

Mikrobiološka analiza različitih vrsta meduna

Požega, Bruno

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

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:184:014227>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-24**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Bruno Požega

MIKROBIOLOŠKA ANALIZA RAZLIČITIH VRSTA MEDUNA

Završni rad

Rijeka, 2024.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Bruno Požega

MIKROBIOLOŠKA ANALIZA RAZLIČITIH VRSTA MEDUNA

Završni rad

Rijeka 2024.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Bruno Požega

MIKROBIOLOŠKA ANALIZA RAZLIČITIH VRSTA MEDUNA

Završni rad

Mentor rada: prof.dr.sc. Ivana Gobin, dipl.sanit.ing.

Rijeka, 2024.

Sadržaj

Sažetak	1
Summary	2
1. UVOD I PREGLED PODRUČJA.....	3
1.1. Podjela meda	4
1.2. Kemijski sastav meda	6
1.3. Svojstva meda.....	8
1.4. Kontaminacija meda	10
1.4.1. Mikrobiološka kontaminacija	10
1.4.2. Ostali oblici kontaminacije	12
1.5. Antimikrobna svojstva meda	12
2. MATERIJALI I METODE.....	13
2.1. Materijali	14
2.1.1. Laboratorijski pribor i oprema	14
2.1.2. Hranjive podloge	14
2.2. Metode rada	15
2.2.1. Prikupljanje i pohrana uzoraka za analizu	15
2.2.2. Priprema uzoraka meda za analizu	15
2.2.3. Određivanje zastupljenosti vode, električne vodljivosti, slobodne kiselosti i pH vrijednosti	15
2.2.4. Mikrobiološka analiza	16
2.2.4. Izolacija kvasaca i plijesni	Error! Bookmark not defined.
2.2.5. Identifikacija bakterija pomoću MALDI_TOF uređaja.....	18
3. Rezultati	19
3.1. Dokazivanje prisutnosti bakterija, kvasaca i plijesni	19
3.2. Dokazivanje prisutnosti Lactobacillusa	21
4. RASPRAVA	22

5. Zaključak	24
6. Životopis	25
7. Literatura	26

Sažetak

Zdravstvena ispravnost hrane jedna je od osnovnih pretpostavki ljudskog zdravlja. U ovom radu ispitana mikroorganizama u nekoliko različitih uzoraka meda od medljike. Ovaj med poznat i kao šumski med, specifična je vrsta meda koja se ističe svojim složenim kemijskim sastavom i brojnim zdravstvenim koristima, što ga čini predmetom interesa kao u terapiji (metoda liječenja i prevencije bolesti korištenjem pčelinjih proizvoda), tako i u suvremenim istraživanjima na područjima medicine. Med od medljike je prirodni proizvod koji pčele stvaraju procesom prikupljanja biljnih sokova iz dubljih slojeva vegetacije, a zatim ga obrađuju unutar košnice. Ovaj složeni proces uključuje enzimske reakcije i dehidraciju, što rezultira stvaranje visoko nutritivnog i aromatičnog proizvoda koji se koristi u prehrani i tradicionalnoj medicini. S obzirom da je med u konstantnom doticaju s ljudskom populacijom i lako može prenijeti određene vrste mikroorganizama, ali može biti i izvor određenih bolesti.

Cilj rada je istražiti mikrobiološku kvalitetu različitih vrsta meda meduna te utvrditi kontaminaciju različitim mikroorganizmima. Kod svih uzoraka je dokazana prisutnost aerobnih mezofilnih bakterija. Prisutnost kvasaca i plijesni je utvrđena kod 60% uzoraka meda. Daljnjom identifikacijom uzoraka meda utvrđeno je nekoliko različitih rodova mikroorganizama : *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*. Također, neki od identificiranih mikroorganizama ukazuju na nepravilno provođenje pčelarske prakse i pokazuju kako je potrebno sustavno provoditi mikrobiološku analizu meda kao proizvoda.

Ključne riječi: med, mikrobiološka kvaliteta, kvasci i plijesni, identifikacija

Summary

The healthiness of food is one of the basic assumptions of human health. In this work, microorganisms were examined in several different samples of honey from honeydew. This honey, also known as forest honey, is a specific type of honey that stands out for its complex chemical composition and numerous health benefits, which makes it an object of interest both in therapy (methods of treatment and prevention of diseases using bee products) and in modern research in the fields of medicine. . Honey from honeydew is a natural product that bees create by the process of collecting plant juices from the deeper layers of vegetation, and then process it inside the hive. This complex process involves enzymatic reactions and dehydration, resulting in the creation of a highly nutritious and aromatic product used in nutrition and traditional medicine. Given that honey is in constant contact with the human population and can easily transmit certain types of microorganisms, it can also be the source of certain diseases.

The aim of the work is to investigate the microbiological quality of different types of meduna honey and to determine the contamination by aerobik mesophilic bacteria. The presence of some type of microorganism was proven in all samples. The presence of yeast and mold was determined in 60% of the honey samples. Further identification of honey samples revealed several different genera of microorganisms: *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*. Also, some of the identified microorganisms indicate improper implementation of beekeeping practices and show that it is necessary to systematically carry out microbiological analysis of media as a product.

Key words: honey, microbiological quality, yeasts and molds, identification

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA

Med, prirodni proizvod i jedan od prirodnih zaslađivača koji nastaje aktivnošću medonosnih pčela. U mnogim kulturama pčelarstvo je postalo i dio kulturnog nasljeđa. Med se konzumira u nepromijenjenom obliku još od vremena drevnih civilizacija. Karakterizira ga složeni kemijski sastav koji ovisi o vrsti pčela, geografskoj regiji, raspoloživom cvjetnom izvoru te uvjetima skladištenja. Potrebno je proći kroz nekoliko različitih procesa kako bi čovjek u konačnici mogao konzumirati gotov proizvod tj. u ovom slučaju med.

Pčele prikupljaju nektar cvjetova ili prirodne sokove koji potječu iz dubljih slojeva biljaka. Nakon oprašivanja samoga cvijeta ili biljke pčela proguta sok ili nektar čime se mijenja pH, a to je posljedica dolaska nektara i sokova u kontakt s enzimima pčela. Nakon što se prikupi dovoljna količina meda pčele se vraćaju u košnice gdje predaju svoj prikupljeni med mlađim pčelama radilicama koje dalje nastavljaju proces prerade meda. Mlađe pčele radilice ekstrahiraju i prerađuju sokove ili nektar pomoću svojih probavnih enzima do jednostavnijih spojeva, kao na primjer fruktoza ili glukoza. Prisutnost ovih šećera objašnjava sladak okus meda i njegovu visoku kalorijsku vrijednost. Pčele probavljaju tj. žvaču med onoliko koliko je potrebno kako bi se vlažnost meda spustila sa 70% na 20%. Nakon smanjenja vlažnosti meda pčele ga odlažu u košnice te se ondje nastavlja proces uklanjanja viška vlage u samoj košnici. Pčele smanjuju vlažnost u samim košnicama mašući snažno svojim krilima te raspršuju stanice vode. Na ovaj način mogu ukloniti i do 80% viška vode iz samih košnica. Takav med ostavljaju ondje te nakon određenog vremena kada smatraju da je dovoljno odstajao hermetički zatvaraju ćeliju s medom. Takav med je siguran i može se čuvati dugi niz godina. Proces stvaranja meda u košnicama završava kada se tijekom vremena stvoreni nektar veže karakterističnim enzimima i voskom, te dobije svoj karakterističan izgled i okus.

