

Antibakterijski učinak propolisa

Markov, Klara

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:024412>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

ANTIBAKTERIJSKI UČINAK PROPOLISA

DIPLOMSKI RAD

Klara Markov

Zagreb, rujan 2022.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

Diplomski studij:

Fitomedicina

ANTIBAKTERIJSKI UČINAK PROPOLISA

DIPLOMSKI RAD

Klara Markov

Mentor: prof. dr. sc. Edyta Đermić

Komentor: dr. sc. Damir Đermić

Zagreb, rujan 2022.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Klara Markov**, JMBAG 0178114733, rođen/a 7.4.1999. u Šibeniku, izjavljujem da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom:

ANTIBAKTERIJSKI UČINAK PROPOLISA

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studenta / studentice

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta/ice **Klara Markov**, JMBAG 0178114733, naslova

ANTIBAKTERIJSKI UČINAK PROPOLISA

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

- | | | | |
|----|-------------------------------|----------|-------|
| 1. | prof. dr. sc. Edyta Đermić, | mentor | _____ |
| 2. | dr. sc. Damir Đermić, | komentor | _____ |
| 3. | doc. dr. sc. Joško Kaliterna, | član | _____ |
| 4. | prof. dr. sc. Dragan Bubalo, | član | _____ |

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Cilj rada	1
2. PREGLED LITERATURE	2
2.1. Integrirana zaštita bilja	2
2.2. Fitopatogeni organizmi	4
2.2.1. Fitopatogene bakterije	4
2.3. Propolis	6
2.3.1. Identifikacija i terminologija	6
2.3.2. Propolis kroz povijest	7
2.3.3. Kemijski sastav propolisa	8
2.3.4. Biološka svojstva propolisa	14
2.3.5. Fizikalna i organoleptička svojstva propolisa	14
2.3.6. Metode ekstrakcije propolisa	15
2.4. Antibakterijsko djelovanje propolisa	17
2.4.1. Antibakterijski učinak propolisa na fitopatogene bakterije	22
2.4.1.1. <i>Erwinia amylovora</i>	24
2.4.1.2. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	24
2.4.1.3. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i> i <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	25
2.4.1.4. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	25
2.4.1.5. <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i>	26
2.4.1.6. <i>Xanthomonas fragariae</i>	26
3. ZAKLJUČNA RAZMATRANJA	27
4. POPIS LITERATURE	28
ŽIVOTOPIS	

Sažetak

Diplomskog rada studenta/ice **Klara Markov**, naslova

ANTIBAKTERIJSKI UČINAK PROPOLISA

Čovjek već tisućljećima koristi propolis u farmaciji, veterini, medicini i prehrambenoj industriji, a odnedavno postoje nastojanja da ga se primijeni i u kontekstu suzbijanja biljnih patogena. Povećanjem potrošnje svježe hrane, simultano raste i problem njene kontaminacije bakterijama patogenim za ljude. Jačanjem ere ekološkog osvješćivanja, provode se brojna istraživanja antibakterijskog, antivirusnog i antimikotičkog učinka raznih prirodnih tvari. Uslijed smanjenja izbora konvencionalnih kemijskih pripravaka za zaštitu bilja, ali i činjenice da prisutni prokariotski patogeni postaju otporni na mnoge aktivne tvari, potrebno je razmotriti alternativne, ekološki prihvatljive opcije za tu namjenu, među ostalima i propolis. Dodatno, sposobnost ove kompleksne prirodne tvari da aktivira obrambene mehanizme biljaka, vrlo je obećavajuća.

Ključne riječi: zaštita bilja, fitomedicina, fitopatogene bakterije, biološko suzbijanje

Summary

Of the master's thesis – student **Klara Markov**, entitled

Antibacterial effect of propolis

Man has been using propolis for thousands of years in pharmacy, veterinary medicine, medicine and the food industry. Recently there have been efforts to apply it in the context of controlling plant pathogens. With the increase in the consumption of fresh food, the problem of its contamination with bacteria pathogenic to humans also grows simultaneously. By strengthening the era of environmental awareness, numerous researches are being conducted on the antibacterial, antiviral and antimycotic effect of various natural substances. Due to the reduction of the choice of conventional chemical preparations for the protection of plants, and the fact that the prokaryotic pathogens present are becoming resistant to many active substances, it is necessary to consider alternative, ecologically acceptable options for this purpose, such as propolis. Additionally, the ability of this complex natural substance to activate plant defense mechanisms is very promising.

Keywords: plant protection, phytomedicine, phytopathogenic bacteria, biocontrol

1. UVOD

Biljne bolesti uzrokuju znatne gubitke u biljnoj proizvodnji i skladištenju. Ovih dana, uzgajivači se još uvijek uvelike oslanjaju na kemijske pesticide za sprječavanje ili suzbijanje ovih bolesti. Međutim, visoka učinkovitost i jednostavnost korištenja tradicionalno prisutnih kemijskih pripravaka za zaštitu bilja može rezultirati zagađenjem okoliša i prisutnošću ostataka pesticida u hrani, što za posljedicu ima razne socijalne i ekonomske probleme. Prilikom sve više izraženih zahtjeva potrošača da se smanji upotreba kemikalija, znanstvenici su krenuli u potragu za novim, alternativnim metodama zaštite bilja.

Pčele postoje već 125 milijuna godina i njihov evolucijski uspjeh im je omogućio da postanu vječne vrste koje mogu iskorištavati gotovo sva staništa na Zemlji. U ekosustavu imaju jednu od najvažnijih uloga, te osim što oprašuju biljke, proizvode med, vosak, otrov, pelud, matičnu mliječ i propolis.

Propolis je poznat u narodnoj medicini od davnina, no zadnjih godina privukao je veliku pozornost u prehrambenoj industriji jer sadrži razna povoljna biološka svojstva. Sada se naširoko koristi u hrani i pićima, uz tvrdnju da može očuvati ili unaprijediti ljudsko zdravlje. Iako može biti različitog kemijskog sastava, propolis uvijek ima djelovanja kao što su antibakterijsko, antifungalno, antivirusno, antiparazitsko, protuupalno, antiproliferativno i antioksidativno.

Naime, raznim istraživanjima dokazan je pozitivan učinak protiv humanih i animalnih bakterija zbog čega se nameće pitanje djeluje li jednako i na fitopatogene bakterije.

Europski zeleni plan je ideja oporavaka prirode u Europi do 2050. god., što uključuje plan za smanjenje upotrebe pesticida do 2030. god. za 50%. Ovom strategijom želi se doskočiti staromodnim načinima suzbijanja štetnih organizama i primorati poljoprivrednike na provođenje integrirane zaštite bilja. Takav način zaštite bilja uključuje prije svega korištenje alternativnih, ekološki prihvatljivih načina za suzbijanje, dok se pesticidi smiju koristiti tek kao krajnja mjera.

Uloga propolisa kao sredstva za zaštitu bilja i parcijalne alternative primjeni pesticida je novo i još nedovoljno istraženo područje.

1.1. Cilj rada

Cilj rada je bio proučiti dostupnu literaturu, u smislu znanstvenih i stručnih radova, o antibakterijskom učinku propolisa, s naglaskom na vrste bakterija koje su poznati patogeni ili kontaminanti biljaka. Iz literaturnih podataka prikazati za koje bakterije bi se moglo pretpostaviti da bi se najuspješnije mogle suzbijati pomoću propolisa i njegovih ekstrakata. Ujedno, napraviti pregled suvremenih znanja i rezultata istraživanja u ovom području te ih time učiniti dostupnim široj zainteresiranoj javnosti.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Integrirana zaštita bilja

Od Drugog svjetskog rata, pesticidi imaju značajnu ulogu u nastojanju da se osigura obilje hrane po pristupačnim cijenama. No, u novije vrijeme javnost je zabrinuta zbog rezidua raznih pesticida koje ostavljaju tragove u hrani i mogu stvarati problem oko sigurnosti hrane. Samim tim sve je veći pritisak na prehrambenu industriju. Kritično pitanje s kojim se trenutno suočavaju je kako kontrolirati štetočine i bolesti uz manju upotrebu pesticida (Bolkan i Reinert 1994).

Osnivanjem Međunarodne organizacije za biološku i integriranu zaštitu u Antibesu (*International Organisation for Biological and Integrated Control*, IOBC) prvi put se spominje pojam integrirane zaštite bilja (IZB). Znanstvenici uključeni u organizaciju istražuju probleme u poljoprivredi izazvane otpornošću štetnika na postojeće insekticide, prisutnošću velikih populacija štetnika i nemogućnošću njihova suzbijanja, unatoč velikom broju tretiranja. Smatra se da je neracionalna upotreba pesticida poremetila ravnotežu prirodnih neprijatelja i pogodovala razvoju štetnih organizama (Barić 2014).

Prokopy (2003) je definirao integriranu zaštitu bilja (eng. *Integrated Pest Management*, IPM) kao „*proces temeljen na odluci koji uključuje koordinirano korištenje višestrukih taktika za optimizaciju suzbijanja svih klasa štetočina (insekata, patogena, korova, kralježnjaka) na ekološki i ekonomski ispravan način*“. Također Bažok i sur. (2014) navode kako je IZB „*ipak često specifična za pojedinu štetnu vrstu, a temelji se na dobrom poznavanju životnog ciklusa, ekologije i vrste šteta koje štetnik uzrokuje*“. Dugoročno, ovaj pristup ima za cilj smanjiti upotrebu pesticida, osigurati uštede za poljoprivrednika i zaštititi ljudsko zdravlje i okoliš. Izraz „integrirani“ podrazumijeva uključivanje prirodnih neprijatelja i donošenje kompatibilnih, neometajućih taktika koje će sačuvati ove agense (Ehler 2006).

U Republici Hrvatskoj (RH) su *Održivi razvoj poljoprivrede* i *Integrirana proizvodnja* definirani u Zakonu o poljoprivredi iz 2009. god. (NN 2009), dok je 2012. god. na snagu stupio Pravilnik o uspostavi aktivacijskog okvira za postizanje održive uporabe pesticida (NN 2012). Nastavno na to, u travnju 2022. god. donesen je Zakon o održivoj uporabi pesticida (NN 2022) u kojem se nekemijske mjere definiraju kao: „*zamjena kemijskim mjerama za zaštitu bilja i suzbijanje štetnih organizama, koje se zasnivaju na agrotehničkim, fizikalnim, mehaničkim, biotehničkim i biološkim mjerama suzbijanja štetnih organizama*“. Svrha ovog Zakona je postizanje održive upotrebe pesticida, smanjenje rizika i negativnih učinaka pesticida te istovremeno osiguravanje visoke razine zaštite zdravlja ljudi i životinja, zaštite okoliša i očuvanja bioraznolikosti te uvođenje obavezne primjene temeljnih načela integrirane zaštite bilja.

U mnogim zemljama ključnu ulogu u zaštiti bilja imaju upravo sintetički pesticidi i ostale agrokemikalije. Sve to dovodi do akumulacije pesticida i njihovih metabolita u ekosustavu i posljedično do poremećaja duž hranidbenog lanca. S velikom količinom rezidua pesticida, poljoprivredni proizvodi gube primarnu vrijednost te postaju opasni za ljudsko zdravlje, ali i tretirani čimbenik s vremenom gradi svoju rezistentnost što dovodi do pojačavanja problema u suzbijanja (Patyka i sur. 2016). U usporedbi sa sintetičkim

pesticidima, prirodni proizvodi trebaju imati prednost jer su jednostavni za korištenje i netoksični, što je i glavna motivacija za procjenu djelovanja ekstrakta propolisa. Propolis i druge biljne pripravke treba koristiti pojedinačno ili integrirano s drugim strategijama suzbijanja, kako bi prevladali izazove povezane s upotrebom sintetičkih pripravaka za zaštitu bilja (Ajao i sur. 2020).

Razne alternativne metode suzbijanja obično se temelje na dobivanju ekstrakta određene biljke ili tvari koji pokazuju sposobnost inhibicije uspostave zaraze. Među mogućim upotrebljivim materijalima su ekstrakti propolisa, jer imaju visok potencijal da posjeduju antimikrobno, antifungalno, antioksidativno, antivirusno i antiprotozalno djelovanje (Guginski-Piva i sur. 2015).

2.2. Fitopatogeni organizmi

Negativne posljedice u slučaju intenzivne poljoprivrede zaslužuju posebnu pažnju. Procijenjeno je da u trenutnim uvjetima na planetu ima oko 30 000 vrsta korova, 10 000 vrsta štetnih insekata i drugih člankonožaca, 3 000 vrsta nematoda, 120 000 vrsta gljiva, 600 vrsta patogenih virusa i 100 vrsta fitopatogenih bakterija (Patyka i sur. 2016).

Fitopatogeni organizmi, kao što su mikrogljive, virusi i bakterije, zajedno s čimbenicima koji uzrokuju abiotički stres, uključujući degradaciju okoliša, klimatske promjene i kemijsko onečišćenje, predstavljaju globalnu prijetnju poljoprivrednoj proizvodnji hrane te u poljoprivrednoj industriji uzrokuju godišnje diljem svijeta gubitke od preko jedne milijarde dolara (Martins i sur. 2018).

