

Antimikrobni učinak gljiva

Brnobić, Filip

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:184:530295>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

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





SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI

SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINA

Filip Brnobić

ANTIMIKROBNA AKTIVNOST GLJIVA

Diplomski rad

Rijeka, 2019



SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI

SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINA

Filip Brnobić

ANTIMIKROBNA AKTIVNOST GLJIVA

Diplomski rad

Rijeka, 2019

Mentorica rada: prof. dr. sc. Maja Abram, dr. med

Diplomski rad ocijenjen je dana _____ na Medicinskom fakultetu u Rijeci,
pred povjerenstvom u sastavu:

1. prof.dr.sc. Darinka Vučković, dr. med.
2. izv.prof.dr.sc. Ivana Gobin, dipl.san.ing.
3. izv.prof.dr.sc. Marina Bubonja Šonje, dr. med.

Rad sadrži **48** stranica, **13** slika, **3** tablice i **45** literaturnih navoda.

ZAHVALA

Prije svega, htio bih se zahvaliti svojoj mentorici, prof. dr. sc. Maji Abram, dr. med, na susretljivosti, velikoj pomoći i usmjeravanju prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se Gabrijeli Begić, mag. med. lab. diag. koja mi je mnogo pomogla prilikom izrade praktičnog, laboratorijskog dijela ovog istraživanja na Zavodu za mikrobiologiju i parazitologiju. Također, hvala izv. prof. dr. sc. Gordani Čanadi Jurešić, dipl. ing. preh. teh. na pomoći prilikom postupka ekstrakcije.

Zahvalio bih se i članovima Udruge gljivara „Ožujka“ koji su mi pomogli pribaviti gljive, te determinatorima udruge koji su izvršili stručnu determinaciju gljiva.

Zahvaljujem se svim kolegama i prijateljima koji su mi uljepšali ovih šest godina studiranja i učinili da uz zabavu i druženje prođu prebrzo.

I na kraju posebno se zahvaljujem svojoj obitelji na nesebičnoj i velikodušnoj pomoći, te razumijevanju i podršci za vrijeme trajanja studija.

Popis skraćenica i akronima

ATCC – eng. American Type Culture Collection

ESKAPE - *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*,
Acinetobacter, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter*

CP5, CP8 - capsular polisacharide 5 ili 8

TSST-1 – eng. Toxic shock syndrome toxin 1

MRSA - meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus*

CA-MRSA – Community Acquired MRSA

VRE – vankomicin rezistentni enterokok

DMSO - Dimetil sulfoksid

OD - Optička gustoća (OD – engl. Optical density)

CFU – eng. Colony – forming units

MIK - Minimalna inhibicijska koncentracija

MBK - Minimalna baktericidna koncentracija

HPLC - tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (od engl. High performance liquid chromatography)

Sadržaj:

1.	Uvod i svrha rada	1
1.1.	Gljive	3
1.1.1.	Velika sunčanica (<i>Macrolepiota procera</i>)	4
1.1.2.	Paprena mliječnica (<i>Lactarius piperatus</i>)	6
1.1.3.	Prosenjak (<i>Hydnum repandum</i>).....	8
1.1.4.	Maglenka (<i>Clitocybe nebularis</i>).....	9
1.1.5.	Mrka trubača (<i>Craterellus cornucopioides</i>).....	11
1.2.	Rezistencija bakterija na antibiotike.....	12
1.2.1.	<i>Escherichia coli</i>	14
1.2.2.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
1.2.3.	<i>Staphylococcus aureus</i>	15
1.2.4.	<i>Enterococcus faecalis</i>	16
2.	MATERIJALI I POSTUPCI.....	17
2.1.	Materijali	17
2.1.1.	Laboratorijski pribor i instrumenti	17
2.1.2.	Gljive.....	17
2.1.3.	Hranjive podloge i mediji.....	18

2.1.4.	Bakterijski sojevi.....	18
2.2.	Postupci	19
2.2.1.	Ekstrakcija.....	19
2.2.2.	Priprema bakterijske suspenzije	21
2.2.3	Difuzijska metoda za određivanje antimikrobne aktivnosti gljiva.....	21
2.2.4	Dilucijska metoda za određivanje antimikrobne aktivnosti gljiva.....	23
3	Rezultati	26
3.2	Dobivanje suhog ekstrakta gljiva	26
3.3	Rezultati difuzijske metode	27
3.4	Rezultati dilucijske metode	28
4	Rasprava	31
5	Zaključak.....	36
6	Sažetak	38
7	Summary	40
8	Literatura	42
9	Životopis.....	48

1. Uvod i svrha rada

Procjenjuje se da na Zemlji ima oko 140000 vrsta gljiva, od kojih je poznato svega oko 22000, a stručno i znanstveno je istražen samo mali postotak (oko 5%). Gljive od davnina imaju važnu ulogu u različitim aspektima našeg života. Jestive gljive se koriste u prehrani i predstavljaju važan dio niskokalorične dijeta. U mitologiji su gljive uvelike povezane s patuljcima, vilama i ostalim mitskim bićima. Neke gljive su dio religijskih obreda zbog svojih psihoaktivnih svojstava. Isto tako vrlo važan dio mikologije su i nejestive, otrovne gljive koje mogu biti smrtno opasne.

Razlog česte upotrebe gljiva baziran je na tri glavne činjenice: prvo, koriste se u prehrani zbog njihove visoke prehrambene vrijednosti (bogate su vodom, mineralima, proteinima, esencijalnim aminokiselinama, vlaknima i ugljikohidratima) i niske kaloričnosti (zbog niskog sadržaja masti imaju malo kalorija); drugo, plodna tijela nekih vrsta su izuzetno cijenjene kulinarske delicije (djeluju kao pojačivači okusa i arome kada se koriste s drugom hranom); i treće, gljive se mogu koristiti u medicinske svrhe (zbog sadržaja vitamina D mogu se koristiti kao dodatak za liječenje bolesti kostiju, npr. rahitisa; snižavaju kolesterol, utječu na regulaciju tlaka i šećera u krvi, itd.). Njihov povoljan utjecaj na zdravlje poznat je već tisućama godina.

(1)

Gljive koje se uzgajaju, kao i one divlje, jestive i nejestive, vrste sadrže veliki broj različitih biomolekula s nutritivnim, ali i potencijalnim, medicinskim značenjem. Plodišta gljiva, micelij i spore sadrže bioaktivne tvari koje mogu imati pozitivan utjecaj na ljudsko zdravlje djelujući imunomodulatorno, protektivno na kardiovaskularni sustav i jetru, antidijabetički, antifibrotski, antioksidacijski, protuupalno, antitumorski, antivirusno i antibakterijski (2).

Poznato je da su gljive izvor prirodnih antibiotika. Kako bi preživjele i opstale u svome prirodnom okruženju moraju se štititi protiv uzročnika bolesti, pa neophodno trebaju posjedovati/producirati antibakterijske i antifungalne supstancije. Najpoznatiji, i prvi, otkriveni prirodni antibiotik, penicilin, produkt je gljive, plijesni iz roda *Penicillium*. Manje je poznato da i više, mesnate gljive mogu producirati jedan ili više različitih spojeva, niske ili visoke molekularne težine, koji pokazuju antimikrobni učinak. Spojevi niske molekularne težine su uglavnom sekundarni metaboliti kao što su terpeni, steroidi, derivati antrakinona i benzojeve kiseline te kinolini, ali i primarni metaboliti kao što je oksalna kiselina. U grupu spojeva s visokom molekularnom težinom uglavnom spadaju peptidi i proteini. (3)

Danas, u eri rastuće rezistencije bakterija na konvencionalne antibiotike, sve se češće provode istraživanja s ciljem pronalaženja alternativnih lijekova koji bi mogli pomoći u sprječavanju i/ili liječenju infekcija. Postoje brojna znanstvena izvješća o antimikrobnom djelovanju prirodnih aktivnih ljekovitih tvari koje djeluju baktericidno ili bakteriostatski. (4, 5) Međutim, činjenica je da su gljive, bez obzira da li se radi o kultiviranim ili samoniklim vrstama, slabo istražene, i da je dostupan skroman broj znanstvenih radova o njihovom utjecaju na ljudsko zdravlje kao i njihovom antimikrobnom potencijalu. U dostupnim radovima, najčešće su istražene gljive koje se uzgajaju radi konzumacije kao što su šampinjoni (*Agaricus bisporus*), bukovače (*Pleurotus ostreatus*) i shiitake (*Lentinula edodes*) (3, 6, 7, 8). No, danas se svuda u svijetu, kao i u Hrvatskoj, sakupljaju i konzumiraju brojne vrste samoniklih gljiva o kojima postoji mali broj znanstvenih studija.

Stoga je svrha ovog rada ispitati antimikrobnu aktivnost pet različitih vrsta (velika sunčanica - *Macrolepiota procera*, paprena mliječnica - *Lactarius piperatus*, prosenjak - *Hydnum repandum*, maglenka - *Clitocybe nebularis* i mrka trubača - *Craterellus cornucopioides*) samoniklih, jestivih gljiva prikupljenih u šumama Primorsko-goranske županije prema

odabranim gram negativnim (*Escherichia coli* 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) i gram pozitivnim (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) bakterijama iz Američke kolekcije mikroorganizama (ATCC eng. American Type Culture Collection),

1.1. Gljive

Gljive (Fungi, Mycota) su vrlo specifična skupina živih organizama koji se u mnogočemu razlikuju od ostatka živog svijeta. Dugo vremena su smatrane jednostavnim biljkama, ali otkrićem sličnosti gljivične sa životinjskom stanicom, te spoznajom kako gljive ne vrše fotosintezu uvrštene su u zasebno carstvo (Slika 1). Gljive su heterotrofni organizmi što znači da same ne proizvode hranu nego crpe hranjive tvari iz drugog živog organizma (paraziti) ili rastu na mrtvoj organskoj tvari koju razlažu (saprofiti). Postoje i vrste gljiva koje žive u simbiozi s drugim biljkama (mikoriza) od kojih uzimaju hranjive tvari, a zauzvrat biljke lakše upijaju mineralne tvari iz tla.



