

# Inhibicijski učinak propolisa na klijavost zoospora patogenih oomiceta *Saprolegnia parasitica* i *Aphanomyces astaci*

---

Vasari, Karla

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:239255>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Biotehnologija**

**Karla Vasari**

7763/BT

**Inhibicijski učinak propolisa na klijavost zoospora  
patogenih oomiceta *Saprolegnia parasitica* i  
*Aphanomyces astaci***

**ZAVRŠNI RAD**

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

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Ana Bielen

**Zagreb, 2021.**

# 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 klijavost zoospora patogenih oomiceta  
*Saprolegnia parasitica* i *Aphanomyces astaci***

**Karla Vasari, 0058215308**

**Sažetak:** Patogene oomicete *Saprolegnia parasitica* i *Aphanomyces astaci* uzročnici su dominantnih bolesti u slatkovodnoj akvakulturi. Postojeće kemikalije za njihovo suzbijanje toksične su za domaćina, ljude i okoliš, te je potrebno razviti nove, ekološki prihvatljive i održive metode. Cilj ovog rada bio je istražiti antioomicetno djelovanje propolisa i njegovih glavnih komponenti. Korištena su dva pripravka propolisa: P1 - 200 mg mL<sup>-1</sup> i P2 - 250 mg mL<sup>-1</sup>, s dodatkom ekstrakata kadulje i paprene metvice, te su oba inhibirala klijavost zoospora oomiceta *S. parasitica* i *A. astaci* s EC<sub>50</sub> vrijednostima od 15 do 24 µg mL<sup>-1</sup>. Nadalje, primjena krizina, kao dominantne komponente propolisa, uzrokovala je inhibiciju klijavosti zoospora vrste *S. parasitica*, ali u koncentraciji višestruko višoj od one u pripravcima propolisa. Zaključno, po prvi je puta demonstrirana inhibicija klijavosti zoospora oomiceta propolisom, za koju se može pretpostaviti da je posljedica sinergije većeg broja bioaktivnih komponenti.

**Ključne riječi:** *Aphanomyces*, krizin, propolis, *Saprolegnia*, zoospore

**Rad sadrži:** 28 stranica, 5 slika, 4 tablice, 62 literaturna 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:** izv. prof. dr. sc. Ana Bielen

**Pomoć pri izradi:** Anđela Miljanović, mag. ing. techn. aliment.

**Datum obrane:** 16. rujna 2021.

## 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 germination of zoospores of pathogenic oomycetes *Saprolegnia parasitica* and *Aphanomyces astaci***

**Karla Vasari, 0058215308**

**Abstract:** The pathogenic oomycetes *Saprolegnia parasitica* and *Aphanomyces astaci* are the causative agents of the most important diseases in freshwater aquaculture. Their control is based on agents that are toxic to the host, humans and the environment. Therefore, new, environmentally friendly and sustainable methods need to be developed. The aim of this study was to investigate the antioomycetic activity of propolis and its main components. Two propolis solutions were used: P1 (200 mg mL<sup>-1</sup>) and P2 (250 mg mL<sup>-1</sup>, with the addition of sage and peppermint extracts), both of which inhibited *S. parasitica* and *A. astaci* zoospore germination with EC<sub>50</sub> values of 15 - 24 µg mL<sup>-1</sup>. In addition, chrysin, the dominant component of propolis, caused an inhibition of zoospore germination of *S. parasitica*, but at a higher concentration than in propolis solutions. In summary, the inhibition of zoospore germination of oomycetes by propolis, demonstrated for the first time, is probably due to the synergy of multiple bioactive components.

**Keywords:** *Aphanomyces*, chrysin, propolis, *Saprolegnia*, zoospore

**Thesis contains:** 28 pages, 5 figures, 4 tables, 62 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:** Assoc. Prof. Ana Bielen, PhD

**Technical support and assistance:** Anđela Miljanović, mag. ing. techn. aliment.

**Defence date:** September 16<sup>th</sup>, 2021

# Sadržaj

<b>1. Uvod</b> .....	1
<b>2. Teorijski dio</b> .....	2
<b>2.1. Vodene plijesni (Oomycota)</b> .....	2
<b>2.2. Metode kontrole oomicetnih bolesti u akvakulturi</b> .....	6
<b>2.2.1. Tradicionalne metode kontrole</b> .....	6
<b>2.2.2. Razvoj ekološki prihvatljivih metoda kontrole</b> .....	7
<b>2.3. Propolis</b> .....	8
<b>2.4. Antioomicetno djelovanje propolisa</b> .....	9
<b>3. Materijali i metode</b> .....	10
<b>3.1. Pripravci propolisa</b> .....	10
<b>3.2. Uzgoj mikroorganizama</b> .....	12
<b>3.3. Indukcija sporulacije u laboratorijskim uvjetima</b> .....	13
<b>3.4. <i>In vitro</i> testiranje inhibicijskog učinka propolisa na klijavost zoospora patogenih oomiceta <i>Aphanomyces astaci</i> i <i>Saprolegnia parasitica</i></b> .....	14
<b>4. Rezultati</b> .....	15
<b>5. Rasprava</b> .....	20
<b>6. Zaključak</b> .....	22
<b>7. Popis literature</b> .....	23

## 1. Uvod

Životinjski patogeni *Saprolegnia parasitica* i *Aphanomyces astaci* iz skupine vodenih plijesni (Oomycota) uzročnici su velikih šteta u slatkovodnoj akvakulturi. Vrsta *S. parasitica* odgovorna je za velike ekonomske gubitke u akvakulturi salmonida jer uzrokuje saprolegniozu na odraslim ribama i njihovim jajašcima, osobito kod lososa i pastrve (Shin i sur., 2017). Patogeni mikroorganizam *A. astaci* obligatni je parazit i uzročnik račje kuge, vrlo ozbiljne bolesti u akvakulturi rakova, osobito kod uzgoja zavičajnih europskih vrsta (Makkonen i sur., 2012). Metode koje se koriste za kontrolu patogenih oomiceta, poput primjene formalina, štetne su za čovjeka, životinje i okoliš. Malahitno zelenilo bilo je najučinkovitije sredstvo za suzbijanje oomicetnih patogena, ali je zbog kancerogenih i toksičnih učinaka njegova uporaba danas zabranjena u mnogim zemljama, uključujući Europsku uniju, zbog čega je došlo do porasta incidencije oomicetnih bolesti (Torto-Alalibo i sur., 2005). To je dovelo do potrebe za razvojem novih metoda temeljenih na prirodnim tvarima koje bi učinkovito inhibirale patogene te istovremeno pozitivno utjecale na domaćina. Nedavna su istraživanja pokazala da propolis, tvar biljnog porijekla s poznatim antimikrobnim djelovanjem, ima potencijala u suzbijanju oomicetnih patogena. Propolis je pokazao i pozitivan učinak na zdravlje riba domaćina pospješujući njihov rast čime je istaknut njegov veliki potencijal za primjenu u akvakulturnoj industriji (De la Cruz-Cervantes i sur., 2018). Do sada je pokazano inhibicijsko djelovanje propolisa na rast micelija životinjskih patogena *A. astaci*, *S. parasitica* i vrsta iz roda *Pythium* te biljnih patogena *Phytophthora cactorum* i *P. plurivora* (Iveljić, 2019; Pazin i sur., 2019; Jurčević, 2018; Araújo i sur., 2016), dok djelovanje propolisa na klijavost zoospora, kao infektivnog stadija patogenih oomiceta, do sada nije istraženo. Cilj ovog rada bio je po prvi puta *in vitro* ispitati inhibicijski učinak propolisa na klijavost zoospora dvaju oomicetnih patogena *S. parasitica* i *A. astaci*.

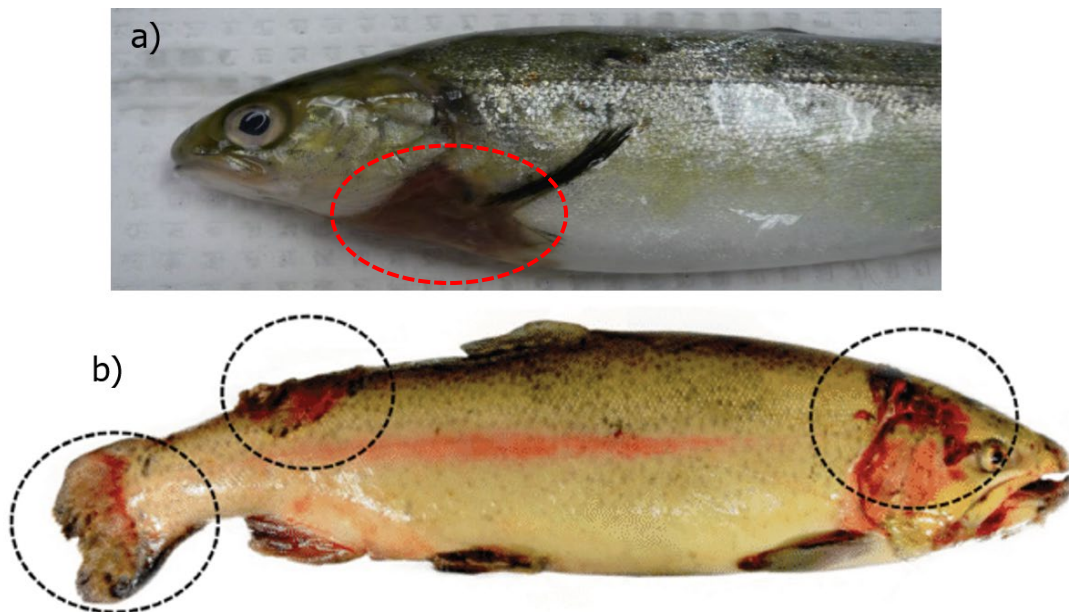
## 2. Teorijski dio

### 2.1. Vodene plijesni (Oomycota)

Vodne plijesni (Oomycota) su eukariotski mikroorganizmi patogenog ili saprofitskog načina života. Tradicionalno su zbog nekih značajki poput hranjenja apsorbacijom i tvorbe micelija, klasificirani u carstvo gljiva. Međutim, suvremene molekularne i biokemijske analize ukazuju na to da su srodnije smeđim algama (heterokontima) iz skupine Stramenopila (Torto-Alalibo i sur., 2005; Kamoun, 2003) te se danas svrstavaju u tu skupinu unutar carstva Chromista, zajedno s dijatomejama i algama (Songe, 2015).

