

2006년 8월

석사학위논문

수종의 치주질환원인균에 대한  
Propolis의 항균효과

Antimicrobial effect of propolis on the  
periodontopathogens

2006년 월 일

조선대학교 대학원

치의학과

권영선

수종의 치주질환원인균에 대한  
Propolis의 항균효과

지도교수 김 병 옥

이 논문을 치의학 석사학위신청 논문으로 제출함

2006년 월 일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

권 영 선

권영선의 석사학위 논문을 인준함.

위 원 장 조선대학교 교수 고 영 무 인

위 원 조선대학교 교수 김 병 옥 인

위 원 조선대학교 교수 안 상 건 인

2006년 월 일

조선대학교 대학원

## 목 차

표 목 차 .....	ii
도 목 차 .....	iii
ABSTRACT .....	iv
I. 서 론 .....	1
II. 연구재료 및 방법 .....	3
III. 연구결과 .....	5
IV. 총괄 및 고안 .....	7
V. 결 론 .....	10
참고문헌 .....	11

## 표 목 차

Table 1. Minimum bactericidal concentration of propolis against periodontopathogens.....	5
---	---

## 도 목 차

- Fig. 1 Propolis time-kill curve on *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384 at different concentrations. ×, control; ◆, 0.5 × MBC; ■, 1 × MBC; ▲, 2 × MBC. ....17
- Fig. 2. Propolis time-kill curve on *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 at different concentrations. ×, Control; ◆, 0.5 × MBC; ■, 1 × MBC; ▲, 2 × MBC. ....17
- Fig. 3. Propolis time-kill curve on *F. nucleatum* ATCC 51190 at different concentrations. ×, Control; ◆, 0.5 × MBC; ■, 1 × MBC; ▲, 2 × MBC. ....18
- Fig. 4. Propolis time-kill curve on *P. intermedia* ATCC 49046 at different concentrations. ×, Control; ◆, 0.5 × MBC; ■, 1 × MBC; ▲, 2 × MBC. ....18
- Fig. 5. Propolis time-kill curve on *P. nigrescens* ATCC 25261 at different concentrations. ×, Control; ◆, 0.5 × MBC; ■, 1 × MBC; ▲, 2 × MBC. ....19
- Fig. 6. Propolis time-kill curve on *P. nigrescens* ATCC 33563 at different concentrations. ×, Control; ◆, 0.5 × MBC; ■, 1 × MBC; ▲, 2 × MBC. ....19
- Fig. 7. Propolis time-kill curve on *P. gingivalis* ATCC 33277 at different concentrations. ×, Control; ◆, 0.5 × MBC; ■, 1 × MBC; ▲, 2 × MBC. ....20
- Fig. 8. Fig. 8. Propolis time-kill curve on *Tannerella forsythia* ATCC 43037 at different concentrations. ×, Control; ◆, 0.5 × MBC; ■, 1 × MBC; ▲, 2 × MBC. ....20

# ABSTRACT

## *Antimicrobial Effect of Propolis on Periodontopathogens*

Kwon young sun, D.D.S.

Advisor: Prof. Kim byung ock, D.D.S. PhD.

Department of Dentistry

Graduate School of Chosun University

The aim of this study was to investigate the antimicrobial effect of Propolis on periodontopathogens. To test the antimicrobial effect of Propolis the minimum bactericidal concentration (MBC) of against 2 strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, 1 strains of *Fusobacterium nucleatum*, 1 strains of *Prevotella intermedia*, 2 strains of *Prevotella nigrescens*, 1 strains of *Porphyromonas gingivalis*, and 1 strains of *Tannerella forsythia* was measured by broth dilution method. Time-kill curves were assessed for susceptible bacteria, testing 0, 0.5, 1, 2 × MBC for Propolis, by counting viable bacteria after 3, 90, 180, 360, 720, 1440 minutes. The minimum bactericidal concentration of Propolis was 4.8, 9.3, 9.3, 9.3, 18.9, 37.5 and 75 µg/ml on the *F. nucleatum* ATCC 51190, *P. gingivalis* ATCC 33277, *P. intermedia* ATCC 49046, *P. nigrescens* ATCC 33563, *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718, *P. nigrescens* ATCC 25261, *A.*

*actinomycescomitans* ATCC 33385 respectively. Time-kill curves demonstrated Propolis had bactericidal activity on all strains. The results suggest that Propolis can be useful in the agents for the prevention and treatment of periodontitis.

Key words: antimicrobial effect, Propolis, Periodontopathogens



# I. 서 론

치주질환은 치아우식증과 더불어 양대 구강상병중 하나이다. 1960년대 말과 1970년대 초에 치주질환이 구강 내 세균의 감염에 의하여 발생된다는 것이 밝혀졌고<sup>12,37)</sup>, 이와 더불어 치은연하치태 내 세균에 대한 연구가 진행되어 왔다. 이런 연구에 의하여 치주질환 발생에 특정 세균이 관여한다는 이론이 형성되었다<sup>30,36)</sup>. 세균감염에 의해 유발되는 치주질환은 치은출혈, 치주낭의 형성, 부착상실, 치조골 파괴와 같은 다양한 임상적 증상을 유발시키고, 치아상실의 주된 원인 중의 하나로 알려져 있다<sup>41)</sup>. 일반적으로 치주질환의 발병은 여러 국소적, 전신적 요인에 의한 초기 치은 염증이 더 깊숙한 치주조직으로 진행되어 광범위한 치주조직의 파괴를 야기하고, 이때 국소적인 구강 내의 환경과 숙주요인이 깊이 관여하는데, 가장 중요한 요인은 치태로 알려져 있다<sup>28)</sup>. 치태는 주로 세균으로 구성되어 있고, 500가지 이상의 세균 종들이 치은연상 및 치은연하 치태에 존재하며, 잠재적인 병원체로 규명되어져 왔다<sup>35)</sup>. 따라서 많은 연구자들이 특정 치주질환과 특정 세균간의 상관관계를 밝히려는 노력을 하였다. 이들 세균 중 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia* 및 *Fusobacterium nucleatum* 등이 관련이 깊은 것 알려져 있다<sup>8)</sup>.