2.2.1. Fitopatogene bakterije

Patogenu sposobnost bakterija na biljkama prvi je prepoznao Burrill još u 19. stoljeću kada je otkrio da palež jabuke i kruške uzrokuje bakterija. Ova je bakterija kasnije identificirana kao *Erwinia amylovora*. Jednom kad je utvrđeno da su i bakterije uzročnici biljnih bolesti, otkrilo se mnogo više bakterijskih biljnih bolesti koje su detaljno proučavane, paralelno s pokušavanjem pronalaska mjera za njihovo suzbijanje.

Među različitim rodovima bakterija, poznato je da ima onih rodova koji sadrže fitopatogene vrste bakterija. To su npr. rodovi: *Agrobacterium* (uzrokuju tumore na biljkama), *Ralstonia* (uzrokuju venuće), *Pseudomonas*, *Xanthomonas* i *Pantoea* (uzrokuju pjegavost listova, plamenjaču, rak i venuće), *Corynebacterium* tj. *Curtobacterium* (uzrokuju pjegavost listova, pjegavost plodova i venuće), *Erwinia* tj. *Dickeya* (uzročnici meke truleži ili venuća). Danas se procjenjuje da je više od 180 biljnih bolesti uzrokovano bakterijama (Borkar i Yumlembam 2016).

Bakterije uzrokuju bolesti biljaka diljem svijeta. Ovi organizmi utječu na različite biljke, kolonizirajući njihovu površinu ili tkiva. Uzrokuju raznolike simptome, kao što su pjege, nekroze, rak, truljenje tkiva i/ili hormonske neravnoteže koje dovode do prekomjernog rasta biljke, zaostajanja u rastu, grananja korijena ili epinastije listova. Takvi problemi utječu na biljke na kvalitativnoj i kvantitativnoj razini, negativno utječući na globalne zalihe hrane. Bakterioze biljaka uzrokuju razorne štete u usjevima i značajne ekonomske gubitke (Martins i sur. 2018). Bakterije imaju jako veliki infektivni potencijal koji nastaje u kratkom vremenu zato što se one umnožavaju dijeljenjem, tako da od jedne bakterije, pri optimalnim uvjetima, u roku od 24 sata nastane više od 17 milijuna novih jedinki. To objašnjava pojavu iznenadnih epifitocija (poput pandemija). Sve fitogene bakterije su endoparaziti što znači da se nalaze unutar biljke, zbog čega se teško suzbijaju kada se uspostavi zaraza.

Kada govorimo o patogenim bakterijama uz njih najčešće vežemo pojam antibiotika. To je najuspješnija skupina lijekova za liječenje ljudi, životinja i biljaka. Pretjerana uporaba antibiotika i sve veća otpornost mikroorganizama na antibiotike, uzrokovana genetičkom sposobnošću bakterija da steknu otpornost i prenesu je na svoje potomke, postao je ozbiljni globalni problem (Bićanić 2020). Mnoge su fitopatogene bakterije stekle otpornost na pesticide ali i na neke antibiotike, kao što su ampicilin i penicilin (Almasoudi 2013). Otpornost

mikroba na antibiotike zadnjih godina postala je velika prijetnja zdravlju diljem svijeta (Freitas i sur. 2022). O'Neill (2014) je procijenio da će tijekom sljedećih 30 godina, daljnji porast otpornosti bakterija na antibiotike rezultirati s 10 milijuna preuranjenih smrti godišnje. Ako otpornost mikroba na lijekove ne oslabi, svjetski BDP će se smanjiti za između 2 i 3.5 %, uzrokujući ekonomski gubitak između 60 i 100 milijardi USD do 2050. god.

Sukladno s tim, izravna je potreba za traženjem novih, jeftinih, učinkovitih i netoksičnih prirodnih tvari s antibakterijskim svojstvima, kod kojih postoji manja vjerojatnost da će na njih bakterije razviti otpornost. Korištenje prirodnih spojeva jedna je od novih metoda suzbijanja štetnika i biljnih bolesti (naročito u cilju proizvodnje organskih proizvoda). S obzirom na velike štete koje fitopatogene bakterije uzrokuju u poljoprivredi, čini se da je njihovo suzbijanje prirodnim tvarima neophodna strategija (Nashveh i sur. 2018).

2.3. Propolis

Propolis je prirodna tvar koju pčele sakupljaju s različitih biljaka, primjerice topola, bora, palmi i slično. Primarna uloga mu je zadržavanje unutarnje temperature košnice (oko 35 °C), sprječavanje utjecaja vanjskih vremenskih uvjeta i invazije predatora (Pasupuleti i sur. 2017). Propolis je izvorno, kao antiseptik, namijenjen za zaštitu pčelinjih zajednica od mikrobnih infekcija, zbog čega se često naziva i pčelinje ljepilo jer se ujedno koristi i za popunjavanje šupljina u stijenkama košnice, za smanjivanje ulaza tijekom hladnih dana te za mumificiranje i eliminaciju uljeza (Basim i sur. 2006).

2.3.1. Identifikacija i terminologija

Riječ „*propolis*“ je izvedena iz grčkog jezika i dolazi od riječi „*pro*“ što znači obrana i riječi „*polis*“ što znači grad ili zajednica, odnosno drugim riječima – košnica (Pasupuleti i sur. 2017).

Proizvode ga pčele iz roda *Apis*, dok drugu vrstu propolisa, geopropolis, proizvode bezžalčane pčele, tj. rod *Meliponini* (Przybyłek i sur. 2019). Skupljanje propolisa poznato je samo kod zapadne medonosne pčele *Apis mellifera* dok azijske vrste iz roda *Apis* ne skupljaju propolis. Vrste iz roda *Meliponini* ili bezžalčane pčele skupljaju slične ljepljive smolaste tvari za brtvljenje košnica i izradu saća. Tijekom jednog leta pčela radilica prikupi približno 10 mg propolisa (Krell 1996). Jedna pčelinja zajednica godišnje u prosjeku prikupi od 50 do 150 g propolisa (Kljenak 2017). Skuplja ga vrlo mali broj pčela radilica, uglavnom one koje su za to specijalizirane. Najčešće se to odvija prijepodne, između 10 i 15:30 sati, a u jako vrućim danima mogu se vidjeti pčele kako ga sakupljaju i u 8 h ujutro. Radije ga skupljaju na sunčanom mjestu, jer je tamo propolis mekši i lakše se lomi (Meyer, Ulrich 1956).

Zapadna pčela (*Apis mellifera* L.) skuplja smolaste i balzamske tvari s pupoljaka i iz pukotina u kori drveća. Žvaču je čime dodaju u nju enzime slin te se takav, djelomično probavljeni materijal, miješa s pčelinjim voskom i koristi u košnici.

Prema Pravilniku o kakvoći meda i drugih pčelinjih proizvoda (NN 2000), propolis se definira kao pčelinji proizvod koji sadrži smolaste tvari koje pčele skupljaju s pupoljaka drvenastih biljaka, te svaki propolis koji se stavlja na tržište mora udovoljavati sljedećim uvjetima:

1. mora sadržavati najmanje 35% tvari koje se ekstrahiraju alkoholom,
2. ne smije sadržavati katran ni spojeve slične katranu, odnosno katranske smole,
3. ne smije sadržavati više od 5% mehaničkih nečistoća ni dijelova pčela,
4. ne smije sadržavati više od 30% voska.

2.3.2. Propolis kroz povijest

U područjima prirodne rasprostranjenosti vrste *Apis mellifera* poznata su brojna tradicionalna korištenja ove svestrane tvari. Već su Grci i Rimljani znali da će propolis liječiti kožne apscese, a stoljećima je njegovoj upotrebi u medicini posvećivana različita pažnja (Krell 1996). Ljekovitost propolisa identificirali su još Galen, Aristotel, Plinije i Dioskorid koji je u svom glavnom djelu „*De materia Medica*“ opisao medicinsku upotrebu propolisa: „žuto pčelinje ljepilo koje je slatkog mirisa i nalik na stiraks, koje je mekano i lako se maže poput mastike. Izuzetno je toplo, privlačno i dobro je za izvlačenje trnja i iverja, pomaže pri kašlju i uklanja lišajevе“.

Također postoje navodi Pilinija Starijeg u njegovoj knjizi „*Naturalis historia*“: „Propolis se proizvodi od slatke smole, gušće kozinstencije, sakupljene na biljkama vinove loze ili topole, kojem se dodaju cvjetni sokovi. Ipak, to se ne može ispravno nazvati voskom, već temeljem saća; pomoću kojeg su svi ulazi začepljeni, te bi inače mogli poslužiti za propuštanje hladnoće ili drugih štetnih utjecaja; također ima jak miris, doista toliko da ga mnogi ljudi koriste umjesto galbanuma“ (Bostock i Riley 1855).

Spominje se kako je Hipokrat koristio propolis za liječenje vanjskih i unutarnjih rana i čireva. Stari Egipćani prikazivali su pčele koje prave propolis na vazama i drugim ukrasima koje su koristili za ublažavanje mnogih bolesti, za zacjeljivanje rana te za očuvanje leševa od raspadanja. Također učinkovito se koristio za liječenje ozljeda tijekom Anglo-burske bitke kao i u Drugom svjetskom ratu. U Engleskoj i Kini korišten je za liječenje rana, zaraza i karcinoma, kao i u očuvanju mesa za prehranu. Stari Židovi smatrali su *tzori* (hebrejski naziv za propolis) lijekom. Njegova terapijska svojstva spominju se u cijelom Starom zavjetu. Biblijski balzam iz Gileada (hebrejski *tzori Gilead*) se gotovo ne razlikuje od propolisa. On je opisan u Bibliji kao dar koji je kraljica dala Kralju Solomonu. U Judeji se 1500 godina proizvodio oko Mrtvog mora i stekao veliku popularnost zbog svoje arome i ljekovitih svojstava (Anjum i sur. 2019; Kuropatnicki i sur. 2013).

U „*Historia Animalium*“, u knjizi IX (knjige I–VIII napisao je Aristotel; autor IX knjige je anonim), mogu se pronaći sljedeće karakteristike propolisa: „Kada im je [pčelama] košnica isporučena čista i prazna, grade svoje saće, unoseći sok od svih vrsta cvijeća i “suze” ili sokove drveća, kao što su vrbe i brijestovi i druga drveća koja daju izlučevine smolaste konzistencije. Ovim materijalom mažu temelje za zaštitu od napada drugih stvorenja; pčelari ovo zovu “stop-vosak”. Istim materijalom sužavaju i bočne zidove ulaza u košnicu ako su preširoki. (...) Na ulazu u košnicu otvor vratašca je namazan mitysom; ova supstanca je duboko crna i vrsta je troske ili zaostalog nusproizvoda voska; ima oštar miris, te je lijek za modrice i gnojne rane“ (Smith, Ross 1910).

Interes za propolis u Euopu se vratio zajedno s renesansnom teorijom *ad fontes* koja je vratila zanimanje za antičko učenje i medicinu. Tako je još 1597. god. John Gerard pisao o upotrebi smole ili ljepljive tvari iz pupoljaka crne topole koja se koristi kao ljekovita mast protiv upale mišića, modrica i slično (Kuropatnicki i sur. 2013).

Još ranih 1960-ih godina pokazalo se da je propolis odgovoran za manju učestalost bakterija unutar košnice (Kuropatnicki i sur. 2013).

Osim, sad već stalne primjene propolisa u medicini i farmakologiji, studije su pokazale da se propolis može koristiti u poljoprivredi, posebice u kontroli fitopatogena u usjevima

rajčice, kave, graha, krastavaca i vinove loze. Njegova uporaba u poljoprivredi je relativno nova i zahtijeva daljnja istraživanja te razvoj komercijalnih proizvoda. Međutim, to je alternativa koja se može primijeniti u poljoprivredi kako bi se izbjegla neselektivna uporaba pesticida koji uzrokuju dobro poznate štete okolišu i ljudima. U poljoprivredi se propolis ne koristi u sirovom obliku, nego se njegovi spojevi ekstrahiraju kako bi se dobila konačna otopina. Zbog složenog kemijskog sastava propolisa, neke tvari prisutne u sirovom obliku su topljive u vodi, ili u alkoholu, ili u oba otapala. Isprva se za dobivanje ekstrakta propolisa koristila voda. Međutim, zato jer je praktičan, a i zbog slabe topljivosti nekih sastavnica propolisa u vodi, trenutno je najkorištenije i najučinkovitije otapalo za proces ekstrakcije propolisa hidroetanol, te je konačni proizvod ekstrakcije etanolni ekstrakt propolisa (Carvalho, Sorde 2021).

2.3.3. Kemijski sastav propolisa

Budući da je teško promatrati pčele na njihovim izletima u potrazi za hranom, točni izvori smola obično nisu poznati. Pčele su opažene kako svojim čeljustima stružu (Slika 2.3.3.1.) zaštitnu smolu s cvjetnih i lisnih pupova i zatim ih na stražnjim nogama nose u košnicu, poput kuglica peludi. Može se pretpostaviti da su smole u procesu skupljanja i modeliranja pomiješane s nešto sline i drugih izlučevina pčela. Sastav propolisa ovisi o vrsti biljaka dostupnih pčelama (Krell 1996). U skladu s izvornom florom kojoj pčele imaju pristup, botaničko podrijetlo propolisa vrlo je raznoliko. Broj identificiranih sastojaka u svakom pojedinačnom uzorku propolisa broji se u stotinama, ovisno o zemljopisnom podrijetlu (Braakhuis 2019).



