

In vitro istraživanje utjecaja propolisa na rast micelija uzročnika račje kuge, *Aphanomyces astaci*, Schikora, 1906.

Čakarić, Ivana

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:159:254899>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-12**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Ivana Čakarić

7607/BT

***In vitro* istraživanje utjecaja propolisa na rast
micelija uzročnika račje kuge, *Aphanomyces*
astaci, Schikora, 1906.**

ZAVRŠNI RAD

Naziv znanstveno-istraživačkog 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

***In vitro* istraživanje utjecaja propolisa na rast micelija uzročnika račje kuge, *Aphanomyces astaci*, Schikora, 1906.**

Ivana Čakarić, 58212904

Sažetak: Mikroorganizam iz skupine Oomycetes, *Aphanomyces astaci*, uzrokuje smrtonosnu bolest račju kugu te je odgovoran za pomore čitavih populacija slatkovodnih rakova u prirodi i akvakulturi. Dosadašnje metode prevencije i liječenja račje kuge uključuju kemikalije štetne za ljudsko zdravlje i okoliš pa je cilj ovog rada bio istražiti djelovanje propolisa, kao ekološki prihvatljive metode, na rast micelija patogena. Inhibicijsko djelovanje propolisa demonstrirano je disk-difuzijskom metodom te je utvrđena inhibicija rasta micelija uzorcima propolisa od 40 %. Potom su eksperimentalno određene EC₅₀-vrijednosti, odnosno koncentracije potrebne za postizanje 50 %-inhibicije koje su iznosile 5,6 odnosno 8,9 µg/mL za uzorke propolisa te 2,6 µg/mL za krizin, dominantni flavonoid u uzorcima propolisa. Ovo istraživanje demonstriralo je i kvantificiralo antioomicetno djelovanje propolisa te dobiveni rezultati otvaraju mogućnost korištenja propolisa kao komercijalnog antioomicetnog agensa u akvakulturi.

Ključne riječi: (disk–difuzijska metoda, EC₅₀, propolis, račja kuga)

Rad sadrži: 24 stranica, 7 slika, 5 tablica, 58 literaturnih navoda, 0 priloga

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.

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**

***In vitro* study on the effect of propolis on the mycelial growth of
Aphanomyces astaci, Schikora, 1906., the causative agent of crayfish
plague**

Ivana Čakarić, 58212904

Abstract: The microorganism *Aphanomyces astaci* (Oomycetes) causes the lethal disease crayfish plague and is responsible for the decline of freshwater crayfish populations in nature and in aquaculture. Conventional methods of preventing and treating the disease use chemicals that are harmful to human health and the environment. The aim of this study was therefore to test the effect of propolis as an environmentally friendly method on the pathogen mycelial growth. The inhibitory effect of propolis on the growth of the mycelium was demonstrated by the disk-diffusion method, and the inhibition of mycelial growth was achieved by propolis concentration of about 40%. Subsequently, the EC₅₀ values, i.e. the concentrations required to achieve 50% inhibition, were experimentally determined to be 5.6 and 8.9 µg/mL for propolis samples and 2.6 µg/mL for chrysin, the dominant flavonoid in propolis. The results of this study open up the possibility of using propolis as a commercial antioomycetic in aquaculture.

Keywords: (crayfish plague, disk-diffusion assay, EC₅₀, propolis)

Thesis contains: 24 pages, 7 figures, 5 tables, 58 references, 0 supplements

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.

Defence date:

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Teorijski dio	2
2.1 Astacikultura	2
2.2 Račja kuga	3
2.3.1 Kemijski agensi	6
2.3.2 Prirodni pripravci	6
2.3.2.1 Propolis	7
3. Materijali i metode	8
3.1 Ispitivani uzorci	8
3.2 Uzgoj ispitivanog mikroorganizma	10
3.2.1 Priprema hranjive podloge	10
3.3 <i>In vitro</i> metode testiranja inhibicijskog djelovanja propolisa prema rastu micelija <i>Aphanomyces astaci</i>	10
3.3.1 Disk-difuzijska metoda	11
3.3.2 Određivanje EC₅₀ –vrijednosti	13
4. Rezultati	14
4.1 Inhibicija rasta micelija disk-difuzijskom metodom	14
4.2 Inhibicija rasta micelija tvarima otopljenima u hranjivoj podlozi	15
5. Rasprava	16
6. Zaključak	18
7. Popis literature	19

1. Uvod

Aphanomyces astaci, Schikora, 1906., je mikroorganizam iz skupine Oomycetes, uzročnik visoko zarazne i letalne bolesti slatkovodnih rakova - račje kuge (Alderman, 2003). Ova je bolest dovela do značajnih smanjenja brojnosti rakova u prirodi, ali i ekonomskih šteta u akvakulturi (Huner, 1994; Ackefors, 2000). Zaraženi rakovi ne zadovoljavaju zahtjeve tržišta, stoga nisu prikladni za prodaju (Jussila i sur., 2011), ali osim direktnog ekonomskog gubitka uzrokovanog uginulim i zaraženim jedinkama, veliki troškovi nastaju i pokušajima sprječavanja širenja bolesti, liječenja te nadoknade brojnosti populacija u akvakulturi (Jernelöv, 2017).

Metode koje se tradicionalno koriste u svrhu prevencije i liječenja račje kuge manjkave su te nerijetko predstavljaju opasnost za zdravlje ljudi i životinja. Primjerice, malahitno zelenilo je spoj koji pokazuje izrazito inhibicijsko djelovanje prema rastu micelija patogena *A. astaci*, ali ujedno ima svojstvo bioakumulacije te je toksično i kancerogeno, stoga je danas zabranjeno u Europskoj uniji, SAD-u i mnogim drugim zemljama (Alderman, 2003). Komercijalno često korišteni spoj, formalin (Jernerlov, 2017), također ima negativne strane, npr. predstavlja rizik za zdravlje ljudi, radnika u akvakulturi ali i krajnjih potrošača zbog njegovih ostataka u mesu (Wooster i sur., 2005).

Obzirom na manjkavost tradicionalno korištenih kemikalija, ali i rastom svijesti o ekološkoj poljoprivredi i održivom gospodarstvu, javlja se potreba za korištenjem neopasnih, prirodnih tvari s antioomicetnim učinkom, poput propolisa. Propolis, zahvaljujući kemijskom sastavu bogatom bioaktivnim tvarima, među kojima najvažniju ulogu zauzimaju polifenoli (Hegazi i sur., 2000), pokazuje inhibicijsko djelovanje prema brojnim mikroorganizmima, poput Gram-pozitivnih bakterija i gljivica (Drago i sur. 2000). Međutim njegovo je antioomicetno djelovanje mnogo slabije istraženo, većinom s fokusom na oomicetne uzročnike biljnih bolesti, primjerice vrstu *Phytophthora cambivora* (Silva-Castro i sur., 2017).

Cilj ovog rada bio je demonstrirati i kvantificirati antioomicetno djelovanje propolisa prema rastu micelija mikroorganizma *Aphanomyces astaci*, uzročnika račje kuge, u *in vitro* uvjetima.

2. Teorijski dio

2.1 Astacikultura

Astacikultura je uzgoj slatkovodnih rakova i kao gospodarska grana posljednjih godina doživljava izuzetno brz rast te je u 2017. godini tržište doseglo vrijednost veću od 10 milijardi dolara (FAO, 2019). U 2020. godini najveći izvoznik slatkovodnih rakova bio je Novi Zeland, a u Europi Norveška (Tridge, 2021). Osim toga, uslijed rasta potražnje, brzi rast proizvodnje slatkovodnih rakova bilježi Kina gdje se rakovi uzgajaju ekstenzivno u poljima riže (Wang i sur., 2018).

U Europi se uzgajaju četiri vrste slatkovodnih rakova (Ackefors, 2000). Najveću cijenu po jedinki postižu zavičajne vrste riječni rak, *Astacus astacus* (Slika 1a) te uskoškari rak *Pontastacus leptodactylus* (Slika 1c). U europskoj astacikulturi važno mjesto zauzimaju i dvije uvezene, izvorno sjevernoameričke vrste, *Pacifastacus leniusculus* (Slika 1b) te *Procambarus clarkii* (Slika 1d) (Holdich, 1993). Vrsta *Procambarus clarkii* je veličinom najmanja, ali njegova pojavnost je najčešća te obuhvaća većinu svjetske proizvodnje slatkovodnih rakova (Vogt, 2021).