Tijekom prikupljanja meda pčelari mogu napraviti pogrešku na način da prerano prikupe stvoreni med, tj. prije zatvaranja ćelija od strane pčela. Nakon pravilnog prikupljanja proizvoda potrebno je provesti dekantiranje kako bi se uklonili eventualni ostaci voska. Dekantiranje je postupak koji se koristi za odvajanje smjesa tekućina koje se ne miješaju ili smjese tekućine i čvrste tvari kao što je suspenzija. Općenito, u dekantaciji se tekućina ručno

odvaja od taloga ili druge tekućine koja se ne može miješati zbog različite gustoće. Nakon dekantiranja potrebno je nekoliko dana medu da odstoji te nakon pravilnog dekantiranja proizvod se filtrira te pravilno pakira. Nakon zadnjeg postupka tj. pakiranja med je spreman za odlazak na tržište te je spreman za konzumaciju.

Med kao proizvod ne koristi se samo u prehrani, već ima široku primjenu i u kozmetičkoj industriji. S obzirom na njegova snažna antimikrobna svojstva. Vodikov peroksid, visokoi osmotski tlak, visoka kiselost, prisutnost fenolnih kiselina i flavonoida pridonose antimikrobnim svojstvima. Med inhibira rast bakterija i gljivica smanjujući njihov razvoj na površini kože. Za antigljivična svojstva odgovoran je lizozim na način da sprječava rast gljivica sličnih kvascima. Također je dokazan pozitivan učinak meda na postoperativne rane. Med također ima visok sadržaj ugljikohidrata, voćnih kiselina zaslužan je za njegovo hranjivo i regenerativno djelovanje. Zahvaljujući osmozi potiče se mikrocirkulacija u tkivu kože. Na taj način potiču se i metabolički procesi, što dovodi do eliminacije štetnih metabolita na površini sloja kože, te pojačanih regenerativnih procesa. Osim toga, med ima higroskopna svojstva, apsorbira metabolite i uzrokuje detoksikaciju epidermalnog tkiva te iz tog razloga se događa povećanje napetosti kože, poboljšanje njezine elastičnosti, revitalizacija njezine boje i izgladivanje bora.

1.1.Podjela meda

Med možemo podijeliti prema načinu proizvodnje ili prema podrijetlu. Prema načinu proizvodnje dijelimo med na:

- Med u saću; on se smatra najčišćim i najsigurnijim medom za ljudsku potrošnju jer nakon što ga pčele proizvedu ne bude podvrgnut nikakvom procesu obrade. Ovakva vrsta meda se prodaje u svom izvornom obliku, te ovakav med je prirodno konzerviran od strane pčela.
- Cijeđeni med; med koji se dobiva iz saća jednostavnim procesom cijeđenja bez primjene topline ili mehaničke topline. Na ovaj način prikupljanja meda omogućeno nam je potpuno očuvanje prirodnih sastojaka meda, kao što su različiti vitamini, minerali te aromatske tvari. Očuvanjem svih ovih sastojaka meda rezultira kvalitetnim i nutritivno bogatim proizvodom.
- Vrcani med; vrsta meda koja se dobiva procesom vrcanja. Ovaj proces se odvija u posebnim uređajima koji se nazivaju centrifuga za med. Uređaj djeluje na način da

izdvaja med iz saća uz pomoć centrifugalne sile, te se na ovaj način u potpunosti očuvaju voštane ćelije.

- Filtrirani med; vrsta meda koja prolazi proces filtracije te na taj način se oslobađa čestica voska, peludi te drugih nečistoća. Ova vrsta meda je vrlo bistra i prozirna te kao takva najprivlačnija za tržište. Filtracija meda može biti jednostavna ili vrlo fina, ovisi o tome koliko čestica se želi ukloniti iz meda.

Prema podrijetlu dijelimo med se dijeli na cvjetni med ili med od medljike tj. medun. Dijelimo ih u dvije različite skupine jer za cvjetni med pčele sakupljaju različite vrste nektara s cvijeća, no za dobivanje meda od medljike pčele koriste mednu rosu. U prošlosti se vjerovalo da mednu rosu izlučuju stabla, no u stvarnosti medna rosa dolazi iz sasvim drugog izvora. To je zapravo slatka tekućina koja nastaje na mjestima gdje se hrane insekti kao što su: lisne i štitaste uši, lisne buhe i dr. Ovi insekti za svoju prehranu koriste biljne sokove, no neki dijelovi sokova, najčešće šećeri se izlučuju kao višak. Pri velikom napadu insekata na drva, nastaje i više medne rose. Ona se najčešće pojavljuje u listopadnim šumama posebice kada su noći hladne, a jutro topla. Kod prikupljanja medne rose važno je održavati visoku vlažnost zraka kako bi se spriječilo isparavanje vode i omogućilo pčelama prikupljanje medne rose. S obzirom na zahtijevanje ovakvih uvjeta šumski med ili medun bolji je kada dolazi iz šuma mediteranskog područja.

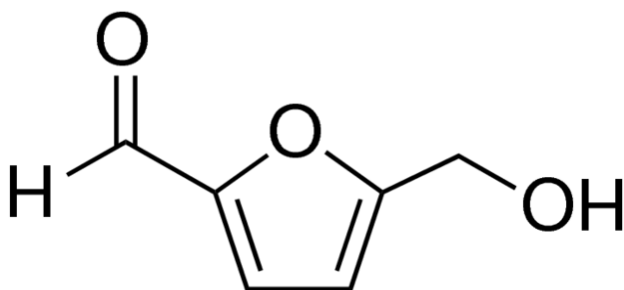
Med od medljike ima diferencirana kemijska i fizikalno-kemijska svojstva te potencijalna funkcionalna svojstva poput antimikrobnih, protuupalnih i antioksidativnih.() S obzirom na svojstva koja posjeduje vrlo je tražen proizvod kako u prehrambenoj tako i u kozmetičkoj industriji. Primijećen je značajan porast interesa za ovom vrstom meda. Ova vrsta meda obično ima tamniju boju u odnosu na druge vrste. Također ima niži sadržaj šećera i više vrijednosti pH, kiselosti, električne vodljivosti, bjelančevina, minerala, fenolnih spojeva i oligosaharida u odnosu na cvjetni med.(1) Ovako bogat med doprinosi ljudskome zdravlju.

1.2. Kemijski sastav meda

Kemijski sastav meda ima vrlo važnu ulogu u antimikrobnim svojstvima te je sastav vrlo bogat.

Kemijski sastav čine:

- **Ugljikohidrati**- ovaj med je koncentrirana otopina šećera koja se većinom sastoji od fruktoze i glukoze. Uglavnom u ovoj vrsti meda u 100 grama proizvoda nalazi se 50-60 g šećera fruktoze i glukoze. Reducirajući šećeri (fruktoza i glukoza), a također i saharoza mogu se koristiti kao pokazatelj zrelosti meda.⁸⁽⁾ Visok sadržaj saharoze može ukazivati na preuranjenu berbu meda, u kojoj saharoza nije u potpunosti pretvorena u glukozu i fruktozu ili otkriti moguće krivotvorenje proizvoda komercijalnim šećernim sirupom tijekom njegove proizvodnje.⁽⁾ Osim saharoze, disaharidi kao što su maltoza izomaltoza, gentiobioza, melibioza i trehaloza, osim disaharida u medu se nalaze i trisaharidi, ali obično se radi o niskim koncentracijama.
- **5-hidroksimetilfurfural** – radi se kemijskom spoju koji se prirodno započinje stvarati nakon određenog vremena kod skladištenog meda. Nakon dugog skladištenja ili termičke obrade dolazi do povećanja koncentracije ovoga spoja. Ovaj spoj se smatra idealnim pokazateljem kvalitete i svježine meda.