Patogene vodene plijesni imaju sposobnost inficiranja mnogih biljnih i životinjskih domaćina te uzrokuju brojne gospodarski važne bolesti (Earle i Hintz, 2014). Nekoliko patogenih vodenih plijesni odgovorno je za masovno uništavanje populacija domaćina u prirodi, kao i velike gubitke u poljoprivredi i akvakulturi (Phillips i sur., 2008). Oomicetni patogeni životinja pripadaju redu Saprolegniales te uzrokuju infekcije riba, ribljih jaja, vodozemaca i rakova te imaju veliki negativan utjecaj na slatkovodne ekosustave (Lone i Manohar, 2018). Unutar reda Saprolegniales nalaze se tri glavna roda: *Saprolegnia*, *Achlya* i *Aphanomyces*.

Pripadnici roda *Saprolegnia* uzrokuju saprolegniozu, bolest koju karakteriziraju vidljive bijele ili sive mrlje vlaknastog micelija na tijelu ili perajama slatkovodnih riba (slika 1). Među njima, vrsta *Saprolegnia parasitica* je ekonomski jedan od važnijih patogena salmonidnih riba, poput lososa i pastrva te uzrokuje desetke milijuna dolara gubitka u akvakulturi u cijelom svijetu, osobito u Škotskoj, Skandinaviji, Čileu, Japanu, Kanadi i SAD-u (Songe, 2015; Torto-Alalibo i sur., 2005). Ovaj patogeni mikroorganizam uzrokuje primarne infekcije na jajima i na odraslim ribama, osobito na mjestima gdje je koža već ozlijeđena (Shin i sur., 2017).



**Slika 1.** Juvenilni losos (a) (preuzeto iz Earle i Hintz, 2014) i kalifornijska pastrva (*Oncorhynchus mykiss*) (b) (preuzeto iz Shin i sur., 2017) inficirana vrstom *Saprolegnia parasitica*. Mjesta infekcije i krvarenja su označena

Rodu *Aphanomyces* pripadaju paraziti životinja, poput vrsta *Aphanomyces astaci*, *Aphanomyces invadans* te *Aphanomyces piscicida* (Diéguez-Uribeondo i sur., 2009), ali i nekih biljaka, poput *A. euteiches* (Parikh i sur., 2021). Patogeni mikroorganizam *A. astaci* obligatni je parazit rakova i uzročnik račje kuge, smrtonosne bolesti europskih vrsta slatkovodnih rakova. Jedan od simptoma bolesti je pojava melaniziranih mrlja na kutikuli (slika 2). Glavni prijenosnici patogena su invazivne sjeverno-američke vrste rakova koje su ko-evoluirale s patogenom te je njihovom introdukcijom patogen *A. astaci* dospio u Europu (Maguire i sur., 2016; Makkonen i sur., 2012; Phillips i sur., 2008). Novijim istraživanjima rasprostranjenosti ovog patogena u populaciji slatkovodnih rakova u Hrvatskoj dokazano je da je *A. astaci* prisutan kod svih testiranih zavičajnih vrsta (*Astacus astacus*, *Pontastacus leptodactylus*, *Austropotamobius pallipes*, *A. torrentium*) i neautohtonih američkih vrsta (*Pacifastacus leniusculus*) koje nastanjuju hrvatske slatke vode (Pavić i sur., 2021; Pavić i sur., 2020; Maguire i sur., 2016).

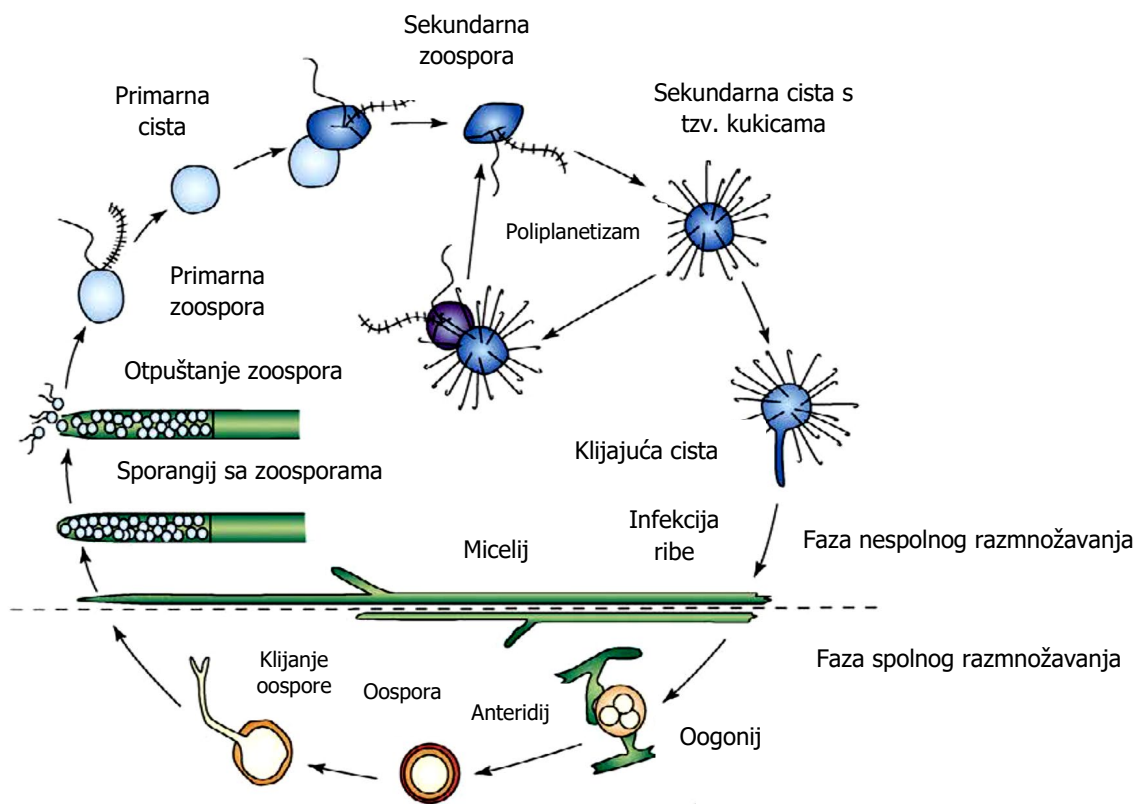




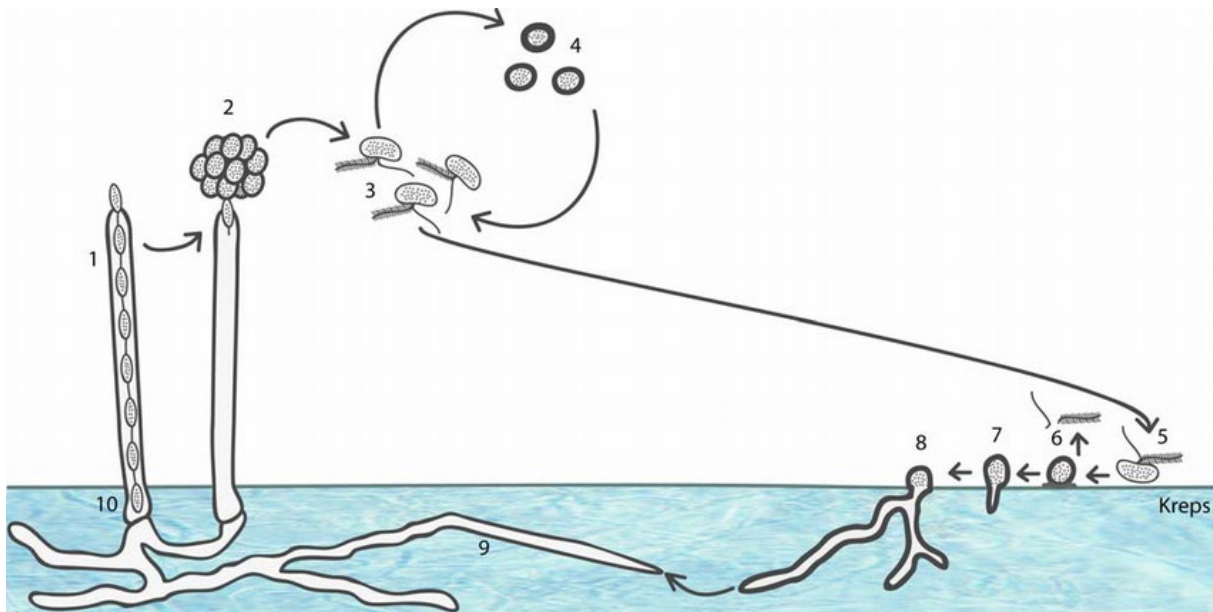
**Slika 2.** Melanizirane mrlje na karapaksu (a) i na trbušnoj kutikuli (b) raka kao posljedica imunog odgovora jedinke na infekciju patogenom *A. astaci* (Vrålstad i sur., 2011)

