

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Maria Jurčević

7212/BT

**Inhibicijski učinak propolisa na patogene
mikroorganizme iz skupine Oomycetes**

ZAVRŠNI RAD

Naziv znanstveno-istraživačkoga projekta: Uspostavni istraživački projekt Hrvatske zaklade za znanost „Interakcije slatkovodnih patogenih oomiceta i okoliša (InteractOomyc)“ (voditeljica: doc. dr. sc. Ana Bielen)

Mentor: doc. dr. sc. Ana Bielen

Zagreb, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Inhibicijski učinak propolisa na patogene mikroorganizme iz skupine Oomycetes

Maria Jurčević, 7212/BT

Sažetak: Trenutne metode suzbijanja patogenih mikroorganizama iz skupine Oomycetes uključuju kemikalije štetne po ljude i okoliš. Cilj ovog rada bio je istražiti anti-oomicetno djelovanje propolisa, kao prirodne tvari s poznatim antimikrobnim djelovanjem. Korištena su dva pripravka propolisa: P1 s 0,2 g suhe tvari propolisa / mL te P2 s 0,29 g suhe tvari / mL uz dodatak kadulje i paprene metvice. Spektrofotometrijski je određena koncentracija flavonoida od 5,96 mg QE/mL za P1 i 6,50 mg QE/mL za P2. *In vitro* je testirana inhibicija rasta oomiceta iz rodova *Aphanomyces* (*A. astaci*, uzročnik bolesti riječnih rakova) i *Phytophthora* (biljni patogeni *P. cactorum* i *P. plurivora*) te je utvrđeno da je u prisutnosti pripravaka propolisa rast bio usporen od 30 do 75%. Stupanj inhibicije bio je pozitivno koreliran s koncentracijom flavonoida, a *A. astaci* je bio značajno osjetljiviji od oomiceta iz roda *Phytophthora*. Zaključno, demonstrirana je učinkovitost propolisa u inhibiciji oomiceta.

Ključne riječi: *Aphanomyces*, flavonoidi, Oomycetes, *Phytophthora*, propolis

Rad sadrži: 24 stranice, 10 slika, 5 tablica, 58 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: doc. dr. sc. Ana Bielen

Pomoć pri izradi: doc. dr. sc. Maja Dent

Datum obrane: 9. srpnja 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Biology and Microbial Genetics

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Inhibitory effect of propolis on pathogenic Oomycetes

Maria Jurčević, 7212/BT

Abstract: Current methods for treatment of pathogenic oomycetes include chemicals harmful to humans and the environment. The aim of this thesis was to examine anti-oomycete effects of propolis as a natural substance with known antimicrobial activity. Two propolis formulations were used: P1 with 0.2 g of propolis dry mass / mL and P2 with 0.29 g of propolis dry mass / mL with addition of sage and pepper mint. Concentration of flavonoids of 5.96 mg QE / mL for P1 and 6.50 mg QE / mL for P2 was determined spectrophotometrically. Growth inhibition of oomycetes from the genus *Aphanomyces* (*A. astaci*, causative agent of crayfish plague) and *Phytophthora* (plant pathogens *P. cactorum* and *P. plurivora*) was investigated *in vitro* and it was found that the mycelium growth was slowed down from 30% to 75% in the presence of propolis formulations. The degree of inhibition was positively correlated with the concentration of flavonoids and *A. astaci* was significantly more sensitive than *Phytophthora* sp. In conclusion, the efficacy of propolis to inhibit growth of oomycetes has been demonstrated.

Keywords: *Aphanomyces*, flavonoids, Oomycetes, *Phytophthora*, propolis

Thesis contains: 24 pages, 10 figures, 5 tables, 58 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Asst. Prof. Ana Bielen, PhD

Technical support and assistance: Asst. Prof. Maja Dent, PhD

Defence date: July 9th, 2018

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Teorijski dio	2
2.1. Vodene plijesni (Oomycetes) kao patogeni biljaka i životinja	2
2.2. Postojeće metode kontrole oomicetnih bolesti i njihovi nedostaci	6
2.3. Propolis	7
2.4. Anti-oomicetno djelovanje propolisa	9
3. Materijali i metode	10
3.1. Pripravci propolisa	10
3.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih flavonoida	10
3.3. Uzgoj mikroorganizama	12
3.4. <i>In vitro</i> testiranje inhibicijskog učinka propolisa na mikroorganizme iz skupine Oomycetes	13
4. Rezultati i rasprava	15
4.1. Masena koncentracija ukupnih flavonoida u uzorcima propolisa	15
4.2. Inhibicijski učinak propolisa prema patogenim oomicetima	16
5. Zaključak	19
6. Popis literature	20

1. Uvod

Mikroorganizmi iz skupine Oomycetes, poznatiji kao „vodene plijesni“, patogeni su biljaka i životinja (Fry i Grünwald, 2010), a postojeće metode njihovog suzbijanja uključuju korištenje kemikalija štetnih za čovjeka i okoliš (West, 2006; Phillips i sur., 2008; Silva-Castro i sur., 2018). Pri razvoju novih metoda kontrole oomicetnih patogena treba poseban naglasak stavljati na prirodne tvari s potencijalnim anti-oomicetnim učinkom, što je bio predmet istraživanja u ovom radu.

Propolis je ljepljivi materijal koji se nalazi u biljkama, a skupljaju ga pčele i koriste ga za izgradnju košnice i kao obrambeni materijal. U sastavu propolisa značajni dio zauzimaju polifenoli, od kojih najvećim dijelom flavonoidi. Propolis ima antioksidativna, antimikrobna i protuupalna svojstva pa se od davnina koristi kao lijek (Santos i sur., 2002), a u novije vrijeme nalazi i druge primjene. Primjerice, često se koristi kao dodatak prehrani ljudi, ali i životinja na farmama kako bi im se ubrzao metabolizam i povećala produktivnost (Ambrosini i sur., 2002). Propolis se može primijeniti i u akvakulturi jer pozitivno utječe na zdravlje i apsorpciju hrane kod riba i time ubrzava rast riba (de la Cruz-Cervantes i sur., 2018). Istražuju se i mogućnosti primjene propolisa u tretmanu biljnih bakterijskih i gljivičnih patogena koji uzrokuju štete u poljoprivredi (Krajinović, 2016). Iako malobrojna, istraživanja su pokazala da propolis može inhibirati rast micelija i/ili zoospore patogenih oomiceta (Campbell, 2001; Araujo i sur., 2016; Silva-Castro i sur., 2018).

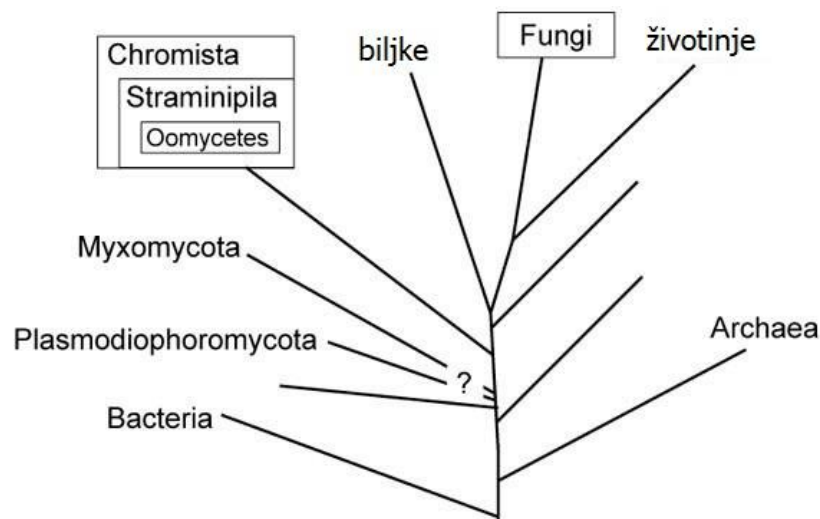
Cilj ovog rada bio je istražiti može li propolis inhibirati rast micelija odabranih oomicetnih patogena *Aphanomyces astaci*, *Phytophthora cactorum* i *P. plurivora*. *A. astaci* je odabran kao slatkovodni mikroorganizam i patogen životinja. Uzročnik je bolesti račje kuge te uzrokuje veliku štetu u akvakulturi i u prirodnim populacijama rakova (Vrålstad i sur., 2011). Vrste iz roda *Phytophthora* (*P. cactorum* i *P. plurivora*) primjeri su patogena kopnenih biljaka, uzrokuju bolesti na širokom rasponu biljnih vrsta te su značajni štetnici u uzgoju biljaka (Pernek i sur., 2011).