Slika 1. Klasifikacija živih bića u pet carstava

(Izvor: vlastita slika)

Gljive su najrasprostranjeniji organizmi na Zemlji te imaju vrlo važnu ulogu u ekološkim procesima u kopnenim ekosustavima, naročito u šumskima. Gljive razgrađuju mrtvu organsku tvar i time omogućuju kruženje energije i materije u prirodi osiguravajući odvijanje svih životnih procesa. Značajnu ulogu imaju i u razgradnji biljnih ostataka (celuloze, hemiceluloze, pektina i lignina), dok životinjske ostatke većinom razgrađuju bakterije. Bez gljiva, kvasaca ne bi bilo fermentacije, a posljedično niti kruha, vina, piva. Gljive su vrlo dobar materijal koji se koristi u biotehnološkim procesima za proizvodnju mliječne i limunske kiseline, alkohola, nekih antibiotika, riboflavina i mnogih drugih supstancija. Izvor su bioloških fungicida, vitamina i enzima. (9, 10) Oko 30-tak različitih vrsta gljiva koje se zbog jestivih plodišta konzumiraju kao hrana, uspješno se uzgajaju u kontroliranim uvjetima. (11)

Pretpostavlja se da se broj poznatih vrsta gljiva u Republici Hrvatskoj kreće oko 4500. (12) U prirodi se može pronaći velik broj jestivih gljiva, koje je, naravno, potrebno razlikovati od otrovnih dvojnika. Također, treba voditi računa da se gljive ne nalaze na listi zakonom zaštićenih gljiva zbog svoje ugroženosti te da ih se sakuplja na adekvatan način. (13)

1.1.1. Velika sunčanica (*Macrolepiota procera*)

Velika sunčanica (Slika 2) je jestiva gljiva iz roda *Agaricaceae*. Vrlo je rasprostranjena i česta gljiva koja raste ljeti i u jesen.

Klobuk joj je širok 10-35 cm, u mladosti okruglasto jajolik, potom konveksan te na kraju otvoren i potpuno ispružen. Rub klobuka nije narebran, ni podvrnut prema unutra, ali ljuskasta kožica klobuka malo prerasta rub i ponekad visi s njega. U odraslih primjeraka je sredina klobuka ispupčena. Klobuk je kremsmeđe boje, uz rub svjetliji, pahuljasto-ljuskast,

svilenast, prekriven tamnijim smeđim krpicama ili ljuskama kojih ima više prema sredini klobuka, a uz rub klobuka postupno nestaju starenjem. Kiša, sa klobuka, može isprati sve krpice pa može izgledati ogoljeno. Ispupčenj na sredina klobuka je tamnosmeđe ili crnkastosmeđe boje obično glatko i tvrdo. Listići su gusti, nejednako dugi, široki, slobodni, mekani, bijele boje, a starenjem poprimaju oker nijansu.



Slika 2. Velika sunčanica (*Macrolepiota procera*)

(Izvor: <https://www.plantea.com.hr/velika-suncanica/#velika+sun%C4%8Danica-2>)

Stručak je visok od 20 do 40 cm, debljine do 2, tvrd, valjkast, vitak, šupalj, dugačak, vlaknast, išaran s tamnijim ljuskama na bijeloj podlozi. Stručak je u bazi gomoljasto zadebljan širine do 4 cm, u gornjoj trećini nosi debeli dvostruki vjenčić ili prsten. Prsten je bjelkast ili bjelkastosmeđ, pomičan, na rubu pahuljast te je s donje strane smeđasto obrubljen, a s gornje strane je bijele boje.

Meso je u klobuku mekano, tanko, bijele boje ugodnog mirisa i okusa. Okus je slatkast te podsjeća na okus lješnjaka ili oraha. Raste od nizinskih pa sve do planinskih predjela u bjelogoričnim i crnogoričnim šumama, uz rubove šuma, po livadama, pašnjacima, uz puteve, u grmlju, voćnjacima, dvorištima. (10, 14)

1.1.2. Paprena mliječnica (*Lactarius piperatus*)

Paprena mliječnica (Slika 3) je uvjetno jestiva gljiva iz porodice *Russulaceae*. Uvjetno je jestiva zbog toga što ima vrlo papren i ljut okus. Vrlo je rasprostranjena i česta vrsta gljive koja u ljetnim mjesecima može doslovno preplaviti bjelogorične šume. Dobro podnosi i sušna razdoblja te može rasti kada u šumi nema drugih gljiva. Raste od srpnja do kraja jeseni.

Klobuk joj je širok 5-15 cm, u početku konveksan, a kasnije se raširi i udubi poput lijevka. Rubovi klobuka su podvrnuti prema unutra, tj. prema listićima, posebno u mlađih gljiva. Kožica klobuka je glatka, ali gruba, može biti sa sitnim naborima posebno uz rub klobuka. Ponekad se za vrijeme sušnog razdoblja raspuca po sredini. Klobuk je bijele boje, ali može biti oker ili smeđasto zamrljan. Listići su ekstremno gusti, toliko da se u mladim gljiva treba dobro izbliza pogledati da se uoči da se radi o listićima. Listići su uski, prema rubu klobuka mogu biti toliko stisnuti da se vijaju, račvaju se, pravilno su prirasli uokolo stručka uz koji se

malo spuštaju. U početku su bijele boje, kasnije krem sa žutom nijansom. U starosti mogu biti oker ili smeđasto pjegavi. Na ozlijeđenim mjestima ispuštaju bijeli mliječni sok.



Slika 3. Paprena mliječnica (*Lactarius piperatus*)

(Izvor: <http://www.gusuncanica-samobor.com.hr/paprena%20mlijecnica.JPG>)

Stručak je visok do 12 cm, debljine do 3 cm, gotovo uvijek je kraći od promjera klobuka, često djeluje zdepasto, čvrst, valjkast, pun, u bazi se obično malo suzuje, u starosti postane šupalj. Stručak je gladak ili ponegdje s manjim naborima ili brazdama, bjelkaste boje, na pojedinim mjestima može biti oker ili zelenkasto zamrljan. Meso je prilično debelo, čvrsto, zrnate i drobive strukture, bijele boje. Na ozlijeđenim mjestima ispušta obilan bijeli mliječni sok, koji nakon nekog vremena može poprimiti zelenkastu boju. Mliječni sok i meso su jako

ljutog okusa u svježih gljiva, miris nezamjetan. Paprena mliječnica raste u bjelogoričnim i miješanim šumama, najviše voli staništa uz bukve i grabove. (10, 14)

1.1.3. Prosenjak (*Hydnum repandum*)

Prosenjak (Slika 4) je jestiva gljiva iz porodice ježevica, *Hydnaceae*. Prilično je česta gljiva koja raste u manjim ili većim skupinama, ponekad u linijama, polukrugovima ili krugovima. Raste od druge polovica ljeta pa sve do kraja jeseni.



Slika 4. Prosenjak (*Hydnum repandum*)

(Izvor: <https://www.plantea.com.hr/prosenjak>)

Klobuk joj je velik 3-15 cm, mesnat, debeo, čvrst, grbav, u početku je nepravilno polukuglast, zatim nepravilno konveksan, kasnije se raširi, ponekad malo i udubi u starijih gljiva. Rub klobuka je u mladih primjeraka podvrnut prema dolje. Glatke je površine poput fine antilop kože, često s grbicama, manjim jastučastim izbočenjima, udubljenjima ili crtastim brazdama. Za sušnog razdoblja ispuca. Bojom varira od bjelkastožute, žute, pa sve do narančaste ili okercrvenkaste. S donje strane klobuka nalazimo vrlo lomljive bodlje žutobijele boje koje silaze po stručku.

Stručak je visok do 8 cm, debljine do 4 cm, većinom valjkast, ali tvori i nepravilne oblike, masivan, tvrd, čvrst, ekscentričan (nepravilno postavljen u odnosu na klobuk), zdepast, ponekad u dnu zadebljan, a ponekad uži. Stručak je gladak, ponekad ispucan, bjelkaste ili blijedožute boje, na dodir ili prerez dobije narančastožutu boju, pogotovo u bazi. Meso gljive je debelo i tvrdo, prvotno bijele boje, ali na prerezu dobije žutonarančastu boju, pod malo jačim pritiskom lako puca. Miris nije specifičan, okus je blag kod mladih gljiva, a u starijih gorkasto-ljutkasto. Prosenjak raste u bjelogoričnim i crnogoričnim šumama, u brdskim i pretplaninskim šumama. Gljiva se konzumira dok je mlada, kod starijih primjeraka uklanjaju se bodljike čime se smanjuje gorčina. (10, 14)

1.1.4. Maglenka (*Clitocybe nebularis*)

Maglenka (Slika 5) je uvjetno jestiva gljiva (osjetljive osobe je teže probavljaju) iz porodice *Tricholomataceae*. Vrlo često raste u velikim vilinskim krugovima ili polukrugovima koji broje više desetaka primjeraka. Doba godine u koje raste je od kraja ljeta do kraja jeseni. Pogotovo je česta u drugoj polovici jeseni.

Klobuk joj je širok 5-25 cm, mesnat, u početku zvonolik, ruba uvrnutog prema unutra. Kasnije se klobuk ispruži i bude gotovo ravan ili malo konveksan. U sredni klobuka se nalazi blago ispupčenje koje se kod starijih primjeraka gubi. Boja klobuka varira od bjelkasto sive do tamnosive ili čađavosive, ponekad je skroz bijele boje (*var. alba*). Uz rub klobuka je svjetlije boje. Listići se lagano spuštaju niz stručak, prilično gusti, blijedokrem boje.