Vodne plijesni imaju specifičan životni ciklus u kojem zoospore predstavljaju infektivni stadij. Životni ciklus vrste *S. parasitica* prikazan je na slici 3, a uključuje nespolno i spolno razmnožavanje, dok je životni ciklus vrste *A. astaci*, za koju je poznato samo nespolno razmnožavanje (Diéguez-Uribeondo i sur., 2009), prikazan na slici 4. Vrsta *S. parasitica* je homotalična, što znači da ista jedinka sadrži i muške i ženske spolne organe (Songe, 2015). Faza spolnog razmnožavanja započinje nastankom muškog (anteridij) i ženskog (oogonij) haploidnog gametangija. Spajanjem anteridija i oogonija dolazi do oplodnje te nastaje zigota koja se naziva oospora. Morfološki različita od zoospore, oospora je okružena debljom stijenkom koja ju štiti od nepogodnih vanjskih uvjeta, poput suše ili ekstremnih temperatura. Nespolna faza životnog ciklusa patogena *A. astaci* i *S. parasitica*, uključujući tvorbu sporangija i zoospora, odgovorna je za razvoj bolesti kod podložnog domaćina (Lone i Manohar, 2018; Torto-Alalibo i sur., 2005). Zoospore se oslobađaju iz strukture sporangija koja nastaje u specijaliziranoj hifi, sporangioforu. Sporulaciju mogu potaknuti nedostatak hranjivih tvari ili nagli pad temperature (Van den Berg i sur., 2013). Zoospore se pokreću pomoću dva biča (biflagelatne zoospore) i to im omogućuje pronalaženje odgovarajućeg domaćina. Primarne zoospore su kratko aktivne te se ubrzo pretvore u primarnu cistu. Klijanjem primarne ciste nastaju sekundarne zoospore koje mogu ostati pokretne i do nekoliko dana te se smatraju glavnim infektivnim stadijem vrsta *S. parasitica* i *A. astaci*. Ako sekundarna zoospora kemotaksijom nađe odgovarajućeg domaćina pretvara se u sekundarnu cistu koja proklije i prodire u tkivo. Do takvih prodora hifa (slike 4-8), primjerice kod vrste *A. astaci* dolazi na oštećenim dijelovima kutikule raka ili na mekim područjima, poput zglobova i abdominalnog

dijela kutikule (Phillips i sur., 2008; Unestam i Weiss, 1970). Kod vrste *S. parasitica* najčešće se inficiraju kožne lezije (Shin i sur., 2017). Sekundarne ciste vrste *A. astaci* i nekih vrsta roda *Saprolegnia* (uključujući *S. parasitica*) mogu osloboditi nove sekundarne zoospore (Diéguez-Uribeondo i sur., 1994; Cerenius i Söderhäll, 1984). Takvo ponavljanje tvorbe cista i oslobađanja zoospore naziva se poliplanetizam, a kod vrste *A. astaci* može se ponoviti tri puta. Poliplanetizam povećava vjerojatnost pronalaska odgovarajućeg domaćina i na taj način doprinosi patogenosti vodenih plijesni (Songe, 2015; Phillips i sur., 2008; van West, 2006).



**Slika 3.** Životni ciklus vrste *Saprolegnia parasitica* (Lone i Manohar, 2018)



**Slika 4.** Životni ciklus vrste *Aphanomyces astaci*. Sporangij (1) proizvodi plivajuće biflagelatne zoospore (2, 3) koje se nakon nekoliko dana pretvore u ciste (4), a one ponovo u zoospore (pojava poliplanetizma). Ako zoospore kemotaksijom pronadu pogodnog domaćina (5) prelaze u oblik ciste (6), klijaju (7) te hife prodiru kroz kutikulu raka (8). Micelij se širi u organizmu domaćina (9) dok konačno ne dođe do smrti raka, te se ponovo formiraju sporangiji (10) (Vrålstad i sur., 2011)

## 2.2. Metode kontrole oomicetnih bolesti u akvakulturi

### 2.2.1. Tradicionalne metode kontrole

Metode koje se danas koriste za kontrolu oomicetnih bolesti u slatkovodnoj akvakulturi temelje se na uporabi kemikalija štetnih za čovjeka, životinje i okoliš. U prošlosti je najučinkovitije sredstvo bilo malahitno zelenilo (Shin i sur., 2017). Međutim, zbog kancerogenih i toksičnih učinaka, njegova je uporaba danas zabranjena u mnogim zemljama, uključujući EU i SAD, što je rezultiralo povećanjem incidencije oomicetnih bolesti (Torto-Alalibo i sur., 2005). Umjesto malahitnog zelenila, ostale raspoložive opcije su formalin, hitozan, bronopol, kalijev permanganat, bakrov sulfat, peroctena kiselina, UV zračenje te ozon (Lone i Manohar, 2018; Jussila i sur., 2014; Cui i sur., 2011). Primjerice, pokazano je da formalin smanjuje smrtnost kalifornijske pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) uzrokovanu patogenom *S. parasitica* (Giesecker i sur., 2006). No, s druge strane, on negativno utječe na zdravlje radnika koji njime rukuju u uzgajalištima riba kao i na zdravlje potrošača jer se ostaci formalina mogu detektirati u ribi (Wooster i sur., 2005). Nadalje, i druge kemikalije koje se trenutno koriste, poput bronopola, bakrova sulfata i peroctene kiseline, također nisu održiva rješenja i

predstavljaju ozbiljnu prijetnju vodenoj bioti (Jacob i sur., 2016; Cui i sur., 2011; Norliana i sur., 2009). Primjerice, koncentracije peroctene kiseline koje su učinkovite protiv patogena *A. astaci* mogu biti otrovne za vodene organizme (Jussila i sur., 2014).

### **2.2.2. Razvoj ekološki prihvatljivih metoda kontrole**

S obzirom na gore navedeno sve više se istražuje mogućnost primjene prirodnih, netoksičnih sredstava, poput eteričnih ulja i biljnih ekstrakata, u kontroli oomicetnih patogena. Takva ekološki prihvatljiva sredstva bi trebala biti učinkovita protiv patogena, ali i sigurna za ljude, odnosno potrošače, životinje i okoliš. Mnoga istraživanja pokazala su da alkoholni ekstrakti (Tandel i sur., 2021; Pagliarulo i sur., 2018; Afzali i Wong, 2017; Borisutpeth i sur., 2014; Borisutpeth i sur., 2009; Campbell i sur., 2001) i eterična ulja (Miljanović i sur., 2021; Nardoni i sur., 2019; Hoskonen i sur., 2015; Madrid i sur., 2015; Metin i sur., 2015; Saleh i sur., 2015; Gormez i Diler, 2014; Caruana i sur., 2012; Khosravi i sur., 2012; Pirbalouti i sur., 2009) odabranih biljaka mogu *in vitro* inhibirati oomicetne patogene, pri čemu su eterična ulja pokazala snažniji učinak od alkoholnih ekstrakata (Pirbalouti i sur., 2009). Primjerice, za biljke iz obitelji Lauraceae i Lamiaceae, poput vrsta *Salvia officinalis*, *Thymbra spicata* i *Cinnamomum zeylanicum*, dokazana je inhibicija oomicetnih patogena slatkovodnih životinja, uključujući vrste iz roda *Saprolegnia* i *Aphanomyces* (Miljanović i sur., 2021., Parikh i sur., 2021; Nardoni i sur., 2019; Metin i sur., 2015; Gormez i Diler, 2014; Khosravi i sur., 2012; Pirbalouti i sur., 2009; Campbell i sur., 2001). Shin i suradnici (2017) pokazali su da lawsone (2-hidroksi-1,4-naftokinon), glavna komponenta u ekstraktu kane (*Lawsonia inermis*), može promijeniti propusnost membrane micelija te uzrokovati raspad stanične membrane vrste *S. parasitica*, što je ukazalo na njegov potencijal u suzbijanju saprolegnioze. Osim eteričnih ulja i biljnih ekstrakata, propolis je također ekološki prihvatljiv pripravak koji bi mogao postati i prikladno antioomicetno sredstvo s obzirom na ranije pokazana antimikrobna i antifungalna svojstva.

### 2.3. Propolis

Propolis je viskozna i smolasta mješavina tvari intenzivnog mirisa, a može biti žute, smeđe ili gotovo crne boje, ovisno o biljnom podrijetlu (Sawicka i sur., 2012). Pčele proizvode propolis na način da sakupljaju biljne izlučevine, uključujući sluzi, gume, smole i tekućine, koje zatim žvačući, miješaju s enzimima iz sline te na kraju s pčelinjim voskom. Propolis je poznat i kao pčelinje ljepilo s obzirom da ga pčele koriste za popunjavanje šupljina i pukotina u zidovima košnica te kao toplinski izolator. Propolis pčelama koristi i u obrani od kukaca i patogenih mikroorganizama poput bakterija i gljivica (Przybyłek i Karpinski, 2019; De la Cruz-Cervantes i sur., 2018).

Kemijski sastav propolisa nije konstantan, nego se mijenja ovisno o vegetaciji, zemljopisnom i ekološkom području te vremenu i načinu sakupljanja (Bankova i sur., 2014). Najčešće se sastoji od 45 – 55 % biljnih balzama i smole (flavonoidi, uključujući flavonole, flavone i flavanone, te fenolne kiseline i esteri), 8 – 35 % voska (uglavnom pčelinji vosak), 5 – 10 % eteričnih ulja i aromatičnih tvari (primjerice pinen, eudesmol, viridiflorol, trikozan), 5 % masnih kiselina (uglavnom iz voska), 5 % peludi i 5 % drugih organskih spojeva (ketoni, laktoni, kinoni, steroidi, šećeri) i minerala, od kojih su najzastupljeniji željezo i cink (De la Cruz-Cervantes i sur., 2018).

Mnoga istraživanja pokazala su da propolis ima antibakterijska, antifungalna, antivirusna, antioksidativna, antikancerogena, protuupalna te imuno-stimulativna svojstva (Soltani i sur., 2020; Przybyłek i Karpinski, 2019; Simoni i sur., 2018; Sawicka i sur., 2012; Schnitzler i sur., 2009; Kumazawa i sur., 2004; Bankova i sur., 1983). Primjerice, istraživanja su pokazala bakteriostatski i baktericidni utjecaj propolisa na Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterijske patogene riba, poput vrsta *Bacillus subtilis*, *Vibrio anguillarum* i *Vibrio harveyi*, s tim da je inhibicijski učinak propolisa bio snažniji prema Gram-pozitivnim nego prema Gram-negativnim bakterijama (Soltani i sur., 2020; Przybyłek i Karpinski, 2019). Antimikrobno djelovanje propolisa temelji se na njegovom kemijskom sastavu te je za neke komponente propolisa, poput kafeinske kiseline, kvercetina i naringenina, pokazano da utječu na propusnost membrane te inhibiraju pokretljivost bakterija. Međutim, smatra se da niti jedna komponenta propolisa nema snažnije antimikrobno djelovanje od ukupnog ekstrakta, što upućuje na sinergijsko djelovanje niza komponenti prisutnih u propolisu (De la Cruz-Cervantes i sur., 2018).