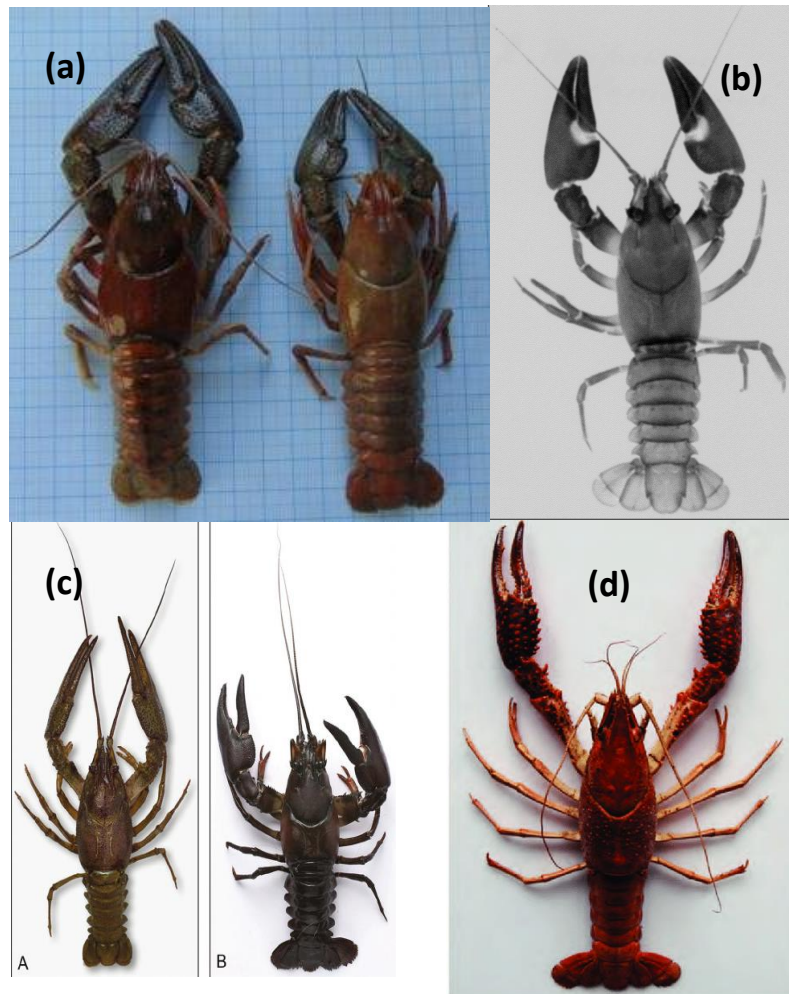
Rakovi su luksuzna namirnica visoke cijene te je njihov uzgoj ekonomski privlačan. Prinos mesa raka značajno ovisi o vrsti te najveća količina dolazi iz repa raka, odnosno trbušnog mišića, a nešto manje i iz klijesta (Holdich, 1993).

Astacikultura većinski podrazumijeva ekstenzivni ili u manjoj mjeri semi-ekstenzivni uzgoj (Holdich, 1993), ovisno o tome hrane li se rakovi prirodnom hranom ili se prihranjuju dodatcima prehrani (Vogt, 2021). Rakovi tijekom svih razvojnih faza imaju jednake prehrambene potrebe što omogućuje njihov uzgoj u ekstenzivnoj akvakulturi uz relativno jeftinu prehranu koja uključuje komadiće ribe, mrkve, krumpira, biljnog otpada, žitarica, komadiće mesa, zooplankton i slično (Ackefors, 2000). Tipična uzgajališta obuhvaćaju otvorene zemljane ribnjake (Vogt, 2021) ili jezera, kanale za navodnjavanje i potoke (Hollows, 2016), dok su zatvoreni sustavi rijetki te se smatraju komercijalno neisplativima (Vogt, 2021)

Uvjeti uzgoja su relativno jednostavni pri čemu važnu ulogu uz prehranu rakova imaju temperatura vode, pH i koncentracija anorganskih iona (posebice kalcija koji igra važnu ulogu u građi egzoskeleta raka) (Ackefors, 2000).

Klima, a posljedično i temperatura vode, jest faktor koji determinira koja vrsta slatkovodnog raka će biti najzastupljenija na pojedinom području. Dok je, primjerice, riječni rak *A. astacus* karakterističan za hladniju klimu vrsta *P. clarkii* je više prilagođena toplijim, gotovo subtropskim uvjetima (Ackefors, 2000). Temperatura okoline direktno utječe na vrijeme inkubacije jajašaca te brzinu rasta rakova. Istraživanja pokazuju kako je godišnja

produkcija slatkovodnih rakova po jedinici površine znatno viša u toplijim nego u hladnim područjima (Ackefors, 2000; Hollows, 2016). Ta činjenica jedan je od razloga zašto jug Europe ostvaruje nešto bolje prinose u akvakulturi nego što je to slučaj u sjevernoj Europi. Iz tog razloga se u primjerice Finskoj na uzgajalištima slatkovodnih rakova primjenjuju brojne metode sa svrhom zagrijavanja vode, poput pokrivanja uzgajališta suhim lišćem i sličnim materijalima (Jussila i Manonnen, 1995).



Slika 1: Riječni rak, *Astacus astacus* (a) (Roljić i sur., 2020); signalni rak, *Pacifastacus leniusculus* (b) (Ackefors, 2000); uskoškari rak, *Pontastacus leptodactylus*, (c) (Huys i sur., 2014); *Procambarus clarkii* (d) (Boets i sur., 2009)

2.2 Račja kuga

Uzročnik račje kuge je jednostanični protist sličan gljivama *Aphanomyces astaci*. Ovaj mikroorganizam iz skupine Oomycetes je od strane Međunarodnog saveza za očuvanje prirode i prirodnih bogatstava uvršten u 100 najgorih stranih invazivnih vrsta na svijetu (Lowe i sur.,

2000), prvenstveno zbog devastirajućeg učinka kojeg je širenje račje kuge imalo na zavičajne populacije europskih rakova u prirodi, ali i u akvakulturi.

Patogen *A. astaci* razmnožava se putem pokretnih zoospora s dva biča, koje ujedno služe kao infektivne jedinice (Ackefors, 2000; Holdich i sur., 2009). Kada zoospore dospiju na površinu kutikule raka, odbacuju bičeve i formiraju penetracijski oblik koji djelovanjem enzima hitinaza i proteaza razgrađuje kutikulu raka (Svensson, 1978). Hife prodiru kroz kutikulu i šire se kroz tkiva i organe uzrokujući smrtonosnu bolest.

Klinički znakovi kod netom zaražene životinje često ne postoje ili su teško uočljivi, dok u terminalnoj fazi bolesti postaju izraženiji (Buller, 2018). Početkom infekcije pojavljuju se nespecifični simptomi, poput bijelih diskoloracija na tijelu raka (Slika 2) koje mogu ukazivati i na druge račje bolesti (Longshaw, 2011). U nešto kasnijoj fazi pojavljuje se crvenkasto-smeđa melanizacija koja označava mjesto na kojem su hemociti inkapsulirali hife. U posljednjoj fazi bolesti životinja pokazuje znakove neurotoksičnosti. Tipično noćne životinje izlaze na danje svjetlo, gube koordinaciju, a u najekstremnijim slučajevima gube oči ili udove (Buller, 2018).

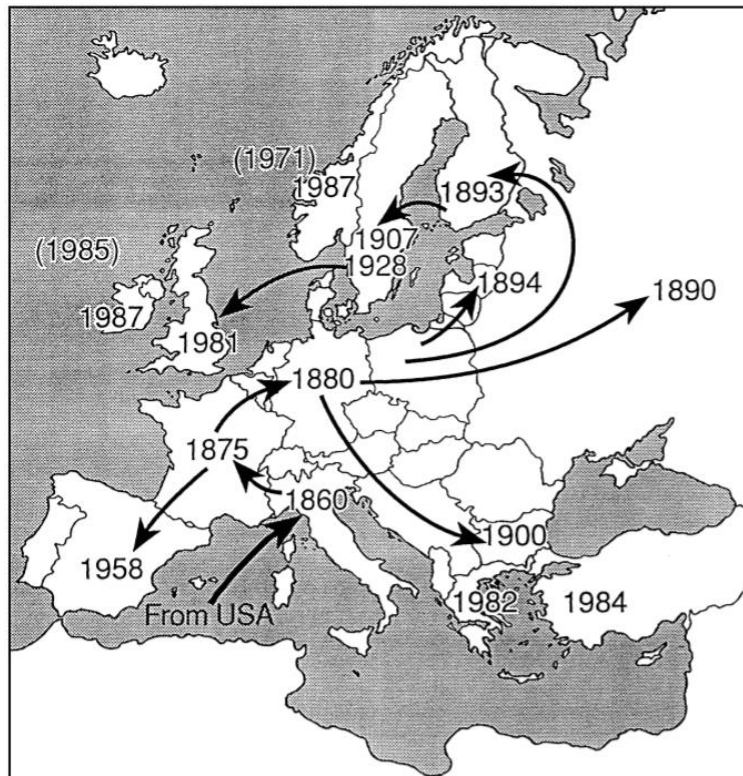


Slika 2: Jedinka vrste *A. astacus* zaražena račjom kugom. Vidljive su bijele diskoloracije na trbušnom mišićju raka, melanizacija kutikule te erozija egzoskeleta (Jussila i sur., 2014)

Životinje uginule od račje kuge te one s uznapredovalim stadijem bolesti izvor su novih infektivnih zoospora (Longshaw, 2011). Voda je najbolji medij za širenje spora, ali je njihov prijenos moguć i bilo kojim kontaminiranim predmetom, poput ribarske opreme koja se prenosi iz jednog u drugi vodotok. Spore pri odgovarajućim uvjetima (visoka vlažnost, niska temperatura) mogu preživjeti i do 16 dana (Holdich i sur., 2009).