2. Teorijski dio

2.1. Vodene plijesni (Oomycetes) kao patogeni biljaka i životinja

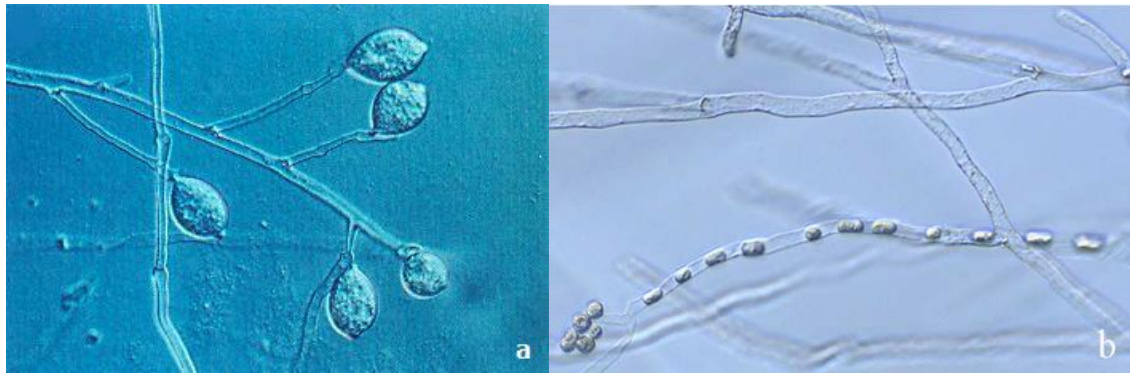
Vodne plijesni, Oomycetes, skupina su od nekoliko stotina mikroorganizama od kojih su neki biljni i životinjski patogeni, a neki saprofiti, odnosno imaju važnu ulogu u razgradnji i recikliranju mrtve organske tvari (Fry i Grünwald, 2010).

Dugo su vremena smatrani nižim gljivama jer imaju vlaknasti način rasta, hrane se apsorpcijom i razmnožavaju se sporama. Međutim, relativno nedavnim filogenetskim istraživanjima gena i međugenskih regija utvrđeno je da vodene plijesni tvore zasebnu skupinu, srodniju algama i biljkama nego gljivama (Link i sur., 2002; Fry i Grünwald, 2010) (Slika 1.).



Slika 1. Filogenetsko stablo koje pokazuje evolucijski odnos oomiceta i drugih skupina organizama (Link i sur., 2002).

Vodne plijesni se najčešće razmnožavaju nespolno tako što stvaraju strukturu sporangij koja nastaje u specijaliziranoj hifi, sporangioforu. Ovisno o vrsti, oblik sporangija, način klijanja i struktura sporangiofora se razlikuju. Primjerice, kod roda *Aphanomyces* sporangiji su vlaknasti i slični vegetativnim hifama, a kod roda *Phytophthora* sporangiofori su razgranati i slični krošnji drveta koja na vrhu svake „grane“ sadrži jedan sporangij (Link i sur., 2002). Sporangij roda *Phytophthora* prikazani su na Slici 2.a, dok je sporangij roda *Aphanomyces* prikazan na Slici 2.b.

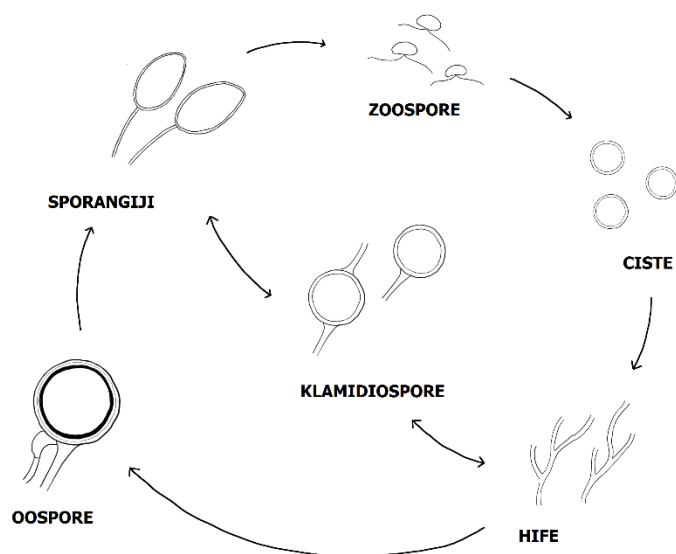


Slika 2. Sporangij roda *Phytophthora* (a) (Schumann i D'Arcy 2000) i roda *Aphanomyces* (b) (Vrålstad i sur., 2011).

U većini rodova koji se nalaze u tlu i vodi sporangiji klijaju tako što proizvode zoospore – nespolne spore koje se pokreću pomoću dva biča nejednake dužine (Link i sur., 2002). Kada zoospore dođu na površinu pogodnu za klijanje, odbace bičeve i pretvore se u kratkoživuće strukture – ciste, zatim iz ciste proklijaju hife koje inficiraju domaćina i omogućuju apsorpciju nutrijenata. Kod nekih oomiceta, poput roda *Phytophthora*, postoje i klamidospore - spore koje preživljavaju u nepovoljnim uvjetima, imaju čvrstu stijenku i nastaju isključivo nespolnim razmnožavanjem (Lawrence, 2017). Zoospore su infektivni stadiji oomiceta i stoga je na njih najbolje djelovati prilikom suzbijanja oomiceta.

U slučaju kontakta muškog anteridija i ženskog oogonija dolazi do spolnog razmnožavanja. Kariogamijom, tj. fuzijom jezgara muške i ženske spolne stanice, nastaje diploidna oospora. Oospore imaju čvrstu stijenku koja im omogućava preživljavanje u tlu, na biljkama i u lošim uvjetima. Vrste iz roda *Phytophthora* mogu biti homotalične, tj. razmnožavati se samooplodnjom ili heterotalične kada su za razmnožavanje potrebne dvije jedinke suprotnog tipa parenja (Bengtsson, 2013).

Životni ciklus roda *Phytophthora*, uključujući spolni i nespolni način razmnožavanja, prikazan je na Slici 3.



Slika 3. Životni ciklus roda *Phytophthora* (Schumann i D'Arcy, 2000).

U skupinu oomiceta spadaju mnogi patogeni biljaka i životinja koji izazivaju značajne štete u raznim granama poljoprivrede, kao i na prirodnim populacijama biljaka i životinja.

Među biljnim patogenima poznate su vrste iz roda *Phytophthora* koje su primarni paraziti finog korijenja (korijenje promjera 0,1 - 0,5 cm čija je funkcija upijanje vode i hranjivih tvari) i kore biljaka te uzročnici truljenja čitavog korijenovog sustava. Vrste iz ovoga roda poznati su patogeni bilja u agronomiji, hortikulturi i šumarstvu (Erwin i Ribero, 1996). U povijesti je poznat događaj „Velika glad“ u Irskoj (Kinealy, 1994), uzrokovan vrstom *Phytophthora infestans*, a uzrokuje bolest plamenjaču krumpira. Zbog epidemije ove bolesti, 1845. godine došlo je do propadanja krumpira u kasnoj fazi dozrijevanja pri čemu su uništeni listovi, korijen i cijeli gomolji (Nowicki, 2012), a uzrokovalo je velike seobe naroda jer je u to vrijeme krumpir bio primarni izvor hrane (Kinealy, 1994).

Vrsta *P. plurivora* se najčešće pojavljuje u prirodi, a uzrokuje opadanje nadzemnih tkiva te odumiranje korijenja (Pernek i sur., 2011). Najčešći domaćini ove vrste su europska bukva i hrast, ali može zaraziti i velik raspon drugih biljaka (Jung i Burgess, 2009) (Slika 4.a). Vrsta *P. cactorum* napada velik broj različitih vrsta voćaka, ukrasnoga bilja i šumskoga drveća. U Hrvatskoj je najčešći parazit na jagodama (Tomić, 2015) (Slika 4.b), a velike štete radi i na stablima jabuka, trešanja i krušaka (Soldo i sur., 2015).



Slika 4. Drvo hrasta zaraženo patogenom *P. plurivora* (a) (Pirttilä i Frank, 2011) te plodovi jagode uništeni patogenom *P. cactorum* (b) (Tomić, 2015).

Sljedeća značajna skupina oomicetnih patogena su uzročnici bolesti slatkovodnih životinja, među kojima su najznačajniji rodovi *Saprolegnia* i *Aphanomyces* (Alderman i Polglase, 1984).