Slika 1: Prikaz kemijske strukture 5-hidroksimetilfurfural

- **Voda** -drugi najvažniji sastojak meda od medljike te je zastupljena između 10 i 20 %. Na sadržaj vode u medu mogu utjecati stupanj zrelosti meda u košnici, također botaničko i geografsko podrijetlo, klimatski uvjeti, godišnje doba, uvjeti prerade i skladištenja.⁽¹⁾ Voda također ima vrlo važnu ulogu u medu s obzirom da količina slobodne vode određuje enzimsku aktivnost, preživljavanje i ograničavanje mikroorganizama te kao posljedica svega dolazi do propadanja proizvoda zbog procesa fermentacije. U medu prosječan aktivitet vode iznosi od 0,4 do 0,55 što znači da med ima idealne uvjete za sprječavanje rasta mikroorganizama jer ni jedni ne mogu preživjeti aktivitet manji od 0,6.

- **Organske kiseline**- ova vrsta meda također sadrži i male količine organskih kiselina koje su male molekularne mase. Prisutnost kiselina u medu služi kao pokazatelj kvalitete i svježine samoga meda. Prisutnost kiselina pridonosi osjetilnim svojstvima kao što su miris i okus samoga meda te utječu na miris, okus, boju te pH. Prisutnost kiselina u medu znači i smanjivanje pH samoga meda, što znači da su time poboljšana antimikrobna svojstva, sprječava se ili ograničava rast mikroorganizama u medu. Iako je pH važan parametar u kontroli kvalitete meda, ne postoji zakon koji utvrđuje prihvatljive granice.(1) Najčešće varira između 3,8 i 5,3. Primjer takve kiseline koja se nalazi u ovom medu je limunska kiselina koja se koristi za razlikovanje meda prema njihovom botaničkom i/ili zemljopisnom podrijetlu te je važan spoj za diferencijaciju između cvjetnog meda i meda od medljike s obzirom da ovaj med ima mnogo veću koncentraciju same kiseline. (1)
- **Minerali**- med je također bogat mineralima, te u njemu možemo pronaći čitav niz mineralnih tvari koje su vrlo važne za pravilno funkcioniranje ljudskog organizma. Dominiraju kalij, natrij, kalcij, fosfor, sumpor, klor, magnezij, željezo i aluminij, ali u manjim količinama prisutni su još određeni minerali kao što su bakar, mangan, krom, cink, olovo, arsen, titan, selen i dr. Najzastupljeniji je kalij koji čini od 25% do 50% ukupnog udjela mineralnih tvari.(10) No, nisu svi minerali jednako zastupljeni u svakome medu s obzirom da minerali prisutni u medu izravno predstavljaju profil i količinu ovih elemenata prisutnih u tlu i biljkama gdje pčele skupljaju nektar, mednu rosu ili pelud. (1) Osim toga, botaničko i geografsko podrijetlo meda posebno utječe na sadržaj svakog minerala. (1)
- **Proteini**- oni u medu potječu od pčela, posebno enzima i glavnog proteina matične mliječi. Procjenjuje se da oko 40 do 65% ukupnog dušika u medu pripada proteinima, a ostatak slobodnim aminokiselinama(1). Prolin, kao glavna aminokiselina koja je prisutna u medu odgovara čak i do 90 % ukupnog sadržaja slobodnih aminokiselina te gotovo cjelokupni prolin proizlazi upravo od samih pčela. Prisutnost samoga prolina prikazuje zrelost, no može ukazati i na patvorenje šećera.

- **Vitamini-** u medu od medljike uglavnom se nalaze vitamini B skupine i vitamin C.() Uspoređujući cvjetni med i med od medljike zapažena je znatno manja količina vitamina u medu od medljike. Postoje čimbenici koji mogu pridonijeti gubitku vitamina C u medu kao na primjer proces filtracije te oksidacija vodikovim peroksidom koji je prirodan čimbenik meda.()
- **Enzimi-** jedna od razlika po kojoj se med kao proizvod razlikuje od ostalih proizvoda sličnih medu je to što je bogat enzimima. Med sadrži invertazu, amilazu, glukoza oksidazu, katalazu, kiselu fosfatazu, peroksidazu, esterazu, inulazu te proteolitičke enzime.(10)Neki od enzima koji se nalaze u medu potječu od samih pčela sudjeluju u procesu prerade nektara, a ostali enzimi potječu iz nektara ili rose, a ponekad potječu iz mikroorganizama koji se prirodno nalaze u medu.(10) Enzimi su vrlo važna komponenta meda s obzirom da se aktivnost enzima smatra izvrsnim pokazateljem kakvoće, trajnosti te čuvanja meda.(10)Enzimi zajedno s proteinima u medu daju svojstva koja se umjetnim putem ne mogu proizvesti niti nadoknaditi.

1.3.Svojstva meda:

U svojstva meda možemo ubrojiti fizikalno-kemijska i senzorska svojstva meda. Fizička svojstva uključuju kristalizaciju, viskoznost, električnu vodljivost, higroskopnost i indeks loma svjetlosti. Fizička svojstva zaključna su za otkrivanje patvorenja meda, ali i vrste meda. U senzorna svojstva ubrajamo okus, boju i miris samoga meda, no na ta svojstva utječu mnogi faktori poput botaničkog podrijetla meda i geografskog položaja ispaše pčela.

- **Viskoznost-** to je koeficijent unutarnjeg trenja koje nastaje pri strujanju dva različita sloja tekućine, različitim brzinama. Sama viskoznost ima vrlo važnu ulogu tijekom skladištenja i obrade meda. Na viskoznost meda utječe više faktora; udio vode u medu, vrsta samoga meda, temperatura pri kojoj se med skladišti te broj i veličina kristala koji se nalaze u medu. Količina vode je glavni faktor za viskoznost, povećanjem količine vode viskoznost je manja dok se povećanjem temperature također smanjuje jer ima manje molekularnog trenja i sile unutar meda su manje. Osim vode na viskoznost utječe i količina ugljikohidrata tako da veći udjel šećera doprinosi većoj viskoznosti (10)
- **Električna vodljivost-** to je fizikalno svojstvo meda; dobar je parametar s obzirom da med od medljike ima veću električnu vodljivost za razliku od cvjetnoga meda, što

uvelike olakšava razlikovanje ovih vrsta meda. Ovo svojstvo meda uvelike ovisi o samom sastavu meda tj. o udjelu mineralnih tvari i kiselina u medu.(10) Što je udio veći povećava se i vodljivost.

- **Higroskopnost-** fizikalna osobina meda koja je u ovisnosti o relativnoj vlažnosti zraka i udjelu vode koje na sebe privlači ili otpušta vodu(10). Radi sposobnosti privlačenja vode, u medu se povećava udio fruktoze, što rezultira pojačavanjem higroskopnosti meda. Zbog velike viskoznosti meda gibanje apsorbirane vode s površinskih slojeva u unutrašnjost meda vrlo je sporo tako da se promjene koje nastaju zbog higroskopnosti očituju uglavnom na površini(10). Higroskopnost igra ključnu ulogu i za pčelare i za potrošače meda, jer med u vlažnim uvjetima upija vlagu iz zraka, što povećava udio vode u njemu. To dovodi do veće sklonosti fermentaciji i kvarenju meda, što negativno utječe na njegovu kvalitetu i trajnost.
- **Kristalizacija meda-** ovaj proces je prirodni proces pri kojemu prisutna glukoza u medu prelazi u kristale. Med je prezasićena otopina glukoze i spontano prelazi u stanje ravnoteže kristalizacijom one količine glukoze koja je višak u otopini(10). Sama kristalizacija ovisi o sadržaju šećera, udjelu vode, temperaturi skladištenja, vremenu čuvanja, ali i o vrsti meda. Tijekom procesa kristalizacije voda, koja je prije bila vezana na glukozu, postaje slobodna tako da se povećava sadržaj vode u nekristaliziranim dijelovima meda. Zbog toga med postaje skloniji fermentaciji i kvarenju(10).
- **Indeks loma svjetlosti-** Udjel vode odnosno topljive suhe tvari u medu određuje se mjerenjem indeksa refrakcije. Mjerenje se provodi refraktometrom (to je mjerni instrument kojim se određuje indeks loma svjetlosti. Indeks loma može se odrediti i mjerenjem kuta otklona svjetlosne zrake kada ona prolazi prizmom od materijala kojemu se želi odrediti indeks loma). Mjerenje se provodi najčešće pri 20°C, a dobiveni rezultati se razlikuju ovisno o temperaturi mjerenja(10).
- **Površinska napetost-** Med je proizvod koji ima vrlo malu površinsku napetost što ga čini odličnim sredstvom jer zadržava vlažnost u kozmetičkim proizvodima. Površinska

napetost najviše ovisi o podrijetlu meda. Površinska napetost zajedno s viskoznošću odgovorna je za stvaranje pjene u medu.