Bolest se prvi put pojavila u Europi 1859. godine i to u Italiji. Smatra se da je teretni brod iz sjeverne Amerike ispustio je balastne vode u blizini grada Genove, a u vodi su se nalazili

živi zaraženi rakovi (Ackefors, 2000). Posljedica tog događaja bilo je širenje račje kuge po čitavom kontinentu (Slika 3).



Slika 3: Širenje račje kuge Europom (Ackefors, 2000)

Ljudskim djelovanjem i translokacijom rakova (iz jednog u drugo uzgajalište, nehotećim puštanjem rakova u prirodu itd.) bolest dopijeva u akvakulturu te se, posljedično, europski uzgajivači nerijetko susreću s pomorom čitavih uzgajanih populacija (Viljamaa–Dirks i sur., 2011). Kako bi se nadomjestile izgubljene jedinice, šezdesetih godina prošlog stoljeća Švedska iz Sjeverne Amerike uvozi signalne rakove, pripadnike vrste *Pacifastacus leniusculus* (Holdich, 1993). Uvezeni rakovi su uglavnom otporni na račju kugu, ali su njeni prijenosnici (Alderman i sur., 1987; Ackefors, 2000; Svoboda i sur., 2016.) pa tijekom izvoza u mnoge druge europske zemlje šire i patogena *A. astaci*. Širenje bolesti dovodi do pomora brojnih zavičajnih populacija (Holdich, 1993). Populacije napadnute račjom kugom nerijetko doživljavaju i stopostotnu smrtnost (Hochwimmer i sur., 2009). U slučaju prirodnih populacija takva pojava može dovesti do ekološke neravnoteže u okolišu, obzirom da jedna čitava karika prehrambenog lanca iščezne (Jernelöv, 2017). Ovo se dogodilo s mnogim europskim populacijama rakova nakon prvog širenja račje kuge u prošlom stoljeću.

Naknadno je dokazano kako račja kuga može negativno djelovati i na otporne uvezene rakove. Prisutnost patogena uzrokuje kontinuirano pojačan imunski odgovor u organizmu

raka, što predstavlja stanje stresa u kojem razne oportunističke infekcije mogu biti letalne po životinju (Edgerton i sur., 2004). Nešto novija istraživanja otkrila su kako i invazivne vrste rakova, poput signalnog raka, mogu podlijeći zarazi patogenom *A. astaci*. Osobito juvenilne jedinke ili odrasle jedinke pod stresom, primjerice zbog previsoke temperature vode i prevelike gustoće u ekstenzivnom akvakulturnom okruženju (Aydin i sur., 2014; Thomas i sur., 2020).

2.3 Mogućnosti kontrole račje kuge u akvakulturi

2.3.1 Kemijski agensi

Tradicionalno se u svrhu prevencije i tretmana infekcija račjom kugom primjenjivalo malahitno zelenilo (Alderman i Polglase, 1985). Međutim, malahitno zelenilo je kancerogena tvar sa svojstvom bioakumulacije pa je danas njegova upotreba zabranjena u Europskoj uniji, SAD-u i mnogim drugim zemljama (Svoboda i sur., 2016). Nadalje, magnezijev klorid, ukoliko se primijeni u odgovarajućoj koncentraciji, sprječava sporulaciju odnosno rast micelija patogena *A. astaci*. Međutim, njegovi učinci su privremeni. Stoga se radi o fungistatiku, a ne o fungicidu široke primjene (Räntamaki i sur., 1992). Od organskih spojeva peroctena kiselina pokazuje inhibicijski učinak prema uzročniku račje kuge, pogotovo u kombinaciji s filtracijom vode kroz filter promjera pora 5 µm (Jussila i sur., 2011), ali koncentracije učinkovite protiv patogena *A. astaci* mogu biti otrovne za vodene organizme (Jussila i sur., 2014).

2.3.2 Prirodni pripravci

Obzirom na iznad opisane nedostatke kemijskih agensa dostupnih za kontrolu račje kuge, u posljednje se vrijeme sve više istražuje inhibicija mikroorganizma *A. astaci* tvarima prirodnog podrijetla, poput bagremovog meda razrijeđenog vodom, različitih eteričnih ulja i biljnih ekstrakata (Pagliarulo i sur., 2018; Sateriale i sur., 2018; Miljanović i sur., 2021). Primjerice, nedavno je pokazano da eterična ulja kadulje (*Salvia officinalis*), ružmarina (*Rosmarinus officinalis*) te lovora (*Laurus nobilis*) inhibiraju rast micelija i klijanje zoospora *A. astaci* pri čemu je najefikasnije eterično ulje kadulje (Miljanović i sur., 2021). Nadalje, ekstrakt kore drveta *Zanthoxylum rhoifolium* inhibira rast micelija i proizvodnju zoospora patogena *A. astaci* te djeluje fungicidno (Sateriale i sur., 2018). Osim toga, nekoliko istraživanja navode prirodne spojeve, poput ekstrakta čajevca, drveta *Cassia fistula* i stabla mangrova *Sonneratia alba*, koji pokazuju *in vitro* inhibicijsko djelovanje prema filogenetski srodnom patogenu *Aphanomyces invadans* (Campbell i sur., 2001; Borisutpeth i sur., 2014; Yogeshwari i sur., 2014; Afzali i Wong, 2017), uzročniku epizootskog ulceroznog sindroma kod riba (Yogeshwari i sur., 2014).

2.3.2.1 Propolis

Obzirom na ranije navedene nedostatke postojećih metoda kontrole račje kuge te potragu za inovativnim, ekološki prihvatljivim metodama, pojavila se ideja korištenja propolisa kao antioomicetnog pripravka (Campbell i sur., 2001).

Propolis je tvar prirodnog podrijetla kojeg proizvode pčele. Formira se od tvari koje su pčele prikupile iz biljaka, cvjetova, smola i sličnog. Primarna namjena propolisa je strukturalna zaštita košnice – pčele ga koriste za ispunjavanje eventualnih pukotina te zaglađivanje hrapavih površina košnice. Omjeri sastojaka propolisa variraju ovisno o geografskoj lokaciji i mjestu prikupljanja (Wagh, 2013), ali svaki propolis sadrži smolu, vosak, eterična ulja, pelud te ostale organske komponente, uključujući flavonoide (Burdock, 1998).

Propolis je dobro poznata antimikrobna tvar s dokazanim djelovanjem protiv bakterija i gljivica (Grange i Davey, 1990; Sforcin i sur., 2000; Ota i sur., 2001). Propolis pokazuje inhibicijsko djelovanje protiv brojnih bakterija koje uzrokuju bolesti ljudi i životinja, između ostaloga *Staphylococcus aureus* (čak i MRSA pokazuje osjetljivost na propolis (Grange i Davey, 1990)) te *Escherichia coli* (Sforcin i sur., 2000). Nešto bolja učinkovitost primijećena je za Gram-pozitivne bakterije, posebice štapiće i koke, nego za Gram-negativne bakterije. Smatra se kako antibakterijska svojstva propolisa duguje svom sastavu i to prvenstveno bogatom udjelu flavonoida (Grange i Davey, 1990). Osim toga, propolis se u *in vitro*, ali i u *in vivo* uvjetima pokazao kao efikasan fungicid. Primjerice, nakon što je u *in vitro* uvjetima pokazano inhibicijsko djelovanje prema vrstama iz roda *Candida*, pozitivni učinci propolisa potvrđeni su kliničkim ispitivanjem. Pacijenti koji su uzimali pripravke s propolisom imali su smanjen broj stanica patogena u uzorku sline (Ota i sur., 2001).

