

Antimikrobni učinak hrvatskih medova na E.coli, S. aureus i MRSA

Škara, Ivan

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:499365>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-28**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Ivan Škara

ANTIMIKROBNI UČINAK HRVATSKIH MEDOVA

NA *E. coli*, *S. aureus* i MRSA

Diplomski rad

Rijeka, 2020

SVEČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Ivan Škara

ANTIMIKROBNI UČINAK HRVATSKIH MEDOVA

NA *E. coli*, *S. aureus* i MRSA

Diplomski rad

Rijeka, 2020

Mentor rada: izv.prof.dr.sc. Dražen Lušić, dipl.sanit.ing.

Diplomski rad obranjen je dana _____ godine u/na Medicinskom fakultetu Sveučilišta

u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. doc.dr.sc. Željko Linšak, dipl.sanit.ing

2. izv.prof.dr.sc. Darija Vukić Lušić, dipl.sanit.ing.

3. izv.prof.dr.sc. Dražen Lušić, dipl.sanit.ing.

Rad ima 64 stranica, 19 slika, 9 tablica, 45 literaturnih navoda.

SAŽETAK

Povećana rezistentnost patogenih bakterijskih sojeva na široko primjenjivane antibiotike predstavlja globalni problem s kojim se sureće moderna medicina prvenstveno u suzbijanju i liječenju hospitalnih infekcija. Potraga za alternativnim rješenjima svrstala je određene vrste meda sa izrazitim antibakterijskim djelovanjem u skupinu tvari s potencijalnim antibiotskim učincima. U ovom istraživanju ispitivano je antibakterijsko djelovanje ukupno 52 uzorka meda svrstanih u 5 monofloernih grupa prema potvrđenom botaničkom podrijetlu: lipa (*Tilia* sp.), kadulja (*Salvia officinalis* L.), bagrem (*Robinia pseudoacacia* L), kesten (*Castanea sativa* Mill.) i medun te po jednog uzorka meda manuke, tzv. „umjetnog“ meda te antibiotika, uz pomoć makro- i mikro-dilucijske metode. Uzorci su podrijetlom s različitih lokacija pčelinjaka širom Republike Hrvatske (Hrvatsko primorje s otocima Krk, Cres, Lošinj i Pag, Istra, Gorski kotar, Ogulinsko-plašćanska udolina, Lika, područje zagrebačkog prstena, Pokuplje, Banovina, Međimurje, Zapadna Slavonija, Baranja). Ispitivanje bakteriostatskog (MIK) i baktericidnog (MBK) učinka provedeno je na 6 sojeva gram pozitivnih bakterija (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*, ESBL *Escherichia coli*) i 3 soja gram negativnih bakterija (*Staphylococcus aureus*, meticilin-rezistentan *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Enterococcus faecium*). Visoku razinu antibakterijskog djelovanja na sve ispitivane bakterije ostvario je uzorak meduna (M8) od kojih se posebice ističe bakteriostatski učinak na rezistentan soj MRSA u koncentraciji od 0,05 mg/kg (3,1% v/v), dok za isti učinak potrebna koncentracija antibiotika je 4 puta veća i iznosi 0,2 mg/kg (12,5% v/v). Pojedini medovi od bagrema, lipe, kadulje, te uzorci tzv. „umjetnog“ i meda manuke pripadaju skupini sa niskom razinom antibakterijskog djelovanja.

Ključne riječi: antibakterijsko djelovanje, medun, ESKAPE patogeni

SUMMARY

Increased resistance of pathogenic bacterial strains to widely used antibiotics represents a global problem faced by modern medicine primarily in the control and treatment of nosocomial infections. The search for alternative solutions has classified particular types of honey with a pronounced antibacterial effect into a group of substances with potential antibiotic effects. A total of 52 honey samples were studied for their antibacterial activity classified in 5 unifloral groups by their confirmed botanical origin: linden (*Tilia* sp.), sage (*S. officinalis* L.), black locust (*R. pseudoacacia* L), chestnut (*C. sativa* Mill.) and honeydew honey, one sample per each of manuka and the so-called "artificial" honey as well as the antibiotics by means of macro- and micro-dilution methods). Samples derived from different apiary locations of Croatia (Croatian Littoral with the islands of Krk, Cres, Lošinj and Pag), Istria, Gorski kotar, Ogulin-Plaški valley, Lika, wider District of Zagreb, Pokuplje, Banovina, Međimurje, Western Slavonia and Baranja). The study of the bacteriostatic (MIK) and bactericidal (MBK) effect of studied honey samples was carried out on 6 strains of gram-positive bacteria (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*, ESBL *Escherichia cphylococci* and *Escherichia coli* negative), methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Enterococcus faecium*). High level of antibacterial activity on all tested bacteria was reached by the honeydew honey sample (M8), with particular bacteriostatic effect on the tested MRSA strain in the concentration of 0.05 mg/kg (3.1% v/v), whilst the required concentration of antibiotics for the same effect was 4 times higher amounting 0.2 mg/kg (12.5% v/v). Particular acacia, linden and sage honey samples, as well as the samples of "artificial" and manuka honey, fall into the group of samples showing a low level of antibacterial activity.

Key words: antimicrobial activity, honeydew hpney, ESKAPE pathogens

SADRŽAJ

1.	Uvod i pregled područja istraživanja	1
1.1.	Definicija meda	2
1.2.	Botaničko podrijetlo meda	3
1.3.	Fizikalno-kemijska svojstva meda	5
1.4.	Antibakterijske komponente meda.....	6
1.4.1.	Kiselost meda.....	6
1.4.2.	Osmolarnost meda.....	7
1.4.3.	Vodikov peroksid.....	8
1.4.4.	Metilglioksal	10
1.4.5.	Defensin-1	11
1.5.	Interpretiranje antibakterijskog djelovanja meda.....	12
1.6.	<i>Escherichia coli</i> i ESKAPE patogeni mikroorganizmi	13
2.	Cilj istraživanja	16
3.	Materijali i metode.....	17
3.1.	Uzorci meda.....	17
3.1.1.	Med od kadulje.....	19
3.1.2.	Med od lipe	20
3.1.3.	Med od kestena	21
3.1.4.	Med od bagrema.....	22
3.1.5.	Medun	22
3.1.6.	Manuka med.....	23
3.1.7.	Tzv. „umjetni“ med.....	24
3.2.	Prprema stock otopine uzoraka meda i tzv. „umjetnog“ meda	24
3.3.	Priprema stock otopine uzorka antibiotika.....	25
3.4.	Bakterijski sojevi	25
3.5.	Priprema inokuluma.....	25
3.5.1.	Određivanje faktora (<i>f</i>).....	26
3.5.2.	Razrjeđivanje bakterijske suspenzije vrijednosti OD ₆₀₀ ~1.....	31
3.5.3.	Potvrda koncentracije radne suspenzije	33

3.6.	Metode određivanje antibakterijskog djelovanja meda.....	34
3.6.1.	Makrodilucijska metoda.....	36
3.6.2.	Mikrodilucijska metoda	41
5.	Rezultati	47
5.1.	Klasifikacija antibakterijskih učinaka meda pomoću neuronskih mreža	47
5.1.1.	Neuronska mreža (Neural-gas)	47
5.1.2.	Algoritam neuronske mreže (Neural-gas).....	48
	doc	
5.2.	Ispitivanje podudarnosti antibakterijskog učinka između makrodilucijske i mikrodilucijske	54
6.	Rasprava.....	57
7.	Zaključak.....	64
7.	Literatura.....	66
8.	Dodaci.....	72
8.1.	Tablice replika uzoraka sa generiranim vrijednostima BMU vektora	72
8.2.	Popis slika	74
8.3.	Popis tablica.....	76
9.	Životopis	77

1. Uvod i pregled područja istraživanja

Od drevnih kultura pa sve do suvremenog doba, medu se pridodaje izrazita važnost, kako u prehranbenim tako i u terapijskim svrhama. U prehrani čovjeka prvenstveno se koristi kao prirodni zaslađivač, koji je ujedno bio i jedini zaslađivač do početka industrijske proizvodnje šećera. S druge strane, korištenje meda i drugih pčelinjih proizvoda u terapijske svrhe posljednjih godina je poznato pod nazivom apiterapija. Temelji apiterapije postavljeni su mnogo prije suvremene medicine, zahvaljujući antičkim narodima Egipta, Rima, Grčke, Asirije i Kine. Med se upotrebljavao samostalno ili u kombinaciji s različitim ljekovitim biljem za liječenje rana nastalih opeklinama, bolesti crijeva, očnih bolesti te za upalu grla i liječenje kašlja (Bogdanov i sur., 2008; Molan, 2009)

Dokazivi terapijski učinak meda se može interpretirati kroz antimikrobno, antioksidacijsko, gastroprotektivno i protuupalno djelovanje. Antimikrobno djelovanje meda ponajviše je rezultat složenog kemijskog sastava i fizikalnih svojstava što se odražava na stvaranje nepovoljnje sredine za bakterije poput *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* (Molan, 1992).

Visoka vrijednost i široki spektar upotrebe u terapijske svrhe te velika globalna dostupnost, uporabu meda svrstavaju u komplementarne oblike moderne medicine. Glavni razlog tome jest pretjerana upotreba antibiotika, odnosno, pojava sve veće rezistencije bakterija na danas poznate antibiotike. Abd-El Aal i sur. (2007.) godine su usporedili antimikrobni učinak meda i antibiotika na bakterije izolirane iz inficiranih opeklinama te pokazali kako je med imao veći inhibicijski učinak na izolirane gram-negativne bakterije (*Pseudomonas aeruginosa*,

Enterobacter spp., *Klebsiella pneumoniae*) u odnosu na antibiotike ciprofloksacin, sulbaktam/ampicilin, ceftriakson i vankomicin (Abd-El Aal i sur., 2007).

Značajno za istaknuti je da važnu ulogu i iskoristivost, osim meda, imaju i drugi pčelinji proizvodi kao što je pelud, matična mliječ, vosak, propolis te pčeljinji otrov.

1.1. Definicija meda

Pravilnik o medu (NN 53/15, 47/17) definira med kao „prirodno sladak proizvod što ga medonosne pčele (*Apis mellifera*) proizvode od nektara medonosnih biljaka ili sekreta živih dijelova biljaka ili izlučevina kukaca koji sišu na živim dijelovima biljaka, koje pčele skupljaju, dodaju mu vlastite specifične tvari, pohranjuju, izdvajaju vodu i odlažu u stanice saća do sazrijevanja“ (Pravilnik o medu, NN 53/15,47/17).

Vijeće Europske zajednice je donijelo Direktivu 2001/110/EZ i 2014/63/EU s ciljem stvaranja ekvivalencije između nacionalnih zakonskih standarda o različitim karakteristikama i vrstama meda te potpunoj informiranosti potrošača u pogledu kvalitete i podrijetla meda. Navedenim aktom se pridonijelo uspostavljanju uvjeta i donekle transparentnosti zajedničkog tržišta te djelomičnom sprječavanju nepoštenog tržišnog natjecanja u svrhu zaštite potrošača. Posljedično, med koji je prilikom stavljanja na tržište deklariran za konzumaciju ne smije imati strani okus ili miris zbog umjetno izmjenjene kiselosti ili dodatkom prehrambenih aditiva, ne smije biti u stanju vrenja ili zagrijavan na način da prirodni enzimi budu inaktivirani ili degradirani. Iznimka na koju se ne odnose kriteriji sastava meda jest med za industrijsku uporabu (Parlament i Vijeće Europske zajednice, 2001/110; 2014/63).

1.2. Botaničko podrijetlo meda

Ovisno o botaničkom podrijetlu meda, osnovna podjela je na nektarni ili cvjetni med i medun ili medljikovac (NN 53/15, 47/17). Nektar je slatka tekućina u kojoj su glavni sastojci voda i ugljikohidrati od kojih su najzastupljeniji monosaharidi glukoza i fruktoza te disaharid saharoza. Izlučuju ga biljne žlijezde nektarije nakon čega ga medonosne pčele skupljaju i svojom aktivnošću prerađuju u med (Oertel, 1980). Količina nektara kojeg biljke izluče ovisi o nadmorskoj visini, zemljopisnoj širini, meteorološkim prilikama (temperatura, vjetar, vlaga), navodnjavanju, gnojenju i o sortama (ukoliko se radi o poljoprivrednim kulturama). Iz navedenih razloga, u Hrvatskoj postoji veliki broj vrsta medonosnog bilja, što se uzročno-posljedično odražava i na raznovrsne pčelinje ispaše (Zima, 2007).

Dio nacionalnog paketa standarda kojima se definirana botaničko podrijetlo meda uključuje i Pravilnikom o kakvoći uniflornog meda (NN 122/09, 141/13). „Uniflorni med proizveden je većinski od nektara jedne biljne vrste, te u netopljivom sedimentu sadržavati najmanje 45% peludnih zrnaca iste biljne vrste, dok multiflorni med vuče podrijetlo od više biljnih vrsta“. Iznimke ovog pravilnika se odnose na medove koji su definirani manjinskim ili većinskim postocima peludnih zrnaca iste biljne vrste u netopivom sedimentu. Vrste medova na koje se odnose iznimke navedenog pravilnika su: med od pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.) koji mora sadržavati najmanje 85% peludnih zrnaca iste biljne vrste, med od uljane repica (*Brassica napus* L.) i med od facelije (*Phacelia tanacetifolia* Benth.) mora sadržavati 60% peludnih zrnaca iste biljne vrste, med od lipe (*Tilia* spp.) mora sadržavati 25 % peludnih zrnaca iste biljne vrste ili 10 % uz karakteristična senzorska svojstva (miris, okus, boja), med od bagrema (*Robinia pseudoacacia* L.), metvice (*Mentha* spp.), vrijeska (*Calluna vulgaris* L.), vriska - primorski vrijesak (*Satureja montana* L.), maslačka (*Taraxacum officinale* Weber) i

ružmarina (*Rosmarinus officinalis* L.) mora sadržavati 20 % peludnih zrnaca iste biljne vrste, med od Kadulja (*Salvia officinalis* L.) mora sadržavati 15 % peludnih zrnaca iste biljne vrste ili 10 % uz karakteristična senzorska svojstva (miris, okus, boja), med od planike (*arbutus unedo* L.) mora sadržavati 10 % peludnih zrnaca iste biljne vrste, a medovi agruma (*Citrus* spp.) i lavande (*Lavandula* spp.) moraju sadržavati 10 % peludnih zrnaca iste biljne vrste ili 5 % uz karakteristična senzorska svojstva (miris, okus, boja). (Pravilnik o kakvoći uniflornog meda, NN 143/2013; NN 122/2009). Bagremov, kaduljin, lipov i kestenov med su među najznačajnijim vrstama uniflornih nektarnih medova u Hrvatskoj.

Za razliku od nektarnog med, osnovna sirovina koju pčele skupljaju i iskorištavaju u proizvodnji meduna jest medna rosa ili medljika. To je slatki sok koji najčešće proizvode kukci iz reda *Homoptera* (lisne i štitaste uši) na način da svojim rilcem (usnim aparatom) buše list i prodiru do dubljih slojeva biljaka odnosno biljnih sokova. Iz biljnih sokova ekstrahiraju dušične tvari koje iskorištavaju za vlastiti metabolizam, a iz organizma izlučuju vodenu otopinu bogatu šećerima - mednu rosu. Količina medne rose na tlu i biljkama koju pčele skupljaju i prerađuju u med, ponajviše ovisi o klimatskim uvjetima koji djeluju na reprodukciju tih kukaca. Meduni od jele, smreke i hrasta najznačajnije su vrste meduna u Hrvatskoj (Lušić i sur., 2009)

Osim u polaznoj sirovini za proizvodnju meda, medun se od nektarnog meda razlikuje po određenim senzorskim (boja i okus) i kemijskim svojstvima te mnogo kraćem vremenu potrebnom za kristalizaciju (Lušić i sur., 2009). Također, karakteristično svojstvo meduna u odnosu na nektarni med je i visoki sadržaj mineralnih tvari koji proporcionalno utječe na vrijednosti električne vodljivosti. Prema Pravilniku o medu (NN 53/15, 47/17) električna vodljivost kod meduna mora biti najmanje 0,8 mS/cm, a nektarnog meda najviše 0,8 mS/cm (Pravilnik o medu, NN 53/15, 47/17).

1.3. Fizikalno-kemijska svojstva meda

Med je namirnica sa jedinstvenom kombinacijom sastojaka koju u najvećoj količini sačinjavaju ugljikohidrati i voda te stoga se može okarakterizirati kao vodena otopina šećera. Udio vode u medu iznosi 15-20% te kao druga najzastupljenija komponentna ima značajnu ulogu u određivanju kvalitete meda, dok s druge strane, suha tvar meda čini 80-85% od ukupnog sastava meda. Prema kvantiteti, najzastupljeniji među makronutrijentima su ugljikohidrati čiji udio u suhoj tvari meda iznosi 95-99%. Osim jednostavnih ugljikohidrata, odnosno fruktoze i glukoze (85-95% od ukupnih ugljikohidrata), u medu su prisutni i složeniji ugljikohidrati čiji su glavni predstavnici disaharidi i oligosaharidi. Ostale komponentne sastava meda koje su prisutne u vrlo malom postotku su minerali, vitamini, proteini i slobodne aminokiseline, organske kiseline, enzimi, pigmenti i tvari arome (kiseline, alkohol, ketoni, aldehidi). Kemijski sastav meda, odnosno različita zastupljenost pojedinih makronutrijenata i mikronutrijenata uvelike ovise o botaničkom podrijetlu što rezultira razlikama među pojedinim vrstama meda (Bogdanov i sur., 2008).

Također, razlike u kemijskom sastavu utječu i na promjenu fizikalnih svojstva meda, posebice na kristalizaciju, viskoznost, higroskopnost, električnu provodljivost i optičku aktivnost). Na temelju razlika u fizikalno-kemijskim karakteristikama meda, razvijeno je više rutinskih analiza za utvrđivanje kvalitete meda i autentičnosti botaničkog podrijetla (Bogdanov i sur., 2002).

1.4. Antibakterijske komponente meda

Od 1892. godine antibakterijsko svojstvo meda poprimilo je novo značenje u medicini, ali i u cjelokupnoj znanstvenoj zajednici (Molan, 1992). Do danas, mnogi znanstvenici su u istraživanjima proučavali utjecaj različitih vrsta meda i njihovih fizikalno-kemijskih svojstava na različite sojeve bakterija (Hussain, 2019; Gobin i sur., 2018; Mulu i sur. 2004). Također, opisani su mehanizmi djelovanja i metode detekcije. Temeljem dobivenih rezultata moderna medicina prepoznala je sve veću ulogu antibakterijskog svojstva meda (Bang, 2003; Jantakee, 2015; Kwakman, 2010; Adams i sur. 2009; Broznić i sur., 2018; Kwakman i sur., 2010)

Svojstva meda kojima se ostvaruje antibakterijsko djelovanje su dvostrukog karaktera: 1) fizikalnog (visoka osmolarnost, kiselost) i 2) kemijskog (vodik peroksid, metilglioksal, defensin-1, fenolni spojevi) (Brudzynki, 2011; Girma, 2019; Bogadanov 1997; Mavric i sur., 2008; Fijuwara i sur., 1990)

1.4.1. Kiselost meda

Med s prosječnom vrijednosti pH od 3,2 do 4,5 pripada skupini namirnica koje predstavljaju nepovoljnu sredinu za rast i razvoj. Kiselost meda ponajviše ovisi o sadržaju organskih kiselina od kojih je najzastupljenija glukonska kiselina a koja nastaje enzimskom razgradnjom glukoze pod djelovanjem enzima glukoza oksidaze (Anupama, 2003).

Istraživanja su pokazala kako niske vrijednosti pH meda posljedično djeluju inhibicijski na bakterije *Corynebacterium diphtheriae* i *Bacillus cereus*, dok se prilikom neutralizacije i povećanja pH vrijednosti inhibicijski učinak velikim djelom smanjuje ili u potpunosti izostaje (Roth i sur., 1986; Molan, 2009).

S druge strane, Bogdanov (1997.) linearnom korelacijom analizira utjecaj pH, slobodne i ukupne kiselosti različitih uniflornih i poliflornih medova na inhibiciju rasta bakterije *Staphylococcus aureus*. Rezultat istraživanja je utvrđivanje značajne korelacije između inhibicije rasta bakterije te ukupne i slobodne kiselosti meda, ali ne i korelacije s vrijednostima pH. Iako su niske vrijednosti pH jedne od glavnih karakteristika antibakterijskog djelovanja meda, u nekim slučajevima drugi faktori utječu na inhibiciju meda, poput meda od kestena koji sprječava rast bakterija s vrijednostima $\text{pH} \geq 5$ (Bogadnov, 1997).