Oomiceti iz roda *Saprolegnia* uzročnici su saprolegnioze - bolesti pastrve i drugih salmonidnih riba značajnih za slatkovodnu akvakulturu u Hrvatskoj i svijetu i široko su rasprostranjeni u slatkovodnim ekosustavima. Vrste iz roda *Saprolegnia* (najčešće *Saprolegnia parasitica*) javljaju se na površini jaja i kožnim lezijama odraslih pastrva kada uvjeti uzgoja nisu optimalni (Jiang i sur., 2013). Bolest je karakterizirana bijelim ili sivim mrljama vlaknastog micelija na tijelu ili perajama ribe (West, 2006).

Patogeni mikroorganizam *Aphanomyces astaci* uzročnik je smrtonosne bolesti račje kuge na europskim vrstama rakova, a Europom se proširio preko sjevernoameričkih slatkovodnih rakova. Sjevernoameričke vrste razvile su otpornost na razvoj bolesti i djeluju kao prijenosnici zaraze (Unestam, 1969; Rantamäki i sur., 1999). Zbog svog pogubnog utjecaja na europske autohtone populacije rakova, *A. astaci* je svrstan među sto najgorih invazivnih stranih vrsta na svijetu (Lowe i sur., 2000). Melanizirane mrlje na kutikuli vanjski su simptom zaraze (Slika 5).



Slika 5. Melanizirane mrlje kao reakcija imunskog sustava na karapaksu (a) i na trbušnoj kutikuli (b) raka uzrokovane infekcijom patogenom *A. astaci* (Vrålstad i sur., 2011).

2.2. Postojeće metode kontrole oomicetnih bolesti i njihovi nedostaci

Kontrola oomicetnih bolesti u slatkovodnoj akvakulturi temelji se na metodama koje uključuju korištenje toksičnih i štetnih kemikalija za čovjeka, životinje i cijeli ekosustav. U suzbijanju vrsta iz roda *Saprolegnia*, do 2002. godine koristilo se malahitno zelenilo. Međutim, otkriveno je kako malahitno zelenilo ima kancerogene i toksične učinke pa je njegovo korištenje zabranjeno u cijelom svijetu što je dovelo do povećanja incidencije saprolegnioze (West, 2006). U suzbijanju oomicetnih bolesti životinja koristi se i formalin, koji je također kancerogen, ali se ipak još uvijek koristi diljem svijeta (Van Den Berg i sur., 2013).

Što se tiče biljnih oomicetnih patogena, problem je što su uzročnici prisutni u tlu, a tlo je vrlo složen sustav koji je teško kontrolirati. Moguća rješenja su odvod suvišne površinske vode kako bi se tlo što bolje prozračilo i izbjegavanje sađenja nasada na slabo prozračivana tla. Preventivna sredstva su i razni fungicidi, npr. metalaksil koji ima odlično djelovanje na *P. cactorum* u slučaju napada na stabla jabuke i fosetil-Al koji se koristi u borbi protiv bolesti vinove loze koju uzrokuje patogena oomiceta *Plasmopara viticola*. Međutim, u slučaju prekomjerne uporabe fungicida može doći do razvoja otpornih sojeva patogena, ali i produkti raspada fungicida onečišćuju podzemne vode (Soldo, 2015).

2.3. Propolis

Propolis je naziv kojim se opisuje složena smolasta mješavina smole, gume i balzama porijeklom iz pupoljaka, listova, cvjetova te biljnih izlučevina koje sakupljaju pčele, *Apis mellifera* (Marcucci, 1995). Pčele skupljaju smolu iz pupoljaka i transportiraju je u košnicu gdje ju potom žvaču i djelomično probavljen materijal miješaju s pčelinjim voskom kako bi dobile konačan proizvod (Meyer, 1956). Pčele koriste propolis kao materijal za gradnju košnica, popunjavanje pukotina, poliranje saća i kao obrambenu tvar. Riječ *propolis* dolazi od grčkih riječi *pro* što znači „ispred“, „na ulazu u“ i *polis* što znači „grad“, „zajednica“ jer propolis kao prirodni materijal štiti košnicu.

Propolis se, kao i med, koristi još od davnina. Prvi izvori govore kako su propolis koristili drevni Egipćani koji su na vazama i ornamentima oslikavali pčele kako proizvode propolis, a koristili su ga i Perzijanci, Rimljani i Židovi kao lijek. Grci su koristili propolis kao glavni sastojak parfema, miješajući ga s aromatičnim biljkama (Kuropatnicki i sur., 2013).

Do danas je u sastavu propolisa otkriveno oko 300 spojeva, uglavnom polifenola (Huang i sur., 2014). Početkom 19. stoljeća, francuski kemičar Michel Eugène Chevreul otkrio je nekoliko flavonoida u propolisu, a Piccard je 1864. godine iz njega izolirao flavonoid krizin ($C_{15}H_{10}O_4$) u potpuno čistom obliku (Kuropatnicki i sur., 2013). Danas je poznato da su glavni polifenoli u propolisu flavonoidi, a prate ih fenolne kiseline, esteri, fenolni aldehidi, ketoni itd. Ostali spojevi u propolisu su hlapljiva ulja i aromatske kiseline (5 – 10%), vosak (30 – 40%), smola, balzam i peludna zrnca koji su bogati izvor bitnih elemenata kao što su magnezij, nikel, kalcij, željezo i cink (Thomson, 1990). Sastav neprerađenog propolisa naveden je u Tablici 1.

Na povišenim temperaturama propolis je mekan, savitljiv i vrlo ljepljiv; međutim, kada se ohladi, a osobito kada se zamrzne, postaje tvrd i lomljiv. U većini slučajeva, propolis prelazi u tekućinu pri 60 - 70 °C, ali za neke uzorke točka taljenja može doseći i 100 °C (Kuropatnicki i sur., 2013). Na kemijski sastav propolisa utječe botaničko podrijetlo pri čemu propolis može biti promjenjive boje, mirisa i djelovanja (Bankova, 2014).

Antibakterijsko djelovanje propolisa pokazano je u brojnim znanstvenim istraživanjima (Grange i Davey, 1990; Dobrowolski i sur., 1991; Wagh, 2013). Općenito, Gram pozitivne bakterije osjetljivije su na djelovanje propolisa od Gram negativnih bakterija iz nekoliko razloga (Tukmechi i sur., 2010). Gram negativne bakterije u staničnoj membrani sadrže proteinske pumpe koje izbacuju sastojke propolisa, npr. flavonoide, iz stanice. Slabi učinak inhibicije Gram negativnih bakterija također može biti objašnjen činjenicom kako se u sastavu propolisa nalazi

smola koju biljka inače izlučuje kako bi se zaštitila od Gram pozitivnih bakterija (Shuaib i sur., 2013).

Tablica 1. Sastav neprerađenog propolisa (Marcucci, 1995).

Djelotvorne tvari	% u neprerađenom propolisu	Napomena
ugljikovodici, vosak, esteri, eteri, ketoni, više masne kiseline, steroidi	5 – 40	potječu najvećim dijelom iz voska
polifenoli (flavoni, flavonoidi, kalkoni...)	5 – 50	alkoholnog podrijetla
aromatične kiseline, alkoholi, esteri aromatičnih kiselina s alkoholima, aldehidi	1 – 25	uglavnom alkoholnog podrijetla
aminokiseline, šećeri, vitamini, mineralne tvari	1 – 10	topljivi u vodi i manjim dijelom alkoholnog podrijetla

Prisutnost flavonoida, kao i fenolnih, aromatskih i diterpenskih kiselina u sastavu propolisa, povezana je i s njegovim antifungalnim svojstvima (Siqueira i sur., 2015). Najčešće se koristi u tretmanu infekcija gljivicama iz roda *Candida*. Ota i suradnici (2001) pokazali su da je unutar roda *Candida* najosjetljivija vrsta *C. albicans*. Kod pacijenata, koji su se liječili hidroalkoholnim ekstraktom propolisa, došlo je do smanjenja brojnosti gljivica iz roda *Candida*.

Nadalje, u mnogim je istraživanjima pokazana i antiviralna aktivnost propolisa. Primjerice, Yildirim i suradnici (2016) koristili su turski propolis i pokazali kako je propolis u *in vitro* uvjetima inhibirao reprodukciju herpes simpleks virusa tipa 1 i 2 ometajući pravilan rad virusne DNA polimeraze, a pri tome nije uzrokovao citopatološke promjene u stanici kao što to uzrokuju neki sintetski antiviralni lijekovi dostupni na tržištu. Također, propolis je pokazao vrlo slično djelovanje kao i antivirusni lijek aciklovir koji inhibira virusnu DNA polimerazu (Schaffer i sur., 1970). Nadalje, pokazano je da propolis interferira s virusima prilikom ulaska u stanicu tako što prevenira ulazak virusa u stanice domaćina i/ili inhibira replikaciju virusne DNA u stanici (Huleihel i Isanu, 2002), a jedan od virusa na koje utječe je retrovirus humane imunodeficijencije (HIV-1) koji uzrokuje stečeni sindrom imunodeficijencije (AIDS). Istraživanja su pokazala da propolis smanjuje koncentraciju p24 antigena koji je sastavni dio retrovirusa HIV-1 u tijelu oboljele osobe (Harrish i sur., 1997).