Stručak je visok do 12 cm, debljine do 4 cm, ima oblik batine, vlaknast, pun, prema dolje je deblji, nerijetko u bazi i podosta zadebljan, često uzdužno naboran, bjelkasto sive boje. Meso je bjelkaste boje, vlaknasto, prodornog, pomalo neugodnog mirisa koji se još više intenzivira kuhanjem, kiselkastog okusa. Gljiva raste u bjelogoričnim i crnogoričnim šumama, u nizinskom, brdovitom i planinskom području. (10, 14)



Slika 5. Maglenka (*Clitocybe nebularis*)

(Izvor: <https://www.plantea.com.hr/maglenka/#maglenka-4>)

1.1.5. Mrka trubača (*Craterellus cornucopioides*)

Mrka trubača (Slika 6) je jestiva gljiva iz porodice *Cantharellaceae*. Raste u nizinsko-brdskom području, ali i na većim nadmorskim visinama. Pojavljuje se ljeti i u jesen u velikim kolonijama, ponekad i više stototina primjeraka na jednom manjem prostoru.



Slika 6. Mrka trubača (*Craterellus cornucopioides*)

(Izvor: <http://www.enogastrobrutal.com/wp-content/uploads/2013/10/crne-trubace.jpg>)

Plodište gljive je široko 2-8 cm, te do 12 cm visoko. Ima oblik lijevka ili trube. U središtu se nalazi duboko udubljenje poput lijevka koje se nastavlja sve do dna stručka. Rub klobuka je tanak, uvrnut, nepravilan, valovit, ponekad i kovrčav. Gornja površina klobuka je crne ili sivocrne boje, nerijetko sa smeđastim obojenjima. Kad se osuši bude svjetlije. Kožica klobuka

je fino pustenasta ili lagano čehasta. Trusište se nalazi s vanjske ili donje strane trube. Ono je blijedosivkaste ili sivočađave boje, ponekad s plavičastim odsjajem, prekriveno sitnim bjelkastim prahom. Obično je glatke površine, s manje-više izraženim naborima. Svjetlije od unutrašnje strane klobuka.

Stručak je zapravo produžetak klobuka, sivocrne je boje, tamniji od trusišta, šupalj, manje-više naboran, pri samom dnu može biti bjelkast. Meso gljive je tanko, sivocrno, djeluje nježno, ali je pomalo elastično, posebno kad je gljiva starija. Okus i miris su vrlo ugodni, aromatični, voćni. Stanište mrke trubače su bjelogorične i miješane šume. Raste na raznim tlima, najčešće na sjenovitim i vlažnim staništima. Posebno voli staništa uz bukve, ali i grabove i pitome kestene. (10, 14)

1.2. Rezistencija bakterija na antibiotike

Otkriće i razvoj antibiotika zasigurno su jedno od najvažnijih znanstvenih dostignuća u medicini u posljednjih osamdeset godina. Flemingovo slučajno otkriće penicilina bilo je temelj istraživanja i razvoja novih antimikrobnih lijekova koji su omogućili uspostavu moderne medicine, unaprijedili i ubrzali uvođenje novih kirurških tehnika, invazivnih dijagnostičkih i terapijskih postupaka sprječavajući nastajanje i liječeći uspostavljene bakterijske infekcije. Međutim, prekomjerna i puno puta nepotrebna upotreba antibiotika dovela je do toga da su antibiotici, od velikog otkrića, postali, vrlo često, potpuno nedjelotvorni.

Otpornost (rezistencija) bakterija na antibiotike znači da antibiotici ne djeluju na bakterije u koncentracijama koje se mogu postići u ljudskom organizmu. Rezistencija bakterija na

antibiotike može biti primarna ili urođena (intrinzična) te sekundarna ili stečena. (15) Prirođena rezistencija je genetski uvjetovana i predstavlja stalnu karakteristiku određene bakterijske vrste, odnosno roda. Obično, za bakterije koje pokazuju prirodenu rezistenciju, postoji mogućnost izbora nekog drugog antimikrobnog pripravka. Za razliku od spomenutog, stečena rezistencija nastaje najčešće pod selekcijskim pritiskom antimikrobnih lijekova, mutacijom postojećih ili stjecanjem novih gena. Sve češće, na taj način bakterije postaju rezistentne, ne samo na jedan, već više različitih antibiotika, čime se smanjuje mogućnost izbora adekvatnog antimikrobnog lijeka te se ugrožava klinički uspjeh terapije infektivnih bolesti. Najčešće višestrukorezistentne bakterije obuhvaćene su akronimom ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter*). (16, 17, 18)

Bolesti koje su se nekada jednostavno liječile danas postaju ozbiljan problem upravo zbog pojave otpornosti na antibiotike. Povezanost multirezistentnih mikroorganizama i bolničkih infekcija svakako naglašava ovaj problem i zahtijeva hitnu potrebu za rješenjima. Rezistencija je danas općepriznati javnozdravstveni problem koji nameće veliku potrebu za edukacijom i kontrolom nad upotrebom antibiotika. Racionalna i ispravna antimikrobna terapija, uz unaprjeđenje dijagnostičkih mikrobioloških postupaka i suradljivost u higijeni, posebno higijeni ruku, mogu doprinijeti zaustavljanju rezistencije. Naravno, treba nastaviti s istraživanjem i razvojem novih antibiotika, kao i alternativnih, biljnih pripravaka koji pokazuju antimikrobni učinak. Jedan od izvora novih antimikrobnih lijekova mogle bi biti i gljive. (19, 20)

1.2.1. *Escherichia coli*

E. coli najčešći i najznačajniji predstavnik roda *Escherichia*. *E. coli* čini dio normalne crijevne mikrobiote, ali može biti povezana s mnogobrojnim infekcijama. Struktura i fiziologija *E. coli* tipična je za enterobakterije što znači da su to kratki gram-negativni, uglavnom pokretni, štapići. Određeni patogeni sojevi *E. coli* (enterohemoragična, enterotoksična, enteroinvazivna, enteropatogena, enteroagregativna) odavno su prepoznati kao uzročnici proljeva koji se prenose hranom. Također, opće je prihvaćeno da je *E. coli* najčešći uzročnik urinarnih infekcija, ali se rjeđe spominje da je *E. coli* važan uzročnik i drugih ekstra-intestinalnih infekcija, npr. u središnjem živčanom, kardiovaskularnom ili respiratornom sustavu. (21, 22) Sposobnost *E. coli* da uzrokuje infekcije u ili izvan probavnog sustava uvelike ovisi o nekoliko faktora virulencije. Određeni sojevi posjeduju kapsulu. Opći čimbenici patogenosti kod *E. coli* su: endotoksin, hemolizini, siderofore. Neki sojevi posjeduju i specifične čimbenike virulencije kao što su: egzotoksini, sekretorni sustavi te adhezini specifični za određene stanice. (15, 23)

1.2.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Bakterije roda *Pseudomonas* su aerobni gram-negativni štapići koji se pojavljuju pojedinačno, u parovima, lancima ili su složeni jedan pored drugoga. Određeni sojevi posjeduju polisaharidnu kapsulu, enzime katalazu i citokrom-oksidazu. *P. aeruginosa* izaziva primarno oportunističke infekcije, u onih s oslabljenim ili oštećenim imunološkim sustavom, dugotrajnom hospitalizacijom ili nekim predležecim bolestima, npr. cističnom fibrozom ili opeklinama. Infekcijom mogu biti zahvaćeni svi organski sustavi. *P. aeruginosa* posjeduje mnogo čimbenika virulencije koji su odgovorni za razvoj bolesti, a za sustavnu toksičnost

odgovorni su lipopolisaharid i egzotoksin A. Pseudomonasi su uobičajeno prisutni u različitim okolišnim uvjetima, naročito u prisustvu vodenog medija, a katkad mogu biti i sastavni dio normalne mikrobiote zdravih ljudi. (24) U bolničkim uvjetima *P. aeruginosa* je jedan od najčešćih uzročnika nozokomijalnih infekcija, povezanih s visokom stopom smrtnosti. Bakterija je prirodno otporna na niz antibiotika, a pod selekcijskim pritiskom u bolničkom okruženju, nerijetko se razvijaju sojevi rezistentni na gotovo sve klase antibiotika što predstavlja velik problem u liječenju. (15, 23, 25)

1.2.3. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus je katalaza-pozitivni, gram-pozitivni kok koji, u mikroskopskom preparatu, formira nakupine slične grozdovima. Staničnu stijenku sačinjavaju peptidoglikan i teikoična kislina koja je atigenski specifična za *S. aureus*. Staničnu stijenku okružuje polisaharidna kapsula koja ga štiti od vezanja komplementa i fagocitnog ubijanja neutrofilima. Iako je poznato 13 stafilokoknih kapsularnih polisaharida, samo su izolati koji ekspimiraju kapsularni polisaharid tipa 5 (CP5) ili 8 (CP8) povezani s bolešću. (26) *S. aureus* može producirati toksine među kojima su najvažniji: eksfolijatin, α -toksin, TSST-1 (eng. Toxic shock syndrome toxin 1), enterotoksini koji izazivaju trovanje hranom.

