

Inhibicijski učinak propolisa na patogeni mikroorganizam *Saprolegnia parasitica*, uzročnika saprolegnioze

Iveljić, Ana-Marija

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

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:159:004194>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom](#).

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-19**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Ana-Marija Iveljić

7040/BT

Inhibicijski učinak propolisa na patogeni mikroorganizam *Saprolegnia parasitica*, uzročnika saprolegnioze

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, 2019.

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 patogeni mikroorganizam *Saprolegnia parasitica*,
uzročnika saprolegnioze**

Ana-Marija Iveljić, 0058206279

Sažetak: Patogeni oomiceti iz roda *Saprolegnia* uzrokuju saprolegniozu, bolest koja uzrokuje velike gubitke u salmonidnoj akvakulturi. Postojeće metode kontrole bolesti uključuju korištenje toksičnih kemikalija pa je potrebno razviti ekološki prihvatljivije tretmane patogena. Cilj ovog rada bio je po prvi put istražiti djelovanje propolisa na mikroorganizam *Saprolegnia parasitica*, primarnog uzročnika saprolegnioze. Korištene su dvije etanolne otopine propolisa, P1 s 0,2 g suhe tvari propolisa/mL te P2 s 0,25 g suhe tvari propolisa/mL s dodatkom ekstrakta kadulje i paprene metvice. Spektrofotometrijski je utvrđeno da oba pripravka sadrže visoke koncentracije bioaktivnih spojeva: fenola (> 7 mg GAE/mL), flavonoida (> 7 mg QE/mL), flavonola (> 4 mg QE/mL) i hidroksicimetnih kiselina (> 28 mg CAE/mL). U skladu s tim, oba pripravka propolisa značajno su usporila rast micelija *S. parasitica* i to do 50 %. Pripravak P2, bogatiji fenolima, pokazao je jače inhibicijsko djelovanje, što upućuje na značaj fenola u anti-oomicetnom djelovanju propolisa.

Ključne riječi: inhibicija, propolis, *Saprolegnia parasitica*, saprolegnioza

Rad sadrži: 38 stranica, 8 slika, 7 tablica, 98 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, Anđela Miljanović, mag. ing.

Datum obrane:

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 *Saprolegnia parasitica*, the causative agent of saprolegniosis

Ana-Marija Iveljić, 0058206279

Abstract: Pathogenic oomycetes of the genus *Saprolegnia* cause saprolegniosis, a reason for great losses in salmonid aquaculture. Existing disease control methods involve the use of toxic chemicals, so environmentally friendly treatments need to be developed. The aim of this thesis was to explore for the first time the effect of propolis on the microorganism *Saprolegnia parasitica*, the primary cause of saprolegniosis. Two ethanolic propolis extracts were used, P1 with 0.2 g of propolis dry matter / mL and P2 with 0.25 g of propolis dry / mL with the addition of sage and peppermint extracts. Spectrophotometrical analyses showed that both preparations contain high concentrations of bioactive compounds: phenols (> 7 mg GAE / mL), flavonoids (> 7 mg QE / mL), flavonols (> 4 mg QE / mL) and hydroxycinnamic acids (> 28 mg CAE / mL). Accordingly, both propolis preparations significantly slowed the growth of *S. parasitica* mycelium up to 50 %. Preparation P2, with higher phenol concentration exhibited a stronger inhibitory activity, suggesting the importance of phenols in the anti-oomycetic activity of propolis.

Keywords: inhibition, propolis, *Saprolegnia parasitica*, saprolegniosis

Thesis contains: 38 pages, 8 figures, 7 tables, 98 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, Anđela Miljanović mag. ing.

Defence date:

Sadržaj

| | |
|--|----|
| 1. Uvod..... | 1 |
| 2. Teorijski dio..... | 2 |
| 2.1. Patogeni mikroorganizam <i>Saprolegnia parasitica</i> kao uzročnik saprolegnioze..... | 2 |
| 2.2. Postojeće metode kontrole patogenih oomiceta u akvakulturi | 4 |
| 2.3. Ekološki prihvatljive metode kontrole patogenih oomiceta | 5 |
| 2.4. Sastav i antimikrobno djelovanje propolisa | 8 |
| 2.4.1. Istraživanja antimikrobnog djelovanja propolisa..... | 9 |
| 3. Eksperimentalni dio | 12 |
| 3.1. Pripravci propolisa | 12 |
| 3.3. Aparatura | 13 |
| 3.4. Pribor | 13 |
| 3.5. Metode rada..... | 14 |
| 3.5.1. Spektrofotometrija | 14 |
| 3.5.1.2. Postupak određivanja flavonoida | 17 |
| 3.5.1.3. Postupak određivanja hidroksicimetnih kiselina | 19 |
| 3.5.1.4. Postupak određivanja flavonola | 20 |
| 3.5.2. Uzgoj mikroorganizma <i>Saprolegnia parasitica</i> | 21 |
| 3.5.3. <i>In vitro</i> testiranje inhibicijskog učinka propolisa na rast micelija patogena <i>Saprolegnia parasitica</i> | 22 |
| 4. Rezultati i rasprava..... | 23 |
| 4.1. Spektrofotometrijsko određivanje masenih udjela polifenolnih spojeva | 23 |
| 4.2. Inhibicijski učinak propolisa na patogeni mikroorganizam <i>Saprolegnia parasitica</i> | 25 |
| 5. Zaključak..... | 29 |
| 6. Popis literature | 30 |

1. Uvod

Patogeni mikroorganizam *Saprolegnia parasitica* uzrokuje bolest saprolegniozu na odraslim ribama, njihovim jajašcima i ličinkama. Ima široki raspon domaćina, među kojima su divlje ribe poput jesetre i grgeča, ali i neke vrste važne u slatkovodnoj akvakulturi kao pastrva, som i losos. Saprolegnioza predstavlja značajni ekonomski i gospodarski problem u mrijestilištima pastrve i lososa širom svijeta uzrokujući gubitke veće od 10 %, a ponekad i do 50 % (Van den Berg i sur., 2013).

Unatoč tome, postojeće metode kontrole saprolegnioze nedostatne su jer se temelje na upotrebi toksičnih kemikalija, poput formalina i malahitnog zelenila, štetnih kako za okoliš, tako i za ljudsko zdravlje. Zbog toga je u Europskoj uniji nedavno zabranjena upotreba malahitnog zelenila, a očekuje se da će se uskoro isto dogoditi i s formalinom, što će uvelike smanjiti mogućnost kontrole ove bolesti (Van den Berg i sur., 2013). Stoga se intenzivno istražuju mogućnosti inhibicije razvoja i širenja patogena iz roda *Saprolegnia* na nove, ekološki prihvatljive načine. Primjerice, u posljednje je vrijeme pokazano inhibicijsko djelovanje širokog raspona biljnih ekstrakata i eteričnih ulja prema patogenima iz roda *Saprolegnia*, poput ekstrakata kurkume (Rahman i sur., 2008), krizanteme, majčine dušice (Pirbalouti i sur., 2009) čička, kadulje, đumbira (Caruana i sur., 2012), ehinaceje (Shin i sur., 2017) te eteričnih ulja kadulje i klinčića (Pirbalouti i sur., 2009). Nadalje, pokazano je da propolis, tvar bogata bioaktivnim spojevima porijeklom iz biljaka i s poznatim antimikrobnim djelovanjem, inhibira rast oomicetnih patogena *Pythium insidiosum*, *Pythium aphanidermatum* i *Aphanomyces*, uzročnika bolesti kod životinja (Araújo i sur., 2016; Jurčević, 2018; Pazin i sur., 2019) te niza vrsta iz roda *Phytophthora*, poznatih i široko rasprostranjenih uzročnika biljnih bolesti (Yusuf i sur., 2005; Jurčević, 2018). Međutim, inhibicijski potencijal propolisa prema oomicetima iz roda *Saprolegnia* do sada nije istražen. Stoga je cilj ovog rada bio po prvi puta ispitati *in vitro* antimikrobnu aktivnost propolisa na rast micelija oomicetnog patogena *Saprolegnia parasitica*.

2. Teorijski dio

2.1. Patogeni mikroorganizam *Saprolegnia parasitica* kao uzročnik saprolegnioze

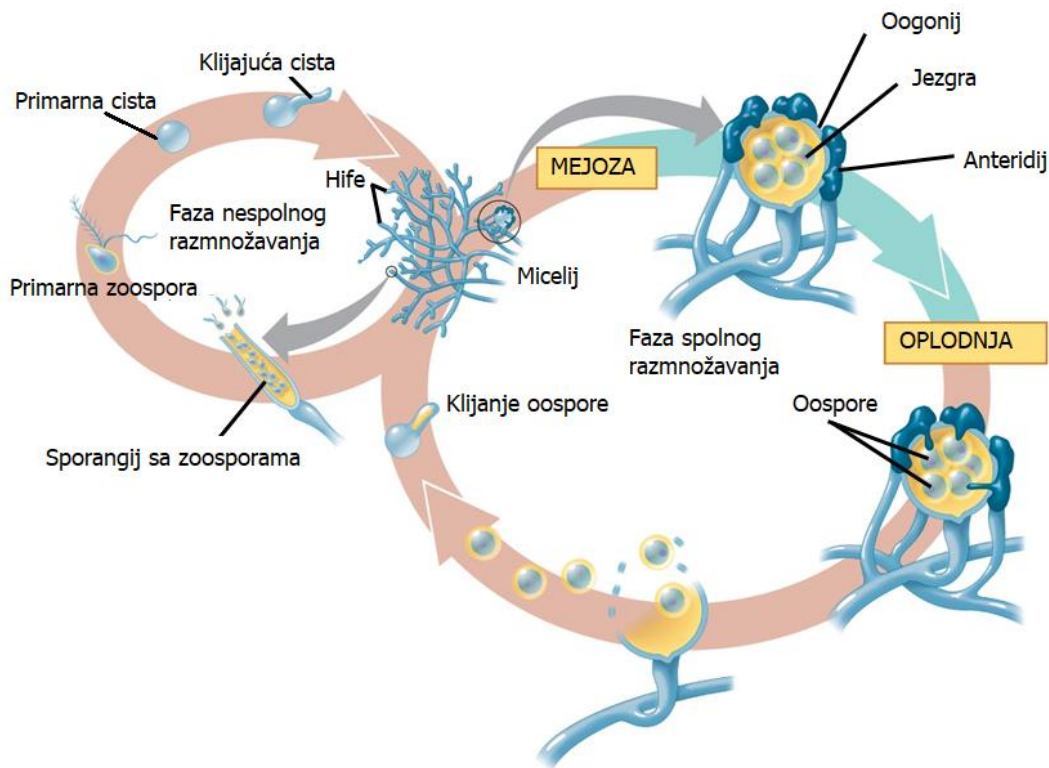


Slika 1. Klasifikacija vrste *S. parasitica* (Songe, 2015).

Oomycetes su eukariotski mikroorganizmi, poznati kao vodene plijesni. Neki od njih su saprofiti, a neki su biljni i životinjski patogeni. Tradicionalno su svrstavane u carstvo gljiva zbog filamentoznog rasta i drugih zajedničkih obilježja, no novije biokemijske i molekularne analize smještaju oomicete u carstvo Straminipila, koje uključuje i alge i dijatomeje (Kamoun, 2003). Mikroorganizmi iz razreda Oomycetes dijele se u šest redova u koje pripadaju mnogi biljni i životinjski patogeni.