Iako je antimikrobna aktivnost propolisa dobro istražena, radovi koji dokazuju antioomicetno djelovanje propolisa su malobrojni, ali pokazuju da je propolis učinkovit inhibitor oomicetnih uzročnika bolesti biljaka (Silva-Castro i sur., 2018; Pazin i sur., 2019) i životinja (Campbell i sur., 2001; Araújo i sur., 2016; Jurčević, 2018; Iveljić, 2019). Primjerice, biljni patogen *Pythium aphanidermatum* otporan na većinu komercijalno dostupnih fungicida pokazuje osjetljivost prema zelenom propolisu porijeklom iz biljke *Baccharis dracunculifolia*, kao i njegovom ključnom sastojku artepilinu C (Pazin i sur., 2019). Nadalje, demonstrirano je inhibicijsko djelovanje propolisa prema vrstama *A. invadans* (Campbell i sur., 2001) i *Saprolegnia parasitica* (Iveljić, 2019), patogenima riba srodnima uzročniku račje kuge. Naposljetku, pokazano je inhibicijsko djelovanje propolisa prema rastu micelija patogena *A. astaci* disk-difuzijskom metodom te je utvrđeno kako propolis ima snažnije djelovanje prema *A. astaci* nego prema dvije testirane vrste iz roda *Phytophthora*, oomicetnim patogenima biljaka.

3. Materijali i metode

3.1 Ispitivani uzorci

Cilj ovog rada bio je odrediti inhibicijsko djelovanje uzoraka propolisa P1 i P2 te dva dominantna flavonoida iz propolisa, krizin i pinocembrin, na rast micelija patogena *A. astaci*. Kao pozitivna kontrola korišteno je malahitno zelenilo, poznati inhibitor rasta oomiceta (Alderman i Polglase, 1985). Testirane tvari otopljene su u otapalima navedenima u Tablici 1.

Tablica 1: Ispitivane tvari te pripadajuća otapala.

Tvar	Otapalo
Propolis (P1 i P2)	Etanol
Pinocembrin	Etanol
Krizin	0,1M NaOH
Malahitno zelenilo	Destilirana voda

Tijekom provođenja eksperimenta korištena su dva uzorka propolisa, P1 i P2, koji se međusobno razlikuju po svom sastavu. Uzorak P1 sadrži 200000 µg suhe tvari propolisa po mililitru uzorka, a uzorak P2 ima 250000 µg suhe tvari propolisa po mililitru te dodatke ekstrakata kadulje, *Salvia officinalis*, u masenoj koncentraciji 250000 µg/mL i paprene metvice, *Mentha piperita*, u koncentraciji 190000 µg/mL.

Fenolni sastav tekućih pripravaka propolisa određen je vezanim sustavom tekućinske kromatografije ultravisoke učinkovitosti i dvojne masene spektrometrije (UPLC/MS-MS, eng. *ultra performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry*) u Laboratoriju za procese sušenja i praćenje stabilnosti biološki aktivnih spojeva Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta (Tablica 2). Spojevi koji su bili prisutni u najvećoj koncentraciji kod oba pripravka propolisa su bili flavoni krizin i apigenin te flavanon pinocembrin.

Tablica 2: Sastav pripravaka propolisa P1 i P2 određen vezanim sustavom tekućinske kromatografije ultravisoke učinkovitosti i dvojne masene spektrometrije

	masena koncentracija γ ($\mu\text{g/mL}$)	P1	P2
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
	Izoramnatin	0,24	0,40
	Ramnatin	1,22	0,77
	Galangin	6,96	7,00
	<i>Ukupno</i>	<i>10,80</i>	<i>25,20</i>
Flavoni	Apigenin	182,593	119,528
	Krizin	734,27	838,38
	Luteolin	30,10	19,11
	<i>Ukupno</i>	<i>946,97</i>	<i>977,01</i>
Flavanoni	Sakuranetin	0,48	0,00
	Naringenin	1,77	1,09
	Pinocembrin	34,74	15,78
	Pinobanksin	0,26	0,11
	<i>Ukupno</i>	<i>37,25</i>	<i>16,98</i>
Flavonoidi	Ukupno	995,02	1019,20
Fenolne kiseline i derivati	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
	Ukupno	115,69	201,39
Drugi spojevi	Vanilin	39,15	22,44

3.2 Uzgoj ispitivanog mikroorganizma

U istraživanju je korišten mikroorganizam *Aphanomyces astaci* (Schikora, 1906) soj B, Psl – genotip (izolat PEC 8) (osigurao F. Grandjean iz Sveučilišta u Poitiersu, Francuska). Kultura je uzgajana u laboratoriju pri 18 °C na krutoj hranjivoj podlozi PG1 (Unestam, 1965) i u inkubatoru (Innova® 42, New Brunswick™, Njemačka).

3.2.1 Priprema hranjive podloge

Uzročnika račje kuge uzgaja se na krutoj hranjivoj podlozi PG1 (Unestam, 1965). Za pripremu podloge najprije je potrebno zasebno pripremiti i sterilizirati pet otopina (Tablica 3) u kojima se nalaze svi nutrijenti potrebni za rast mikroorganizma, koje se potom steriliziraju i miješaju točno određenim redoslijedom. Pojedine komponente podloge potrebno je zasebno sterilizirati u autoklavu, kroz 15 min pri 121 °C. Potom se otopine hlade na otprilike 45 °C te miješaju, počevši sa otopinom agara, a potom uz dodavanje, po redu, prvo fosfatnog pufera, potom otopine soli, zatim otopine glukoze, a na kraju i peptona, kako bi se smanjila vjerojatnost pojave taloga. Na samom kraju se u podlogu dodaju po 500 µL otopina ampicilina te oksolinske kiseline koje smanjuju mogućnost kontaminacije kulture oomiceta bakterijama. Otopina ampicilina pripravlja se otapanjem 500 mg ampicilin natrijeve soli u 25 mL demineralizirane vode nakon čega se sterilizira filtracijom. Otopina oksolinske kiseline pripravlja se otapanjem 500 mg oksolinske kiseline u 2,5 mL 1 M NaOH, te se razrjeđuje s 25 mL demineralizirane vode i sterilizira filtracijom.

3.3 *In vitro* metode testiranja inhibicijskog djelovanja propolisa prema rastu micelija *Aphanomyces astaci*

U sklopu ovog istraživanja korištene su *in vitro* metode za ispitivanje i kvantificiranje inhibicijskog djelovanja uzoraka propolisa P1 i P2 te njihovih dominantnih fenolnih komponenata na rast micelija patogena *A. astaci*. Korištene metode temelje se na izlaganju mikroorganizma tvarima čija inhibicijska svojstva se ispituju te mjerenju zona inhibicije. Kao pozitivna kontrola korišteno je malahitno zelenilo, a kao negativne kontrole odgovarajuća otapala navedena u Tablici 1.

Tablica 3: Otopine potrebne za pripremu krute hranjive podloge (prema Unestam, 1965)

Otopina	Priprema	Potrebna količina otopine za pripremu 1L podloge
1. Pepton	3 g Bacto peptona (BD Biosciences) odvagati i otopiti u 100 mL destilirane vode.	100 mL
2. Glukoza	6 g D (+) glukoza monohidrata (Sigma) odvagati i otopiti u 100 mL destilirane vode.	100 mL
3. Otopina soli	Odvagati 1,70 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (Sigma), 1,45 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (Sigma), 0,20 g $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (Sigma), 3,70 g KCl (Sigma) i 0,55 g dinatrijeve soli etilendiamintetraoctenekiseline i otopiti u 1000 mL destilirane vode.	100 mL
4. Fosfatni pufer (pH 7)	Pripremiti otopine A; 9,5 g/L Na_2HPO_4 (Sigma) i B; 9,2 g/L $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ (Sigma). Nakon sterilizacije pomiješati 611 mL otopine A i 389 mL otopine B.	100 mL
5. Agar	12 g agara (Biolife) otopiti u 600 mL vode.	600 mL