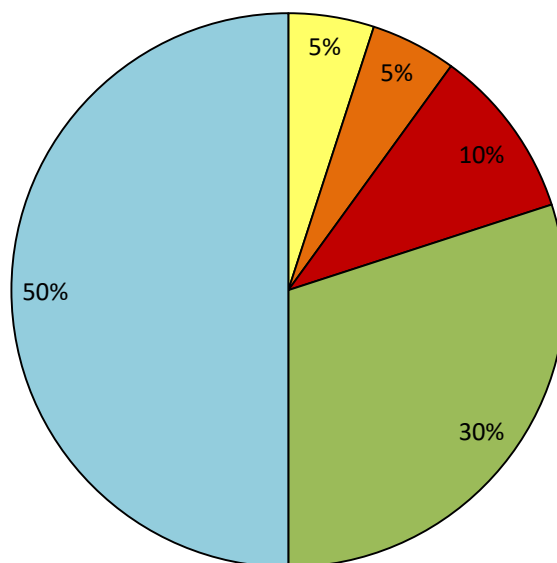
Slika 2.3.3.1. Radilica s prikupljenom smolom na kaošarici stražnje noge (Izvor: <https://www.honeybeesuite.com/propolis-and-the-resin-connection> pristupljeno 24.9.2022).

Različiti kontinenti, regije i biljne vrste koje pčele koriste za proizvodnju propolisa čine njegov sastav međusobno drugačijim. No iako su kemijski različiti, oni imaju slična djelovanja (Przybyłek i sur. 2019).

Da bismo razumjeli što uzrokuje razlike u kemijskom sastavu propolisa, potrebno je imati na umu biljno podrijetlo propolisa. Za proizvodnju propolisa pčele koriste dobivene materijale iz raznih prirodnih procesa u različitim dijelovima biljaka. To su tvari koje biljke aktivno izlučuju, kao i tvari koje biljke izlučuju iz rana: lipofilni materijali na listovima i lisnim pupoljcima, laticama, gume, smole, itd. Danas je dobro dokumentirano da je u umjerenom pojasu glavni izvor propolisa izlučevina iz pupova topole, i to uglavnom crne topole (*Populus nigra*). Iz tog razloga europski propolis sadrži tipične fenolne spojeve pupoljka topole: flavonoidni aglikoni (flavoni i flavanoni), fenolne kiseline i njihovi esteri. Stabla topole česta su samo u umjerenom pojasu; ne mogu rasti u tropskim i suptropskim krajevima. Iz tog razloga, u ovim staništima pčele moraju pronaći druge biljne izvore propolisa kako bi zamijenile topolu. Kao rezultat toga, propolis iz tropskog područja ima drugačiji kemijski sastav od propolisa tipa topole. Posljednjih desetljeća pokazalo se da je izvor brazilskog propolisa smola listova vrste *Baccharis dracunculifolia*. Među glavnim pronađenim spojevima u brazilskom propolisu su prenilirani derivati p-kumarinske kiseline i acetofenona te diterpeni, lignani i flavonoidi (različiti od onih u propolisu tipa topole). Međutim, u Brazilu postoji nekoliko vrsta propolisa, registriranih u novijim studijama, koje dolaze iz biljnih izvora različitih od *B. dracunculifolia* i sadrže spojeve koji nisu gore navedeni. Nedavno je pozornost privukao kubanski propolis čije su glavne komponente poliizoprenilirani benzofenoni, po čemu se kubanski propolis razlikuje od, kako europskog, tako i brazilskog jer mu je glavni biljni izvor cvjetna smola vrste *Clusia rosea*, odakle potječu prenilirani benzofenoni. Iako su kemijski sastavi ovih propolisa različiti, njihova biološka svojstva su ista (Bankova 2005).

Sadržaj svakog propolisa (Slika 2.3.3.2.) obično obuhvaća više od 500 sastavnica, uključujući biljne smole i balzame, pčelinji vosak, aromatična i eterična ulja, pelud, terpene, šećere, proteine, vitamine i aminokiseline (Asma i sur. 2022).

■ Druge organske supstance
 ■ Pelud
 ■ Eterična ulja
 ■ Pčelinji vosak
 ■ Biljne smole

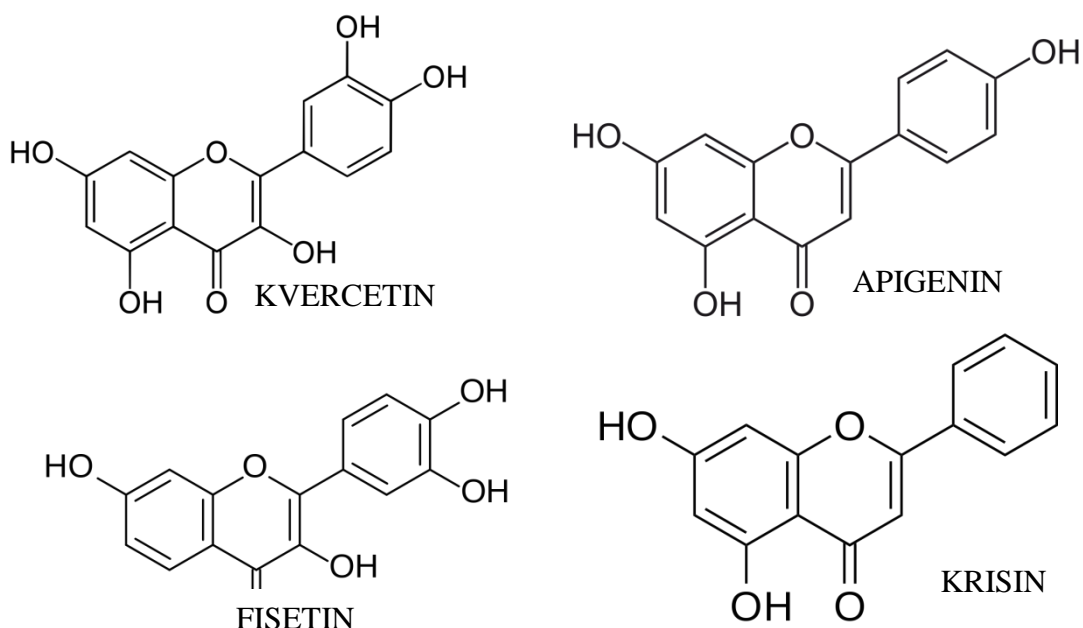


Slika 2.3.3.2. Kemijske komponente propolisa (Izvor: Pasupuleti i sur. 2017).

Fenolni spojevi sadrže različite kemijske komponente, uključujući flavonoide, fenolne kiseline, aldehide, kumarine, estere, jednostavne fenole, lignine i lignane. Dva glavna tipa fenolnih kiselina prisutnih u propolisu su hidroksicimetne kiseline (kavena, ferulinska i p-kumarinska kiselina) i hidroksibenzojeve kiseline (salicilna, galna, protokatehinska, vanilična i gentizinska kiselina) (Asma i sur. 2022).

Flavonoidi su posebne komponente propolisa, kojih je do sada u propolisu identificirano i proučavano više od 150 vrsta (Asma i sur. 2022). Kao glavni sastojci propolisa, uvelike pridonose farmakološkom djelovanju propolisa. Imaju širok spektar bioloških svojstava, poput antibakterijskih, antivirusnih i protuupalnih učinaka. Prema kemijskoj strukturi flavonoidi u propolisu su klasificirani u flavone, flavonole, flavanone, flavanonole, kalkone, dihidrohalkone, izoflavone, izodihidroflavone, flavane, izoflavane i neoflavonoide (Huang i sur. 2014). Značajna skupina flavonoida su flavanoni kojih je u propolisu identificirano 40 različitih vrsta. Najviše se navode pinostrobin, likviritigenin, pinocembrin, naringenin, izosakuranetin i sakuranetin (Asma i sur. 2022).

Pasupuleti i sur. (2017) navode kako flavonoidi (Slika 2.3.3.3.) točnije; apigenin, kvercetin, krisin, fisetin najviše pridonose antibakterijskom učinku. Ostali važni flavonoidi su: galangin, acacetin, pinocembrin, pinobanksin, luteolin i kemferol. Jedna od glavnih karakteristika ovih spojeva je visoki antioksidacijski i antimikrobni potencijal. Naime dokazano je kako je antioksidacijski učinak proporcionalan koncentraciji polifenola (Kljenak 2017).



Slika 2.3.3.3. Molekularne formule flavonoida iz propolisa koji značajno pridonose njegovom antibakterijskom učinku

(Izvori: <https://sh.wikipedia.org/wiki/Kvercetin>, <https://sh.wikipedia.org/wiki/Apigenin>, <https://en.wikipedia.org/wiki/Fisetin>, <https://en.wikipedia.org/wiki/Krisin> pristupljeno 28.7.2022).

Propolis također sadrži važne vitamine, poput vitamina B1, B2, B6, C i E, te korisne minerale poput magnezija (Mg), kalcija (Ca), kalija (K), natrija (Na), bakra (Cu), cinka (Zn), mangana (Mn) i željeza (Fe). Osim toga, sadrži i neke enzime kao što su jantarna dehidrogenaza, glukoza-6-fosfataza, adenzin trifosfataza i kiselinska fosfataza (Lotfy 2006).

U Tablici 2.3.3.1. prikazane su sve kemijske komponente do sada identificirane u sastavu propolisa.

Sadržaj propolisa ovisi o vremenu i mjestu skupljanja smolastih i balzamskih tvari. Kao rezultat toga, biološka aktivnost propolisa proizvedenih u različitim vremenima, iz različitih fitogeografskih područja, se jako razlikuju (Hashemi 2016). Također, biološka aktivnost se razlikuje ako je ekstrakt propolisa pripremljen s etanolom ili s vodom (Braakhuis 2019). Biološka aktivnost propolisa (farmakološki učinci na živim organizmima) izravno ovise o njegovom kemijskom sastavu (Asma i sur. 2022).

Tablica 2.3.3.1. Prikaz kemijskog sastava propolisa (Izvor: Anjum i sur. 2019).

KOMPONENTE	REFERENCA
Flavonoidi, flavanoni, flavoni i flavonoli: islapinin, ermanin, pektolinarigenin, sakuranetin, isosakuranetin, kvercetin 3,30-dimetil eter, 3-acetil pinobanksin, betuletol, izorhamnetin, kemferid, ramnazin, ramnetin, alnusin, alpinetin, alnusitol, pinostrobin, pinocembrin, krizin, tektokrizin, akacetin, ramnocitrin, kvercetin, galangin, apigenin, pinobanksin, kemferol, rutin, katehin, luteolin, naringenin	Walker i Crane 1987. Lotfy 2006.
Benzojeva kiselina i derivati: benzojeva kiselina, salicilna kiselina, gentizinska kiselina, galna kiselina, fenilmetil ester, fenilmetil ester salicilne kiseline, trans-koniferil benzoat, trans-p-kumaril benzoat, protokatehuinska kiselina	Walker i Crane 1987.
Derivati benzaldehida: vanilin, kapronski aldehidi, izovanilin p-hidroksibenzaldehid, protokatehualdehid	Abdulkhani i sur. 2017. Akby i sur 2017. Marcucci 1995. Walker i Crane 1987.
Cinamil alkohol, cimetna kiselina i njeni derivati: cinamilni alkohol, hidrocefinska kiselina, izoferulična kiselina, metil ester cimetne kiseline, etil ester cimetne kiseline, cinamiliden octena kiselina, cimetna kiselina, kavena kiselina, ferulinska kiselina	Walker i Crane 1987.
Alifatski ugljikovodici: eikozin, 1-oktadecen, trikozan, pentakozan, eikozan, heneikozan	
Šećeri: d-ribofuranoza, d-fruktoza, d-glucitol, d-guloza, taloza, saharoza, d-glukoza	Walker i Crane 1987.
Vitamini: B1, B2(complex), B6, C, E	Kuropolitnicki i sur. 2013.
Nikotinska kiselina, pantotenska kiselina, halkoni i dihidrohalkoni: alpinetin kalkon, naringenin kalkon, pinobanksin kalkon, pinobanksin-3-acetat kalkon, pinostrobin kalkon, pinocembrin kalkon, sakuranetin kalkon, 2',6',a-trihidroksi-4'-metoksi kalkon, 2',6-dihidroksi-4'-metoksidihidro halkon, 2',4',6-trihidroksidihidro kalkon	Marcucci 1995.
Aminokiseline: alanin, b-alanin, a-amino maslačna kiselina, d-amino maslačna kiselina, arginin, asparagin, asparaginska kiselina, cistein, glutaminska kiselina, glicin, histidin, hidroksiprolin, izoleucin, leucin, lizin, metionin, ornitin, fenilalanin, prolin, piroglutaminska kiselina, sarkozin, serin, treonin, triptofan, tirozin, valin	
Esteri: metil palmitat, cinamil-trans-4-kumarat, etil palmitat, stearinska kiselina metil ester, ftalat ester, benzil benzoat, benzil-trans-4-kumarat, 3-metil-3-butenil izoferulat, 3-metil-2-butenil izoferulat, 3-metil-3-butenil kafeat, 2-metil-2-butenil kafeat, 3-metil-2-butenil kafeat, benzil kafeat, feniletil kafeat, cinamil kafeat, tetradecil kafeat, tetradecenil kafeat, tetradecenil kafeat (izomer) b, tetradecenil kafeat, heksadecil kafeat	El Hady i Hegazi 2002.

