

## 8.0 General discussion / Allgemeine Diskussion

### 8.1 General discussion

The large number of bees living in a crowded space can have disastrous consequences for the colony, due to the very fast transmission of parasites and pathogens among individuals in the beehive. The death threat of honeybee colonies attacked by parasites, pests, or pathogens is so high that affected colonies have to be treated in some way to prevent them from perishing. The most urgent problem of apiculture based on the western honeybee *Apis mellifera* L. today is the threat of extermination by the parasitic mite *Varroa destructor* (Anderson and Trueman). Parasitic mites and mite-related diseases have caused the death of most wild honeybees and left the commercial colonies at high risk. In addition to parasitic mites, the honeybee is also a victim of attack by several types of viruses, bacteria, fungi, protozoans, and insect pests such as the greater wax moth *Galleria mellonella* L., and the small hive beetle *Aethina tumida* Murray among several others. The effect of the other bee diseases is nowadays overshadowed by varroosis, except the newly emerged, and frightening small hive beetle *Aethina tumida*, which is already ravaging the beekeeping industry in the United States and Australia; but not yet detected in Europe. Varroosis, however, still holds the record of current research activities in the field of bee health.

Even though infestation of a colony with *Varroa destructor* is known to elicit colony death, the exact cause of colony death remains controversial. Some researchers, undermining the amount of hemolymph the mites rob from bee brood, reached the conclusion that the causes of colony death after infestation by Varroa mites are the viruses vectored by them, but not the mites themselves. Apart from guesses and speculations, no data exist about the amount of hemolymph and energy mites rob from the brood during the entire capped developmental period. For the first time, the nutritional and energy demand of mites have been demonstrated in this thesis, through starvation and calorimetric experiments. It has been found that the mites suck up to 28% of the non-replenishable reserve food of the capped brood that otherwise would have been consumed by the pupa during metamorphosis, and would have contributed to proper development. The shortage of substances essential for ontogenesis leads to malformation and underdevelopment. This results in the emergence of underweighted adult bees incapable of performing normal life activities. Therefore, the very nature of loss of high amount of reserve food by the capped brood, due to robbing by the mites, may lead to the emergence of bees with the typical mite syndromes. It can not, however, be excluded that factors other than the Varroa mites themselves, such as the viruses and bacteria vectored by them, could contribute to the malformation of bees infested with

Varroa mites during brood development; the mites, however, still play remarkable roles to cause the problem, or add up to it.

Regardless of whether the mites themselves, or the viruses and bacteria that they vector cause the problem of colony death, mites have to be controlled. Research is being carried out in different laboratories to select for honeybees resistant to mites, and to enable them to live together with the mites by suppressing the mite's population size. In addition to the effort to select resistant bee races, researchers are also focusing on the biology of the Varroa mites, trying to understand how they locate bees in the first place. If one can determine the host location mechanism, and discover the physical and chemical cues the mites use, it may be possible to manipulate those cues for a control mechanism that will protect the bees. The process of selection of honeybees resistant to mites, and understanding the biology of the mites is taking undesirably longer time. Therefore, the colony has to be treated in the meantime to stop its death.

Different types of biotechnical and chemical mite control methods are available at present. The biotechnical methods are laborious, time consuming, and also not very efficient. Effective mite control may be achieved by the use of certain acaricides, which are unfortunately associated with several drawbacks. Some acaricides are toxic to the bees and the beekeeper above a certain threshold concentration, and they also cause residue problems in bee products such as honey, wax, and propolis. The other major problem with the use of acaricides is that mite populations resistant to acaricides have already emerged, thus, acaricides are losing their efficiency. As living organisms, mite populations will eventually adapt to whatever chemical control mechanism one develops, and thus it is an ongoing struggle that may never be completely won. Thus with one solution to varroosis at hand, the search for other, better, and effective solutions could save the honeybee colony from its demise. Presently, the search for antivarroa agents is mainly concentrating on in the realm of organic acids and plant secondary metabolites. A number of natural products, including essential oils from herbs and spices, are being examined for their potential in mite control. It is actually desirable to use a natural product, which is a mixture of several compounds, with different modes of action, since the development of resistance against such mixtures takes longer time. One of such natural products, known for its broad spectrum of biocidal actions, is propolis.