Od toga, u red Saprolegniales pripadaju patogeni riba i drugih životinja uključujući najpoznatije rodove *Saprolegnia*, *Achyla* i *Aphanomyces*. Neke od najpoznatijih vrsta unutar roda *Saprolegnia* su *S. parasitica*, *S. diclina*, *S. ferax* i *S. australis* (Earle i Hintz, 2014). Na Slici 1. prikazana je klasifikacija vrste *Saprolegnia parasitica*. U životnom ciklusu vrste *Saprolegnia parasitica* izmjenjuju se spolna i nespolna faza (Slika 2). U fazi spolnog razmnožavanja dolazi do spajanja muškog (anteridij) i ženskog (oogonij) haploidnog gametangija te oplodnje. Nastaje diploidna zigota – oospora koja je okružena debelom stijenkom koja ju štiti od negativnih vanjskih utjecaja te služi za preživljavanje u nepovoljnim uvjetima i širenje patogena na veće udaljenosti. Nespolni (vegetativni) stadij ključan je u procesu infekcije domaćina. Uslijed nedostatka hranjivih tvari ili naglog pada temperature, na završecima hifa formiraju se nespolni sporangiji sa zoosporama koje se otpuštaju u okolinu. Primarne zoospore kreću se pomoću dva biča i mogu izazvati primarnu infekciju domaćina, ali su aktivne samo nekoliko minuta, a zatim se pretvore u primarnu cistu. Kada primarna cista proklija dolazi do stvaranja sekundarnih zoospora koje se smatraju glavnim infektivnim stadijem, a zatim iz njih nastaju sekundarne ciste – citospore. Vrsta *Saprolegnia parasitica* ima sposobnost stvaranja novih sekundarnih zoospora iz sekundarnih cista. Ta pojava može se ponoviti kroz čak šest ciklusa i naziva se

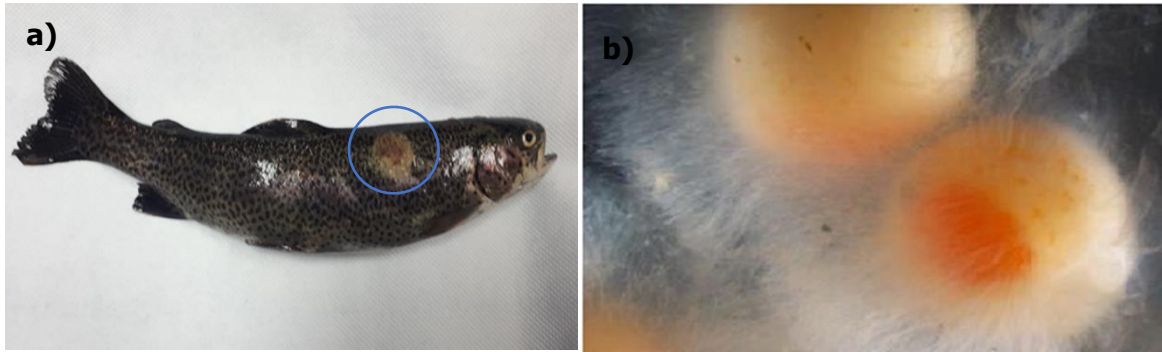
poliplanetizam ili ponovljena pojava zoospora, no najčešće dolazi do klijanja sekundarne ciste u novi micelij (Andersson i Cerenius, 2002).



Slika 2. Životni ciklus roda *Saprolegnia* (Cummings, 2015). Vrsta *Saprolegnia parasitica* živi u vlažnim uvjetima na kopnu i u slatkovodnim ekosustavima. Podnosi široki raspon temperatura, 3 – 30 °C. Saprofit je i nekrofit, ali i patogen koji uzrokuje saprolegniozu, bolest slatkovodnih riba i vodozemaca te njihovih jaja (Van den Berg i sur., 2013). Ima širok raspon domaćina, poput kalifornijske pastrve (*Oncorhynchus mykiss*), potočne pastrve (*Salmo trutta*), perzijske jesetre (*Acipenser persicus*), velike ozimice (*Coregonus lavaretus holsatus*), australskog srebrnog grgeča (*Bidyanus bidyanus*), kanalskog soma (*Ictalurus punctatus*) i japanskog lososa (*Oncorhynchus masu*). Osim toga parazitira i na jajašcima atlantskog (*Salmo salar*) te pacifičkog lososa (*Oncorhynchus nerka*) (Gozlan i sur., 2014).

Kao oportunistički patogen, *S. parasitica* najčešće uzrokuje bolest kad je riba pod stresom, primjerice uslijed naglog pada temperature vode te kod riba s fizičkim ozljedama ili drugim bolestima. Uzgoj riba u ribnjacima često uključuje uzgoj velikog broja riba u malom području te lošu kvalitetu vode pa su takvi uvjeti povoljni za širenje bolesti (Shin i sur., 2017). Saprolegnioza se manifestira bijelim ili sivim područjima s razvijenim filamentoznim

micelijem na koži, perajama i škragama inficirane ribe (Slika 3). Rast micelija na površini jajašaca dovodi do njihove smrti, dok kod odraslih riba *S. parasitica* oštećuje površinski epidermalni sloj te napredovanjem bolesti riba postaje letargična. Zatim se homeostaza organizma narušava, dolazi do smanjenja broja eritrocita što u konačnici uzrokuje osmotski šok, a posljedično i smrt (Torto-Alalibo i sur., 2005).



Slika 3. Odrasla pastrva (a) i jaja (b) zaražena vrstom *Saprolegnia parasitica*. Inficirana lezija na koži ribe označena je plavim krugom. Foto: D. Pavić

2.2. Postojeće metode kontrole patogenih oomiceta u akvakulturi

Rastom ljudske populacije, ali i prosječne svjetske konzumacije ribe s 9 kg na 20,3 kg godišnje po osobi (u razdoblju od 1961. do 2016. godine), raste i akvakulturna proizvodnja. Kako bi se osigurao rast u akvakulturi, koja danas čini gotovo 50 % ukupne godišnje proizvodnje ribe, nužna je kontrola bolesti u uzgajalištima i mrijestilištima. Patogen *Saprolegnia parasitica* ima negativan utjecaj u salmonidnoj akvakulturi, u kojoj uzrokuje 10 do 30 %-tne gubitke (FAO, 2018).

Do nedavno su infekcije vrstom *S. parasitica* u slatkovodnim ribnjacima držane pod kontrolom pomoću malahitnog zelenila (MZ), koje je vrlo učinkovit fungicid, a djeluje i protiv bakterija i praživotinja (Yang i sur., 2007). Međutim, brojna *in vitro* i *in vivo* istraživanja pokazala su da MZ ima citotoksična (Clemmensen i sur., 1984), kancerogena i mutagena svojstva (Meyer i Jorgenson, 1983; Mittelstaedt i sur., 2004). Zbog toga je upotreba MZ u akvakulturi danas zabranjena u Sjedinjenim Američkim Državama, Japanu i Europskoj uniji (Jiang i sur., 2012). Usprkos zabrani, u nedostatku drugih učinkovitih metoda kontrole, MZ se i dalje koristi pa su u periodu od 2002. do 2011. godine (HAH, 2011) utvrđene povišene koncentracije malahitnog zelenila i njegovog metabolita

leukomalahitnog zelenila u 123 uzorka ribe, od kojih je 58,5 % potjecalo iz Azijskih zemalja (Bilandžić i sur., 2012).

Osim MZ, i različite druge kemikalije, kao što su formalin, bronopol, vodikov peroksid, i natrijev klorid pokazale su se učinkovitima u suzbijanju infekcija uzrokovanih vrstama iz roda *Saprolegnia*. Međutim i one imaju negativne prateće učinke (Van den Berg i sur., 2013). Vodikov peroksid se pokazao učinkovitim u suzbijanju saprolegnioze u koncentracijama 500 – 1000 ppm, no istovremeno je utvrđeno da njegova prisutnost u vodi uzrokuje smanjen broj jajašaca kalifornijske pastrve *Oncorhynchus mykiss* (Pottinger i Day, 1999). Formalin je također pokazao visoku djelotvornost, ali je, kao i malahitno zelenilo, vrlo toksičan pa je u nekim zemljama već potpuno zabranjen, a u nekima se zabrana uskoro očekuje, uključujući Europsku Uniju. Upotreba svih ovih kemijskih reagensa vodi do razvoja fungicidne rezistencije i potencijalnih štetnih učinaka za ljudsko zdravlje (Phillips i sur., 2008).

2.3. Ekološki prihvatljive metode kontrole patogenih oomiceta

Biljni materijal ima velik potencijal primjene u suzbijanju djelovanja patogenih oomiceta. Biljni ekstrakti bogati su izvori bioaktivnih tvari kao što su fenoli, flavonoidi, kinoni, tanini, alkaloidi i steroli. Isto tako dostupnost, visoka učinkovitost, mali troškovi i smanjeni rizik za okoliš čine biljne ekstrakte ekološki prihvatljivom metodom (Rahman i Chowdhury, 2008; Ramudu i Dash, 2013). Mnogobrojni su primjeri istraživanja u kojima je ispitivano i potvrđeno inhibicijsko djelovanje eteričnih ulja i biljnih ekstrakata na micelij, sporulaciju ili pokretljivost zoospora patogenih oomiceta (Tablica 1).

Tablica 1. Biljne vrste s potvrđenim inhibicijskim djelovanjem na patogene oomicete.

| Biljni materijal | Eterično ulje/ekstrakt | Ciljni mikroorganizam | Životni stadij prema kojem je potvrđena inhibicija | Referenca |
|--|------------------------|-------------------------------|--|-------------------------|
| <i>Atractylodes macrocephala</i> | Alkoholni ekstrakt | <i>Saprolegnia australis</i> | Zoospore (klijavost) | Caruana i sur. (2012) |
| Bršljan, <i>Hedera helix</i> | Alkoholni ekstrakt | <i>Phytophthora infestans</i> | Micelij | Rodino i sur. (2013) |
| Čajevac, <i>Melaleuca alternifolia</i> | Eterično ulje | <i>Aphanomyces invadans</i> | Micelij, zoospore (klijavost) | Campbell i sur. (2001) |
| Češnjak, <i>Allium sativum</i> | Suhi ekstrakt | <i>Aphanomyces invadans</i> | Micelij | Campbell i sur. (2001) |
| | Alkoholni ekstrakt | <i>Phytophthora infestans</i> | Zoospore (klijavost) | Curtis i sur. (2004) |
| | Vodeni ekstrakt | <i>Saprolegnia parasitica</i> | Micelij | Khallil (2001) |
| Čičak, <i>Xanthium strumarium</i> | Alkoholni ekstrakt | <i>Phytophthora infestans</i> | Micelij | Rodino i sur. (2013) |
| Đumbir, <i>Zingiber officinale</i> | Alkoholni ekstrakt | <i>Saprolegnia australis</i> | Zoospore (klijavost) | Caruana i sur. (2012) |
| Ehinaceja, <i>Echinacea sp.</i> | Suhi ekstrakt | <i>Saprolegnia parasitica</i> | Micelij, zoospore (klijavost) | Caruana i sur. (2012) |
| Hena, <i>Lawsonia inermis</i> | Alkoholni ekstrakt | <i>Saprolegnia parasitica</i> | Micelij | Shin i sur. (2017) |
| Juka, <i>Yucca schidigera</i> | Alkoholni ekstrakt | <i>Plasmopara viticola</i> | Micelij | Dagostin i sur. (2011) |
| Kadulja, <i>Salvia officinalis</i> | Alkoholni ekstrakt | <i>Aphanomyces invadans</i> | Micelij | Campbell i sur., (2001) |
| | Alkoholni ekstrakt | <i>Aphanomyces invadans</i> | Micelij | Škof (2018) |
| | Alkoholni ekstrakt | <i>Phytophthora cactorum</i> | Micelij | Škof (2018) |
| | Alkoholni ekstrakt | <i>Phytophthora infestans</i> | Micelij | Rodino i sur., (2013) |
| | Alkoholni ekstrakt | <i>Phytophthora plurivora</i> | Micelij | Škof (2018) |
| | Alkoholni ekstrakt | <i>Plasmopara viticola</i> | Zoospore (klijavost) | Dagostin i sur. (2011) |