1.4.2. Osmolarnost meda

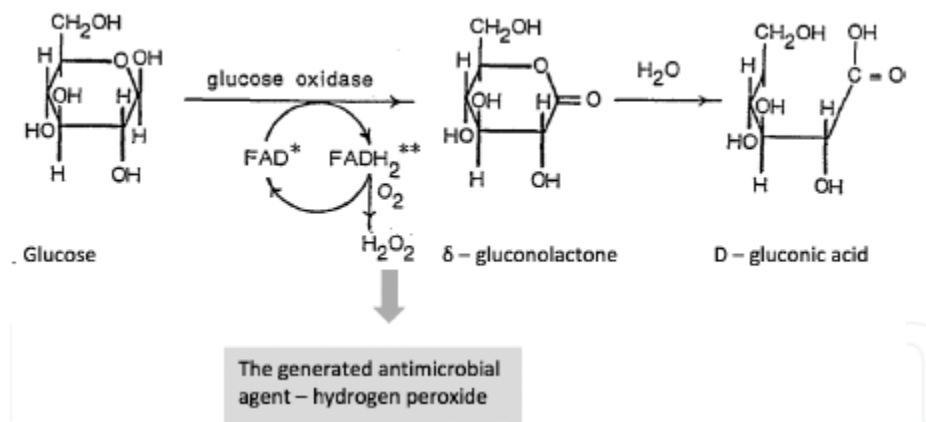
Osmotski učinak meda izražen je zahvaljujući povoljnom koncentracijskom omjeru između ugljikohidrata i vode. Zbog visoke koncentracije ugljikohidrata u suhoj tvari meda, udio slobodnih molekula vode dostupnih za rast bakterija, odnosno aktivitet vode u medu je vrlo nizak. Optimalne vrijednosti aktiviteta vode za rast većine bakterija se kreću u rasponu od 0,94-0,99, dok se vrijednosti prosječnog raspona aktiviteta vode u medu kreću od 0,56 do 0,62 što osim antibakterijskog učinka rezultira i inhibicijom ostalih vrsta mikroorganizama (Molan, 1992).

Iako visoka osmolarnost direktno utječe na rast bakterija, ona ne predstavlja ključan faktor antibakterijske aktivnosti meda. Vidljivo je to iz rezultata mnogobrojnih istraživanja u kojima je dokazano da određene vrste meda pri niskim, odnosno razrijeđenim koncentracijama od 5%, 6,25%, 9,5% i 12% zadržavaju antibakterijsko djelovanje na različite sojeve bakterija *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* (Mulu i sur., 2004; Henriques i sur., 2011). Nadalje, dodatni dokaz činjenici da visoka osmolarnost ne predstavlja

ključan faktor u antibakterijskom djelovanju meda jeste djelovanje tzv. „umjetnog meda“. Zainol i sur. su prezentirali utjecaj tzv. „umjetnog meda“, odnosno smjese šećera (40,5% fruktoze, 33,5% glukoze, 7,5% maltoze i 1,5% saharoze) i 100 ml sterilne deionizirane vode, na različite sojeve bakterija, a dobiveni rezultat je bio samo bakteriostatski učinak pri 50%-tnoj koncentraciji (Zainol i sur., 2013).

1.4.3. Vodikov peroksid

Vodikov peroksid se opisuje kao jedan od glavnih i najistaknutijih sastojaka meda s antibakterijskim djelovanjem. Reakcija stvaranja vodikovog peroksida u medu uključuje oksidaciju glukoze koju katalizira enzim glukoza oksidaza (White i sur., 1963).



Slika 1. Reakcija stvaranja vodikov peroksida (Szweda, 2016)

Dokazano je da izvor enzima glukoza oksidaze predstavljaju pčelinje faringealne žlijezde koje ga luče u sakupljeni nektar tijekom ispaše. Enzimska aktivnost glukoza oksidaze u medu ovisi o nizu fizikalno-kemijskih čimbenika koji dovode do smanjenja njezinih funkcija ili inaktivacije. Neki od tih čimbenika su povećano izlaganje meda svjetlosti i toplini, inhibicija

višom koncentracijom supstrata (glukozom) te stupanj razrjeđenja meda. (Molan, 1992; White i sur., 1963). Utvrđeno je kako je ovaj enzim velikim dijelom inaktivan u nerazrijeđenom medu, dok se razrjeđenjem meda uvelike povećava faktor aktivnosti samog enzima (Brudzynski i sur., 2011).

Skupini enzima koji značajno utječu na koncentraciju vodikovog peroksida u medu, osim glukoza oksidaze pripada i katalaza. Za razliku od glukoza oksidaze koja je pčelinjeg podrijetla, izvor katalaze je botaničkog podrijetla, odnosno nalazi se u sastavu peludnih zrnaca. Stoga je, koncentracija vodikovog peroksida uvjetovana i količinom peludnih zrnaca koje dospiju u med. Katalaza ima i različiti mehanizam djelovanja na vodikov peroksid u odnosu na glukoza oksidazu te se umjesto produkcije, njezino djelovanje očituje hidrolizom vodikovog peroksida na dva razgradna produkta: kisik i vodu. Iz tog razloga enzim katalaza se upotrebljava u analitičke svrhe za određivanje koncentracije vodikovog peroksida (Molan, 1992).

White i sur. (1963.) su među prvima vodikovom peroksidu pripisali antibakterijsko djelovanje zbog značajne korelacije između koncentracije prisutne u medu i bakteriostatskog učinka (White i sur., 1963). Mehanizam antibakterijskog djelovanja vodikovog peroksida opisan je reakcijama oksidacije kojim se povećava oksidativni stres u samoj bakterijskoj stanici. Na smanjenje oksidativnog stresa, odnosno povećane razgradnje vodikovog peroksida u medu, bakterijama osim vlastitih mehanizama obrane i katalaze, posebice pomažu ostale komponentne meda s antioksidativnim djelovanjem kao što su polifenoli i određeni vitamini. Brudzynski i sur. (2011.) su pokazali da vodikov peroksid oksidacijskim djelovanjem uspješno inhibira rast *Escherichia coli*, dok na drugu ispitivanu bakteriju *Bacillus subtilis* nije potvrđen inhibicijski učinak (Brudzynski i sur., 2011).

1.4.4. Metilglioksal

Druga skupina komponenti meda s kemijskim karakterom kao što su metilglioksal, pčelinji defensin-1 i polifenoli ostvaraju antibakterijsko djelovanje kroz neperoksidnu aktivnost.

Visoka razina neperoksidne aktivnosti utvrđena je u medu manuke (*lat. Leptospermum scoparium*) podrijetlom s Novog Zelanda. Jedno od glavnih obilježja te vrste meda je jedinstveni manuka faktor (engl. *Unique Manuca Factor*, UMF), posebna jedinica kojom se izražava i procjenjuje moć antibakterijskog učinka meda manuke. Značajnost UMF-a prvensteno se očituje u marketinške svhe, a raspon UMF vrijednosti u manuka medu se kreće od 5 do 26 jedinica, obzirom na količinu metilglioksala. Njegovo inhibitorno djelovanje očituje se na rast i razvoj različitih sojeva gram pozitivnih i gram negativnih bakterija, primjerice *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* (Allen i sur., 1991; Mavric i sur., 2008; <https://www.umf.org.nz/grading-system-explained/>).

Od niza bioaktivnih komponenti meda manuke koje sudjeluju u neperoksidnoj antibakterijskoj aktivnosti, najznačajniji je metilglioksal. Vrijednosti metilglioksala pronađene u medu manuke se kreću u rasponu od 38 mg/kg do 1282 mg/kg, što ukazuje na bitnu razliku u odnosu na ostale vrste medova (do 24 mg/kg), fermentirane proizvode (3-11 mg/kg) te prženu kavu (23-47 mg/kg) (Mavric i sur, 2008; <https://www.umf.org.nz/grading-system-explained/>).

Koncentracija metilglioksala uvelike ovisi o prisustvu spoja dihidroksiacetona identificiranog i u različitim vrijednostima kvantificiranog u nektaru cvjetova biljke manuke. Adams i sur. (2009.) godine su pokazali kako metilglioksal izravno nastaje mehanizmom koji uključuje reakciju pri kojoj dolazi do neenzimske pretvorbe dihidroksiacetona. Ipak, razlog zašto

je reakcija uvjetovana visokim koncentracijama dihidroksiacetona u nektaru cvjetova još je nepoznanica.

Također, u istom istraživanju, u svježe prikupljenom medu manuke pronađena je visoka količina dihidroksiacetona i niska količina metilglioksala, a nakon čuvanja meda na 37 °C omjer između dihidroksiacetona i metilglioksala značajno se povećao u korist produkta (Adams i sur., 2009).

1.4.5. Defensin-1

Tijekom zadnjih par desetljeća identificiranim komponentama meda sa antibakterijskim svojstvom pridružen je i defensin-1. Njegovo prisustvo prvotno je dokazano u matičnoj mliječi pod nazivom rojalisin, a zatim s određenim vremenskim odmakom dokazan je i u medu upotrebom uzastopnih neutralizacija više antibakterijskih komponentni (Fujiwara i sur., 1990; Kwakman i sur., 2010). Razlog takvom pristupu jest složena kemijska građa, odnosno preklapanja u bakteriostatskom i baktericidnom učinku komponenti meda. Naime, neutralizacijom vodikovog peroksida i metilglioksala u analiziranom medu nije uočen izostanak antibakterijske aktivnosti već se njezina razina prvenstveno smanjuje. Posljedično, daljnjim neutraliziranjem je otkriven niz komponenti među kojima se našao i defensin-1 (Kwakman i sur., 2010).

Defensin-1 nastaje kao jedan od produkata u hemolimfi pčela, a primarna uloga mu je zaštita i očuvanje pčelinje zajednice od raznih nepovoljnih mikroorganizama (Klaudiny i sur., 2005). Prema kemijskoj građi svrstava se u kationske proteine, čiji lanac sadrži 51 aminokiselinu, visoki udio cisteina te tri unutarmolekulska disulfidna mosta što čini kompaktnu

globularnu strukturu. Među ostalim karakteristikama defensina-1 izdvaja se snažno antibakterijsko djelovanje na različite sojeve gram-pozitivnih bakterija poput *Bacillus subtilisa* i *Staphylococcus aureusa* (Fujiwara i sur. 1990; Kwakman i sur. 2010).

1.5. Interpretiranje antibakterijskog djelovanja meda

Ogroman doprinos istraživanjima na ovu temu ostvarili su Dold i sur. (1955.) godine koji su pod pojmom „inhibicijski broj“ kvantificirali antibakterijski potencijal meda. Inhibicijski broj označava najveći stupanj razrjeđenja u kojem je utvrđeno antibakterijsko djelovanje meda. Metoda uključuje dilucijski niz od pet stupnjeva razrjeđenja uzorka, a svaki se stupanj razrjeđenja povećava za 5%, odnosno rezultat je raspon od 25% do 5% koncentracije uzorka u otopini (Molan, 1992). Također, metoda se i danas nalazi u širokoj primjeni u području mikrobiologije uz male promjene. U najvećoj mjeri promjene se odnose na stupnjeve razrjeđenja ovisno o granicama detekcije antibakterijskog djelovanja za različite tvari (npr. eterična ulja, med, antibiotici)

Pojam koji se danas koristi za označavanje antibakterijskog djelovanja meda, a predstavlja zapravo sinonim „inhibicijskom broju“ jest minimalna inhibitorna koncentracija (MIK). U mnogim istraživanjima, za razliku od „inhibicijskog broja“, određivanje MIK-a je provedeno serijom dvostrukih razrjeđenja uzoraka meda. Uz MIK koji predstavlja bakteriostatski učinak, antibakterijsko djelovanje meda izražava se i baktericidnim učinkom, odnosno određivanjem minimalne baktericidne koncentracije (MBK) (Anthimidou i Mossialos, 2013; Burdzinsky i sur., 2011; Jantakee i Tragoolpua, 2015; Mama i sur., 2019).

1.6. *Escherichia coli* i ESKAPE patogeni mikroorganizmi

Escherichia coli je gram negativna fakultativno anaerobna bakterija štapićastog oblika iz porodice *Enterobacteriaceae*. Prirodno je prisutna u gastrointestinalnom sustavu ljudi i životinja gdje se u simbiotskom odnosu nalazi u sastavu normalne crijevne mikrobiote i svojim enzimima pomaže u metaboličkoj razgradnji određenih makronutrijenata. Uz domaćinski organizam, *E. coli* može preživjeti i u vanjskoj okolini (voda i tlo) u koju dospijeva preko fecesa. Osim navedenog, izvor infekcije može biti višestruk (kontaminirana hrane, razne nečiste površine) zbog toga što se infekcija uzorkavana *E. coli* prenosi fekalno-oralnim putem, a njezina prisutost u vanjskoj okolini karakteristika je loših higijenskih uvjeta i mogućeg fekalnog zagađenja. Danas je poznato više od 700 serotipova *E. coli* od kojih su neki izrazito patogeni poput enterotoksične *E. coli* (ETEC), enteroinvazivne *E. coli* (EIEC) i enterohemoragijske *E. coli* (EHEC) te mogu uzrokovati različite infekcije mokraćnog sustava, crijevnog sustava i raznih drugih organih sustava (Nataro i Kaper, 1998).

E. coli otpornost na antibiotike ostvaruje sa sojevima proširenog spektra β -laktamaze *E. coli* (ESBL - *engl.* extended-spectrum beta-lactamase) prvenstveno beta-laktamske antibiotike. Melzer i Petersen su proučavali razlike u stopi smrtnosti i dužini boravaka u bolnici kod pacijenata sa potvrđenom dijagnozom bakterijske infekcije uzorkovane sojevima *E. coli* koje produciraju ESBL i onim sojevima koji ne produciraju ESBL EC. Rezultati studije su pokazali kako potvrđene infekcije sa ESBL EC imaju veću stopu smrtnosti u odnosu na infekcije uzrokovane sojevima *E. coli* koji ne produciraju ESBL (Melzer i Petersen, 2007).

ESKAPE predstavlja akronim za skupinu vrlo patogenih mikroorganizama koja uključuje sojeve gram pozitivnih bakterija *Enterococcus faecium* i *Staphylococcus aureus* te sojeve gram negativnih bakterija kao što su *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas*

aeruginosa i *Enterobacter* spp. Najznačajnija karakteristika ESKAPE-a se očituje u sposobnosti “izbjegavanja” baktericidnog djelovanja antibiotika uzrokujući hospitalne infekcije. Mehanizmi rezistencije ESKAPE bakterija ostvaruju se enzimskim reakcijama, raznim promjenama u ciljevima djelovanja lijeka, promjenom propusnosti vanjske membrane bakterija te stvaranjem biofilma (Pendleton i sur., 2013).

Enterococcus faecium je gram pozitivna fakultativno anaerobna bakterija. Pripada skupini oportunističkih patogena, a čini normalnu mikrobiotu crijeva čovjeka i životinja. Njegova virulentnost se posebice očituje u rezistenciji na β -laktamske antibiotike ampicilin i vankomicin. *Staphylococcus aureus* je također gram pozitivna fakultativno anaerobna okruglasta bakterija koja u komezalnom odnosu sa čovjekom kolonizira kožu, usta i nazofaringealnu šupljinu. *Staphylococcus aureus* virulentnost iskazuje proizvodnjom različitih termostabilnih toksina i enterotoksina koji mogu izazvati infekcije i uzrokovati mnoge bolesti poput bakterijemije, endokarditisa, sepse i sindroma toksičnog šoka. Uz navedeno, *S. aureus* posebice stvara ogromne probleme u bolnički sustavima, a jedan od najznačajnijih uzročnik hospitalnih infekcija je meticilin-rezistentan *S. aureus* (MRSA). Njegova rezistentnost sadržana je u enzimu beta-laktamaza čiji mehanizam djelovanja uključuje hidrolizu β -laktamskog prstena što rezultira inaktivacijom skupine antibiotika na bazi penicilina. *Klebsiella pneumoniae* je gram negativna fakultativno anaerobna bakterija štapićastog oblika iz porodice *Enterobacteriaceae*. Njezina virulentnost se izražava posjedovanjem fimbrija i guste kapsule, a povećanu rezistentnost na peniciline, cefalosporine, a u nekim slučajevima i karbapeneme zahvaljuje enzimu β -laktamazi. *Acinetobacter baumannii* je oportunistički gram negativni patogen koji sadrži sposobnost dugog preživljavanja izvan domaćina. Uzročnik je bolničkih infekcija izazvanih unakrsnom kontaminacijom iz razloga što dugo preživljava na ljudskim rukama. *Acinetobacter baumannii* je

tvorac spojeva nove virulentnosti koja se očituje enzimima imipenem metalo- β -laktamaze i β -laktamaze serin oksacilinaza (OXA) te zbog toga stvara ogromne probleme u liječenju. *Pseudomonas aeruginosa* je gram negativna fakultativno anaerobna bakterija. Najčešći izvori infekcije uzorokovane *Pseudomonas aeruginosa* u bolnički sustavima su egzogeni (iz vanjske okoline). Svoju otpornost na antibiotike (u većini slučajeva na imipenem) ostvaruje zbog posjedovanja AmpC enzima i vanjske membrane koja povećava otpor prema prolasku antimikrobnih lijekova u samu bakteriju. *Enterobacter* spp. je gram negativna bakterija koja najčešće inficira urinarni i respiratorni sustav. Određeni sojevi posjeduju kapsulu. Široki spektar rezistencije na antibiotike većina sojeva *Enterobacteria* postiže zbog β -laktamaze i karbapenemaze (Santajit i Indrawattana, 2016;

2. Cilj istraživanja

Primarni cilj ovog istraživanja bio je procjena antibakterijskog djelovanja različitih vrsta meda određivanjem minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) i minimalne baktericidne koncentracije (MBK). Ispitivanje je provedeno na 6 sojeva gram pozitivnih bakterija (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*, ESBL *Escherichia coli*) i 3 soja gram negativnih bakterija (*Staphylococcus aureus*, meticilin-rezistentan *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Enterococcus faecium*) pomoću dvije dilucijske metode (makro- i mikro-dilucijska metoda). Bakteriostatski i baktericidni učinak ispitivan je na skupini od pet odabranih vrsta medova (medovi od lipe, kadulje, bagrema, kestena i medun) s različitih pčelinjaka Republike Hrvatske (Hrvatsko primorje s otocima Krk, Cres, Lošinj i Pag, Istra, Gorski kotar, Ogulinsko-plašćanske udoline, Lika, područje zagrebačkog prstena, Pokuplje, Banovina, Međimurje, Zapadna Slavonija, Baranja) prikupljenih u razdoblju od 2017. do 2019. godine, jednom uzorku manuka meda (iz komercijalnog izvora), tzv. „umjetnog“ meda te antibiotika.

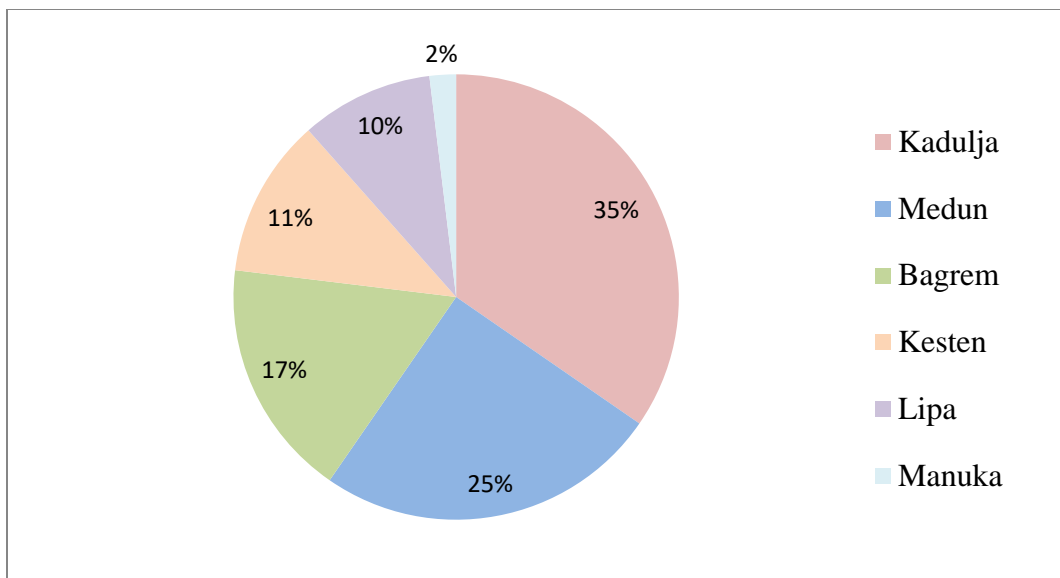
Dodatno, cilj istraživanja bio je ispitati podudarnosti između dviju dilucijskih metoda, odnosno metode makrodilucije u epruvetama i metode mikrodilucije u mikrotitarskim pločicama, primijenjenih u određivanju antibakterijskog djelovanja na prethodno navedene bakterijske sojeve.