## 2.4. Antioomicetno djelovanje propolisa

Unatoč poznatim antimikrobnim svojstvima propolisa opisanim u prethodnom poglavlju, istraživanja koja pokazuju njegovo inhibicijsko djelovanje prema patogenima iz skupine vodenih plijesni su malobrojna, a djelovanje propolisa na oomicetne uzročnike bolesti slatkovodnih životinja je slabo istraženo. Većina postojećih istraživanja je fokusirana na biljne patogene oomicete, te je tako demonstrirano njegovo inhibicijsko djelovanje na vrstama iz roda *Phytophthora* (*P. infestans*, *P. parasitica*, *P. capsici*, *P. alni*, *P. plurivora* i *P. cactorum*) te na nekoliko vrsta iz roda *Pythium* (*P. aphanidermatum* i *P. insidiosum*) (Pazin i sur., 2019; Jurčević, 2018; Silva-Castro i sur., 2018; Yusuf i sur., 2005). Jedno istraživanje je pokazalo da propolis u smjesi s drugim komponentama, poput oligomera hitozana, može učinkovito inhibirati rast biljnih patogena *P. alni* i *P. plurivora* (Silva-Castro i sur., 2018). Nadalje, većina istraživanja je demonstrirala inhibicijsku aktivnost propolisa prema rastu micelija patogenih vodenih plijesni (Iveljić, 2019; Pazin i sur., 2019; Jurčević, 2018; Araújo i sur., 2016), dok je njegov učinak na zoospore, kao glavni infektivni stadij životnog ciklusa, gotovo u potpunosti neistražen (Mašek i sur., 2018; Araújo i sur., 2016; Campbell i sur., 2001). Antioomicetno djelovanje propolisa prema vodenim plijesnima iz rodova *Saprolegnia* i *Aphanomyces* izrazito je slabo istraženo. Jurčević (2018) je demonstrirala inhibicijsko djelovanje etanolnih ekstrakata propolisa prema životinjskim i biljnim oomicetnim patogenima (*A. astaci*, *P. cactorum*, *P. plurivora*) te je najjači inhibicijski učinak propolisa postignut kod patogena rakova *A. astaci*. Slično istraživanje provedeno je na patogenoj vodenoj plijesni *S. parasitica* u kojem su oba testirana pripravka propolisa inhibirala rast micelija patogena (Iveljić, 2019). Osim na rast micelija patogenih vodenih plijesni, Campbell i suradnici (2001) istražili su inhibicijski učinak propolisa na zoospore. Pokazali su da propolis u koncentraciji  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  može u potpunosti inhibirati pokretljivost zoospora patogena *Aphanomyces invadans*.

### 3. Materijali i metode

#### 3.1. Pripravci propolisa

U radu su korištena dva tekuća pripravka propolisa (PIP d.o.o.): pripravak 1, P1 (200 mg suhe tvari propolisa mL<sup>-1</sup>) i pripravak 2, P2 (250 mg suhe tvari propolisa mL<sup>-1</sup>, 250 mg mL<sup>-1</sup> ekstrakta kadulje, *Salvia officinalis*, te 190 mg mL<sup>-1</sup> ekstrakta paprene metvice, *Mentha piperita*). Pripravci propolisa otopljeni su u mješavini etanola i deionizirane vode (1:1).

Fenolni sastav tekućih pripravaka propolisa određen je vezanim sustavom tekućinske kromatografije ultravisoke učinkovitosti i dvojne masene spektrometrije (eng. *ultra performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry*, UPLC/MS-MS) u Laboratoriju za procese sušenja i praćenje stabilnosti biološki aktivnih spojeva Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta (tablica 1). Dominantan spoj koji je prisutan u najvećoj koncentraciji kod oba pripravka je flavon krizin (734 µg mL<sup>-1</sup> u P1, 838 µg mL<sup>-1</sup> u P2), zatim flavon apigenin (183 µg mL<sup>-1</sup> u P1, 120 µg mL<sup>-1</sup> u P2) i flavanon pinocembrin (35 µg mL<sup>-1</sup> u P1, 16 µg mL<sup>-1</sup> u P2). Stoga je u ovom radu, osim testiranja djelovanja pripravaka propolisa na klijavost zoospora patogenih oomiceta, testirano i djelovanje krizina (kao dominantnog predstavnika flavona u testiranim uzorcima propolisa) i pinocembrina (kao dominantnog predstavnika flavanona).

**Tablica 1.** Sastav pripravaka propolisa P1 i P2 određen vezanim sustavom tekućinske kromatografije ultravisoke učinkovitosti i dvojne masene spektrometrije

	<b>masena koncentracija <math>\gamma</math> (<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>
Flavonoli	Rutin	2,19	1,84
	Kaempferol-3-rutinozid	0,00	2,96
	Kvercetin-3-glukozid	0,00	0,45
	Kaempferol-3-glukozid	0,00	11,44
	Kvercetin-dimetileter	0,19	0,34
	Izorhamnetin	0,24	0,40
	Ramnetin	1,22	0,77
	Galangin	6,96	7,00
	Ukupno	10,80	25,20
Flavoni	Apigenin	182,593	119,528
	Krizin	734,27	838,38
	Luteolin	30,10	19,11
	Ukupno	946,97	977,01
Flavanoni	Sakuranetin	0,48	0,00
	Naringenin	1,77	1,09
	Pinocembrin	34,74	15,78
	Pinobanksin	0,26	0,11
	Ukupno	37,25	16,98
<b>Flavonoidi</b>	<b>Ukupno</b>	<b>995,02</b>	<b>1019,20</b>
<b>Fenolne kiseline i derivati</b>	Ferulinska kiselina	23,08	39,89
	Izoferulinska kiselina	24,82	49,90
	Kafeinska kiselina	5,41	4,75
	p-kumarna kiselina	27,31	43,20
	Cimetna kiselina	30,44	58,20
	Fenetil ester kafeinske kiseline (CAPE)	2,30	2,95
	p-hidroksibenzojeva kiselina (p-HBA)	2,32	2,49
	<b>Ukupno</b>	<b>115,69</b>	<b>201,39</b>
<b>Drugi spojevi</b>	Vanilin	39,15	22,44



### 3.2. Uzgoj mikroorganizama

U istraživanju su korištena dva patogena mikroorganizma iz skupine Oomycetes: *Aphanomyces astaci* (Schikora, 1906) soj B, Psl – genotip (izolat PEC 8) (osigurao F. Grandjean iz Sveučilišta u Poitiersu, Francuska) i *Saprolegnia parasitica* CBS 223,65 (osigurala R. Galuppi, Sveučilište u Bologni, Italija). Mikroorganizmi su uzgajani u laboratoriju pri 18 °C na krutoj hranjivoj podlozi PG1 (Unestam, 1965).

#### Priprema krute hranjive podloge PG1

Priprema hranjive podloge PG1 (Unestam, 1965) sastoji se od zasebne pripreme pet različitih otopina, njihove sterilizacije te potom miješanja u točno određenim volumenima prema zadanom redoslijedu.

Otopina 1 sadrži 3 g Bacto-peptona (Biolife, Italia) otopljenog u 100 mL destilirane vode.

Otopina 2 sadrži 6 g D (+) glukoza-monohidrata (Kemika, Hrvatska) otopljenog u 100 mL destilirane vode.

Otopina 3 sadrži:

- 1,70 g  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  (Gram-mol, Hrvatska)
- 1,45 g  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  (Gram-mol, Hrvatska)
- 0,20 g  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  (Sigma Aldrich, Njemačka)
- 3,70 g KCl (Kemika, Hrvatska)
- 0,55 g dinatrijeve soli etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA) (Sigma Aldrich, Njemačka)

otopljenih u 1000 mL destilirane vode.

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

- 611 mL sterilne otopine A: 0,067 M ( $9,5 \text{ g L}^{-1}$ )  $Na_2HPO_4$  (Kemika, Hrvatska)
- 389 mL sterilne otopine B: 0,067 M ( $9,2 \text{ g L}^{-1}$ )  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  (Gram-mol, Hrvatska)

Otopina 5 sadrži 12 g agara (Liofilchem, Italy ) otopljenog u 600 mL vode.

Također se pripreme otopine antibiotika ampicilina i oksolonične kiseline, i to na način da se otopi 500 mg ampicilin-natrijeve soli (Sigma Aldrich, Njemačka) u 25 mL deionizirane vode te 500 mg oksolonične kiseline (Sigma Aldrich, Njemačka) u 2,5 mL 1 M NaOH i razrijedi s 25 mL deionizirane vode.

Svih pet otopina potrebno je zasebno autoklavirati pri temperaturi 121 °C kroz 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 otopine 1 i otopine 2 te se na kraju doda po 500 µL pripremljenih antibiotika. Dobivena otopina se sterilno ulije u Petrijeve zdjelice. U postupku pripreme tekuće hranjive podloge PG1 umjesto 600 mL otopine 5 dodaje se 600 mL sterilne deionizirane vode.

### **3.3. Indukcija sporulacije u laboratorijskim uvjetima**

Kod obje vrste vodenih plijesni, sporulacija je inducirana ispiranjem micelija sterilnom potočnom vodom (Makkonen i sur., 2012; Diéguez-Uribeondo i sur., 1994).

U postupku sporulacije patogena *S. parasitica* se kružić agara (d = 5 mm), uzet s ruba hranjive podloge koja je obrasla micelijem, stavi u 25 mL tekućeg PG1 medija u Petrijevu zdjelicu (d = 90 mm). Nakon inkubacije pri 18 °C kroz 36 h u inkubatoru (Eppendorf™ Innova™ 42, Njemačka), micelij se odvoji iz PG1 medija sterilnom pincetom te se tri puta ispere sa po 2 mL autoklavirane potočne vode (Vrapčanski potok i slap Sopot, Medvednica) pomoću sterilne Pasteurove pipete te ostavi 24 h u 20 mL autoklavirane vode za ispiranje pri 18 °C (dok se ne oslobode zoospore).