3.3.1 Disk-difuzijska metoda

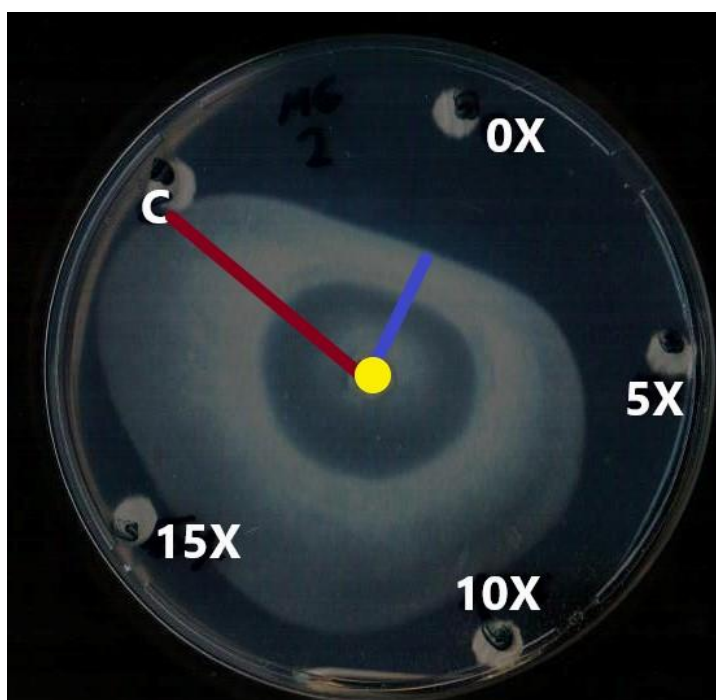
Na sterilne kružice od filter papira promjera 6 mm nanoseno je po 5 μ L ispitivane kemikalije te su papirići osušeni na zraku. Papirići koji sadrže različite koncentracije uzorka iste tvari (Tablica 4) složeni su uz rub PG1 hranjive podloge (Slika 4). Na sredinu ploče nacijepjen

je mikroorganizam, odnosno postavljen kružić agara izrezan s ruba podloge na kojoj raste micelij patogena.

Tablica 4: Koncentracije potencijalnih inhibitora rasta micelija uzročnika račje kuge testirane disk-difuzijskom metodom.

Razrjeđenje	Koncentracija ($\mu\text{g/mL}$)		
	Malahitno zelenilo	P1	P2
0X	512	200000	250000
5X	103	40000	50000
10X	51	20000	25000
15X	34	13333	16670

Tako nacijspljene hranjive podloge inkubirane su pri 18 °C te fotografirane nakon devet dana. Fotografije su analizirane uz pomoć programa Image J, odnosno izmjeren je polumjer rasta micelija (Slika 4). Temeljem usporedbe rasta micelija u prisutnosti negativne kontrole (očekivano nema inhibicije) i testirane tvari (moguća inhibicija) određena je jačina inhibicijske aktivnosti spoja.



Slika 4: Disk-difuzijska metoda na primjeru malahitnog zelenila. U prisustvu negativne kontrole (destilirana voda, C) micelij raste do samog ruba Petrijeve zdjelice (crvena linija). U prisustvu najviše koncentracije malahitnog zelenila (0X razrjeđenje) prisutna je najveća zona inhibicije, odnosno rast micelija je zaustavljen (plava linija).

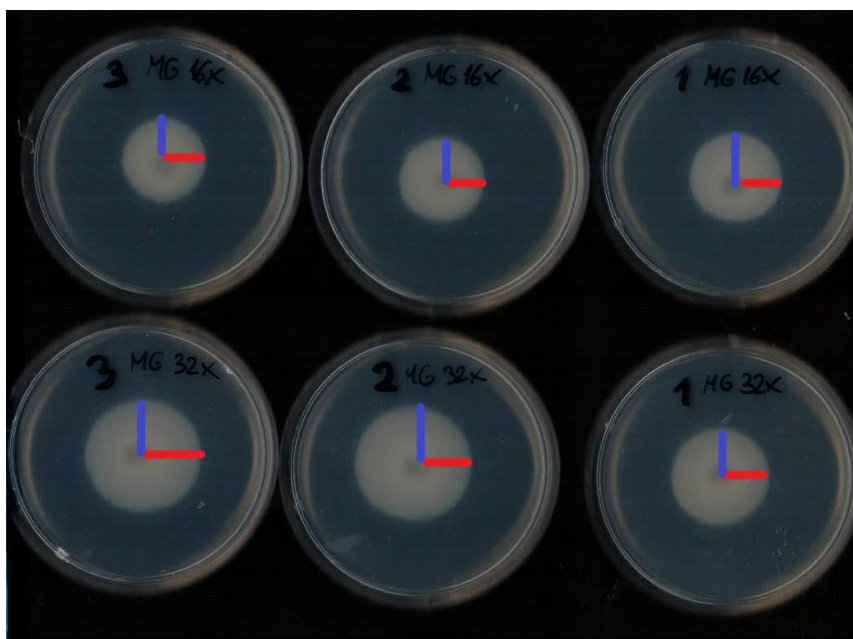
3.3.2 Određivanje EC₅₀ vrijednosti

Testirane tvari dodane su u hranjivu podlogu PG1 pri temperaturi od oko 60 °C, (podloga je u tekućem stanju) i to tako da je u 10 mL podloge umiješano 25 µL tvari koju se ispituje (odnosno otapala kao negativne kontrole). Tako dobivene smjese su izlivena u Petrijeve zdjelice promjera 55 mm. Za svaku proučavanu tvar, uključujući i negativnu kontrolu, načinjeno je do 10 dvostrukih razrjeđenja, kako je navedeno u Tablici 5.

Tablica 5: Koncentracije potencijalnih inhibitora rasta micelija uzročnika račje kuge korištene prilikom određivanja EC₅₀ vrijednosti.

Koncentracija u podlozi µg/mL				
Malahitno zelenilo	P1	P2	Krizin	Pinocembrin
1,28	500	625	5,120	1,28
0,64	250	312,5	2,560	0,64
0,32	125	156,3	1,280	0,32
0,16	62,500	78,13	0,640	0,16
0,08	31,250	39,06	0,320	0,08
0,04	15,625	19,53	0,160	0,04
0,02	7,813	9,77	0,080	0,02
0,01	3,907	4,88	0,040	0,01
0,005	1,954	2,45	-	-
0,0025	0,977	1,23	-	-

Na sredinu svake ploče naciepljen je kružić agara s micelijem. Inkubacija pri 18 °C trajala je pet dana te su nakon toga ploče fotografirane i analizirane uz pomoć programa Image J. Za svako razrjeđenje i svaku testiranu tvar napravljene su i analizirane tri biološke replike. Za svaku ploču provedena su dva mjerenja od ruba mjesta naciepljivanja, do ruba rastućeg micelija (Slika 5). Iz srednje vrijednosti mjerenja ispitivanih tvari i mjerenja negativnih kontrola izračunati su postotci inhibicije koji su korišteni za izračun EC₅₀ vrijednosti u programu GraphPad Prism v.9.1.1. EC₅₀ vrijednost jest koncentracija promatranog spoja koja uzrokuje 50 %-tnu inhibiciju rasta micelija. Za dobivanje vrijednosti EC₅₀ izračunati su logaritmi koncentracija uzoraka te provedena nelinearna regresija s uklapanjem krivulje.



Slika 5: Mjerenje radijusa micelija na primjeru malahitnog zelenila, razrjeđenja 16x i 32x. Svako razrjeđenje testirano je na tri biološke replike *A. astaci* (1-3).