Na krvnom agaru *S. aureus* formira krem kolonije koje s vremenom postaju zlatno žute otkuda potječe i naziv *aureus* što znači zlatni. Razlika u odnosu na ostale vrste iz roda *Staphylococcus* jest ta što producira koagulazu koja se može dokazati laboratorijskim testovima. *S. aureus* se može naći u oko 30% ljudi kao dio normalne mikrobiote u nosnom vestibulumu, u probavnom sustavu te na vlažnim dijelovima kože. *S. aureus* je i vrlo uspješan patogen koji može izazvati niz infekcija od impetiga, karbunkula, furunkula, artritisa do, po

život opasnih, bakterijemija, endokarditisa, osteomijelitisa i sepse. Većina izolata *S. aureus* rezistentna je na penicilin pa se u liječenju koriste antistafilokokni penicilini (flukloksacilin) ili cefalosporini prve ili druge generacije, a u slučaju meticilin rezistentnih sojeva (MRSA od meticilin rezistentni *S. aureus*), u terapiji se koristi vankomicin, teikoplanin, linezolid, tigeciklin. (15, 23) Povijesno gledano, izolati MRSA povezani su s bolničkim infekcijama i brzo su razvijali otpornost na višestruke klase lijekova. (27) Međutim, posljednjih godina u zajednici su se pojavili različiti sojevi s jedinstvenim fenotipovima, a rezervoar MRSA sojeva u zajednici ubrzano se širi. U usporedbi s bolničkim sojevima, izolati MRSA povezani sa zajednicom (CA - MRSA od engl. Community Acquired MRSA) pokazuju povećanu virulenciju, ali su trenutno, većinom osjetljivi na različite antibiotike. (28)

1.2.4. *Enterococcus faecalis*

Članovi roda *Enterococcus* su gram-pozitivni, katalaza-negativni koki. Enterokoki su dio normalne mikrobiote probavnog sustava čovjeka i ne smatraju se izrazito virulentnim bakterijama. Međutim, preživljavanje u crijevima čovjeka i životinja im omogućuje sposobnost rasta u visokim koncentracijama žuči i natrijeva klorida. Također, mogu preživjeti u medijima s alkalnim pH i visokom temperaturom, otporni su na detergente, etanol i teške metale. (29) U prirodi su široko rasprostranjeni te ih se može naći na biljkama, probavnom sustavu životinja, tlu, vodi, hrani. Najčešće izolirane vrste jesu *E. faecalis* i *E. faecium*, od kojih drugi češće pokazuje rezistenciju prema vankomicinu (VRE – vankomicin rezistentni enterokok). Iako se smatraju primarno oportunističkim patogenima mogu uzrokovati infekcije endokarda, mokraćnog sustava, bakterijemije i sepse, infekcije povezane s intravaskularnim kateterima, abdominalne i druge infekcije. (15, 23)

2. MATERIJALI I POSTUPCI

2.1. Materijali

2.1.1. Laboratorijski pribor i instrumenti

- Rotacioni vakuumski uparivač (Laborota 4002 control, Heidolph, Njemačka)
- Spektrofotometar (Biofotometar, "Eppendorf", Njemačka)
- Inkubator (Binder, Njemačka)
- Tikvice s okruglim dnom
- Epruvete
- Petrijeve zdjelice
- Mikrobiološke ušice ("eze")
- Sterilni brisni štapići
- Mikrotitracijske pločice (96 jažica)
- Plamenik (Poligas OMM)
- Filteri: veličina pora 0.45 μm (FilterBio, Labex Ltd., Južna Afrika)
- Automatske pipete: 10-1000 μL (Gilson, USA) i 0,5-10 μL , 2-20 μL , 20-100 μL , 20-200 μL (Eppendorf, Njemačka)
- Nastavci za automatske pipete
- Ultrazvučna kupelj (BactoSonic 14, Bandelin, 800 W)

2.1.2. Gljive

Uzorci divljih, samoniklih vrsta gljiva prikupljeni su u šumama na području Primorsko-goranske županije u listopadu 2018. godine uz pomoć članova Gljivarske udruge „Ožujka“. Stručnu determinaciju gljiva izvršio je tročlani sastav licenciranih determinatora Gljivarske

udruga „Ožujka“. Vrste gljiva koje su korištene u ovom istraživanju su: velika sunčanica *Macrolepiota procera*, paprena mliječnica *Lactarius piperatus*, prosenjak *Hydnum repandum*, maglenka *Clitocybe nebularis*, mrka trubača *Craterellus cornucopioides*.

2.1.3. Hranjive podloge i mediji

Tekuće i čvrste hranjive podloge koje su korištene za uzgoj mikroorganizama, pripremljene su prema propisanim recepturama. Hranjive podloge korištene u radu su: Mueller Hinton bujon (Oxoid, Engleska) i Mueller Hinton agar (Biolife, Italija).

2.1.3.1. Mueller Hinton bujon

Mueller Hinton bujon je tekuća podloga pripremljena otapanjem 21 g dehidriranog hranilišta u 1000 mL destilirane vode, nakon čega je provedena sterilizacija u autoklavu na 121 °C tijekom 15 minuta. Sastav podloge (g/L): goveđi ekstrakt 300 g/L; kazein hidrolizat 17,5 g/L; škrob 1,5 g/L. pH vrijednost hranilišta iznosi $7,3 \pm 0,1$ na 25 °C.

2.1.3.2. Mueller Hinton agar

Mueller Hinton agar je kruta podloga pripremljena otapanjem 38 g dehidriranog hranilišta u 1000 mL hladne destilirane vode koja je zagrijavana do vrenja, te sterilizirana u autoklavu na 121 °C tijekom 15 minuta. Sastav podloge (g/L): goveđi ekstrakt 2 g/L; kazein hidrolizat 17,5 g/L; škrob 1,5 g/L; agar 17 g/L. pH vrijednost hranilišta iznosi $7,3 \pm 0,1$.

2.1.4. Bakterijski sojevi

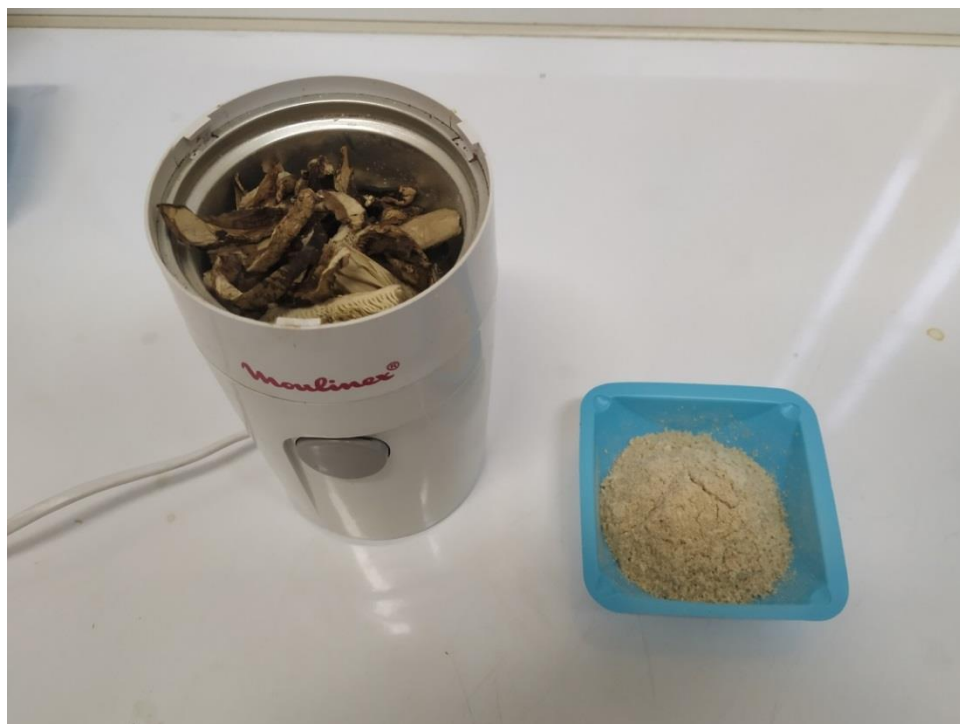
U istraživanju su korištena četiri odabrana, gram negativna i gram pozitivna, bakterijska soja iz Američke kolekcije mikroorganizama (ATCC, od eng. American Type Culture Collection):

Escherichia coli ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 i *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Bakterije su čuvane u zamrzivaču na temperaturi od -80 °C. Prije istraživanja, sojevi su postepeno odležani na sobnoj temperaturi te su nasađeni na Mueller Hinton agar, nakon čega su inkubirani na 37°C u trajanju od 24 sata.

2.2. Postupci

2.2.1. Ekstrakcija

Svježe ubrane gljive su oprane pod tekućom vodom kako bi se uklonile sve nečistoće poput zemlje i lišća. Površinski su sterilizirane alkoholom te narezane na manje dijelove i osušene na toplom zraku u pećnici na 40 °C. Osušene gljive su usitnjene u prah u električnoj drobilici (Slika 7).



Slika 7. Usitnjavanje osušenih gljiva

(Izvor: vlastita fotografija)

Šest grama usitnjenih gljiva otopljeno je u 140 ml metanola. Suspenzija je, u ultrazvučnoj kupelji, u četiri navrata izložena ultrazvučnim valovima snage 800 W i frekvencije od 40 kHz tijekom 15 minuta. Između svakog ciklusa sonikacije izvršeno je miješanje suspenzije. Nakon toga suspenzija je centrifugirana na 4000 okretaja 15 minuta. Ekstrakti su koncentrirani u rotacijskom vakuumskom uparivaču kako bi se uz pomoć vakuuma i povišene temperature potpuno isušili (Slika 8).



Slika 8. Ekstrakti na isušivanju u rotacijskom vakuumskom uparivaču

(Izvor: vlastita fotografija)

Prije početka evaporacije tikvice s okruglim dnom su se potpuno osušile i izvagale zbog kasnijeg preciznog određivanja dobivene mase suhog ekstrakta. Suhi ekstrakti dobiveni evaporacijom stavljeni su u eksikator kako bi se dodatno isušili i masa ustalila. Uz svakodnevno vaganje ekstrakti su proveli 7 dana u eksikatoru sve dok nije došlo do ustaljenja mase.

Svaki dobiveni suhi ekstrakt otopljen je u 40% dimetil sulfoksidu (DMSO) kako bi se postigla koncentracija ekstrakta od 200 mg/mL koja je korištena je za sva daljnja ispitivanja antimikrobnog djelovanja.