(Tablica 2.3.3.1. se nastavlja na sljedećoj stranici)

(nastavak Tablice 2.3.3.1.)

KOMPONENTE	REFERENCA
Ostale kiseline i derivati: fenilmetil ester 14- metilpentadekanske kiseline, etil ester palmitinske kiseline, miristinska kiselina, sorbinska kiselina, butil-2- metilpropil ester ftalne kiseline, stearinska kiselina, metilni ester alnustinske kiseline	Walker i Crane 1987.
Alkohol, ketoni, fenoli i heteroaromatski spojevi: benzil alkohol, heksadekanol acetat, kumarin, pterostilben, ksantorija, skopoletin	
Terpen, seskviterpen, alkohol i derivati: acetoksibetulenol terpen, geraniol, nerolelol, b-bisabolol, guaiool, farnisol, dihidroeudesmol	
Seskviterpenski i triterpenski ugljikovodici: b-pačulen, b-bisabolen, skvalen, b-burbonen, kopaen, kalaren, kalamenen, kariofilen, pačulan, selenen, aromadendren	
Steroli i steroidni ugljikovodici: kolesterol, stigmasterol, b-dihidrofukosterol, lanosterol	
Minerali: Sr, Ba, Cd, Sn, Pb, Ti, Ag, Co, Mo, Al, Si, V, Ni, Mn, Cr Na, Mg, Cu, Ca, Zn, Fe, K	Lotfy 2006. Pasupuleti i sur. 2017.
Enzimi: glukoza-6-fosfataza, kiselna fosfataza, adenzin trifosfataza, sukcijska dehidrogenaza	Walker i Crane 1987.
Ketoni: acetofenon, p-acetofenolacetofenon, dihidroksi-acetofenon, metilacetofenon, hept-5-en-2-on, 6-metilketon	Marcucci 1995.
Voštane kiseline: arhidna kiselina, behenska kiselina, cerotična kiselina, laurinska kiselina, linoleinska kiselina, lignocerinska kiselina, montanska kiselina	
Alifatske kiseline i alifatski esteri: octena kiselina, maslačna kiselina, krotionska kiselina, fumarna kiselina, izomaslačna kiselina, metilmaslačna kiselina, izobutil acetat, izopentil acetat, izopentil acetat	
Alkoholi: benzol metanol, cinamil alkohol, glicerol, glicerofosfat, fenetil alkohol, izobutenol, hidrokinon, prenil alkohol	
Alifatske kiseline: mliječna kiselina, hidroksioctena kiselina, jabučna kiselina, 5-hidroksi-n-valerijanska kiselina, mliječna kiselina, valerijanska kiselina, jantarna kiselina, valerinska kiselina, arabinska kiselina, nonanska kiselina, palmitinska kiselina, oleinska kiselina, dekanska kiselina, dodekanska kiselina, tetradekanska kiselina, heptadekanska kiselina, oktadecenska kiselina, tetrakozanska kiselina, eikozanska kiselina, heksakozanska kiselina, heksakozanska kiselina	El Hady i Hegazi 2002.
Masne kiseline (C7-C18 kiseline) i ostali spojevi: Fosforna kiselina, 1,4- dihidroksi benzen, 4-hidroksi-benzaldehid, 4-hidro acetofenon, 1,2,4-trihidroksi butan, 1,2,3-trihidroksi butanal i njegov izomer, miristicin, 2,4-bis(dimetil benzil)-6-t-butil fenol, 1,8-dihidroksi-3-metil antrakion, miristicin (izomer)	

2.3.4. Biološka svojstva propolisa

Biološka svojstva propolisa ovise o njegovom kemijskom sastavu, biljnom izvoru, zemljopisnom području i godišnjem dobu (Anjum i sur. 2019). Posjeduje razna biološka svojstva ovisno o prisutnosti značajnih količina određenih spojeva, primjerice flavonoida koji imaju jaka antioksidativna svojstva, ili fenolne kiseline koja djeluje ljepljivo, što pridonosi brže zacjeljivanju rana (Ernješ 2017).

Propolis i njegovi ekstrakti imaju brojne primjene u liječenju raznih bolesti zbog svojih antiseptičkih, protuupalnih, antioksidativnih, antibakterijskih, antimikotičkih, antifungalnih, antiulkusnih, antikancerogenih i imunomodulatornih svojstava (Siheri 2017).

Mehanizam antimikrobnog djelovanja se može pripisati sinergističkom djelovanju fenolnih i ostalih spojeva. Do danas nije dokumentirana otpornost bakterija na propolis te se smatra da postoje jako male šanse da dođe do razvoja rezistentnosti jer je riječ o multikomponentnoj mješavini, složenog mehanizma djelovanja. Utvrđeno je da propolis utječe na citoplazmatsku membranu te da na taj način inhibira pokretljivost bakterija, aktivnost enzima, diobu stanica i sintezu proteina. Ujedno inhibira RNA-polimerazu čime se djelomično može objasniti sinergistički učinak propolisa s antibioticima koji djeluju na sintezu proteina (Kljenak 2017).

U *in vitro* uvjetima propolis djeluje direktno na mikroorganizme, a u *in vivo* uvjetima djeluje aktivacijom imunološkog sustava organizma u kojem se nalazi mikroorganizam (Sforcin i Bankova 2011).

2.3.5. Fizikalna i organoleptička svojstva propolisa

Boja propolisa varira ovisno o području i biljci, ali je on najčešće smeđe ili tamnozeleno boje (Slika 2.3.5.1.) te gorkog okusa. Topi se na 60-70 °C, dok se neke vrste tope tek na 100 °C. Komercijalno se ekstrahira prikladnim otapalima (metanolom, kloroformom, eterom i acetonom), dok je najbolji etanol (Anjum i sur. 2019, Hashemi 2016). Kad je zamrznut ili blizu zamrzavanja, te pri temperaturama nižim od 15 °C, postaje tvrd i lomljiv dok mu se ljepljivost povećava kad temperature porastu iznad 45 °C. U vrućoj vodi se otapa bolje nego u hladnoj (7-10%), u eteru zagrijanom do 123 °C se otapa do 66%, u etilnom alkoholu se otapa od 50-70%, a u acetonu od 20-40%. Njegova topljivost ovisi o trajanju ekstrakcije, temperaturi otapala te veličini čestica. Najbolja topljivost se postiže kada se otapa u smjesi otapala (eter i alkohol, kloroform i alkohol) te kad je propolis u obliku praha (Kljenak 2017).



Slika 2.3.5.1. Različite boje propolisa

(Izvor: Kljenak 2017).

Svojstva propolisa ovise uglavnom od vrste biljaka koje se nalaze u radijusu letenja pčela. Zagrijavanjem u vodenoj kupelji propolis se razdvaja na dva dijela: viskoznu masu koja pada na dno te vosak koji pluta na površini. Kao takav ima mnoge koristi u pčelarstvu (Kljenak 2017).

Propolis mijenja boju, miris i vjerojatno ljekovita svojstva, ovisno o izvoru i godišnjem dobu. Smole propolisa skupljaju se s velikog broja vrsta drveća i grmlja. Čini se da svaka regija ima svoje preferirane izvore smole, što rezultira velikom varijacijom boje, mirisa i sastava. Usporedbe sa smolama drveća u Europi sugeriraju da, gdje god su prisutne vrste *Populus*, pčele radije skupljaju smole iz lisnih pupova ovih stabala. Kubanska studija pokazuje da pčele barem djelomično metaboliziraju prikupljene biljne smole što se može dokazati prisutnošću šećera koji ukazuje na određenu metabolizaciju od strane pčela, tj rezultat dodavanja sline tijekom struganja i žvakanja (Krell 1996).

Komercijalno se propolis nalazi u pastama za zube, pastilama, sredstvima za ispiranje usta, kremama, gelovima, sirupima protiv kašlja, žvakaćim gumama, sapunima, prašcima, itd (Anjum i sur. 2019).

2.3.6. Metode ekstrakcije propolisa

Propolis se ne može koristiti izravno kao sirov materijal, nego se treba ekstrahirati. Jednostavno frakcioniranje propolisa za dobivanje spojeva teško je zbog složenosti njegovog sastava. Najčešći način je ekstrahiranje frakcije topljive u etanolu prilikom čega se uklanja vosak, a kao rezultat ekstrakcije se dobiva alkoholni ekstrakt propolisa bogat biološki aktivnim komponentama (Marcucci 1995).

Postoji nekoliko osnovnih metoda ekstrakcije koje se mogu mijenjati upotrebom različitih otapala. Odabir otapala ovisi o konačnoj upotrebi ekstrakta i tehničkim

mogućnostima. Čini se da je većina aktivnih sastojaka topiva u propilen glikolu i etanolu. Manje sastojaka je topivo u vodi, ali čak i vodeni ekstrakti pokazuju barem neke baktericidne i fungicidne učinke, kao i svojstvo zacjeljivanja rana (Krell 1996).

Pravilnik o kakvoći meda i drugih pčelinjih proizvoda (NN 2000) navodi kako se određuje ekstrakt propolisa u alkoholnoj otopini. Od pribora je potrebno imati uobičajenu laboratorijsku opremu i etanol koji služi kao reagens. Prvo se izvaže 5 g propolisa, stavi se u Erlenmeyerovu tikvicu i prelije s 50 g etanola. Zatim se na sobnoj temperaturi, preko noći, ekstrahira. Potom se tekućina filtrira i uzimaju se alikvoti od 3 g filtrata, koji se dva sata suše u sušioniku na temperaturi od 105 °C. Nakon dva sata uzorak se izvadi iz sušionika, stavi u eksikator i ohladi pa se izvaže. Količina suhe tvari (ekstrakta) iskazuje se u postocima i izračunava prema formuli:

$$\text{postotak ekstrakta} = 100 \times b \times c / d \times (a-c)$$

gdje je:

a - masa filtrata, u g,

b - masa otapala, u g,

c - masa suhog ostatka, u g,

d - masa uzorka, u g.

2.4. Antibakterijsko djelovanje propolisa

Kao najvažnije svojstvo propolisa prepoznato je antimikrobno djelovanje protiv bakterija. Većina istraživanja antibakterijskog djelovanja provedeno je korištenjem *in vitro* bioloških testova, dok ih je vrlo malo provedeno *in vivo*. Iako se sastav propolisa razlikuje, kako je ranije navedeno (poglavlje 2.3.3.), on također ovisi o vrsti pčela koja ga skuplja. Primjerice, utvrđeno je da propolis topole kojeg skuplja *Apis mellifera caucasica* ima izraženiji antibakterijski učinak od onog kojeg skupljaju vrste *Apis mellifera anatolica* i *Apis mellifera carnica* (Siheri i sur. 2017).

Najranije sustavno istraživanje antibakterijskog djelovanja propolisa izveo je Kivalkina 1940-ih. U tim istraživanjima pokazalo se da propolis ima bakteriostatsko djelovanje protiv patogenih vrsta *Streptococcus aureus*, *Salmonella typhi* i nekih drugih bakterija. U detaljnoj studiji antimikrobnog djelovanja propolisa, Lindenfelser (1967) je testirao 15 uzoraka propolisa prikupljenih iz različitih dijelova SAD-a u različitim godišnjim dobima te je od 39 testiranih bakterijskih vrsta, u *in vitro* uvjetima, na čak njih 25 potvrđeno inhibitorno djelovanje. Najučinkovitije je propolis djelovao na vrstu *Bacillus larvae*, dok je ostalih 24 vrsta pokazalo osjetljivost na propolis, uključujući gram-pozitivne koke i bacile otporne na kiseline. Djelovanje na bakterije otporne na kiseline je bilo od velikog značenja s obzirom na tvrdnje da se propolis može koristiti za liječenje tuberkuloznih bolesnika. U drugom eksperimentu Lindenfelser (1969) je otkrio da alkoholni ekstrakt propolisa suzbija američku gnjiloću legla u medonosnih pčela. Ekstrakt je ili stavljen izravno, ili se miješao u razrijeđeni med, ili se prskao kao vodena ili slana otopina na češere. Ujedno je dokazano da propolis pojačava učinak pojedinih antibiotika. U pojedinim slučajevima bakteriostatski učinak je bio povećan 10-100 puta. Slični sinergistički učinci kombinacije propolisa s penicilinom, streptomycinom ili furaginom također su primijećeni u odnosu prema sojevima bakterije *Staphylococcus*. Najučinkovitija kombinacija protiv bakterije *Escherichia coli* bila je mješavina propolisa i furagina (Ghisalberti 1979). Upravo je bakterija *E. coli* vrlo čest kontaminant na površini kultiviranih biljaka koje se konzumiraju u sirovom stanju, npr. povrću (salata, krastavac, rajčica itd.), a čiji pojedini sojevi mogu uzrokovati bolesti ljudi (Martinko 2022).