Even though it naturally occurs in the beehive, and does not incur the beekeeper extra cost, the potential antivarroa use of propolis is completely forgotten. The beekeepers and bee researchers know about the antibacterial, antifungal, and several other curing effects of propolis, but not its antivarroa actions. It seems that there is a rationale for bee researchers and beekeepers not to think of the potential acaricidal use of propolis. The *in situ* presence of propolis in the

beehive, where the Varroa mites wreck havoc, may lead at a first glance to the notion that propolis does not have any effect on mites; otherwise the mite would have been killed by propolis. In this thesis work the antivarroa actions of propolis of different geographic origins were investigated.

Propolis showed Varroa narcotizing and varroacidal effects. The length of narcosis and the mortality rate of mites depended on the solvent of extraction (70% or 40% ethanol, or water), concentration of propolis, and contact time. Propolis extracted in 70% ethanol was found to be highly toxic, resulting in 100% narcosis of mites regardless of the contact time and concentration of propolis. After treatment with weak concentrations of propolis (e.g. 0.5%, 1%, and 2%) most mites recovered from narcosis, and few died. However, the treatments with concentrated propolis solutions (e.g. 5% and 7.5%) led to higher mortality and little recovery rates from narcosis. The treatment with 40% ethanol-extracted propolis was less effective, both in its Varroa narcotizing and varroacidal actions, compared to that of propolis extracted in 70% ethanol. The treatments with water-extracted propolis had negligible effects on mites, considering their Varroa narcotizing and varroacidal effects.

From the trends observed in the antivarroa actions of the different extracts of propolis, it was clear that extraction with strongly concentrated propolis procures the biologically active hydrophobic components of propolis, that have strong antivarroa actions. The water soluble components of propolis are less active and constitute a minor proportion of its chemical make-up. Propolis is, thus, inactive in the beehive interior *in situ* due to the insolubility of its biologically active components; its potential is concealed by its insolubility. Thus, propolis can be used as an antivarroa substance after extracting and dissolving it in ethanol. Spraying honeybees with Varroa mites on their surface, with 10% propolis in 55% ethanol, in a preliminary experiment, showed that the mites were dead at the end of the experiment. The dead mites either remained attached to the bee or fell down, but the bees were neither narcotized nor aggressive. This is an indication that propolis solution can be used in the beehive interior as a varroacide.

Even though the treatment with lower concentrations of propolis did not result in a remarkable mortality of mites, it significantly reduced their heat production rate. This indicates that even the non-lethal doses of propolis could be used in mite control, instead of the strongly concentrated and lethal ones. The use of lower concentrations of propolis is desirable, since higher concentrations, though they showed no observable effects in a preliminary experiment, may affect the bees in some way. It is also wastage of resources to use higher concentrations of propolis, if the desirable effects could be achieved with the lower ones. The effectiveness of

treatments at lower concentrations can be increased by exploiting the phenomenon of synergism of propolis treatment with high temperature (e.g. 40 °C).

The antivarroa effects of propolis investigated in this thesis concentrated on its narcotic effect, mite weakening, reduction of the heat production rate, and varroacidal actions. It is, however, possible that propolis affects the chemical cues and orientation of mites, thus disturbing their ability to locate, and enter a ready-to-cap brood. This latter mechanism was displayed by some essential oils.

Investigations on the antivarroa actions of ethanol-extracted propolis from different geographic origins displayed that all propolis samples showed antivarroa actions, with slight differences in the strength of narcotic and varroacidal effects. The slight differences in the strength of activity of propolis samples of different geographic origins can be explained by the quantitative and/or qualitative variation of the propolis chemical make-up. The geographic location, and, therefore, the vegetation composition of the area, affects the chemical make-up of propolis quantitatively and/or qualitatively. Some propolis samples, however, showed similar antivarroa activities regardless of their geographic origins. The possession of comparable antivarroa actions by the different propolis samples is an indication that, regardless of the origin, propolis is collected and accumulated in the beehive for similar purposes.

