهرت نتائج الكشف الكيميائي النوعي للمجاميع الفعالة في العكبر احتواءه على الراتنجات والفلافونويدات والفينولات وكما موضح في جدول (2) .ان وجود الراتنجات يتفق مع ما ذكره Castro واخرون (2003) و Orsi واخرون (2007) ، وجاء وجود الفلافونويدات مؤكدا لما وجده Kosalic واخرون (2005) ، وطابق وجود الفينولات في العكبر ماذكره Savickas واخرون (2005) الذين اكدوا ان محتوى العكبر من هذه المواد يعود الى البيئة التي يتواجد فيها نحل العسل .ان الصفات الكيميائية للعكبر تعد مؤشرات مهمة على خواصه التثبيطية وان هناك ارتباطا واضحا بين التركيب الكيميائي للعكبر وفعاليته المضادة للاحياءالمجهرية ، اذ ذكر Kujumgiev واخرون (1993) و Katral واخرون (2003) ان الراتنجات والفلافونويدات هي المركبات التي يمكن ان يعزى اليها الجزء الاكبر من الفعالية البايولوجية للعكبر ، فيما اكد Katircioglu و Mercan (2006) ان الفعل التعاوني (Synergism) بين الفلافونويدات ومركب الـ Apigenin

وبعض المركبات الاخرى له الدور الاهم في الفعالية البايولوجية للعكبر ، وقد ذكر Popova واخرون (2004) ان هناك ارتباطا معنويا بين محتوى الفلافونويدات الكلي والتركيز المثبط الادنى (MIC) .فضلا عن المركبات اعلاه يمكن ان تلعب مكونات اخرى دورا في فعالية العكبر المضادة للاحياء المجهرية مثل حامض الكافييك وحامض السينامييك واستراته (Park واخرون ، 1997 و Marcucci واخرون ، 2001)

جدول 2 . الكشف الكيميائي النوعي عن بعض المجاميع الفعالة في العكبر

المركب	الكاشف المستعمل	نتيجة الكشف *
الراتنجات Resins	كحول اثيلي + ماء مقطر محمض بحامض الهيدروكلوريك (HCl)	عكورة (+)
الفلافونويدات Flavonoids	كحول اثيلي + هيدروكسيد البوتاسيوم (KOH)	لون اصفر (+)
الفينولات Phenols	كلوريد الحديديك 1%	لون اخضر مزرق (+)

* النتيجة لثلاثة مكررات

العلامة (+) تدل على ايجابية الفحص

دراسة فعالية المستخلص الكحولي للعكبر تجاه الخمائر :

استخدمت طريقة التخفيف بالاكار (Agar Dilution Method) لتحديد التركيز المثبط الادنى (MIC) للمستخلص الكحولي تجاه بعض انواع انواع الخمائر النامية في عصير البرتقال وعصير التفاح ، وقد اظهرت النتائج ان اضافة المستخلص الكحولي للعكبر بمستويات تراوحت بين 0.1 و 0.8 ملغم/مل قد ثبطت جميع انواع الخمائر قيد البحث ، في حين تراوحت مستويات التركيز المثبط الادنى (MIC) لبنزوات الصوديوم بين 40 و 640 مايكروغرام/مل ، بعد 24 ساعة من التحضين بدرجة حرارة 30م .

ان لوسط النمو تأثير في مقدار التركيز المثبط الادنى (MIC) للمستخلص الكحولي للعكبر وبنزوات الصوديوم ، حيث كانت جميع الخمائر قيد البحث اكثر حساسية في عصير البرتقال مقارنة بعصير التفاح ، اذ ان التركيز المثبط الادنى (MIC) للمستخلص الكحولي للعكبر تجاه الخمائر Candida tropicalis و Debaryomyces hansenii و Pichia tropicalis قد بلغ 0.1 ، 0.4 ، 0.1 ملغم/مل على التوالي في عصير البرتقال و 0.4 ، 0.8 ، 0.2 ملغم/مل على التوالي في عصير التفاح ، اما التركيز المثبط الادنى (MIC) لبنزوات الصوديوم تجاه الخمائر Candida tropicalis و Debaryomyces hansenii و Pichia tropicalis فقد بلغ 40 ، 160 ، 80 مايكروغرام/مل على التوالي في عصير البرتقال و 320 ، 640 ، 320 مايكروغرام/مل على التوالي في عصير التفاح ، وقد يعود السبب في ذلك الى الحموضة العالية لعصير البرتقال اذ بلغ الرقم الهيدروجيني له 3.5 والحموضة التسحيحية 0.95% كحامض ستريك مقارنة بعصير التفاح الذي بلغ الرقم الهيدروجيني له 4.1 والحموضة التسحيحية 0.31% كحامض ماليك (Silici واخرون ، 2005) .