3. Materijali i metode

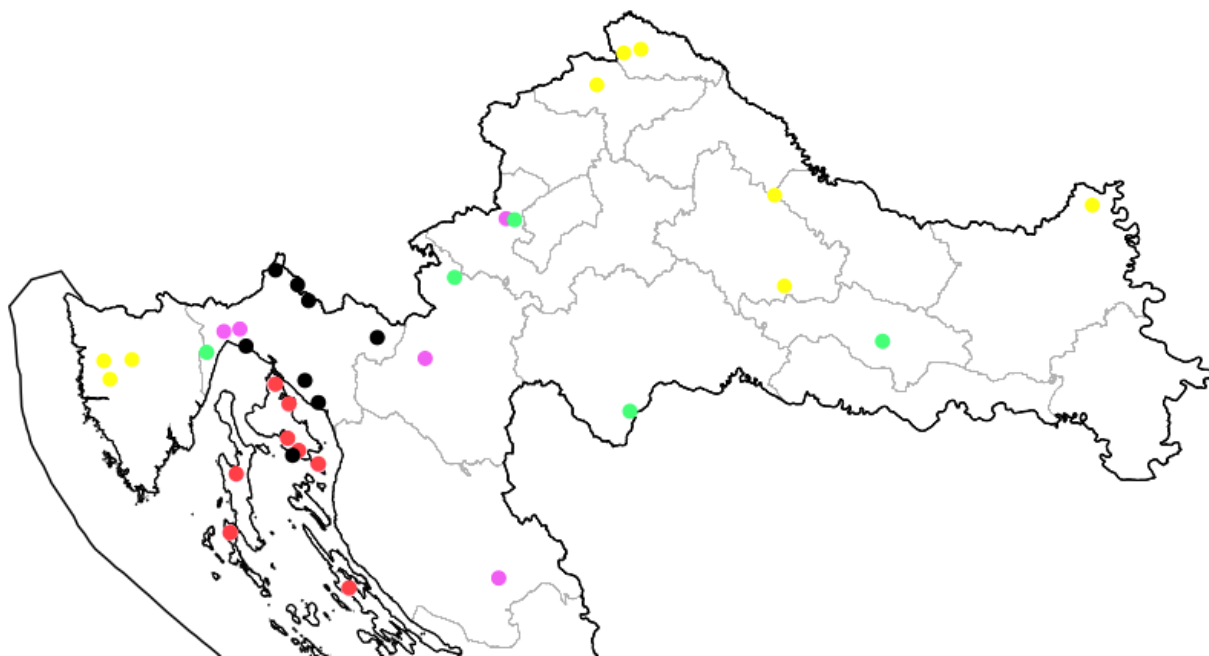
3.1. Uzorci meda

Antibakterijsko djelovanje uzoraka meda, tzv. „umjetnog“ meda (umjetne supstitucije) i uzorka antibiotika ispitivano je u mikrobiološkom laboratoriju Odjela zdravstvene ekologije pri Nastavnom Zavodu za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije. Od ukupno obrađena 53 uzorka, jedan uzorak se odnosi na tzv. „umjetni“ med (smjesa šećera i vode), dok su preostala 52 uzorka monoflorni medovi botanički raspodjeljeni u šest identificiranih vrsta (medovi od lipe, kadulje, bagrema, kestena, meduna te manuka med iz komercijalnog izvora) uzorkovani u vremenskom razdoblju od 2017. do 2019. godine. Zemljopisno podrijetlo pet vrsta meda (medun, med od kadulje, med od bagrema, med od kestena, med od lipe) s mirkoregijske razine obuhvaća lokacije pčelinjaka u Hrvatskom primorju s otocima Krk, Cres, Lošinj i Pag, Istri, Gorskom kotru, Ogulinsko-plašćanskoj udolini, Lici, području zagrebačkog prstena, Pokuplju, Banovini, Međimurju, Zapadnoj Slavoniji te Baranji. Na slici 2. je grafički prikazan udio zastupljenost šest ispitivanih vrsta meda s obzirom na ukupni broj uzoraka, od kojih se 18 uzoraka (35%) odnosi na med od kadulje, 13 uzoraka (25%) na medun, 9 uzoraka (17%) na med od bagrema, 6 uzoraka (11%) na med od kestena, 5 (10%) uzoraka na med od lipe te jedan uzorak (2%) na manuka med. Slika 3. predstavlja kartu Republike Hrvatske s označenim geografskim podrijetlom proizvodnje pet vrsta ispitivanih uzoraka meda¹. Lokaliteti proizvodnje pčelinjaka sa kojih potječu uzorci meda od kadulje na slici 2. su označeni različitim bojama.

¹ Slika 3. se nalazi na sljedećoj stranici.



Slika 2. Udio zastupljenosti ispitivanih vrsta meda s obzirom na ukupni broj uzoraka



Slika 3. Karta Republike Hrvatske s označenim lokalitetima ispitivanih uzoraka meda (med od lipe, med od kadulje, med od kestena, med od bagrema, medun)(autorska slika)

Med od kadulje je označen crvenim točkama, meda od lipe ružičastim točkama, meda od kestena zelenim točkama, meda od bagrema žutim točkama i medun crnim točkama.

Svim uzorcima uniflornih medova, deklariranim kao takvima od strane proizvođača, determinirano je i potvrđeno botaničko podrijetlo temeljem melisopalinološke i senzorske procjene svojstava.

3.1.1. Med od kadulje

Med od kadulje je najzastupljenija vrsta meda u istraživanju (18 uzoraka od ukupno 52 uzorka meda, 35%). U tablici 1. su prezentirani uzorci meda od kadulje (K1-K18) prikupljeni tijekom dvije godine, 2018. i 2019. obuhvaćajući arhipelag pet jadranskih otoka². S geografskog položaja gledano, više od polovine uzoraka, njih deset potječe s otoka Krka, četiri uzorka su s područja otoka Prvića u sjevernom Jadranu, dva uzorka s otoka Paga te po jedan uzorak s otoka Cresa i Lošinja.

² Tablica 1. se nalazi na sljedećoj stranici.

Tablica 1. *Popis uzoraka meda od kadulje razvrstanih prema godini proizvodnje i lokalitetu*

Uzorci	Godina	Vrsta	Lokacija
K1	2019.	Med od kadulje	Otok Prvić, sj. Jadran
K2	2019.	Med od kadulje	Otok Prvić, sj. Jadran
K3	2019.	Med od kadulje	Stara Baška, Otok Krk
K4	2019.	Med od kadulje	Stara Baška, Otok Krk
K5	2019.	Med od kadulje	Nerezine, Otok Lošinj
K6	2019.	Med od kadulje	Stara Baška, Otok Krk
K7	2019.	Med od kadulje	Stara Baška, Otok Krk
K8	2019.	Med od kadulje	Omišalj, Otok Krk
K9	2019.	Med od kadulje	Vrana, Otok Cres
K10	2019.	Med od kadulje	Dokulovo, Otok Krk
K11	2019.	Med od kadulje	Stara Baška, Otok Krk
K12	2018.	Med od kadulje	Rudine, Otok Krk
K13	2018.	Med od kadulje	Punat, Otok Krk
K14	2018.	Med od kadulje	Sv. Juraj, Otok Prvić, sj. Jadran
K15	2018.	Med od kadulje	Šimuni, Otok Pag
K16	2018.	Med od kadulje	Dokulovo, Otok Krk
K17	2018.	Med od kadulje	Šimuni, Otok Pag
K18	2018.	Med od kadulje	Sv. Juraj, Otok Prvić, sj. Jadran

3.1.2. Med od lipe

U tablici 2. od pet ispitivanih uzoraka meda od lipe (L1-L5), kroz 2018. godinu su prikupljena četiri uzorka, od kojih su dva proizvedena na lokalitetima u Hrvatskom primorju, po jedan uzorak je proizveden na lokalitetu Like i Ogulinsko-plašćanske udoline³. Prethodnoj godini, 2017. pripada samo jedan uzorak proizveden na području grada Samobora.

³ Tablica 2. se nalazi na sljedećoj stranici.

Tablica 2. *Popis uzoraka meda od lipe razvrstanih prema godini proizvodnje i lokalitetu*

Uzorci	Godina	Vrsta	Lokacija
L1	2017.	Med od lipe	Samobor
L2	2018.	Med od lipe	Podlopača, Udbina
L3	2018.	Med od lipe	Matulji, Rijeka
L4	2018.	Med od lipe	Ogulin
L5	2018.	Med od lipe	Kastav

3.1.3. Med od kestena

U tablici 3. navedeno je šest uzoraka meda od kestena (KE1-KE6) koji su proizvedeni u razdoblju od tri godine (od 2017. do 2019.). Pet od šest uzoraka meda od kestena podrijetlom je s prostora kontinentalne Hrvatske. Iz 2017. godine dva uzorka potječu s područja Banovine te po jedan uzorak s područja Pokuplja i Samobora, a u 2019. godini samo je jedan uzorak podrijetlom iz Požeške kotline. Jadranskoj regiji, preciznije Kvarnerskom zaljevu (obronci Učke) geografski pripada jedan uzorak iz 2018. godine.

Tablica 3. *Popis uzoraka meda od kestena razvrstanih prema godini proizvodnje i lokalitetu*

Uzorci	Godina	Vrsta	Lokacija
KE1	2017.	Med od kestena	Ozalj
KE2	2018.	Med od kestena	Učka, Rijeka
KE3	2017.	Med od kestena	Šakanlije, Dvor
KE4	2019.	Med od kestena	Požega
KE5	2017.	Med od kestena	Samobor
KE6	2017.	Med od kestena	Kosna, Dvor

3.1.4. Med od bagrema

Devet uzoraka meda od bagrema (B1-B9), prezentirano tablicom 4. proizvedeni su tijekom razdoblja od dvije godine na pet lokaliteta. Šest uzoraka je prikupljeno u 2017. godini, od čega polovina na istarskim pčelinjacima. Tri preostala uzorka proizvedena su na pčelinjacima oko grada Daruvara, u Međimurju (Slakovec) i Baranji. Uzorci meda od bagrema iz 2018. godine, proizvedeni su na lokalitetima - Bilogore, Međimurja (Macinec) te okolici grada Varaždina.

Tablica 4. *Popis uzoraka meda od bagrema razvrstanih prema godinama i lokalitetima proizvodnje*

Uzorci	Godina	Vrsta	Lokacija
B1	2017.	Med od bagrema	Višnjanj, Istra
B2	2018.	Med od bagrema	Macinec, Međimurje
B3	2017.	Med od bagrema	Golubinjak, Daruvar
B4	2017.	Med od bagrema	Podolje, Baranja
B5	2017.	Med od bagrema	Baderna, Istra
B6	2017.	Med od bagrema	Slakovec, Međimurje
B7	2018.	Med od bagrema	Bilogora
B8	2017.	Med od bagrema	Škropeti, Istra
B9	2018.	Med od bagrema	Selnik Maruševački, Varaždin

3.1.5. Medun

Kategorija medova meduna sa ukupnim brojem od 13 uzoraka (M1-M13) predstavlja drugu najzastupljeniju vrstu meda u ovom istraživanju. Za razliku od ostalih ispitivanih vrsta medova, svi uzorci meduna potječu iz iste godine, a lokacijski su ograničeni na jednu županiju.

Tablica 5. prikazuje uzorke meduna podrijetlom iz 2019. godine i Primorsko-goranske županije s

unutrašnjom distribucijom na Hrvatsko primorje i Gorski kotar. U Hrvatskom primorju je proizvedeno sedam uzoraka koji najvećim dijelom, čak njih četiri, pripadaju širem području Vinodola i Bribira, dva uzorka potječu sa šireg riječkog područja, dok je jedan uzorak podrijetlom s otoka Krka. S druge strane, šest uzoraka goranskog meduna je iz kontinentalnog dijela Primorsko-goranske županije, sa lokacija oko Vrbovskog, Delnica i Čabra..

Tablica 5. *Popis uzoraka meduna razvrstanih prema godini proizvodnje i lokalitetu*

Uzorci	Godina	Vrsta	Lokacija
M1	2019.	Medun	Novi Vinodolski
M2	2019.	Medun	Vrbovsko
M3	2019.	Medun	Vrbovsko
M4	2019.	Medun	Grižane, Vinodol
M5	2019.	Medun	Hrvatsko, Delnice
M6	2019.	Medun	Rijeka
M7	2019.	Medun	Plešće, Čabar
M8	2019.	Medun	Novi Vinodolski
M9	2019.	Medun	Novi Vinodolski
M10	2019.	Medun	Prezid, Čabar
M11	2019.	Medun	Prezid, Čabar
M12	2019.	Medun	Rijeka
M13	2019.	Medun	Punat, Otok Krk

3.1.6. Manuka med

Komercijalni uzorak meda manuke proizvela je tvrtka Haines Apiaries Ltd. iz grada Kaitaia sa sjevera Novog Zelanda, a uvoznik i distributer za Republiku Hrvatsku je tvrtka Kavocommerce d.o.o iz Lovrana. Ispitivani uzorak, punjen je 19.11.2018 godine u neprozirnu ambalažu neto količine 250 grama, a njegov deklarirani sastav u potpunosti je pripisan manuka medu s pripadnom vrijednosti UMF 5+.

3.1.7. Tzv. „umjetni“ med

Postupak pripreme smjese vode i šećera, to jest tzv. „umjetnog“ meda, uključuje dva monosaharida (glukoza i fruktoza) te dva disaharida (saharozu i maltozu) u prosječnim omjerima karakterističnim za najčešće medove i otopljenim u 17 ml destilirane vode. Približno polovinu smjese čini glukoza u količini od 40,5 g i fruktoza u količini od 33,5 g. Cjelina od četiri šećerna sastojka zaokružena je s maltozom u količini od 7,5 g te saharozom u količini od 1,5 g.

3.2. Priprema stock otopine uzoraka meda i tzv. „umjetnog“ meda

Uzorci meda (medun, med od bagrema, med od kadulje, med od kestena, med od lipe) su podrijetlom od hrvatskih proizvođača obiteljskih poljoprivrednih gospodarstava (OPG). Podrijetlo manuka meda, „umjetnog“ meda opisano je u poglavlju 3.1.6., a način pripreme tzv. „umjetnog“ meda u poglavlju 3.1.7.

Za pripremu stock otopine uzoraka meda i tzv. „umjetnog“ meda određena je masa od $14 \pm 0,1$ grama uzoraka (6 uniflornih vrsta meda + tzv. „umjetni“ med) koju je potrebno otopiti u 10 mililitara destilirane vode s ciljem postizanja 50 %-tne koncentrirane otopine. Potrebna količina uzoraka odvagana je na tehničkoj vagi u plastične epruvete koje sadrže čep s navojem, a zatim je u epruvetu dodano 10 ml destilirane vode temperirane na 37°C kako bi se određene vrste meda mogle lakše otopiti. Pripremljena otopina meda (50% v/v) tijekom ispitivanja je čuvana u hladnjaku na temperaturi od 2 do 8°C zbog usporavanja povećanja aktiviteta vode u samom uzorku meda te posljedičnog sprječavanja dovođenja do stanja vrenja.

3.3. Priprema stock otopine uzorka antibiotika

Za pripremu stock otopine uzorka antibiotika 1 ml 1%-tnog antibiotika (100 U/ml penicilin, 100 ug/ml streptomycin) razrijeđen je s 99 ml destilirane vode cilju postizanja razrjeđenja 1:100, osim za bakterije *Acinetobacter baumannii* i ESBL *Escherichia coli* koje su na te koncentracije antibiotika pokazale rezistenciju. Zbog toga se, u ispitivanju antibakterijskog djelovanja antibiotika na *Acinetobacter baumannii* i ESBL *Escherichia coli* pripremlila stock otopina koja sadrži 1 ml 1%-tnog antibiotika otopljenog u 9 ml destilirane vode.

3.4. Bakterijski sojevi

Ispitivanje antibakterijskog učinka uzoraka meda, tzv. "umjetnog" meda i antibiotika provedeno je na sljedećim sojevima gram negativnih: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, okolišnom izolatu *Enterobacter cloacae* i kliničkom izolatu ESBL *Escherichia coli*, gram pozitivnih bakterija *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, kliničkom izolatu meticilin-rezistentnog *Staphylococcus aureus* (MRSA) i izolatu iz uzorka međulaboratorijske usporedbe *Enterococcus faecium*. Izvor okolišnih izolata korištenih u ovom istraživanju pripada kolekciji Zdravstveno-ekološkog odjela dok klinički izolati pripadaju kolekciji Mikrobiološkog odjela Nastavnog Zavoda za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije.

3.5. Priprema inokuluma

Posljednja faza pripreme materijala potrebnih za izvođenje eksperimenta predstavlja pripremu bakterijske suspenzije za inokulaciju što uključuje uzgajanje kultura izabranih sojeva,

određivanje Faktora \overline{f} , priprema bakterijske suspenzije s OD ~ 1 , postizanje željene koncentracije bakterija u samom inokulumu te potvrdu postignute koncentracije bakterija u inokulumu.

3.5.1. Određivanje faktora \overline{f}

Faktor \overline{f} predstavlja odnos između broja kolonija u 1 ml bakterijske suspenzije (N) i pri odgovarajućoj vrijednosti optičke gustoće (OD- *engl.* optical density). Nakon određivanja faktora za pojedinu bakteriju (temeljem triplikata), isti se može koristiti u daljnjim ispitivanjima ukoliko se ne mijenjaju uvjeti. Optimalno je pripremiti bakterijsku suspenziju s OD ~ 1 , obzirom da se iznad 1 gubi linearnost. Ukoliko je OD vrijednost premala, smanjuje se preciznost mjerenja instrumenta.

3.5.1.1. Određivanje optičke gustoće (OD)

Postupak pripreme inokuluma (radna suspenzija) započinje nasađivanjem bakterijskih kultura ispitivanih sojeva na neselektivnom hranjivom agaru koji se zatim stavlja na inkubaciju preko noći. Nakon inkubacije⁴, sterilnom ezom se prenese dovoljna količina bakterijskih kolonija u staklenu epruvetu koja sadrži 9 ml fiziološke otopine kako bi se postigla optimalna vrijednost OD₆₀₀~1. Optička gustoća (OD) bakterijske suspenzije mjerena je UV-Vis spektrofotometrom Shimadzu DR 3900 s dvije zrake (*engl.* dual beam) pri valnoj duljini (λ) od 600 nanometara (nm).

⁴ Ovaj dio postupka je proveden u triplikatu zbog preciznijeg izračunavanja faktora \overline{f} .

Svako odstupanje od $OD_{600} \sim 1$ korigirano je sukcesivnim dodavanjem bakterijskih kultura ukoliko su očitane vrijednosti $OD_{600} < 1$ ili razrjeđivanjem suspenzije s fiziološkom otopinom ako su vrijednosti $OD_{600} > 1$, s ciljem izbjegavanja lažno pozitivnih ili lažno negativnih rezultata antibakterijskog učinka. Korištenjem preguste bakterijske suspenzije (s većim vrijednostima $OD_{600} > 1$) može utjecati na porast minimalne inhibitorne koncentracije (MIK). Odnosno ispitivana tvar bi antibakterijski učinak ostvarivala pri višim koncentracijama, dakle rezultat bi bio manji antibakterijski potencijal. S druge strane, bakterijska suspenzija s nižim vrijednostima $OD_{600} < 1$ može dovesti do smanjenja MIK-a, a posljedično i do porasta vrijednosti antibakterijskog potencijala određene tvari (Wiegand, 2008).

Nakon postignute vrijednosti $OD_{600} \sim 1$ bitno je bakterijsku suspenziju iskoristiti unutar 30 minuta jer u protivnom postoji mogućnost kvantitativne promijene unutar suspenzije, odnosno dolazi do povećanja broja bakterija.

Cilj je u finalnoj bakterijskoj suspenziji koja će se aplicirati u epruvete/mikrotitarske pločice koncentracija ispitivane bakterije bude 5×10^5 cfu/ml.