Not only the mite *V. destructor*, but also a weakened-colony-devastating, and storehouse comb destructive insect pest, the greater wax moth *Galleria mellonella* that was also sensitive to propolis treatment. The treatment of the wax moth larvae with propolis narcotized them, and reduced their heat production rate remarkably. The sensitivity of wax moth larvae to the propolis treatment changed with larval instar, with the early instars displaying higher sensitivity. Higher concentrations of propolis induced mortality of larvae. Even though weak concentrations of propolis did not kill the larvae, they affected metamorphosis of the pupae that were treated at the seventh larval instar, with the strength and nature of the effect being dependent on the sublethal concentration of propolis.

After treatment with propolis concentrations that are sublethal to the seventh instar larva, all treated larvae underwent larval-pupal ecdysis, with highly diminished ecdysal peaks. The nature of the subsequent pupal metamorphosis of such treated larvae was highly affected by the concentration of the sublethal propolis used. After treatment with very weak sublethal concentrations of propolis (e.g. 1% w/v), the pupae were able to complete their metamorphosis. In such cases, metamorphosis lasted shorter than that of the control organisms, indicating that propolis at such concentrations plays the role of insect growth regulators (IGR). The adults that emerged after the accelerated metamorphosis of pupae displayed weakly structured *p-t* curves,

which is an indication of their inability to fly properly. The weak flying activities of adults could be explained by the underdevelopment of structures, such as flying muscles. Even though the larvae treated with higher sublethal concentrations of propolis (e.g. 4% w/v) underwent the larval-pupal ecdysis, pupal metamorphosis was aborted. This is a good indication that optimal concentrations of propolis, though not lethal to the larval stage, can be used to control wax moths by interfering with pupal metamorphosis. The effects of weak sublethal concentrations of propolis on the development of *Galleria* are very difficult to judge visually, since no death was observed, and the organisms appeared normal. The calorimetric method, however, helped to monitor the weakened metabolic activities that take place during metamorphosis, and the flying activities of adults.

The screening of insecticidal, insectistatic, and antivarroa actions of propolis by the use of the calorimetric method is highly reliable compared to the traditional and standard methods. The only limitation of the calorimetric method to investigate the insectistatic, insecticidal, and antivarroa actions of propolis is that it was not possible to record the heat production rate of the organism in the first 30 to 45 min after treatment, due to the time needed for the thermal equilibration of the calorimeter. This problem can, however, be solved by coupling the calorimetric method with infrared CO<sub>2</sub> analysers, or oxygen sensors that measure oxygen concentration in air.

The antimicrobial activities of the different extracts of propolis from various geographic locations were compared by using parameters such as the minimal inhibitory concentrations (MIC), minimal bactericidal concentrations (MBC), diameter of the inhibition zone, and several parameters of the *p-t* curves. The most important features of the *p-t* curves used for comparisons were the level of drop of the curve after treatment, the time needed for the dropped curve to revive and to come back to the before-treatment position, and the level of the *p-t* peak achieved after treatment. The ethanol extract of propolis (EEP) was found to be highly effective against all microbes tested. The dose-response curves of concentration versus the effect on the *p-t* curve, by the different extracts, demonstrated that the response patterns were similar to each other, but achieved at lower concentrations of EEP, and very high concentrations of WEP, intermediated by those of the PV. For some propolis samples, there were no remarkable differences in the antimicrobial activities of the EEP and PV. The higher antimicrobial activities of the PV could be an indication that these fractions of propolis play roles in reducing the microbial flora in the air within the beehive. The water extracts of propolis (WEP) were, however, the least active of all extracts, their antimicrobial activities being detected only at higher concentrations. The lower activity of WEP, and its less abundance in the beehive, demonstrated by the low yield of water

extracts, explains why this component of propolis does not play considerable roles against the parasites and pathogens of honeybees *in situ*.