Glavni spoj propolisa koji djeluje antitumorski je kvercetin koji inhibira nagli porast broja tumorskih stanica i poboljšava učinak komercijalno dostupnih antitumorskih lijekova (Wang, 2000). Feniletil ester kafeinske kiseline (eng. *caffeic acid phenethyl ester*, CAPE), još jedan spoj u propolisu, inhibira sintezu proteina i nukleinskih kiselina, a inducira apoptozu (programirana smrt stanice) tumorskih stanica (Oršolić i sur., 2004).

Antioksidanti su spojevi koji štite biološke sustave od potencijalno štetnih utjecaja koje mogu uzrokovati pretjerane oksidacije (Krinsky, 1992). Istraživanjima je pokazano antioksidacijsko djelovanje propolisa jer neutralizira slobodne radikale te pojačava aktivnost antioksidacijskih enzima (de Castro, 2001).

2.4. Anti-oomicetno djelovanje propolisa

Pokazano je da propolis, uz sva navedena svojstva, ima i inhibicijski učinak na micelij nekih patogenih oomiceta i/ili na njihov infektivni oblik, zoospore. Yusuf i suradnici (2005) su, koristeći metanolni ekstrakt propolisa turskog porijekla, dokazali njegovo inhibicijsko djelovanje na rast micelija svih korištenih patogenih mikroorganizama – *Phytophthora infestans*, *P. capsici* i *P. parasitica*. Silva-Castro i suradnici (2018) koristili su, osim čistog propolisa, i propolis u kombinaciji s hitozanom, prirodnim vlaknom dobivenim iz hitina. Utvrđeno je inhibicijsko djelovanje propolisa, hitozana i kombinacije propolis/hitozan na rast micelija svih testiranih vrsta iz roda *Phytophthora* (*P. cambivora*, *P. plurivora* i *P. x alni*).

Među oomicetnim patogenima životinja, do danas je testirano djelovanje propolisa na vrste *Aphanomyces invadans*, patogen riba (Campbell i sur., 2001) i *Phytium insidiosum*, uzročnika infekcija konja, pasa i ljudi (Araujo i sur. 2016). Campbell i suradnici (2001) su testirali djelovanje propolisa na micelij i zoospore vrste *A. invadans* te utvrdili da je propolis najučinkovitije inhibirao micelij *A. invadans* od serije testiranih biljnih ekstrakata, uključujući eterično ulje čajevca i češnjaka. Nadalje, bila je potrebna sto i više puta niža koncentracija propolisa za potpunu inhibiciju pokretljivosti zoospora nego što je bilo potrebno da bi se inhibirao rast hifa. Araujo i suradnici (2016) su, koristeći brazilski etanolni ekstrakt propolisa, utvrdili njegovo inhibicijsko djelovanje na micelij 15 izolata *P. insidiosum*, s tim da su neki izolati (3/15) bili osjetljiviji odnosno potpuna inhibicija je nastupila pri koncentraciji propolisa 1,0 mg / mL, dok je kod ostalih izolata (12/15) inhibicija nastupila pri 3,4 mg / mL.

Za što bolje razumijevanje načina djelovanja propolisa na skupinu Oomycetes, u budućnosti je potrebno provesti karakterizaciju funkcionalnih skupina koje su odgovorne za anti-oomicetno djelovanje (Yusuf i sur., 2005).

3. Materijali i metode

3.1. Pripravci propolisa

U radu su korištena dva različita tekuća pripravka propolisa (PIP d.o.o.): pripravak 1, P1 (Slika 6.) i pripravak 2, P2 (Slika 7.). Sastav korištenih pripravaka naveden je u Tablici 2. Pripravci propolisa otopljeni su u mješavini etanola i deionizirane vode (1:1).



Slika 6. Pripravak 1 (P1).



Slika 7. Pripravak 2 (P2).

Tablica 2. Sastav korištenih pripravaka propolisa.

masena koncentracija γ (g/mL)	P1	P2
suha tvar propolisa	0,2	0,25
ekstrakt kadulje (<i>Salvia officinalis</i>)	/	0,25
ekstrakt paprene metvice (<i>Mentha piperita</i>)	/	0,19

3.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih flavonoida

Flavonoidi pripadaju grupi prirodnih tvari s promjenjivom fenolnom strukturom. Flavonoidi ili bioflavonoidi su sekundarni metaboliti biljaka, a nalaze se u voću, povrću, žitaricama, korijenu, stablima, cvijeću, čaju i vinu. Navedeni prirodni proizvodi su poznati po blagotvornim učincima na zdravlje za koje su odgovorni flavonoidi (Panche i sur., 2016).

U propolisu su u najvećem udjelu pronađeni sljedeći flavonoidi: pinocembrin, galangin, krizin, tektokrizin, kvercetin, isorhamnetin te kempferol. Najvažniji flavonoid u prirodi je kvercetin koji se smatra i predstavnikom bioflavonoida (Bankova i sur., 1983).

Spektrofotometrijska metoda određivanja flavonoida temelji se na reakciji flavonoida s aluminijevim kloridom i kalijevim acetatom te mjerenjem intenziteta nastalog obojenja pri 415 nm (Chang i sur., 2002). Korišteni reagensi prilikom određivanja ukupnih flavonoida su 96-postotni etanol (Kefo d.o.o.), 100-postotni metanol (J. T. Baker), 10-postotni aluminijev klorid, 1 M kalijev acetat i standardi kvercetina. Priprema korištenih otopina opisana je u Tablici 3.

Tablica 3. Priprema otopina korištenih pri određivanju koncentracije ukupnih flavonoida.

Otopina	Priprema
10-postotni aluminijev klorid	1 g aluminijevog klorida (aluminij-klorid-heksahidrat, Acros organics) otopljeno je u 5 mL destilirane vode (u čaši, u digestoru) te kvantitativno preneseno u odmjernu tikvicu volumena 10 mL i nadopunjeno do oznake destiliranom vodom.
1 M kalijev acetat	9,845 g kalijevog acetata (Acros organics) otopljeno je u 10 mL destilirane vode te kvantitativno preneseno u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i nadopunjeno do oznake destiliranom vodom.
100 mg / L kvercetin	Odvagano je 10 mg standarda kvercetina (Acros organics) u plastičnu lađicu te je pomoću 5 mL 100-postotnog metanola kvantitativno preneseno u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopljeno u danom volumenu, a potom do oznake nadopunjeno metanolom. Od početne otopine standarda priređena su redom razrjeđenja 10, 25, 50 i 75 mg/L u odmjernim tikvicama od 10 mL tako da je otpipetirano redom 1, 2,5, 5 i 7,5 mL alikvota standardne otopine kvercetina u svaku tikvicu i potom nadopunjeno do oznake 100-postotnim metanolom.

Postupak spektrofotometrijskog određivanja sastojao se od: a) izrade baždarnog dijagrama te b) mjerenja apsorbancije uzoraka propolisa.

Za pripremu baždarnog pravca korištena je kao standard serija otopina kvercetina koncentracija 10, 25, 50, 75 i 100 mg/L (Tablica 3.). Iz svake tikvice otpipetirano je redom 0,5 mL otopine standarda, 1,5 mL 96-postotnog etanola, 0,1 mL 10-postotnog aluminijeva klorida, 0,1 mL 1 M kalijeva acetata i 2,8 mL destilirane vode. Na isti način je pripremljena i slijepa proba, ali je umjesto otopine standarda korišten 100-postotni metanol, a umjesto 10-postotnog aluminijeva klorida dodano je 0,1 mL destilirane vode. Reakcijska smjesa je stajala 30 minuta pri sobnoj temperaturi, nakon čega je izmjerena apsorbancija na UV/Vis spektrofotometru (Perkin elmer, Lambda 1) pri valnoj duljini 415 nm. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija,

nacrtnan je baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanosene koncentracije kvercetina (mg/L), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 415 nm. Koncentracija ukupnih flavonoida izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca.