치주질환의 치료는 증상과 발병 진행 정도에 따라 치태제거, 치석제거, 치근면 활택술, 치주판막술 등이 있으며, 특히 기계적 처치에 반응을 하지 않을 때, 전신적인 증상이 있는 급성 치주감염, Medically compromised 환자의 예방적 목적, 비외과적 또는 외과적 치료에 부가적으로 항생제를 국소적 또는 전신적 투여를 병행한다. 항생제의 전신적 투여에 의해서 구강 내 치태에서도 특정 항생제에 대한 내성을 갖는 세균들이 검출되고 있다<sup>24,31)</sup>. 따라서 현재 이러한 부작용을 극복하기 위하여 천연추출물에서 새로운 항세균제 등의 생약성분을 찾으려는 노력이 증가되고 있다.

프로폴리스는 꿀벌의 생산물로서 집을 유지하고 건설하는데 사용한다. 프로폴

리스는 복잡한 물질이다. 프로폴리스의 구성성분은 다양하게 이루어져 있지만 일반적으로 50% resin과 vegetables balsam, 30% wax, 10% essential 과 aromatic oil, 5% pollen, 5% 다양한 유기물질로 구성되어있고<sup>6)</sup>, 이러한 화합물들은 아미노산, flavanoids, terpens, vanillin, tetchrysin, pinocembrin, ferulic acid, caffeic acid 그리고 cinnamic acid들로 이루어져 있다.

여러 연구결과에 의하면 프로폴리스는 항균, 항진균, 항바이러스 그리고 항암 효과 등을 갖는 것으로 보고되었다<sup>1,5,6,10,11,13,16,17,25,36)</sup>. 특히 그람양성균 및 그람음성균에 대하여 광범위 항균효과가 있는 것으로 알려져 있다. 프로폴리스의 이러한 항균작용에 대한 정확한 기전은 밝혀져 있지 않지만, flavinoid의 성분과 관련이 있을 것이라는 보고도 있다<sup>20)</sup>.

따라서 이 연구에서는 한국에서 생산된 프로폴리스의 치주질환원인균에 대한 최소살균농도(minimum bactericidal concentration) 조사 및 time-kill curves 분석을 통하여, 항균효과를 평가하고자 한다.

## II. 연구재료 및 방법

### A. 연구재료

가보농산에서 만들어진 프로폴리스를 용액형태로 사용함

### B. 연구방법

#### B-1. 세균 및 세균 배양

본 연구에 사용된 *A. actinomycetemcomitans* 2균주(ATCC 33384, ATCC 43718), *F. nucleatum* 1균주(ATCC 51190), *P. intermedia* 1균주(ATCC 49046), *P. nigrescens* 2균주(ATCC 33563, ATCC 25261), *P. gingivalis* 1균주(ATCC 33277) 그리고 *T. forsythia* 1균주(ATCC 43037)는 (American Type Culture Collection(ATCC, University Boulevard, Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. 이들 균주들을 배양하기 위해 *A. actinomycetemcomitans*는 TSV agar(3% tryptic soy broth, 0.1% yeast extract, 1.5% agar, 5 µg/ml vancomycin, 75 µg/ml bacitracin, 10% horse serum, 1.5% agar), *F. nucleatum*은 tryptic soy broth에 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, 0.2% glucose, 0.02% L-tryptophan, 4 µg/ml erythromycin, 5 µg/ml crystal violet, 5.0% sheep blood 및 1.5% agar가 포함된 선택배지에서 배양하였다. 그리고 나머지 균주들은 혈액한천배지(3% tryptic soy broth, 0.5% yeast extract, 0.025% resazurin, 1.5% agar, 0.05% cysteine HCl-H<sub>2</sub>O, 0.5 mg/ml hemin solution, 2 µg/ml vitamin K<sub>1</sub>, 5.0% sheep blood)를 사용하여 배양하였다. 모든 균주는 37°C 혐기성 배양기(Model Bactron I, Sheldon Manufacturing Inc., Cornelius, OR, USA)에서 배양하였다.

#### B-2. 최소살균농도(*minimum bactericidal concentration; MBC*)

프로폴리스의 치주원인균인 *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *P. gingivalis* 그리고 *T. forsythia* 균주들에 대한

성장 억제 및 살균효과를 측정하기 위해 MBC를 측정하였다. 먼저 균주를 각각의 액체배지에서 후기 로그기까지 배양한 후, 이를 액체배지에 37℃에서 배양한 후 균주를 파장 540 nm에서 OD 값이 0.1이 되도록 배지로 희석하였다. 프로폴리스 원액을 96 well plate에 0.5×~0.0625× 로 2배씩 순차적으로 희석하고, 희석된 각각의 균주들을 100  $\mu$ l 씩 넣은 후 37℃에서 24시간 동안 배양하였다. 각 well의 5  $\mu$ l를 취해서 혈액한천배지에 도말한 후 24시간 후에 세균이 전혀 배양되지 않는 well의 프로폴리스 값을 MBC 값으로 정하였다.