2.2.2. Priprema bakterijske suspenzije

S krute podloge, sterilnom ezom dotaknuto je nekoliko morfološki identičnih kolonija koje su unešene u fiziološku otopinu za provođenje difuzijske ili u Mueller Hinton bujon za provođenje dilucijske metode antibiograma. U suspenziji je, pomoću spektrofotometra određena apsorbancija, odnosno optička gustoća pri 600nm (OD_{600} – engl. Optical density) koja je pri vrijednosti 1 ($OD_{600}=1$) značila 10^9 CFU/ml (CFU- eng. Colony – forming units) u suspenziji. Konačna radna koncentracija bakterija u suspenziji od 1×10^5 CFU/ml dobivena je razrjeđivanjem. Ispitivanje antimikrobnog učinka gljiva

2.2.3 Difuzijska metoda za određivanje antimikrobne aktivnosti gljiva

U istraživanju su korištene dvije različite varijante difuzijske metode: metoda diska i metoda difuzije uz bušenje rupa u agaru. U oba postupka korišten je Mueller Hinton agar, na koji je vatenim brisnim štapićem umočenim u bakterijsku suspenziju ravnomjerno nanešen inokulum na površinu agara, razmazivanjem u tri smjera.

2.2.3.1 Disk difuzijska metoda

Nakon nanošenja bakterijske suspenzije na površinu Mueller Hinton agara, aplicirani su sterilni, prazni diskovi promjera 6 mm. Pet diskova za svaki ispitivani ekstrakt gljiva, raspoređeni su u pravilnim razmacima tako da cijelom površinom dodiruju površinu agara. Na

svaki disk, pipetom je nanešeno 5 μ L ekstrakta gljiva u koncentraciji od 200 mg/mL. Ploče su stavljene u inkubator na temperaturu od 37°C kroz 24 sata nakon čega su očitavane zone inhibicije rasta. Mjeri se promjer zone inhibicije koja okružuje disk ukoliko postoji antimikrobni učinak ispitivane supstancije (Slika 9).

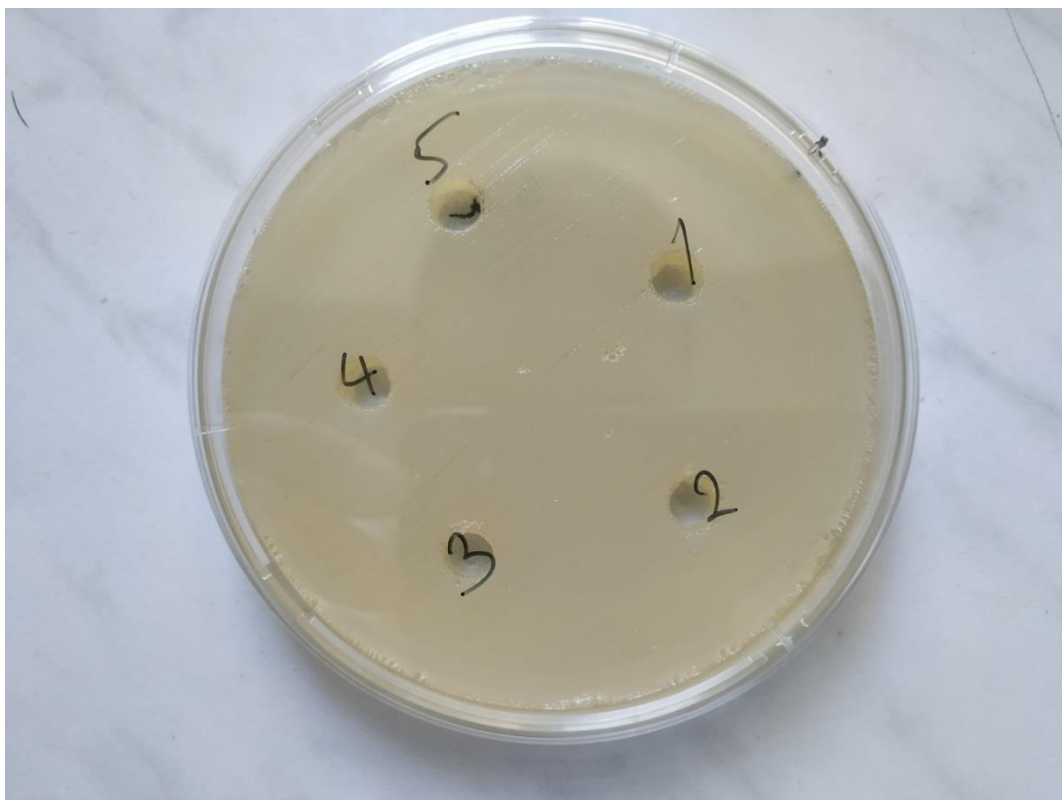


Slika 9. Metoda disk difuzije

(Izvor: vlastita fotografija)

2.2.3.2 Metoda difuzije u jažicama

Nakon nanošenja bakterijske suspenzije na površinu Mueller Hinton agara, u agaru se, pomoću sterilnog bušača rupa, izbuše rupice promjera 5 mm. U izbušene jažice dodali smo 40 μ L ekstrakta pojedine gljive u koncentraciji od 200 mg/mL, nakon čega su ploče stavljene u inkubator na temperaturu od 37°C kroz 24 sata. Očitavanje je provedeno mjerenjem zone inhibicije bakterijskog rasta koja okružuje rupicu ukoliko je prisutan antimikrobni učinak ispitivane supstancije (Slika 10).



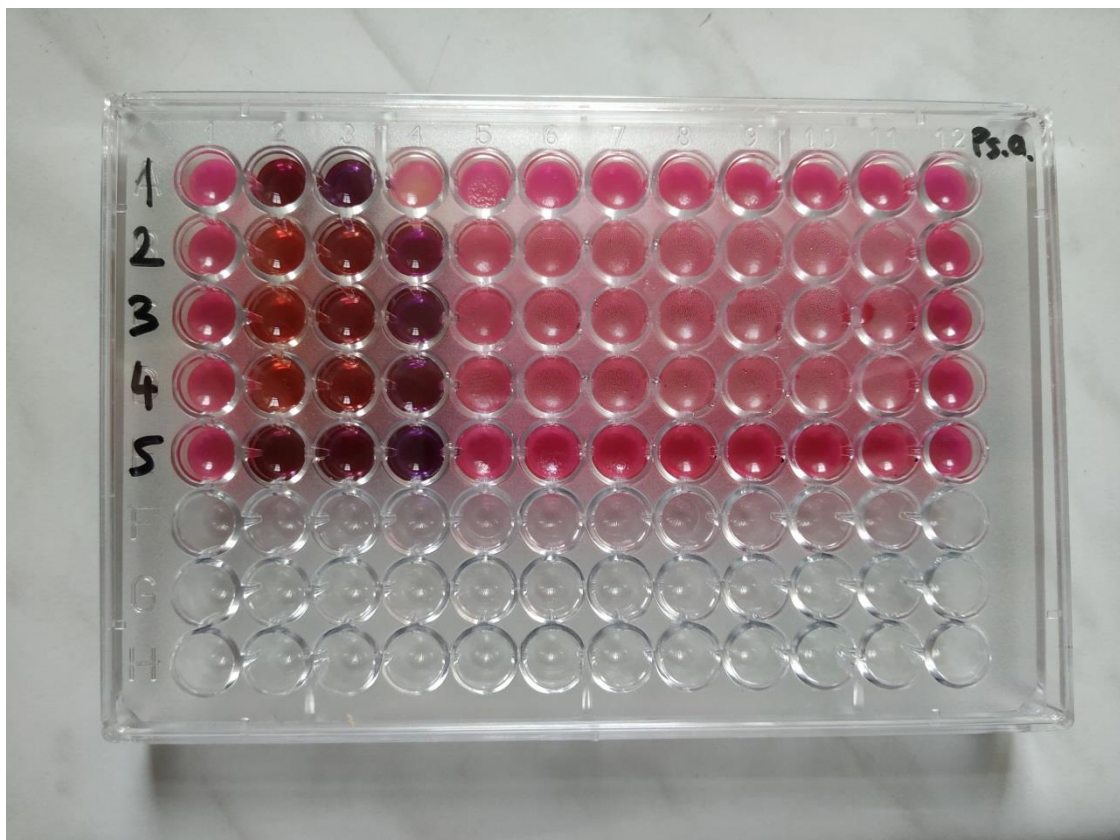
Slika 10. Metoda difuzije u jažicama

(Izvor: vlastita fotografija)

2.2.4 Dilucijska metoda za određivanje antimikrobne aktivnosti gljiva

Dilucijskom, kvantitativnom metodom određuje se MIK, vrijednost koja predstavlja najmanju koncentraciju antimikrobne tvari koja bakteriju zaustavlja u rastu, te MBK, vrijednost koja predstavlja najmanju koncentraciju antimikrobne tvari koja bakteriju ubija. (15) Za određivanje MIK-a korištena je mikrodilucijska metoda s rezazurinom kao indikatorom mikrobnog rasta. Metoda se izvodi u mikrotitracijskim pločama s 96 jažica. U drugu jažicu svakog reda unijeli smo 200 μ l ekstrakta pojedine ispitivane gljive u koncentraciji od 200 mg/ml te smo dalje nastavili s dvostrukim razrjeđivanjem do koncentracije od 0.195 mg/mL. Potom smo u sve jažice ispipetirali 100 μ l bakterijske suspenzije. Mikrotitracijska ploča je

nakon toga stavljena na inkubaciju pri temperaturi od 37 °C tijekom 24 sata. Rezultati su sutradan očitani vizualno promatrajući promjenu boje unutar svake jažice uspoređujući je s bojom prve, kontrolne jažice u kojoj se nalazila samo bakterijska suspenzija. Mikrobiološki rast je očitavan dodavanjem po 30 μ L resazaurina, indikatora oksidacije i redukcije koji se koristi za procjenu bakterijskog rasta. To je plava boja koja postaje ružičasta kada se, djelovanjem oksidoreduktaza iz živih bakterijskih stanica, reducira na resorufin. Stoga se medij u jažici u kojoj je prisutan bakterijski porast boji ružičasto. (30) Vrijednost MIK-a predstavlja najmanja koncentracija testiranog ekstrakta koji je spriječio promjenu boje resazurina iz plave u ružičastu, odnosno koji je inhibirao bakterijski rast (Slika 11).