Uzorci propolisa (P1 i P2) prije određivanja masenih koncentracija ukupnih flavonoida razrijeđeni su i to tako da je 175 µL uzorka otpipetirano u odmjernu tikvicu od 25 mL te nadopunjeno do oznake 96-postotnim etanolom. Nakon toga je u staklenu epruvetu otpipetirano redom 0,5 mL razrijeđenog uzorka propolisa, 1,5 mL 96-postotnog etanola, 0,1 mL 10-postotnog aluminijskoga klorida, 0,1 mL 1 M kalijeva acetata i 2,8 mL deionizirane vode. Na isti način je pripremljena i slijepa proba, ali je umjesto uzorka propolisa uzet 100-postotni metanol, a umjesto 10-postotnog aluminijskoga klorida 0,1 mL deionizirane vode. Nakon 30 minuta izmjerena je apsorbancija pri valnoj duljini 415 nm.

Koncentracija ukupnih flavonoida u uzorcima propolisa izračunata je iz prethodno dobivene jednadžbe baždarnog pravca i izražena kao mg ekvivalent kvercetina (QE) / mL uzorka.

3.3. Uzgoj mikroorganizama

U istraživanju su korištena tri patogena mikroorganizma iz skupine Oomycetes: *Aphanomyces astaci* (Schikora, 1906), *Phytophthora plurivora* (Jung i Burgess, 2009) i *Phytophthora cactorum* (Lebert i Cohn, 1870).

Mikroorganizmi su uzgajani pri 18 °C, a za uzgoj su korištene dvije vrste hranjivih podloga: PDA (eng. *potato dextrose agar*) i PG1.

Priprema krute hranjive podloge PG1 za uzgoj *A. astaci*

Hranjiva podloga PG1 (Unestam, 1965) priprema se korištenjem pet različitih otopina, pri čemu je potrebno svaku komponentu posebno pripremiti, sterilizirati i na kraju ih sve zajedno pomiješati u točno određenim volumenima prema zadanom redoslijedu.

Otopina 1 sadrži 3 g Bacto peptona (BD Biosciences) otopljenog u 100 mL destilirane vode.

Otopina 2 sadrži 6 g D (+) glukoza monohidrata (Sigma) otopljenog u 100 mL destilirane vode.

Otopina 3 sadrži:

- 1,70 g MgCl₂ x 6 H₂O (Sigma)
- 1,45 g CaCl₂ x 2 H₂O (Sigma)

- 0,20 g FeCl₃ x 6 H₂O (Sigma)
- 3,70 g KCl (Sigma)
- 0,55 g dinatrijeve soli etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA) (Sigma)

otopljenih u 1000 mL destilirane vode.

Otopina 4 je fosfatni pufer čiji je pH = 7,0, a dobije se miješanjem:

- otopine A: 0,067 M (9,5 g/L) Na₂HPO₄ (Sigma)
- otopine B: 0,067 M (9,2 g/L) NaH₂PO₄ x 2 H₂O (Sigma).

Pripremljene otopine potrebno je zasebno sterilizirati i nakon autoklaviranja pomiješati 611 mL otopine A i 389 mL otopine B.

Otopina 5 sadrži 12 g agara (Biolife) otopljenog u 600 mL vode.

Svih pet otopina potrebno je zasebno autoklavirati pri temperaturi 121 °C 15 minuta te ih potom ohladiti na temperaturu približno 45 °C. Nakon toga se otopine pomiješaju, pri čemu treba paziti na redoslijed dodavanja otopina kako ne bi došlo do pojave taloga: u 600 mL otopine 5 polako se dodaje 100 mL otopine 4, zatim jednaki volumen otopine 3, pa otopina 1 i na kraju 100 mL otopine 2. Dobivena otopina se sterilno ulije u Petrijeve zdjelice pri čemu je 1 L otopine dovoljna za otprilike 40 Petrijevih zdjelica s krutom hranjivom podlogom.

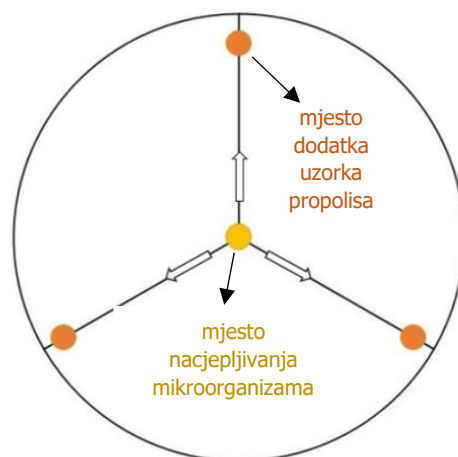
Priprema krute hranjive PDA (eng. *potato dextrose agar*) za uzgoj vrsta iz roda *Phytophthora*

Sastav PDA podloge (Biolife) je sljedeći: 5 g/L krumpirovog ekstrakta, 20 g/L glukoze i 17 g/L agara. 42 g smjese se suspendira u 1000 mL hladne destilirane vode te se smjesa zagrije do vrenja uz često mućkanje. Otopina se sterilizira autoklaviranjem pri 121 °C 15 minuta te ohladi na 45 – 50 °C, promiješa i sterilno izlije u Petrijeve zdjelice.

3.4. *In vitro* testiranje inhibicijskog učinka propolisa na mikroorganizme iz skupine Oomycetes

Istraženo je hoće li dodatak propolisa na hranjivu podlogu uzrokovati inhibiciju rasta micelija oomiceta, a shema *in vitro* testiranja prikazana je na Slici 8. Na sredinu krute hranjive podloge u Petrijevoj zdjelici postavljen je kružni komadić podloge s micelijem oomiceta (promjer = 5 mm) (žuti krug na Slici 8.). Uz rub Petrijeve zdjelice načinjena su tri bunara promjera 5 mm, međusobno na jednakoj udaljenosti i na jednakoj udaljenosti od sredine Petrijeve zdjelice, tj. oomicete (narančasti krugovi na Slici 8.). U tri bunara dodano je po 50 µL pripravaka propolisa, odnosno otapala etanol/voda (mješavina 96-postotnog etanola i

deionizirane vode u omjeru 1:1, negativna kontrola). Svaka kombinacija oomicete/pripravak propolisa te oomicete/otapalo etanol/voda testirana je u triplicatu. Petrijeve zdjelice s mikroorganizmima inkubirane su 9 dana (*A. astaci*), odnosno 12 dana (*Phytophthora*) pri 18 °C kada je izmjeren radijalni rast micelija oomiceta u mm, tj. rast od središta podloge do vanjskog ruba micelija. Nakon provedenih mjerenja uspoređen je rast oomiceta u prisutnosti čistog otapala i ekstrakta propolisa te tako utvrđen intenzitet inhibicijskog djelovanja određenog pripravka propolisa pri čemu je inhibicijska aktivnost veća što je radijalni rast oomiceta prema pripravku propolisa sporiji.



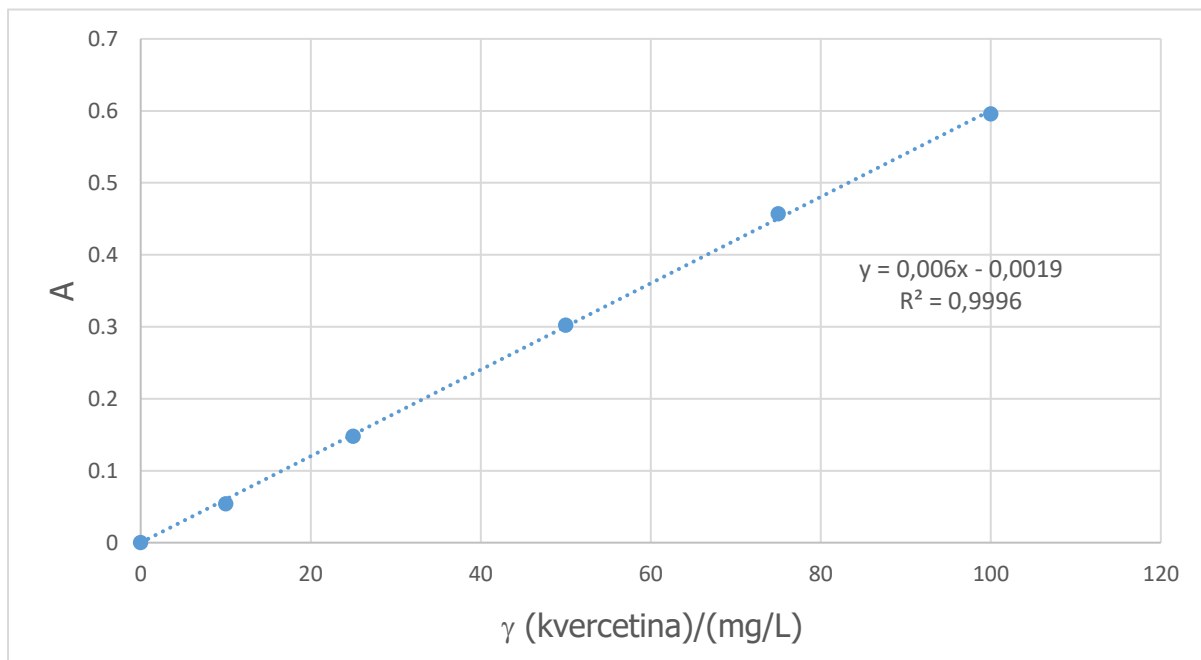
Slika 8. Shema *in vitro* testiranja inhibicije radijalnog rasta oomiceta. Smjer rasta micelija označen je strelicama.