### ***B-3. Time kill curves***

이 연구에 사용된 각각의 균주들에 대한 프로폴리스의 MBC 농도(1×MBC) 및 이의 0.5배(0.5×MBC) 및 2배(2×MBC) 농도에서 3분, 1.5시간, 3시간, 6시간, 12시간, 및 24시간이 경과함에 따른 항균력을 측정하여, 프로폴리스가 각각의 균주들에 대하여 살균제 혹은 정균제로 작용하는지를 조사하였다. 균주를 각각의 액체배지에 24시간 배양한 후 파장 540 nm에서 배양액의 흡광도를 측정하여 균주가  $1 \times 10^6$  CFU/ml이 되도록 희석하였다. 이 실험에 이용하고자 하는 프로폴리스 농도보다 2배씩 높은 액체배지 250  $\mu$ l에 희석된 균주 250  $\mu$ l를 첨가하여 배양하고, 조사하고자 하는 배양 시간에 따라 20  $\mu$ l를 취하여 각각의 고체배지에 도말하여 48시간 동안 배양한 후 형성된 균락을 계수화하였다. 각각의 실험은 모두 2회 반복하여 평균값으로 나타내었다.

### Ⅲ. 연구 결과

프로폴리스의 치주원인균인 *P. gingivalis* ATCC 33277, *P. intermedia* ATCC 49046, *P. nigrescens* ATCC 33563 대한 최소살균농도(minimum bactericidal concentration)는 9.3  $\mu\text{g/ml}$  로 나타났고 *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33385에서는 37.5  $\mu\text{g/ml}$ , *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718에서는 18.9  $\mu\text{g/ml}$ , *F. nucleatum* ATCC 51190에서는 4.8  $\mu\text{g/ml}$ , *P. nigrescens* ATCC 25261에서는 37.5  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 그리고 *T. forsythia* ATCC 43037에서는 18.9  $\mu\text{g/ml}$  였다(Table 1).

Table 1. Minimum bactericidal concentration of propolis against the periodontopathogens

strains	MBC( $\mu\text{g/ml}$ )
	Propolis
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> ATCC 33384	75
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> ATCC 43718	18.9
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC51190	4.8
<i>Prevotella intermedia</i> ATCC 49046	9.3
<i>Prevotella nigrescens</i> ATCC 25261	37.5
<i>Prevotella. nigrescens</i> ATCC 33563	9.3
<i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277	9.3
<i>Tannerella forsythia</i> ATCC 43037	18.9

Time-kill curves 측정결과에 의하면 *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384는 모든 농도에서 3시간 후에 대부분 사멸하였고 *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718은 1 $\times$ , 2 $\times$  농도에서 1.5시간부터 대부분 사멸하였고 0.5 $\times$  농도에서는 3시간 후부터 사멸하였다. *F. nucleatum* ATCC 51190은 1 $\times$ , 2 $\times$  농도에서 3시간 후부터

대부분 사멸하였고 0.5× 농도에서는 12시간 후부터 사멸하였다. *P. intermedia* ATCC 49046은 모든 농도에서 3시간 후부터 대부분 사멸하였다. *P. nigrescens* ATCC 25261은 0.5× 농도에서만 6시간 후부터 대부분 사멸한다. *P. nigrescens* ATCC 33563은 모든 농도에서 1.5시간 후부터 사멸하였다. *P. gingivalis* ATCC 33277은 1×, 2× 농도에서 6시간 후부터 대부분 사멸하였으며, 0.5× 농도에서 6시간 후부터 감소하기 시작해서 24시간 후에 대부분 사멸하였다. 그리고 *T. forsythia* ATCC 43037은 모든 농도에서 1.5시간 후부터 대부분 사멸하였다. 따라서 프로폴리스는 이 연구에 사용된 모든 균주들에 대해서 살균제로 작용하고 있음을 알 수 있었다(Fig 1-8).

## IV. 총괄 및 고안

천연추출물의 생약성분들은 수 천년동안 민간약제로 사용되어져 왔고 그것들의 대부분은 항균, 항염증 같은 약리학적인 성질을 가지고 있다<sup>44)</sup>. 이러한 약리학적인 성질을 이용해서 양대 구강상병에 주원인이 되는 구강 내 병원균에 대해서 항균 작용이 있는 천연추출물에 대한 연구가 진행되고 있는데, 대표적인 예가 녹차에 들어있는 폴리페놀의 일종인 카테킨이 있다. Hattori et al에 의하면 카테킨은 치아우식증을 유발시키는 *S. mutans* 와 *S. sobrinus*에 대해서 항균작용이 있다고 보고했고<sup>17)</sup>, Hirasawa et al 은 치주원인병원균에 대한 효과도 있는 것으로 보고했다<sup>19)</sup>. 또한 프로폴리스에 대한 항균작용에 대한 연구도 진행되어져 왔다<sup>4,23,24)</sup>.

프로폴리스를 포함하고 있는 생산물들은 일반적으로 사용되고 있으며 특히 식품보조제로 사용되고 있다. 알레르기 반응과 같은 부작용이 발생하기도 하지만 상대적으로 유해하지 않은 것으로 알려져 있다<sup>6)</sup>.