| | | | | |
|--|--------------------|-------------------------------|----------------------|--------------------------|
| | Eterično ulje | <i>Saprolegnia parasitica</i> | Micelij | Pirbalouti i sur. (2009) |
| Klinčić, <i>Eugenia aromitica</i> | Vodeni ekstrakt | <i>Saprolegnia parasitica</i> | Micelij | Khallil (2001) |
| Krizantema, <i>Chrysanthemum</i> sp. | Alkoholni ekstrakt | <i>Saprolegnia parasitica</i> | Zoospore (klijavost) | Caruana i sur. (2012) |
| Kurkuma, <i>Curcuma longa</i> | Alkoholni ekstrakt | <i>Aphanomyces invadans</i> | Micelij | Campbell i sur. (2001) |
| | Alkoholni ekstrakt | <i>Saprolegnia</i> sp. | Micelij | Rahman i sur. (2008) |
| Lovor, <i>Laurus nobilis</i> | Alkoholni ekstrakt | <i>Aphanomyces invadans</i> | Micelij | Vujović (2018) |
| | Alkoholni ekstrakt | <i>Phytophthora cactorum</i> | Micelij | Vujović (2018) |
| | Alkoholni ekstrakt | <i>Phytophthora infestans</i> | Micelij | Rodino i sur. (2013) |
| | Alkoholni ekstrakt | <i>Phytophthora plurivora</i> | Micelij | Vujović (2018) |
| Majčina dušica, <i>Thymus daenensis</i> | Eterično ulje | <i>Saprolegnia parasitica</i> | Micelij | Pirbalouti i sur. (2009) |
| | Vodeni ekstrakt | <i>Saprolegnia parasitica</i> | Micelij | Khallil (2001) |
| Miloduh, <i>Hyssopus officinalis</i> | Alkoholni ekstrakt | <i>Saprolegnia parasitica</i> | Micelij | Pirbalouti i sur. (2009) |
| Metvica, <i>Mentha longifolia</i> | Alkoholni ekstrakt | <i>Saprolegnia parasitica</i> | Micelij | Pirbalouti i sur. (2009) |
| Mirta, <i>Myrtus communis</i> | Alkoholni ekstrakt | <i>Saprolegnia parasitica</i> | Micelij | Pirbalouti i sur. (2009) |
| Oman, <i>Inula viscosa</i> | Alkoholni ekstrakt | <i>Plasmopara viticola</i> | Micelij | Dagostin i sur. (2011) |
| Pelin, <i>Artemisia</i> sp. | Alkoholni ekstrakt | <i>Phytophthora infestans</i> | Micelij | Rodino i sur. (2013) |
| Ružmarin, <i>Rosmarinus officinalis</i> | Alkoholni ekstrakt | <i>Phytophthora infestans</i> | Zoospore (klijavost) | Rodino i sur. (2013) |
| <i>Sonneratia alba</i> | Alkoholni ekstrakt | <i>Aphanomyces invadans</i> | Micelij | Afzali i Wong (2017) |
| <i>Vernonia amygdalina</i> | Vodeni ekstrakt | <i>Saprolegnia parasitica</i> | Micelij | Ilondu i sur. (2009) |
| Vratić, <i>Tanacetum parthenium</i> | Alkoholni ekstrakt | <i>Saprolegnia parasitica</i> | Micelij | Pirbalouti i sur. (2009) |
| Vrisak, <i>Satureja bactiarica</i> | Alkoholni ekstrakt | <i>Saprolegnia parasitica</i> | Mickelij | Pirbalouti i sur. (2009) |

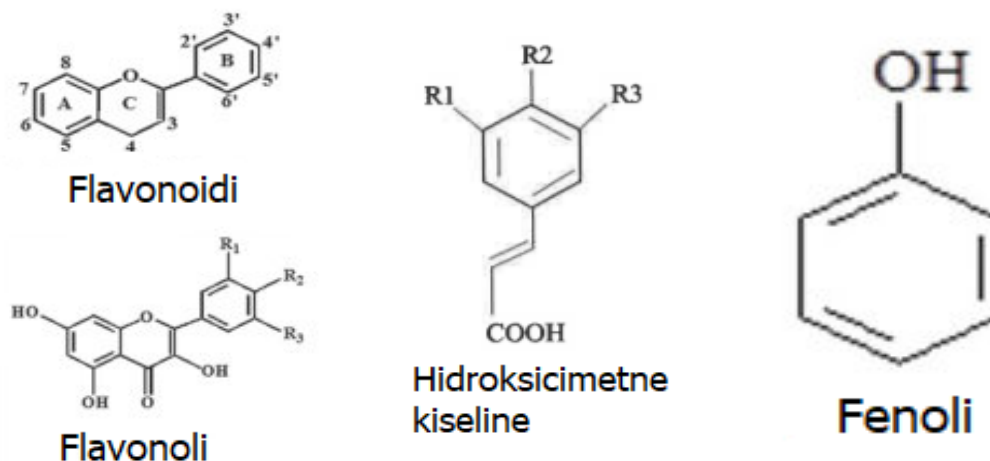
2.4. Sastav i antimikrobno djelovanje propolisa

Propolis (pčelinje ljepilo, eng. bee glue) je smolasta žuto-smeđa do tamno smeđa tvar koju pčele radilice, *Apis mellifera* skupljaju iz rastućih pupoljaka ili kore drveta te prenose do svojih kolonija u košnicama gdje se propolis miješa s pčelinjim voskom i koristi u gradnji i zaštiti košnice od vanjskih neprijatelja. Na taj način iskorištavaju se antibakterijska i antifungalna svojstva propolisa kao zaštita kolonije od bolesti (Burdock, 1998). Propolis mijenja konzistenciju ovisno o temperaturi. Na temperaturama ispod 15 °C tvrd je i krhak, no na višim temperaturama postaje savitljiv i ljepljiv. Obično je u tekućem stanju na temperaturama 60 – 70 °C, ali za neke uzorke temperatura tališta može biti i 100 °C. Ima karakterističan i ugodan aromatični miris. Ovisno o podrijetlu, može biti različite boje, mirisa i djelovanja (Mirzoeva i sur., 1997).

Glavni sastojci propolisa su 40 – 50 % smola (flavonoidi, fenolne kiseline i esteri), 25 – 35 % voska, 10 % eteričnih ulja, 5 % peluda (proteini i kiseline) i 5 % ostalih različitih komponenti (Fe, Zn, Au, Ag, Cs, Hg, ketoni, šećeri). U smoli i eteričnim uljima nalaze se fenolni spojevi - biološki aktivne tvari, a do danas ih je identificirano više od 300 (Shimizu i sur., 2004).

Fenolni spojevi se prema broju aromatskih jezgri u molekuli dijele na monofenole (npr. fenolne kiseline i njihovi derivati, fenolni alkoholi itd.) i polifenole (npr. flavonoidi, stilbeni) U polifenole ubrajamo najistraživaniju podgrupu fenolnih spojeva – flavonoide, a obzirom na razlike u građi oni se dijele na: flavone, flavonole, flavan-3-ole i antocijane. Fenolne kiseline dijele se na dvije glavne skupine: derivate hidroksibenzojeve i derivate hidroksicimetne kiseline. U derivate hidroksicimetne kiseline pripadaju *p*-kumarinska, ferulinska, sinapinska i kava kiselina (Naczki i Shahidi, 2004). Opće kemijske strukture fenola, flavonoida, flavonola i hidroksicimetnih kiselina prikazane su na Slici 4.

Pčele koriste propolis već milijunima godina, a u ljudskoj upotrebi nalazi se tisućljećima. O koristi i djelotvornosti propolisa kroz povijest postoje podaci u literaturi stari više od 2000 godina. U razdoblju prije Krista, Grčki filozof Hipokrat opisao je upotrebu propolisa za liječenje rana i čireva, a rimski znanstvenik Plinije Stariji u svojoj je zbirci knjiga Natural History (79. godine) spomenuo dobrobiti propolisa za liječenje opekline i rana te ublažavanje boli. Zbog povoljnih učinaka na zdravlje, propolis se sve više koristi i kao dodatak prehrani (Kuropatnicki i sur., 2013).



Slika 4. Opće strukturne formule nekih fenolnih spojeva (Manach i sur., 2004).

2.4.1. Istraživanja antimikrobnog djelovanja propolisa

Propolis ima niz povoljnih svojstava: djeluje imunomodulacijski, protuupalno, protutumorski, antioksidacijski i antimikrobno (Santos i sur., 2002). Antimikrobno djelovanje propolisa demonstrirano je na različitim skupinama mikroba – virusima, bakterijama, praživotinjama, gljivama pa i oomicetima.

Antivirusno djelovanje propolisa utvrđeno je nizom istraživanja. Propolis sprječava ulazak virusa u stanicu i njihovo razmnožavanje, a istovremeno potiče imunološki sustav na ubrzanu proizvodnju protutijela. Primjerice, Schnitzler i suradnici (2010) dokazali su antivirusno djelovanje propolisa na *Herpes simplex virus* HSV-1. U tom istraživanju formiranje plakova karakterističnih za virus smanjilo se za > 98 %. Propolis djeluje na mnoge viruse, poput virusa gripe A1 (Lotfy, 2006), HSV-2 – uzročnika genitalnog herpesa (Kuropatnicki i sur., 2013), *Polio virus* – uzročnika dječje paralize (Bufalo i sur., 2009), *Rotavirus*, *Adenovirus* i *Coronavirus* – uzročnika infekcija gastrointestinalnog trakta (Debiaggi i sur., 1990) itd.

Nadalje, brojnim znanstvenim istraživanjima dokazano je inhibicijsko djelovanje propolisa na bakterije, poput *Staphylococcus aureus* (Krol i sur., 1993), *Streptococcus mutans* (Koo i sur., 2002), *Salmonella enteridis* (Uzel i sur., 2005), *Bacillus subtilis* (Pavilonis i sur., 2008), *Klebsiella pneumoniae* i *Escherichia coli* (Bispo i sur., 2012) i mnoge druge

(Fernandes i sur., 1995; Hegazi i sur., 2002; Boyanova sur., 2005). Baktericidno djelovanje propolisa temelji se na sprječavanju diobe stanice, uništavanju stanične stijenke i citoplazmatske membrane te zaustavljanju sinteze proteina (Parolia i sur., 2010). Prema istraživanju Shuaib i suradnika (2013) kod Gram-pozitivnih bakterija antimikrobno djelovanje se pokazalo u 100 % ispitivanih vrsta, a kod Gram-negativnih u 62,5 % ispitanih vrsta. Razlog nešto smanjenog djelovanja na Gram-negativne bakterije autori pripisuju proteinskim pumpama koje izbacuju sastojke propolisa iz stanice (Shuaib i sur., 2013).

Antiprotozoično djelovanje propolisa također je dokazano brojnim istraživanjima. Primjerice, propolis djeluje inhibicijski na *Trypanosoma* sp., *Leishmania* sp., *Plasmodium* sp. (Monzote i sur., 2012), *Trypanosoma brucei* (Siheri i sur., 2014), *Blastocystis* sp. (Mokhtar i sur., 2016) i *Crithidia fasciculata* (Alenezi i sur., 2018).

Propolis djeluje i antifungalno. Primjerice, Ozcan (1999) je ispitao antifungalna svojstva propolisa tretiranjem gljiva *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* i *Penicillium digitatum*. U istraživanju je dokazano da propolis otopljen u vodi u koncentraciji od 4 % ima snažno antifungalno djelovanje na navedene vrste gljiva. Isto tako, propolis je inhibirao rast gljiva *Trichophyton* (Siqueira i sur., 2009), *Penicillium expansum*, *Trichoderma reesei*, *Ulocladium* sp. (Curifuta i sur., 2012) te vrste iz roda *Candida* (Bezerra i sur., 2015).