4. Rezultati i rasprava

Propolis sadrži mnoga pozitivna svojstva kao što su antibakterijska, antiviralna, antioksidacijska, protuupalna, a među svim pozitivnim učincima, propolis ima i inhibicijsko djelovanje na patogene oomicete, što je u ovom radu po prvi put demonstrirano za vrste *A. astaci* i *P. cactorum*.

4.1. Masena koncentracija ukupnih flavonoida u uzorcima propolisa

Kako bi se odredile masene koncentracije flavonoida u uzorcima propolisa, prvo je izrađen baždarni pravac standarda kvercetina, prikazan na Slici 9. Prema dobivenoj jednadžbi pravca izračunata je koncentracija flavonoida u uzorcima propolisa koja je iznosila $5,96 \pm 0,133$ mg QE/mL za P1 te $6,50 \pm 0,45$ mg QE/mL za P1 ($n = 3$).



Slika 9. Baždarni pravac kvercetina. A – apsorbancija pri valnoj duljini 425 nm, γ - masena koncentracija kvercetina.

Višoj koncentraciji flavonoida u P2 vjerojatno nije doprinijela samo povećana koncentracija suhe tvari propolisa ($0,25$ g / mL u P2 naspram $0,2$ g / mL u P1), već i prisutnost ekstrakta listova kadulje (*Salvia officinalis*) za koje je poznato da sadrže visoku koncentraciju flavonoida te imaju najjaču antioksidacijsku aktivnost među biljkama (Hamrouni-Sellami i sur., 2013). Uz to, u P2 je prisutan ekstrakt paprene metvice (*Mentha piperita*) koji također sadrži visoke koncentracije flavonoida. Primjerice, Atanassova i suradnici (2011) usporedili su koncentracije flavonoida u metanolnim ekstraktima ove dvije biljke izraženih kao ekvivalent

GAE (eng. *gallic acid*) pri čemu je koncentracija flavonoida u ekstraktu kadulje iznosila 27,54 mg GAE/ 100 g suhe tvari, a u ekstraktu paprene metvice 25,17 mg GAE/100 g suhe tvari.

Nadalje, koncentracije propolisa utvrđene u ovom istraživanju (oko 6 mg QE/mL) bile su visoke i usporedive s literaturnim podacima. El-Guendouz i suradnici (2016) odredili su koncentracije flavonoida u 21 uzorku propolisa porijeklom iz različitih regija Maroka koje su varirale od 0,013 mg QE/mL do 4,320 mg QE/mL, ovisno o geografskoj regiji i godišnjem dobu u kojem je propolis prikupljan. Isla i suradnici (2012) navode kako je propolis argentinskog porijekla sadržavao flavonoide u koncentraciji između 3,77 i 4,23 mg QE/mL.

4.2. Inhibicijski učinak propolisa prema patogenim oomicetima

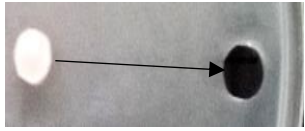
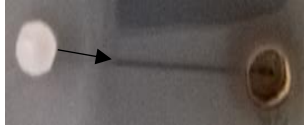
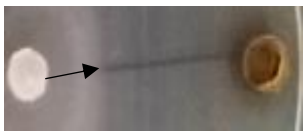
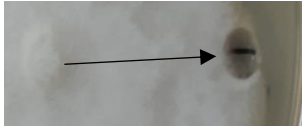
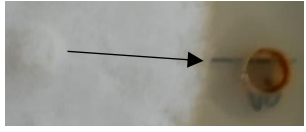

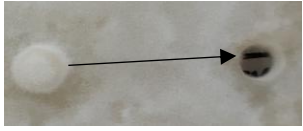
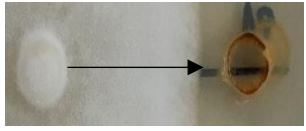
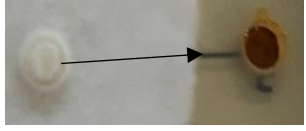
Rezultati prikazani u Tablicama 4. i 5. i na Slici 10. pokazali su da oba pripravka propolisa imaju inhibicijski učinak na rast micelija sva tri testirana patogena mikroorganizma.

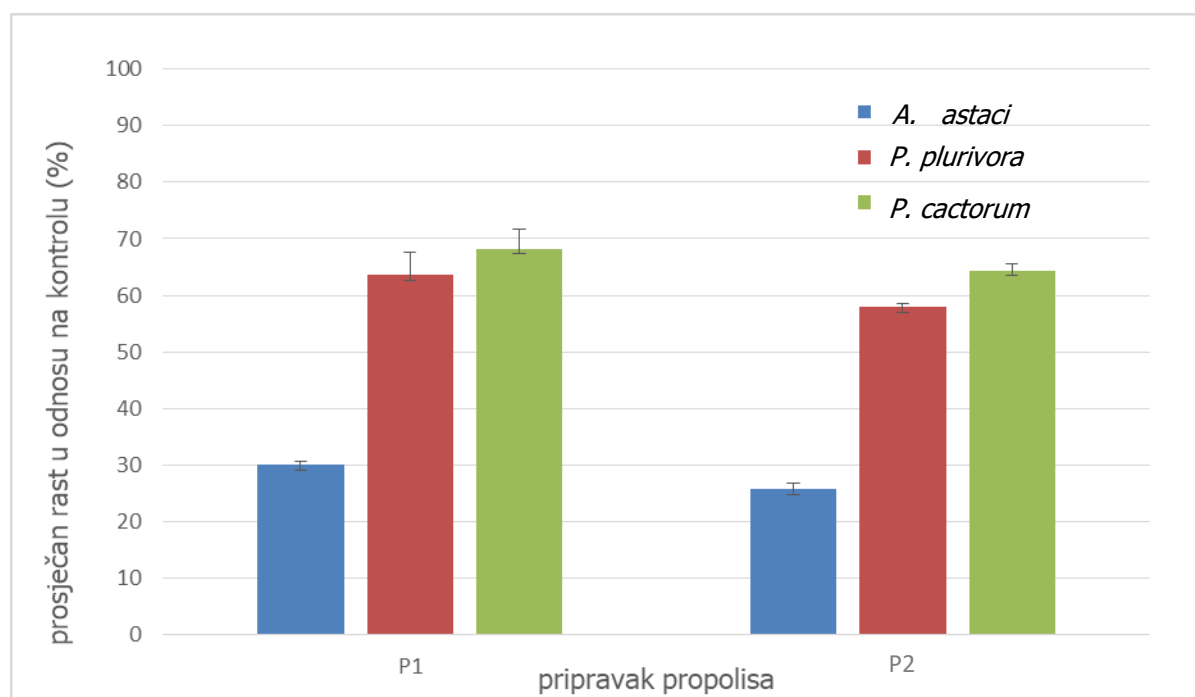
Najjače inhibirana vrsta bila je *A. astaci* čiji je rast u prisustvu P1 iznosio tek 30% od kontrolnih vrijednosti, a 25,7% u prisustvu P2. Vrste iz roda *Phytophthora* bile su slabije inhibirane pri čemu je rast *P. plurivora* iznosio 63,7% od kontrolnih vrijednosti u prisustvu P1 te 57,9% u prisustvu P2. Vrsta *P. cactorum* bila je najslabije inhibirana, 69,6% uz P1 i 65,7% uz P2. Pripravak P2 je u svim slučajevima pokazao nešto jače inhibicijsko djelovanje od pripravka P1, što se može pripisati nešto većoj izmjerenoj koncentraciji flavonoida u uzorku P2, odnosno dodatku kadulje i paprene metvice.

Tablica 4. Prosječni radijalni rast micelija mikroorganizama u mm nakon 9 (*A. astaci*) odnosno 12 dana (*P. plurivora* i *P. cactorum*) pri 18 °C. Prikazane su prosječne vrijednosti tri mjerenja ± standardna devijacija.