- **Boja**- sama boja meda je faktor koji definira vaš identitet i ima veliki utjecaj na prihvaćanje pojedine vrste meda(1). Boja meda može varirati od gotovo bezbojne do smeđe-tamne, a uglavnom ovisi o području s kojega su prikupljeni nektar ili rosa. Boja meda povezana je s njegovim okusom: medovi svijetlih boja imaju blag okus, a tamni medovi imaju izraženiji okus te takav okus može utjecati na potražnju i cijenu samog proizvoda. Tamni tonovi povezani su s većim količinama ukupnih fenolnih spojeva i većom antioksidativnom aktivnošću. Također, tijekom skladištenja meda dulje razdoblje, med prolazi kroz promjene boja koje su rezultat neenzimskih reakcija posmeđivanja, kao što je Maillardova reakcija. Med od medljike je tamniji od cvjetnog meda uglavnom zbog sadržaja minerala, fenola i drugih spojeva.
- **Miris i okus meda**- miris i okus uvelike ovise o biljkama s kojih su pčele prikupljale nektar, pelud ili mednu rosu. Aromatski spojevi prisutni u biljkama ključni su za oblikovanje senzorskih karakteristika mirisa i okusa meda. Smatra se da su miris i okus međusobno povezani te u određenoj mjeri ovise jedan o drugome. Punoća i slatka meda rezultat su udjela ugljikohidrata, aminokiselina, eteričnih ulja i organskih kiselina. Iako med može poprimiti blago kiseli okus, takav je okus obično rezultat fermentacije.

1.4. Kontaminacija meda

Kao i kod većine ostalih proizvoda, tako i kod meda može doći do kontaminacije i krivotvorenja meda i ugroziti kvalitetu, sigurnost i autentičnost samog proizvoda. Med se može kontaminirati različitim tvarima i na različite načine. Kontaminacija može biti različita od kemijske pesticidima, ostacima antibiotika, anorganskim tvarima ili može biti mikrobiološka kontaminacija mikroorganizmima iz tla, nektara, peluda, voska, pčelama te praksama pčelara koji vrši prikupljanje samoga meda iz košnica.

1.4.1. Mikrobiološka kontaminacija

Mikrobiološka opasnost meda je vrlo mala, što proizlazi iz antimikrobne okoline, koja potječe iz sastava, sami sastav mikroflore ovisi o kemijskom sastavu meda, on je sredina

čija fizičko-kemijska svojstva sprječavaju razvoj mikroorganizama. Velika količina šećera uzrokuje visok osmotski tlak, koji ne dozvoljava razmnožavanje mikroorganizama. Pri koncentraciji šećera preko 20% mikroorganizmi se ne razmnožavaju. Jedino se osmofilni kvasci u određenim uvjetima mogu razmnožavati u medu i izazvati fermentaciju proizvoda. Kiseli pH meda, sa druge strane, ometa razmnožavanje većine bakterija, osim acidofilnih, koje se vrlo često pronalaze u medu. Čak i ako prilikom prikupljanja meda u njemu ima heterogene mikroflore, ona za vrijeme čuvanja meda brzo ugiba. U medu također ima osmofilnih kvasaca, spora plijesni vrste *Aspergillus niger*. Osmofilni kvasci kojih ima u medu spadaju u rod *Saccharomyces*, kojima pripada preko 30 vrsta. Glavni izvor kvasaca su nektar, tlo, pčele te zrak. Njihova količina u medu kreće se u širokim granicama-od 1 do 100.000 spora u 10 g meda. Najviše ih je u medu sa povećanom vlažnošću. No unatoč svim uvjetima koji su u medu postoje bakterije koje dobro podnose takve uvjete, najčešće su to bakterije koje imaju mogućnost stvaranja spora. Primjer takve bakterije je *Clostridium botulinum* ili *Bacillus cereus* koje su vrlo opasne za malu djecu koja još nemaju dovoljno razvijen imunološki sustav(1). Bakterijska spora nakon ulaska u ljudsku tijelo prelazi iz oblika spore u aktivni oblik te započinje stvarati toksin koji se stvara u probavnom traktu. Med je poznat kao izvor spora bez prethodno formiranog toksina. Znanstveni odbor Europske unije ispitao je opasnost od *Clostridium botulinum* u medu te je zaključeno da nisu potrebna mikrobiološka ispitivanja meda na ovu vrstu bakterija, kako cvijeta tako i medljike, jer je incidencija *Clostridium botulinum* relativno niska (1).

U svježem medu obično ima mikroorganizama koji su u njega dospjeli zbog aktivnosti pčela (bolesti pčela ili skupljanje peludi sa kontaminirane biljke), ili nepoštivanja higijenskih propisa pri rukovanju medom. Zbog ovih mogućnosti svaki med pa tako i med od medljike mora proći mikrobiološko ispitivanje na različite vrste mikroorganizama.

Prema zakonu Republike Hrvatske tj. prema vodiču za mikrobiološke kriterije za hranu svaki med mora biti ispitan na sljedeće mikroorganizme:

Tablica 1. Preporučeni parametri u medu prema Mikrobiološkom kriteriju za hranu

Hrana	Preporučeni parametri	Plan uzorkovanja		Kriteriji
		n	c	
Med	Aerobne mezofilne bakterije	5	2	m= 10 ³ cfu/g M= 10 ⁴ cfu/g
	<i>Enterobacteriaceae</i>	5	1	m= 10 cfu/g M= 10 ² cfu/g
	Sulfitreducirajuće klostridije	5	0	M= 10 cfu/g
	Kvasci i plijesni	5	1	m= 10 cfu/g M= 10 ² cfu/g

1.4.2. Ostali oblici kontaminacije

Osim mikrobiološke kontaminacije, može doći i do različitih oblika kontaminacije. Kontaminacije mogu također biti:

- **Kontaminacija teškim metalima**- oni se često nalaze u vodi, zraku, tlu te su na taj način pčele koje prikupljaju med izložene čestima koje im s lakoćom zaostaju na tijelu i dlakama.
- **Kontaminacija pesticidima**- postoje situacije u kojima se pčele direktno špricaju pesticidima kako bih se kontrolirale određene bolesti pčela. Izloženost pčela pesticidima koji se nalaze u prirodi smatra se globalni problem te je postao zabrinjavajući problem.