U postupku sporulacije vrste *A. astaci* po jedan kružić agara (d = 5mm), uzet s ruba hranjive podloge s aktivno rastućim micelijem patogena, stavi se u 12 sterilnih Erlenmeyerovih tikvica (volumena 300 mL) s po 45 mL tekućeg PG1 medija te inkubira četiri dana pri 18 °C u inkubatoru (Eppendorf™ Innova™ 42, Njemačka). Potom se porasli micelij prebaci u 200 mL autoklavirane potočne vode (Vrapčanski potok i slap Sopot, Medvednica) u Erlenmeyerovoj tikvici (300 mL) te ispire uz potresanje na linearnoj tresilici (Phoenix Instrument, RS – LS 5, Njemačka) pri 18 °C kroz 45 min. Ovaj postupak ispiranja autoklaviranom potočnom vodom se ponavlja još dva puta, da bi se u četvrtoj vodi za ispiranje micelij ostavio 20 h, do oslobađanja zoospora.

Nakon završetka protokola sporulacije oba patogena, micelij se ukloni procjeđivanjem kroz sterilni lijevak s gazom, a u vodi se određuje prosječan broj oslobođenih zoospora brojanjem u Thoma-inoj komorici na svjetlosnom mikroskopu (Zeiss Primo Star, Kina) pri povećanju 100 x. Procijenjena konačna koncentracija zoospora za vrstu *A. astaci* bila je oko 100 000 zoospora mL<sup>-1</sup>, a za vrstu *S. parasitica* oko 80 000 zoospora mL<sup>-1</sup>.

### **3.4. *In vitro* testiranje inhibicijskog učinka propolisa na klijavost zoospora patogenih oomiceta *Aphanomyces astaci* i *Saprolegnia parasitica***

Inhibicijski učinak uzoraka propolisa i odabranih čistih spojeva na klijavost i pokretljivost zoospora vodenih plijesni *A. astaci* i *S. parasitica* testiran je u mikropločama s 12 jažica (engl. *12-well plates*). Za svaki uzorak testirano je do šest dvostrukih razrjeđenja, s početnim koncentracijama od 124,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  za uzorak P1, 155,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  za uzorak P2, 10,2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  za krizin, 2,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  za pinocembrin i 0,3  $\mu\text{g mL}^{-1}$  za malahitno zelenilo (eng. *malachite green*, MG). Za uzorke P1 i P2 te za pinocembrin kao negativna kontrola korišten je etanol, za krizin otopina 0,1 M NaOH, a za malahitno zelenilo  $\text{dH}_2\text{O}$ .

Za indukciju klijanja zoospora *A. astaci*, u svaku jažicu dodano je 2 mL potlačne vode s dodatkom  $\text{CaCl}_2$  (11,1  $\text{g L}^{-1}$ ), 20  $\mu\text{L}$  testiranog uzorka (P1, P2, krizin, pinocembrin, malahitno zelenilo) ili negativne kontrole ( $\text{dH}_2\text{O}$ , 0,1 M NaOH, EtOH) te 2 mL vode sa zoosporama. Nakon toga je slijedila inkubacija u trajanju od 16 h pri sobnoj temperaturi te mikroskopiranje/fotografiranje klijavući cista na inverznom mikroskopu (Carl Zeiss, Njemačka) pri povećanju 200 x.

Voda sa zoosporama vrste *S. parasitica* vorteksirana je 45 s kako bi se sve zoospore pretvorile u nepokretne ciste. Zatim, je u svaku jažicu dodano 2 mL svježeg PG1 medija, 20  $\mu\text{L}$  testiranog uzorka (P1, P2, krizin, pinocembrin, malahitno zelenilo), odnosno negativne kontrole, te 2 mL vode s cistama. Nakon inkubacije u trajanju od 1h pri 18 °C klijavuće ciste fotografirane su na inverznom mikroskopu.

Za svaku vrstu i svako razrjeđenje testiranog spoja napravljene su tri replike. Postotak neprokljalih cista (odnosno postotak inhibicije klijavosti) određen je brojeći sve ciste i klice u tri nasumično odabrana vidna polja. Prokljalom je smatrana ona cista čija je klica bila duža od promjera ciste. Zatim je u programu GraphPad Prism 9.1.1 određena vrijednost  $\text{EC}_{50}$ , odnosno minimalna koncentracija testiranog spoja pri kojoj se postiže 50 %-tna inhibicija klijavosti zoospora i to tako da su koncentracije uzoraka logaritmirane te je provedena nelinearna regresija s uklapanjem krivulje. Postotci klijavosti u jažicama negativnih kontrola u koje su dodana otapala umjesto uzoraka bili su u skladu s prethodno objavljenim podacima (Diéguez-Uribeondo i sur., 1994; Häll i Unestam, 1980; Svensson i Unestam, 1975).


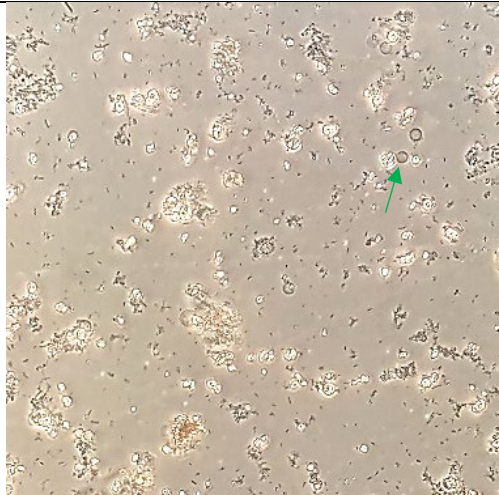
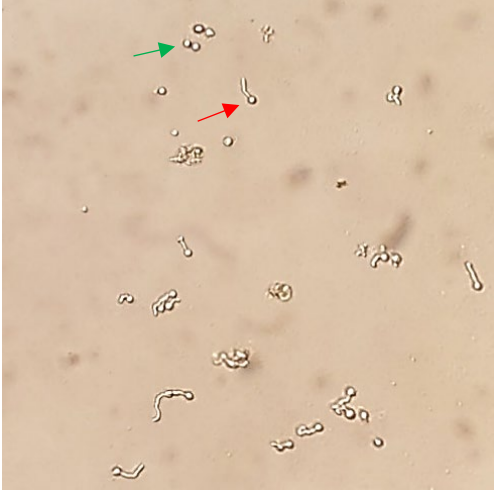
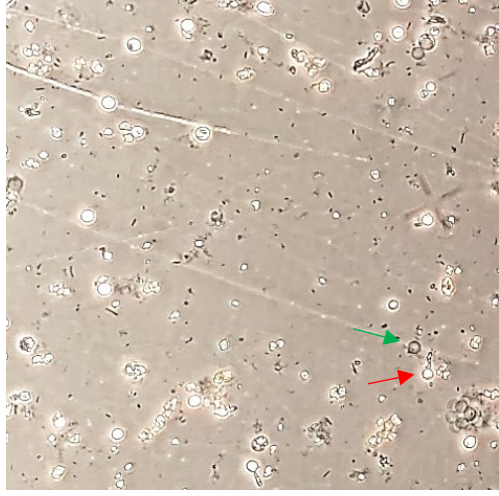

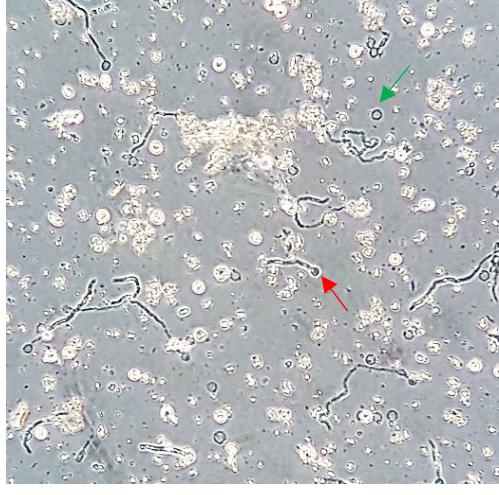
## 4. Rezultati

U ovom je radu prvi put testiran inhibicijski učinak propolisa te pinocembrina i krizina na klijavost zoospora patogenih vodenih plijesni *A. astaci* i *S. parasitica*. Rezultati prikazani u tablicama 2-4 te na slici 5 pokazali su da oba pripravka propolisa imaju inhibicijski učinak na klijavost zoospora obje vrste patogena.

EC<sub>50</sub> vrijednosti određene su za uzorke propolisa P1 i P2 te za malahitno zelenilo kod obje vrste vodenih plijesni i za krizin kod vrste *S. parasitica*. Za pinocembrin nije bilo moguće izračunati EC<sub>50</sub> ni kod patogena *A. astaci* ni kod patogena *S. parasitica* jer ni kod najviše testirane koncentracije (2,5 µg mL<sup>-1</sup>) nije postignuta 100 %-tna inhibicija klijavosti zoospora, već je postotak klijavosti iznosio 38,8 % kod *A. astaci* odnosno 65,3 % kod *S. parasitica* u odnosu na ukupan broj cista (tablice 3 i 4). Isto tako, najviša testirana koncentracija krizina (10,2 µg mL<sup>-1</sup>) nije uzrokovala 100 %-tnu inhibiciju klijavosti zoospora kod vrste *A. astaci*, već je postotak klijavost iznosio 47,1 % (tablica 4).

Inhibicija klijavosti obje vrste patogena uzorcima propolisa (P1 i P2) bila je usporediva. EC<sub>50</sub> vrijednosti uzoraka P1 i P2 iznosile su 24 µg mL<sup>-1</sup> i 19 µg mL<sup>-1</sup> za vrstu *S. parasitica* te 15 µg mL<sup>-1</sup> i 20 µg mL<sup>-1</sup> za vrstu *A. astaci*. Za razliku od uzoraka propolisa, malahitno zelenilo, kao poznati inhibitor oomiceta (Shin i sur., 2017) pokazao je tri reda veći učinak: EC<sub>50</sub> vrijednosti su iznosile 0,02 za vrstu *A. astaci* i 0,03 za vrstu *S. parasitica*. Od testiranih komponenti propolisa, krizin je imao jači učinak od pinocembrina koji nije pokazao gotovo nikakav inhibicijski učinak. Također, krizin je nešto jače inhibirao klijavost zoospora patogena *S. parasitica* u odnosu na patogen *A. astaci*. EC<sub>50</sub> vrijednost krizina za klijavost zoospora vrste *S. parasitica* iznosila je 3,1 µg mL<sup>-1</sup>.