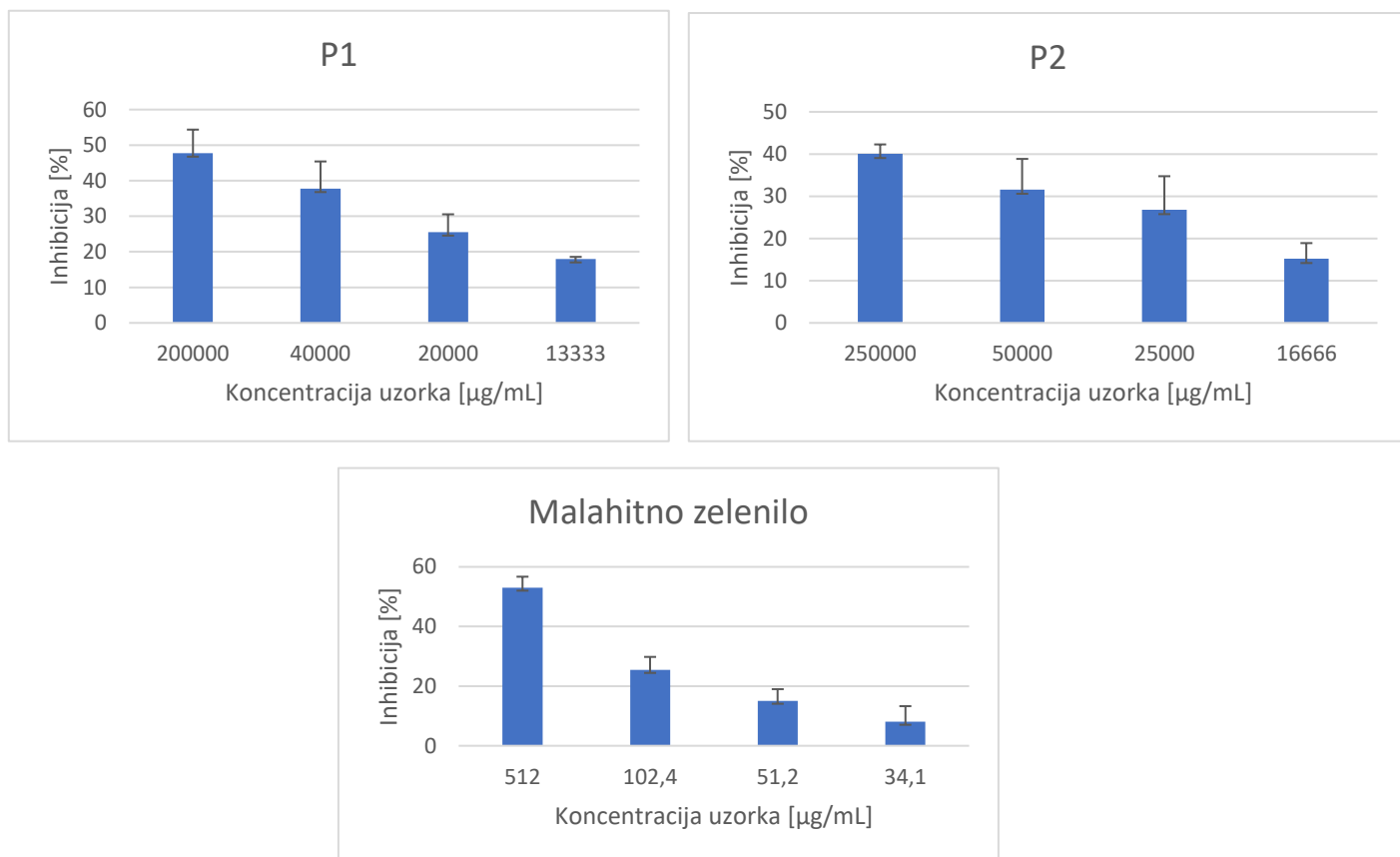
4. Rezultati

4.1 Inhibicija rasta micelija disk-difuzijskom metodom

Rezultati disk-difuzijske metode pokazali su kako oba testirana uzorka propolisa pokazuju inhibicijsko djelovanje koje opada s padom koncentracije (Slika 6).

Postignute inhibicije rasta micelija patogena *A. astaci* utvrđene za uzorak P1 nalaze se u rasponu od 18 % za najnižu testiranu koncentraciju od 13330 µg/mL, do maksimalno postignutih 48 %, korištenjem početne koncentracije uzorka koja iznosi 200000 µg/mL. Maksimalna postignuta inhibicija rasta micelija za uzorak P2 iznosila je 40 % i dobivena je korištenjem nerazrijeđenog uzorka (250000 µg/mL). Uzorak najniže koncentracije propolisa P2 koncentracije 16667 µg/mL uzrokovao je inhibiciju od 15 %.

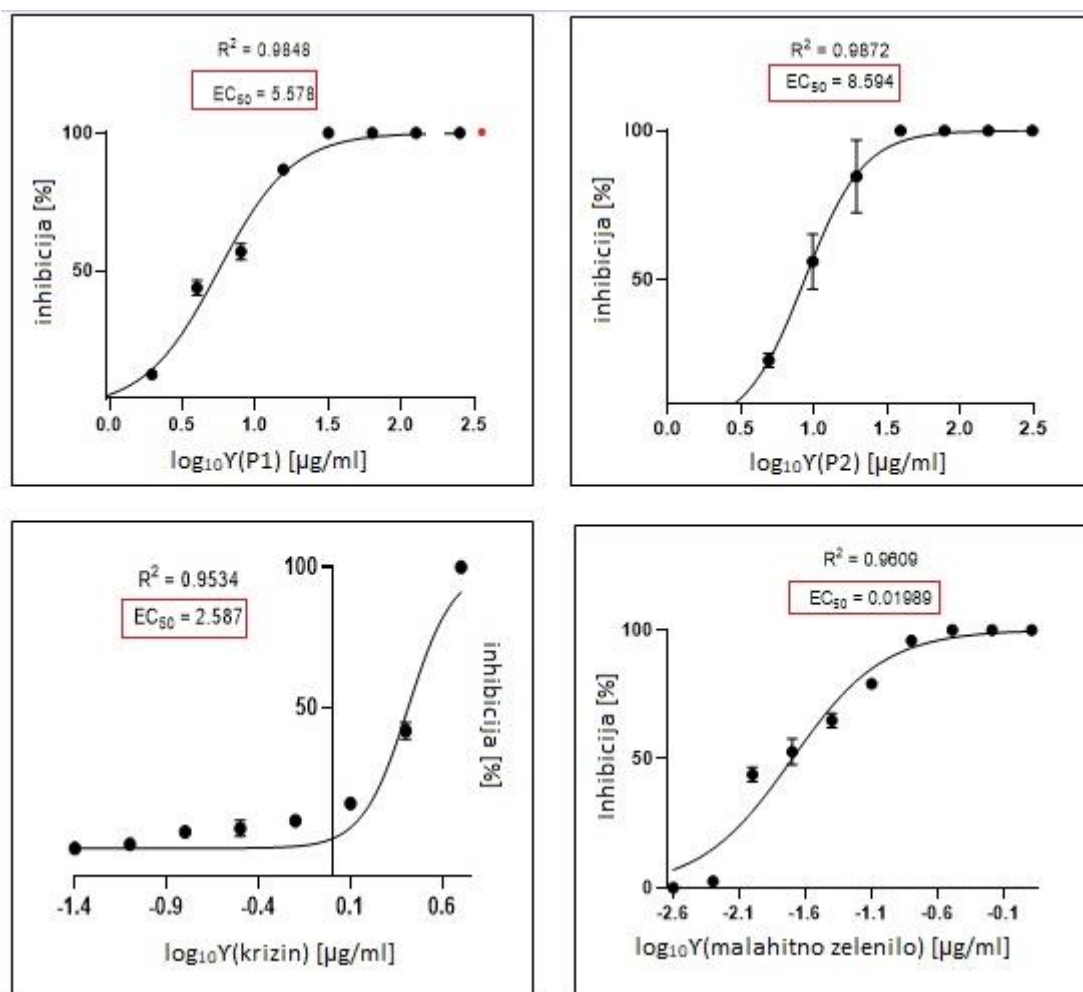
Uzorci propolisa P1 i P2 pokazali su antioomicetno djelovanje sličnog intenziteta (oko 40 % kod originalnog, nerazrijeđenog uzorka) unatoč dodatku ekstrakata kadulje i mente u uzorak P2. Takav rezultat upućuje kako je inhibicijsko djelovanje propolisa jače od inhibicijskog djelovanja navedenih biljnih ekstrakata. U usporedbi s tim, inhibicija od oko 50 % postignuta je korištenjem oko 450 x niže koncentracije malahitnog zelenila, poznatog inhibitora patogena *A. astaci*, (512 µg/mL).



Slika 6: Inhibicija (+/- standardna devijacija, n=3) rasta micelija patogena *A. astaci* uzorcima propolisa (P1 i P2) te malahitnim zelenilom kao pozitivnom kontrolom.

4.2 Inhibicija rasta micelija tvarima otopljenima u hranjivoj podlozi

Otapanjem testiranih tvari u hranjivoj podlozi te mjerenjem polumjera micelija utvrđene su EC_{50} vrijednosti za oba uzorka propolisa (P1 - 5,58 $\mu\text{g/mL}$ i P2 - 8,59 $\mu\text{g/mL}$) te krizin (2,59 $\mu\text{g/mL}$) i malahitno zelenilo koje je korišteno kao pozitivna kontrola (0,02 $\mu\text{g/mL}$) (Slika 8). Za uzorak pinocembrina nije mogla biti utvrđena EC_{50} vrijednost s obzirom na činjenicu kako tim spojem nije postignuta 100 %-tna inhibicija čak ni kod najviše korištene koncentracije koja je bila 14,8, odnosno, 32,41 puta viša od one u propolisu.



Slika 7: Krivulje inhibicije rasta micelija uzročnika račje kuge djelovanjem propolisa (P1 i P2), krizina te malahitnog zelenila.