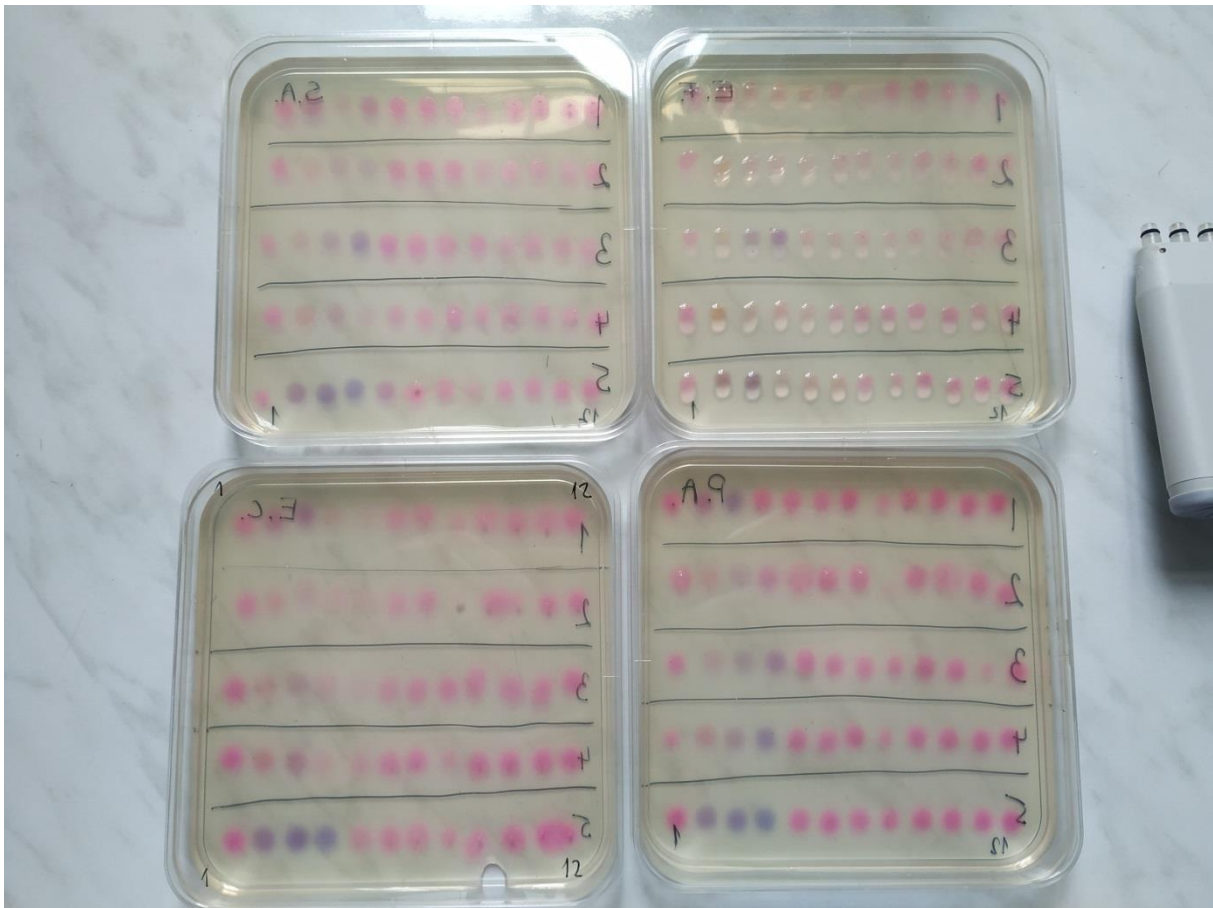


Slika 11. Određivanje MIK vrijednosti u mikrotitracijskoj ploči s 96 jažica

(Izvor: vlastita fotografija)

2.2.4.1 *Određivanje minimalne baktericidne koncentracije (MBK)*

Nakon određivanja vrijednosti MIK-a, na Mueller Hinton agar pomoću pipete nasadujemo uzorake iz svih jažica (Slika 12). Hranjivu podlogu stavljamo u inkubator na 37 °C u razdoblju od 24 sata. Nakon inkubacije očitava se porast kolonija. MBK vrijednost je ona s najmanjom koncentracijom ekstrakta gljiva kod koje nije došlo do porasta bakterijskih kolonija na agaru



Slika 12. Određivanje MBK vrijednosti na Mueller Hinton agaru

(Izvor: vlastita fotografija)

3 Rezultati

Cilj ovog rada bio je odrediti antimikrobnu aktivnost ekstrakata jestivih gljiva (*Macrolepiota procera*, *Lactarius piperatus*, *Hydnum repandum*, *Clitocybe nebularis*, *Craterellus cornucopioides*) na odabrane patogene bakterije (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) metodom određivanja minimalne inhibitorne koncentracije i metodom disk difuzije ili difuzije u jažicama, te na osnovu dobivenih rezultat donijeti zaključke o antimikrobnoj aktivnosti ispitanih gljiva.

3.2 Dobivanje suhog ekstrakta gljiva

Kao rezultat procesa ekstrakcije uz postupak uparivanja u vakuumskom evaporatoru dobiven je suhi ekstrakti (*extracta sicca*) ispitivanih jestivih, samoniklih gljiva. Dobivene mase suhog ekstrakta kretale su se od oko 13 g (*C. cornucopioides*) do 25 g (*L. piperatus*) na 100 g tretiranog uzorka. Dobivene mase ukupnog suhog ekstrakta za svaku pojedinu vrstu gljiva prikazane su u Tablici 1.

Tablica 1. Mase suhog ekstrakta pojedinih vrsta gljiva

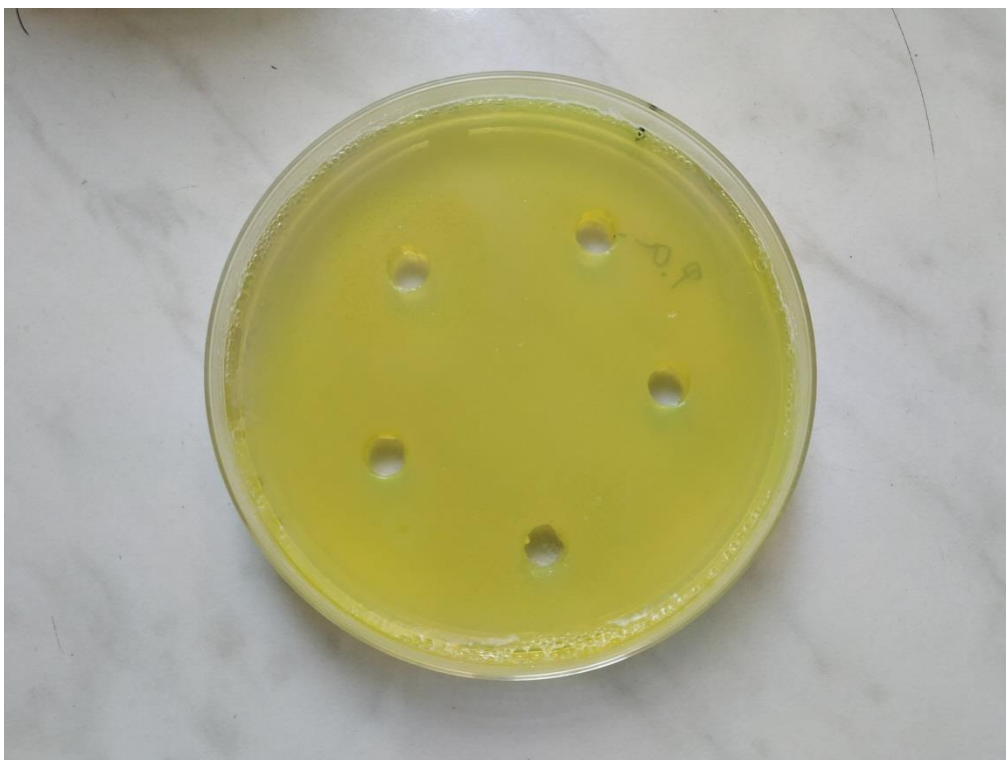
Uzorak	Vrta gljive	Masa ekstrakta (g/100 g suhe gljive)
1	<i>Macrolepiota procera</i>	20,15
2	<i>Lactarius piperatus</i>	25,06
3	<i>Hydnum repandum</i>	24,16
4	<i>Clitocybe nebularis</i>	23,30
5	<i>Craterellus cornucopioides</i>	12,92

3.3 Rezultati difuzijske metode

Potencijalni antimikrobni učinak suhog ekstrakta pet različitih vrsta gljiva (*M. procera*, *L. piperatus*, *H. repandum*, *C. nebularis* i *C. cornucopioides*) ispitan je difuzijskom metodom prema dvije gram-negativne (*E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853) i dvije gram-pozitivne (*S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212) bakterije.

Korištena je metoda disk difuzije te difuzije u jažicama. Difuzijska metoda je kvalitativna, a mikroorganizmi na koje ispitivana supstancija djeluje se klasificiraju kao osjetljivi, umjereno osjetljivi te rezistentni, ovisno o promjeru zone inhibicije rasta oko diska ili jažice. Testovi bi trebali dati preliminarne informacije o antimikrobnom učinku pojedinog ekstrakta te poslužiti za odabir ili isključenje pojedine vrste gljiva iz daljnje analize.

Unatoč korištenja dvije difuzijske metode, niti u jednom slučaju nije došlo do pojave inhibicije bakterijskog rasta. U svim slučajevima, sve ispitivane bakterije rasle su do rubova diska ili jažice (Slika 13). Ovom metodom, niti jedan ekstrakt nije pokazao antimikrobni učinak na ispitivane bakterije.