**Tablica 2.** Klijavost zoospora patogeno *S. parasitica* i *A. astaci* u prisutnosti pripravka propolisa P1. Zelenom strelicom su označene neproklijale, a crvenom proklijale ciste

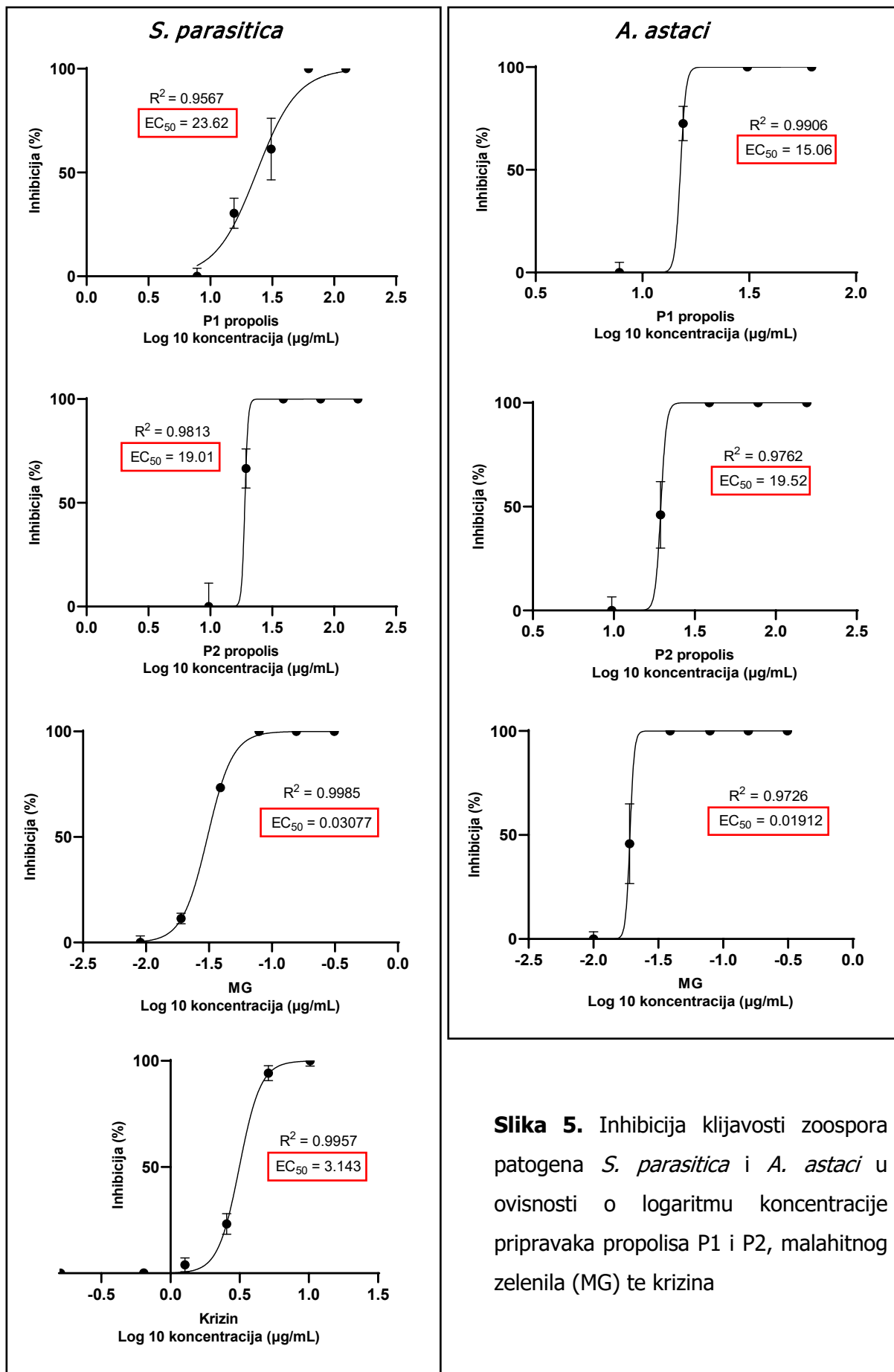
uzorak	Mikroorganizam	
	<i>S. parasitica</i>	<i>A. astaci</i>
P1 - kompletna inhibicija		
P1 - djelomična inhibicija		
etanol (negativna kontrola)		

**Tablica 3.** Postotak inhibicije klijavosti zoospora *S. parasitica* pri različitim koncentracijama pripravaka propolisa P1 i P2, malahitnog zelenila, krizina i pinocembrina

	$\gamma$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	$\log\gamma$	Inhibicija (%)		
			Replika 1	Replika 2	Replika 3
<b>P1</b>	124	2,09342	100	100	100
	62	1,79239	100	100	100
	31	1,49136	83,3	66,7	61,7
	15,5	1,19033	50,3	40,7	50,3
	7,8	0,89209	27,3	23	21,7
<b>P2</b>	155,5	2,19173	100	100	100
	77,7	1,89042	100	100	100
	38,9	1,58995	100	100	100
	19,4	1,28780	83	69,5	73
	9,7	0,98677	19,7	35,3	22,3
<b>MG</b>	0,3125	-0,50515	100	100	100
	0,156	-0,806875	100	100	100
	0,079	-1,102373	100	100	100
	0,039	-1,408935	75	77,5	74
	0,019	-1,721246	21	16,5	18
	0,009	-2,045757	11,2	7,5	5,5
<b>Krizin</b>	10,20	1,00860	99,7	96,3	95,3
	5,10	0,70714	95	88,3	91,5
	2,55	0,40603	29,7	21	23,2
	1,27	0,10380	6,3	9,7	3,5
	0,64	-0,19382	2	2	4,5
	0,16	-0,79588	3,2	2,5	2,5
<b>Pinocembrin</b>	2,5	0,39794	38,3	36,7	29,2
	1,3	0,11394	17	14,3	15,7
	0,6	-0,22185	12	9,3	-
	0,3	-0,52288	4,7	6,3	-

**Tablica 4.** Postotak inhibicije klijavosti zoospora vrste *A. astaci* pri različitim koncentracijama pripravaka propolisa P1 i P2, malahitnog zelenila, krizina i pinocembrina

	$\gamma$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	$\log\gamma$	Inhibicija %		
			Replika 1	Replika 2	Replika 3
<b>P1</b>	62	1,79239	100	100	100
	31	1,49136	100	100	100
	15,5	1,19033	95,4	95,5	97,5
	7,8	0,89209	86,4	85,1	86,2
<b>P2</b>	155,5	2,19173	100	100	100
	77,7	1,89042	100	100	100
	38,9	1,58995	100	100	100
	19,4	1,28780	72,3	79,3	62,4
	9,7	0,98677	45	44,7	50,9
<b>MG</b>	0,3125	-0,50515	100	100	100
	0,156	-0,80688	100	100	100
	0,079	-1,10237	100	100	100
	0,039	-1,40894	100	100	100
	0,019	-1,72125	79,9	65,4	57,2
	0,01	-2	42,1	40	38
<b>Krizin</b>	10,2	1,00860	57,4	53,2	48,1
	5,095	0,70714	35,8	37	37,1
	0,6	-0,22185	24	27,6	18,3
<b>Pinocembrin</b>	2,5	0,39794	65,5	69,6	48,6
	1,3	0,11394	56,7	73,7	72,7
	0,6	-0,22185	65,7	69,2	71
	0,3	-0,52288	61,8	67,2	74,7



**Slika 5.** Inhibicija klijavosti zoospora patogeno *S. parasitica* i *A. astaci* u ovisnosti o logaritmu koncentracije pripravaka propolisa P1 i P2, malahitnog zelenila (MG) te krizina



## 5. Rasprava

U ovom je istraživanju prvi put testiran inhibicijski učinak propolisa na klijavost zoospora, kao infektivnog stadija patogena *A. astaci*, uzročnika račje kuge, i *S. parasitica*, važnog patogena u salmonidnoj akvakulturi.

Oba pripravka propolisa su podjednako inhibirala klijanje zoospora obje vrste patogena, s  $EC_{50}$  vrijednostima od oko  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ . S obzirom da je ovo prvo istraživanje inhibicijskog učinka propolisa na klijavost zoospora patogena *A. astaci* i *S. parasitica*, dobivene inhibicijske koncentracije mogu se usporediti s rezultatima ranijih istraživanja koja su pokazala inhibicijski utjecaj propolisa na rast micelija (Jurčević, 2018; Iveljić, 2019) i pokretljivost zoospora vodenih plijesni (Campbell i sur., 2001). Primjerice, koncentracije propolisa koje su uzrokovale inhibiciju rasta micelija patogena *A. astaci* (Jurčević, 2018) i *S. parasitica* (Iveljić, 2019) bile su i do četiri reda veličine više ( $200000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) od  $EC_{50}$  vrijednosti utvrđenih u ovom radu. U skladu s tim, u istraživanju Campbell i suradnika (2001) utvrđeno je da je za potpunu inhibiciju pokretljivosti zoospora potrebna do dva reda veličine niža koncentracija propolisa ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) nego za inhibiciju rasta micelija ( $2500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) vrste *A. invadans*. Slični rezultati dobiveni su i kada je testirana osjetljivost zoospora i micelija oomiceta *S. parasitica* i *A. astaci* na djelovanje eteričnih ulja kadulje, lovora i ružmarina: zoospore su bile 1,2 do 6,5 puta osjetljivije od micelija (Miljanović i sur., 2021). Sve ovo upućuje na to da su zoospore osjetljivije od micelija na djelovanje propolisa i drugih bioaktivnih komponenti porijeklom iz biljaka, što bi se moglo pripisati različitim mehanizmima djelovanja različitih spojeva na zoospore i na micelij, kao i različitim detoksifikacijskim mehanizmima u različitim fazama životnog ciklusa oomiceta. Međutim, da bi se razjasnilo ova pitanja potrebna su daljnja istraživanja, uključujući transkriptomске i proteomске analize.