5. Rasprava

Ovim istraživanjem su po prvi put određene EC_{50} vrijednosti potrebne za inhibiciju rasta micelija patogena *A. astaci* uzorcima propolisa te krizinom kao njegovom dominantnom komponentom, što doprinosi sadašnjim saznanjima o mogućnostima primjene propolisa u kontroli biljnih i životinjskih bolesti uzrokovanih oomicetnim patogenima. Propolis je u nekoliko postojećih istraživanja prepoznat kao prirodna tvar s inhibicijskim djelovanjem prema mikroorganizmima iz skupine Oomycetes (Campbell i sur. 2001; Araújo i sur., 2016; Jurčević, 2018; Silva–Castro i sur., 2018; Iveljić, 2019; Pazin i sur., 2019).

Dobiveni rezultati su u skladu s ranijim istraživanjima utjecaja propolisa na patogena *A. astaci* (Jurčević, 2018) te srodne vrste *A. invadans* (Campbell i sur. 2001) i *S. parasitica*

(Iveljić, 2019). U istraživanjima Jurčević (2018) i Iveljić (2019) korišteni su istovjetni uzorci propolisa P1 i P2 kao i u ovom istraživanju te je korištena *in vitro* metoda slična disk-difuzijskoj metodi, samo su umjesto diskova korišteni bunari u hranjivoj podlozi, te su dobiveni usporedivi rezultati. Osim toga, djelovanje propolisa na srodnu vrstu *S. parasitica*, također oomicetnog patogena bitnog za slatkovodnu akvakulturu, bilo je sličnog intenziteta kao prema vrsti *A. astaci* (Jurčević, 2018; Iveljić, 2019). Nadalje, Campbell i sur. (2001) su primjenom *in vitro* metode koja omogućuje određivanje minimalne inhibicijske koncentracije promatranjem rasta micelija nakon izlaganja testiranim kemikalijama u različitim koncentracijama (tvz. *agar plug assay*) utvrdili minimalne inhibicijske doze otopina propolisa od 1000 µg/mL do 2500 µg/mL prilikom inhibicije micelija patogena *A. invadans*. Ovo je oko 10x više od minimalnih koncentracija propolisa potrebnih za 100 %-tnu inhibiciju rasta micelija utvrđenih ovim istraživanjem. Razlika u rezultatima bi se mogla objasniti time da je vrsta *A. invadans* nešto otpornija od vrste *A. astaci* na djelovanje propolisa, međutim moguć je i utjecaj korištenja različitih pripravaka propolisa (odnosno njihovih razlika u sastavu) kao i razlika u eksperimentalnom pristupu.

Rezultati ovog istraživanja otvaraju mogućnost primjene propolisa u astacikulturi, međutim potrebno je prvo provesti dodatna *in vivo* istraživanja. Jedna od mogućnosti primjene prirodnih pripravaka u akvakulturi je u obliku suplemenata prehrani, što je pokazano nekim postojećim istraživanjima. U *in vivo* istraživanju inhibicijskog djelovanja ekstrakta biljke *Rauvolfia tetraphylla* prema patogenu *A. invadans*, pokazano je kako ribe već pri dnevnoj dozi od 5 g/kg suplementa pokazuju puno bolji imunski odgovor pri kontaktu s patogenom, te znatno manju smrtnost od kontrolne skupine (ribe koje nisu dobivale dodatak prehrani, a bile su u kontaktu s patogenom) (Yogeshwari i sur., 2014). Nadalje, Mise i suradnici (2017) su tijekom šest mjeseci prihranjivali rakove vrste *Pontastacus leptodactylus* propolisom, tri puta dnevno, te zaključili kako dodatak suplementa poboljšava reproduktivnu efikasnost (znatno povećan broj jajašaca) te smanjuje oksidativni stres kojeg rakovi doživljavaju u uvjetima uzgajališta. U nastavku istraživanja trebalo bi ispitati moguću zaštitnu učinkovitost propolisa kao suplementa prehrani rakova prema zarazi patogenom *A. astaci*.

Obzirom na to kako je propolis prirodna, netoksična tvar, jedina zapreka za široko komercijalno korištenje propolisa kao inhibitora u akvakulturi leži u činjenici kako se radi o izuzetno skupom materijalu (De Francisco i sur., 2018). Stoga bi se u umjesto propolisa mogla istražiti i primjena krizina za kojeg je u ovom istraživanju utvrđena antioomicetna aktivnost, a moguće ga je kemijski sintetizirati (Zheng i sur., 2003). Dostignuća metaboličkog inženjerstva omogućila su proizvodnju rekombinantnog pinocembrina, spoja srodnog krizinu, uz pomoć

bakterije *Escherichia coli* (Zheng i sur., 2003). Mogućnost proizvodnje krizina na ovaj način riješila bi problem cijene krizina u količinama potrebnima za komercijalne aplikacije.

6. Zaključak

Ovim istraživanjem je po prvi put kvantificirano inhibicijsko djelovanje propolisa, te njegova dva dominantna fenolna sastojka, krizina i pinocembrina, na rast micelija uzročnika račje kuge *A. astaci*, te su doneseni sljedeći zaključci:

- Uzorci propolisa P1 i P2 su podjednako inhibirali rast micelija: postignuta je inhibicija od oko 40 % primjenom disk-difuzijske metode, a utvrđene EC_{50} vrijednosti bile su 5,6 $\mu\text{g/mL}$ za uzorak P1, odnosno 8,9 $\mu\text{g/mL}$ za uzorak P2.
- Malahitno zelenilo je uzrokovalo 2 reda veličine jači inhibicijski učinak od uzoraka propolisa, s EC_{50} vrijednosti od 0,02 $\mu\text{g/mL}$.
- EC_{50} vrijednost krizina je iznosila 2,59 $\mu\text{g/mL}$.

7. Popis literature

- Ackefors, H. E. G. (2000). Freshwater crayfish farming technology in the 1990s: a European and global perspective. *Fish and Fisheries*, **1**: 337-359.
- Afzali, 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.
- Alderman, D. J. (2003) Aphanomycosis of crayfish: crayfish plague. A report prepared for the Environment Agency and English nature; <<https://www.cefas.co.uk/data-and-publications/publications/list/publication-abstract/?id=13376>> Pristupljeno: 5. kolovoza 2021.
- Alderman, D. J., Holdich, D., Reeve, I. (1990). Signal crayfish as vectors in crayfish plague in Britain. *Aquaculture*, **86**: 3-6.
- Alderman, D. J., Polglase, J. L. (1985). Disinfection for crayfish plague. *Aquaculture and Fisheries Management*, **16**: 203-205.
- Alderman, D. J., Polglase, J. L., Frayling, M. (1987). *Aphanomyces astaci* pathogenicity under Laboratory and field conditions. *Journal of Fish Diseases*, **10**: 385-393.
- Araújo, M. J. A. M., Bosco, S. de M. G., Sforcin, J. M. (2016). *Pythium insidiosum*: inhibitory effects of propolis and geopropolis on hyphal growth. *Brazilian Journal of Microbiology*, **47**: 863-869.
- Aydin, H., Kokko, H., Makkonen, J., Kortet, R., Kukkonen, H., Jussila, J. (2014). The signal crayfish is vulnerable to both the As and the PsI-isolates of the crayfish plague. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, **413**: 03.
- Boets, P., Lock, K., Cammaerts, R., Plu, D., Goethals, P. (2009). Occurrence of the invasive crayfish *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) in Belgium (*Crustacea: Cambaridae*). *Belgian Journal of Zoology*, **139**: 173-175.
- 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.

- Buller, N. (2008). Crayfish plague. Australia and New Zealand Standard Diagnostic Procedure. <https://www.agriculture.gov.au/sites/default/files/sitecollectiondocuments/animal/ah/ANZS_PD-Crayfish-plague.pdf>. Pristupljeno 7. rujna 2021.
- Burdock, G. A. (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology*, **36**: 347-363.
- 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.
- De Francisco, L., Pinto, D., Rosseto, H., Toledo, L., Santos, R., Tobaldini – Valério, F., Svidzinski, M. B., Sarmiento, B., Oliveira, M. B., Rodrigues, F. (2018). Evaluation of radical scavenging activity, intestinal cell viability and antifungal activity of Brazilian propolis by-product. *Food Research International*, **105**: 537-547.
- Drago, L., Mombelli, B., Vecchi, E. D., Tocalli, M. C. F. L., Gismondo, M. R. (2000). *In vitro* Antimicrobial Activity of Propolis Dry Extract. *Journal of Chemotherapy*, **12**: 390-395.
- Edgerton, B., F., Henttonen, P., Jussila, J., Mannonen, A., Paasonen, P., Taugbøl, T., Edsman, L., Souty – Grosset, C. (2004). Understanding the Causes of Disease in European Freshwater Crayfish. *Conservation Biology*, **18**: 1466-1474.
- FAO (2019). FAO Fishery and Aquaculture Statistics 2017. Food and Agriculture Organization of the United Nation <<https://www.iuncredlist.org/species/2191/9338388>> Pristupljeno 6. rujna 2021.
- Grange, J. M., Davey, R. W. (1990). Antibacterial properties of propolis (bee glue). *Journal of the Royal Society of Medicine*, **83**: 159–160.
- 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.
- Hegazi, A. G., Abd El Hady, F. K., Abd Allah, F. A. M. (2000). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of European Propolis. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, **55**: 70-75.
- Hochwimmer, G., Tober, R., Bibars–Reiter, R., Licek, E., Steinborn, R. (2009) Identification of two GH18 chitinase family genes and their use as targets for detection of the crayfish - plague oomycete *Aphanomyces astaci*. *BMC Microbiology*, **9**: 1-17.