The reason why EEP is superior to WEP and in some cases to PV, in its antimicrobial activities, is that the extraction of propolis with ethanol procures all water soluble, ethanol soluble, and the volatile components of propolis; making EEP superior to the other two extracts qualitatively and/or quantitatively. The qualitative and eventually quantitative richness of EEP in its chemical make-up is indicated by its higher yield of extraction, several folds higher than that of PV or WEP.

Since the yield of extraction of WEP is very low, and it has very weak antimicrobial activities, compared to EEP, it is not economical to use WEP in antimicrobial propolis therapy. It can, however, be used at higher concentrations in situations where an alcohol solution of propolis can not be used, such as for religious reasons. The PV have very low yield, compared to EEP, and it also possess activities comparable to or lower than that of EEP. Thus, it is not economically feasible to use PV as antimicrobial agents as far as EEP can be used in place.

The Gram positive bacteria were generally found to be more sensitive to propolis treatments than their Gram negative counter parts and the fungi. Among the two Gram negative bacteria tested, *E. coli* was the most resistant. The other Gram negative bacterium, *P. syringae*, was relatively sensitive to most treatments when considering the diameters of inhibition zones at higher concentrations, but it needed higher MIC, compared to that of the Gram positive bacteria. The lower sensitivity of Gram negative bacteria can be accounted for by the impermeability of their outer membrane to antibacterial agents. The especially low sensitivity of *E. coli* to propolis can be due to the presence of multiple drug resistance pumps, in addition to the impermeability of the outer membrane, which are already confirmed for several strains of this bacterium against different types of drugs.

The three filamentous fungi were less sensitive to propolis treatment than the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, which showed higher diameters of inhibition zones, especially at higher concentrations of propolis. The sensitivity of *S. cerevisiae* to concentrated propolis solutions is comparable to that of most Gram positive bacteria, except that the yeast demonstrated relatively higher MIC values.

Investigation of the antifungal actions of propolis using the Petridish bioassay method is highly limited by the weak solubility of propolis in the agar layer. This fact was demonstrated by the saturated dose-response curves of propolis concentration versus diameter of inhibition zone of all filamentous fungi. Though retardation of propolis diffusion through the agar layer also occurs in the bacterial Petridish bioassay experiments, it is not as sever as in the case of fungal

cultures. The reason for this could be the higher consistency of fungal growth media that greatly impedes diffusion as compared to the less consistent bacterial growth media.

The problem of propolis diffusion across the agar layer can be solved by using nutrient broth rather than nutrient agar, which is, however, applicable only for bacterial and yeast cultures. Due to the colour of propolis and the formation of emulsions upon addition of propolis to a bacterial culture in a broth, its antimicrobial action is impossible to investigate spectrophotometrically. The use of the calorimetric method, however, solves these problems since it is not affected by the colour of the media. The calorimetric method is more sensitive than the Petridish bioassay method, since it displays antibacterial actions of propolis concentrations considered to be non-inhibitory by the other method. In addition to enabling us to detect the activities of lower concentrations of propolis, the calorimetric method contributes in the elucidation of the mechanisms of the biocidal actions of propolis, since it records the metabolic activities of bacteria “online”. The Petridish bioassay method, in contrast, displays cumulative results of incubation for 24 to 48 hours, or more. Based on the calorimetric results it was possible to illustrate that propolis possesses concentration-dependent bactericidal and bacteriostatic actions.

The calorimetric method, however, is also not without drawbacks. The limitations of this method arise due to the tube connection between the fermenter and the calorimetric spiral. Due to the tube connection, the oxygen concentration in the flow line drops drastically at higher cell densities, introducing artefacts in the  $p-t$  curve. However, as far as treatment is carried out before the  $p-t$  peak is achieved, the curve is a reflection of the events that happen in the fermenter, making the calorimetric method very reliable and enabling us to exploit its higher sensitivity in the investigation of the antimicrobial action of biocides such as propolis which are difficult to investigate using other methods.