ان النتائج اعلاه تتفق مع ماذكره Salomao واخرون (2004) الذين اشاروا الى ان التركيز المثبط الادنى للمستخلص الكحولي للعكبر البرازيلي تجاه بعض انواع الفطريات بلغ 2 – 16 ملغم/مل ، في حين اكد Silici واخرون (2005) ان التركيز المثبط الادنى للمستخلص الكحولي للعكبر التركي تجاه الفطريات المرضية بلغ 0.01 ملغم/مل ، وقد يعزى السبب في هذه الاختلافات النسبية الى التركيب الكيميائي للعكبر الناتج من بعض الاخلافات البيئية ، وهذا ما يؤكده Kujumgiev واخرون (1999) الذين وجدوا ان العكبر البلغاري اكثر فعالية من العكبر البرازيلي تجاه بعض انواع البكتريا والفطريات بسبب احتواءه على نسب اعلى من الفلافونويدات ومشتقات حامض الكافييك .

جدول 3 . معدلات التركيز المثبط الادنى (MIC) للمستخلص الكحولي للعكبر العراقي وبنزوات الصوديوم تجاه بعض انواع الخمائر النامية في عصير البرتقال وعصير التفاح .*

الخميرة	نوع العصير	معـــدل (MIC) للمســـتخلص الكحولي للعكبر ملغم/مل**	معدل (MIC) لبنزوات الصوديوم مايكروغرام/مل**
Candida tropicalis	البرتقال	0.1	40
	التفاح	0.4	320
Debaryomyces hansenii	البرتقال	0.4	160
	التفاح	0.8	640
Pichia tropicalis	البرتقال	0.1	80
	التفاح	0.2	320

* بعد التحضين بدرجة حرارة 30م لمدة 24 ساعة

** النتيجة لثلاث مكررات

تشير النتائج المتحصل عليها في هذا البحث الى امكانية استخدام المستخلص الكحولي للعكبر العراقي كبديل للمواد الكيميائية في حفظ عصائر الفواكه وبتراكيز قليلة لا تؤدي الى ظهور النكهة العطرية القوية التي تميز العكبر ومن ثم عدم التأثير في الخواص الحسية لتلك العصائر.

المصادر

[1]. Alencar, S.M., T.L.C. Oldoni, M.L. Castro, I.S.R. Cabral, C.M. Costa-Neto, J.A. Cury, P.L. Rosalen and M. Ikegaki. 2007. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. 114: 311-316.

[2].Bankova, V. 2005. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. J. Ethnopharmacol. 100: 114-117.

[3].Barnett, J.A., R.W. Payne and D. Yarrow. 2000. Yeasts: Characteristics and Identification. 3rd ed. Cambridge University. Cambridge.

[4].Castro, M.L., S. Duarte, H. Koo, W.H. Bowen, J.A. Cury, M. Ikegaki and P.L. Rosalen. 2003. In-vetro analysis of propolis from Alagoas State against mutans streptococci. Brazilian Journal of Oral Sciences. 2: 307-311.

[5].Eshraghi, S. and S. Valafar. 2008. Evaluation inhibitory effects of Iranian propolis against filamentous bacteria. Pak. J. Med. Sci. 24: 56-60.

[6].Fleet, G. 1992. Spoilage yeasts . Crit. Rev. Biotechnol. 12: 1-14 .

[7].Han, S.K., K. Yamauchi and H.K. Park. 2001. Effect of nitrite and propolis preservative on volatile basic nitrogen changes in meat products. Microbios. 105: 71-75 .

[8].Harborne, J. B. 1973. Photochemical Methods, A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis. Chapman & Hall. London.

[9].Jaffer, H.J., M.J. Mahmoud , A.M. Jawad , A. Naji and A. Al-Naib. 1983. Photochemical and biological screening of some Iraqi plants. Fitoterapia. 14: 299 .

[10].Kang, S. P., C.K. Kab, H. K. Jai, D.J. Adams, T.N. Jung and K.P. Yong. 1999. Differential inhibitory effects of protobeer beeriness on sterol and chitin biosynthesis in Candida albicans . J. Antimicrob. Chemother. 34: 667-674

[11].Katircioglu, H. and N. Mercan. 2006. Antimicrobial activity and chemical compositions of Turkish propolis from different region. African J. Biotechnol. 5: 1151-1153.

[12].Katral, M., S. Yildiz, S. Kaya, S. Kurucu and G. Topcu. 2003. Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia. J. Ethnopharmacol. 86: 69-73.