3.5.1.2. Određivanje broja kolonija (N) u početnoj bakterijskoj suspenziji

Sljedeći korak u pripremi inokuluma uključuje izradu dilucijskog niza s deseterostrukim razrjeđenjem (1:10) postojeće bakterijske suspenzije vrijednosti $OD_{600} \sim 1$. Raspon dilucijskog niza se kreće od 10^{-1} do 10^{-8} jer broj kolonija za većinu bakterijskih vrsta u suspenziji s pripadajućom vrijednosti $OD_{600} \sim 1$ iznosi od 10^8 do 10^9 . Zatim se na ploče s Mueller-Hinton agarom (MHA) nasadi 100 μ l bakterijske suspenzije iz epruveta s razrjeđenjima od 10^{-4} do 10^{-7} (počevši od najvećeg razrjeđenja 10^{-7}) koje se inkubiraju na 37°C preko noći.

Nakon inkubacije, očitava se broj kolonija izraslih na hranjivom agaru, uzimajući u obzir samo ploče s brojem kolonija u rasponu od 100 do 500 cfu. Bakterijska suspenzija s višim brojevima kolonija (>500 cfu) ne predstavlja točnu koncentraciju originalne suspenzije zbog moguća dva razloga: 1) premalog prostora koji bakterije imaju na raspolaganju za rast (prerast kolonija) ili 2) zbog ograničene količina nutrijenata. Navedeno može rezultirati manjim brojem kolonija poraslih na agaru u odnosu na realni broj u originalnoj suspenziji. S druge strane, uzimanje u obzir ploče s manjim brojem poraslih kolonija u odnosu na optimalni raspon (<100 cfu) može dovesti do statističke i metodološke pogreške koja se javlja pri pripremi razrjeđenja za radnu suspenziju. Također, argument pri odabiru ploča s navedenim selekcijskim uvjetom jest taj da s ploča koje sadrže broj kolonija u optimalnom rasponu (100-500 cfu) može najpreciznije odrediti korelacijski odnos između vrijednosti OD₆₀₀ i broja kolonija u suspenziji (N), koji je ključan za izračunavanje faktora (\bar{f}).

Nadalje, za svaku MHA ploču koja sadrži optimalan broj kolonija izračunat je broj kolonija (N) prema sljedećoj jednadžbi:

$$N = \frac{C \times 10}{10^{-D}}$$

gdje je:

- N = broj kolonija u suspenziji (cfu ml⁻¹)
- C = broj kolonija na MHA ploči koje sadrže optimalan raspon (100-500 cfu)
- D = broj razrjeđenja (1:10) koji odgovara MHA ploči s optimalnim rasponom

Poslije završenog izračunavanja broja kolonija (N) u sve tri replike, uzeta je njihova prosječna vrijednost i korelirana s očitanim vrijednostima $OD_{600} \sim 1$, nakon čega je izračunat faktor (f) sljedećom jednačinom (Wiegand, 2008):

$$f = \frac{N}{OD_{600}}$$

gdje je:

- N = broj kolonija u suspenziji (cfu ml^{-1})
- OD_{600} = optička gustoća bakterijske suspenzije mjerena pri 600nm

Jednom određen faktor (\overline{f}) višestruko je iskoristiv u daljnjim eksperimentima (pri istim uvjetima) u svrhu efikasnog izračunavanja broja kolonija u bakterijskoj suspenziji prema jednačini:

$$(I) \quad N = OD_{600} \times \text{faktora } \overline{f}$$

gdje je:

- N = broj kolonija (cfu ml^{-1})
- OD_{600} = optička gustoća bakt. suspenzije mjerena pri 600nm

Glavni uvjet za iskoristivost faktora (\overline{f}) precizno određivanje broja kolonija u bakterijskoj suspenziji jest da se u daljnjim eksperimentima koristi isti bakterijski soj koji mora biti uzgojen u istim uvjetima kao i bakterijski soj korišten za određivanje faktora. Osim navedenog uvjeta, bitno je u daljnjim eksperimentima postići vrijednost OD_{600} što bliže 1, što aproksimativno znači da je broj kolonija (za većinu bakterija) u suspenziji od 10^8 do 10^9 .

3.5.1.3. Primjer izračunavanja faktora \overline{f}

U nastavku je prezentiran primjer koji uključuje postupke (I-VI) izračunavanja faktora \overline{f} za bakterijski soj *Escherichia coli* ATTC 25922.

- (I) Postizanje bakterijske suspenzije s vrijednosti $OD_{600} \sim 1$
- (II) Izrada dilucijskog niza (1:10), nasađivanje 100 μ l suspenzije na MHA ploču iz epruveta s razrjeđenjima od 10^{-4} do 10^{-7} ; inkubacija na 37°C preko noći.
- (III) Brojanje kolonija (N) na MHA pločama koje sadrže od 100-500 cfu
- (IV) Nakon izračuna broja kolonija *Escherichia coli* ATTC 25922 u sve tri replike, uzeta je njihova prosječna vrijednost i korelirana s očitanim vrijednostima $OD_{600} \sim 1$.

1. replika: $N_{E.coli\ 1} = 404 \longrightarrow OD_{E.coli\ 1} = 0,9497$

2. replika: $N_{E.coli\ 2} = 300 \longrightarrow OD_{E.coli\ 2} = 0,9262$

3. replika: $N_{E.coli\ 3} = 304 \longrightarrow OD_{E.coli\ 3} = 0,9497$

- (V) Faktor \overline{f} izračunat je za svaku za svaku repliku prema jednadžbi:

$$f = \frac{N_{E.coli}}{OD_{600}}$$

1. replika: $f_{E.coli\ 1} = \frac{4,04 \times 10^9}{0,9497} = 4,3 \times 10^9$

2. replika: $f_{E.coli\ 2} = \frac{3 \times 10^9}{0,9497} = 3,2 \times 10^9$

3. replika: $f_{E.coli\ 3} = \frac{3,04 \times 10^9}{0,9497} = 3,1 \times 10^9$

(VI) Rezultat faktora \overline{f} za bakteriju *Escherichia coli* ATTC 25922 je aritmetička vrijednost prema jednadžbi:

$$\overline{f} = \frac{f_1 + f_2 + f_3}{3}$$

$$\overline{f} = \frac{4,3 \times 10^9 + 3,2 \times 10^9 + 3,1 \times 10^9}{3} = 3,36 \times 10^9$$

3.5.2. Razrjeđivanje bakterijske suspenzije vrijednosti OD_{600~1}

U posljednjem koraku u pripremi inokuluma, početnu bakterijsku suspenziju vrijednosti OD_{600~1} je potrebno pravilno razrijediti s obzirom da je cilj u MIK testu primijeniti koncentraciju bakterija od 100 000 do 1 000 000 cfu/ml (optimalno 500 000 cfu/ml). Početna bakterijska suspenzija razrijeđena je prema jednadžbi:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

gdje je:

- C_1 = eksperimentalno dobiven broj kolonija (N) povezan s OD_{600~1} (cfu/ml)
- V_1 = volumen bakterijske suspenzije OD_{600~1} koji ćemo razrijediti s MHB u cilju dobivanja potrebnog volumena suspenzije željene koncentracije od 500 000 cfu/ml
- C_2 = ciljna koncentracija (500 000 cfu/ml)
- V_2 = ciljni volumen suspenzije potreban za provedbu eksperimenta (500 ml)

U ispitivanju, radna suspenzija za *Escherichiu coli* ATTC 25922 je pripremljena na način da je menzutom odmjerenom 500 ml Mueller-Hinton bujona (MHB) te preliveno u staklenu bocu s

navojnim čepom u koju je zatim automatskom pipetom dodano 74 µl početne bakterijske suspenzije vrijednosti OD₆₀₀~1. Isti postupak razrjeđenja s pripadajućim početnim bakterijskim suspenzijama je napravljen za *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 za koju je potrebno 465 µl početne bakterijske suspenzije dodati u 500 ml MHB-a, za *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 102 µl suspenzije u 500 ml MHB-a, za *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 263 µl suspenzije u 500 ml MHB-a, za okolišni izolat *Enterobacter cloacae* 109 µl suspenzije u 500 ml MHB-a, za klinički izolat ESBL *Escherichia coli* 83 µl suspenzije u 500 ml MHB-a, za *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 367 µl suspenzije u 500 ml MHB-a, za MRSA-u 178 µl suspenzije u 500 ml MHB-a te izolat iz uzorka međulaboratorijske usporedbe *Enterococcus faecium* 524 µl suspenzije u 500 ml MHB-a kako bi se postigla ciljna koncentracija bakterijske suspenzije od 500 000 cfu/ml.

3.5.2.1. Primjer izračunavanja bakterijske suspenzije OD₆₀₀~1

Na primjeru *Escherichia coli* ATCC 25922 opisan je način (I-II) izračunavanja razrjeđenja početne bakterijske suspenzije vrijednosti OD₆₀₀~1.

$$\begin{aligned}
 \text{(I)} \quad N &= \text{OD}_{600} \times \text{faktora } (\overline{f}) & \text{OD}_{600} &\approx 1 \\
 N &= 1 \times (3,36 \times 10^9) & \text{faktora } (\overline{f}) &= 3,36 \times 10^9 \\
 N &= C_1 = 3,36 \times 10^9 \approx 3,4 \times 10^9 \text{ cfu/ml}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{(II)} \quad C_1 \times V_1 &= C_2 \times V_2 & C_1 &= 3,4 \times 10^9 \text{ cfu/ml} \\
 3,4 \times 10^9 \text{ cfu/ml} \times V_1 &= 500\,000 \text{ cfu/ml} \times 500 \text{ ml} & V_1 &= ? \\
 V_1 &= \frac{500\,000 \text{ cfu ml}^{-1} \times 500 \text{ ml}}{3,4 \times 10^9 \text{ cfu ml}^{-1}} = 74 \text{ µl} & C_2 &= 500\,000 \text{ cfu/ml} \\
 & & V_2 &= 500 \text{ ml}
 \end{aligned}$$

3.5.3. Potvrda koncentracije radne suspenzije

Po završetku pripreme radne suspenzije slijedi postupak provjere uspješnosti postizanja željene koncentracije bakterija u inokulumu. Provjera započinje izradom dilucijskog niza s deseterostrukim razrjeđenjem (1:10) pripremljene radne suspenzije čiji raspon uključuje razrjeđenja od 10^{-1} do 10^{-3} . U drugom koraku 0,1 ml iz razrjeđenja 10^{-2} i 10^{-3} nasadi na MHA ploču koja se zatim inkubira preko noći na temperaturi od 37°C. Zadnji korak se odnosi na očitavanje broja kolonija i izračunavanje koncentracije bakterija u radnoj suspenziji na način da se u obzir uzima samo MHA ploča s brojem kolonija >100 cfu.

Vrijednosti dobivene u postupku potvrde bakterijskih koncentracija u radnoj suspenziji, odnosno inokulumu za *Escherichia coli* (ATCC 25922) 188 000 cfu/ml, za *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 3883) 446 000 cfu/ml, za *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) 208 000 cfu/ml, za *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606) 750 000 cfu/ml, za okolišni izolat *Enterobacter cloacae* 430 000 cfu/ml, za klinički izolat ESBL *Escherichia coli* 205 000 cfu/ml, za *Staphylococcus aureus* 300 000 cfu/ml, za metilicilin-rezistentnog *Staphylococcus aureus* 386 000 cfu/ml te za izolat iz uzorka međulaboratorijske usporedbe *Enterococcus faecium* 960 000 cfu/ml što odgovara referentnim vrijednostima optimalnog raspona (100 000 do 1 000 000 cfu/ml) koncentracije bakterija u radnoj suspenziji.

3.5.3.1. Primjer izračunavanja potvrde koncentracije bakterija u radnoj suspenziji

U nastavku je prikazan postupak (I-V) izračunavanja koncentracije bakterija u radnoj suspenziji na primjeru bakterijskog soja *Escherichia coli* ATCC 25922.

- (I) S MHA ploče na kojoj je nasadeno 0,1 ml iz razrjeđenja 10^{-2} očitana je broj kolonija od 188 cfu, dok broj kolonija na MHA ploči koja sadrži 0,1 ml iz razrjeđenja 10^{-3} iznosi 14 cfu.
- (II) U daljnji izračun u obzir se uzima samo MHA ploča koja sadrži broj kolonija >100 cfu, što je u ovom slučaju MHA ploča sa brojem kolonija od 188 cfu (razrjeđenje 10^{-2})
- (III) Broj bakterija u 1 ml suspenzije se izračunava prema jednadžbi:
- $$C = \text{broj kolonija (cfu)} \times \text{nasaden volumen na MHA ploču (ml)} \times \text{razrjeđenje}$$
- (IV) Uvrštavanjem eksperimentalnih vrijednosti u jednadžbu (III) dobivena je koncentracija bakterija u radnoj suspenziji.
- $$C = 188 \text{ cfu} \times (10 \times 0,1 \text{ ml}) \times 100 = 188\,000 \text{ cfu ml}^{-1}$$
- (V) Rezultat je koncentracija *Escherichia coli* ATTC 25922 u radnoj suspenziji iznosi $188\,000 \text{ cfu ml}^{-1}$.

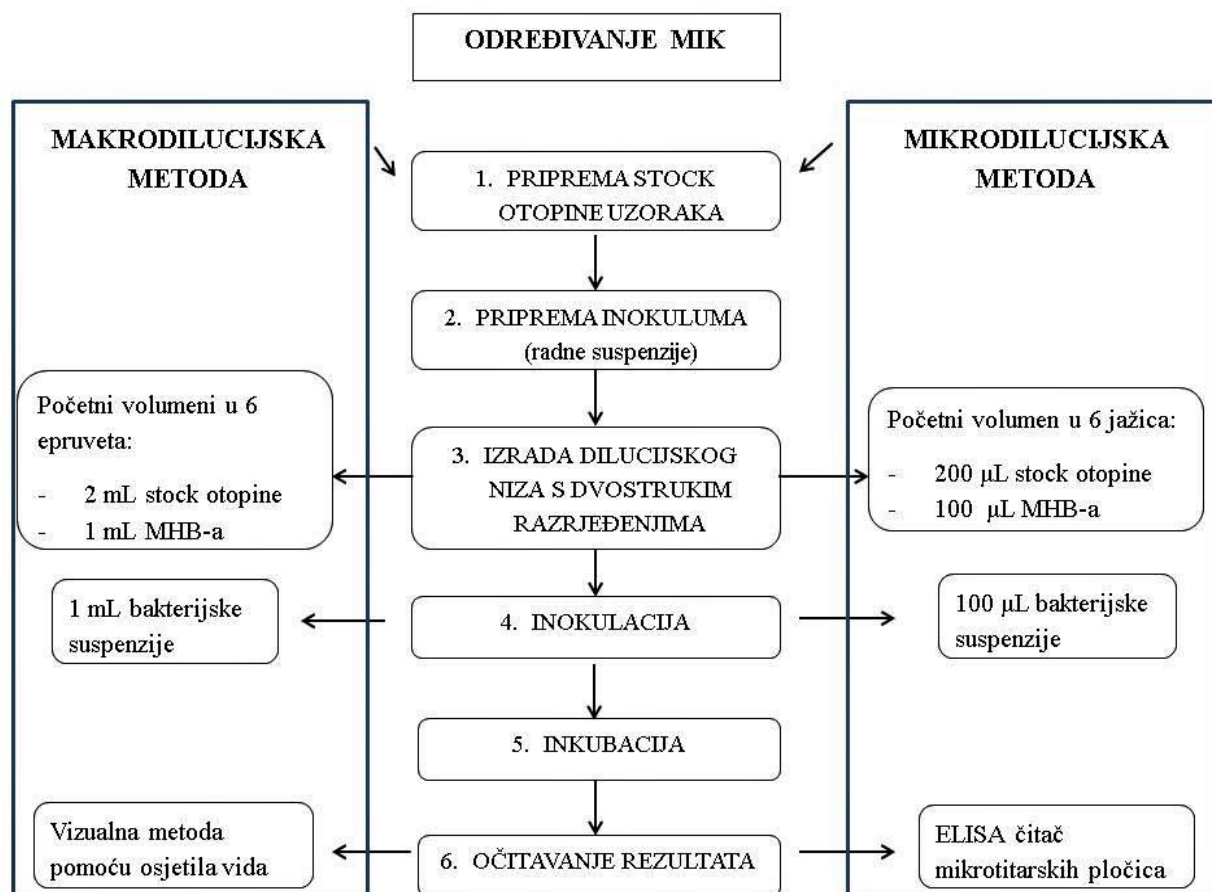
3.6. Metode određivanje antibakterijskog djelovanja meda

Antibakterijsko djelovanje uzoraka meda i tzv. "umjetnog meda" ispitano je pomoću dvije dilucijske metode, preciznije metodom makrodilucije u epruvetama i metodom mikrodilucije u mikrotitarskim pločicama u mikrobiološkom laboratoriju Zdravstveno-ekološkog odjela Nastavnog Zavoda za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije.

Eksperimentalna izvedba metoda se sastoji od dva povezana dijela obzirom da je ispitivan bakteriostatski i baktericidni učinak. Prvi dio obuhvaća šest koraka (priprema stock otopine uzorka, priprema inokuluma, izrada dilucijskog niza, inokulacija, inkubacija i očitavanje rezultata) u kojima se ispituje bakteriostatski učinak, odnosno minimalna inhibitorna koncentracija (MIK). Pojam MIK označava najnižu koncentraciju antimikrobne tvari pri kojoj je inhibiran rast ispitivanog bakterijskog soja u suspenziji. Nastavak ispitivanja predstavlja drugi dio koji obuhvaća tri koraka (nasađivanje na MHA ploče, inkubacija i očitavanje rezultata) kojima se ispituje minimalna baktericidna koncentracija (MBK), odnosno najniža koncentracija antimikrobne tvari potrebna da izazove smrt bakterijskih stanica u suspenziji u određenom vremenskom periodu.

Usporedbom makrodilucijske i mikrodilucijske metode (slika 4.)⁵ postaju vidljive mnoge sličnosti u izvedbi, ali također i dvije osnovne razlike. Prvenstveno u prvom dijelu, to jest u određivanju MIK-a. Prva razlika se odnosi na prefiks u imenu metode koji je povezan sa količinom korištenog volumena stock otopine uzoraka i inokuluma, a druga razlika na instrument koji se koristi prilikom očitavanja rezultata MIK-a.

⁵ Slika 4. se nalazi na sljedećoj stranici.



Slika 4. Usporedba makrodilucijske i mikrodilucijske metode u određivanju MIK-a (autorska slika)

3.6.1. Makrodilucijska metoda

3.6.1.1. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK)

Makrodilucijska metoda provodi se u epruvetama (<https://microbeonline.com/minimum-inhibitory-concentration-mic-broth-dilution-method-procedure-interpretation/>). Određivanje MIK-a makrodilucijskom metodom započinje pripremom stock otopine uzoraka (50% v/v) opisano u poglavlju 3.2. te pripremom i označavanjem staklenih epruveta u kojima je izveden test određivanja MIK-a. Na slici 5. su prikazane staklene test epruvete podijeljene u redove od kojih svaki predstavlja po jednu repliku uzorka s odgovarajućim nizom dvostrukih razrjeđenja u

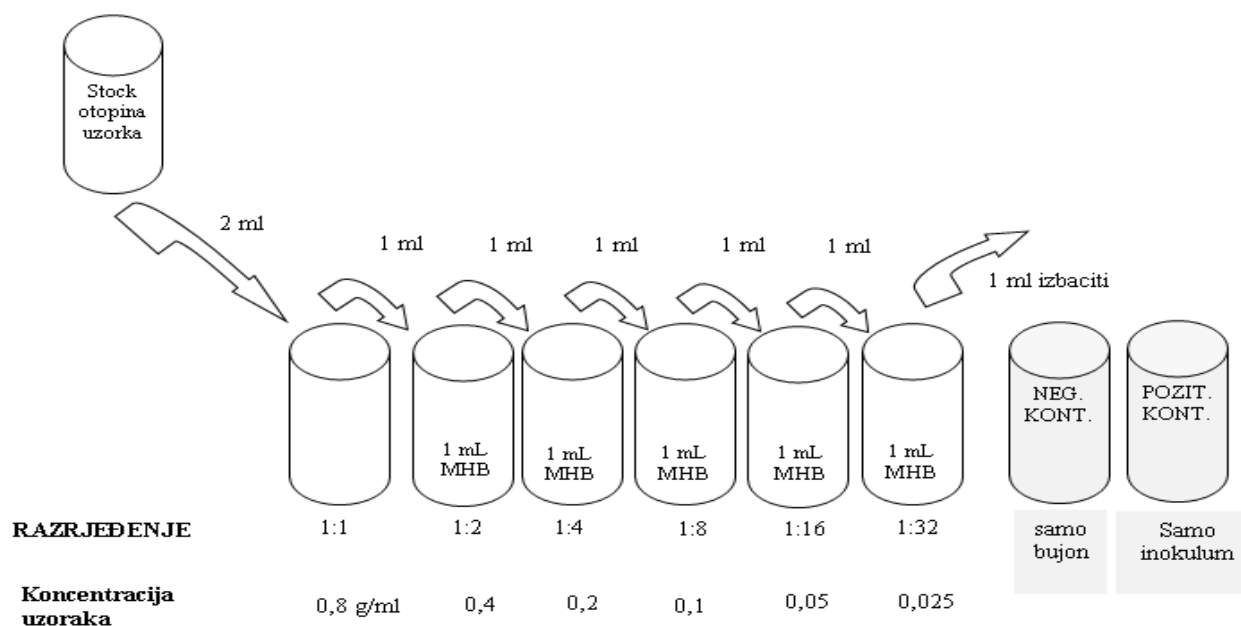
Mueller-Hinton bujonu (MHB) s ciljem postizanja koncentracija meda i tzv. „umjetnog“ meda od 0,8 g/ml, 0,4 g/ml, 0,2 g/ml, 0,1 g/ml, 0,5 g/ml i 0,025 g/ml.