1.5. Antimikrobna svojstva meda

Antimikrobna aktivnost meda uglavnom se pripisuje njegovoj kiselosti, osmolarnosti i stvaranju vodikovog peroksida putem enzima glukoza oksidaze. Vodikov peroksid kao snažno oksidirajuće sredstvo inhibira rast mnogih mikroorganizama aktivirajući čimbenike nuklearne transkripcije koji aktiviraju gene odgovorne za odgovor na upalu koje stvaraju bakterije. Ovaj enzim proizvodi glukonsku kiselinu iz glukoze. Kao nusprodukt reakcije nastaje vodikov peroksid. Osim vodikovog peroksida, još jedna tvar s antimikrobnim učinkom je peptid defenzin-1, koji inhibira rast bakterija, a uglavnom se nalazi u matičnoj mliječi. Sadržaj defenzina-1 u medu može varirati, ali određena količina uvijek mora biti prisutna u medu. Ako se defenzin-1 ne nalazi u određenom medu ili ako je prisutan u vrlo niskim koncentracijama, velika je vjerojatnost da je med krivotvoren ili da je njegova vrijednost smanjena nepravilnom preradom.

2.MATERIJALI I METODE

2.1.Materijali

Uzorci meda prikupljali su se u privatnim obrtima za uzgoj meda ili u trgovinama na području Bosne i Hercegovine te jedan uzorak s otoka Krka tijekom jeseni 2023. godine. Svi prikupljeni uzorci deklarirani su kao med od medljike.

2.1.1.Laboratorijski pribor i oprema

Laboratorijska oprema koja je potrebna za napraviti kvalitetnu mikrobiološku analizu je: analitička vaga, sterilne mikrobiološke ušica, sterilne plastične epruvete, plamenik, sterilni štapić za uzimanje brisa, L- štapić, Petrijeve zdjelice, fiziološka otopina itd.

2.1.2.Hranjive podloge

Hranjive podloge služe za uzgoj mikroorganizama u laboratorijskim uvjetima jer sadrže sve što je potrebno za rast i razvoj mikroorganizama.

Hranjive podloge koje su korištene u:

- **Sabouraud agar** – radi se o agaru koji je pogodan za uzgoj i diferencijaciju gljiva. Uglavnom agar se sastoji od dekstroze, peptona i agara, pH agara je blago kiseli s obzirom da gljive podnose kisele uvjete.
- **Mueller Hinton agar**- radi se o agaru koji se koristi u mikrobiologiji kako bih se ispitivala osjetljivost bakterija na određene antibiotike. Uglavnom se sastoji od škroba, govedeg ekstrakta, kazeina i agara. Prisutnost škroba osigurava apsorpciju toksičnih čimbenika tijekom rasta mikroorganizama.(9)
- **UTI agar**- radi se o agaru koji se u mikrobiologiji koristi za identifikaciju mikroorganizama koji uzrokuju infekcije mokraćnog sustava. Uglavnom se sastoji od peptona, kromogene mješavine te agara. Omogućuje široku diferencijaciju mikroorganizama, npr. enterokoka, koliformnih organizama, *E. coli*, *S. aureus*, itd.

- **MRS agar-** radi se o agaru koji je dizajniran za poticanje rasta "bakterija mliječne kiseline" posebno za laktobacile.
- **VRBG agar-** agar se koristi za dokazivanje i određivanje broja pripadnika porodice *Enterobacteriaceae* u hrani, u ovom slučaju u medu.
- **TSN agar-** agar koji se koristi za dokazivanje i određivanje broja *C. perfringens*.

2.2. Metode rada

2.2.1. Prikupljanje i pohrana uzoraka za analizu

Med se prikupljao s različitih geografskih područja Sjevernog Jadrana i područja Hercegovine. Uzorci su prikupljeni od lokalnih pčelara s tih područja. Nakon prikupljanja meda, uzorak je prebačen u sterilne staklene posude te je čuvan na adekvatnim uvjetima do trenutka analize. Prije same analize, svaki uzorak meda je potrebno pripremiti.

2.2.2. Priprema uzoraka meda za analizu

Suspenziju meda je potrebno pripremiti jer se suspenzija koristi u daljnjem ispitivanjima. Priprema se na način da izvažemo zadanu masu svakoga meda, u ovom slučaju radilo se o masi 5 grama svakoga uzorka. Uzorcima se dodaje fiziološka otopina te zatim je potrebno homogenizirati fiziološku otopinu i med. Nakon uspješne homogenizacije uzorci se odlažu u termostate koji su podešeni na $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ tijekom 30 minuta. Nakon tog perioda uzorci meda spremni su za daljnju mikrobiološku analizu.

2.2.3. Određivanje zastupljenosti vode, električne vodljivosti, slobodne kiselosti i pH vrijednosti

2.2.3.1. Određivanje udjela vode u medu

Refraktometrom se određuje indeks refrakcije, pri stalnoj temperaturi od 20°C. Nakon određivanja indeksa refrakcije, računa se količina vode (% m/m). Za taj račun se koriste podaci uz pomoć tablice za proračun udjela vode u medu prema IHC metodama (15).

2.2.3.2. Određivanje električne vodljivosti

20 g meda se otopi u destiliranoj vodi, prebaci u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni do oznake destiliranom vodom. 40 mL pripremljene otopine ulije se u posudu i stavi u vodenu kupelj temperature 20°C. Elektrode se isperu ostatkom otopine, te se potom uranjaju u otopinu uzorka. Pri 20°C očita se vrijednost električne provodnosti u mS cm⁻¹ (15).

2.2.3.3. Određivanje slobodne kiselosti

Slobodna kiselost predstavlja sadržaj slobodnih kiselina u medu. Određuje se titracijom otopine uzorka s 0,1 M otopinom natrijevog hidroksida do pH 8,3. Rezultati su izraženi u miliekvivalentima (mEq/kg) (15).

2.2.3.4. Određivanje pH vrijednosti

Kiselost meda mjerimo lako dostupnim pH metrom. Na temelju provedenih analiza meda pH vrijednost kreće se od 3.98 do 4.47, što je u skladu sa s međunarodnim standardima.

2.2.4. Mikrobiološka analiza

Mikrobiološka analiza uzoraka meda provedena je prema Vodiču za mikrobiološke kriterije za hranu (2009.). Mikrobiološka analiza provedena je na sve mikroorganizme iz porodice enterobacteriaceae, laktobacile te također na prisutnost kvasaca i plijesni.

2.2.4.1. Određivanje ukupnog broja aerobnih mezofilnih bakterija

Iz početne suspenzije potrebno je uzeti 1 mL, te izliti taj mililitar u Petrijevu zdjelicu i prelići još s 10 mL rastopljenog i ohlađenog agara s kvaščevim ekstraktom, nakon što se agar stisne potrebno je inkubirati na temperaturi od $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ tijekom 48-72 sata. Nakon vremena inkubacije potrebno je pregledati podloge i prebrojati sve porasle kolonije na agarima. Kako bi lakše identificirali porasle bakterije u ispitivanim medunima istovremeno nasadeni i na UTI kromogeni agar (100 μL)

2.2.4.2. Određivanje ukupnog broja kvasaca i plijesni

Za određivanje ukupnog broja kvasaca i plijesni potrebno je pripremiti početnu suspenziju, te zatim prenijeti 1 mL pripremljene suspenzije u Petrijeve zdjelice. Nakon pripreme zdjelica, prelijevamo u njih 15 mL Sabouraud agara. Potrebno je pustiti agar nekoliko minuta, kako bih se skrutnuo. Agar s suspenzijom puštamo na $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ tijekom 5 dana. Kolonije koje su porasle se broje nekoliko puta. Broje se 3., 4. i 5. dana inkubacije.