Mikroorganizam	Uzorak		
	etanol/voda (negativna kontrola)	P1	P2
<i>A. astaci</i>	37,6 ± 0,578	11,3 ± 0,578	9,7 ± 1,15
<i>P. plurivora</i>	31,7 ± 3,06	20,2 ± 3,88	18,3 ± 0,578
<i>P. cactorum</i>	34 ± 1	23,7 ± 3,51	22,3 ± 1,15

Tablica 5. Rast *A. astaci* (nakon 9 dana) te *P. plurivora* i *P. cactorum* (nakon 12 dana) u prisutnosti pripravaka propolisa. Strelice prikazuju smjer i frontu radijalnog rasta.

Mikroorganizam	Uzorak		
	etanol/voda (negativna kontrola)	P1	P2
<i>A. astaci</i>			
<i>P. plurivora</i>			
<i>P. cactorum</i>			



Slika 10. Inhibicija rasta patogenih oomiceta u prisutnosti pripravaka propolisa P1 i P2.

Rast je prikazan kao postotak radijalnog rasta u odnosu na negativnu kontrolu (rast u prisutnosti čistog otapala etanol/voda) nakon 9 (*A. astaci*) odnosno 12 dana (*Phytophthora* sp.). Rezultati su prosječne vrijednosti tri mjerenja \pm standardna devijacija.

Ovo je prvo istraživanje koje ukazuje na primjenjivost propolisa u svrhu zaštite rakova od patogena *A. astaci*. Rezultati su u skladu s ranijim istraživanjem koje je provedeno na srodnoj oomiceti *A. invadans*, patogenu riba (Campbell i sur., 2001). Tinktura propolisa (minimalne koncentracije 2500 ppm) inhibirala je micelij *A. invadans* te bila učinkovitija od svih drugih testiranih prirodnih sredstava, uključujući eterično ulje čajevca i češnjak. Nadalje, u tom je istraživanju demonstriran i utjecaj propolisa na pokretljivost zoospora, koje predstavljaju infektivni stadij oomiceta, i to već pri koncentraciji od 10 ppm. Rezultati pokazuju kako je za prevenciju razmnožavanja oomiceta potrebna značajno niža koncentracija propolisa nego za inhibiciju rasta njihovih hifa.

U ovom radu pokazana inhibicija rasta micelija vrsta iz roda *Phytophthora* (*P. plurivora*, *P. cactorum*) u skladu je s literaturnim podacima, iako je očito da postoji značajna varijabilnost među vrstama ovog roda što se tiče osjetljivosti na propolis. Yusuf i suradnici (2005) su pokazali da je rast micelija *P. infestans*, *P. capsici* i *P. parasitica* bio 100-postotno inhibiran pri koncentracijama propolisa od 3 do 10 µg/mL. Moguće je da su korištene vrste osjetljivije od vrsta *P. cactorum* i *P. plurivora* korištenih u ovom radu, gdje je s 20 - 70 puta većim koncentracijama propolisa inhibicija bila 30 – 40%. Ipak, za pouzdane usporedbe osjetljivosti između vrsta trebalo bi sve vrste testirati u istom eksperimentalnom sustavu. Primjerice, Yusuf i suradnici (2005) koristili su ekstrakte propolisa u metanolu (a ne u etanolu) i dodavali su ih izravno u hranjivu podlogu (a ne u bunare u njoj) i to je sigurno utjecalo na razlike u dobivenim rezultatima.

U nastavku istraživanja trebalo bi testirati učinak propolisa na brojnost, pokretljivost i vijabilnost zoospora, kao infektivnog stadija oomiceta, pogotovo s obzirom na to da su da su ranija istraživanja pokazala da su zoospore osjetljivije na propolis od micelija (Campbell i sur., 2001). S obzirom na dokazano snažno djelovanje pripravaka propolisa na *A. astaci*, zanimljiva je mogućnost korištenja propolisa u akvakulturi, osobito ako se inhibicijska aktivnost pokaže i prema vrstama iz roda *Saprolegnia*. Propolis se već koristi kao dodatak prehrani riba (de la Cruz-Cervantes i sur., 2018), a moglo bi se istražiti mogu li se rakovi zaštititi od zaraze s *A. astaci* dodavanjem propolisa u hranu. Također, nakon što rakovi izlegu jaja, jaja se mogu zaštititi premazivanjem propolisom, a zatim ih izložiti patogenu kako bi se provjerila korisnost takvog postupka.

5. Zaključak

Istraživanja antioomicetnih svojstava propolisa su malobrojna te je ovaj prvo istraživanje koje pokazuje inhibicijsko djelovanje propolisa na vrste *A. astaci* i *P. cactorum*. Rezultati su pokazali sljedeće:

- Masena koncentracija flavonoida u korištenim pripravcima propolisa bila je visoka te je u pripravku 1 iznosila 5,96 mg QE/mL, a u pripravku 2 6,50 mg QE/mL.
- Propolis je imao snažniji inhibicijski učinak na rast micelija vrste *Aphanomyces astaci* nego na vrste iz roda *Phytophthora*.
- *In vitro* testiranjem utvrđeno je nešto jače antioomicetno djelovanje pripravka P2, što ukazuje na značaj flavonoida u inhibicijskom učinku.

6. Popis literature

Alderman D.J., Polglase J.L. (1984) A comparative investigation of the effects of fungicides on *Saprolegnia parasitica* and *Aphanomyces astaci*. *Transactions of the British Mycological Society*. **83**: 313-318.

Ambrosini F., Diop C.T., Oliveros O., Cianci D. (2002) The therapeutic effects of propolis in the livestock farming. *Journal of agriculture and environment for international development*. **96**: 13-22.

Araújo M.J.A.M., de Moraes Gimenes Bosco S., Sforcin J.M. (2016) *Pythium insidiosum*: inhibitory effects of propolis and geopropolis on hyphal growth. *Brazilian Journal of Microbiology*. **47**: 863–869.

Atanassova M., Georgieva S., Ivancheva K. (2011) Total Phenolic And Total Flavonoid Contents, Antioxidant Capacity And Biological Contaminants In Medicinal Herbs. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*. **46**: 81-88.

Bankova V., De Castro S.L., Marcucci M.C. (2000) Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*. **31**: 3–15.

Bankova V., Popova M., Trusheva B. (2014) Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review. *Chemistry Central Journal*. **8**: 28.

Bengtsson T. (2013) Boosting potato defence against late blight a study from field to molecule. A Study from Field to Molecule. Doktorski rad. Alnarp: Swedish University of Agricultural Sciences.

Campbell R.E., Lilley J.H., Taukhid I., dan Perikanan B.K., Panyawachira V., Kanchanakhan S. (2001) *In vitro* screening of novel treatments for *Aphanomyces invadans*. *Aquaculture Research*. **32**: 223 – 233.

Chang C., Yang M.H., Wen H.M., Chern J.C. (2002) Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *Journal of Food and Drug Analysis*. **10**: 178-182.

De Castro S.L. (2001) Propolis: biological and pharmacological activities. Therapeutic uses of this bee-product. *Annual Review of Biomedical Sciences*. **3**: 49–83.

- De la Cruz-Cervantes J.A., Gonzalez F.B., Sanchez-Martinez J.G., Saucedo M.L., Uribe A.J. (2018) Propolis in Aquaculture: A Review of Its Potential. *Fisheries Science & Aquaculture*. **26**: 337-349.
- Dobrowolski J.W., Vohora S.B, Sharma K., Shaukat A. S., Naqvi S.A.H., Dandiya P.C. (1991) Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *Journal of Ethnopharmacology*. **35**: 77-82.
- El-Guendouz S., Aazza S., Lyoussi B., Antunes M.D., Faleiro M.L., Miguel M.G. (2016) Anti-acetylcholinesterase, antidiabetic, anti-inflammatory, antityrosinase and antixanthine oxidase activities of Moroccan propolis. *International Journal of Food Science & Technology*. **51**: 1762-1773.
- Erwin C., Ribeiro O.K. (1996) *Phytophthora* Diseases Worldwide. *The American Phytopathological Society*. **131**: 245 – 249.
- Fry W.E., Grünwald N.J. (2010) Introduction to Oomycetes. The Plant Health Instructor; <<https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/PathogenGroups/Pages/IntroOomycetes.aspx>> Pristupljeno 10. lipnja 2018.
- Grange J.M., Davey R.W. (1990) Antibacterial properties of propolis (bee glue). *Journal of the Royal Society of Medicine*. **83**: 159-160.
- Hamrouni-Sellami I., Rahali F.Z., Rebey I.B., Bourgou S., Limam F., Marzouk B. (2013) Total Phenolics, Flavonoids, and Antioxidant Activity of Sage (*Salvia officinalis* L.) Plants as Affected by Different Drying Methods. *Food and Bioprocess Technology*. **6**: 806.
- Harrish Z., Rubinstein A., Golodner A., Elmaliah M., Mizrahi Y. (1997) Suppression of HIV-1 replication by propolis and its immunoregulatory effect. *Drugs under experimental and clinical research*. **23**: 89-96.
- Huang S., Zhang C.P., Wang K., Li G.Q., Hu F.L. (2014) Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis. *Molecules*. **19**: 19610-19632.
- Huleihel M., Isanu V. (2002) Anti-herpes simplex virus effect of an aqueous extract of propolis. *The Israel Medical Association Journal*. **4**: 923-927.
- Isla M., Dantur Y., Salas A., Danert C., Zampini C., Arias M., Ordóñez R., Maldonado L., Bedascarrasbure E., Nieva Moreno M.I. (2012) Effect of seasonality on chemical composition and antibacterial and anticandida activities of Argentine propolis. Design of a topical formulation. *Natural Product Communications*. **7**: 1315-1318.