Slika 5. Staklene epruvete u kojima je određivan MIK (autorska slika)

Gledajući s lijeva na desno na slici 5., u prvu od ukupno 6 epruveta u dilucijskom nizu dodano je samo 2 ml stock otopine uzorka što označava razrjeđenje matičnog uzorka od 50% (0,8 g/ml), dok je u svaku sljedeću epruvetu dodano po 1 ml MHB. Zatim je automatskom pipetom iz prve epruvete preneseno 1 ml stock otopine uzorka u drugu epruvetu koja već sadrži 1 ml MHB te nakon centrifugiranja na vortexu (Vortex-genie 2, Scientific Industries i Reax top vortex, Heidolph) postignuto je razrjeđenje matičnog uzorka koje iznosi 25 % (0,4 g/ml). Na identičan način postupak dvostrukih razrjeđenja je ponovljen do zadnje epruvete u seriji iz koje se 1 ml izdvaja u otpad kako bi postignuti volumeni u svim epruvetama bili jednaki. Preostala razrjeđenja (prema rastućem nizu) od treće do šeste epruvete u seriji iznose 12,5% (0,2 g/ml),

6,25% (0,1 g/ml), 3,13% (0,05 g/ml) i 1,56% (0,025 g/ml). Na kraju dilucijskog niza u jednoj epruveti je pozitivna kontrola koju čini 1 ml radne bakterijske suspenzije i 1 ml MHB, dok druga epruveta predstavlja negativnu kontrolu u kojoj se nalazi samo 2 ml MHB. Cjelokupna izrada dilucijskog niza prikazana je shemom na slici 6.

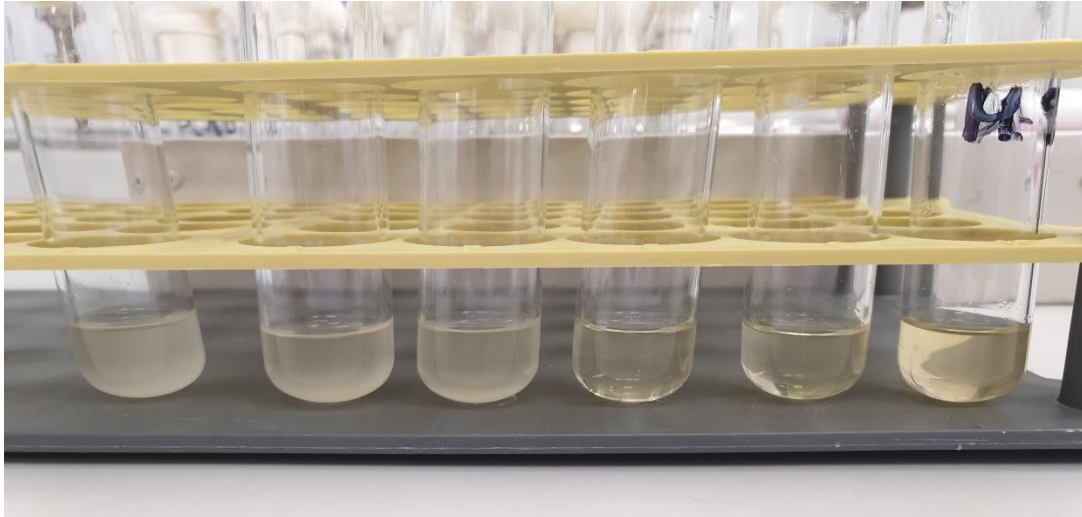


Slika 6. Shema izrade dilucijskog niza s dvostrukim razrjeđenjima u određivanju MIK-a makrodilucijskom metodom (autorska slika)

Po završetku izrade dilucijskog niza s dvostrukim razrjeđenjima, slijedi postupak inokulacije koji uključuje retrospektivno pripremljenu radnu bakterijsku suspenziju (inokulum) približne koncentracije 5×10^5 cfu/ml (opisana u poglavlju 3.4.) inokuliranu u svaku epruvetu po 1 ml (osim u negativnu kontrolu). Epruvete se zatim promućkaju na vortexu te inkubiraju na temperaturi od 37°C tijekom 16-20 sati.

Nakon inkubacije, slijedi očitavanje rezultata inhibicije rasta bakterija u suspenziji. Princip očitavanja rezultata MIK-a se temelji na vizualnoj procjeni pri kojem je najvećem

razrjeđenju uzorka (u usporedbi s negativnom kontrolom) porast ispitivanog bakterijskog soja spriječen. Na slici 7. prikazan je dilucijski niz sa serijom dvostrukih razrjeđenja uzorka meduna (M9) nakon inkubacije s ispitivanim bakterijskim sojem *Staphylococcus aureus* ATTC 25923.



Slika 7. Rezultati određivanja MIK-a makrodilucijskom metodom (autorska slika)

3.6.1.2. Određivanje minimalne baktericidne koncentracije (MBK)

U drugom dijelu makrodilucijske metode, MBK je ispitivan na način da se iz epruvete za koju je određen MIK, te iz prethodne dvije epruvete s manjim razrjeđenjima uzoraka 100 μ l sadržaja prenese na MHA ploču nakon čega slijedi inkubacija na 37°C tijekom 24 sata. Na slici 8. demonstrirana je shema određivanja MBK-a nakon završenog vizualnog određivanja MIK-a.



Slika 9. Rezultati određivanja MBK-a na uzorku meda od bagrema (B6) (autorska slika)

3.6.2. Mikrodilucijska metoda

3.6.2.1. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK)

Određivanje bakteriostatskog učinka uzoraka meda i „umjetnog“ meda mikrodilucijskom metodom provedeno je pomoću mikrotitarskih pločica s 96 jažica (Sarstedt AG & Co. KG, Njemačka), u kojima su jažice raspoređene u 12 redaka i 8 stupaca (A-H). Ispitivanje je provedeno prema Wiegand i sur. (2008) i Anand (2019). Za razliku od makrodilucijske metode u kojoj je izvedba sastavljena od jedne replike uzoraka, u mikrodilucijskoj metodi svaki uzorak je napravljen u tri replike.

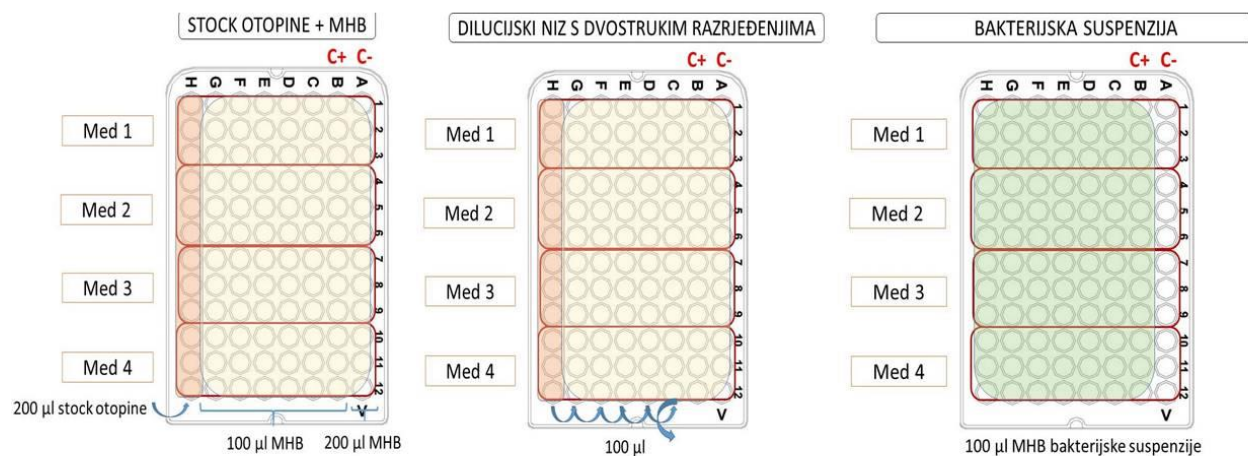
Šest od osam stupaca (H-C) predstavlja dilucijski niz s dvostrukim razrjeđenjima identičan kao i u makrodilucijskoj metodi. Međutim, u mikrodilucijskoj metodi korišteni su manji volumen za izradu dilucijskog niza pa je stoga u jažice stupca H nanoseno 200 μ l stock otopine uzorka (priprema otopine opisana u poglavlju 3.2.), a u ostale jažice koje pripadaju

rasponu stupaca od G do A je preneseno 100 µl MHB. Daljnji postupak izrade dilucijskog niza uključuje prenošenje 100 µl otopine iz prethodnog u sljedeći stupac počevši od stupca H, uz napomenu da se iz zadnjeg stupca (C) 100 µl otopine izdvaja u otpad kako bi volumen bio jednak u cijelom nizu. Također, važno je naglasiti da se prije svakog prijenosa sadržaj jažice mora resuspendirati uz pomoć automatske pipete, što predstavlja analogiju centrifugiranju epruvete kod makrodilucijske metode. Krajnji rezultat dilucijskog niza predstavlja vrijednost koncentracija od 0,8 g/ml do 0,025g/ml postignutih s razrjeđenjima matičnog uzorka od 50% do 1,56 % .

Sljedeći postupak je inokulacija u kojem je 100 µl radne bakterijske suspenzije približne koncentracije 5×10^5 cfu/ml (priprema inokuluma opisana u poglavlju 3.4.) dodano u jažice koje pripadaju stupcima od H do C. Posljednja dva stupca (B i A) označavaju pozitivnu i negativnu kontrolu, odnosno u stupac B je dodano 100 µl radne bakterijske suspenzije i 100 µl MHB, dok u stupac A je dodano samo 200 µl MHB.

Na slici 10. je predstavljena shema s tri mikrotitarske pločice koje označavaju slijed postupaka u određivanju MIK-a mikrodilucijskom metodom⁷. U prvoj mikrotitarskoj pločici s desne strane prikazani su volumeni stock otopine uzoraka (stupac H) i MHB-a naneseni u odgovarajuće stupce (G-A). Druga pločica uključuje izradu dilucijskog niza sa serijom dvostrukih razrjeđenja (stupci od H-C), a treća demonstrira raspon stupaca u koji je dodana radna bakterijska suspenzija (H-B)

⁷ Slika 10. se nalazi na sljedećoj stranici.



Slika 10. Shema s tri mikrotitarske pločice koje označavaju slijed postupaka u određivanju MIK-a mikrodilucijskom metodom (autorska slika)

U vremenskom razdoblju od završetka inokulacije do početka inkubacije, mikrotitarske pločice su najprije stavljene na Orbital shakers (IKA[®] Ks 130 Basic) frekvencije 320 pokreta/minuti kroz 5 minuta, a zatim je izmjerena optička gustoća (OD) uzorka pri valnoj duljini od 620 nm pomoću ELISA čitača mikrotitarski pločica (Sunrise, Tecan, godina proizvodnje: 2008.; Software: Magellan 7 V7.0, 2010 TECAN) što označava početak postupka određivanja MIK-a. Nakon početnog mjerenja⁸ OD_1 uzoraka, mikrotitarske pločice se stavljaju na inkubaciju tijekom 24 sata pri temperaturi 37°C. Nakon inkubacije, mikrotitarske pločice ponovno su podvrgnute mjerenju OD_1 pomoću ELISA čitača pri valnoj duljini od 620 nm, a razlika u vrijednostima između OD_1 u „nultom“ stanju i OD_1 nakon inkubacije određuje postotak

⁸ Mjerenje OD_1 uzoraka provedeno prije inkubacije označava „nulto“ stanje ($t=0$).

(%) inhibicije rasta bakterija u pojedinim otopinama uzoraka⁹. U ovom slučaju, rezultat MIK-a predstavlja jažica koja sadrži najmanju koncentraciju uzorka sa 100%-tnom inhibicijom.

Navedeni čitač mikrotitarskih pločica predstavlja zamjenu za vizualnu osobnu procjenu u određivanju MIK-a, odnosno drugu razliku između makrodilucijske i mikrodilucijske metode. Bakteriostatski učinak pojedinih uzoraka u mikrodilucijskoj metodi se temelji na sljedećoj jednadžbi:

$$\% \text{ inhibicije} = (1 - [(OD_1)/(OD_0)]) \times 100$$

gdje je:

- OD_1 = optička gustoća ispitivanih uzoraka mjerenih pri valnoj duljini od 620 nm
- OD_0 = optička gustoća kontrole¹⁰

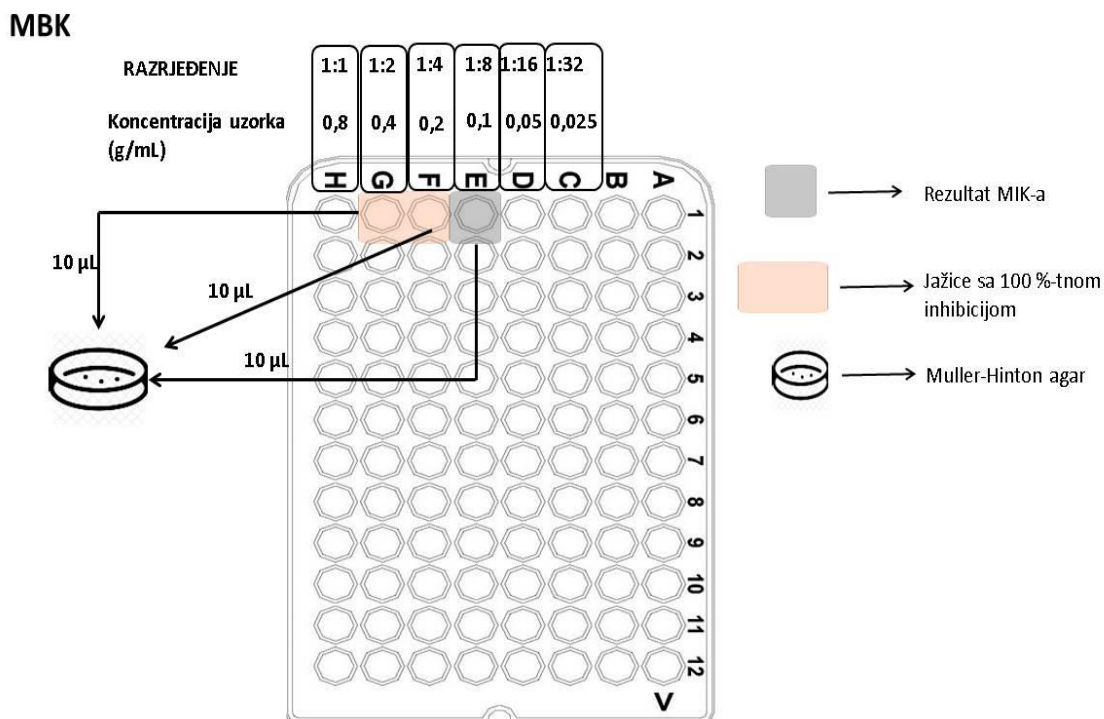
3.6.2.2. Određivanje minimalne baktericidne koncentracije (MBK)

4. MBK u mikrodilucijskoj metoditemelji određuje se na isti način kao i u makrodilucijskoj metodi što znači da se iz prve tri jažice koje nemaju detektiran porast bakterija, to jest imaju 100 %-tnu inhibiciju, volumen od 10 μ L prenese na MHA ploče, kako je prikazano na slici 11¹¹. MHA ploče se inkubiraju u periodu od 24 sata na temperaturi 37°C. nakon čega se rezultat MBK-a očitava kao najveće razrjeđenje pri kojem nije došlo do porasta kolonija ispitivane bakterije, odnosno vidljiv je baktericidni učinak.

⁹ Utjecaj boje uzoraka na rezultate postotka (%) inhibicije rasta bakterija korigiran je oduzimanjem vrijednosti OD prije inkubacije od vrijednosti OD nakon inkubacije

¹⁰ OD_0 je izmjerena oduzimanjem vrijednosti OD naciepljenog hranjivog bujona s bakterijama bez dodane otopine meda od vrijednosti OD hranjivog bujona bez bakterija

¹¹ Slika 11. se nalazi na sljedećoj stranici.

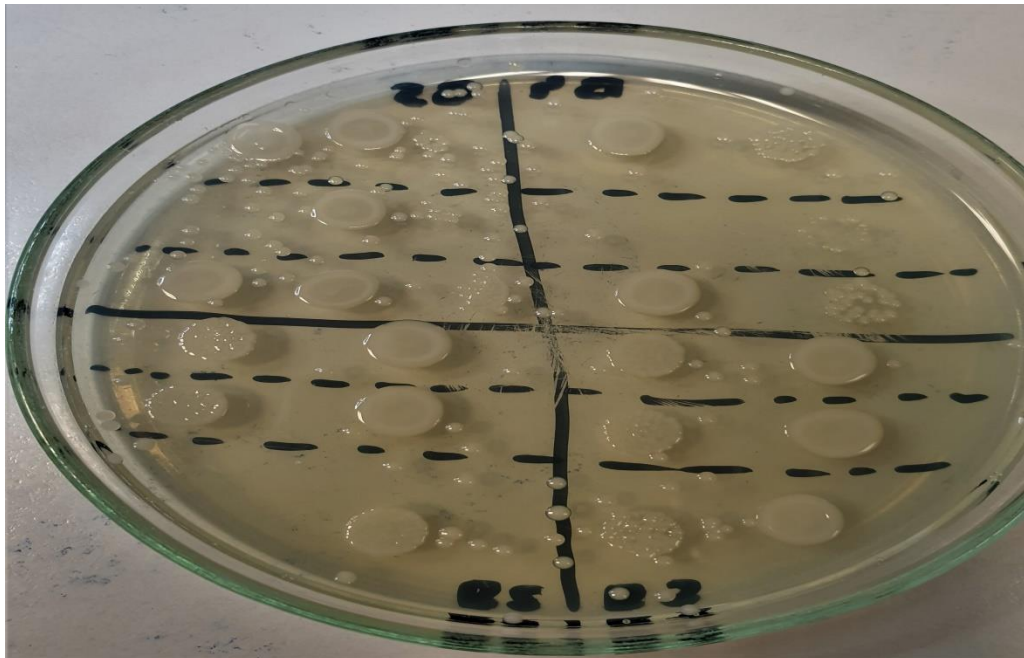


Slika 11. Shema određivanja MBK-a mikrodilucijskom metodom (autorska slika)

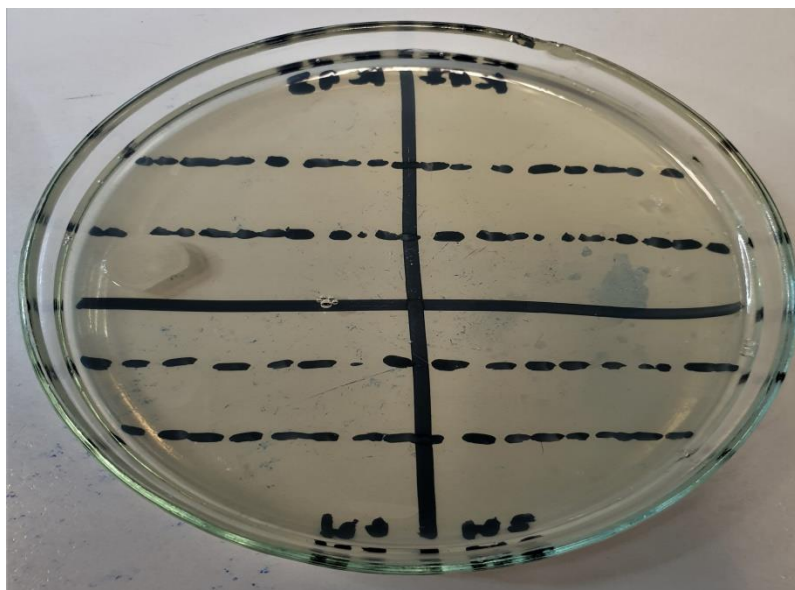
Na slikama 12¹². i 13¹³. prezentirani su rezultati MBK-a za uzorke meda od bagrema (B2, B3, B4, B5), meda od kadulje (K17, K18) i meduna (M1, M2) ispitivani mikrodilucijskom metodom nakon očitavanja MIK-a na mikrotitarskim pločicama pomoću ELISA čitača. Na navedenim slikama MBK se ispitivala na bakterijski soj *Escherichia coli* ATTC 25922, a dobiveni rezultati na slici 9. ukazuju na to da niti jedan uzorak meda nije ostvario baktericidno djelovanje, dok na slici 10. gotovo kod svih uzoraka meda se poklapa bakteriostatski učinak s baktericidnim učinkom, osim u zadnjoj replici uzorka meda od kadulje (K18).