Nadalje, koncentracije propolisa koje su potpuno inhibirale klijavost zoospora patogena *A. astaci* ( $31 \mu\text{g mL}^{-1}$  za P1 i  $39 \mu\text{g mL}^{-1}$  za P2) bile su tri puta su veće od vrijednosti koje su dobivene za pokretljivost zoospora vrste *A. invadans* u istraživanju Campbell i suradnika (2001). Ovo bi se moglo objasniti time da je vrsta *A. invadans* nešto osjetljivija od vrste *A. astaci* na djelovanje propolisa, međutim moguće je i da su razlike u rezultatima posljedica i različitih korištenih pripravaka propolisa (koji se razlikuju u sastavu, Campbell i sur., 2001). Osim toga, Campbell i suradnici su testirali inhibicijski utjecaj propolisa na pokretljivost, dok je u ovom radu isto demonstrirano na klijavosti zoospora. U budućim bi se istraživanjima trebala sustavno usporediti osjetljivost različitih vrsta i sojeva iz rodova *Aphanomyces* i *Saprolegnia* na različite pripravke propolisa.

Uočena inhibicijska aktivnost propolisa može se pripisati njegovom bogatom sadržaju polifenola i sinergijskoj aktivnosti brojnih bioaktivnih komponenata. U ovom je radu, osim inhibicijskog utjecaja propolisa na klijavost zoospora vodenih plijesni, testiran i utjecaj njegovih dvaju glavnih komponenata, flavona krizina (0,3 % suhe tvari propolisa) i flavanona pinocembrina (0,01 % suhe tvari propolisa). U slučaju pinocembrina maksimalna testirana koncentracija od 2,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  nije uzrokovala gotovo nikakvu inhibiciju klijavosti zoospora patogenih vodenih plijesni *A. astaci* i *S. parasitica*. U usporedbi s tim, Montenegro i suradnici (2019) su pokazali antioomicetnu aktivnost pinocembrina, izoliranog iz smolastog ekstrakta biljke *Escallonia illinita*, kod koncentracija 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (minimalna inhibitorna koncentracija, MIC) prema rastu micelija i kod 150  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (minimalna oomicidna koncentracija, MOC) prema klijanju spora vrsta *S. parasitica* i *S. australis*. Moguće da bi se i u ovom radu postigla bolja inhibicija klijavosti zoospora pinocembrinom da su testirane više koncentracije pinocembrina, međutim one nisu testirane jer se one odnose na koncentraciju pinocembrina u nerazrijeđenom propolisu (15-30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), čija primjena u akvakulturi nije realno izvediva. Za razliku od pinocembrina, krizin je pokazao nešto snažniji inhibicijski učinak. Koncentracija krizina kod koje je u ovom radu u potpunosti inhibirana klijavost zoospora vrste *S. parasitica* (10,2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) bila je za red veličine niža od literaturnih vrijednosti, vjerojatno zbog toga što su zoospore osjetljivije od micelija testiranog u ranijim istraživanjima. Primjerice, u istraživanju Agüero i suradnika (2014) koncentracija krizina kod koje je postignuta 100%-tna inhibicija kvasaca iznosila je 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Nadalje, dobivena  $\text{EC}_{50}$  vrijednost krizina od 3,1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  preniska je da bi objasnila inhibiciju pripravaka propolisa te se može zaključiti da je sinergijski učinak mnogih spojeva prisutnih u propolisu jači od učinka bilo kojeg pojedinačnog spoja (De la Cruz-Cervantes i sur., 2018; Mašek i sur., 2018).

Ovim *in vitro* istraživanjem dokazano je učinkovito djelovanje propolisa na zoospore dvije patogene vrste vodenih plijesni *A. astaci* i *S. parasitica* koje su uzročnici bolesti račje kuge i saprolegnioze te velikih šteta u akvakulturi. Time je ukazano na mogućnost primjene propolisa u akvakulturi u svrhu zaštite rakova i salmonidnih riba od ovih patogena. Ranija istraživanja ukazuju na veliki potencijal propolisa za primjenu u akvakulturnoj industriji s obzirom da kao dodatak prehrani može poboljšati rast, imunosni odgovor te otpornost na bolesti različitih vrsta uzgojenih riba, poput kalifornijske pastrve (Kelestemur i sur., 2012; De la Cruz-Cervantes i sur., 2018). Stoga bi se u nastavku istraživanja trebali provesti *in vivo* pokusi primjene propolisa kao suplementa u prehrani rakova i salmonida te testiranje njegovog učinka na parametre fitnesa životinja, kao i smanjenje smrtnosti od bolesti račje kuge i saprolegnioze.

## 6. Zaključak

Istraživanja kojima je dokazano antioomicetno djelovanje propolisa su malobrojna te je ovim radom prvi puta demonstriran inhibicijski učinak propolisa na klijavost zoospora vrsta *S. parasitica* i *A. astaci*. Istraživanjem je utvrđeno sljedeće:

- Propolis je pokazao snažan inhibicijski učinak na klijavost zoospora vrste *A. astaci* i *S. parasitica* s dobivenim  $EC_{50}$  vrijednostima u rasponu od 15 do 24  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .
- Malahitno zelenilo, kao poznati spoj koji inhibira oomicetne patogene, pokazalo je tri reda veličine snažniji inhibicijski učinak, i podjednako je inhibiralo klijanje zoospora obje vrste ( $EC_{50}$  0,02  $\mu\text{g mL}^{-1}$  za vrstu *A. astaci* i 0,03  $\mu\text{g mL}^{-1}$  za *S. parasitica*).
- Od testiranih komponenti propolisa, krizin je imao jači učinak ( $EC_{50}$  3,1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  za *S. parasitica*) od pinocembrina koji nije pokazao gotovo nikakav inhibicijski učinak te  $EC_{50}$  vrijednosti nisu mogle biti utvrđene.

## 7. Popis literature

- Afzali S. F., Wong W. L. (2017) *In vitro* screening of *Sonneratia alba* extract against the oomycete fish pathogen, *Aphanomyces invadans*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences* **16**: 1333–1340.
- Agüero M. B., Svetaz L., Baroni V., Lima B., Luna L., Zacchino S., Saavedra P., Wunderlin D., Feresin G. E., Tapia A. (2014) Urban propolis from San Juan province (Argentina): Ethnopharmacological uses and antifungal activity against *Candida* and dermatophytes. *Industrial Crops and Products* **57**: 166-173.
- 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.
- Bankova V. S., Popov S. S., Marekov N. L. (1983) A Study on Flavonoids of Propolis. *Journal of Natural Products* **46**: 471–474.
- Bankova V., Popova M., Trusheva B. (2014) Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review. *Chemistry Central Journal* **8**: 1-8.
- Borisutpeth P., Kanbutra P., Hanjavanit C., Chukanhom K., Funaki D., Hatai K. (2009) Effects of Thai herbs on the control of fungal infection in tilapia eggs and the toxicity to the eggs. *Aquaculture Science* **57**: 475-482.
- Borisutpeth M., Kanbutra P., Weerakhun S., Wada S., Hatai K. (2014) In vitro antifungal activity of *Cassia fistula* L. against selected pathogenic water molds. *International Journal of Phytomedicine* **6**: 237–242.
- Campbell R. E., Lilley J. H., Panyawachira V., Kanchanakhan S. (2001) *In vitro* screening of novel treatments for *Aphanomyces invadans*. *Aquaculture Research* **32**: 223–233.
- Caruana S., Yoon G. H., Freeman M. A., Mackie J. A., Shinn A. P. (2012) The efficacy of selected plant extracts and bioflavonoids in controlling infections of *Saprolegnia australis* (Saprolegniales; Oomycetes). *Aquaculture* **358**: 146–154.
- Cerenius L., Söderhäll K. (1984) Repeated zoospore emergence from isolated spore cysts of *Aphanomyces astaci*. *Experimental Mycology* **8**: 370–377.

- Cui N., Zhang X., Xie Q., Wang S., Chen J., Huang L., Qiao X., Li X., Cai X. (2011) Toxicity profile of labile preservative bronopol in water: The role of more persistent and toxic transformation products. *Environmental pollution* **159**: 609-615.
- De la Cruz-Cervantes J. A., Benavides-González F., Sánchez-Martínez J. G., de la Luz Vázquez-Sauceda M., Ruiz-Urbe A. J. (2018) Propolis in Aquaculture: A Review of Its Potential. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture* **26**: 337-349.
- Diéguez-Urbeondo J., Cerenius L., Söderhäll K. (1994) Repeated zoospore emergence in *Saprolegnia parasitica*. *Mycological Research* **98**: 810–815.
- Diéguez-Urbeondo, J., García, M. A., Cerenius, L., Kozubíková, E., Ballesteros, I., Windels, C. i sur. (2009) Phylogenetic relationships among plant and animal parasites, and saprotrophs in *Aphanomyces* (Oomycetes). *Fungal Genetics and Biology* **46(5)**: 365–376.
- Earle G., Hintz W. (2014) New Approaches for Controlling *Saprolegnia parasitica*, the Causal Agent of a Devastating Fish Disease. *Tropical Life Sciences Research* **25**: 101-109.
- Gieseke C. M., Serfling S. G., Reimschuessel R. (2006) Formalin treatment to reduce mortality associated with *Saprolegnia parasitica* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* **253**: 120–129.
- Gormez O., Diler O. (2014) *In vitro* antifungal activity of essential oils from *Tymbra*, *Origanum*, *Satureja* species and some pure compounds on the fish pathogenic fungus, *Saprolegnia parasitica*. *Aquaculture Research* **45**: 1196–1201.
- Häll L., Unestam T. (1980) The effect of fungicides on survival of the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*, Oomycetes, growing on fish scales. *Mycopathologia* **72**: 131-134.
- Hoskonen P., Heikkinen J., Eskelinen P., Pirhonen J. (2015) Efficacy of clove oil and ethanol against *Saprolegnia* sp. and usability as antifungal agents during incubation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) eggs. *Aquaculture Research* **46**: 581–589.
- Iveljić A. M. (2019) Inhibicijski učinak propolisa na patogeni mikroorganizam *Saprolegnia parasitica*, uzročnika saprolegnioze. *Završni rad. Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu*
- Jacob A. P., Culver D. A., Lanno R. P., Voigt A. (2016) Ecological impacts of fluridone and copper sulphate in catfish aquaculture ponds. *Environmental toxicology and chemistry* **35**: 1183–1194.