Holdich, D.M. (1993). A review of astaciculture: freshwater crayfishing farming. *Aquatic Living Resources*, **6**: 307-317.

Holdich, D. M., Reynolds, J. D., Souty-Grosset, C., Sibley, P. J. (2009). A review of the ever increasing threat to European crayfish from non-indigenous crayfish species. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, **11**: 394-395.

Hollows, J. (2016). Freshwater Crayfish Farming – a guide to getting started. <www.researchgate.net/publication/305239925_Freshwater_Crayfish_Farming_-_a_guide_to_getting_started> Pristupljeno 1. rujna 2021.

Huner, J. (1994). Freshwater Crayfish Aquaculture in North America, Europe, and Australia: families *Astacidae*, *Cambaridae* and *Parastacidae*, 1. izd., Food Products Press, Inc. str. 122.

Huys, R., Oidtmann, B., Pond, M., Goodman, H., Clark, P. F. (2014). Invasive crayfish and their symbionts in the Greater London area: new data and the fate of *Astacus Leptodactylus* in the Serpentine and Long Water Lakes. *Ethology Ecology & Evolution*, **26**: 320-347.

Iveljić, A. (2019). Inhibicijski učinak propolisa na patogeni mikroorganizam *Saprolegnia parasitica*, uzročnika saprolegnioze. Završni rad. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno – biotehnološki fakultet.

Jernelöv, A. (2017). The Long-Term Fate of Invasive Species, 1. izd., Springer, str. 92., 99.

Jurčević, M. (2018). Inhibicijski učinak propolisa na patogene mikroorganizme iz skupine Oomycetes. Završni rad. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno – biotehnološki fakultet

Jussila, J., Mannonen, Ari. (1995). Crayfish culture Finland, Northern Europe. *Marron Growers Bulletin*, **17**: 2-6.

Jussila, J., Makkonen, J., Kokko, H. (2011). Peracetic acid (PAA) treatment as an effective disinfectant against crayfish plague (*Aphanomyces astaci*) spores in aquaculture. *Aquaculture*, **320**: 37-42.

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.

Longshaw, M. (2011). Diseases of crayfish: A review. *Journal of Invertebrate Pathology*, **106**: 54-70.

Lowe S., Browne M., Boudjelas S., De Poorter M. (2000). 100 of the world's worst invasive alien species. A selection from the Global Invasive Species Database. *Aliens*, **12**: 1-12.

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* 2021, **10**: 1676.

Mişe Yonar, S., Köprücü, K., Yonar, M. E., Silici, S. (2017). Effects of dietary propolis on the number and size of pleopadal egg, oxidative stress, and antioxidant status of freshwater crayfish (*Astacus leptodactylus* Eschscholtz). *Animal Reproduction Science*, **184**: 149-159.

Ota, C., Unterkircher, C., Fantinato, V., Shimizu, M. T. (2001). Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. *Mycoses*, **44**: 375–378.

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.

Pazin, W. M., Santos, S. N. D., Queiroz, S. C. N., Bagatolli, L. A., Soares, A. E. E., Melo, I. S. D., Ito, A. S. (2019). Bioactivity and action mechanism of green propolis against *Phytium apahnidermatum*. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, **91**.

Rantamäki, J., Cerenius, L., Söderhäll, K. (1992). Prevention of transmission of the crayfish plague fungus (*Aphanomyces astaci*) to the freshwater crayfish *Astacus Astacus* by treatment with MgCl₂. *Aquaculture* **104**: 11-18.

Roljić, R., Nikolić, V., Savić, N. (2020). Morphological variability and sexual dimorphism of noble crayfish *Astacus Astacus* from the Balkana Lake. *Bulletin of Natural Sciences Research*, **10**: 7-11.

Sateriale, D., Scioscia, E., Colicchio, R., Pagliuca, C., Salvatore, P., Varricchio, E., Grazia Volpe, M., Paolucci, M., Pagliarulo, C. (2018). Italian acacia honey exhibits lytic effects against the crayfish pathogens *Aphanomyces astaci* and *Fusarium avenaceum*. *Letters in Applied Microbiology*, **68**: 64-72.

- Sforcin, J. M., Fernandes Jr, A., Lopes, C. A. M, Bankova, V., Funari, S.R.C. (2000). Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, **73**: 243-249.
- Silva-Castro, I., Martín-García, J., Diez, J. J. Flores-Pacheco, J. A., Martín-Gill, J., Martín-Ramos, P. (2017). Potential control of forest diseases by solutions of chitosan oligomers, propolis and nanosilver. *European Journal of Plant Pathology*, **150**: 401–411.
- Svensson, E. (1978). Interactions between a parasitic fungus, *Aphanomyces astaci*, *Oomycetes*, and its crayfish host: I. Motility, encystment, attachment, and the germination of the zoospore. *Acta Universitatis Upsaliensis*, **457**:1-18.
- Svoboda, J., Mrugała, A., Kozubíková–Balcarová, E., Petrussek, A. (2016). Hosts and transmission of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci*: a review. *Journal of Fish Diseases*, **40**: 127-140-
- Thomas, J., Robinson, C., Mrugała, A., Ellison, A., Matthews, E., Griffiths, S., Cable, J. (2020). Crayfish plague affects juvenile survival and adult behaviour of invasive signal crayfish. *Parasitology*, **147**: 706-714
- Tridge (2021). Crayfish <<https://www.tridge.com/intelligences/white-clawed-crayfish/price>> Pristupljeno: 5. rujna 2021.
- Unestam, T. (1965). Studies on the Crayfish Plague Fungus *Aphanomyces astaci* I. Some Factors Affecting Growth *in vitro*. *Physiologia Plantarum*, **18**: 483-505.
- Unestam, T. (1969). On the Adaptation of *Aphanomyces astaci* as a Parasite. *Physiologia Plantarum*, **22**: 221-235.
- Viljamaa–Dirks, S., Heinikainen, S., Niemininen, M., Vennerström, P., Pelkonen, S. (2011). Persistent infection by crayfish plague *Aphanomyces Astaci* in a noble crayfish population – A case report. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, **31**: 182-188.
- Vogt, G. (2000). Evaluation of the suitability of the parthenogenetic marbled crayfish for aquaculture: potential benefits versus conservation concerns. *Hydrobiologia*, **848**, 285–298.
- Wagh, V. D. (2013). Propolis: A Wonder Bees Product and Its Pharmacological Potentials. *Advances in Pharmacological Sciences*, **2013**: 1-11.

Wang, Q., Ding, H., Tao, Z., Ma, D. (2018). Crayfish (*Procambarus clarkii*) Cultivation in China: A Decade of Unprecedented Development. *Aquaculture in China*, 363-377.

Wooster, G., Martinez, C., Bowser, P., O'Hara, D. (2005). Human Health Risks Associated with Formalin Treatments Used in Aquaculture: Initial Study. *North American Journal of Aquaculture*, **67** :111-113.

Wu, J., Du, G., Zhou, J., Chen, J. (2013). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for (2S)-pinocembrin production from glucose by a modular metabolic strategy. *Metabolic Engineering*, **16**: 48-55.

Yogeshwari, G., Jagruthi, C., Anbazahan, S. M., Mari, L. S. S., Selvanathan, J., Arockiaraj, J., Ramasamy, H. (2015). Herbal supplementation diet on immune response in *Labeo rohita* against *Aphanomyces invadans*. *Aquaculture*, **437**: 351–359.

Zheng, X., Meng, W.-D., Xu, Y.-Y., Cao, J.-G., Qing, F.-L. (2003). Synthesis and anticancer effect of chrysin derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **13**: 881-884.

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.

Handwritten signature of Ivana Čekarić in black ink.

ime i prezime studenta