¹² Slika 12. se nalazi na sljedećoj stranici.

¹³ Slika 13. se nalazi na sljedećoj stranici.



Slika 12. Rezultati određivanja MBK-a za uzorke meda od bagrema (B2, B3, B4, B5) (autorska slika)



Slika 13. Rezultati određivanja MBK-a za uzorke meda od kadulje (K17, K18) i uzorke meduna (M1, M2) (autorska slika)

5. Rezultati

5.1. Klasifikacija antibakterijskih učinaka meda pomoću neuronskih mreža

5.1.1. Neuronska mreža (Neural-gas)

Neuronska mreža (Neural-gas) je metoda izbora obrade rezultata MIK-a i MBK-a dobivenih mikrodilucijskom metodom zbog izrazito velikog skupa podataka koje je vrlo teško provjeriti vizualnom metodom te je takav skup podataka potrebno reducirati. Jedna od redukcijskih metoda je Neural-gas koja kao rezultat generira određeni broj vektora (BMU¹⁴) koji se poput plina slobodno šire i raspoređuju prostorom podataka pritom minimizirajući ukupnu pogrešku. Glavna funkcija Neural-gas metode je smanjenje dimenzije prostora podataka, pri čemu se prostor podataka opisuje s malim brojem odabranih BMU vektora. Prednost Neural-gas metode nad ostalim redukcijskim metodama poput Samo-organizirajuće mape (SOM - *engl.* Self-Organizing Map) i običnih klasterizacija se očituje u mogućnosti modeliranja ekstremnijih vrijednosti i analizi odnosa između klastera, što s obzirom na ispitanu vrstu i broj uzoraka u ovom istraživanju ima vrlo bitnu ulogu. Također, važno je istaknuti kako su odabrani BMU vektori međusobno statistički značajno različiti unatoč tome što sama metoda Neural-gas tu tvrdnju ne provjerava. Pretpostavlja se ako je metoda neuronske mreže generirala BMU vektore, da su vektori po karakteristikama statistički značajno različiti te da se mogu grupirati u različite skupine.

¹⁴ BMU - *engl.* Best Matching Units

5.1.2. Algoritam neuronske mreže (Neural-gas)

Stvaranje algoritma neuronske mreže zahtjeva određivanje tri parametra. Prvi i najvažniji parametar je broj BMU¹⁵ vektora koji su potrebni za redukciju prostora podataka, dok preostala dva parametra određuju doseg pojedinog BMU vektora u prostoru podataka. Drugim riječima, drugi i treći parametar u stvaranju algoritma neuronske mreže određuju koliko opsežno će pojedini BMU uključivati podatke te koliko će mu vremenski trajati pamćenje. Nakon određivanja parametara, svakom BMU vektoru će biti pridružen određen broj podataka koje on najbolje opisuje, stoga neki će BMU vektori opisivati jedan podatak, a neki dva ili više podataka. U nastavku je prikazano četiri koraka (I-IV) u stvaranju algoritma neuronske mreže:

- (I) Odabrani broj BMU vektora se inicijalizira slučajnim brojevima, odnosno ukupan broj BMU vektora je slučajan.
- (II) Zatim se uzima prvi vektor podataka¹⁶ koji grupira pojedine BMU vektor (od najbližeg prema najdaljem) ovisno o udaljenosti od vektora podataka.
- (III) Modifikacija BMU vektora na način da najbliži BMU vektor koji najbolje opisuje podatke se dodatno približi vektoru podataka, a preostali BMU vektori u manjoj mjeri prate proces modifikacije, odnosno približavanje vektoru podataka. Koliko će se preostali BMU vektori (izuzevši najbližeg BMU vektora) korigirati ovisi o zadanim parametrima na samom početku stvaranja algoritma
- (IV) Nakon toga svaki sljedeći vektor podataka prolazi korake 2. i 3., a proces se ponavlja dok se ne stvori algoritam neuronske mreže, u ovom istraživanju dok se ne stvori klasifikacija antibakterijskih svojstava meda.

¹⁵ BMU vektori se još nazivaju codebook vektorima, a u Machine Learning-u predstavljaju jedan neuron u neuronskoj mreži.

¹⁶ U ovom istraživanju vektor podataka predstavlja jednu repliku.

5.1.3. Algoritam neuronske mreže antibakterijskih svojstava uzoraka

U procesu stvaranja Neural-gas algoritma s ciljem klasifikacije antibakterijskih svojstava korištenih uzoraka obuhvaćeno je ukupno 162 vektor podataka. Svaki vektor podatak predstavlja po jednu repliku od 54 uzorka (52 uzorka meda + 1 uzorak „umjetnog“ meda + 1 uzorak antibiotika) analiziranu na devet različitih bakterija (*E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. faecium*, *E. cloacae*, ESBL EC, *A. baumannii* i MRSA). Dakle uzlazni podatak ne predstavlja antibakterijsko djelovanje jedne replike uzorka na jednu određenu bakteriju, već skup podataka (vektor) u združenom djelovanju (MIK + MBK) na sve ispitivane bakterije. Vektor je formiran od niza elemenata od kojih svaki opisuje djelovanje jedne replike uzorka na jednu bakteriju što u konačnici rezultira da se u ovom istraživanju svaki vektor sastoji od 18 elemenata.

U tablici 6. je prikazan primjer principa klasifikacije vektor podataka korištenih u kreiranju Neural-gas algoritma prema ukupnom (združenom) antibakterijskom djelovanju na ispitivane bakterije. Razlog zbog kojeg je su u analizi uključene replike uzoraka umjesto prosječnih vrijednosti tih replika jest mogućnost pojedinačne analize odnosa između samih replika te dodatno uočavanje anomalija (pogreška) na replikama¹⁷.

Također, vrijednosti replika uzoraka su vrlo slične i stoga je napravljena dodatna provjera njihove međusobne neovisnosti pomoću SSIntra algoritma. Rezultati provedenog testa pokazuju da su svi vektori međusobno neovisni, odnosno da su određene vrste uzoraka međusobno različite.

¹⁷ Tablica 6. se nalazi na sljedećoj stranici.

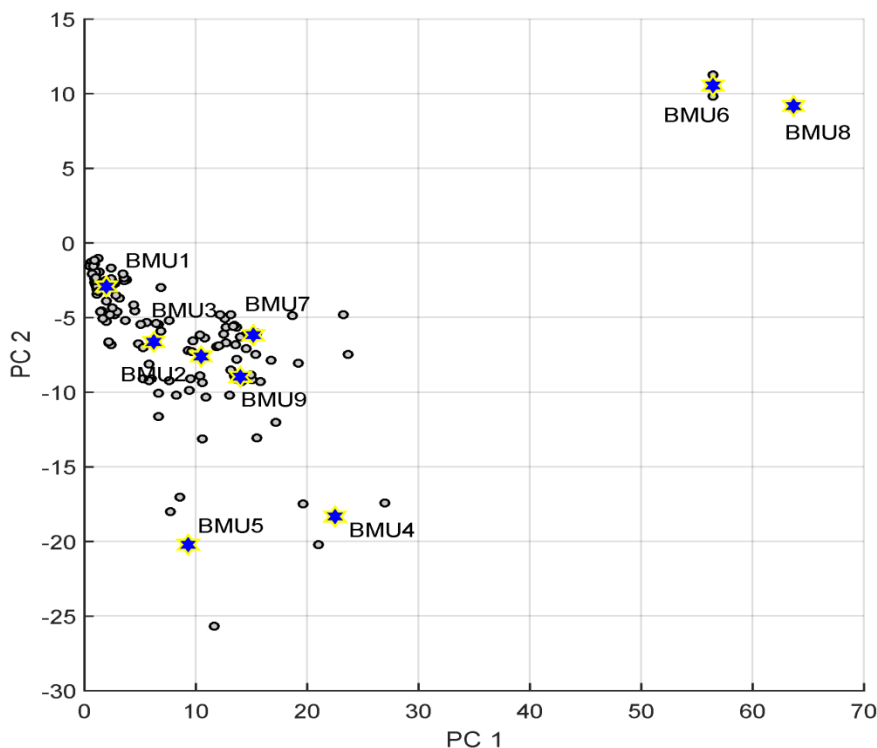
Tablica 6. Prikaz organizacije podataka za antibakterijsku analizu uzoraka u Neural-Gas algoritmu

OZNAKA UZORKA	E. coli MIKROMETODA		S. aureus MIKROMETODA		MRSA MIKROMETODA	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
K1				Vektor podataka		
				Vektor podataka		
				Vektor podataka		
K2				Vektor podataka		
				Vektor podataka		
				Vektor podataka		
...				...		
...				...		
...				...		
...				Vektor podataka		

Antibakterijsko djelovanje uzoraka opisanih ukupnim prostorom od 162 vektor podataka reducirano je i raspodijeljeno Neural-gas metodom na sveukupno 9 podataka (BMU vektora). Svaki od tih 9 BMU vektora opisuje određenu razinu uspješnosti, odnosno jačinu antibakterijskog djelovanja replike uzorka (vektor podataka) na ispitivane bakterije.

U teoriji svaki vektor podataka promatran je u 18 dimenzionalnom prostoru, što je u praksi vizualno teško prikazati te se zbog toga svi podaci reduciraju i projiciraju na dvije najznačajnije osi 18 dimenzionalnog prostora metodom glavnih komponenti kao rezultat nastaje dvodimenzionalni prostor. Na slici 14. prikazana je projekcija podataka i pobjedničkih vektora (BMU) na dvije glavne osi PC1 (x-os) i PC2 (y-os). Ulazni podaci (crne točkice) nisu ravnomjerno raspoređeni između osi PC1 i PC2, kvantitativno gledano najviše podataka je oko ishodišta, dok s povećanjem udaljenosti od ishodišta broj ulaznih podataka se smanjuje. Također, nepravilnu raspodjelu podataka slijede i BMU vektori od kojih su BMU4 i BMU5 te BMU6 i BMU8 najudaljeniji od ishodišta. Udaljenost od ishodišta zapravo definira jačinu

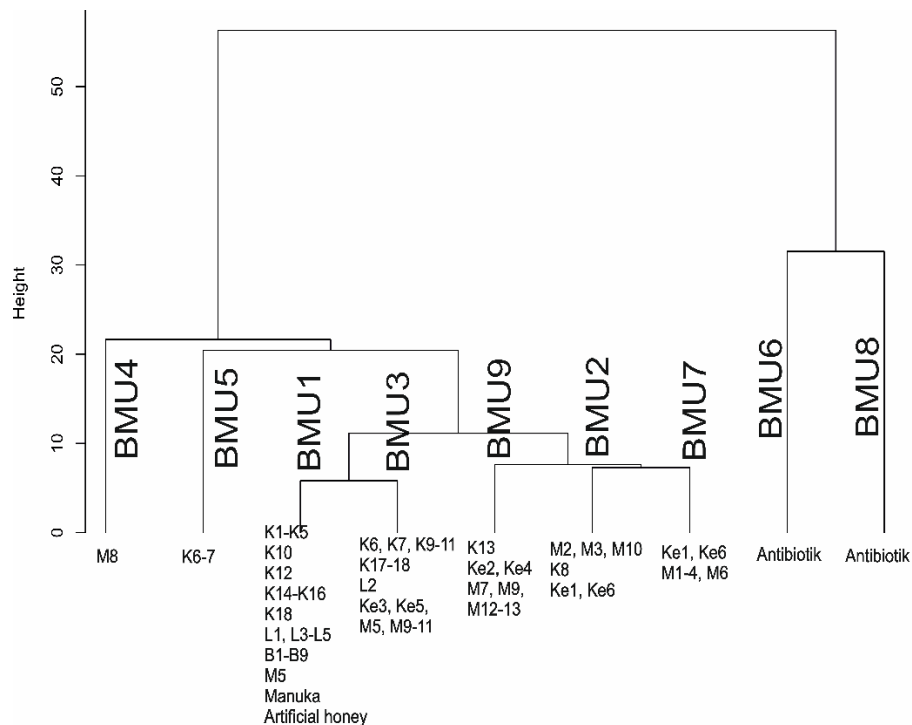
antibakterijskog djelovanja pojedine replike, odnosno sve replike (vektor podataka) čije je antibakterijsko djelovanje opisano sa BMU4, BMU5, BMU6 i BMU8 pokazuju najjači bakteriostatski i baktericidni učinak, dok preostale replike opisane sa BMU-ovima najbližih ishodištu pokazuju slabiji antibakterijski učinak. Udaljenost BMU-ova od ishodišta prikazana je i dendogramom na slici 15¹⁸. gdje je također vidljivo da su BMU4, BMU5, BMU6 i BMU8 najudaljeniji od ishodišta dok se preostali BMU-ovi (bliži ishodištu) dijele u dvije skupine. Jednu skupinu sačinjavaju BMU1 i BMU3 dok drugu skupinu čine BMU2, BMU7 i BMU9¹⁹.



Slika 14. Projekcija podataka (crne točkice) i BMU-a iz Neural-gas algoritma (plave zvjezdice) na glavne osi dobivene metodom glavnih komponentata

¹⁸ Slika 15. se nalazi na sljedećoj stranici.

¹⁹ Vrijednosti BMU vektora pojedinačnih replika nalaze se u tablici 7. poglavlje 8.

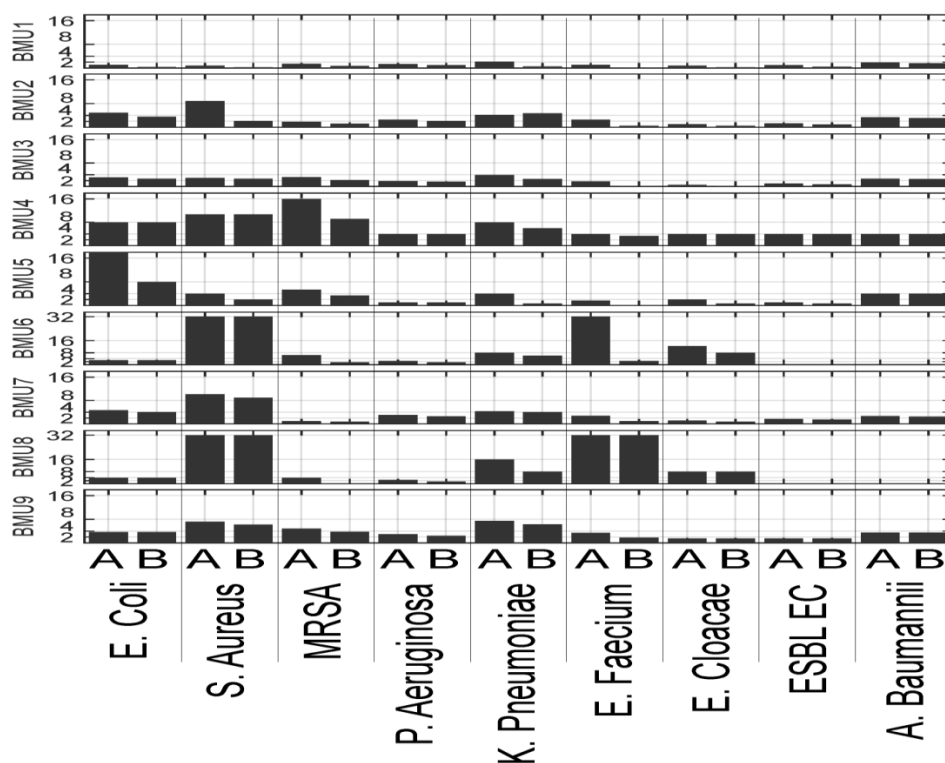


Slika 15. Dendrogram pobjedničkih neurona s označenim uzorcima

Karakteristike pojedinih BMU vektora unutar skupine prikazane su na slici 16. Najbliži ishodištu, prema slici 14., je BMU1 te stoga opisuje uzorke sa vrlo slabim antibakterijskim djelovanjem. Potvrda navedenog se može uočiti na slici 16²⁰. gdje su vrlo niske vrijednosti razrjeđenja uzoraka koji ostvaruju bakteriostatski (A) i baktericidni (B) učinak na sve ispitivane bakterije, odnosno na nekim bakterijama čak je i vidljiv izostanak baktericidnog (B) djelovanja. Iza BMU1, drugi po redu najbliži ishodištu je BMU3. Unatoč tome što BMU3 na slici 16. opisuje uzorke sa malo boljim antibakterijskim djelovanjem od BMU1, ipak sačinjavaju

²⁰ Slika 16. se nalazi na sljedećoj stranici. Na slici 16. slovo A označava bakteriostatski učinak, a slovo B baktericidni učinak. Sa lijeve strane na slici 16. brojevima od 0 do 32 su označena razrjeđenja radnih otopina ispitivanih uzoraka. „Nulto“ razrjeđenje označava koncentraciju uzoraka >50 %, a 32 označava koncentraciju početnog uzorka od 1,6 %.

zajedničku skupinu klaster uzoraka slabijeg antibakterijskog djelovanja u kojoj su sva razrjeđenja radne otopine <25%. Drugu skupinu BMU vektora po udaljenosti najbližih ishodištu čine BMU2, BMU7 i BMU9 (slika 14.). Unutar ove skupine postoje dvije razlike koje se mogu uočiti na slici 16. Prva razlika se odnosi na analiziranje jačine antibakterijskog djelovanja navedenih BMU vektora na *S. aureus* i *K. pneumoniae*, gdje BMU7 pokazuje najjači, a BMU2 najslabiji antibakterijski učinak. Druga razlika prezentirana je odstupanjima u vrijednostima MIK-a i MBK-a unutar pojedinog BMU. Kod BMU9 i BMU2 uočena su veća odstupanja u vrijednostima bakteriostatskog i baktericidnog učinka, odnosno potrebno je primijeniti veću koncentraciju radne otopine kako bi se ostvario baktericidni učinak. Posebice je ova razlika izražena kod BMU2 vektora za bakterije *E. faecium*, *E. cloacae* i ESBL EC, a najveća razlika se očituje za *S. aureus*.



Slika 16. Karakteristike BMU vektora s obzirom na antibakterijski učinak na sve ispitivane bakterije

Za razliku od mikrodilucijske metode, rezultati dobiveni makrodilucijskom metodom nisu se obrađivali Neural-gas metodom zbog manjeg broja podataka (uzorci nisu analizirani u triplicatima, nego kao jedna replika).