다양한 병원성 세균들의 항균작용에 대한 연구는 많이 보고되었지만 구강 내 세균 특히 치주질환 원인균종에 대한 연구는 거의 보고된 것이 없었다<sup>20,32,33,37)</sup>. 본 연구에서는 치주질환과 연관된 *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *P. gingivalis* 그리고 *T. forsythia* 균주에 대하여 MBC값을 구하고 Time-kill curves 분석을 실시한 결과 실험에 사용된 치주질환 원인균종들에서 프로폴리스는 살균제로 작용함을 알 수 있었다.

Koo 등은 브라질산 프로폴리스로 치아우식원인균 *S. mutans*와 *S. sobrinus* 균종과 치주질환 원인균인 *P. gingivalis* 균종에 대한 항세균 효과를 조사하였다<sup>23)</sup>. 그 결과 브라질산 프로폴리스는 *S. mutans*와 *S. sobrinus*의 세포외 다당류 합성을 억제하고 세균의 부착능을 감소시키는 효과가 있었으며 *P. gingivalis* 등에 대하여는 살균효과 보다는 정균효과를 보인다고 보고되었다<sup>23)</sup>. 이번 연구에 사용된 한국산 프로폴리스는 *P. gingivalis*에 대하여 살균효과를 보였는데 이는 Koo 등의 연구결과와 상반된 것이다. 이는 생산지별로 프로폴리스 구성성분의

차이에 기인한 것으로 생각된다. 향후 국제공동연구를 통해 생산 국가별 프로폴리스의 치주질환 원인균에 대한 항균효과를 조사하고 각각의 성분을 분석하여 항균효과의 작용기전을 밝히는 실험이 필요하리라 생각된다.

*F. nucleatum*은 초기 및 후기 치태형성과정에서 다른 세균들을 연결하는 역할, 혐기성 조건을 형성하는 역할 그리고 면역작용을 차단하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>9,21,40</sup>. 따라서 프로폴리스가 *F. nucleatum*에 대하여 살균작용을 갖는다는 것은 치주질환의 예방 및 치주질환의 처치 후 재발방지를 위한 약제로 사용할 있는 의미를 갖는다고 할 수 있다.

프로폴리스의 구성성분중 항균력을 보이는 화합물은 폴리페놀류인 flavonoids 이다<sup>2,3,14</sup>. Pinocembrin, galangin 그리고 sakuranetin 같은 flavonoids가 항균작용이 있다고 보고되었다<sup>2,6,42,43</sup>. Kaempferol도 *S. mutans*, *A. viscosus* 대해서 항균작용이 있다고 보고됐고<sup>32</sup>, 브라질산 프로폴리스를 구성하는 flavonoid aglycones에는 galangin, pinocembrin, kaempferol 그리고 sakuranetin이 포함되어 있고 다른 페놀화합물도 포함되어 있다고 보고되었다<sup>33,34</sup>. 하지만 이러한 프로폴리스의 항균작용에 대한 정확한 기전은 아직까지 완벽하게 밝혀지지 않았다. 항균작용은 각각의 화합물의 효과 보다는 flavonoid의 상승 효과가 더 관련 있다고 보고되었다<sup>1,4</sup>. *S. agalactiae*에 대한 항균작용에 있어서 네 가지 기전이 보고되었는데, 첫 번째로 pseudomuticellular streptococci의 형성 두 번째 세포질, 세포막 그리고 세포벽의 disorganization 세 번째로 부분적인 세균용해작용 그리고 네 번째로 단백질 합성의 억제등 이다<sup>39</sup>. 하지만 앞에서 언급했듯이 이러한 프로폴리스의 항균작용은 프로폴리스를 구성하고 있는 여러 가지 성분들에 의해서 작용되는 것으로 알려져 있고 이러한 성분들은 프로폴리스가 생산되는 지역과 시기에 따라서 정량적, 정성적으로 다양하게 나타나고 있다<sup>2,15,22,33</sup>. 그래서 이러한 항균효과를 나타내는 가장 활동적인 화합물을 알아내는 것이 필요하다고 생각된다.

프로폴리스에 대한 치주질환 예방 및 치주치료 약제로 임상에서 사용하기 위해서는 항균효과를 보이는 프로폴리스 농도에서 치주조직을 구성하는 구강점막 상피세포, 치은섬유아세포, 치주인대세포에 대한 세포독성검사를 시행하고 조절



된 임상연구를 통해서 실제적인 효과를 밝혀야 한다고 사료된다.

이상의 결과를 종합해 보면 프로폴리스는 치주질환 원인균종들에 대한 성장억제효과와 살균효과를 가지고 있었고, 이를 이용한 치주질환 예방을 위한 구강양치용액과 치약, 치실 등의 개발에 사용가능하리라 사료된다.

## V. 결 론

이 연구는 치주질환의 예방 및 치료에 응용할 수 있는 프로폴리스의 항균작용을 알아보기 위하여 실시하였다. 이 연구에서 프로폴리스의 치주질환 원인균에 대한 항균작용은 최소살균농도(minimum bactericidal concentration)와 time-kill curves를 측정하여 조사하였다.