[13].Kolankaya, D., G. Selmanoglu, K. Sorkun and B. Salih. 2002. Protective effects of Turkish propolis on alcohol-induced serum lipid changes and liver injury in male rats. Food Chem. 78: 213-217.

[14].Kosalic, I., S. Pepeljnjak, M. Bakmaz and S.V. Knezevic. 2005. Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis products. Acta Pharma. 55: 423-430.

[15].Kujumgiev, A., I. Tsvetkova, Y. Serekedjeiva, V. Bankova, R. Christov and S. Popov. 1999. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. J. Ethnopharmacol. 64: 235-240.

[16].Kujumgiev, A., V. Bankova, A. Ignatova and S. Popov. 1993. Antibacterial activity of propolis: some of its components and there analogs. Pharmazie. 48: 785-786.

[17].Larone, D.H. 1993. Medically Important Fungi: A Guide to Identification. Washington DC. USA. pp. 117-137.

[18].Macrae, R., R.K. Robinson and M.J. Ssdler. 1993. Encyclopedia of Food Science, Food Technology and Nutrition. Vol. 7. Academic Press. London. UK. pp. 4344-4349.

[19].Marcucci, M.C., F. Ferreres, C. Garcia-Viguera, V. Bankova, S.L. De Castro, A.P. Dantas, P.H.M. Valente and N. Paulino. 2001. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. J. Ethnopharmacology. 74: 105-112.

[20].Orsi, R.O., S.R.C. Funari, P. Rodrigues, J.M. Sforcin, A. Fernandes and V. Bankova. 2007. Effect of propolis from brazil and Bulgaria on Salmonella serovars. J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis. 13: 748-757.

[21].Ota, C., C. Unterkircher, V. Fantinato and M.T. Shimuzu. 2001. Antifungal activity of propolis on different species of Candida. Mycoses. 44: 375-378.

[22].Ozcan, M., A. Uver, D.A. Ceylan and R. Yetisir. 2004. Inhibitory effect of pollen and propolis extracts. Nahrung/Food. 48: 188-194.

[23].Ozkul, Y., S. Silici and E. Eroglu. 2005. The anticarcinogenic effect of propolis in human lymphocytes culture. Phytomedicine. 12: 742-747.

[24].Palou, E., A. Lopez-Malo, G. Barbosa, J. Welti, P. Davidson and B. Swanson. 1998. Effect of oscillatory high hydrostatic pressure treatments on Byssochlamys nivea ascospores suspended in fruit juice concentrates. Lett. Appl. Microbiol. 27: 375-378.

[25].Palou, L., J. Usall, J.L. Smilanick, M.J. Aguilar and I. Vinas. 2002. Evaluation of food additives and low-toxicity compounds as alternative chemicals for the control of Penicillium digitatum and Penicillium italicum on citrus fruit. Pest Manag. Sci. 58: 459-466.

[26].Park, Y.K., M.H. Koo, M. Ikegaki and J.L. Contado. 1997. Investigation of the flavonoid aglycones of propolis collected by Apis mellifera in Brazil. Arq. Boil. Technol. 40: 97-106.

[27].Pincus, D.H. 2009. Practical Handbook of Microbiology. Goldman, E. and L.H. Green (eds.), CRC Press. pp 767 – 792.

[28].Popova, M., V. Bankova and D. Butovska. 2004. Chemical composition and antimicrobial activity of European propolis. Phytochem. Anal. 15: 235 – 240.

[29].Salomao, K., A. P. Dantas, C. M. Borba, L.C. Campos, D.G. Machado, F.R. Aquino and S.L. de Castro. 2004. Chemical composition and microbicidal activity of extracts from Brazilian and Bulgarian propolis. Lett. Appl. Microbiol. 32: 87-92.

[30].Savickas, A., D. Majiene, K. Ramanauskiene, A. Pavilones, J. Muselik, R. Masteikova and Z. Chalupova. 2005. Chemical composition and antimicrobial activity of Lithuanian and Czech propolis. Biologi J.4: 59-63.

[31].Shihata, I.M. 1951. A pharmacological study of Anagallis arvensis. M.Sc. Thesis, Faculty of Vet. Med. Cairo Univ. Egypt.

[32].Silici, S., A. N. Koc, F. Mutlu-Sariguzel and O. Sagdic. 2005. Mold inhibition in different fruit juice by propolis. Arch. Lebensmitt. Hyg. 56: 73-96.

[33].yaghobi, S.M.J., G.R. Ghorbani, S. Soleimanian Zad and R. Satari. 2007. Antimicrobial activity of European propolis and its Chemical composition. DARU. 15: 45-49.