## 8.2 Allgemeine Diskussion

In einem Bienenstock lebt eine hohe Zahl von Bienen auf beengtem Raum zusammen. Das hat die schnelle Übertragung von Parasiten und Pathogenen zur Folge. Viele der infizierten Völker sterben ab. Das dringlichste Problem bei der Zucht und Haltung der westliche Honigbiene, *Apis mellifera* L., stellt deren Befall durch die parasitische Milbe *Varroa destructor* (Anderson und Trueman) dar. Darüber hinaus sind die Honigbienen durch verschiedene Virusstämme, Bakterien, Pilze, Einzeller und parasitische Insekten, z.B. die Große Wachsmotte *Galleria mellonella* L. und den kleinen Beutenkäfer *Aethina tumida* Murray bedroht. Neben *A.*

*tumida*, der die Bienenzucht in den USA und Australien bedroht, stellt *Varroa destructor* für die Bienenhaltung weltweit das größte Problem dar.

Die genaue Ursache für das Absterben von mit Varroa infizierten Bienenvölkern wird kontrovers diskutiert. Einige Forscher gewichten den Energieverlust durch Hämolympverlust als gering. Diese Autoren mutmaßen, dass für den Kolonietod nicht die Milben selbst, sondern die durch sie übertragenen Pathogene verantwortlich sind. Bisher gab es zur Menge der Hämolymphe und der Energie, die der Bienenbrut durch die Milben tatsächlich verloren gehen, keine exakten Daten. In dieser Arbeit konnte erstmals der genaue Nährstoffbedarf der Milben mittels Hungerversuche- und kalorimetrischer Experimente demonstriert werden: Die Milben verbrauchten bis zu 28% der nicht regenerierbaren Reserven der verdeckelten Bienenbrut. Diese verlorenen Energiereserven führen zu deformierten, unterentwickelten und untergewichtigen adulten Bienen - dem typischen „Milben-Syndrom“. Obwohl nicht ausgeschlossen werden kann, dass Viren und Bakterien an diesen Missbildungen mitwirken, sind die Milben selbst sicherlich als die Hauptursache anzusehen.

Es wurden zahlreiche Versuche unternommen, milbenresistente Bienenvölker zu züchten bzw. die Bienen über das Verständnis des Wirtsfindemechanismus von Varroa und der Manipulation der entsprechenden Parameter zu schützen. Diese Ansätze sind jedoch sehr zeitintensiv. Heute stehen mit verschiedenen biotechnischen und chemischen Techniken kurzfristiger wirksame Kontrollmethoden gegen die Milben zur Verfügung. Die biotechnischen Methoden sind jedoch arbeitsaufwendig und nicht sehr wirksam. Eine effektivere Milbenkontrolle kann durch den Einsatz bestimmter Akarizide erreicht werden, die jedoch häufig toxisch sind und Rückstände in Honig, Wachs und Propolis (Kittharz) hinterlassen. Außerdem führen viele der herkömmlichen Akarizide zu resistenten Milbenpopulationen. Die aktuelle Forschung konzentriert sich daher auf die Nutzung organischer Säuren und sekundärer Metabolite, darunter ätherische Öle aus Kräutern und Gewürzen, als Milbenbekämpfungsmittel. Angestrebt wird eine Mischung aus mehreren Komponenten mit verschiedenen Wirkweisen, da hierbei die Herausbildung von Resistenzen weniger wahrscheinlich ist. Eine derartige Mischung natürlicher Substanzen ist Propolis.

Obwohl es im Bienenstock in ausreichender Menge vorhanden ist und daher dem Imker keine Kosten verursacht, ist die Eignung von Propolis zur Milbenbekämpfung bisher nicht weiter erforscht worden. Die antibakterielle und antifungale Wirkung von Propolis ist gut bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde die akarizide Wirkung von Propolisproben aus unterschiedlichen geographischen Gebieten untersucht.