### 1. 최소살균농도(minimum bactericidal concentration)

- ① *P. gingivalis* ATCC 33277, *P. intermedia* ATCC 49046,  
*P. nigrescens* ATCC 33563 : 9.3 µg/ml
- ② *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33385 : 75 µg/ml,
- ③ *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 : 18.9 µg/ml,
- ④ *F. nucleatum* ATCC 51190 : 4.8 µg/ml,
- ⑤ *P. nigrescens* ATCC 25261 : 37.5 µg/ml
- ⑥ *T. forsythia* ATCC 43037 : 18.9 µg/ml,

### 2. Time-kill curves 측정결과에 의하면 프로폴리스는

*A. actinomycetemcomitans* (ATCC 33384, ATCC 43718),  
*F. nucleatum*(ATCC 51190), *P.intermedia*(ATCC 49046), *P. nigrescens*  
(ATCC 33563, ATCC 25261), *P. gingivalis*(ATCC 33277) 그리고  
*T. forsythia* (ATCC 43037) 모두에 대해서 살균제로 작용하고 있음을 알 수 있었다.

이상의 결과를 종합하면, 프로폴리스는 치주질환 원인균종들에 대한 성장억제 효과와 살균효과를 가지고 있었고, 이를 이용한 치주질환 예방을 위한 구강양치 용액과 치약, 치실 등의 개발에 사용가능하리라 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. Amoros M, Lurton E, Boustie J, Girre L, Sauvager F, Cormier M  
“Comparison of the anti-herpes simplex virus activities of propolis and  
3-methyl-but-2-enyl caffeate.” J Nat Prod 57:644-647, 1994.
2. Bankova V, Christov R, Stoev G, Popov S “Determination of phenolics  
from propolis by capillary gas chromatography.” J Chromatogr 607:150-153,  
1992.
3. Bankova VS, Popov SS, Marckov NL “Isopentenyl cinnamates from  
poplar buds and propolis.” Phytochemistry 28:871-873, 1989.
4. Bohevi JS, Coll FV, Jorda RE “The composition active components and  
bacteriostatic activity of propolis in dietetics.” J Am Oil Chem Soc  
71:529-532, 1994.
5. Brumfitt W, Hamilton-Miller JM, Franklin I “Antibiotic activity of  
natural products: 1. Propolis.” Microbios 62:19-22, 1990.
6. Burdock GA “Review of the biological properties and toxicity of bee  
propolis(propolis).” Food Chem Toxicol. 36:347-363, 1998.
7. Cirasino L, Pisati A, Fasni F “Contac dermatitis from propolis.” Contact  
Dermatitis 16:110-111, 1987.

8. Darveau RP, Tanner A, Page RC "The microbial challenge in periodontitis." *Periodontol* 2000 14:12-32, 1997.
9. Diaz PI, Zilm PS, Rogers AH "*Fusobacterium nucleatum* supports the growth of *Porphyromonas gingivalis* in oxygenated and carbon-dioxide-depleted environments." *Microbiol* 148:467-472, 2002.
10. Dobrowolski JW, Vohora SB, Sharma K, Shah SA, Naqvi SA, Dandiya PC "Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products." *J Ethnopharm* 35:77-82, 1991.
11. Focht J, Hansen SH, Nielsen JV, van den Berg-Segers A, Riezler R "Bactericidal effect of propolis in vitro against agents causing upper respiratory tract infections." *Arz-Forsch* 43:921-923, 1993.
12. Genco RJ, Evans RT, Ellison SA "Dental research in microbiology with emphasis on periodontal disease." *J Am Dent Assoc* 78:1016-1036, 1969.
13. Grange JM, Davey RW "Antibacterial properties of propolis(bee glue)." *Journal of the Royal Society of Medicine* 83:159-160, 1990.
14. Gibbons RJ, van Houtc H "Bacterial adherence in oral microbial ecology." *Annu Rev Microbiol* 29:19-44, 1975.
15. Greenaway W, Scaysbrook T, Whatley FR "The composition and plant origins of propolis: " A report of work at Oxford. *Bee World* 71:107-118, 1990.

16. Harish Z, Rubinstein A, Golodner M, Elmaliyah M, Mizrachi Y  
"Suppression of HIV-1 replication by propolis and its immunoregulatory effect." *Drugs Exptl Res* 23:89-96, 1997.
17. Hattori M, Kusumoto IT, Namba T, Ishigami T, Hara Y " Effect of tea polyphenols on glucan synthesis by glucosyltransferase from *Streptococcus mutans*." *Chem Pharm Bull(Tokyo)* 38:717-720, 1990.
18. Higashi KO, de Castro SL "Propolis extracts are effective against *Trypanosoma cruzi* and have an impact on its interaction with host cells." *J Ethnopharmacol* 43:149-155, 1994.
19. Hirasawa M, Takada K, Makimura M, Otake S "Improvement of periodontal status by green tea catechin using a local delivery system: A clinical pilot study." *J periodontal Res* 37:433-438, 2002.
20. Ikeno K, Ikeno M, Miyazawa C "Effects of propolis on dental caries in rats." *Cares Res* 25:347-351, 1991.
21. Kolenbrander PE, Ganeshkumar N, Cassels FJ, Hughes CV  
"Coaggregation: specific adherence among human oral plaque bacteria." *FASEB J* 7: 406-413, 1993.
22. König B "Plant sources of propolis." *Bee World* 66:136-139, 1985.
23. Koo H, Gomes BPF, Rosalen GMB, Ambrosano GMB, Park YK, Cury JA. " In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens" *Archives of Oral Biology* 45:141-148, 2000.