Od 1950. god. provedena su brojna istraživanja djelovanja propolisa i njegovih komponenti protiv širokog spektra bakterija. Primjerice Takaisi-Kikuni i Schilcher (1994) su pomoću elektronskog mikroskopa prikazali ometanje diobe bakterije *Streptococcus agalactiae*, dezorganizaciju citoplazme i inhibiciju sinteze proteina što dovodi do razgradnje bakterija, dok su Mirzoeva i sur. (1997) otkili da neke fenolne komponente i etanolni ekstrakt propolisa (EEP) utječu na bioenergetski status membrane inhibicijom membranskog potencijala koji vodi do povećane propusnosti membrane za ione i do nepokretnosti bakterije *Bacillus subtilis*.

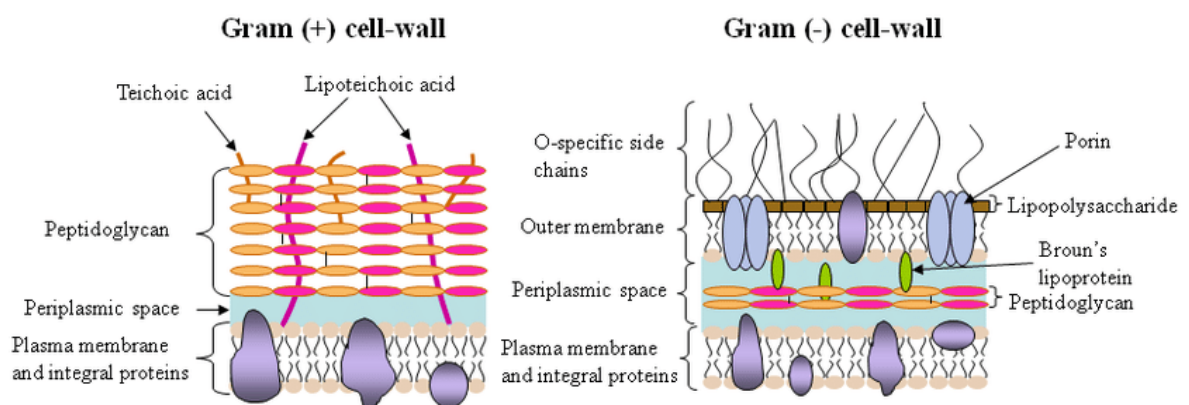
Propolis također pokazuje antibakterijsko djelovanje protiv nekih aerobnih bakterija, kao što su: *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Nocardia asteroides*, *Rhodococcus equi*, *Staphylococcus auricularis*, *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. haemolyticus*, *S. warnerii*, *S. mutans*, *S. hominis*, *Streptococcus cricetus*, *St. faecalis*, *St. pyogenes*, *St. pneumioniae*, *St. Sobrinus* i *St. viridians* (Fokt i sur. 2010).

Etanolski ekstrakti propolisa, prikupljeni iz četiri različite regije Brazila i Turske, primijenjeni metodom razrjeđivanja u agaru protiv različitih anaerobnih bakterijskih sojeva (kao što su: *Actinomyces naeslundii*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Veillonella parvula*, *Lactobacillus acidophilus*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *P. micros*, *Prevotella oralis* i *Pr. melaninogenica*) dali su rezultate u smislu niske inhibicijske i niske bakteriocidne aktivnosti (Anjum i sur. 2019). Antibakterijsko djelovanje propolisa također je zabilježeno protiv vrsta *Bacillus alvei* i *Proteus vulgaris* (Krajinović 2016).

Dodatak etanolskog ekstrakta propolisa u sastav vodica za ispiranje usta i pasta za zube pojačava prevenciju mikrobnih zaraza i učinkovit je u liječenju upale desni, te ujedno pomaže pri raznim drugim bolestima kod ljudi i životinja (Anjum i sur. 2019).

Od početka istraživanja propolisa, nekoliko skupina autora proučavalo je njegov antimikrobni učinak. Bankova i sur. (1995) proučavali su antibakterijsko djelovanje različitih frakcija brazilskog propolisa prema bakterijskoj vrsti *Staphylococcus aureus*, iz čega je zaključeno da je antibakterijsko djelovanje uglavnom posljedica njegovih fenolnih spojeva. Također, propolis ima i značajan učinak protiv bakterija kao što su *Enterococcus* spp. i *E. coli*. Bakterije *S. aureus* i *E. coli* glavni su uzročnici bolničkih infekcija čiji izolati su često čak višestruko otporni na djelovanje antibiotika (Huang i sur. 2006).

Daljnijim istraživanjima Sforcin i sur. (2000) dokazali su da su etanolski ekstrakti propolisa ipak učinkovitiji protiv gram-pozitivnih bakterija, dok je učinak protiv gram-negativnih bakterija ograničen, tj. najčešće propolis samo zaustavlja njihov rast. Gram-negativne bakterije su otpornije jer, iako imaju fleksibilnu staničnu stijenku, imaju složeniju kemijsku strukturu (Slika 2.4.1.). Jedan od spojeva prisutan u stijenci bakterijske stanice je polisaharid koji određuje antigenost, toksičnost i patogenost mikroorganizama. Također, vanjska membrana može sadržavati hidrolitičke enzime koji su sposobni kompromitirati djelovanje aktivnih sastojaka propolisa. Osim toga, ova skupina bakterija ima veću količinu lipida od one uočene u gram-pozitivnim bakterijama (Sforcin i Bankova 2011; Mohdaly i sur 2015).



Slika 2.4.1. Usporedni presjek stanične ovojnice gram-pozitivne i gram-negativne bakterije (Izvor: Atanasova 2010).

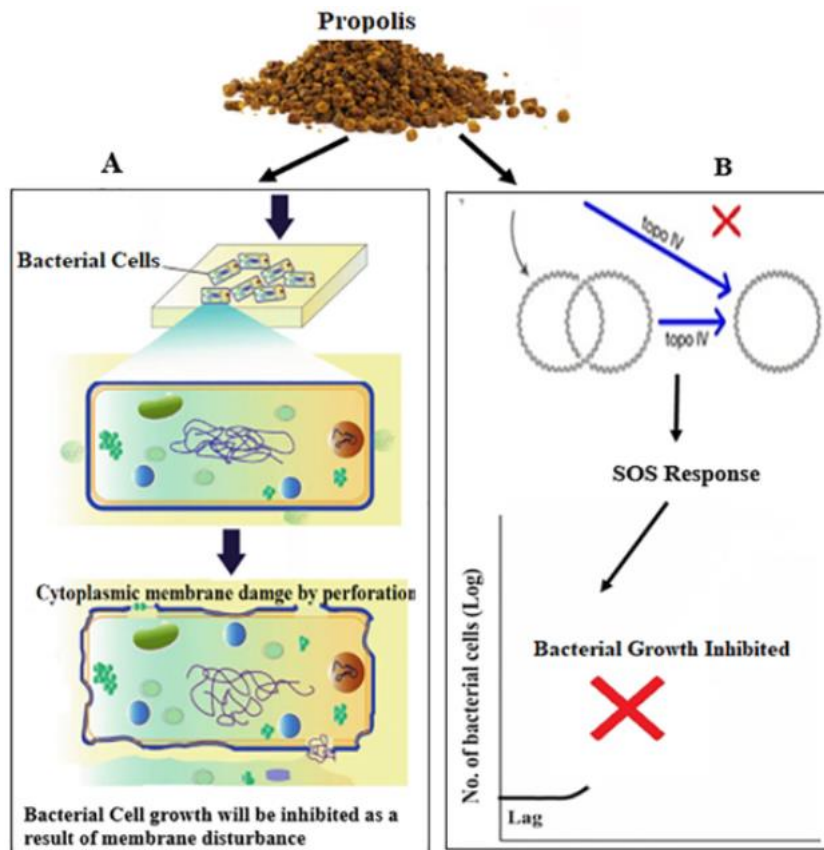
Mohdaly i sur. (2015) proveli su istraživanje učinka fenolnog ekstrakta egipatskog propolisa na gram-pozitivne (*S. aureus*) i gram-negativne (*E. coli*) bakterije. U ovoj studiji se

navodi kako su svi ekstrakti imali antibakterijsko djelovanje te da pokazuju različitu selektivnost i minimalnu inhibitornu koncentraciju (MIC) za svaki testirani organizam. Gram-pozitivne bakterije inhibirane su propolisnim ekstraktom u vrlo niskim koncentracijama te su rezultati bili slični onome što su izvjestili Sforcin i sur. (2000) na prikupljenom propolisu iz Brazila. Međutim, Moreno i sur. (1999) navode kako je propolis prikupljen iz Argentine imao nižu vrijednost MIC-a protiv istog soja bakterije. Bakterija *E. coli* je također bila osjetljiva na propolis. MIC vrijednost za propolis prema standardnoj *E. coli* bila je 1 mg/ml, te je ona bila bolja (niža) od vrijednosti koju su objavili Darwish i sur. (2010) za jordanski propolis na istom soju bakterije. Takva razlika je pokazatelj da propolis iz različitih geografskih regija sadrži različite komponente.

Način djelovanja propolisa je posljedica interakcije između fenola i drugih spojeva, kao što su pinocembrin, galangin i pinobanksin. Slično tome, antibakterijsko djelovanje odvija se zbog njegovih aktivnih spojeva kao što su aromatski spojevi (kavena kiselina) i flavonoida (Anjum i sur. 2019). Naime, fenolni spojevi biljnog porijekla imaju drugačiji mehanizam antibakterijskog djelovanja od konvencionalnih lijekova, čime onemogućuju bakterijama razvoj otpornosti (Zampini i sur. 2021).

Bankova i sur. (2019) proveli su istraživanje antibakterijskog učinka propolisa na ljudske bakterijske patogene. Provode se testovi osjetljivosti makro- i mikrodilucija. Takva testiranja se izvode razrjeđivanjem propolisa u agaru, a prema preporuci Instituta za kliničke i laboratorijske standarde, pri čemu se određuju vrijednosti MIC za svako razrjeđenje aktivne tvari. Nadalje, baktericidno djelovanje promatrano je na vremenskoj krivulji. Osim na ljudske patogene testiran je učinak i na uzročnike bolesti pčela – američka gnjiloća legla (*Paenibacillus larvae*). U svim navedenim testiranjima promatran je antimikrobni učinak kao rast bakterija pod tretmanom u odnosu na rast bakterija bez tretmana, što uključuje primjenu formula prikladnih za statističku usporedbu antimikrobnog učinka između različitih uzoraka propolisa.

Propolis i neki njegovi derivati mogu izravno djelovati na bakterije putem nekoliko mehanizama, a djeluju i na imunosni sustav domaćina (Slika 2.4.2.).



Slika 2.4.2. Mehanizam djelovanja propolisa kao antibakterijskog sredstva (Izvor: Almuhayawi 2020).

Aktivne komponente propolisa se pričvršćuju na citoplazmatsku membranu bakterijske stanice. Narušava se strukturni integritet stanice, ona se oštećuje te dolazi do nastanka perforacija membrane kroz koje se citoplazmatski sadržaj izbacuje van, pri čemu nastupa stanična smrt. Na desnoj strani slike (Slika 2.4.2.) prikazani su flavonoidi koji rezultiraju inhibicijom aktivnosti tj. deaktivacijom ovisnom o enzimu topoizomerazi, što dovodi do staničnog odgovora poznatog kao SOS reakcija, a finalo i do inhibicije rasta bakterijskih stanica. Primjerice, propolis će djelovati na propusnost stanične membrane, smanjit će se proizvodnja adenozin trifosfata (ATP) te će se tako kompromitirati mobilnost bakterija i neke druge njene aktivnosti (Almuhayawi 2020). Drugi mehanizam djelovanja je onaj preko cimetne kiseline koja inhibira proizvodnju enzima ATPaze, stanične diobe i razvoj biofilma uzrokujući oštećenja bakterijske stanične membrane povezanog s prekidom ključnih metaboličkih puteva. Čini se da flavonoidi inhibiraju i sintezu nukleinskih kiselina. Primjerice kvercetin inhibira aktivnost ATPaze vezanjem na enzim DNK girazu. Giraza je enzim koji umanjuje naprezanje tokom odvijanja dvolančane DNK helikazom. To je istraženo u bakterije *E. coli*, no kod te vrste je nađeno i to da je njen rast inhibiran i kada se kvercetin veže na topoizomerazu II, što dovodi do cijepanja molekule DNK. Štoviše, kao što je prije navedeno, razna izvješća ukazuju na sinergistički učinak između antimikrobnih lijekova i propolisa. Jedan od primjera takvih mehanizama za sinergističko pojačavanje je sposobnost propolisa da inhibira sintezu proteina. Zabilježen je sinergizam protiv bakterije *Salmonella typhi* nakon primjene bugarskog i brazilskog propolisa s kloramfenikolom, neomicinom i tetraciklinom djelujući na ribosom (Almuhayawi 2020). Ujedno, pri primjeni mješavine propolisa i meda pokazuje se jači antibakterijski učinak od aktivnosti koju pokazuje pojedinačno testirani uzorak propolisa. Kada se propolis pomiješa s medom, antioksidativni potencijal propolisa se održava ili samo malo smanjuje do razrjeđenja 1:1, te se pri tome pokazuje sinergistički antibakterijski učinak, omogućujući optimizirano korištenje ovog prirodnog resursa. Također, s obzirom na problem otpornosti na antibiotike, prirodni pčelinji proizvodi, sami ili u mješavini, obećavajuća su alternativa za usporavanje izbijanja otpornosti mikroba (Freitas i sur. 2022).