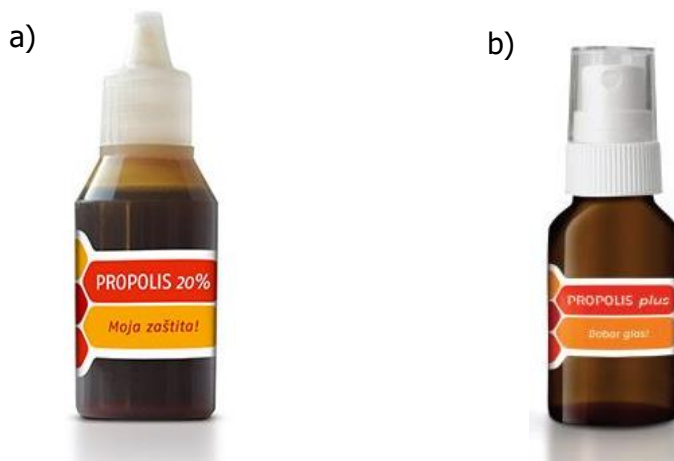
Uz sva navedena svojstva, pokazano je da propolis ima i inhibicijski učinak na micelij i/ili zoospore patogenih oomiceta. Primjerice, Jurčević (2018) je demonstrirala inhibicijski učinak etanolnih ekstrakata propolisa na rast micelija oomiceta *Aphanomyces astaci*, patogena rakova te *Phytophthora cactorum* i *P. plurivora*, biljnih patogena sa širokim rasponom domaćina. Isto tako, Yusuf i suradnici (2005) dokazali su inhibicijski učinak metanolnih ekstrakata propolisa na micelij oomiceta *Phytophthora infestans*, *P. capsici* i *P. parasitica*. Antioomicetna svojstva propolisa također su pokazana inhibicijom rasta hifa *Pythium insidiosum* (Araújo i sur., 2016) i micelija *Pythium aphanidermatum* (Pazin i sur., 2019). **Iako je antimikrobni potencijal propolisa danas potvrđen velikim brojem istraživanja, studije koje pokazuju njegovo antioomicetno djelovanje još uvijek su malobrojne, unatoč velikom broju biljnih i životinjskih patogena unutar ove skupine.**

S obzirom na široki spektar antimikrobnog djelovanja propolisa, smatra se da je takvo djelovanje rezultat sinergizma različitih komponenti, a ne pojedinačnih učinaka (Burdock, 1998). Eksperimentalno je dokazano da jedna komponenta izolirana iz propolisa nema

veću aktivnost od cijelog ekstrakta propolisa. Očito je da u različitim uzorcima različite kombinacije tvari mogu biti temelj biološke aktivnosti propolisa (Kujumgiev i sur. 1993). Snaga antimikrobnog djelovanja leži u visokoj koncentraciji tvari flavonoida, fenola, flavonola i hidroksicimetnih kiselina (Al-Ani i sur. 2018).

3. Eksperimentalni dio

3.1. Pripravci propolisa



Slika 5. Pripravak 1 (a) i Pripravak 2 (b)

Tijekom izrade ovog rada korištena su dva tekuća pripravka propolisa, P1 i P2 (Slika 5), različitog sastava (Tablica 2) (PIP d.o.o., Pisarovina, Hrvatska).

Tablica 2. Sastav korištenih pripravaka propolisa

| masena koncentracija γ (g/mL) | P1 | P2 |
|---|-----|------|
| suhi ekstrakt propolisa | 0,2 | 0,29 |
| alk. ekstrakt listova kadulje (<i>Salvia officinalis</i>) | / | 0,25 |
| alk. ekstrakt listova paprene metvice (<i>Mentha piperita</i>) | / | 0,19 |

3.2. Kemikalije

- Agar (Biolife, Italija)
- Aluminijev klorid (aluminij-klorid-heksahidrat, p.a.) ($\text{AlCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$) (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska)
- Etanol, 96%-tni (Kefo d.o.o, Ljubljana, Slovenija)
- Folin – Ciocalteu reagens (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska)
- Galna kiselina (Acros Organics, New Jersey, USA)

- Glukoza (Biolife, Italija)
- Kafeinska kiselina (C₉H₈O₄) (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Njemačka)
- Kalijev acetat, CH₃CO₂K (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska)
- Klorovodična kiselina, koncentrirana 37% (HCl) (Fisher Chemical, Loughborough, UK)
- Kvaščev ekstrakt (Biolife, Italija)
- Kvercetin (Extrasynthese, Lyon, Francuska)
- Metanol (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev karbonat, bezvodni (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

3.3. Aparatura

- Analitička vaga (JOBST, Samobor, Hrvatska)
- Autoklav (Inkolab, Zagreb, Hrvatska)
- Inkubator (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- UV/Vis Spektrofotometar (PERKIN-ELMER, Lambda 1, Massachusetts, USA)

3.4. Pribor

- Boce za čuvanje otopina (250 mL, 500 mL i 1000 mL)
- Graduirane pipete (1, 2 i 5 mL)
- Mikropipete Eppendorf (0,1 i 1 mL)
- Odmjerne tikvice (10 mL, 50 mL, 100 mL)
- Petrijeve zdjelice
- Propipeta
- Plastične lađice za vaganje
- Plastična žličica
- Staklene čaše (50 i 100 mL)
- Staklene epruvete
- Stalak za epruvete
- Stakleni lijevci

3.5. Metode rada

3.5.1. Spektrofotometrija

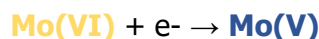
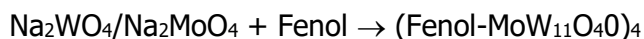
Spektrometrija je grana znanosti koja proučava interakciju elektromagnetskog zračenja i tvari i na taj način daje informacije o sastavu i strukturi tvari. UV/Vis spektrofotometrija je analitička metoda prikladna za određivanje kemijskih vrsta koje apsorbiraju elektromagnetsko zračenje na valnim duljinama 200 – 400 nm (UV područje), odnosno 400 – 800 nm (Vis područje). UV/Vis spektrofotometrija koristi se za kvantitativno određivanje organskih komponenti u otopini, pri čemu se koristi svjetlost kako bi se izmjerila kemijska koncentracija tvari, odnosno prigušenja inteziteta zračenja prilikom apsorbancije. Apsorbanciju opisuje Lambert-Beerov zakon:

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

gdje je A apsorbancija, b duljina puta svjetlosti kroz uzorak (cm), c množinska koncentracija (mol/L), a ϵ molarni apsorpcijski koeficijent (L/cm mol). Vidljivo je da je apsorbancija linearno ovisna o koncentraciji analita pa pomoću Lambert-Beerovog zakona i baždarnog dijagrama (ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda) možemo jednostavno izračunati koncentraciju analita. Mjerenje apsorbancije vrši se spektrofotometrom koji se sastoji od izvora zračenja, monokromatora (izbor valne duljine), detektora (mjerenje inteziteta zrake svjetlosti) i procesora signala prikladnog za analitičku obradu podataka (Harvey, 2009).

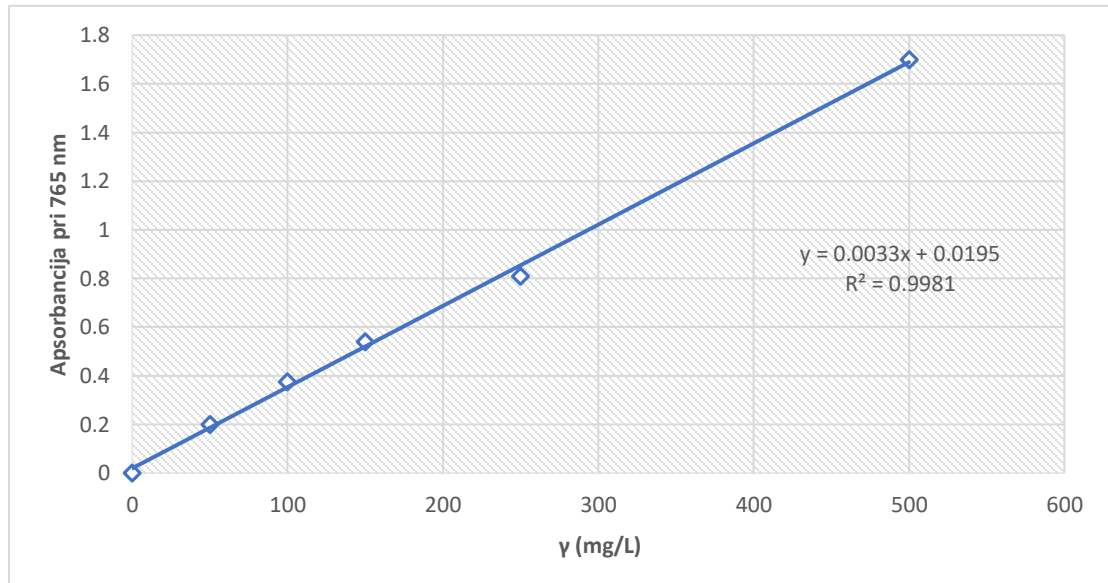
3.5.1.1. Postupak određivanja ukupnih fenola

Metoda s Folin-Ciocalteu (FC) reagensom korištena je za određivanje ukupnih fenola u pripravcima propolisa (Agbor i sur., 2014). FC reagens smjesa je fosfovolframove i fosfomolibdene kiseline koje se reduciraju u volframov oksid i molibdenov oksid pri oksidaciji fenolnih spojeva u blago lužnatim uvjetima pri čemu nastaje plavo obojenje koje se mjeri pri valnoj duljini 765 nm (Chang i sur., 2002).



U Tablici 3. navedeni su postupci pripreme reagensa za određivanje fenola.

Iz svake tikvice prethodno napravljenih razrijeđenja standarda galne kiseline, otpipetirano je 125 μL u epruvete te je dodano 1250 μL FC reagensa i 15 mL destilirane vode. Nakon 3 minute dodano je 3,75 mL zasićene otopine natrijeva karbonata te se sve skupa vorteksiralo i termostatiralo 25 minuta pri temperaturi od 50°C u vodenoj kupelji. Nakon toga mjerena je apsorbancija pri valnoj duljini 765 nm na UV/Vis spektrofotometru. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija, u programu Microsoft Excel nacrtan je baždarni pravac pri čemu se na apcisi nalaze koncentracije galne kiseline (mg/L), a na ordinati vrijednosti apsorbancije pri 765 nm (Slika 6).



Slika 6. Baždarni pravac galne kiseline.

Nakon toga, gore opisanim postupkom izmjerene su i vrijednosti apsorbancije pripravaka propolisa. Pri tome su uzorci propolisa zbog opće poznatih visokih koncentracija fenolnih spojeva razrijeđeni 1000 puta u etanolu tako da budu u granicama kvantifikacije baždarnog dijagrama. Na isti način pripremljena je i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzeo 96 %-tni etanol.

Koncentracija ukupnih fenola u uzorcima propolisa izračunata je iz dobivene jednadžbe pravca i izražena kao mg ekvivalent galne kiseline (GAE) / mL uzorka.