24. Lacroix JM, Walker CB "Detection and prevalence of the tetracycline resistance determinant *Tet Q* in the microbiota associated with adult periodontitis." *Oral Microbiol Immunol* 11:282-288, 1996.
25. Lindenfelser LA "Antimicrobial activity of propolis." *Am Bee* 107:90-92, 1967.
26. Metzner J, Bekemeier H, Paintz E, Schneidewind E "Zur antimicrobiellen Wirksamkeit von Propolis und Propolisinhaltstoffen." *Pharmazie* 34:97-102, 1979.
27. Mirzoeva OK, Grishanin RN, Calder PC "Antimicrobial action of propolis and some of propolis and some of its components: the effect on growth, membrane potential and mobility of bacteria." *Micobial Res* 152:239-246, 1997.
28. Moore WE, Moore LH, Ranney RR, Smibert RM, Burmesister JA, Schenkein HA "The microflora of periodontal sites showing active destructive progression." *J Clin Periodontol* 18:729-739, 1991
29. Murray PR, Jorgensen JH "Quantitative susceptibility test methods in major united states medical center." *Antimicrob Agents Chemother* 20:66-70, 1981.
30. Newman MG, Soscransky SS, Savitt ED, Propas DA, Crawford A "Studies on the microflora of periodontitis." *J Periodontol* 47:372-379, 1976.

31. Olsvik B, Tenover FC "Tetracycline resistance in periodontal pathogens." *Clin Infect Dis* 16:S310-S313, 1993.
32. Osawa K, Yasuda H, Maruyama T, Morita H, Takeya K, Itokawa H "Isoflavanones from the heartwood of *Swartzia polyphylla* and their antibacterial activity against cariogenic bacteria." *Chem Pharm Bull* 40:2970-2974, 1992.
33. Park YK, Koo MH, Ikegaki M, Contado JL "Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil." *Arq Biol Tecnol* 40:97-106, 1997.
34. Park YK, Koo MH, Abreu JAS, Ikegaki M, Cury JA, Rosalen PL "Antibacterial activity of propolis on microorganism." *Current Microbiol* 36:24-28, 1998.
35. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE "Bacterial diversity in human subgingival plaque." *J Bacteriol* 183:3770-3783, 2001.
36. Slot J "The predominant cultivable organism in juvenile periodontitis." *J Dent Res* 84:1-10, 1976.
37. Socransky SS "Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease." *J Dent Res* 49:203-222, 1970.
38. Steinberg D, Kaine G, Gedalia I "Antimicrobial effect of propolis and honey on oral bacteria." *Am J Dent* 9:236-239, 1996.

39. Takaisikikuni NB, Schilcher H "Electron-microscopic and microcalorimetric microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance." *Planta Med* 60: 222-227, 1994.
40. Tew JG, Thomas SS, Ranney RR "*Fusobacterium nucleatum*-mediated immunomodulation of the *in vitro* secondary antibody response to tetanus toxoid and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*." *J Periodontal Res* 22: 506-512, 1987.
41. Tran SD, Rudney JD, "Multiplex PCR using conserved and species-specific 16S rRNA gene primers for simultaneous detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*." *J Clin Microbiol* 34:2674-2678, 1996.
42. Villanueva VR, Barbier M, Gonnet M, Lavie P "Les flavonoides de la propolis. Isolament d'une nouvelle substance bacteriostastique: la pinocembrine. *Ann Inst Pasteur(Paris)* 118:84-87, 1970.
43. Villanueva VR, Bogdanovsky D, Barbier M, Gonnet M, Lavie P "Sur l'identification de la 3,5,7-trihydroxyflavon(galangine) a partir de la propolis" *Ann Inst Pasteur(Paris)* 106:292-302, 1964.
44. Wu-yuan CD, Green L, Birch WX "In vitro screening of Chinese medicinal toothpastes: Their effects on growth and plaque formation on mutans streptococci." *Caries Res* 24:198-202, 1990.



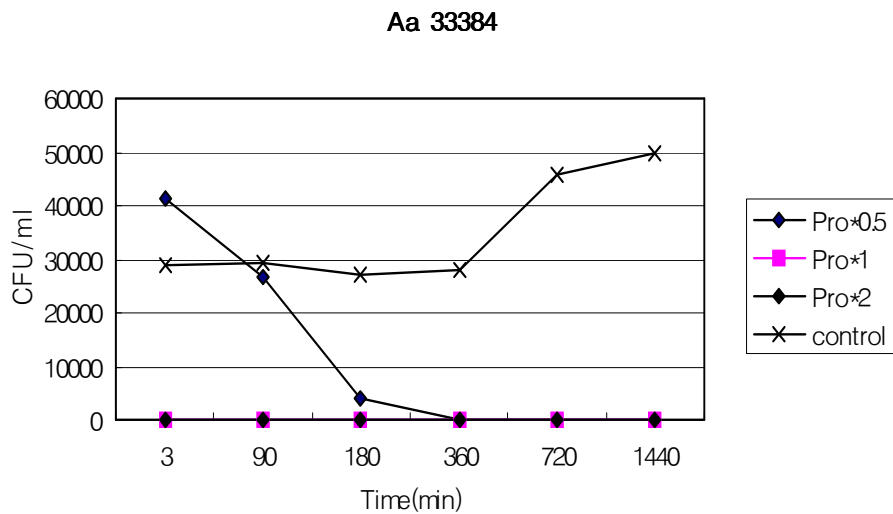


Fig. 1. Propolis time-kill curve on *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384 at different concentrations. (×, Control; ◆, 0.5 × MBC; ■, 1 × MBC; ▲, 2 × MBC.)