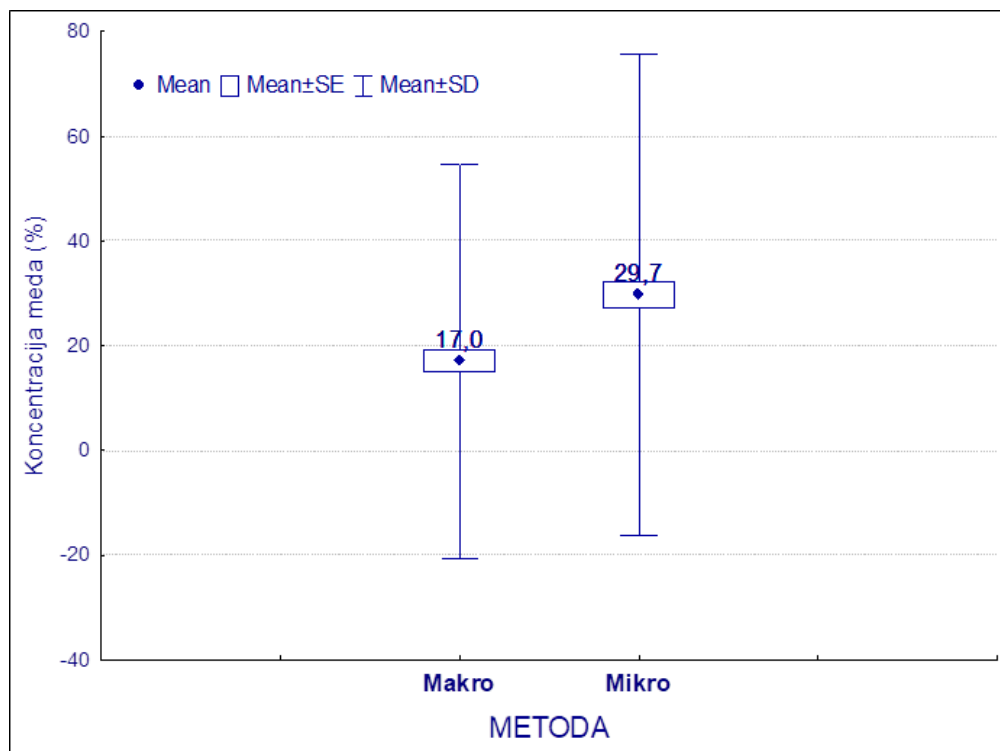
5.2. Ispitivanje podudarnosti antibakterijskog učinka između makrodilucijske i mikrodilucijske

Statistička analiza podudarnosti rezultata MIK-a i MBK-a dobivenih makrodilucijskom i mikrodilucijskom metodom provedena je u programu Statistica 13.0 (Stat. Soft. Inc., Tulsa, SAD) pomoću Wilcoxonovog testa ekvivalentnih parova samo za bakterijske sojeve *E. coli*, *S. aureus* i MRSA. Wilcoxonov test je neparametrijski test koji se temelji na izračunavanju razlike

između članova u svakom paru. Elemente svakog para čini jedna vrijednost MIK-a određena makrodilucijskom metodom i druga vrijednost MIK-a određena mikrodilucijskom metodom za pojedinačni uzorak. Na isti način su formirani parovi i za MBK. Prije početka same analize potrebno je odrediti prosječnu vrijednost MIK-a i MBK-a za uzorke ispitivane mikrodilucijskom metodom, iz razloga što je u istraživanju antibakterijski učinak makrodilucijskom metodom određen jednom replikom a mikrodilucijskom metodom u tri replike.

Rezultati Wilcoxonovog testa, odnosno p-vrijednost od 0,003 ukazuje na to da postoji statistički značajna ($p \leq 0.05$) razlika između vrijednosti MIK-a i MBK-a dobivenih makrodilucijskom i mikrodilucijskom metodom. Na slici 17²¹. grafički su prikazani rezultati pomoću box plota s označenim srednjim vrijednostima (lijevo za makrodilucijsku, a desno za mikrodilucijsku metodu) koje predstavljaju prosječnu koncentraciju uzorka u postocima, potrebnu za ostvarivanje bakteriostatskog i baktericidnog učinka.

²¹ Slika 17. se nalazi na sljedećoj stranici.



Slika 17. Prikaz prosječni vrijednosti koncentracija uzoraka potrebnih za postizanje MIK-a i MBK-a u makrodilucijskoj i mikrodilucijskoj metodi

Prosječna koncentracija uzoraka za postizanje MIK-a i MBK-a u makrodilucijskoj metodi iznosi 17,0%, dok za isto djelovanje prosječna koncentracija uzoraka dobivenih mikrodilucijskom metodom iznosi 29,7 %. Prema tome proizlazi da za postizanje istog djelovanja na pojedinu bakteriju, makrodilucijskom metodom je potrebna manja koncentracija uzorka za 12,7% u odnosu na mikrodilucijsku metodu.

6. Rasprava

Prema rezultatima dobivenih pomoću Neural-gas algoritma utvrđeno je kako najslabiju skupinu uzoraka s obzirom na antibakterijski učinak prema svim bakterijama (*E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. faecium*, *E. cloacae*, ESBL *E. coli*, *A. baumannii* i MRSA) opisuju BMU vektori najbliži ishodištu PC1 i PC2 osi, odnosno vektori BMU1 i BMU3. U navedenu skupinu, s odgovarajućom vrijednosti BMU1, pripada više od polovine od ukupnih uzoraka meda od kadulje (K1, K2, K3, K4, K5, K10, K12, K14, K15, K16, K18), svi uzorci meda od bagrema (B1-B9), uzorak „umjetnog“ meda, manuka meda i meduna (M5) te 4 uzorka meda od lipe (L1, L3, L4, L5).

Prema dostupnim literaturnim izvorima, manuka med prvenstveno je okarakteriziran kao vrsta meda s izrazitim antibakterijskim svojstvima prvenstveno zahvaljujući visokoj koncentraciji metilglioksala (Allen i sur.,1991). Razina metilglioksala u manuka medu opisana je UMF vrijednosti, a njihov odnos je proporcionalan. U ovom istraživanju, razlog za slab antibakterijski potencijal uzorka manuka meda na sve ispitivane bakterije moguće je objasniti niskim razinama metilglioksala. Naime, korišten je manuka med s najnižom vrijednosti u UMF gradacijskom sistemu čija je oznaka UMF 5+, što odgovara razini metilglioksala od 83 mg/kg (<https://www.umf.org.nz/grading-system-explained/>). Međutim, Girma i sur. (2019.) su prezentirali rezultate koji pokazuju kako manuka med pri vrlo visokim razrjeđenjima (6-27% v/v) s vrijednosti UMF 5+ pokazuje bolji bakteriostatski učinak u usporedbi sa manuka medom UMF 10+ i UMF 15+ na ispitivane sojeve bakterija *P. aeruginosa* i MRSA-u zaključujući kako UMF vrijednost moguće nije pouzdan pokazatelj antibakterijskih svojstava (Girma i sur., 2019).

Skupini uzoraka s niskom razinom antibakterijskog djelovanja pripadaju pojedine replike 7 uzoraka meda od kadulje (K6, K7, K9, K10, K11, K17, K18), jednim uzorkom meda od lipe (L2), dva uzorka meda od kestena (KE3, KE5) te pojedinim replikama 4 uzorka meduna (M5, M9, M10, M11) koje opisuje vektor BMU3. Naposljetku, 25% od ukupnog broja ispitivanih replika uzoraka pripada skupini uzoraka sa niskom razinom antibakterijskog učinka.

Sljedeću skupinu uzoraka sa selektivno visokom razinom antibakterijskog djelovanja na određene bakterijske sojeve opisuju tri BMU vektora (BMU2, BMU7 i BMU9) malo udaljenija od ishodišta PC1 i PC2 osi u odnosu na vektore BMU1 i BMU3. Glavna karakteristika skupine se očituje u razini antibakterijskog djelovanja na ispitivane sojeve *S. aureus* i *K.pneumonia*. Najveća razina antibakterijskog djelovanja na ispitivanu bakteriju *S. aureus* odnosi se na uzorke meduna (M1, M2, M3, M4, M6, M10) i uzorke meda od kestena (KE1, KE6) te jedan uzorak meda od kadulje (K8), dok rast i razmnožavanje *K. pneumoniae* najbolje sprječava uzorak meda od kadulje (K13), uzorci meda od kestena (KE2, KE4) te uzorci meduna (M7, M9, M12, M13).

Uz antibakterijsko djelovanje na navedene bakterije, skupina sa selektivno visokom razinom antibakterijskih svojstava uključuje i pojedine replike uzoraka meda od kadulje (K6,K7) opisane vektorom BMU5. Za razliku od vektora BMU2, BMU7 i BMU9, visoku razinu antibakterijskog djelovanja uzorci opisani vektorom BMU5 ostvaruju na bakterijski soj *E. coli*.

Osim bakteriostatskog i baktericidnog djelovanja na *S. aureus* i *K. pneumoniae*, izrazito antibakterijsko djelovanje meduna u odnosu na ostale ispitivane vrste meda očituje se i u zadnjoj, najudaljenijoj skupini BMU vektora od ishodišta PC1 i PC2 osi koja opisuje uzorke meda s visokom razinom antibakterijskog djelovanja. Najznačajnije svojstvo skupine opisane vektorom BMU4, kojoj pripada samo uzorak meduna (M8), jest visoka razina antibakterijskog učinka na

sve ispitivane bakterije od kojih se posebice ističe djelovanje na rezistentan klinički soj MRSA. Vrijednost ostvarenog antibakterijskog potencijala uzorka meduna (M8) na MRSA-u dobiva dodatno na značaju slabim bakteriostatskim učinkom te izostankom baktericidnog učinka antibiotika za navedeni bakterijski soj. Koncentracija uzorka meduna (M8) potrebna za postizanje bakteriostatskog učinka na ispitivani soj MRSA iznosi 0,05 mg/kg (3,1% v/v), dok za isti učinak potrebna koncentracija antibiotika je 4 puta veća i iznosi 0,2 mg/kg (12,5% v/v). S druge strane, baktericidni učinak na bakteriju MRSA ostvaren je pri koncentraciji meduna (M8) u vrijednosti od 0,1 mg/kg (6,25% v/v), a za isti učinak na isti bakterijski soj koncentracija dvije replike antibiotika iznosi 0,8 mg/kg (50% v/v), dok je trećoj replici baktericidni učinak izostao.

Antibakterijsko djelovanje uzorka antibiotika opisano je Neural-gas analizom sa dva vektora BMU6 i BMU8. Iako je udaljenost ta dva vektora od ishodišta PC1 i PC2 osi najveća, antibakterijsko djelovanje ispitivanog antibiotika je u potpunosti izostalo na bakterijskim sojevima ESBL EC i *A. baumannii*. Mogućnost za nastanak ovakvih anomalija u rezultatima u ispitivanju uzorka antibiotika proizlazi iz njegovih vrlo različitih replika koje su se tijekom Neural-gas analize i separirale. Prva replika unutar uzorka antibiotika opisana je s vektorom BMU6, dok su preostale dvije replike opisane vektorom BMU8. S druge strane, svi ispitivani uzorci meda i „umjetnog“ meda su ostvarili antibakterijsku aktivnost na sojeve ESBL EC i *A. baumannii*, većinom pri najmanjem razrjeđenju (50% v/v).

Rezistentnost bakterijskih sojeva na široko primjenjivane antibiotike postao je jedan od glavnih problema s kojim se susreće moderna medicina, a indirektna potvrda toga se može pronaći i u ovom istraživanju u rezistenciji oportunističkih patogena bolničkih infekcija ESBL EC i *A. baumannii* na ispitivani antibiotik. Također, u prilog navedenom je i *in-vitro* studija Georgea i Cuttinga (2007) kojom su demonstrirali antibakterijsko djelovanje standardiziranog

medicinskog meda Medihoney™ Antibacterial Honey (manuka med) na multi-rezistentne mikroorganizme. Medihoney™ Antibacterial Honey je ostvario bakteriostatski učinak na bakterije ESBL EC i *A. baumannii* u koncentraciji od 6-8% (v/v) što je puno efikasnije u odnosu na uzorke meda korištene u ovom istraživanju.

Provedenim analizama na ukupno 5 vrsta medova s područja Republike Hrvatske i jednim komercijalnim uzorkom manuka meda postignuta je klasifikacija s obzirom na antibakterijsko djelovanje. Prema postignutoj klasifikaciji i opisanim razinama antibakterijskog djelovanja, medun se pokazao kao vrsta meda sa visokom razinom antibakterijskog djelovanja, dok med od lipe i med od bagrema su opisani kao vrste meda sa najmanjom razinom antibakterijskog učinka.

Razlog visokim razinama antibakterijskog djelovanja meduna u odnosu na ostale vrste nektarnih medova teško je objasniti jednom specifičnom razlikom, ali različito podrijetlo osnovnih sirovina potrebnih za proizvodnju meduna i nektarnog meda te vjerojatno geografsko podrijetlo imaju veliku ulogu u tome.

U ovom istraživanju, ispitivani uzorci meduna potječu s dva lokaliteta koja se odnose na Gorski kotar i Hrvatsko primorje. Biljne zajednice koje prevladavaju u području Gorskog kotra koje direktno utječu na proizvodnju medne rose, a samim tim i na proizvodnju meduna su zajednice crnogoričnog (jela, smreka) i bjelogoričnog drveća (hrast i bukva). Osim navedenog, drugi faktor koji uvjetuje obilnu proizvodnju medne rose u crnogoričnim i bjelogoričnim šumama Gorskog kotara su raznolike vrste biljnih uši koje zapravo i proizvode mednu rosu (Lušić i sur., 2009). S druge strane, biljna zajednica na određenim dijelovima Hrvatskog

primorja sadrži rijetku kombinaciju bjelograba (*Carpinus orientalis*) i hrasta crnike (*Quercus ilex*), značajnu za proizvodnju meduna (Trinajstić, 2007).

Također, Gobin i sur. (2018.) godine su ispitivali antibakterijski potencijal 12 uzoraka hrvatskih medova na *S. aureus*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* i *E. coli* u kojoj su uzorke meduna, podrijetlom iz Gorskog kotara, označili kao vrstu meda sa najboljim antibakterijskim djelovanjem u odnosu na ostale vrste medova, a dobivene vrijednosti za MIK (0,05 mg/kg-0,2 mg/kg) su identične vrijednostima dobivenim u ovom istraživanju (Gobin i sur., 2018). Nadalje, Broznić i sur. (2018.) godine su proučavali antioksidativni kapacitet te antimikrobni i antiproliferativni potencijal 4 uzorka meduna iz Gorskog kotara na bakterije *S. aureus*, *A.baumannii*. Rezultati studije pokazuju kako se vrijednosti MIK-a i MBK-a za *S. aureus* kreću u rasponu od 0,05 mg/kg do 0,0125 mg/kg, dok za *A. baumannii* vrijednosti MIK-a i MBK-a se kreću u rasponu od 0,1 mg/kg do 0,025 mg/kg. U istoj studiji, autori su zaključili kako medun iz Gorskog kotara posjeduje terapijski potencijal te se može iskoristiti za unaprjeđenje zdravlja iz razloga što pokazuje snažnu biološku aktivnost (Broznić i sur.,2018)

Terapijski učinak određenih vrsta medicinskog meda s viskom razinom antibakterijskih svojstava prvenstveno se očituje u liječenju opekline i raznih kirurških i kroničnih rana inficiranih patogenim mikroorganizmima poput MRSA-e u svakoj životnoj dobi, čak i kod imunokompromitiranih osoba koje boluju od diabetes mellitusa (Simon i sur., 2009). Osim navedenog, područje primjene medicinskog meda se širi i prema drugim organskim sustavima, a glavni cilj je prevencija bakterijskih infekcija te brži oporavak oštećenih sluznica (Simon i sur., 2009).

Visoka razina antibakterijskog djelovanja meduna s područja Gorskog kotara i Hrvatskog primorja u odnosu na ostale vrste nektarnih medova je još jednom potvrđena i u ovom istraživanju, čiji rezultati su pridonijeli porastu važnosti meduna, posebice u smjeru primjene u medicinske svrhe poput vrsta manuka meda. Također, na temelju rezultata ovog istraživanja, ali i prethodnih kao i budućih istraživanja meduna, svakako ga je potrebno podvrgnuti standardiziranim procesima za proizvodnju medicinskog meda poput filtracije i ozračivanja s gama zraka, a zatim u *in vitro* uvjetima ispitati njegovo antibakterijsko djelovanje što je ujedno i prvi korak za primjenu u medicinske svrhe.

Osim analiziranja antibakterijskih svojstava uzoraka, u ovom istraživanju dodatno je provedena procjena podudaranja rezultata MIK-a i MBK-a dobivenih makrodilucijskom i mikrodilucijskom metodom. Prema Wilcoxonovom testu, statistički značajne razlike postoje u međusobnim vrijednostima MIK-a i MBK-a određene navedenim dilucijskim metodama. Prosječne vrijednosti MIK-a i MBK-a dobiveni mikrodilucijskom metodom su veće u odnosu na prosječne vrijednosti MIK-a i MBK-a dobiveni makrodilucijskom metodom što znači da su mikrodilucijskoj metodi potrebne veće koncentracije ishodišnog uzorka u radnoj otopini za postizanje istog djelovanja.

Statistički značajne razlike između vrijednosti MIK-a i MBK-a su zasigurno produkt pogreška nastalih tijekom mjerenja, odnosno različitosti instrumenta koji se koriste u određivanju navedenih vrijednosti. Naime, u izvedbi makrodilucijske metode kao instrument procjene MIK-a koristi se vizualna procjena, a kod mikrodilucijske metode ELISA čitač mikrotitarskih pločica s 96 jažica. Posljedično tome, vrijednosti MBK-a pokazuju isti rezultat Wilcoxonovog testa, iz razloga što prema dobivenim vrijednostima MIK-a se određivao MBK u ispitivanim uzorcima.

Szweda (2016.) je u svojoj studiji proučavao razlike između agar-difuzijske metode i mikrodilucijske metode u određivanju antibakterijskih svojstava uzoraka meda, a kao prednosti mikrodilucijske metode navodi veću mogućnost uzastopnih mjerenja rezultata, lakšu interpretaciju rezultata te snažniju diskriminacijsku snagu u analizi rezultata (Szweda, 2016).

Mikrodilucijska metoda bi svakako bila metodom izbora u određivanju antibakterijskih svojstava uzoraka meda, ali i u ispitivanju drugih tvari koje pokazuju navedeno djelovanje, u odnosu na makrodilucijsku metodu prvenstveno zbog jednostavnosti, brže izvedbe te mogućnosti ispitivanja većeg broja replika. Za potvrdu navedenih prednosti, definitivno je potrebno napraviti dodatnu analizu kako bi se utvrdilo koja metoda producira točne i precizne rezultate što nije obuhvaćeno ovim istraživanjem.

7. Zaključak

Od ukupno 52 uzorka meda raspodijeljenih u 6 monoflornih vrsta, visoku razinu s najširim spektrom antibakterijskog djelovanja pokazuju uzorci meduna. Pojedini uzorci meduna visoku razinu antibakterijskog djelovanja ostvaruju na bakteriju *S. aureus* (M1, M2, M3, M4, M6) i *K. pneumoniae* (M7, M9, M12, M13). Jedini uzorak koji ostvaruje visoku razinu antibakterijskog djelovanja na sve ispitivane bakterije je medun (M8), među kojima se ističe djelovanje na rezistentan klinički soj MRSA zbog vrlo slabog ili izostanka antibakterijskog djelovanja ispitivanog antibiotika na navedeni bakterijski soj.

Kod bakterijskih sojeva ESBL EC i *A. baumannii* nije zabilježeno antibakterijsko djelovanje ispitivanog antibiotika, dok su svi ispitivani uzorci meda u minimalnoj koncentraciji (50% v/v) ostvarili antibakterijski učinak na te bakterijske sojeve.

Visoku razinu antibakterijskog djelovanja, ali samo na soj *S. aureus* ostvaruju uzorci meda od kestena (KE1, KE6), a isti učinak postiže uzorak meda od kadulje (K13) i uzorci meda od kestena (KE2, KE4) na bakteriju *K. pneumoniae* te uzorci meda od kadulje (K6 i K7) na bakteriju *E. coli*.

Skupina uzoraka sa niskom razinom antibakterijskog djelovanja prema svim bakterijama uključuje sve uzorke meda od bagrema (B1-B9), uzorak „umjetnog“ meda i manuka meda, 4 uzorka meda od lipe (L1, L3, L4, L5) te polovinu ukupnih uzoraka meda od kadulje (K1, K2, K3, K4, K5, K12, K14, K15, K16). Mogući razlog zbog kojeg manuka med spada u navedenu skupinu je taj što se u ispitivanju koristio uzorak sa najnižom vrijednosti manuka faktora (UMF 5+).

U procjeni podudaranja rezultata MIK-a i MBK-a dobivenih makrodilucijskom i mikrodilucijskom metodom prema Wilcoxonovom testu, mikrodilucijska metoda bi svakako bila metodom izbora u određivanju antibakterijskih svojstava uzoraka meda prvenstveno zbog jednostavnosti i brže izvedbe. Potrebno je napraviti dodatnu analizu kako bi se utvrdilo koja metoda producira točne i precizne rezultate ispitivanja antibakterijskog djelovanja što nije obuhvaćeno ovim istraživanjem.