2.2.4.3. Dokazivanje enterobakterija u medu

Porodica *Enterobacteriaceae* je vrlo aktivna vrsta bakterija te imaju nekoliko zajedničkih karakteristika, a to su: fermentacije glukoze, redukcija nitrata te nemaju citokrom oksidazu. Za dokazivanje je potrebno pripremiti početnu suspenziju, koju nasadimo na VRBG agar (100 μL) te inkubiramo na 37°C kroz 24 sata. Nakon vremena inkubacije podloge se pregledavaju te traži karakterističan porast za ove bakterije. Karakteristična boja kolonija je ružičasta do crvena ili tamnoljubičasta te mogu imati halo zonu. Nasumično se izabire 5 kolonija koje se zatim presađuju na agar te ponovno inkubira 24 sata na 37°C . Nakon inkubacije odrade se potvrdni testovi koji su u ovom slučaju OF test te test oksidaze.

2.2.4.4. Dokazivanje sulfitreducirajućih klostridija u medu

Ova grupa bakterija ima mogućnost stvaranja sulfita, te su ove bakterije široko rasprostranjene u okolišu zbog mogućnosti stvaranja spora koje vrlo uspješno preživljavaju vanjske nepovoljne uvjete. Tijekom procesa dokazivanje ovih bakterija potrebno je početnu suspenziju zagrijati na 75°C na način da se uroni epruveta u vodenu kupelj nekoliko sekundi te je potrebno pričekati kako bih se suspenzija ohladila. Suspenzije koje se nalaze u zdjelici je potrebno prelići željezo sulfidnim agarom te pričekati kako bih se agar stisnuo. Takav agar se premještana u Gas Pak sustav za uzgoj anaerobnih bakterija te inkubiramo na 37°C tijekom 24 sata. Karakteristične

kolonije za ove bakterije su crne sa ili bez halo zone. Nasumično izabranih 5 kolonija se potvrđuju pomoću biokemijskim testovima.

2.2.4.5. Dokazivanje lactobacila

Za izolaciju lactobacillusa potrebno je nasaditi pripremljeni uzorak meda u MRS bujon, koji je zatim inkubiran na $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ tijekom 24-48 sata. Nakon inkubacije 100 μL bujona presadimo na MRS agar te inkubiramo na $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ tijekom 48-72 sata u mikroaerofilnim i anaerobnim uvjetima. Iz poraslih kolonija su pripremljene mikroskopski preparati bojani po Gram-u kao i testovi katalaze, koagulaze i oksidaze.

2.2.5. Identifikacija bakterija pomoću MALDI_TOF uređaja

Sve ove bakterije su identificirane pomoću uređaja MALDI-TOF MS čime je sama analiza puno brže odrađena te je povećana pouzdanost same analize uzoraka. Ovaj uređaj se temelji na masenoj spektrometriji, to je metoda kod koje se uz pomoć lasera ioniziraju i stvore nabijene molekule koje su zatim usmjerene kroz električno polje do detektora i koji u konačnici mjeri omjer između mase (m) i naboja (z) određene molekule.(11) Ova vrsta uređaja ima široku primjenu u mikrobiološkoj dijagnostici. spektri proteina uglavnom prikazuju m/z vrhove koji odgovaraju ribosomskim proteinima, s obzirom da su oni najbrojniji u bakterijskim stanicama. Kod pripreme uzorka koristi se matriks otopina koja služi za ionizaciju proteina te omogućuje stvaranje spektra proteina sa specifičnim rasponom molekulskih težina. Izmjereni signali masenog spektra uspoređeni su s spektrima referentnih bakterija iz baze podataka samoga uređaja. Spektar dobivenih masa peptida jedinstven je za svaki pojedini protein poput otiska prsta.(12) Na prikazanom spektru nalazi se brojčana vrijednost ioniziranih molekula na y -osi, dok je na x -osi prikazan omjer m/z . Bio markeri koje detektiramo uključuju ribosomske proteine, DNA i RNA.(12) U više studija dokazano je da suspenzije bakterijskih kultura analizirane MALDI-TOF uređajem prikazuju puno više podataka u smislu povećanja broja m/z vrhova, kao i kvalitetu spektra za razliku od čistih kultura na solidnom mediju uz ekstrakciju proteina. Spektar je analiziran i uspoređen s referentnim spektrom iz baze podataka uređaja kao i s drugim kontrolnim sojem, odabirom "najčišćeg" (bez šuma) spektra, s rezultatom najmanje ≥ 80 .

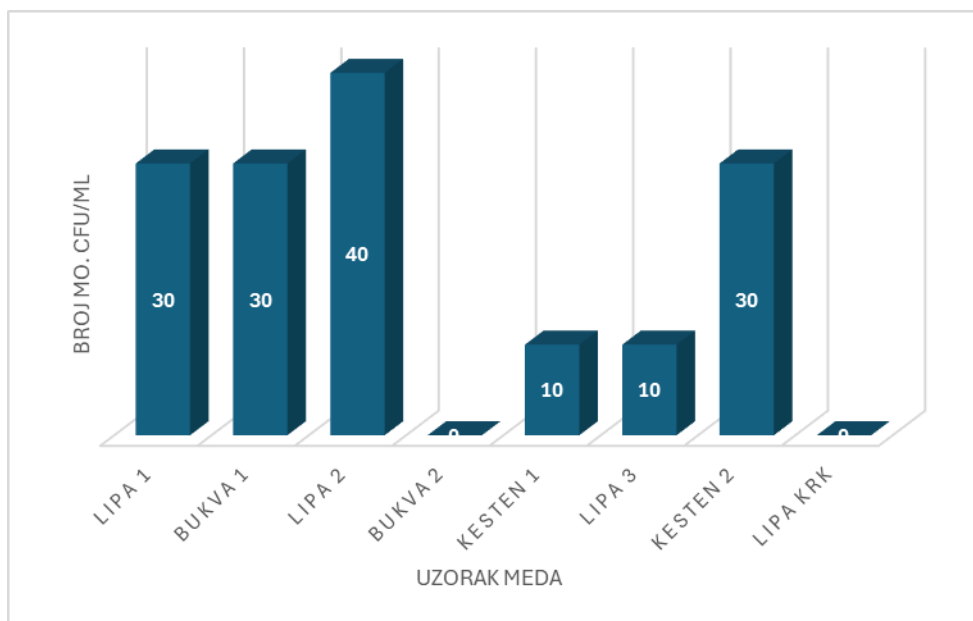
3.Rezultati

Tablica 2: Prikaz fizikalno- kemijskih svojstava uzoraka meda

Fizikalno-kemijska svojstva								
	Lipa	Bukva	Lipa 2	Bukva 2	Kesten	Lipa 3	Kesten 2	Lipa Krk
Voda(%)	14,70	14,5	14,55	14,60	18,60	15,50	17,50	16,20
Električna	0,93	1,65	1,15	1,25	1,40	1,21	1,62	1,52
Vodljivost								
mS/cm								
Slobodna	30	35	31	33	30	36	35	32
kiselost								
MEQ/Kg								
pH	4,97	5,52	5,15	5,43	5,1	4,93	5,41	5,22
Geografsko	43° 20' 58"	43° 32'	43°27'15.	43° 49' 14.3"	43° 20' 58"	43° 20'	43° 39' 15.9"	45°12'32.5"N
podrijetlo	N, 17° 48' 45" E	52.98" N, 17° 25' 56.79" E	3"N 17°31'05.	N, 17° 36' 40.5"	N, 17° 48' 45"	58" N, 17° 48'	N, 17° 57' 38.6"	14°34'14.1"E

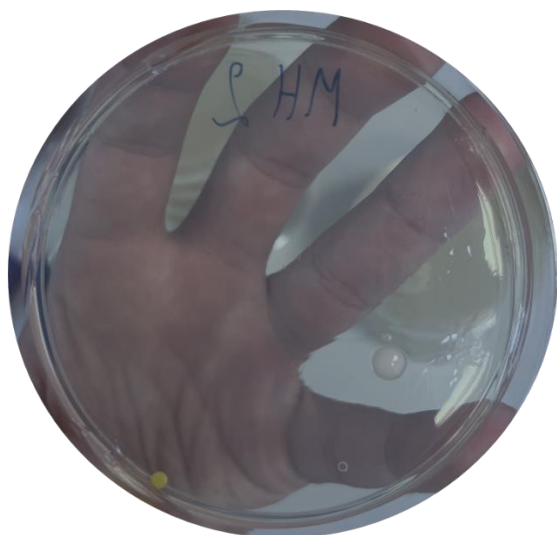
U tablici 2. su prikazani rezultati fizikalno-kemijskih analiza. Pregledom rezultata utvrđeno je da sadržaj vode meda je između 14,5% do 18,6%. Električna vodljivost uzoraka bila je u rasponu od 0,93 mS/cm do 1,65 mS/cm. Slobodna kiselost iznosila je između 30 MEQ/Kg i 36 MeQ/Kg, dok se pH vrijednost kretala od 4,93 do 5,52. Sve dobivene vrijednosti su u skladu s Vodićem za mikrobiološke kriterije za hranu. Povećana električna provodljivost ukazuje da se radi o medunima.