Slika 13. Bakterija *Pseudomonas aeruginosa* je porasla do ruba jažica

(Izvor: vlastita fotografija)

3.4 Rezultati dilucijske metode

3.4.3 Minimalna inhibicijska koncentracija ispitivanih ekstrakata gljiva

Osjetljivost odabranih gram negativnih (*E. coli* i *P. aeruginosa*) i gram pozitivnih bakterija (*S. aureus* i *E. faecalis*) na ekstrakte dobivene iz gljiva *M. procera*, *L. piperatus*, *H. repandum*, *C. nebularis* i *C. cornucopioides* analizirana je određivanjem vrijednosti MIK-a. Ekstrakti svih gljiva ispitivani su u koncentracijama od 200 mg/ml do 0.195 mg/mL. Rezultati dobivenih vrijednosti izraženih u mg/mL prikazani su u Tablici 2.

Tablica 2. Minimalna inhibicijska koncentracija ispitivanih ekstrakata gljiva

Ekstrakti gljiva	Minimalna inhibicijska koncentracija (MIK) (mg/mL)			
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212
<i>Macrolepiota procera</i>	100	100	200	>200
<i>Lactarius piperatus</i>	100	50	50	200
<i>Hydnum repandum</i>	100	50	25	50
<i>Clitocybe nebularis</i>	100	50	200	200
<i>Craterellus cornucopioides</i>	50	50	25	100

Prema najmanjoj vrijednosti MIK-a, najbolji učinak su pokazali ekstrakti gljiva *H. repandum* i *C. cornucopioides* na bakteriju *S. aureus* ATCC 29213 koji su djelovali inhibicijski u koncentraciji od 25 mg/mL. Generalno najbolji učinak na sve testirane bakterije pokazao je ekstrakt *H. repandum* te *C. cornucopioides*. Najlošiji antimikrobni učinak prema odabranim bakterijama pokazao je ekstrakt gljive *M. procera*.

Među odabranim bakterijama, vrsta *P. aeruginosa* pokazala je osjetljivost prema svim gljivama. Ekstrakti većine ispitivanih gljiva (Tablica 2) postigli su bakteriostatski učinak u koncentraciji od 50 mg/mL, osim ekstrakta *M. procera* koji je inhibirao rast pseudomonasa u koncentraciji od 100 mg/mL. Osjetljivost prema ekstraktima svih gljiva pokazao je i *S. aureus*. Međutim, ekstrakti *H. repandum* i *C. cornucopioides* djelovali su bakteriostatski u koncentraciji od 25 mg/mL, *L. piperatus* od 50 mg/mL, a *M. procera* i *C. nebularis* od 200 mg/mL. Najotpornija bakterijska vrsta, u ovom ispitivanju, bila je *E. faecalis* na koju su

ekstrakti *L. piperatus* i *C. nebularis* djelovali tek u maksimalnoj, a *M. procera* niti u najvećoj ispitivanoj koncentraciji od 200 mg/mL (Tablica 2).

3.4.4 Minimalna baktericidna koncentracija ispitivanih ekstrakata gljiva

Kao što je vidljivo iz Tablice 3, u ispitivanim koncentracijama, sve su testirane gljive pokazale baktericidan učinak prema gram negativnim bakterijama, prvenstveno prema *P. aeruginosa*, a zatim i *E. coli*. Ekstrakti dobiveni iz *H. repandum* i *C. cornucopioides* pokazali su baktericidan učinak i prema odabranim gram pozitivnim bakterijama, *S. aureus* i *E. faecalis*. Iako niti jedan ekstrakt ispitivanih gljiva nije djelovao baktericidno u koncentraciji manjoj od 100 mg/mL, ekstrakti dobiveni iz vrsta *M. procera* i *C. nebularis* nisu postigli baktericidan učinak na *E. faecalis* i *S. aureus* niti u najvećoj ispitivanoj koncentraciji od 200 mg/mL.

Tablica 3. Minimalna baktericidna koncentracija ispitivanih ekstrakata gljiva

Ekstrakti gljiva	Minimalna baktericidna koncentracija (MBK) (mg/mL)			
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212
<i>Macrolepiota procera</i>	200	100	>200	>200
<i>Lactarius piperatus</i>	100	100	100	>200
<i>Hydnum repandum</i>	100	100	100	200
<i>Clitocybe nebularis</i>	200	100	>200	>200
<i>Craterellus cornucopioides</i>	100	100	100	200

4 Rasprava

Gljive su najrasprostranjeniji organizmi na Zemlji s ključnom ekološkom ulogom u različitim, posebno šumskim, ekosustavima. Značajne su za kruženje tvari i energije u prirodi razgrađujući mrtvu organsku tvar, bez čega život na Zemlji ne bi bio moguć. Kao oportunistički heterotrofi, gljive su razvile cjevaste strukture, hife kojima prodiru u čvrste supstrate te crpe hranjive tvari, a spore za razmnožavanje i raspršivanje na velike udaljenosti. Gljive mogu biti nepatogeni saprofiti, ali ima i parazitskih, patogenih vrsta koje su dobro opremljene za prodiranje u organizme domaćina. Mnoge vrste proizvode i toksične spojeve (mikotoksine).

Gljive mogu utjecati na ljudsko zdravlje na različite načine. Plodišta gljiva, micelij i spore sadrže bioaktivne tvari koje mogu djelovati imunomodulatorno, antidiabetički, antifibrotski, antioksidacijski, protuupalno, antitumorski, protektivno na kardiovaskularni sustav i jetru, antivirusno i antimikrobno. (3) Poznato je da su gljive izvor prirodnih antibiotika koji su im potrebni za opstanak u prirodnom okruženju i vlastitu zaštitu od bakterijskih, virusnih i gljivičnih infekcija. Velik broj konvencionalnih antibiotika koji se i danas upotrebljavaju u medicini, potječu od gljiva, najčešće plijesni. (9, 10)

Danas se svijet suočava sa značajnim izazovima u modernoj medicini jer su mnogi antimikrobni lijekovi izgubili svoju vrijednost u liječenju zaraznih bolesti prvenstveno zbog razvoja bakterijske otpornosti. (31). Rastući problem antimikrobne rezistencije i nedostatak novih konvencionalnih antibiotika, razlozi su sve većeg interesa za pronalaskom alternativnih antimikrobnih pripravaka, baktiofaga, eteričnih ulja, biljnih ekstrakata i njihovih bioaktivnih komponenata. (32) Iako je poznato da i mnoge više gljive mogu imati povoljan utjecaj na zdravlje čovjeka, o njihovom antimikrobnom učinku literaturni podaci su skromni. Stoga smo,

za potrebe ovog rada, ispitali antimikrobnu aktivnost pet jestivih gljiva, *Macrolepiota procera*, *Lactarius piperatus*, *Hydnum repandum*, *Clitocybe nebularis*, *Craterellus cornucopioides*, ubranih na području Primorsko-goranske županije prema odabranim gram-negativnim i gram-pozitivnim bakterijama.

Gljive smo sasušili, samljeli te proveli postupak ekstrakcije kako bi dobili ukupni suhi ekstrakt tj. skup svih tvari gljive koje pod zadanim fizičkim uvjetima ne isparavaju. U našem istraživanju, kao otapalo, koristili isključivo metanol što je djelomično ograničenje ovog rada. Poznato je da se za ekstrakciju, osim metanola, mogu koristiti različita otapala kao što su etilni alkohol, aceton, etil acetat, kloroform, voda i druga. (19, 33) Vrsta otapala može utjecati na uspješnost ekstrakcije, a samim time i na dobivene rezultate. Također, problem je i međusobna usporedba rezultata iz različitih istraživanja koji su dobiveni korištenjem različitih otapala.

Za procjenu *in vitro* antimikrobne aktivnosti ekstrakta ili čistog spoja mogu se koristiti brojni laboratorijski postupci. Najpoznatije i najosnovnije metode su disk difuzija i dilucijske metode u bujonu ili agaru (34). U našem istraživanju antimikrobnu aktivnost dobivenih ekstrakata gljiva ispitali korištenjem dvije difuzijske i jedne dilucijske metode antibiograma. Difuzijske metode relativno su jednostavne kvalitativne tehnike kojima se dobiva informacija o prisutnosti ili odsutnosti antimikrobnog djelovanja ispitivane supstancije. Stoga su ove tehnike trebale biti probirne te poslužiti za odabir ili isključenje pojedine vrste gljiva iz daljnje analize. Iako se u literaturi ističe bolja osjetljivost difuzije u jažicama u odnosu na disk difuziju, u našem istraživanju niti jednom difuzijskom metodom nije došlo do pojave zone inhibicije rasta niti na jedan bakterijski soj, odnosno bakterije su porasle sve do diska ili rupice s ispitivanim uzorkom. Postoje brojni faktori koji mogu utjecati na rezultate difuzijskih antibiograma. Jedna je mogućnost da diskovi nisu bili impregnirani dovoljnom količinom

ekstrakata. Međutim, rezultat može biti posljedica samih fizikalnih i/ili kemijskih karakteristika ispitivanih ekstrakata koje su mogle utjecati na difuziju u okolni supstrat. (35) Važan je čimbenik i standardizacija veličine inokuluma (0,5 prema McFarland-ovom standardu) kako bi se osigurao konfluentni rast kulture, jer manja veličina inokuluma može dovesti do lažno velikih zona inhibicije, dok preveliki inokulum može dovesti do znatno manje ili potpunog izostanka zone. (36)