Ukratko, predloženo je nekoliko mogućih mehanizama povezanih s antibakterijskim učinkom propolisa: inhibicija sinteze nukleinske kiseline, promjene funkcije citoplazmatske membrane, inhibicija energetskog metabolizma, smanjenje afiniteta za razvoj biofilma, inhibicija proteina stanične membrane, ugrožavanje propusnosti membrane te smanjenje otpornosti bakterija (Almuhayawi 2020).

Štoviše, propolis kao baktericidno sredstvo djeluje na zaustavljanje diobe bakterijske stanice, uništava zid stanice i bakterijsku citoplazmu te zaustavlja sintezu proteina. Pinocembrin pokazuje antibakterijsko djelovanje prema bakteriji *Streptococcus* spp. dok takvo djelovanje imaju artepilin C, p-kumarinska kiselina i 3-fenil-4-dihidrocinamilocinamska kiselina prema bakteriji *Helicobacter pylori*, a apigenin ograničava bakterijsku glikoziltransferazu (Anjum i sur. 2019).

Zbog prisutnosti flavonoida (galangin, krizin, pinobanksin, kvercetin, naringenin, galangin) i aromatskih kiselina u propolisu, on je učinkovit protiv abnormalnosti u ustima, primjerice bolesti zuba (De Castro 2001.; Sforcin 2016) i u obnavljanju desni. Propolis u kombinaciji s vodicom za ispiranje usta i pastom za zube poboljšava prevenciju mikrobne infekcije (De Castro 2001).

2.4.1. Antibakterijski učinak propolisa na fitopatogene bakterije

Istraživanja antibiotskih svojstava propolisa provode se uglavnom u medicini i veterini, gdje propolis pokazuje učinkovito bakteriostatsko i baktericidno djelovanje protiv nekoliko rodova gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija (Mohdaly i sur 2015).

Pokazuje se da je učinak propolisa inhibitoran za određene rodove bakterija te da je on djelomično učinkovit ili neaktivan na druge. Zbog te spoznaje Bianchini i Bedendo (1998) istražuju utjecaj propolisa na pet različitih fitopatogenih vrsta bakterija. Dobiveni rezultati su pokazuju da su fitopatogene bakterije također osjetljive na antibiotske tvari prisutne u propolisu.

Istraživanja pokazuju da korištenje propolisa putem etanolskog ekstrakta propolisa (EEP) pruža blagotvorne učinke na usjeve. Prednosti takve primjene povezuju se sa suzbijanjem fitopatogena, konzerviranjem voća i povrća nakon berbe i promicanjem rasta biljaka, što je ujedno dokaz dobrobiti kemijskog sastava propolisa koji je posebno bogat fenolnim spojevima i hranjivim tvarima. Osim toga, tipična svojstva smole propolisa rezultiraju nastankom učinkovitog biofilma u biljnim tkivima (Carvalho i Sorde 2021).

Jedna od prvih studija u suzbijanju fitopatogenih bakterija istražuje korištenje vodenog ekstrakta propolisa u *in vitro* pokusu protiv bakterija *Agrobacterium tumefaciens*, *Clavibacter michiganensis* i *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Bianchini i Bedendo 1998). Iako su istraživanja vezana uz propolis i njegov učinak na bakterije i biljne bolesti tek u početku, neki od njih su u *in vitro* uvjetima ostvarili povoljan učinak različitih ekstrakata propolisa prema pojedinim gram-pozitivnim i gram-negativnim fitopatogenim vrstama bakterija, kao što su: *A. tumefaciens*, *C. michiganensis*, *Erwinia chrysanthemi*, *X. axonopodis* pv. *phaseoli* i *Xanthomonas gardneri* (Carvalho i Sorde 2021).

Suzbijanje šteta od biljnih bakterioza u osnovi se provodi primjenama antibiotika (ukoliko su oni u određenoj državi u zaštiti bilja dozvoljeni) i fungicida na bazi bakra. Česta i neprikladna uporaba tih pripravaka pogodovala je nastanku sojeva otpornih na standardne legalne kemijske tretmane. Shodno tome, Rabelino i sur. (2009) su istražili tri koncentracije dvaju ekstrakata propolisa u inhibiciji rasta ovih bakterija: *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atroseptica*, *Xanthomonas vesicatoria*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *P. corrugata*, *X. campestris* pv. *cucurbitae*, *P. savastanoi* subsp. *savastanoi*, *X. axonopodis* pv. *citri*. Rezultati su pokazali sljedeće: ekstrakti propolisa dvaju podrijetla inhibirali su rast *C. m.* subsp. *michiganensis* u svim testiranim koncentracijama. Propolis je također pozitivno djelovao na inhibiciju *X. c.* pv. *cucurbitae*, *X. vesicatoria* i *R. solanacearum*, dok nijedan od testiranih ekstrakata propolisa nije inhibirao rast *P. c.* subsp. *atroseptica*, *A. tumefaciens*, *P. s.* pv. *tomato*, *P. corrugata*, *P. s.* pv. *savastanoi* i *X. a.* pv. *citri*. Basim i sur. (2006) su utvrdili antibakterijski učinak turskog propolisa protiv 13 bakterijskih fitopatogena: *Agrobacterium tumefaciens*, *A. vitis*, *Clavibacter michiganensis*, *Erwinia amylovora*, *E. carotovora*, *Pseudomonas corrugata*, *P. savastanoi*, *P. syringae* (4 soja), *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris* i *X. axonopodis*. Takva razlika među rezultatima se može objasniti korištenjem propolisa različitog botaničkog podrijetla i njihova različitog kemijskog sastava.

U literaturi se navodi da je uočena djelomična inhibicija rasta bakterija u laboratoriju, pokazujući da etanolni ekstrakt propolisa ima potencijal da se koristi kao alat za suzbijanje pojedinih biljnih patogena. Takva aktivnost se povezuje s prisutnošću flavonoida, aromatskih kiselina i estera sadržanih u propolisu (Burdock 1998). No postoje i slučajevi gdje su neke bakterije u određenim biljkama bile potpuno neosjetljive, primjerice bakterije iz roda *Pseudomonas*, na estrakte propolisa, koje se uobičajeno koriste u testiranjima (Carvalho i Sorde 2021).

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) i minimalna baktericidna koncentracija (MBC) alkoholnog ekstrakta propolisa za bakterije *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas syringae* i *Serratia plymuthica* su bile jednake, a iznosile su (navedeno istim redoslijedom) 0.328 mg/ml, 0.656 mg/ml i 1.310 mg/ml. Također su vrijednosti MIC i MBC dimetil sulfoksidnog ekstrakta za bakterije *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas syringae* i *Serratia plymuthica* bile identične, a iznosile su redom 0.56 mg/ml, 1.310 mg/ml i 1.310 mg/ml. MIC vodenog ekstrakta propolisa za bakterije *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas syringae* i *Serratia plymuthica* iznosio je 1.31 mg/ml, 2.62 mg/ml i 2.62 mg/ml, a njegov MBC za te bakterije bio je redom 2.62 mg/ml, 5.25 mg/ml odnosno 5.25 mg/ml. Prema rezultatima, alkoholni i vodeni ekstrakti propolisa pokazali su u laboratorijskim uvjetima značajno djelovanje protiv bakterija *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas syringae* i *Serratia plymuthica* (Etminani i sur. 2017).

Prema Zampini i sur. (2012) koji su proveli istraživanje na različitim argentinskim propolisima, Zuccagnia-tip (*Zuccagnia punctata* Cav.) je djelovao na sljedeće fitopatogene bakterije: *Pseudomonas syringae*, *P. corrugata*, *Xanthomonas campestris* i *Erwinia carotovora*. Ove bakterije predstavljaju ozbiljne probleme u usjevima rajčice. Glavni izolirani antibakterijski spoj iz testiranog propolisa bio je identificiran kao DHC (2',4'-dihidroksikalkon). Prskanje plodova rajčice vodenom otopinom propolisa smanjuje jačinu simptoma bolesti. Učinak otopine propolisa koji je prskan prije ili nakon inokulacije bakterijom *P. syringae* pv. *tomato* bio je sličan, čime se pokazuje njegovo i kurativno i preventivno djelovanje.

Uloga propolisa kao sredstva za zaštitu bilja i alternativa pesticidima je još uvijek dosta neistraženo područje. Ateş i sur. (2021) usporedno su istraživali dva različita komercijalno dostupna ekstrakta propolisa. Njihovi antibakterijski učinci procijenjeni su na bakterijama *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst), soj DC3000. Također, uspoređuje se aktivnost gena, čiji produkti su proteini WRKY70 i CaBP22, u obrambenom odgovoru biljke talijinog uročnjaka (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) nakon primjene propolisa. Prema rezultatima, svaki ekstrakt i doza propolisa imali su drugačiji učinak na ekspresiju spomenutih gena, kao i antibakterijski učinak. Jedan od komercijalnih brendova imao je značajan učinak u svim primijenjenim dozama, dok je ekstrakt propolisa drugog brenda imao aktivnost samo pri koncentraciji od 1%. Propolis je u koncentraciji od 2% smanjio rast bakterija do 93%. Po prvi put propolis je također procijenjen zbog svoje sposobnosti aktivatora obrane biljaka te je inducirao gene odgovorne za produkciju proteina WRKY70 i CaBP22. Razlike u ekspresiji gena i razinama inhibicije rasta bakterija ukazuju na važnost porijekla propolisa, kao što su biljne vrste i regije s kojih je proizveden. Iako su preliminarni, ovi rezultati sugeriraju značajan potencijal propolisa u zaštiti bilja u komercijalnoj i ekološkoj poljoprivredi.

2.4.1.1. *Erwinia amylovora*

Gram-negativna fitopatogena bakterija *Erwinia amylovora* uzrokuje bakteriozni palež – jednu od najrazornijih bolesti jabuke, kruške i drugih biljaka iz porodice *Rosaceae* (Pomoideae), kako kultiviranih, tako i divljih. Glavna šteta koju uzrokuje ovaj patogen je palež na jabuci i krušci te od trenutka kada se pojavi zaraza bakterijom *E. amylovora* ekonomske štete mogu trajati i do 7 godina, te se u tom razdoblju provodi sadnja tolerantnih ili otpornih novih stabala jer oboljela stabla kroz vrijeme najčešće ugibaju, a voćnjak je potrebno osposobiti za punu proizvodnju (Borkar i Yumlembam 2016).

Bakterija se može širiti na kratke i duge udaljenosti uz pomoć nekoliko čimbenika (npr. sadnim materijalom, pticama, kukcima, ljudima), te uz pomoć abiotičkih vektora (npr. kiša, vjetar, aerosoli) (Sabatini i sur. 2006). Jedan od značajnih vektora su i pčele (*Apis mellifera*) koje prenose bakteriju *E. amylovora* sa zaraženih na zdrave cvjetove. Radi boljeg razumijevanja njihove uloge u prijenosu bakterijskog inokuluma, važno je znati dugovječnost bakterija u košnici te na i u tijelu pčela. Alexandrova i sur. (2002) istraživali su dugovječnost inokuluma bakterije *E. amylovora* u medu, pčelinjem vosku, peludi i propolisu. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da su stanice bakterije *E. amylovora* uginule vrlo brzo nakon kontaminacije. Prva ponovna izolacija obavljena je 6 sati nakon kontaminacije, no nijedna bakterija nije bila vijabilna. Do istog zaključka dolaze Bianchini i Bedendo (1998) kada istražuju mogućnost preživljavanja bakterije *E. amylovora* u propolisu. Rezultati pokazuju da propolis nije povoljan supstrat za preživljavanje bakterije te da se ovaj proizvod ne može smatrati izvorom inokuluma za širenje bolesti. Činjenica da bakterija ne preživljava u propolisu svjedoči o prisutnosti inhibitornih tvari koje djeluju na ovog patogena (Bianchini i Bedendo 1998).

2.4.1.2. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*

Bakterija *Pseudomonas syringae* i njezini patovari zaražavaju većinu voćnih kultura umjerenog pojasa, poput marelice, šljive, jabuke, trešnje, breskve, badema, kestena, lješnjaka, maline, avokada, kivija i naranče. Ostali domaćini su joj jorgovan, pšenica i grašak te povrtne kulture, poput rajčice, paprike, graha, celera, poriluka, peršina, krastavca, šećerne repe, špinata i korijandera. Rasprostranjena je diljem svijeta i glavne štete koje uzrokuju njeni brojni patogeni varijeteti (patovari) su bakteriozni rak, pjegavost i palež lista, ovisno o domaćinu. Gospodarski utjecaj bakterije *P. syringae* je u porastu, s ponovnom pojavom tzv. starih bolesti, uključujući bakterioznu pjegavost rajčice (Borkar i Yumlembam 2016).