Propolis narkotisierte und tötete die Milben. Die Intensität dieser Effekte hing von der Art des Lösungsmittels (70%iges oder 40%iges Äthanol oder Wasser), der Propoliskonzentration und der Kontaktzeit ab. In 70%igem Äthanol gelöstes Propolis war hochtoxisch und narkotisierte unabhängig von seiner Konzentration und der Kontaktzeit 100% der Milben. Bei geringeren Propoliskonzentrationen (0,5%, 1% und 2%) erwachten die meisten Milben aus der Narkose, nur wenige starben. Höhere Propoliskonzentrationen (5% und 7,5%) führten zu einer höheren Mortalitätsrate. In 40%igem Äthanol gelöstes Propolis narkotisierte und tötete die Milben weniger effektiv als in 70%igem Äthanol gelöstes Propolis. Der Effekt von in Wasser gelöstem Propolis war vernachlässigbar gering.

Daraus lässt sich folgern, dass die wasserunlöslichen Komponenten des Propolis die Milben schädigen, die wasserlöslichen Bestandteile hingegen kaum aktiv sind. Unter natürlichen Bedingungen ist Propolis im Bienenstock wegen der Wasserunlöslichkeit seiner akariziden Komponenten nicht gegen Milben wirksam. In Äthanol aufbereitetes Propolis könnte jedoch gut als Bekämpfungsmittel eingesetzt werden. Hierfür spricht auch, dass durch eine Behandlung mit 10% Propolis in 55%igem Äthanol die Milben getötet werden, die Bienen hingegen unbeeinflusst bleiben und weder narkosiert noch aggressiv sind. Das zeigten vorangegangene (in der vorliegenden Arbeit nicht dargestellte) Versuche.

Geringere Propoliskonzentrationen führten bei den Milben zwar nicht zum Tod, reduzierten jedoch ihre Wärmeproduktionsrate signifikant. Dies ermöglicht den Einsatz auch nicht-letal, geringerer Propoliskonzentrationen zur Milbenbekämpfung. Die geringere Effektivität einer Behandlung mit einer geringeren Konzentration kann mit einer höheren Inkubationstemperatur (z. B. 40 °C) ausgeglichen werden.

Vergleichende Untersuchungen zur akariziden Wirkung von Propolisproben aus verschiedenen geographischen Regionen zeigten nur geringe Unterschiede bezüglich der Stärke des narkotisierenden Effektes. Die Unterschiede lassen sich durch die abweichenden chemischen Zusammensetzungen der Proben erklären, die sich aus der jeweils regionaltypischen Flora der Gebiete ergeben. Die Tatsache, dass einige Proben aus verschiedenen Regionen dieselbe akarizide Wirkung zeigten, ist ein Hinweis darauf, dass Propolis von den Bienen weltweit für denselben Zweck gesammelt wird.

Neben *V. destructor* reagierte auch die Große Wachsmotte *Galleria mellonella* auf eine Propolisbehandlung mit Narkotisierung und einer erheblich reduzierten Wärmeproduktionsrate. Die Empfindlichkeit der Großen Wachsmotte gegenüber Propolis war bei den jüngeren Larvalstadien besonders hoch. Höhere Propoliskonzentrationen töteten die Larven. Geringere Konzentrationen, die Motten im siebten Larvalstadium verabreicht wurden, beeinflussten den

Verlauf der Metamorphose. Stärke und Ausprägung dieses Effektes waren von der Propoliskonzentration abhängig.