3.1. Dokazivanje prisutnosti bakterija, kvasaca i plijesni

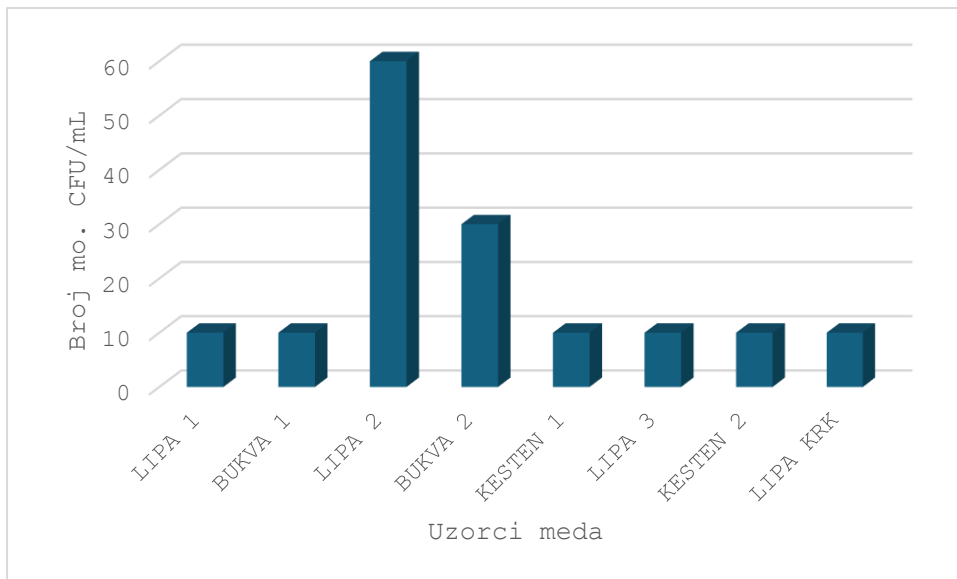


Grafikon 1. Ukupan broj aerobnih mezofilnih bakterija. Rezultat je prikazan kao CFU/mL

U grafikonu 1. prikazani su dobiveni rezultati koji prikazuju porast broja kolonija različitih uzoraka meda na agaru s kvašćevim ekstraktom. Rezultati pokazuju da je najveći broj kolonija narastao na podlogama uzoraka meda 3. i 4. te se radi o broju 40 CFU/mL.



Slika 1: Prikaz porasta kolonija na agaru s kvašćevim ekstraktom.



Grafikon 2. Broj poraslih kolonija kvasaca i plijesni na Sabouroud agaru po mL uzorka.

Rezultat je prikazan kao broj kolonija kvasaca i plijesni po mL uzoraka

U grafikonu 2. prikazani su dobiveni rezultati koji prikazuju porast broja kolonija različitih uzoraka meda na Sabouroud agaru. Rezultati pokazuje da je u uzorku meda broj 3. poraslo najviše kolonija po mililitru. Rezultati također prikazuju da je dokazana prisutnost kvasaca i plijesni u svim uzorcima meda

3.2. Dokazivanje prisutnosti *Lactobacillus* -a

Uzorci meda su nasadeni bili također i na MRS agaru kako bi se dokazala prisutnost i *lactobacillusa* u uzorcima meda. Na podlogama je došlo do porasta, bakterija, ali porast nije bio karakterističan za laktobacile, čak ni nakon produžene inkubacije. Porasle kolonije su presađene i poslane na identifikaciju pomoću MALDI TOF analize.



Slika 2: Prikaz porasta kolonija na MRS agaru

Tablica 2: Rezultati identificiranih bakterija poraslih na MRS agaru pomoću MALDI-TOF analize

Uzorak meda	Identificirana bakterija
LIPA 1	Nema porasta
BUKVA 1	Nema porasta
LIPA 2	Nema porasta
LIPA 3	<i>Bacillus licheniformis</i>
BUKVA 2	<i>Enterobacter hormaechei</i>
KESTEN 1	<i>Bacillus licheniformis</i>
LIPA 4	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
BUKVA 3	<i>Bacillus cereus</i>
KESTEN 2	<i>Staphylococcus epidermis</i>
LIPA KRK	<i>Staphylococcus epidermis</i>

Tablica 2: prikazuje da uzorcima meda 1. 2. i 3. nema porasta bilo kakvih bakterija. U uzorcima se najviše nalaze bakterije iz roda *Bacillus* te iz roda *Staphylococcus*.

4.RASPRAVA

Med je jedna od najstarijih proizvoda koji se koristi u ljudskoj prehrani već mnogo godina unazad. Zbog svojeg bogatog sastava koristio se i u tradicionalnoj medicini. Prije stavljanja meda na tržište kako bih bio ispravan za konzumaciju kod ljudi mora zadovoljiti određene uvjete. Zadatak ovog završnog rada bio je provjeriti jesu li uzorci meda koji su bili

prikupljeni s različitih područja mikrobiološki ispravni za tržište. Mikroorganizmi koji se mogu naći u medu potječu iz različitih izvora, mogu potjecati iz biljke, pčela, itd. Većina primarnih infekcija meda dolazi iz samih pčela tijekom procesa prerade.