Bakterija *P. syringae* pv. *tomato* (pst), soj DC3000, je važan fitopatogen i uzrokuje značajne gubitke prinosa svake godine na rajčicama. Osim rajčice, njime se zaražavaju i druge biljne vrste. Još uvijek ne postoji potpuno uspješna metoda suzbijanja ovog patogena no smatra se da bi baš propolis mogao biti obećavajuće sredstvo zaštite biljaka od bolesti koju uzrokuje (Ateş i sur. 2021).

Ordonez i sur. (2010) uzorkom propolisa skupljenog u sjevernoj Argentini procjenjuju njegov antimikrobni učinak na fitopatogene bakterije. U istraživanju su identificirani najaktivniji uzorci, a vrijednosti MIC određuju se testovima makrodilucije agara i

mikrodilucije hranjivog bujona. Otkriven je snažan antibakterijski učinak na bakteriju *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* CECT 225, *P. syringae* pv. *tomato* CECT 126, *P. corrugata* CECT 124 i *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* CECT 792. Najučinkovitiji ekstrakt propolisa (Tucumán, T1) odabran je kako bi ostvario bioaktivno odvajanje baktericidnih spojeva. Izolirani antimikrobni spoj bio je identificiran kao 2,4-dihidroksihalkon. Provede se testovi fitotoksičnosti i ekstrakti propolisa ne usporavaju klijanje sjemena salate niti rast korijena luka. Otopine propolisa primijenjene prskanjem na plodove rajčice zaražene bakterijom *P. syringae* smanjile su ozbiljnost bolesti.

2.4.1.3. *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* i *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*

Provedena su istraživanja antimikrobne aktivnosti koja inducira fitoaleksine te obrambene enzime i težinu bolesti, koristeći koncentracije od 0%, 0.5%, 1.0%, 2.5% i 5.0%. Etanolni ekstrakt propolisa (EEP) je pokazao antimikrobni učinak na obje fitopatogene bakterije, uzrokujući smanjenje njihovog razvoja, a također je pospješio linearno nakupljanje fazeolina u hiopokotilima graha. Došlo je do smanjenja površine oštećene bakterioznom plamenjačom na listovima graha tretiranim etanolnim ekstraktom propolisa uz lokalni i sistemski učinak. EEP je aktivirao enzim polifenoloksidazu uz maksimalnu točku aktivacije 62.5 sata nakon primjene. Došlo je do povećanja aktivnosti fenilalanin amonijak-liaze u biljkama tretiranim EEP-om te rezultati ukazuju na potencijal EEP-a za sprječavanje šteta od ovih bolesti (Jaski i sur. 2019).

2.4.1.4. *Agrobacterium tumefaciens*

Bakterija *Agrobacterium tumefaciens* inficira velik broj biljnih vrsta, između ostalih i badem, marelicu, trešnju, breskvu, šljivu, jabuku, vinovu lozu, topolu, malinu, ružu, orah, vrbu, kupinu, krizantemu, citruse, fikuse, maslinu, krušku, neven, klematis, gipsofilu, jorgovan, makadamiju, dunju i gliciniju. Povremeno zarazi i brezu, borovnicu, daliju, hortenziju, javor, rododendron, sekvoju i smreku. Ova bakterija je rasprostranjena diljem svijeta, ali uzrokuje ozbiljne štete u SAD-u, Europi i Australiji. Glavni simptomi uzrokovani ovim patogenom su tumori na vratu korijena biljke. Kao takve, zaražene biljke nisu za prodaju, te najveći gubitci nastaju kod mladih biljaka tj. onih koje su još u rasadniku. Bolest rijetko ubija biljke, ali može izazvati nedostatak snage, smanjeni rast i slabu produktivnost. Bakterije iz roda *Agrobacterium* prouzročile su znatne ekonomske gubitke i u rasadnicima i u komercijalnoj proizvodnji koštičavog voća (Borkar, Yumlembam 2016).

Almasoudi (2013) provodi istraživanje na vrstama bakterija *A. tumefaciens* i *Pectobacterium carotovorum*, od kojih obje predstavljaju neke od najvećih uzročnika gubitka prinosa u poljoprivredi. U petrijevim zdjelicama testira se antibakterijski učinak tri biljna ekstrakta i propolisa, između kojih je najbolji učinak pokazao propolis. Njegova koncentracija od 4000 µg/ml imala je vrlo snažan antibakterijski učinak s jakom zonom inhibicije od najviše 1.36 mm, dok je ona kod pozitivne kontrole iznosila najviše 1.07 mm pri istim koncentracijama.

2.4.1.5. *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*

Bakterija *X. axonopodis* i njeni patovari uglavnom zaražavaju biljke agruma, šipak, kasavu i grah. Geografski je rasprostranjena u Aziji, Africi, Americi i Oceaniji. Glavne bolesti uzrokovane ovim patogenom su rak citrusa, masna pjegavost i bakteriozni palež kasave (Borkar i Yumlembam 2016).

Temeljem spoznaje da propolis djeluje na razne fitopatogene bakterije, Pereira i sur. (2020) su istraživali dva različita propolisa u Brazilu. U *in vitro* uvjetima ekstrakt propolisa iz mjesta Santa Izabel do Para je pokazao znatno bolji učinak na bakteriju *X. axonopodis* pv. *passiflorae* od onog ekstrakta propolisa iz dijelova Curuçá. Znanstvenici nalaze da su bioaktivne tvari korištenog propolisa ekstrahirane otapalom višeg polariteta. U ovom slučaju je 80%-tni etanolski ekstrakt propolisa dao bolje rezultate, vjerojatno zato što su se bakterijske alelokemikalije uspješnije orijentirale na molekule srednjeg i većeg polariteta u ekstraktu propolisa. Razlika između polarnih i nepolarnih tvari je u prisutnosti ili odsutnosti elektronegativnih atoma u njihovim strukturama, što uzrokuje razlike u međumolekularnim silama. Kod dijela nepolarnih tvari privlačnost molekula je slabija, što olakšava kretanje tih molekula, te one obično imaju izuzetno nisko talište i vrelište. U polarnim tvarima, zbog postojanja regija s različitim elektronskim gustoćama, na molekule djeluje jača sila privlačenja koja otežava kretanje tih molekula i sprječava ih da lako dođu do plinovitog stanja. Budući da je propolis vrlo složena mješavina tvari različitih polariteta, teško je pronaći jedno otapalo koje ekstrahira sve njegove komponente. U ovom istraživanju najučinkovitije otapalo je bio 80%-tni etanol koji je u potpunosti inhibirao rast bakterija.

2.4.1.6. *Xanthomonas fragariae*

Na jagodama je opisan velik broj bolesti čiji se simptomi najčešće pojavljuju na listovima. Najviše je mikoza, te nešto manje bakterioza i viroza. Folijarne bolesti znatno iscrpljuju biljku i utječu na njezinu vitalnost, što se odražava na prinosu u narednim godinama. Zbog nepravilnog pristupa ovim bolestima, zaštita koja se provodi u cilju suzbijanja šteta od biljnih bolesti je kriva i neadekvatna (Miličević 2015). Bakteriozna pjegavost lista jagode koju uzrokuje vrsta *X. fragariae* jedna je od glavnih ograničavajućih bolesti usjeva jagode diljem svijeta. Rodrigues i sur. (2021) prskali su već zaražene biljke polisaharidima iz jestive makrogljive *Lentinula edodes* (Shiitake), ekstraktom propolisa, acibenzolar-s-metilom ili destiliranom vodom (kontrola). U rezultatima rada se navodi kako je jedan od korištenih ekstrakata propolisa inhibirao stvaranje novih kolonija i biofilma bakterije te postigao povećanje aktivnosti enzima anilalanin amonijak liaze i superoksid dismutaze, ujedno u usporedbi sa biljkama prskanim destiliranom vodom, propolis je pokazao značajno bolje rezultate. Također se navodi da takav proizvod ima potencijal za primjenu u programima kontrole bolesti jagoda. Nadalje, ozbiljnost bolesti kod biljaka tretiranih polisaharidima makrogljive *L. edodes* nije se razlikovala u usporedbi s kontrolnim biljkama dok su one tretirane acibenzolar-s-metilom pokazale smanjenu razinu bolesti nakon usporedbe.

3. Zaključna razmatranja

Neizostavna je upotreba sredstava za suzbijanje biljnih patogena jer oni ugrožavaju biljnu proizvodnju diljem svijeta te stvaraju velike ekonomske štete. Suzbijanje šteta uzrokovanih biljnim bakteriozama i dalje je teška zbog ograničene dostupnosti učinkovitih sredstava za zaštitu bilja sa smanjenim negativnim učincima na okoliš, zdravlje ljudi i životinja. Osim toga, mnogi patogeni postaju otporni na pojedine aktivne tvari primjenjivane u zaštiti bilja te je nužno težiti novim načinima suzbijanja. Kako bi se smanjila upotreba kemikalija, promiču se alternativne strategije primjene raznolikih tvari (često prirodnog porijekla) za suzbijanje biljnih patogena i/ili poboljšanje otpornosti biljaka na bolesti.

Propolis ima široku paletu farmakoloških potencijala koji su poznati, uključujući antibakterijsko, antimikotičko, antiprotozalno, hepatoprotektivno, antioksidativno, protuupalno, antivirusno, antikancerogeno i antitumorsko djelovanje.

Više istraživanja pokazuje da etanolski ekstrakt propolisa pomaže pri konzervaciji svježeg voća i povrća, promovira rast biljaka te ujedno ima antibakterijski učinak na fitopatogene bakterije. Osim djelovanja pojedinačnih komponenata, ono može biti i kombinirano tj. sinergijsko, što propolisu, kao kompleksnoj prirodnoj tvari, osigurava raznovrsnu i jaču biološku učinkovitost.

Istraživanja propolisa različitog geografskog podrijetla ključna su u testiranju antimikrobnog učinka na različite patogene, s obzirom na činjenicu da je svaki propolis drugačijeg kemijskog sastava.

Trenutačni trend povratka na ekološki sigurnije i manje energetski invazivne industrijske metode, te povećana kupovna moć potrošača, mogu dovesti do značajnog rasta upotrebe i do razvoja novih primjena propolisa, osobito u poljoprivredi.

Pregled literature sugerira da propolis može biti koristan u suzbijanju biljnih patogena, ali da ga je potrebno i dalje istraživati zbog nedosljednosti rezultata u različitim studijama do kojih dolazi vjerojatno zbog heterogenosti komponenti propolisa prikupljenih s različitih geografskih lokacija, primjene različitih doza u različitim studijama kao i malog broja testiranih uzorka u istraživanjima. U budućnosti je potrebno više studija da bi se dokazali jasni učinci propolisa u pojedinim primjenama u fitomedicini i kako bi se u potpunosti razumio njegov molekularni mehanizam djelovanja na stanice biljnih patogena.

4. Popis literature

1. Abdulkhani A., Hosseinzadeh J., Ashori A., Esmaeeli H. (2017). Evaluation of the antibacterial activity of cellulose nanofibers/polylactic acid composites coated with ethanolic extract of propolis. *Polymer Composites*, 38(1), 13-19.
2. Ajao A. M., Ojo J. A., Bamidele J. A., Oladimeji Y. U. (2020). MS Bee propolis as protectant of stored grains against insect pests' damage in Kwara State, Nigeria. *Technoscience Journal for Community Development in Africa*. 1(1), 103-108.
3. Alexandrova M., Porrini C., Bazzi C., Carpana E., Bigliardi M., Sabatini A.G. (2002). *Erwinia amylovora* longevity in beehives, beehive products and honeybees. *Acta Hort.*, 590, 201-205 <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2002.590.29>
4. Almasoudi N. M. (2013). Bioactivity of some natural products on some bacterial plant pathogens. *Journal of Plant Protection and Pathology*. 4(7), 683-688.
5. Almuhayawi, M. S. (2020). Propolis as a novel antibacterial agent. *Saudi journal of biological sciences*. 27(11), 3079-3086.
6. Anjum S.I., Ullah A., Khan K.A., Attaullah M., Khan H.U., Ali H., Bashir M.A., Tahir M., Ansari M.J., Ghramh H.A., Adgaba N., Dash C.K. (2019). Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26, 1695-1703.
7. Asma S. T., Bobiş O., Bonta V., Acaroz U., Shah S. R. A., Istanbulgil F. R., Arslan-Acaroz D. (2022). General nutritional profile of bee products and their potential antiviral properties against mammalian viruses. *Nutrients*, 14(17), 3579.
8. Atanasova K. (2010). Interactions between porcine respiratory coronavirus and bacterial cell-wall toxins in the lungs of pigs. Doctoral dissertation. Ghent University.
9. Ateş M., Özkurt N., Bektaş Y. (2021). Comparative Evaluation of Two Commercial Propolis Extracts as Plant Defense Activator and Antimicrobial Agent Against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst) strain DC3000. *Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi*. *Turk J Agric Res*, 8(2), 213-219.
10. Bankova V. (2005). Recent trends and important developments in propolis research. *Evidence-based complementary and alternative medicine*. Vol.2, 4 pages. <https://doi.org/10.1093/ecam/neh059>.
11. Bankova V., Bertelli D., Borba R., Conti B. J., da Silva Cunha I. B., Danert C., Eberlin M. N., Falcao S. I., Isla M. I., Monero M. I. N., Papotti G., Popova M., Basso Santiago K., Salas A., Frankland Sawaya A. C. H., Vilczaki Schwab N., Sforcin J. M., Simone-Finstrom M., Spivak M., Trusheva B., Vilas-Boas M., Wilson M., Zampini C. (2019). Standard methods for *Apis mellifera* propolis research. *Journal of Apicultural Research*, 58(2), 1-49.
12. Bankova V., Christov R., Kujumagiev A., Marcucci M.C., Popov S. (1995). Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 50(3-4),167 -172.
13. Barić B. (2014). Načela integrirane zaštite bilja. *Glasilo biljne zaštite*, 14(5), 352-356.