Nach der Behandlung des siebten Larvalstadiums mit subletalen Dosen entwickelten sich die Larven zwar zur Puppe, wiesen aber verminderte Wärmeproduktionsrate während der Häutung auf. Der Grad der Störung der anschließenden Metamorphose war in hohem Maße von der Propoliskonzentration abhängig. Nach einer Behandlung mit sehr schwach konzentriertem Propolis (z.B. 1% w/v) waren die Puppen zu einer vollständigen Metamorphose in der Lage. Allerdings verlief diese schneller als bei unbehandelten Kontrolle. Dies lässt vermuten, dass Propolis in geringen Konzentrationen eine Rolle als Wachstumsregulator bei Insekten spielen könnte. Die nach einer derartig verkürzten Metamorphose geschlüpften adulten Wachsmotten wiesen schwach ausgeprägte Wärmeproduktionsrate-Zeit ( $p-t$ ) Kurven auf – ein Indiz für eine schlecht entwickelte Flugfähigkeit. Die verminderte Flugfähigkeit könnte z.B. auf eine Unterentwicklung der Flugmuskeln zurückzuführen sein. Bei höheren subletalen Propoliskonzentrationen (z.B. 4% w/v) entwickelten sich zwar sämtliche Wachsmotten-Larven zu Puppen, aber die pupale Metamorphose war hier vollständig gestört. Hieraus ergibt sich die Perspektive, auch subletale Propolisdosen zur Bekämpfung der Großen Wachsmotte einsetzen zu können. Die Effekte von geringen subletalen Propolisdosen auf die Entwicklung von *Galleria mellonella* sind visuell schwierig zu beurteilen, da es nach der Behandlung weder zum Absterben noch zu sichtbaren Beeinträchtigungen der Tiere kommt. Mit Hilfe der Kalorimetrie konnten in diesen Fällen jedoch die verringerten Stoffwechsel- und Flugaktivitäten aufgezeigt werden.

Die Überprüfung der insektiziden bzw. akariziden Wirkung von Propolis mit Hilfe der Kalorimetrie ist den herkömmlichen Methoden stark überlegen. Die einzige Einschränkung der kalorimetrischen Untersuchung besteht darin, dass es wegen der benötigten Zeit für die thermische Stabilisierung des Kalorimeters nicht möglich war, die Wärmeproduktionsrate innerhalb der ersten 30 bis 45 Minuten nach der Propolisbehandlung zu beobachten. Um dieses Problem zu lösen, kann die Kalorimetrie mit Infrarot-CO<sub>2</sub>- oder O<sub>2</sub>-Sensoren gekoppelt werden, die den Kohlendioxid- bzw. Sauerstoffgehalt der Luft messen.

Die antimikrobielle Wirkung von Propolisproben aus verschiedenen geographischen Gebieten wurde anhand einiger Parameter wie der minimalen inhibitorischen Konzentration, der minimalen bakteriziden Konzentration, dem Durchmesser der Hemmhöfe sowie einigen Parametern der  $p-t$ -Kurven bestimmt. Die wichtigsten benutzten kalorimetrischen Parameter waren die Stärke des Abfallens der Kurven nach der jeweiligen Behandlung, die für den Wiederanstieg benötigte Zeit und die Höhe der  $p-t$  Spitze nach der Behandlung.

Der äthanolische Propolisextrakt (EEP) war gegenüber allen getesteten Mikroorganismen höchst effektiv. Die Tendenz der Dosis-Effekt-Kurve von Konzentration gegen Effekt auf die *p-t*-Kurve war bei allen Propolisextrakten ähnlich, aber die gleiche Wirkung wurde von unterschiedlichen Konzentrationen erreicht. Um die gleiche Wirkung auf die *p-t* Kurve zu erreichen, wurde die Konzentration der drei Extrakte wie folgt benötigt: EEP < PV (flüchtige Bestandteile von Propolis) < WEP (wässrige Propolisextrakte). Bei einigen Propolisproben gab es keine nennbaren Unterschiede in der antimikrobiellen Wirkung zwischen EEP und PV. Die höhere antimikrobielle Wirkung von PV könnte bedeuten, dass diese Propolisfraktion eventuell auch unter natürlichen Bedingungen eine Rolle in der Reduzierung der bakteriellen Flora innerhalb des Bienenstockes spielt. Die WEP hatten die geringsten antimikrobiellen Effekte, und deren Wirkungen waren nur bei den höchsten Propoliskonzentrationen zu beobachten. Dies verdeutlicht, dass die WEP *in situ* keine gewichtige Rolle in der Abwehr von Parasiten und Pathogenen spielen können.