U Prethodnim poglavljima rada opisane su prirodne prepreke meda koje onemogućavaju rast i razvoj. Prepreka je u fizikalnim i kemijskom sastavu meda koji ima vrlo važan učinak na mikrobiologiju samoga meda. Visoki sadržaj ugljikohidrata, kiseli pH, neki enzimi s antimikrobnim svojstvima te niska razina vlage su upravo razlog zašto je med vrlo nepovoljan medij za rast i razvoj većinu mikroorganizama. Unatoč tim nepovoljnim uvjetima, postoje mikroorganizmi kao i u ostalim ekosustavima koji mogu preživjeti u tim uvjetima i normalno rasti i razmnožavati se. Jedan od primjera bakterija koje se mogu razvijati u nepovoljnim uvjetima su bakterija iz roda *Lactobacillus*. On se dokazuju na MRS agaru te se inkubiraju u anaerobnim i mikroaerofilnim uvjetima. Njihova prisutnost u medu je zapravo poželjna zbog svojih mogućnosti terapijskih učinaka. Ovaj rod bakterija se obično kod ljudi i životinja koristi kao probiotik. U ovom istraživanju se očekivala prisutnost laktobacila, no nije dokazana niti u jednom uzorku, kao odgovor na taj problem ima više mogućnosti. Smatra se kako bakterije koje su bile prirodno prisutne u medu su ušle u stanje stresa, te nisu mogle u tako kratkom vremenu razviti se i razmnožiti u tolikom broju kako bih postale uočljive. Mogući razlozi izostanka rasta laktobacila su i uvjeti inkubacije i sadržaj ugljikohidrata u podlozi. Potrebna je dodatna modifikacija metode dokazivanja. U uzorcima meda smo određivali broj aerobno mezofilnih bakterija; koje u med dospijevaju iz probavnog sustava pčela ili zbog nehigijenskog rukovanja s medom (prašinom ili prljavim posuđem). Ova vrsta bakterija se razvija pri temperaturama između 20°C i 45°C uz prisustvo kisika. Njihova idealna temperatura je također 37°C što znači da i ovaj rod bakterija pripada u patogene bakterije što znači da postoji mogućnost razvoja bolesti kod ljudi (14). Najčešće u ovim nepovoljnim uvjetima preživljavaju kvasci i plijesni. Osmotolerantni kvasci u medu mogu uzrokovati fermentacijske procese. Ovi kvasci imaju mogućnost rasta i razmnožavanja u uvjetima niskog pH i pri visokim koncentracija šećera, a posebno imaju pogodnu mogućnost razvijanja kad je aktivnost vode u medu visoka. U takvim uvjetima kvasci se mogu umnožiti i započeti fermentaciju glukoze, stvarajući alkohol i ugljikov dioksid. Prilikom procesa fermentacije koja se događa uz prisutnost kisika dolazi od stvaranja octene kiseline što rezultira povećanjem kiselosti samoga meda, čineći ga neprikladnim za konzumaciju. Stoga, osmofilni kvasci mogu utjecati na fermentaciju i kvarenje meda. Sama fermentacija predstavlja veliki problem u skladištenju meda jer ovim procesom dolazi do promjene sastava samoga meda i narušavanja njegovog izgleda i same kvalitete proizvoda.

Kvasci mogu potjecati iz različitih izvora poput nektara, pčela, košnica ili opreme korištene tijekom proizvodnje. Primjer plijesni koja se pojavljuje u medu je *Mucor* koja ne izaziva infekcije kod većine ljudi, već izaziva infekcije samo kod onih ljudi koji imaju oslabljeni imunostni sustav zbog nekih drugih težih bolesti. Pojavnost plijesni u medu ukazuje da ne higijenu u samim košnicama, prostorijama za vrcanje i skladištenje meda. U našem ispitivanju nije dokazana prisutnost anaerobnih sulfid reducirajućih klostridija, niti enterobakterija u ispitivanim uzorcima meda. U jednom uzorku, medun bukve dokazana je prisutnost gram negativne bakterije *Enterobacter hormaechi*, koja iako je riječ o enterobakteriji može dugo vremena preživjeti na suhim površinama.

Zaključno, fizikalno-kemijska i mikrobiološka analiza ispitivanih uzoraka meduna ukazuje na poštivanje dobre proizvođačke prakse. Potrebno je dodatno modificirati metodu dokazivanja laktobacila koje u ovom radu nismo dokazali u ispitivanim uzorcima meduna.

5. Zaključak

S obzirom na dobivene rezultate u ovome radu može se zaključiti da ispitivani uzorci meduna koji su podvrgnuti ispitivanju zadovoljavaju mikrobiološke kriterije i pogodni su za ljudsku potrošnju.

Kao zaključak samoga rada, mikrobiološka analiza neophodna je za osiguranje sigurnosti i kvalitete meda. Pravilnim radom i redovitom provjerom moguće je spriječiti neželjene fermentacijske procese i kvarenje meda, čime se produžuje njegov rok trajanja i osigurava očuvanje nutritivnih svojstava, čineći ga sigurnim za potrošače.

6. Životopis

Osobni podaci:

Ime i Prezime: Bruno Požega

Adresa: Bjanižov 17, Omišalj

E-mail: brunop0910@gmail.com

Državljanstvo: hrvatsko

Datum rođenja: 09.10.2002.

Mjesto rođenja: Rijeka, Hrvatska

Spol: M

Obrazovanje

Rujan 2009. – Lipanj 2017. -Osnovna škola Omišalj

Rujan 2017- Lipanj 2021. Medicinska škola u Rijeci – sanitarni tehničar

7. Literatura

1. Seraglio SKT, Silva B, Bergamo G, Brugnerotto P, Gonzaga LV, Fett R, Costa ACO. An overview of physicochemical characteristics and health-promoting properties of honeydew honey. *Food Res Int.* 2019 May;119:44-66. doi: 10.1016/j.foodres.2019.01.028. Epub 2019 Jan 16. PMID: 30884675.
[Citirano 28.08.2024.]

Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996919300286>

2. ZErban T, Shcherbachenko E, Talacko P, Harant K. The Unique Protein Composition of Honey Revealed by Comprehensive Proteomic Analysis: Allergens, Venom-like Proteins, Antibacterial Properties, Royal Jelly Proteins, Serine Proteases, and Their Inhibitors. *J Nat Prod*. 2019 May 24;82(5):1217-1226. doi: 10.1021/acs.jnatprod.8b00968. Epub 2019 Apr 17. PMID: 30995037 [Citirano 29.08.2024.]
Dostupno na: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jnatprod.8b00968>
3. Kurek-Górecka A, Górecki M, Rzepecka-Stojko A, Balwierz R, Stojko J. Bee Products in Dermatology and Skin Care. *Molecules*. 2020 Jan 28;25(3):556. doi: 10.3390/molecules25030556. PMID: 32012913; PMCID: PMC7036894. [Citirano 28.08.2024.]
Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32012913/>
4. <https://maeshoney.com/en/making-honey/>
[Citirano 28.08.2024.]
5. <https://www.geeksforgeeks.org/decantation/>
[Citirano 28.08.2024.]
6. <https://www.farmecochem.hr/sto-je-to-medna-rosa/>
[Citirano 28.08.2024.]
7. <https://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/mikrobiologija-meda>
[Citirano 28.08.2024.]
8. <https://agrosmart.net/2023/04/21/mikrobiologija-meda-i-proizvoda-od-meda/>
[Citirano 28.08.2024.]
9. http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=Cm0337&c=UK&lang=EN
[Citirano 09.09.2024.]
10. Vahičić N, Matković D. Kemijske, fizikalne i senzorske karakteristike meda. 2009. Dostupno na: <https://www.scribd.com/document/130527525/Kemijske-Fizikalne-i-Senzorske-Karakteristike-Meda>
[Citirano 09.09.2024.]
11. Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Virdi JS. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front Microbiol*

[Internet]. 2015 Aug 5 [cited 2022 Jul 20];6. Available from:
<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2015.00791/abstract>

[Citirano 13.09.2024.]

- 12.** Topić Popović N, Kazazić SP, Bojanić K, Strunjak-Perović I, Čož-Rakovac R. Sample preparation and culture condition effects on MALDI-TOF MS identification of bacteria: A review. *Mass Spectrom Rev.* 2021 Oct 13;mas.21739. [Citirano 13.09.2024.]
- 13.** Goli Mehdi Abadi ME, Hosseini-Safa A, Habibi S, Dehghan M, Forouzani-Moghaddam MJ, Oshaghi M. Isolation and characterization of the lactobacillus strain from honey and its probiotic properties. *Iran J Microbiol.* 2023 Jun;15(3):439-447. doi: 10.18502/ijm.v15i3.12905. PMID: 37448675; PMCID: PMC10336281. [Citirano 13.09.2024.]
- 14.** <https://www.zzzdnz.hr/hr/o-nama/rjecnik-pojmova/960>
[Citirano 13.09.2024]
- 15.** Bogdanov S. Harmonizirane metode međunarodne komisije za med 2009. Dostupno na: <https://ihc-platform.net/ihcmethods2009.pdf>
[Citirano 13.09.2024.].