Tablica 3. Priprema reagensa za određivanje ukupnih fenola

| Reagens | Priprema |
|---|--|
| Folin-Ciocalteu reagens (FC reagens) | Otopina Folin- Ciocalteu (FC) reagensa dobivena je razrijeđivanjem FC reagensa u deioniziranoj vodi u omjeru 1:2. |
| Standard galne kiseline | Standard galne kiseline pripremljen je otapanjem 250 mg galne kiseline u 10 mL 96 %-tnog etanola te je otopina nadopunjena deioniziranom vodom do oznake u odmjernej tikvici od 50 mL. Od početne otopine standarda (5 g/L) priređena su razrijeđenja 50, 100, 150, 250 i 500 mg/L u odmjernim tikvicama od 100 mL tako da je otpipetirano 1, 2, 3, 5 i 10 mL alikvota standardne otopine galne kiseline i nadopunjeno do oznake 96 %-tnim etanolom. |
| Na₂CO₃ (20 %, w/v) | Zasićena otopina natrijeva karbonata pripremljena je otapanjem 200g bezvodnog Na ₂ CO ₃ u 800 mL vruće deionizirane vode u odmjernej tikvici od 1000 mL, te nadopunjeno deioniziranom vodom do oznake i nakon 24 h filtrirano. |

3.5.1.2. Postupak određivanja flavonoida

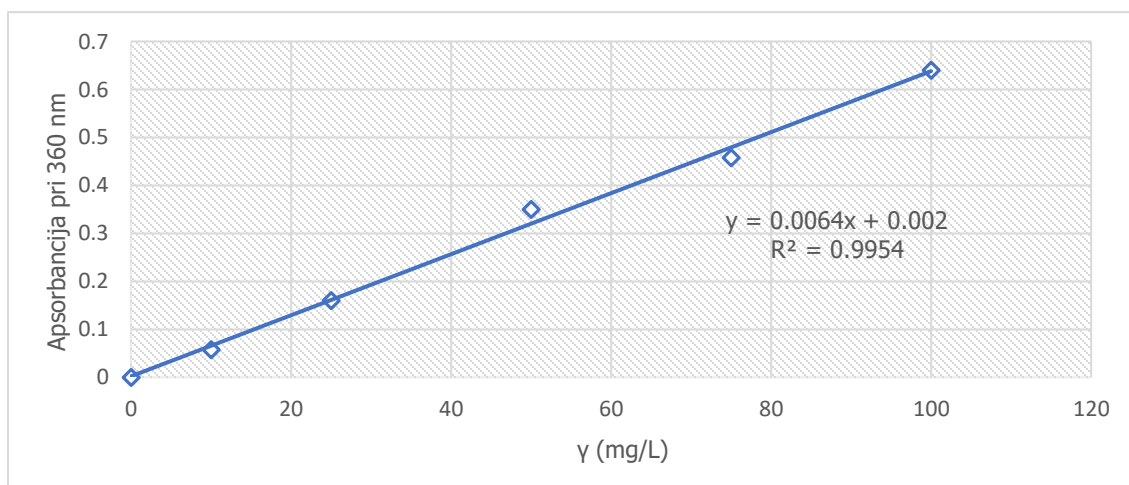
Određivanje flavonoida provodi se metodom koja se temelji na kolornoj reakciji flavonoida s aluminijskim kloridom i kalijevim acetatom te mjerenja inteziteta obojenja pri 415 nm (Chang i sur., 2002). Reagensi za određivanje flavonoida pripremljeni su kako je opisano u Tablici 4.

Tablica 4. Priprema reagensa za određivanje ukupnih flavonoida

| Reagens | Priprema |
|--------------------------------------|--|
| Aluminijev klorid (10 %, w/v) | Odvagano je 1 g aluminijska klorida i otopljeno u destiliranoj vodi u odmjernoj tikvici od 10 mL. |
| Kalijev acetat, 1 M | 9,845 g kalijeva acetata otopljeno je u 10 mL destilirane vode te kvantitativno preneseno u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopunjeno do oznake. |
| Standard kvercetina | Odvagnuto je 5 mg kvercetina i pomoću 5 mL 100 %-tnog metanola preneseno u odmjernu tikvicu od 50 mL te nadopunjeno metanolom do oznake. Od početne otopine standarda (100 mg / L) priređena su razrijeđenja 10, 25, 50 i 75 mg/L u odmjernim tikvicama od 100 mL tako da je otpipetirano 1, 2,5, 5 i 7,5 mL alikvota standardne otopine kvercetina i nadopunjeno do oznake metanolom. |

Za određivanje ukupnih flavonoida također je izrađen baždarni dijagram (Slika 7). Otpipetirano je 0,5 mL otopine standarda kvercetina, 1,5 mL 96 %-tnog etanola, 0,1 mL 10 %-tnog aluminijska klorida, 0,1 mL 1 M kalijeva acetata te 2,8 mL destilirane vode. Na isti način pripremljena je i slijepa proba, ali se umjesto standarda uzeo 100 %-tni metanol, a umjesto 10 %-tnog aluminijska klorida etanol. Nakon stajanja 30 minuta, izmjerena je apsorbancija pri valnoj duljini 415 nm. Zatim je na isti način kao za standarde kvercetina određena apsorbancija 1000 puta razrijeđenih pripravaka propolisa.

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



Slika 7. Baždarni pravac kvercetina.

3.5.1.3. Postupak određivanja hidroksicimetnih kiselina

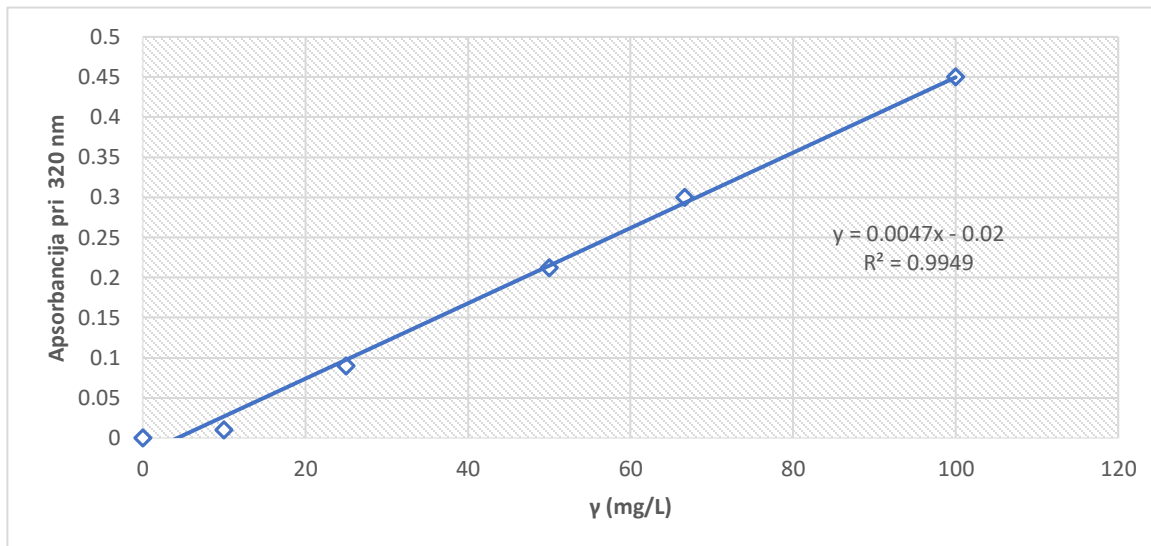
Određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina provodi se spektrofotometrijskom metodom pri čemu se intezitet nastalog obojenja mjeri pri 320 nm (Howard i sur., 2003). Reagensi za određivanje hidroksicimetnih kiselina pripremljeni su kako je opisano u Tablici 5.

Tablica 5. Priprema reagensa za određivanje hidroksicimetnih kiselina

| Reagens | Priprema |
|---|--|
| Standard kafeinske kiseline | Pripremljen je vaganjem 5 mg standarda kafeinske kiseline te pomoću 5 mL 80 %-tnog metanola kvantitativno prenesen u odmjernu tikvicu volumena 50 mL te nadopunjeno metanolom do oznake. Iz alikvotne otopine standarda 100 mg/L prirede se razrijeđenja 10, 25, 50 i 66,7 mg/L na način da se otpipetira 1, 2,5, 5 i 6,67 otopine alikvota i nadopuni do oznake 80 %-tnim metanolom u odmjernim tikvicama od 10 mL. |
| Otopina klorovodične kiseline, 1 g/L HCl (u 96 %-tnom etanolu) | 0,227 mL koncentrirane klorovodične kiseline (37 %) otpipetirano je u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopunjeno do oznake etanolom (96 %). |
| Otopina klorovodične kiseline, 2 g/L HCl | 0,454 mL koncentrirane klorovodične kiseline (37 %) otpipetirano je u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopunjeno do oznake destiliranom vodom. |

Kao i u prethodnim određivanjima, najprije je izrađen baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji kafeinske kiseline (Slika 8). Otpipetirano je redom 250 µL otopine standarda, 250 µL 1g/L HCl u 96 %-tnom etanolu i 4,55 mL 2 g/L HCl u staklenu

epruvetu i određena je apsorbancija na 320 nm. Slijepa proba pripremljena je na isti način, samo je umjesto standarda dodan 80 %-tni metanol.



Slika 8. Baždarni pravac kafeinske kiseline.

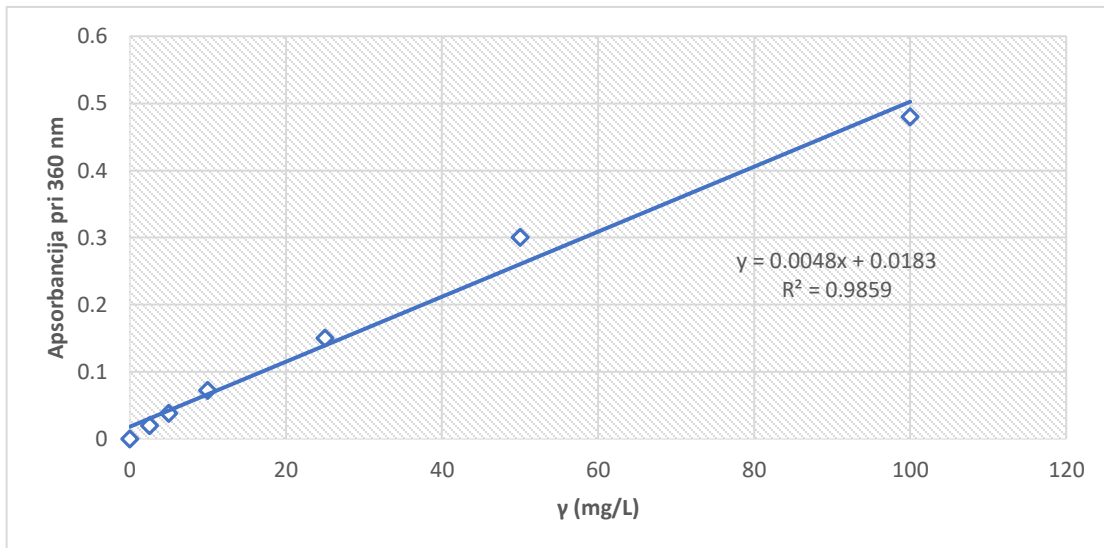
Apsorbancija 1000 puta razrijeđenih uzoraka propolisa određena je na isti način. Koncentracija hidrosicimetnih kiselina u uzorcima propolisa izračunata je iz dobivene jednadžbe pravca i izražena kao mg ekvivalent kafeinske kiseline (CAE) / mL uzorka.

3.5.1.4. Postupak određivanja flavonola

Određivanje ukupnih flavonola provodi se spektrofotometrijskom metodom pri čemu se intezitet nastalog obojenja mjeri pri 320 nm (Howard i sur., 2003). Reagensi korišteni za određivanje flavonola su otopina klorovodične kiseline, 1 g/L HCl (u 96 %-tnom etanolu), otopina klorovodične kiseline, 2 g/L HCl (pripremljena kako je opisano u Tablici 5) te standardi kvercetina (pripremljeni kako je opisano u Tablici 4).

Za pripremu baždarnog dijagrama (Slika 9) otpipetirano je redom 250 μ L otopine standarda, 250 μ L 1 g/L HCl u 96 %-tnom etanolu i 4,55 mL 2 g/L HCl u staklenu epruvetu i određena je apsorbancija pri 320 nm. Slijepa proba pripremljena je na isti način, samo je umjesto standarda dodan 80 %-tni metanol. Apsorbancija 1000 puta razrijeđenih uzoraka propolisa određena je na isti način kao za standarde kvercetina.

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

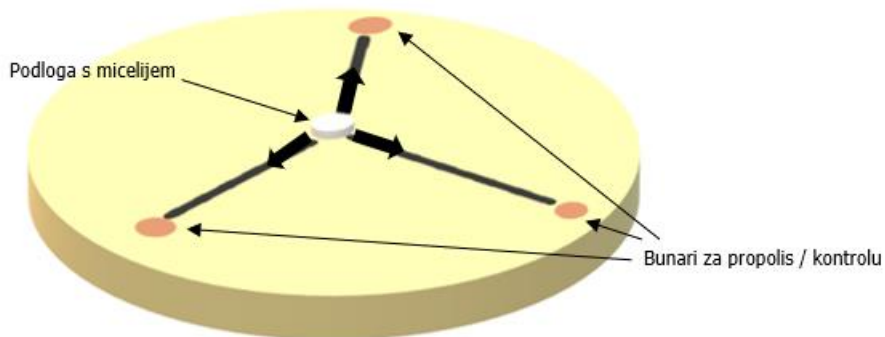


Slika 9. Baždarni pravac kvercetina.