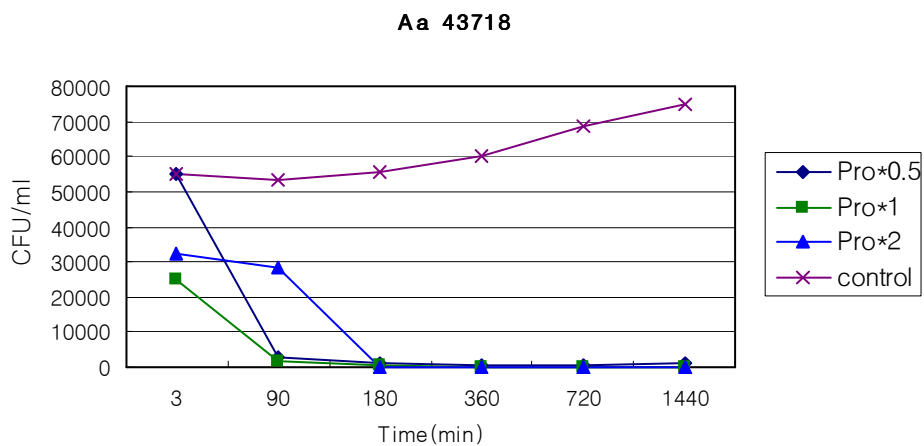


Fig. 2. Propolis time-kill curve on *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 at different concentrations. (×, Control; ◆, 0.5 × MBC; ■, 1 × MBC; ▲, 2 × MBC.)

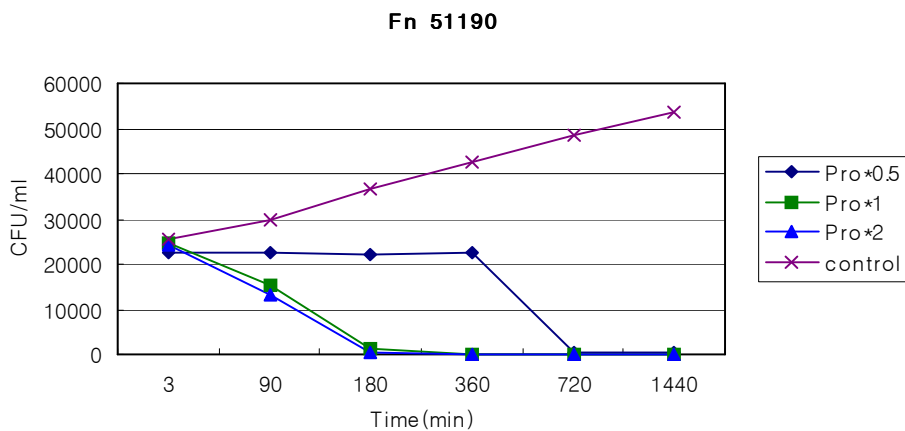


Fig. 3. Propolis time-kill curve on *F. nucleatum* ATCC 51190 at different concentrations. (×, Control; ◆, 0.5 × MBC; ■, 1 × MBC; ▲, 2 × MBC.)

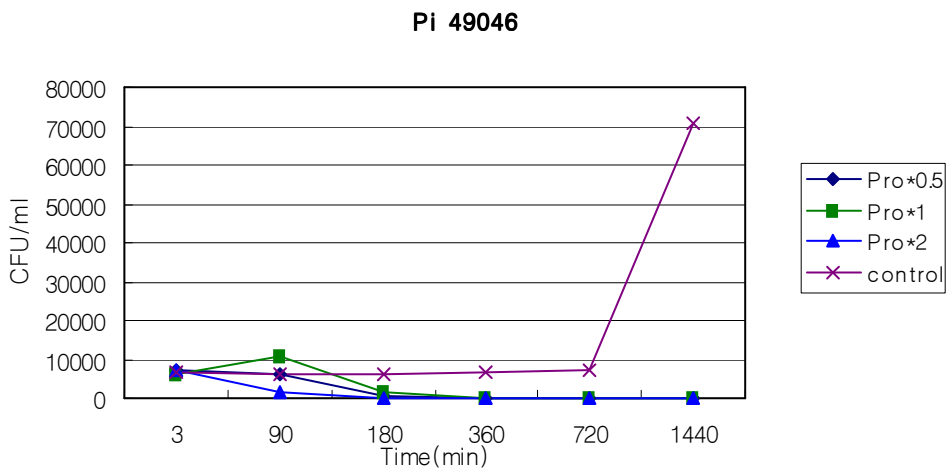


Fig. 4. Propolis time-kill curve on *P. intermedia* ATCC 49046 at different concentrations. (×, Control; ◆, 0.5 × MBC; ■, 1 × MBC; ▲, 2 × MBC.)

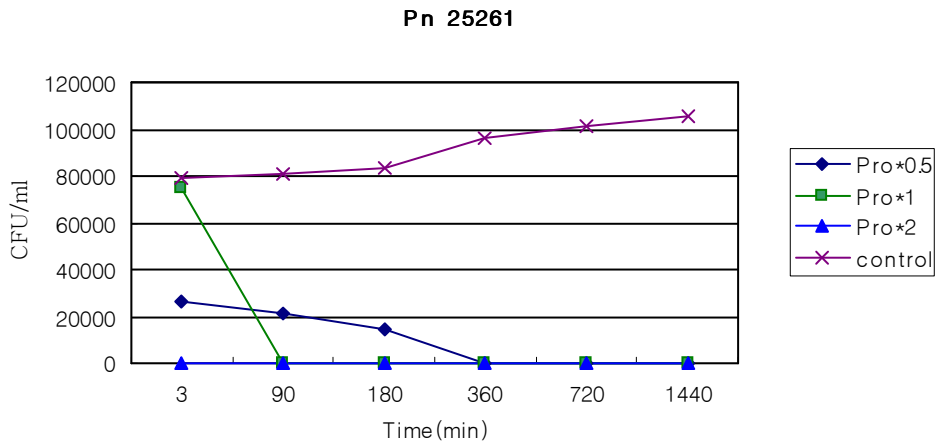


Fig. 5. Propolis time-kill curve on *P. nigrescens* ATCC 25261 at different concentrations. (×, Control; ◆, 0.5 × MBC; ■, 1 × MBC; ▲, 2 × MBC.)