- Jurčević M. (2018) Inhibicijski učinak propolisa na patogene mikroorganizme iz skupine Oomycetes. *Završni rad. Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu*
- Jussila J., Toljamo A., Makkonen J., Kukkonen H., Kokko H. (2014) Practical disinfection chemicals for fishing and crayfishing gear against crayfish plague transfer. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* **413**, 02.
- Kamoun S. (2003) Molecular Genetics of Pathogenic Oomycetes. *Eukaryotic Cell* **2**: 191-199.
- Kelestemur G. T., Seven P. T., Yilmaz S. (2012) Effects of dietary propolis and vitamin E on growth performance and antioxidant status in blood of juvenile Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Teleostei: Salmoniformes) under different flow rates. *Zoologia (Curitiba)* **29**: 99-108.
- Khosravi A. R., Shokri H., Sharifrohani M., Mousavi H. E., Moosavi Z. (2012) Evaluation of the antifungal activity of *Zataria multiflora*, *Geranium herbarium*, and *Eucalyptus camaldolensis* essential oils on *Saprolegnia parasitica*-infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs. *Foodborne Pathogens and Disease* **9**: 674–679.
- Kumazawa S., Hamasaka T., Nakayama T. (2004) Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry* **84**: 329–339.
- Lone S. A., Manohar S. (2018) *Saprolegnia parasitica*, a lethal oomycete pathogen: demands to be controlled. *Journal of Infection and Molecular Biology* **6**: 36-44.
- Madrid A., Godoy P., González S., Zaror L., Moller A., Werner E., Cuellar M., Villena J., Montenegro I. (2015) Chemical characterization and anti-oomycete activity of *Laureliopsis philippianna* essential oils against *Saprolegnia parasitica* and *S. australis*. *Molecules* **20**: 8033–8047.
- Maguire I., Jelić M., Klobučar G., Delpy M., Delaunay C., Grandjean F. (2016) Prevalence of the pathogen *Aphanomyces astaci* in freshwater crayfish populations in Croatia. *Diseases of Aquatic Organisms* **118**: 45-53.
- Makkonen J., Jussila J., Kortet R., Vainikka A., Kokko H. (2012) Differing virulence of *Aphanomyces astaci* isolates and elevated resistance of noble crayfish *Astacus astacus* against crayfish plague. *Diseases of Aquatic Organisms* **102**: 129-136.
- Mašek T., Perin N., Racané L., Cindrić M., Paljetak H. Č., Perić M., Matijašić M., Verbanac D., Radić B., Šuran J., Starčević K. (2018) Chemical Composition, antioxidant and antibacterial activity of different extracts of poplar type propolis. *Croatica Chemica Acta* **91**: 81-89.

- Metin S., Diler O., Didinen B. I., Terzioglu S., Gormez O. (2015) *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of *Satureja cuneifolia* ten essential oil on *Saprolegnia parasitica* strains isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) eggs. *Aquaculture Research* **46**: 1396–1402.
- Miljanović A., Grbin D., Pavić D., Dent M., Jerković I., Marijanović Z., Bielen A. (2021) Essential Oils of Sage, Rosemary, and Bay Laurel Inhibit the Life Stages of Oomycete Pathogens Important in Aquaculture. *Plants* **10**, 1676.
- Montenegro I., Sánchez E., Werner E., Godoy P., Olgúin Y., Caro N., Ehrenfeld N., Madrid A. (2019) Isolation and identification of compounds from the resinous exudate of *Escallonia illinita* Presl. and their anti-oomycete activity. *BMC Chemistry* **13**: 1-7.
- Nardoni S., Najar B., Fronte B., Pistelli L., Mancianti F. (2019) *In vitro* activity of essential oils against *Saprolegnia parasitica*. *Molecules* **24**: 1270.
- Norliana S., Abdulmir A. S., Abu Bakar F., Salleh A. B. (2009) The health risk of formaldehyde to human beings. *American Journal of pharmacology and toxicology* **4**: 98-106.
- Pagliarulo C., Sateriale D., Scioscia E., De Tommasi N., Colicchio R., Pagliuca C., Scaglione E., Jussila J., Makkonen J., Salvatore P., Paolucci M. (2018) Growth, survival and spore formation of the pathogenic aquatic oomycete *Aphanomyces astaci* and *Fungus fusarium avenaceum* are inhibited by *Zanthoxylum rhoifolium* bark extracts *in vitro*. *Fishes* **3**: 12.
- Parikh L., Agindotan B. O., Burrows M. E. (2021) Antifungal Activity of Plant-Derived Essential Oils on Pathogens of Pulse Crops. *Plant Disease* PDIS-06.
- Pavić D., Bielen A., Hudina S., Špoljarić I., Grandjean F., Jussila J., Maguire I. (2021) Distribution of *Aphanomyces astaci* Schikora, 1906, the causative agent of crayfish plague, in the Plitvice Lakes National Park, Croatia. *BioInvasions Records* **10**: 654-668.
- Pavić D., Čanković M., Sviličić Petrić I., Makkonen J., Hudina S., Maguire I., Vladušić T., Šver L., Hrašćan R., Orlić K., Dragičević P., Bielen A. (2020) Non-destructive method for detecting *Aphanomyces astaci*, the causative agent of crayfish plague, on the individual level. *Journal of invertebrate pathology* **169**: 107274.
- Pazin W. M., Santos S. N. D., Queiroz S. C. N., Bagatolli L. A., Soares A. E. E., Melo I. S., Ito A. S. (2019) Bioactivity and action mechanism of green propolis against *Pythium aphanidermatum*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **91**: 63-72.
- Phillips A. J., Anderson V. L., Robertson E. J., Secombes C. J., van West P. (2008) New insights into animal pathogenic oomycetes. *Trends in Microbiology* **16**: 13–19.

- Pirbalouti A. G., Taheri M., Raisee M., Bahrami H. R., Abdizadeh R. (2009) *In vitro* antifungal activity of plant extracts on *Saprolegnia parasitica* from cutaneous lesions of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs. *Journal of Food, Agriculture & Environment* **7**: 94–96.
- Przybyłek I., Karpiński T. M. (2019) Antibacterial Properties of Propolis. *Molecules* **24**: 2047.
- Saleh M., Soltani M., Islami H. R. (2015) *In vitro* antifungal activity of some essential oils against some filamentous fungi of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs. *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation* **8**: 367–380.
- Sawicka D., Car H., Borawska M. H., Nikliński J. (2012) The anticancer activity of propolis. *Folia Histochemica et Cytobiologica* **50**: 25–37.
- Schnitzler P., Neuner A., Nolkemper S., Zundel C., Nowack H., Sensch K. H., Reichling J. (2009) Antiviral Activity and Mode of Action of Propolis Extracts and Selected Compounds. *Phytotherapy Research* **24**: S20–S28.
- Shin S., Kulatunga D. C. M., Dananjaya S. H. S., Nikapitiya C., Lee J., Zoysa M. D. (2017) *Saprolegnia parasitica* Isolated from Rainbow Trout in Korea: Characterization, Anti-*Saprolegnia* Activity and Host Pathogen Interaction in Zebrafish Disease Model. *Micobiology* **45**: 297-311.
- Silva-Castro I., Martín-García J., Díez J. J., Flores-Pacheco J. A., Martín-Gil J., Martín-Ramos P. (2018) Potential control of forest diseases by solutions of chitosan oligomers, propolis and nanosilver. *European Journal of Plant Pathology* **150**: 401-411.
- Simoni I. C., Aguiar B., Navarro A. M. de A., Parreira R. M., Fernandes M. J. B., Sawaya A. C. H. F., Fávero O. A. (2018) In vitro antiviral activity of propolis and *Baccharis* sp. extracts on animal herpesviruses. *Arquivos Do Instituto Biológico* **85**: 1-7.
- Soltani E., Mokhnache K., Mezaache-Aichour S., Charef N., Haro J. P. D., Zerroug M. M., Esteban M. A. (2020) Chemical composition and antibacterial activity of *Algerian propolis* against fish pathogenic bacteria. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics* **10**: 12-19.
- Songe M. M. (2015) Pathogenicity and infectivity of *Saprolegnia* species in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and their eggs. Thesis for the degree of *Philosophiae Doctor*. Faculty of Veterinary Medicine and Biosciences, Norwegian University of Life Sciences, Oslo, Norway.
- Svensson E., Unestam T. (1975) Differential Induction of Zoospore Encystment and Germination in *Aphanomyces astaci*, Oomycetes. *Physiologia Plantarum* **35(3)**: 210–216.



- Tandel R. S., Chadha N. K., Dash P., Sawant P. B., Pandey N. N., Chandra S., Bhat R. A. H., Thakuria D. (2021) An in-vitro study of Himalayan plant extracts against oomycetes disease Saprolegniasis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal Environmental Biology* **42**: 1008–1018.
- Torto-Alalibo T., Tian M., Gajendran K., Waugh M. E., van West P., Kamoun S. (2005) Expressed sequence tags from the oomycete fish pathogen *Saprolegnia parasitica* reveal putative virulence factors. *BMC Microbiology* **5**: 46.
- Unestam T., Weiss D. W. (1970) The Host-Parasite Relationship between Freshwater Crayfish and the Crayfish Disease Fungus *Aphanomyces astaci*: Responses to Infection by a Susceptible and a Resistant Species. *Journal of General Microbiology* **60**: 77–90.
- 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.
- Van West P. (2006) *Saprolegnia parasitica*, an oomycete pathogen with a fishy appetite: new challenges for an old problem. *Mycologist* **20**: 99–104.
- Vrålstad T., Johnsen S. I., Taugbøl, T. (2011) NOBANIS – Invasive Alien Species Fact Sheet – *Aphanomyces astaci*. – From: Online Database of the European Network on Invasive Alien Species – NOBANIS < [https://www.nobanis.org/globalassets/speciesinfo/a/aphanomyces-astaci/aphanomyces\\_astaci.pdf](https://www.nobanis.org/globalassets/speciesinfo/a/aphanomyces-astaci/aphanomyces_astaci.pdf) > Pristupljeno 18. kolovoza 2021.
- Wooster G. A., Martinez C. M., Bowser P. R., O'Hara D. S. (2005) Human health risks associated with formalin treatments used in aquaculture: initial study. *North American Journal of Aquaculture* **67**: 111–113.
- Yusuf Y., Durdane Y., Served, A. (2005) Antifungal activity of Turkish propolis against *Phytophthora* species. *Plant Pathology Journal* **4**: 58-60.