3.5.2. Uzgoj mikroorganizma *Saprolegnia parasitica*

U istraživanju je korišten mikroorganizam *Saprolegnia parasitica*, soj CBS 223.65 koji je ustupila dr. sc. Roberta Galuppi (Sveučilište u Bologni, Italija) uzgajan pri 18 °C na krutoj hranjivoj podlozi GY. Podloga GY priprema se miješanjem 1 L destilirane vode, 12 g agara, 5 g glukoze i 1 g kvašćevog ekstrakta. Podloga se sterilizira autoklaviranjem pri 121 °C i tlaku od 1,2 bar te se ohlađena na oko 60 °C sterilno izlijeva u Petrijeve zdjelice (Hatai i Egusa 1979).

3.5.3. *In vitro* testiranje inhibicijskog učinka propolisa na rast micelija patogena *Saprolegnia parasitica*



Slika 6. Shematski prikaz *in vitro* testiranja inhibicijske aktivnosti propolisa. Crne strelice – smjer radijalnog rasta micelija.

Inhibira li propolis rast micelija patogena *Saprolegnia parasitica* istraženo je *in vitro* testiranjem (Slika 6). U središte Petrijeve zdjelice s hranjivom podlogom GY postavljen je kružni komadić hranjive podloge prorašten svježim micelijem vrste *S. parasitica* ($d = 5$ mm). Uz rub Petrijeve zdjelice napravljena su tri bunara promjera 5 mm, jednako udaljeni međusobno i od micelija u sredini Petrijeve zdjelice. U bunare je dodano po 50 μ L svakog uzorka propolisa i otapala etanol/voda (negativna kontrola). Testiranje je izvršeno u 4 paralele. Petrijeve zdjelice zatim su inkubirane 4 dana pri 18 °C te je izmjeren radijalni rast micelija u milimetrima (od središta podloge do ruba micelija) 2. i 4. dana rasta. Intezitet inhibicijskog djelovanja pripravaka propolisa određen je uspoređivanjem rasta oomiceta u i bez prisutnosti propolisa, pri čemu je inhibicijska aktivnost veća što je izmjereni radijalni rast oomiceta bio manji.

4. Rezultati i rasprava

U ovom radu prikazani su rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola, flavonoida, flavonola i hidroksicimetnih kiselina u uzorcima propolisa (Tablica 6) te je po prvi put ispitano inhibicijsko djelovanje propolisa na rast micelija patogenog mikroorganizma, *Saprolegnia parasitica*, uzročnika saprolegnioze (Slike 7 i 8, Tablica 7).

4.1. Spektrofotometrijsko određivanje masenih udjela polifenolnih spojeva

Koncentracije fenola, flavonola, flavonoida i hidroksicimetnih kiselina u pripravcima propolisa P1 i P2 iznosile su > 7 mg GAE/mL fenola, > 7 mg QE/mL flavonoida, > 4 mg QE/mL flavonola i > 28 mg CAE/mL hidroksicimetnih kiselina (Tablica 6).

Kako bi se izmjerene koncentracije polifenolnih spojeva mogle usporediti s literaturnim podacima, potrebno ih je izraziti po gramu propolisa. To je bilo moguće samo za pripravak P1, s obzirom da je pripravak P2 smjesa propolisa i biljnih ekstrakata. Utvrđene koncentracije fenola, flavonoida, flavonola i hidroksicimetnih kiselina u pripravku P1 usporedive su s literaturnim podacima za pripravke propolisa. Primjerice, koncentracije fenola u uzorcima propolisa iz Alžira (Mouhoubi-Tafinine i sur. 2016), Azerbajdžana (Can i sur., 2015) Koreje, Australije i Brazila (Wang i sur., 2016) varirale su u širokom rasponu od ~1 do ~200 mg GAE/g, dok je koncentracija fenola u pripravku P1 iznosila 36 mg GAE/g. Nadalje, literaturne koncentracije flavonoida u uzorcima propolisa također variraju, i to u rasponu od ~1 do ~100 mg QE/g (Socha i sur. 2015; Tahifine i sur. 2016; Wang i sur. 2016), što je u skladu s izmjerenom vrijednošću za pripravak P1 od 39 mg QE/g. Slično je i s koncentracijom flavonola koje variraju od nekoliko mg QE/g do nekoliko stotina mg QE/g (Betances-Salcedo 2017; Isla i sur. 2014; Kosalec i sur. 2014) te je pripravak P1 unutar tog raspona (24 mg QE/g). Naposljetku, utvrđena koncentracija hidroksicimetnih kiselina u pripravku P1 (139 mg CAE/g) veće su od vrijednosti koncentracija dobivenih u istraživanju Socha i suradnika (2015) kod kojih se raspon hidroksicimetnih kiselina kretao od 37,54 do 116,95 mg CAE/g. Vidljivo je da koncentracije fenolnih spojeva u pripravcima propolisa, kako u ovom radu tako i u drugim istraživanjima, variraju, ali treba uzeti u obzir da na kemijski sastav propolisa (količina

flavonoida, fenolnih kiselina i derivata) utječe geografsko i biljno podrijetlo propolisa te vrsta i temperatura ekstrakcije te korišteno otapalo za ekstrakciju (Salonen i sur., 2012).

Tablica 6. Koncentracije fenola, flavonola, flavonoida i hidroksicimetnih kiselina u uzorcima propolisa (n = 2).

| | FENOLI | FLAVONOIDI | FLAVONOLI | HIDROKSICIMETNE KISELINE |
|-----------|------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|
| P1 | 7,2 ± 0,2 mg GAE/mL 36 mg GAE/g | 7,8 ± 0,03 mg QE/mL 39 mg QE/g | 4,8 ± 0,2 mg QE/mL 24 mg QE/g | 27,8 ± 0,8 mg CAE/mL 139 mg CAE/g |
| P2 | 8,3 ± 0,4 mg GAE/mL | 8,7 ± 0,1 mg QE/mL | 6,3 ± 0,2 mg QE/mL | 37,9 ± 1,5 mg CAE/mL |

Općenito, u pripravku P2 utvrđen je veći udio polifenolnih tvari po mL nego u pripravku P1, i to za 15 % što se tiče koncentracije ukupnih fenola, za 11 % što se tiče koncentracije flavonoida, 31 % za flavonole i 36 % za hidroksicimetne kiseline. Utvrđena viša koncentracija bioaktivnih spojeva može se pripisati dodatku ekstrakta kadulje i paprene metvice pripravku P2. Naime, poznato je da navedene biljke sadrže visoke koncentracije fenolnih tvari (Attanassova i sur., 2011; Benabdallah i sur., 2016; Ghorbani i Esmailizadeh, 2016; Dent i sur., 2017; Lučić 2018;). Primjerice, Lučić (2018) je odredio maseni udio ukupnih fenola u ekstraktima kadulje u rasponu od 36 – 115 mg GAE/g, flavonoida 11 – 36 mg QE/g, flavonola 29 – 49 mg QE/g i hidroksicimetnih kiselina 28 – 62 mg CAE/g. Nadalje, Attanassova i suradnici (2011) odredili su u paprenoj metvici količinu fenola koja je iznosila 0,45 mg GAE/g te flavonoida 0,25 mg QE/g. Osim toga, na veću izmjerenu koncentraciju bioaktivnih tvari u pripravku P2 vjerojatno je utjecala i viša koncentracija suhe tvari propolisa (0,25 g/mL u P1 naspram 0,2 g/mL u P2).

4.2. Inhibicijski učinak propolisa na patogeni mikroorganizam *Saprolegnia parasitica*

Oba testirana pripravka propolisa značajno su inhibirala rast micelija patogena *Saprolegnia parasitica*, kao što je prikazano na Slikama 7 i 8 te u Tablici 7.

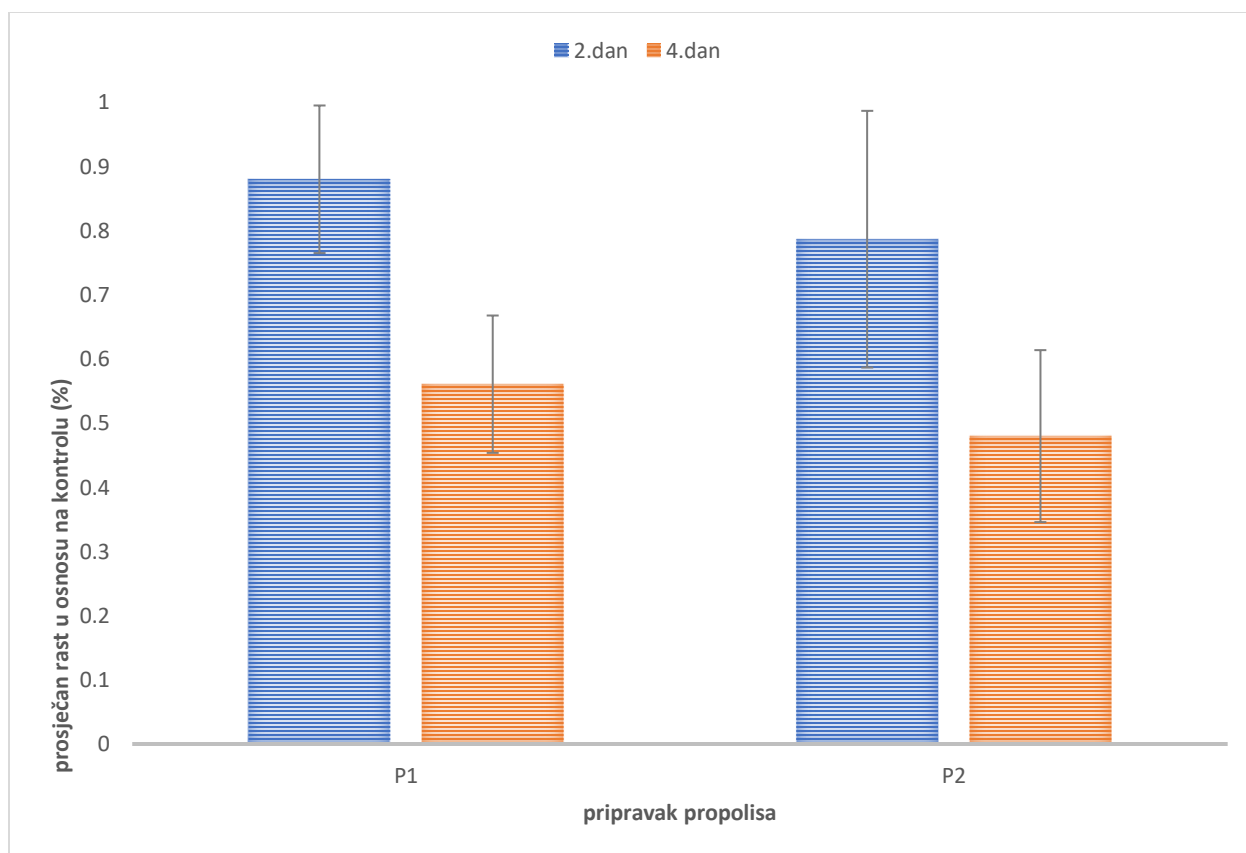
Nakon četiri dana uzgoja u prisustvu pripravaka propolisa, rast u prisustvu pripravka P1 bio je smanjen na 55 % u odnosu na kontrolne vrijednosti, a u prisustvu P2 na 50 %. Dakle, pripravak P2 pokazao je jače inhibicijsko djelovanje od P1 što se može pripisati prisutnosti dodatka ekstrakta kadulje i paprene metvice, odnosno većim određenim koncentracijama ukupnih fenola, flavonoida, flavonola i hidroksicimetnih kiselina. Te komponente odgovorne su za antimikrobni učinak propolisa (Mirzoeva i sur., 1997; Uzel i sur., 2005; Miguel i sur., 2014; Al-Ani i sur., 2018) te se može pretpostaviti da su imale inhibicijski učinak na vrstu *Saprolegnia parasitica* u ovom istraživanju, pogotovo zbog toga jer je pripravak P2, bogatiji fenolnim spojevima, pokazao jače inhibicijsko djelovanje.