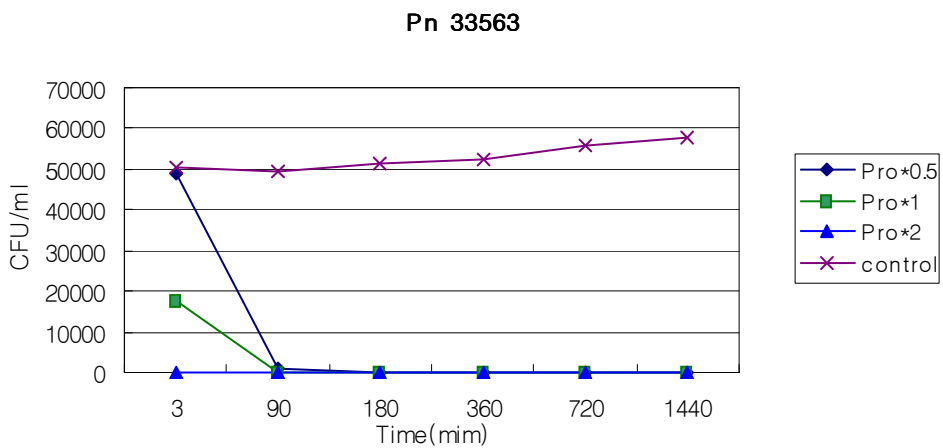


Fig. 6. Propolis time-kill curve on *P. nigrescens* ATCC 33563 at different concentrations. (×, Control; ◆, 0.5 × MBC; ■, 1 × MBC; ▲, 2 × MBC.)

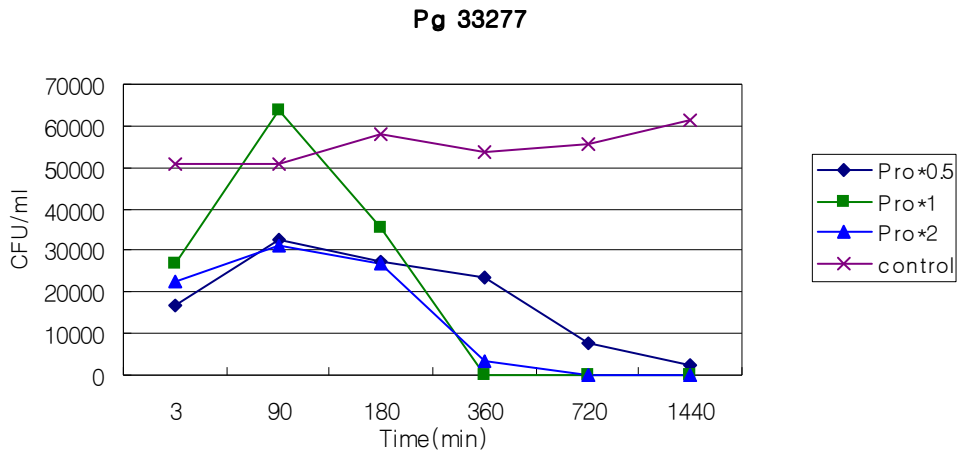


Fig. 7. Propolis time-kill curve on *P. gingivalis* ATCC 33277 at different concentrations. (×, Control; ◆, 0.5 × MBC; ■, 1 × MBC; ▲, 2 × MBC.)

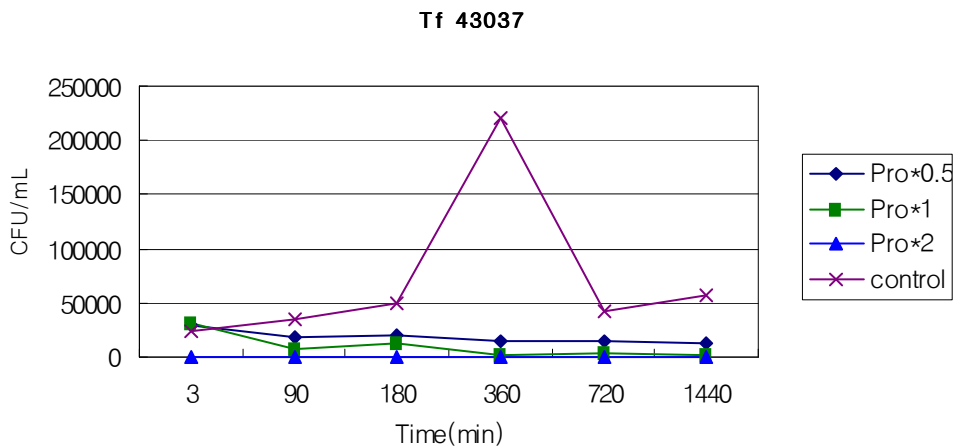


Fig. 8. Propolis time-kill curve on *Tannerella forsythia* ATCC 43037 at different concentrations. (×, Control; ◆, 0.5 × MBC; ■, 1 × MBC; ▲, 2 × MBC.)