Na kraju, zaključujući prema ukupnoj slici ispitivanja antibakterijskog djelovanja pomoću makrodilucijske i mikrodilucijske metode, uzorci meduna s područja Gorskog kotara i Hrvatskog primorja su ostvarili najbolji antibakterijski učinak u odnosu na ostale vrste nektarnog meda. Rezultati ovog istraživanja se poklapaju i sa rezultatima ostalih istraživanja antibakterijskih učinaka provedenih na medunima s istog područja.

7. Literatura

1. Abd-El Aal, A. M., El-Hadidy, M. R., El-Mashad, N. B., & El-Sebaie, A. H. (2007). Antimicrobial effect of bee honey in comparison to antibiotics on organisms isolated from infected burns. *Annals of Burns and fire disasters*, 20(2), 83.
2. Adams, C. J., Manley-Harris, M., & Molan, P. C. (2009). The origin of methylglyoxal in New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. *Carbohydrate research*, 344(8), 1050-1053.
3. Allen, K. L., Molan, P. C., & Reid, G. M. (1991). A survey of the antibacterial activity of some New Zealand honeys. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 43(12), 817-822.
4. Anand, S., Deighton, M., Livanos, G., Morrison, P. D., Pang, E. C., & Mantri, N. (2019). Antimicrobial activity of Agastache honey and characterization of its bioactive compounds in comparison with important commercial honeys. *Frontiers in microbiology*, 10, 263.
5. Anthimidou, E., & Mossialos, D. (2013). Antibacterial activity of Greek and Cypriot honeys against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in comparison to manuka honey. *Journal of medicinal food*, 16(1), 42-47.
6. Anupama, D., Bhat, K. K., & Sapna, V. K. (2003). Sensory and physico-chemical properties of commercial samples of honey. *Food research international*, 36(2), 183-191.
7. Bang, L. M., Bunting, C., & Molan, P. (2003). The effect of dilution on the rate of hydrogen peroxide production in honey and its implications for wound healing. *The Journal of Alternative & Complementary Medicine*, 9(2), 267-273.
8. Bogdanov, S. (1997). Nature and origin of the antibacterial substances in honey. *LWT-Food Science and Technology*, 30(7), 748-753.

9. Bogdanov, S., Jurendic, T., Sieber, R., & Gallmann, P. (2008). Honey for nutrition and health: a review. *Journal of the American College of Nutrition*, 27(6), 677-689.
10. Bogdanov, S., Martin, P., & Lullmann, C. (2002). Harmonised methods of the international honey commission. *Swiss Bee Research Centre, FAM, Liebefeld*.
11. Broznić, D., Ratkaj, I., Malenica Staver, M., Kraljević Pavelić, S., Žurga, P., Bubalo, D., & Gobin, I. (2018). Evaluation of the Antioxidant Capacity, Antimicrobial and Antiproliferative Potential of Fir (*Abies alba* Mill.) Honeydew Honey Collected from Gorski kotar (Croatia). *Food technology and biotechnology*, 56(4), 533-545.
12. Brudzynski, K., Abubaker, K., & Castle, A. (2011). Re-examining the role of hydrogen peroxide in bacteriostatic and bactericidal activities of honey. *Frontiers in microbiology*, 2, 213.
13. Fujiwara, S., Imai, J., Fujiwara, M., Yaeshima, T., Kawashima, T., & Kobayashi, K. (1990). A potent antibacterial protein in royal jelly. Purification and determination of the primary structure of royalisin. *Journal of biological chemistry*, 265(19), 11333-11337.
14. George, N. M., & Cutting, K. F. (2007). Antibacterial honey (Medihoney™): in-vitro activity against clinical isolates of MRSA, VRE, and other multiresistant gram-negative organisms including *Pseudomonas aeruginosa*. *Wounds*, 19(9), 231.
15. Gobin, I., Crnković, G., Magdalenić, M., Begić, G., Babić, A., & Vučković, D. (2018). Antibacterial potential of Croatian honey against antibiotic resistant pathogenic bacteria. *Medicinski Glasnik*, 15(2).
16. Henriques, A. F., Jenkins, R. E., Burton, N. F., & Cooper, R. A. (2011). The effect of manuka honey on the structure of *Pseudomonas aeruginosa*. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 30(2), 167-171.

17. Hussain, M. B., Kamel, Y. M., Ullah, Z., Jiman-Fatani, A. A. M., & Ahmad, A. S. (2019). In vitro evaluation of methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* susceptibility to Saudi honeys. *BMC complementary and alternative medicine*, *19*(1), 185.
18. Jantakee, K., & Tragoolpua, Y. (2015). Activities of different types of Thai honey on pathogenic bacteria causing skin diseases, tyrosinase enzyme and generating free radicals. *Biological research*, *48*(1), 4.
19. Kludiny, J., Albert, Š., Bachanová, K., Kopernický, J., & Šimúth, J. (2005). Two structurally different defensin genes, one of them encoding a novel defensin isoform, are expressed in honeybee *Apis mellifera*. *Insect biochemistry and molecular biology*, *35*(1), 11-22.
20. Kwakman, P. H., te Velde, A. A., de Boer, L., Speijer, D., Vandenbroucke-Grauls, C. M., & Zaat, S. A. (2010). How honey kills bacteria. *The FASEB Journal*, *24*(7), 2576-2582.
21. Lušić, D., Nekić, D., Ožanić, M., Majetić, V., & Staver, M. M. (2009). „Odabrani pokazatelji kvalitete medljikovca Gorskog kotra 2006. i 2007. Godine“. *Zbornik Radova 44. Hrvatski i 4. Međunarodni Simpozij Agronoma, Opatija, Hrvatska, 16-20. Veljače 2009*, 696-701.
22. Mama, M., Teshome, T., & Detamo, J. (2019). Antibacterial activity of honey against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A laboratory-based experimental study. *International journal of microbiology*, 2019.

23. Mavric, E., Wittmann, S., Barth, G., & Henle, T. (2008). Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of Manuka (*Leptospermum scoparium*) honeys from New Zealand. *Molecular nutrition & food research*, 52(4), 483-489.
24. Melzer, M., & Petersen, I. (2007). Mortality following bacteraemic infection caused by extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *E. coli* compared to non-ESBL producing *E. coli*. *Journal of Infection*, 55(3), 254-259.
25. Molan, P. C. (1992). The antibacterial activity of honey: 1. The nature of the antibacterial activity. *Bee world*, 73(1), 5-28.
26. Molan, P. C. (1992). The antibacterial activity of honey: 2. Variation in the potency of the antibacterial activity. *Bee world*, 73(2), 59-76.
27. Molan, P. C. (2009). Honey: Antimicrobial actions and role in disease management.
28. Mulu, A., Tessema, B., & Derby, F. (2004). In vitro assessment of the antimicrobial potential of honey on common human pathogens. *The Ethiopian Journal of Health Development (EJHD)*, 18(2).
29. NN (2009) „Pravilnik o kakvoći uniflornog meda“. Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja. 122: Preuzeto sa: https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2009_10_122_3018.html
30. NN (2015) „Pravilnik o medu“. Ministarstvo poljoprivrede. 53: Preuzeto sa: https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2015_05_53_1029.html
31. NN (2017) „Pravilnik o izmjenama Pravilnika o medu“ Ministarstvo poljoprivrede. 47: Preuzeto sa https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2017_05_47_1107.html.

32. Oertel, E. (1980). History of beekeeping in the United States. *Agriculture Handbook*, 335, 2-9.
33. Pendleton, J. N., Gorman, S. P., & Gilmore, B. F. (2013). Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert review of anti-infective therapy*, 11(3), 297-308.
34. ROTH, L. A., KWAN, S., & SPORNS, P. (1986). Use of a disc-assay system to detect oxytetracycline residues in honey. *Journal of Food Protection*, 49(6), 436-441.
35. Santajit, S., & Indrawattana, N. (2016). Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *BioMed research international*, 2016.
36. Simon, A., Traynor, K., Santos, K., Blaser, G., Bode, U., & Molan, P. (2009). Medical honey for wound care—still the ‘latest resort’?. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 6(2), 165-173.
37. Szweda, P. (2017). Antimicrobial activity of honey. *Honey analysis*, 3, 15.
38. The Council of the European Union [Internet]. Council Directive 2001/110/EC of 20 December 2001 relating to honey, 2001 [Cited: 10.5.2020] Available from: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:010:0047:0052:EN:PDF>.
39. The Council of the European Union [Internet]. Council Directive 2014/63/EU of 15 May 2014 relating to honey, 2014 [Cited: 16.6.2020] Available from: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32014L0063&from=GA>
40. Trinajstić, I. (2007). “Fitocenološko-sintaksonomske značajke šuma crnike—*Quercus ilex* L. na otoku Krku“. *Šumarski list*, 131(9-10), 431-434.
41. Unique Manuka Factor Honey Association. Grading System Explained. 2020 [Pristupljeno 20.5.2020]. Dostupno: UMF Honey Association Website [Internet]. St. Heliers, New Zealand. <https://www.umf.org.nz/gradingsystem-explained/>

42. White Jr, J. W., Subers, M. H., & Schepartz, A. I. (1963). The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose-oxidase system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Specialized Section on Enzymological Subjects*, 73(1), 57-70.
43. Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature protocols*, 3(2), 163.
44. Zainol, M. I., Yusoff, K. M., & Yusof, M. Y. M. (2013). Antibacterial activity of selected Malaysian honey. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(1), 1-10.
45. Zima, D. (2007).“ Prilog poznavanju medonosnog bilja Hrvatske“. *Agronomski glasnik: Glasilo Hrvatskog agronomskog društva*, 69(2), 147-160

8. Dodaci

8.1. Tablice replika uzoraka sa generiranim vrijednostima BMU vektora

Tablica 7. Popis replika uzoraka meda od kadulje (K1-K18) sa generiranim vrijednostima BMU vektora

Uzorci	Broj replike	BMU vektor	Uzorci	Broj replike	BMU vektor
K1 – 19`	1.	1	K10 – 19`	1.	1
	2.	1		2.	3
	3.	1		3.	1
K2 – 19`	1.	1	K11 – 19`	1.	3
	2.	1		2.	3
	3.	1		3.	3
K3 – 19`	1.	1	K12 – 18`	1.	1
	2.	1		2.	1
	3.	1		3.	1
K4 – 19`	1.	1	K13 – 18`	1.	9
	2.	1		2.	9
	3.	1		3.	9
K5 – 19`	1.	1	K14 – 18`	1.	1
	2.	1		2.	1
	3.	1		3.	1
K6 – 19`	1.	5	K15 – 18`	1.	1
	2.	3		2.	1
	3.	5		3.	1
K7 – 19`	1.	5	K16 – 18`	1.	1
	2.	3		2.	1
	3.	3		3.	1
K8 – 19`	1.	7	K17 – 18`	1.	3
	2.	2		2.	3
	3.	2		3.	3
K9 – 19`	1.	3	K18 – 18`	1.	3
	2.	3		2.	3
	3.	3		3.	1

Tablica 8. Popis replika uzoraka meda od lipe (L1-L5) i meduna (M1-M13) sa generiranim vrijednostima BMU vektora

Uzorci	Broj replike	BMU vektor	Uzorci	Broj replike	BMU vektor
L1 – 17`	1.	1	M5 – 19`	1.	1
	2.	1		2.	3
	3.	1		3.	3
L2 – 18`	1.	3	M6 – 19`	1.	7
	2.	3		2.	7
	3.	3		3.	7
L3 – 18`	1.	1	M7 – 18`	1.	9
	2.	1		2.	9
	3.	1		3.	9
L4 – 18`	1.	1	M8 – 18`	1.	4
	2.	1		2.	4
	3.	1		3.	4
L5 – 18`	1.	1	M9 – 18`	1.	9
	2.	1		2.	9
	3.	1		3.	3
M1 – 19`	1.	7	M10 – 18`	1.	2
	2.	7		2.	2
	3.	7		3.	3
M2 – 19`	1.	7	M11 – 18`	1.	3
	2.	2		2.	3
	3.	7		3.	3
M3 – 19`	1.	2	M12 – 18`	1.	9
	2.	7		2.	9
	3.	7		3.	9
M4 – 19`	1.	7	M13 – 18`	1.	9
	2.	7		2.	9
	3.	7		3.	9

Tablica 9. *Popis replika uzoraka meda od kestena (KE1-KE6), meda od bagrema (B1-B9), manuka meda, tzv. "umjetnog" meda i antibiotika sa generiranim vrijednostima BMU vektora*

Uzorci	Broj replike	BMU vektor	Uzorci	Broj replike	BMU vektor
KE1 – 17`	1.	7	B4 – 17`	1.	1
	2.	2		2.	1
	3.	7		3.	1
KE2 – 18`	1.	9	B5 – 17`	1.	1
	2.	9		2.	1
	3.	9		3.	1
KE3 – 17`	1.	3	B6 – 17`	1.	1
	2.	3		2.	1
	3.	3		3.	1
KE4 – 19`	1.	9	B7 – 18`	1.	1
	2.	9		2.	1
	3.	9		3.	1
KE5 – 17`	1.	3	B8 – 17`	1.	1
	2.	3		2.	1
	3.	3		3.	1
KE6 – 17`	1.	7	B9 – 18`	1.	1
	2.	7		2.	1
	3.	2		3.	1
B1 – 17`	1.	1	Manuka med	1.	1
	2.	1		2.	1
	3.	1		3.	1
B2 – 18`	1.	1	„Umjetni“ med	1.	1
	2.	1		2.	1
	3.	1		3.	1
B3 – 17`	1.	1	Antibiotik	1.	8
	2.	1		2.	6
	3.	1		3.	6

8.2. Popis slika

- Slika 1. *Reakcija stvaranja vodikov peroksida (Szweda, 2016) 8*
- Slika 2. *Udio zastupljenosti ispitivanih vrsta meda s obzirom na ukupni broj uzoraka..... 18*

Slika 3. <i>Karta Republike Hrvatske s označenim lokalitetima ispitivanih uzoraka meda (med od lipe, med od kadulje, med od kestena, med od bagrema, medun)(autorska slika)</i>	18
Slika 4. <i>Usporedba makrodilucijske i mikrodilucijske metode u određivanju MIK-a (autorska slika).....</i>	36
Slika 5. <i>Staklene epruvete u kojima je određivan MIK (autorska slika)</i>	37
Slika 6. <i>Shema izrade dilucijskog niza s dvostrukim razrjeđenjima u određivanju MIK-a makrodilucijskom metodom (autorska slika)</i>	38
Slika 7. <i>Rezultati određivanja MIK-a makrodilucijskom metodom (autorska slika).....</i>	39
Slika 8. <i>Shema određivanja MBK-a makrodilucijskom metodom (autorska slika)</i>	40
Slika 9. <i>Rezultati određivanja MBK-a na uzorku meda od bagrema (B6) (autorska slika).....</i>	41
Slika 10. <i>Shema s tri mikrotitarske pločice koje označavaju slijed postupaka u određivanju MIK-a mikrodilucijskom metodom (autorska slika).....</i>	43
Slika 11. <i>Shema određivanja MBK-a mikrodilucijskom metodom (autorska slika).....</i>	45
Slika 12. <i>Rezultati određivanja MBK-a za uzorke meda od bagrema (B2, B3, B4, B5) (autorska slika).....</i>	46
Slika 13. <i>Rezultati određivanja MBK-a za uzorke meda od kadulje (K17, K18) i uzorke meduna (M1, M2) (autorska slika).....</i>	46
Slika 14. <i>Projekcija podataka (crne točkice) i BMU-a iz Neural-gas algoritma (plave zvjezdice) na glavne osi dobivene metodom glavnih komponenata.....</i>	51
Slika 15. <i>Dendogram pobjedničkih neurona s označenim uzorcima.....</i>	52
Slika 16. <i>Karakteristike BMU vektora s obzirom na antibakterijski učinak na sve ispitivane bakterije</i>	54

Slika 17. <i>Prikaz prosječni vrijednosti koncentracija uzoraka potrebnih za postizanje MIK-a i MBK-a u makrodilucijskoj i mikrodilucijskoj metodi</i>	56
--	----

8.3. Popis tablica

Tablica 1. <i>Popis uzoraka meda od kadulje razvrstanih prema godini proizvodnje i lokalitetu</i> ...	20
Tablica 2. <i>Popis uzoraka meda od lipe razvrstanih prema godini proizvodnje i lokalitetu</i>	21
Tablica 3. <i>Popis uzoraka meda od kestena razvrstanih prema godini proizvodnje i lokalitetu</i> ...	21
Tablica 4. <i>Popis uzoraka meda od bagrema razvrstanih prema godinama i lokalitetima proizvodnje</i>	22
Tablica 5. <i>Popis uzoraka meduna razvrstanih prema godini proizvodnje i lokalitetu</i>	23
Tablica 6. <i>Prikaz organizacije podataka za antibakterijsku analizu uzoraka u Neural-Gas algoritmu</i>	50
Tablica 7. <i>Popis replika uzoraka meda od kadulje (K1-K18) sa generiranim vrijednostima BMU vektora</i>	72
Tablica 8. <i>Popis replika uzoraka meda od lipe (L1-L5) i meduna (M1-M13) sa generiranim vrijednostima BMU vektora</i>	73
Tablica 9. <i>Popis replika uzoraka meda od kestena (KE1-KE6), meda od bagrema (B1-B9), manuka meda, tzv. "umjetnog" meda i antibiotika sa generiranim vrijednostima BMU vektora</i>	74

9. Životopis

Osobni podaci

Ime / Prezime	Ivan Škara	
Adresa(e)	B.Benkovića 24	
Telefonski broj(evi)	Broj (evi) fiksnog telefona:023/324200	Broj mobilnog telefona:099/8361591
E-mail	Iskara95@gmail.com	
Državljanstvo	Hrvatsko	
Datum rođenja	2. 6.1995.	
Spol	Muški	

Radno iskustvo

Datumi	Vražap d.o.o. 7. 2016.- 9. 2016. 7. 2017- 9. 2017
Zanimanje ili radno mjesto	Vozač
Glavni poslovi i odgovornosti	
Naziv i adresa poslodavca	Ul. Marijane Radev 28, 23000, Zadar
Vrsta djelatnosti ili sektor	Pekarstvo
	Kraš d.d. 6. 2018.-9. 2018. Pozicionera Ravnice 4810000 Zagreb,Hrvatska Sektor unapređivanja prodaje
	Hotel Pinija, Petrčane, Zadar 6.2019 - 9.2019 Recepcioner ŠRC-a
	Uslužna djelatnost

Obrazovanje i osposobljavanje

Datumi 2010.-2015.
 Naziv dodijeljene kvalifikacije / zvanje Medicinski tehničar opće njege
 Glavni predmeti / stečene profesionalne vještine
 Naziv i vrsta ustanove pružatelja obrazovanja i osposobljavanja Medicinska škola Ante Kuzmanića, Zadar
 Razina prema nacionalnoj ili međunarodnoj klasifikaciji SSS

2015. – 2018
 Prvostupnik Sanitarnog inženjerstva
 Medicinski fakultet u Rijeci

Osobne vještine i kompetencije

Materinski jezik **Hrvatski**
 Drugi jezik(ci)

Samoprocjena

Europska razina ()*

Engleski jezik

_____ jezik

Razumijevanje				Govor				Pisanje	
Slušanje		Čitanje		Govorna interakcija		Govorna produkcija			
B1	Samostalni korisnik	B1	Samostalni korisnik	B1	Samostalni korisnik	B1	Samostalni korisnik	B1	Samostalni korisnik

(*) [Zajednički europski referentni okvir za jezike](#)

Društvene vještine i kompetencije Komunikativnost .

Organizacijske vještine i kompetencije Organizacijski odbor kongresa „Neurini“, „Sanitas“ i Nacionalne konferencije o sigurnosti i kakvoći pčelinjih proizvoda

Tehničke vještine i kompetencije	Tehnička služba u organizaciji kongresa.
Računalne vještine i kompetencije	Osnovno korištenje programa MS Office-a,
Umjetničke vještine i kompetencije	
Druge vještine i kompetencije	Radišnost i želja za učenjem
Vozačka dozvola	B
Dodatne informacije	Trenutno obrazovanje Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci, smjer Sanitarno inženjerstvo Student demonstrator na Zavodu za kemiju i biokemiju, kolegiji Opća i anorganska kemija Predstavnik studija Sanitarnog inženjerstva tijekom 2018.- 2020.
Dodaci	
Datum popunjavanja ili zadnjeg ažuriranja životopisa	18.06.2020