- Jiang R.H., de Bruijn I., Haas B.J., Belmonte, R., Löbach L., Christie J., van den Ackerveken G., Bottin A., Bulone V. and Díaz-Moreno S.M. (2013) Distinctive expansion of potential virulence genes in the genome of the oomycete fish pathogen *Saprolegnia parasitica*. *PLoS Genetics*. **9**: e1003272.
- Jung I., Burgess T.I. (2009) Re-evaluation of *Phytophthora citricola* isolates from multiple woody hosts in Europe and North America reveals a new species, *Phytophthora plurivora* sp. *Persoonia*. **22**: 95–110.
- Kinealy, C. (1994) This great calamity: the Irish famine, 1845-52, 18. izd., Gill & Macmillan. str. 33.
- Krajinović S. (2016) Utjecaj propolisa na porast fitopatogenih gljiva *Pythium irregulare* i *Fusarium solani*. Diplomski rad. Osijek: Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera.
- Krinsky N. (1992) Mechanism of action of biological antioxidants. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. **200**: 248-254.
- Kuropatnicki A.K., Szliszka E, Krol W. (2013) Historical Aspects of Propolis Research in Modern. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. **2013**: 1-11.
- Lawrence S.A., Armstrong C.B., Patrick W.M., Gerth M.L. (2017) High-Throughput Chemical Screening Identifies Compounds that Inhibit Different Stages of the *Phytophthora agathidicida* and *Phytophthora cinnamomi* Life Cycles. *Frontiers in Microbiology*. **8**: 1340.
- Link H., Powelson V., M. L., Johnson K.B. (2002) Oomycetes. The Plant Health Instructor; <<https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/LabExercises/Pages/Oomycetes.aspx>> Pristupljeno 20. lipnja 2018.
- Lowe S., Browne M., Boudjelas S., De Poorter M. (2000) 100 of the World Worst Invasive Alien Species A selection from the Global Invasive Species Database. *The Invasive Species Specialist Group*. str. 6.
- Marcucci M.C., (1995) Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*. **26**: 83-99.
- Meyer W. (1956) „Propolis bees“ and their activities. *Bee World*. **37**: 25–36.
- Nowicki M., Foolad M.R., Nowakowska M., Kozik E.U. (2012) Potato and Tomato Late Blight Caused by *Phytophthora infestans*: An Overview of Pathology and Resistance Breeding. *The American Phytopathological Society*. **96**: 4-17.

- Oršolić N., Bendelja K., Brbot-Šaranović A., Bašić I., (2004) Effects of caffeic acid and caffeic acid phenethyl ester, an antioxidants from propolis, on inducing apoptosis in HeLa human cervical carcinoma and Chinese hamster lung V79 fibroblast cells. *Periodicum Biologorum*. **106**: 367–372.
- Ota C., Unterkircher C., Fantinato V., Shimizu M.T. (2001) Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. *Mycoses*. **4**: 375-378
- Panche A.N., Diwan A.D, Chandra S.R. (2016) Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*. **5**: e47.
- Pernek M., Županić M., Diminić D., Cech T. (2011) Vrste roda *Phytophthora* na bukvi i topolama u Hrvatskoj. *Šumarski list*. **2011**: 130-137.
- Phillips A.J., Anderson V.L., Robertson E.J., Secombes C.J., Wes P. (2008) New insights into animal pathogenic oomycetes. *Trends in Microbiology*. **16**: 13-19.
- Pirttilä A. M., Frank C. (2011) Endophytes of Forest Trees. *Forestry Sciences*. **86**: 207-227.
- Rantamäki J., Cerenius L. and Söderhäll K. (1992) Prevention of transmission of the crayfish plague fungus (*Aphanomyces astaci*) to the freshwater crayfish *Astacus astacus* by treatment with MgCl₂. *Aquaculture*. **104**: 11-18.
- Santos F.A., Bastos E.M.A., Uzeda M., Carvalho M.A.R., Farias L.M., Moreira E.S.A., Braga F.C. (2002) Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. *Journal of Ethnopharmacology*. **80**: 1-7.
- Schaffer A.P., Aron G. M., Biswal N., Benyesh-Melnick M. (1973) Temperature-sensitive mutants of herpes simplex virus type 1: Isolation, complementation and partial characterization. *Virology*. **52**: 57-71.
- Schumann, G.L., D'Arcy C.J. (2000) Late blight of potato and tomato. The Plant Health Instructor;
<<https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/Oomycetes/Pages/LateBlight.aspx>> Pristupljeno 20. lipnja 2018.
- Shuaib M., Ali A., Ali M., Panda B.P., Ahmad M.I. (2013) Antibacterial activity of resin rich plant extracts. *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences*. **5**: 265–269.
- Silvia-Castro I.S., García J.M., Diez J.J., Pacheco J.A.F., Gil J.M., Ramos P.M. (2018). Potential control of forest diseases by solutions of chitosan oligomers, propolis and nanosilver. *European Journal of Plant Pathology*. **150**: 401-411.

- Siqueira A.B.S., Rodriguez L.R.N.A., Santos R.K.B., Marinho R.R.B., Abreu S., Peixoto R.F., Gurgel B.C.V. (2015) Antifungal activity of propolis against *Candida* species isolated from cases of chronic periodontitis. *Brazilian Oral Research*. **29**: 1-20.
- Soldo, T., Svitlica B., Mesić, J. (2015) *Phytophthora cactorum* na jabukama - simptomi, biologija patogena, epidemiologija i kontrola bolesti. *Glasilo biljne zaštite*. **15**: 24-30.
- Thomson W., (1990) Propolis. *Medical Journal of Australia*. **153**: 654
- Tomić Ž. (2015) *Phytophthora fragariae* Hickman i *Phytophthora cactorum* (Lebert & Cohn) J. Schröt na jagodi. *Glasilo biljne zaštite*. **15**: 369-375.
- Tukmechi A., Ownagh A., Mohebbat A. (2010) *In vitro* antibacterial activities of ethanol extract of iranian propolis (EEIP) against fish pathogenic bacteria (*Aeromonas hydrophila*, *Yersinia ruckeri* & *Streptococcus iniae*). *Brazilian Journal of Microbiology*. **41**: 1-20.
- Unestam, T. (1969) On the physiology of zoospore production in *Aphanomyces astaci*. *Physiologia Plantarum*. **22**: 236-246.
- Van Den Berg A.H., McLaggan D., Diéguez-Uribeondo J., Van West, P. (2013) The impact of the water moulds *Saprolegnia diclina* and *Saprolegnia parasitica* on natural ecosystems and the aquaculture industry. *Fungal Biology Reviews*. **27**: 33-42.
- Vrålstad, T., Johnsen, S. I. and Taugbøl, T. (2011): NOBANIS – Invasive Alien Species Fact Sheet – *Aphanomyces astaci*.
<https://www.nobanis.org/globalassets/speciesinfo/a/aphanomyces-astaci/aphanomyces_astaci.pdf> Pristupljeno 26. lipnja 2018.
- Wagh V.D. (2013) Propolis: A Wonder Bees Product and Its Pharmacological Potentials. *Advances in Pharmacological Sciences*. **2013**: 1-11.
- West P. (2006) *Saprolegnia parasitica*, an oomycete pathogen with a fishy appetite: new challenges for an old problem. *Mycologist*. **20**: 99-104.
- Yildirim A., Duran G.G., Duran N., Jenedi K., Bolgul B.S., Miraloglu M., Muz M. (2016) Antiviral Activity of Hatay Propolis Against Replication of Herpes Simplex Virus Type 1 and Type 2. *Medical Science Monitor*. **22**: 422–430.
- Yusuf Y., Durdane Y., Servet A. (2005) Antifungal Activity of Turkish Propolis Against *Phytophthora* Species. *Plant Pathology Journal*. **4**: 58-60.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Maria Jurčević

ime i prezime studenta