Slika 7. Rast micelija *S. parasitica* nakon 4 dana u prisutnosti pripravaka propolisa (oznake P1 i P2) te negativne kontrole (oznaka EtOH). Strelice prikazuju smjer i frontu radijalnog rasta.

Tablica 7. Prosječni radijalni rast micelija mikroorganizma *S. parasitica* u mm nakon 2 odnosno 4 dana pri 18 °C. Prikazane su prosječne vrijednosti četiri mjerenja ± standardna devijacija.

| Dan uzgoja | Uzorak | | |
|------------|-------------------------------------|-------------|-------------|
| | etanol/voda (negativna kontrola) | P1 | P2 |
| 2. dan | 18,8 ± 4,1 | 16,5 ± 1,9 | 14,75 ± 2,9 |
| 4. dan | 43,3 ± 1 | 24,25 ± 2,6 | 20,75 ± 2,8 |



Slika 8. 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 2, odnosno 4 dana. Rezultati su prosječne vrijednosti četiri mjerenja ± standardna devijacija.

Ovo je prvo istraživanje u kojem je demonstrirano inhibicijsko djelovanje propolisa na patogena *Saprolegnia parasitica*, uzročnika saprolegnioze. Ranijim istraživanjima slični su rezultati dobiveni na drugim vrstama oomiceta, kako biljnim patogenima iz rodova *Phytium* i *Phytophthora* (Yusuf i sur., 2005; Pazin i sur., 2019; Jurčević, 2018) tako i animalnim patogenima iz rodova *Aphanomyces* i *Phytium* (Araújo i sur., 2016; Campbell i sur., 2001; Jurčević, 2018). Campbell i sur (2001) su pokazali da je tinktura propolisa učinkovitije inhibirala micelij vrste *Aphanomyces invadans* od eteričnih ulja čajevca i češnjaka. Nadalje, u nedavnom istraživanju korišteni su isti pripravci propolisa P1 i P2 i isti način *in vitro* testiranja inhibicijske aktivnosti propolisa na rast micelija patogenih oomiceta *Aphanomyces astaci*, patogenu rakova te biljnim patogenima *Phytophthora plurivora* i *P. cactorum* (Jurčević, 2018). Kao i u ovom istraživanju, pripravak propolisa P2 s većim udjelom suhe tvari propolisa i dodatkom ekstrakata kadulje i paprene metvice snažnije je inhibirao rast micelija *A. astaci*, *P. plurivora* i *P. cactorum* od pripravka P1 koji nije imao dodane biljne ekstrakte. Najosjetljivija vrsta bila je *A. astaci* čiji je rast u prisutnosti P1 bio inhibiran za 70 % te 75 % u prisustvu P2. Vrste *P. plurivora* i *P. cactorum* pokazale su se manje osjetljivima i njihov rast bio je inhibiran za 40 do 50 %. Rezultati dobiveni ovim istraživanjem pokazali su da je patogen slatkovodnih životinja *Saprolegnia parasitica*, podjednako osjetljiva na pripravke propolisa kao i biljni patogeni iz roda *Phytophthora*.

Većina navedenih istraživanja, kao i istraživanje provedeno u sklopu ovog rada, bavila su se potencijalom propolisa za inhibiciju rasta micelija patogenih oomiceta. Međutim, zoospore, kao primarni infektivni stadij oomiceta, su značajno osjetljivije od micelija na djelovanje vanjskih faktora (Ziogas i Davidse, 1987). Primjerice, Campbell i suradnici (2001) su utvrdili da je bila potrebna sto i više puta niža koncentracija propolisa za potpunu inhibiciju pokretljivosti zoospora nego što je bilo potrebno da bi se inhibirao rast hifa vrste *Aphanomyces invadans*. Stoga bi u nastavku istraživanja trebalo istražiti kako propolis djeluje na zoospore vrste *Saprolegnia parasitica* mjereći njihovu brojnost, pokretljivost i vijabilnost. Temeljem ranijih istraživanja, mogu se očekivati pozitivni rezultati.

U posljednje se vrijeme sve više istražuju nove primjene propolisa, zbog njegovog širokog raspona antimikrobnog djelovanja i male toksičnosti za ljude i okoliš (Sajjad i sur., 2018; Al-Hariri 2019; Zakerkish i sur., 2019). Ranija istraživanja demonstrirala su mogućnost primjene propolisa kao dio prehrane u slatkovodnoj akvakulturi, u svrhu poboljšanja rasta životinja i poboljšanja zaštite od bakterijskih i virusnih patogena (Cruz-Cervantes i sur. 2018). Rezultati ovog rada ukazuju na

mogućnost primjene propolisa i u salmonidnoj akvakulturi, u svrhu zaštite riba i njihovih jaja od saprolegnioze.

5. Zaključak

U ovom je radu prvi put testirano inhibicijsko djelovanje propolisa na vrstu *Saprolegnia parasitica* te su dobiveni sljedeći rezultati:

- ❖ Koncentracije fenolnih spojeva u pripravcima propolisa bile su visoke. P1 sadržavao je koncentracije fenola od 7,2 mg GAE/mL, flavonoida 7,8 mg QE/mL, flavonola 4,8 mg QE/mL i hidroksicimetnih kiselina 27,8 mg CAE/mL, a P2 8,3 mg GAE/mL fenola, 8,7 mg QE/mL flavonoida, 6,3 mg QE/mL flavonola te 37,9 mg CAE/mL hidroksicimetnih kiselina.
- ❖ Koncentracije svih određivanih fenolnih spojeva bile su više u pripravku P2, što se može pripisati višoj koncentraciji suhe tvari propolisa, ali i prisutnosti ekstrakta kadulje i paprene metvice.
- ❖ *In vitro* testiranjem je utvrđeno da su oba pripravka propolisa inhibirala rast micelija vrste *Saprolegnia parasitica*. Nakon četiri dana uzgoja u prisutnosti propolisa, rast micelija bio je smanjen za 20 do 50 % u odnosu na kontrolu.
- ❖ Pripravak P2 pokazao je jači inhibicijski učinak nego što je to bilo kod P1 (prosječan rast od 50 % u odnosu na kontrolu nasuprot prosječnom rastu od 80 %), što se može objasniti višom koncentracijom bioaktivnih fenolnih spojeva.

Zaključno, dobiveni rezultati ukazuju na mogućnost buduće primjene propolisa u ekološki prihvatljivoj slatkovodnoj akvakulturi.

6. Popis literature

- Afzali F., Wong W.Y. (2017) *In vitro* screening of *Sonneratia alba* extract against the oomycete fish pathogen, *Aphanomyces invadans*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences* **16**: 1333-1340.
- Agbor G.A., Vinson J.A., Donnell P.E. (2014) Folin-Ciocalteu Reagent for Polyphenolic Assay. *International Journal of Food Science, Nutrition and Dietetics (IJFS)* **3**: 147-156.
- Al-Ani I., Zimmermann S., Reichling J., Wink M. (2018) Antimicrobial Activities of European Propolis Collected from Various Geographic Origins Alone and in Combination with Antibiotics. *Medicines (Basel)* **5**: 2-17.
- Alenezi S., Manal N.A., Natto J., De Koning H.P., Igoli J., G. Watson D.J. (2018) Chemical Profiling of Papua New Guinea Propolis and Assay its Antiprotozoal Activity. *Journal of Apitherapy and Nature* **1**: 35.
- Al-Hariri M. (2019) Immune's-boosting agent: Immunomodulation potentials of propolis. *Journal of Family and Community Medicine* **26**: 57-60.
- Andersson, M.G.R., Cerenius L. (2002) Pumilio homologue from *Saprolegnia parasitica* specifically expressed in undifferentiated spore cysts. *Eukaryot Cell* **1**: 105-111.
- 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.
- Attanassova 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.
- Benabdallah A., Rahmoune C., Boumendjel M., Aissi O., Messaoud C. (2016) Total phenolic content and antioxidant activity of six wild *Mentha* species (Lamiaceae) from northeast of Algeria. *Asian Pacific. Journal of Tropical Biomedicine* **6**: 760-766.
- Betances-Salcedo E., Revilla I., Vivar-Quintana A.M., Inmaculada G.M. (2017) Flavonoid and Antioxidant Capacity of Propolis Prediction Using Near Infrared Spectroscopy. *Sensors* **17**: 1647.

- Bezerra A.M.F, Farias M.C.A.D., Bezerra K.K.S., Albuquerque F.G.F., Filho A.F., Casimiro G.S., Nunes E.M., da Silva E.D.M.L, Bezerra W.K.T., de Almeida P.B., Maracaja P.B., Araujo A.d.S., da Silva R.S. (2015) Red propolis antifungal action on species of *Candida* of the oral cavity. *International Archives of Medicine* **8**: 1-9.
- Bilandžić N., Solomun Kolanović B., Varenina I. (2012) Surveillance of malachite green residues in farmed fish over a three-year period in Croatia. *Food Control* **26**: 393-396.
- Bispo Junior W., Miranda E.O., Alvino V., Araujo B., Silva D.W., Portirio Z. (2012) Atividade antimicrobiana de frações da propolis vermelha de Alagoas, Brasil. *Semina Ciências Biológicas Saúde* **33**: 3-10.
- Boyanova, L., Gregorova G., Nikolov R., Derejian S., Lazarova E., Katsarov N, Mitov I., Krastev Z. (2005) Activity of bulgarian propolis against 94 *Helicobacter pylori* strains in vitro by agar-well diffusion, agar dilution and disc diffusion methods. *Journal of Medical Microbiology* **54**: 481-483.
- Búfalo M.C., Candeias J.M., Sforcin J.M. (2009) *In vitro* cytotoxic effect of Brazilian green propolis on human laryngeal epidermoid carcinoma (HEp-2) cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **4**: 483-487.
- Burdock, G.A. (1998) Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis. *Food and Chemical Toxicology* **36**: 347-363.
- 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.
- Can Z., Yildiz O., Sahin H., Asadov A., Kolayli S. (2015) Phenolic profile and antioxidant potential of propolis from Azerbaijan. *Mellifera* **15**: 16-28.
- 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*. *Aquaculture* **358**: 146-154.
- Chang C.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.

- Clemmensen S., Jensen J.C., Jensen N.J., Meyer O., Olsen P., Würtzen G. (1984) Toxicological studies on malachite green: a triphenylmethane dye. *Archives of Toxicology* **56**: 43-45.
- Cummings, Benjamin. 2005. "PowerPoint Lectures for Biology: Concepts and Connections." *Campbell* (Pearson Education, Inc.).
<<https://slideplayer.com/slide/2466098/>> Pristupljeno 20.5.2019.
- Curifuta M., Jorge V., Jaime S.V., Aliro C., Salazar L.A., Alvear M. (2012) The *in vitro* antifungal evaluation of a commercial extract of Chilean propolis against six fungi of agricultural importance. *Ciencia e investigación agraria* **39**: 347-359.
- Curtis H., Noll U., Störmann J., Slusarenko A.J. (2004) Broad-spectrum activity of the volatile phytoanticipin allicin in extracts of garlic (*Allium sativum* L.) against plant pathogenic bacteria, fungi and Oomycetes. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **65**: 79-89.
- Dagostin S., Schärer H.J., Pertot I., Tamm L. (2011) Are there alternatives to copper for controlling grapevine downy mildew in organic viticulture? *Crop Protection* **30**: 776-788.
- 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.
- Debiaggi M., Tateo T., Pagani L., Luini M., Romero E. (1990) Effects of propolis flavonoids on virus infectivity and replication. *Microbiologica* **13**: 207-213.
- Dent M., Bursać Kovačević D., Bosiljkov T., Dragović-Uzelac V. (2017) Polyphenolic Composition and Antioxidant Capacity of Indigenous Wild Dalmatian Sage (*Salvia officinalis* L.) *Croatica Chemica Acta* **90**: 451-459.
- 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.
- 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* **51**: 1208

FAO. 2018. The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 – Meeting the sustainable development goals. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <<http://www.fao.org/3/i9540en/i9540en.pdf>> Pristupljeno 20.5.2019.