Der Grund für die wesentlich höhere antimikrobielle Effektivität von EEP gegenüber den WEP und PV besteht darin, dass mit Äthanol sowohl die wasser- als auch die äthanollöslichen sowie die flüchtigen Komponenten des Propolis extrahiert werden. Durch diesen gegenüber WEP und PV wesentlich erhöhten Ertrag an wirksamen Komponenten sollte EEP das Mittel der Wahl in der Bekämpfung von Parasiten und Pathogenen im Bienenstock sein. In Situationen, in denen der Einsatz alkoholischer Extrakte nicht in Frage kommt (z.B. aus religiösen Gründen), könnte die Verwendung hochkonzentrierter WEP eine Alternative sein.

Grampositive Bakterien waren generell sensibler gegenüber Propolis als gramnegative Bakterien und Pilze. Unter den zwei getesteten gramnegativen Bakterien war *E. coli* besonders resistent. *P. syringae* reagierte zwar sensitiv auf die meisten Behandlungen, im Vergleich zu den grampositiven Bakterien wurden jedoch wesentlich höhere Propoliskonzentrationen benötigt. Die geringere Empfindlichkeit der gramnegativen Bakterien lässt sich mit der Impermeabilität ihrer äußeren Membran gegenüber antibakteriellen Agenzien erklären. Bei *E. coli* könnte eine so genannte „multiple-drug-Pumpe“ für die besonders hohe Resistenz verantwortlich sein, wie sie bereits für verschiedene Stämme dieses Bakteriums nachgewiesen worden ist.

Die drei Schimmelpilze waren gegenüber Propolis unempfindlicher als die Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, die insbesondere bei höheren Propoliskonzentrationen deutlich größere Hemmhöfe aufwies. Abgesehen vom relativ höheren Wert der minimalen inhibitorischen Konzentration ist *S. cerevisiae* in ihrer Sensitivität gegenüber konzentriertem Propolis den grampositiven Bakterien vergleichbar.

Die Untersuchung der antifungalen Aktivität von Propolis durch Petrischalen-Experimente war nur eingeschränkt möglich, da sich Propolis schlecht in der Agarschicht löst. Dies wurde durch die gesättigte Dosis-Effekt-Kurve von Hemmhofdurchmesser gegen Propoliskonzentration bei allen Schimmelpilze deutlich. Die verzögerte Propolisdiffusion war bei den bakteriellen Petrischalen-Experimenten auch zu beobachten. Hier war sie jedoch weniger stark ausgeprägt, was vermutlich an der weniger dichten Konsistenz des Nährmediums lag. Das Problem könnte durch die Verwendung eines flüssigen Nährmediums anstelle des Agars gelöst werden. Dies wäre allerdings nur für Experimente mit Bakterien- und Hefekulturen möglich.

Wegen der Eigenfarbe von Propolis und der Emulsionsbildung nach Zugabe von Propolis zu einem Flüssigmedium ist es unmöglich, die Wirkung von Propolis spektrophotometrisch zu untersuchen. Kalorimetrische Methoden werden hingegen von diesen Phänomenen nicht beeinflusst. Darüber hinaus ist die Kalorimetrie empfindlicher als die Petrischalen-Experimente und kann im Gegensatz zu letzteren bereits bei sehr geringen Propoliskonzentrationen antibakterielle Effekte nachweisen. Ein weiterer Vorteil der Kalorimetrie besteht darin, dass die Stoffwechselraten der Bakterien kontinuierlich verfolgt werden können. Im Gegensatz dazu spiegeln die Petrischalen-Experimente nur die Endergebnisse einer 24 - 48-stündigen oder längeren Zeitspanne wieder (je nach Dauer der Inkubationszeit).

Allerdings ist die Kalorimetrie auch mit Nachteilen verbunden. Die Schlauchverbindung zwischen dem Fermenter und der Kalorimeter spirale hat zur Folge, dass die Sauerstoffkonzentration in der Schlauchleitung bei höheren Zelldichten drastisch abfällt und Artefakte in den *p-t* Kurven verursacht. Erfolgt die Behandlung der Versuchsorganismen vor dem Erreichen der *p-t* Spitze, spiegelt die Kurve jedoch die Vorgänge im Fermenter genau wider und ist eine besonders empfindliche Darstellungsweise der antimikrobiellen Wirkung von biologischen Bekämpfungsmitteln wie Propolis.