14. Basim E., Basim H., Ozcan M. (2006). Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens. *Journal of food engineering*, 77, 992-996.
15. Bažok R., Gotlin Čuljak T., Grubišić D. (2014). Integrirana zaštita bilja od štetnika na primjerima dobre prakse. *Glasilo biljne zaštite*, 14(5), 357-390.
16. Bianchini L., Bedendo I.P. (1998). Efeito antibiótico da própolis sobre bactérias fitopatogênicas. *Scientia Agrícola*, Piracicaba, 55(1), 149-152.
17. Bićanić T. (2020). Rezistentnost bakterija kao odgovor na zagađenje tla i vode antibioticima. Završni rad. Sveučilište u Zagrebu Prirodoslovno-matematički fakultet.
18. Bolkan H. A., Reinert W. R. (1994). Developing and implementing IPM strategies to assist farmers: an industry approach. *Plant Disease*. 78(6), 545-550.
19. Borkar S. G., Yumlembam R. A. (2017). *Bacterial diseases of crop plants*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781315367972>.
20. Bostock J., Riley H. T. (1855). The Various Kinds of Insects. Book XI. „The meaning of the terms commosis, pissoceros, and propolis,” in Pliny the Elder. *The Natural History*. Chapter 6 (5). Taylor and Francis. London. UK.
21. Braakhuis A. (2019). Evidence on the health benefits of supplemental propolis. *Nutrients*, 11(11), 2705.
22. Burdock G. A. (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical toxicology*, 36(4), 347-363.
23. Burrill T. J. (1881). Bacteria as a cause of disease in plants. *The American Naturalist*, 15(7), 527-531.
24. Carvalho G. J. L., Sorde G. de S. (2021). Application of propolis in agriculture. *Arquivos do Instituto Biológico*, 88.
25. Darwish R.M., Abu Fares R.J., Abu Zarga M.H., Nazer I.K. (2010). Antibacterial effect of Jordanian propolis and isolated flavonoids against human pathogenic bacteria. *Afr. J. Biotechnol.*, 9, 5966–5974.
26. De Castro S. L. (2001). Propolis: biological and pharmacological activities. Therapeutic uses of this bee-product. *Annual Review of Biomedical Sciences*, 3, 49-83.
27. Ehler L. E. (2006). Integrated pest management (IPM): definition, historical development and implementation, and the other IPM. *Pest management science*. 62(9), 787-789.
28. Ernješ M. (2017). Određivanje polifenola i flavonola u propolisu UV-VIS spektrofotometrijom. Završni rad. Veleučilište u Požegi.
29. Etminani F., Etminani A., Darvishi S. (2017). Evaluation of antibacterial properties of alcohol and water extracts of propolis on *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas syringae* and *Serratia plymuthica*. *Scientific journal od Kurdistan. University od Medical Sciences*. Vol.22 No.4.
30. Fearnley J. (2001). *Bee Propolis: Natural Healing from the Hive*. Souvenir Press. London. UK.
31. Freitas A. S., Cunha A., Oliveria R., Almeida-Aguiar C. (2022). Propolis antibacterial and antioxidant synergisms with gentamicin and honey. *Journal of Applied Microbiology*, 132, 4.

32. Gerard J. (2015). The herbal or general history of plants: the complete 1633 edition as revised and enlarged by Thomas Johnson. Calla editions. Mineola. New York.
33. Ghisalberti E. L. (1979). Propolis: a review. *Bee world*. 60(2), 59-84.
34. Guginski-Piva C. A., dos Santos I., Wagner Júnior A., Winter Heck D., Faber Flores M., Pazolini K. (2015). Propolis for the control of powdery mildew and the induction of phytoalexins in cucumber. *Idesia (Arica)*, 33(1), 39-47.
35. Hady A. E., Faten K., Hegazi A. G. (2002). Egyptian propolis: 2-Chemical composition, antiviral and antimicrobial activity of East Nile Delta propolis. *Z. Naturforsch C*, 57(3-4), 386-394.
36. Hashemi J. M. (2016). Biological effect of bee propolis: a review. *Eur. J. Appl. Sci*, 8, 311-318.
37. Huang Y.C., Chou Y.H., Su L.H., Lien R.I., Lin T.Y. (2006). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization and its association with infection among infants hospitalized in neonatal intensive care units. *Pediatrics*, 118, 469–474.
38. Jaski J. M., Telaxka F. J., Moura G. S., Franzener G. (2019). Green propolis ethanolic extract in bean plant protection against bacterial diseases. *Ciência Rural*, 49(6).
39. Kivalkina B. P. (1948) *Pchelovodstvo* 10. Iz: Ghisalberti E. L. (1979) Propolis: a review. *Bee world*.
40. Kljenak A. (2017). Fitokemijske karakteristike i biološka aktivnost propolisa. Diplomski rad. Kemijsko-tehnološki fakultet i medicinski fakultet. Sveučilište u Splitu.
41. Krajinović S. (2016). Utjecaj propolisa na porast fitopatogenih gljiva *Pythium irregulare* i *Fusarium solani*. Diplomski rad. Poljoprivredni fakultet. Osijek. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.
42. Krell R. (1996). Propolis. Value-added products from beekeeping. *FAO Agricultural Services Bulletin* no. 124.
43. Kuropatnicki A. K., Szliszka E., Krol W. (2013). Historical aspects of propolis research in modern times. *Evidence-based complementary and alternative medicine*.
44. Lindenfelser L. A. (1967). Antimicrobial activity of propolis. *American Bee Journal*, 107, 90–92.
45. Lindenfelser L. A. (1969). In vivo activity of propolis against *Bacillus* in larvae. *Invert. Path.*, 12, 129-131.
46. Lotfy M. (2006). Biological activity of bee propolis in health and disease. *Asian Pac J Cancer Prev*, 7(1), 22-31.
47. Marcucci M. C. (1995). Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, 26(2), 83-99.
48. Martinko K. (2022) Baktericidni i fungicidni učinak fenilboronske kiseline na patogene u uzgoju rajčice. Doktorski rad. Agronomski fakultet. Sveučilište u Zagrebu.
49. Martins P. M., Merfa M. V., Takita M. A., De Souza A. A. (2018). Persistence in phytopathogenic bacteria: do we know enough?. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1099.
50. Meyer W., Ulrich W. (1965). 'Propolis bee' and their activities. *Bee world*. 37(2), 25-36. doi:10.1080/0005772x.1956.1109491.
51. Miličević T. (2015). Bolesti lišća jagode. *Glasilo biljne zaštite*. 15(5), 343-353.

52. 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. *Microbiol Res.*, 152, 239-46.
53. Mohdaly A. A., Mahmoud A. A., Roby M. H., Smetanska I., Ramadan M. F. (2015). Phenolic extract from propolis and bee pollen: composition, antioxidant and antibacterial activities. *Journal of Food Biochemistry*, 39(5), 538-547.
54. Nashveh M., Nazeri S., Zafari, D. (2018). Antibacterial activity of balsam and propolis from *populus deltoides*. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*. 31(2), 427-435.
55. NN (2000). Pravilnik o kakvoći meda i drugih pčelinjih proizvoda. *Narodne novine*, 20, 2000-280.
56. NN (2009). Zakon o poljoprivredi. *Narodne novine*, 149, 2009-3636.
57. NN (2012). Pravilnik o uspostavi akcijskog okvira za postizanje održive uporabe pesticida. *Narodne novine*, 142,2012-3012.
58. NN (2022). Zakon o održivoj uporabi pesticida. *Narodne novine*, 46, 2022-573.
59. O'Neill J. I. M. (2014). Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. *Review on Antimicrobial Resistance*, 20, 1-16.
60. Ordonez R. M., Zampini I. C., Moreno M. N., Isla M. I. (2011). Potential application of Northern Argentine propolis to control some phytopathogenic bacteria. *Microbiological Research*, 166(7), 578-584.
61. Pasupuleti V. R., Sammugam L., Ramesh N., Gan S. H. (2017). Honey, propolis, and royal jelly: a comprehensive review of their biological actions and health benefits. *Oxidative medicine and cellular longevity*. <https://doi.org/10.1155/2017/1259510> (pristupljeno: 1.9. 2022).
62. Patyka V., Buletsa N., Pasichnyk L., Zhitkevich N., Kalinichenko A., Gnatiuk T., Butsenko L. (2016). Specifics of pesticides effects on the phytopathogenic bacteria. *Ecological Chemistry and Engineering*, 23(2), 311.
63. Pereira D. S., Nakasone A. K., de Oliveira L. C., de Oliveira M. S., Pereira N. S., Cruz J. N., Freitas C. I. A. (2020). Effect of extracts of amazonian bee propolis on *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* in the State of Pará-Brazil. *Embrapa Amazônia Oriental-Artigo em periódico indexado*. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i11.9464> (pristupljeno: 1.9.2022).
64. Prokopy R.J. (2003). Two decades of bottom-up, ecologically based pest management in a small commercial apple orchard in Massachusetts. *Agric Ecosyst Environ*, 94, 299–309.
65. Przybyłek I., Karpinski T. M. (2019). Antibacterial properties of propolis. Department of Medical Microbiology. Poznan University of Medical Sciences.Poland.
66. Rabelino P. G., Zignago A., Silvera-Pérez E. (2009). Caracterización *in vitro* de bacterias fitopatógenas en dos extractos de propóleos de diferentes orígenes fitogeográficos. *Centro Agrícola*, 36(4), 43-48.
67. Ransome H. M. (1937). *The Sacred Bee in Ancient Times and Folklore*. George Allen & Unwin. London. UK.

68. Rodrigues B., Coqueiro D. S. O., Di Piero R. M. (2021). Propolis and Lentinula edodes extracts can control the angular leaf spot of strawberry by different mechanisms. *Journal of Plant Pathology*, 103(3), 799–808.
69. Sabatini A.G., Alexandrova M., Carpana E., Ghini S., Girotti S., Porrini C., Bazzi C., Baroni F., Alessandrini A. (2004). Relationships between *Apis mellifera* and *Erwinia amylovora*: Bioindication, bacterium dispersal and quarantine procedures. In: X International Workshop on Fire Blight, 704, 155-162.
70. Sforcin J. M., Bankova V. (2011). Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *Journal of ethnopharmacology*, 133, 253-260.
71. Sforcin J.M. (2016). Biological properties and therapeutic applications of propolis. *Phytother. Res.*, 30, 894–905.
72. Siheri W., Alenezi S., Tusiimire J., Watson D. G. (2017). The chemical and biological properties of propolis. In: *Bee products-chemical and biological properties*, 137-178. Springer, Cham.
73. Smith J. A., Ross W. D. (1910). *The Works of Aristotle*. Translated into English Aristotle. *Historia animalium*. Volume IV. D'Arcy Wentworth Thompson. The Clarendon Press. Oxford. UK.
74. Takaisi-Kikuni N. B., Schilcher H. (1994). Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. *Planta Med.*, 60, 222-7.
75. Walker P., Crane E. (1987). Constituents of propolis. *Apidologie*, 18(4), 327-334.
76. Zampini I. C., Salas A. L., Maldonado L. M., Simirgiotis M. J., Isla M. I. (2021). Propolis from the Monte Region in Argentina: A Potential Phytotherapeutic and Food Functional Ingredient. *Metabolites*. <https://doi.org/10.3390/metabo11020076> (pristupljeno 23.8.2022.)

ŽIVOTOPIS

Klara Markov rođena je 7. travnja 1999. godine u Šibeniku. Godine 2013. je završila osnovnu školu „Murterski škoji“ u Murteru gdje je pokazala interes prema glumi i sportu (četiri godine se bavila rukometom u „RK Murter“). Gimnaziju Antuna Vrančića u Šibeniku, klasični smjer, upisuje 2013. god. gdje je stekla znanje iz engleskog jezika, B2 stupanj. Uz engleski dobro se služi i talijanskim jezikom u pisanju i govoru. Srednju školu završava 2017. god. Za vrijeme srednjoškolskog obrazovanja glumila je u kazališnoj udruzi „Virko“ u Šibeniku. Iste godine obrazovanje nastavlja na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, gdje upisuje preddiplomski studij Fitomedicine, a 2020. god. i istoimeni diplomski studij. Za vrijeme srednjoškolskog i fakultetskog obrazovanja radila je razne poslove u turizmu i ugostiteljstvu čime je stekla odlične komunikacijske i organizacijske vještine. Volontira u udruzi „Latinsko idro“ koja njeguje kulturnu baštinu otoka Murtera, dok je ujedno i član Studentskog zbora Agronomskog fakulteta i Kluba studenata agronomije.