Fernandes A., Sugizaki M.F., Fogo M.L., Funari S.R.C., Lopes C.A.M. (1995) In vitro activity of propolis against bacteria and yeast pathogens isolated from human infections. *Journal of Venomous Animals and Toxins* **2**: 63-69.

Ghorbani A. Esmailzadeh M. (2017) Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components." *Journal of Traditional and Complementary Medicine* **7**: 433-440.

Gonzalez M., Guzman B., Rudyk R., Romano E. (2003) Spectrophotometric Determination of Phenolic Compounds in Propolis. *Acta Farmaceutica Bonaerense* **22**: 243-248.

Gozlan R.E., Marshall W.L., Lilje O., Jessop C.N., Gleason F.H., Andreou D. (2014) Current ecological understanding of fungal-like pathogens of fish: what lies beneath? *Frontiers in Microbiology* **5**: 1-16.

Harvey D.T. (2009) *Analytical Chemistry*. Vol. 2.
>http://dpuadweb.depauw.edu/harvey_web/eTextProject/version_2.1.html.<
Pristupljeno 30.5.2019.

Hatai, K., Egusa S. (1979) Studies on the pathogenic fungus of mycotic granulomatosis: Development of the medium for MG-fungus. *Fish Pathology* **13**: 147-152.

Hegazi A.G., El Hady F.K.A., Abd Allah F.A.M. (2000) Chemical composition and antimicrobial activity of European propolis. *Zeitschrift für Naturforsch* **55**: 71-75

Howard, L.R., Clark J.R., Brownmiller C. (2003) Antioxidant capacity and phenolic content in blueberries as affected by genotype and growing season. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **82**: 1238-1247.

- Ilondu E.M., Arimoro F.O., Sodje, A.P. (2009) The use of aqueous extracts of *Vernonia amygdalina* in the control of saprolegniasis in *Clarias gariepinus*, a freshwater fish. *African Journal of Biotechnology* **8**: 7130-7132.
- Isla M.I., Salas A., Danert F.C., Zampini I.C., Ordonez R. (2014) Analytical methodology optimization to estimate the content of non-flavonoid phenolic compounds in Argentine propolis extracts. *Pharmaceutical Biology* **52**: 835-840.
- Jiang T.F., Lv Z.H., Cui X.Y., Wang Y.H. (2012) Analysis of malachite green, gentian violet and their leuco metabolites in catfish and carp by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Food and Drug Analysis* **20**: 94-100.
- Jurčević, M. (2018) Inhibicijski učinak propolisa na patogene mikroorganizme iz skupine Oomycetes. *Završni rad. Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu*
- Kamoun, S. (2003) Molecular genetics of pathogenic oomycetes. *Eukaryotic Cell* **2**: 191-199.
- Khallil A.R.M. (2001) Phytofungitoxic properties in the aqueous extracts of some plants. *Pakistan Journal of Biological Sciences* **4**: 392-394.
- Koo H., Rosalen P.L., Cury J.A., Park Y.K., Bowen W.H. (2002) Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**: 1302-1309.
- Kosalec I., Bakmaz M., Pepeljnjak S., Vladimir-Knezević S. (2004) Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. *Acta Pharmaceutica* **54**: 65-72.
- Krol W., Scheller S., Shani J., Pietsz G., Zcuba Z. (1993) Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on the growth of *Staphylococcus aureus*. *Arzneimittelforschung* **43**: 607-609.
- Kujumgiev A., Bankova V., Ignatova A., Popov S. (1993) Antibacterial activity of propolis, some of its components and their analogs. *Pharmazie* **48**: 785-786.

Kuropatnicki A.K, Szliszka E., Krol W. (2013) Historical Aspects of Propolis Research in Modern Times. *Evidence-Based complementary and alternative medicine* <<https://www.hindawi.com/journals/ecam/2013/964149/>> Pristupljeno 20.5.2019.

Lotfy, M. (2006) Biological activity of bee propolis in health and disease. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* **7**: 22-31.

Lučić, D. (2018) Priprema ekstrakata lista kadulje (*Salvia officinalis* L.) i određivanje polifenolnih spojeva. Završni rad. *Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu*.

Manach C., Scalbert A., Mnorad C., Remesy C., Jimenez L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* **79**: 727-747.

Meyer F.P., Jorgenson T. A. (1983) Teratological and Other Effects of Malachite Green on Development of Rainbow Trout and Rabbits. *Transactions of the American Fisheries Society* **112**: 818-824.

Miguel M.G., Nunes S., Dandlen S.A., Cavaco A.M., Antunes M.D (2014) Phenols, flavonoids and antioxidant activity of aqueous and methanolic extracts of propolis (*Apis mellifera* L.) from Algarve, South Portugal. *Food Science and Technology* **34**: 16-23.

Mirzoeva O.K., Grishanin R.N., Calder P.C. (1997) Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiological Research* **152**: 239-246.

Mittelstaedt R.A., Mei N., Webb P.J., Shaddock J.G., Dobrovolsky V.N., McGarrity J., Morris S.M., Chen T., Beland F.A., Greenless K.J. (2004) Genotoxicity of malachite green and leucomalachite green in female Big Blue B6C3F1 mice. *Mutation Research* **561**: 127-138.

Mokhtar A.B., El-Gayar E.K., Habib E.S. (2016) *In vitro* antiprotozoal activity of ethanolic extract of Egyptian propolis and a cysteine protease inhibitor, phenyl vinyl sulfone (PVS) on *Blastocystis* sp. *Journal of Egyptian Society of Parasitology* **46**: 261-272.

Monzote L., Cuesta-Rubio O., Campo Fernandez M., Márquez Hernandez I., Fraga J., Pérez K., Kerstens M., Maes L., Cos P. (2012) *In vitro* antimicrobial assessment of Cuban propolis extracts. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **107**: 978-984.

- Mouhoubi-Tafinine Z., Ouchemoukh S., Tamendjari A. (2016) Antioxydant activity of some algerian honey and propolis. *Industrial crops and products* **88**: 85-90.
- Naczki M, Shahidi F. (2004) Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science* **30**: 3268-3295.
- Nélida N., Quispe C., Jiménez-Aspee F., Theoduloz C., Giménez A., Schmeda-Hirschmann G. (2015) Chemical profiling and antioxidant activity of Bolivian propolis. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **96**: 2142-53.
- Ozcan, M. (1999) Antifungal properties of propolis. *Grasas y Aceites* **5**: 395-398.
- Parolia, A., Thomas, M.S., Kundabala, M., Mohan, M. (2010) Propolis and its potential uses in oral health. *International Journal of Medicine and Medical Sciences* **2**: 210-215.
- Pavilonis A., Baranauskas A., Puidokaite L., Mazeliene Z., Savickas A., Radziūnas R. (2008) Antimicrobial activity of soft and purified propolis extracts. *Medicina* **44**: 977-983.
- 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) Review 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*) egg. *Journal of Food, Agriculture & Environment* **7**: 94-96.
- Pottinger T.G., Day J.G. (1999) A *Saprolegnia parasitica* challenge system for rainbow trout: assessment of Pyceze as an anti-fungal agent for both fish and ova. *Diseases of Aquatic Organisms* **36**: 129-141.
- Rahman T., Chowdhury M.B.R, Faruk M.A.R. (2008) Efficacy of selected chemotherapeutic and medicinal plants on Fungal Fish pathogens. *Progressive Agriculture* **19**: 105-116.

- Ramudu D.K., Dash G. (2013) A Review on Herbal Drugs Against Harmfull Pathogens in Aquaculture. *American Journal of Drugs* **3**: 209-219.
- HAH- Hrvatska agencija za hranu (2011). RASFF - brzi sustav uzbunjivanja za hranu i hranu za životinje <<https://www.hah.hr/arhiva/rasff.php>.> Pristupljeno 29.8.2019.
- Rodino S., Dobre A., Butu M. (2013) Screening of some indigenous plants for identifying the inhibitory effect against *Phytophthora infestans*. *Vasile Goldis University Press* **23**: 483-486.
- Sajjad S., Malik H., Saeed L., Hashim I., Farooq U., Manzoor F. (2018) Synergistic potential of propolis and vitamin e against sub-acute toxicity of AlCl₃ in albino mice: *in vivo* study. *Physiological Research* **68**: 67-74.
- Salonen A., Saarnio S., Julkunen-Tiitto R. (2012) Phenolic compounds of propolis from the boreal coniferous zone. *Journal of Apicultural Science* **56**: 13-22.
- 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.
- Schnitzler P., Neuner A., Nolkemper S., Zundel C., Nowack H., Sensch K.H., Reichling J. (2010) Antiviral activity and mode of action of propolis extracts and selected compounds. *Phytotherapy Research* **24**: 20-28.
- Shimizu K., Ashida H., Matsuura Y., Kanazawa K. (2004) Antioxidative bioavailability of artemisinin in Brazilian propolis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **424**: 181-188.
- 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.
- 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.

Siheri W., Igoli J.O., Gray A.I., Nasciemento T.G., Zhang T., Fearnley J., Clements C.J., Carter K.C., Carruthers J., Edrada-Ebel R., Watson D.G. (2014) The isolation of antiprotozoal compounds from Libyan propolis. *Phytotherapy Research* **12**: 1756-60-

Siqueira A.B.S., Cambium I., Maia R., Souza-Motta C.M., Gomes B.S, Abreu S. (2009) *Trichophyton* species susceptibility to green and red propolis from Brazil. *Letters in Applied Microbiology* **48**: 90-96.

Škof M. (2018) Utjecaj ljekovite kadulje (*Salvia officinalis* L.) na patogene mikroorganizme iz skupine Oomycetes. *Završni rad. Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu.*

Socha R., Gałkowska D., Bugaj M., Juszczak L. (2015) Phenolic composition and antioxidant activity of propolis from various regions of Poland. *Natural Product Research* **29**: 416-422.

Songe M.M. (2015) Pathogenicity and infectivity of *Saprolegnia* species in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and their eggs. Oslo, Norway: Doktorska disertacija. Faculty of Veterinary Medicine and Biosciences, Norwegian University of Life Sciences.

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* **46**: 1-13.

Uzel A., Sorkun K., Onçağ O., Cogulu D., Gençay O., Salih B. (2005) Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiology* **160**: 189-195.

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.

Vujović T. (2018) Utjecaj lovora (*Laurus nobilis* L.) na patogene mikroorganizme iz skupine Oomycetes. *Završni rad. Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu.*

Wang X., Sankarapandian K., Cheng Y., Woo S.O., Kwon H.W., Perumalsamy H., Ahn Y.-J. (2016) Relationship between total phenolic contents and biological properties of

propolis from 20 different regions in South Korea. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **16**: 23-41

Yang, M.C., Fang J.M., Kuo T.F., Wang D.M., Huang Y.L., Liu L.Y., Chen P.H., Chang T.H. (2007) Production of antibodies for selective detection of malachite green and the related triphenylmethane dyes in fish and fishpond water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**: 8851-8856.

Yusuf Y., Durdane Y., Servet A. (2005) Antifungal activity of Turkish propolis against *Phytophthora* species. *Plant Pathology Journal* **4**: 58-60.

Zakerkish M., Jenabi M., Zaeemzadeh N., Hemmati A.A., Neisi N. (2019) The Effect of Iranian Propolis on Glucose Metabolism, Lipid Profile, Insulin Resistance, Renal Function and Inflammatory Biomarkers in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: A Randomized Double-Blind Clinical Trial. *Scientific Reports* **9**: 7289

Ziogas, B.N., Davidse L.C. (1987) Studies on the mechanism of action of cymoxanil in *Phytophthora infestans*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **29**: 89-96.

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.

Ava-Marija Iveljić

ime i prezime studenta