Kako bi prevladali nedostatke difuzijskih tehnika, te razlikovali bakteriostatsku i/ili baktericidnu aktivnost ispitivanih gljiva, sve smo uzorke testirali dilucijskom metodom. Dilucijska metoda je kvantitativna i najprikladnija za određivanje vrijednosti MIK-a ispitivane supstancije, bez obzira na izbor tehnike: dilucija u agaru, dilucija u bujonu koja se može izvoditi kao makrodilucijski ili mikrodilucijski postupak. (34) U našem smo radu koristili mikrodilucijsku tehniku koja uključuje pripremu dvostrukih razrjeđenja antimikrobnog agensa u tekućem mediju u mikrotitracijskoj ploči s 96 jažica. Nakon inokulacije svake jažice istom bakterijskom kulturom, MIK vrijednost, najniža koncentracija antimikrobnog pripravka koji inhibira rast mikroorganizma, se očitava poslije 24-satne inkubacije. U najvećoj ispitivanoj koncentraciji ekstrakata od 200 mg/mL, sve su gljive pokazale inhibitorni učinak prema svim ispitivanim bakterijama. Izuzetak je ekstrakt gljive *M. procera* koji ni u najvećoj koncentraciji nije uspio inhibirati rast bakterije *E. faecalis*. Generalno, *M. procera* pokazala je najslabiji antimikrobni učinak u odnosu na druge ispitivane gljive. I u istraživanju Kosanić i suradnika, ekstrakt *M. procera* pokazao je nešto slabiju antimikrobnu aktivnost nego *Lactarius deliciosus*. (37) Međutim, vrijednosti MIK-a detektirane u njihovom radu su od 10 do 20 puta manje nego u našem istraživanju. Pri testiranju prirodnih pripravaka, česte su manje ili veće izmjene i prilagodbe standardiziranih protokola koji se inače koriste u kliničkoj mikrobiologiji. Dobro je poznato da veličina inokuluma, tip medija za rast, vrijeme inkubacije i postupak pripreme inokuluma mogu

utjecati na vrijednosti MIK-a te onemogućiti ispravnu usporedbu dobivenih rezultata. U našem istraživanju, i ekstrakt gljive *C. nebularis* je pokazao skromnu antimikrobnu djelotvornost, napose prema gram-pozitivnim bakterijama. Izostanak antimikrobne aktivnosti *C. nebularis* utvrdili su i Dimitrijević i sur., dok su Kim i sur. pokazali da metanolni ekstrakt plodnog tijela ove gljive pokazuje blagu antifungalnu aktivnost protiv patogenih gljiva. (38,39) Potrebno je naglasiti kako geografsko područje s kojeg potječu gljive može utjecati na njihov kemijski sastav, pa samim time mogu pokazivati i različitu antimikrobnu aktivnost.

Najbolju antimikrobnu aktivnost, u našem radu, su pokazale mrka trubača – *C. cornucopioides* i prosenjak – *H. repandum* koje su u koncentraciji od 100 mg/mL djelovale bakteriostatski na sve odabrane bakterijske vrste. Naši rezultati koji se odnose na *C. cornucopioides* u skladu su s istraživanjem Kola i sur. koji su također pokazali visok antimikrobni potencijal ove gljive prema nizu bakterijskih vrsta uključujući *S. aureus*, *E. faecalis* i *E. coli* koje smo i mi testirali. (40) Pretpostavili su da je za iskazanu antibakterijsku djelotvornost odgovorna vrlo velika količina ukupnih fenola, odnosno glavni fenoli, galna i p-kumarinska kiselina, koje su odredili tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC - High performance liquid chromatography). Özcan i Ertan su ispitali acetonski ekstrakt *H. repandum* i pokazali značajan antimikrobni učinak prema *S. aureus*, *E. faecalis* i *P. aeruginosa*, što smo i mi dokazali za metanolni ekstrakt iste gljive. (41) Isti su autori potvrdili da *H. repandum* sadrži visoke količine β -glukana. Ovaj je spoj građivni dio stanične stijenke gljive koji se strukturno i količinom razlikuje među različitim rodovima gljiva i odgovoran je za njihove bioaktivne sposobnosti, uključujući i antimikrobni učinak. (42)

Rezultati našeg istraživanja pokazuju da su odabrane gljive pokazale najveću antibakterijsku aktivnost protiv zlatnog stafilokoka i pseudomonasa, zatim ešerihije, dok se enterokok pokazao najrezistentnijim na gljivične ekstrakte. Slične su rezultate objavili i neki drugi autori

koji su ispitivali različite biljne ekstrakte na niz gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija. U njihovim je radovima *S. aureus* bio najosjetljivija, a *E. coli* i *E. faecalis* najotpornije bakterije te se čini da su gram-pozitivne bakterije osjetljivije na biljne ekstrakte od gram-negativnih. (43, 44, 45) To se može tumačiti razlikama u građi stanične stijenke gram-negativnih bakterija, s periplazmatskim prostorom i vanjskom stijenkom s lipopolisaharidom, ali i zbog karakteristika samih biljnih ekstrakata. Međutim, iz naših je rezultata vidljivo da su značajne i razlike između pojedinih vrsta gram-pozitivnih, kao i između gram-negativnih bakterija. *S. aureus* je osjetljiviji na ekstrakte svih gljiva od *E. faecalis*, iako imaju sličnu mikromorfologiju i sposobnost bojenja po Gramu. Također, *Pseudomonas* se pokazao osjetljivijim na ekstrakte gljiva nego *E. coli*.

U ovoj studiji, dobivene MIK vrijednosti ekstrakata gljiva bile su niže od MBK vrijednosti, sugerirajući da su ekstrakti ispitivanih gljiva bakteriostatski u nižim, ali baktericidni u višim koncentracijama. U koncentraciji od 100 mg/mL, ekstrakti svih ispitivanih gljiva djelovali su baktericidno na *P. aeruginosa*. Za razliku od spomenutog, *E. faecalis* pokazao se najrezistentnijom ispitivanom bakterijom, s obzirom na to da baktericidni učinak nije postignut od strane *M. procera*, *L. piperatus* i *C. nebularis*, dok su *H. repandum* i *C. cornucopioides* postigli baktericidnost u najvišoj ispitivanoj koncentraciji od 200 mg/mL.

Naše je istraživanje pokazalo da među ispitanim samoniklim gljivama postoji antimikrobni potencijal te da bi bioaktivni spojevi dobiveni iz viših gljiva mogli imati obećavajuću ulogu u potrazi za novim antibioticima.

5 Zaključak

Usljed rastuće rezistencije prema konvencionalnim antibioticima, neprekidno se traga za novim alternativnim, prirodnim antimikrobnim supstancijama.

U ovom je radu ispitana antimikrobna aktivnost samoniklih jestivih gljiva (*Macrolepiota procera*, *Lactarius piperatus*, *Hydnum repandum*, *Clitocybe nebularis*, *Craterellus cornucopioides*) prikupljenih na području Primorsko-goranske županije prema odabranim gram-negativnim (*Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*) i gram-pozitivnim (*S.taphylococcus aureus* i *Eenterococcus faecalis*) ATCC sojevima bakterija.

Disk difuzijska metoda antibiograma, bez obzira na tehniku izvedbe (disk difuzija ili difuzija u jažicama), nije se pokazala pogodnom za ispitivanje antimikrobne djelotvornosti ekstrakata gljiva. Mikrodilucijskom metodom određene su vrijednosti minimalne inhibicijske i minimalne baktericidne za metanolni ekstrakt svake od ispitivanih gljiva.

Najslabiji antimikrobni učinak ustanovljen je za ekstrakt gljive *M. procera*, praćen skromnim učinkom *C. nebularis*. Najbolju antimikrobnu djelotvornost pokazale su *C. cornucopioides* i *H. repandum* koje su u koncentraciji od 50 mg/mL do 100 mg/mL djelovale bakteriostatski na sve testirane bakterije.

Među gram-pozitivnim bakterijama osjetljivijim se pokazao *S. aureus*, a među gram-negativnim *P. aeruginosa*. *E. faecalis* bio je najrezistentniji među ispitivanim bakterijama.

Gljive mogu predstavljati novi, neiskorišteni izvor bioaktivnih tvari s antimikrobnom aktivnošću. Postoji potreba za daljnjim istraživanjima u smislu izolacije i pročišćavanja

spojeva ili molekula iz ekstrakata odgovornih za antimikrobna svojstva gljiva koji bi mogli služiti kao potencijalni budući antibiotici.

6 Sažetak

Gljive su najrasprostranjeniji organizmi na Zemlji sa značajnom ulogom u odvijanju ekoloških procesa u brojnim, posebno šumskim, ekosustavima. Cilj ovog istraživanja je bio *in vitro* istražiti antimikrobnu aktivnost samoniklih gljiva *Macrolepiota procera*, *Lactarius piperatus*, *Hydnum repandum*, *Clitocybe nebularis* i *Craterellus cornucopioides* prikupljenih na području Primorsko-goranske županije.

Metanolni ekstrakti odabranih gljiva testirani su prema dvije gram-negativne (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) i dvije gram-pozitivne (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 292129) bakterije. Antimikrobni učinak određen je korištenjem difuzijskih (disk-difuzija i difuzija u jažicama) i mikrodilucijske metode kojom su određene vrijednosti minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije.

U najvećoj ispitivanoj koncentraciji (200 mg/mL) sve su gljive pokazale inhibitorni učinak prema svim odabranim bakterijama, osim *M. procera* koja ni u najvećoj koncentraciji nije inhibirala rast bakterije *E. faecalis*. *M. procera* je pokazala naslabiju antimikrobnu aktivnost u usporedbi s ostalim ispitivanih gljivama. Ekstrakt gljive *C. nebularis* ima skromnu antimikrobnu djelotvornost, posebno prema gram-pozitivnim bakterijama. Najbolji antimikrobni učinak uočen je za gljive *C. cornucopioides* i *H. repandum* koje su u koncentraciji od 100 mg/mL djelovale bakteriostatski na sve odabrane bakterije. Od gram-pozitivnih bakterija osjetljivijim se pokazao *S. aureus*, a među gram-negativnim *P. aeruginosa*. *Enterococcus faecalis* bio je najrezistentniji među ispitivanim bakterijama.

Rezultati su pokazali da ekstrakti jestivih gljiva, posebno gljiva *C. cornucopioides* i *H. repandum* s iskazanim antimikrobnim učinkom, mogu biti izvor novih bioaktivnih spojeva s potencijalnom primjenom u medicini, farmaceutskoj i prehrambenoj industriji.

Ključne riječi: antimikrobna aktivnost, bakterije, ekstrakt gljive

7 Summary

Mushrooms are the most widespread organisms on Earth with a significant role in the ecological processes in numerous, especially forest, ecosystems. The aim of this study was to investigate *in vitro* the antimicrobial activity of *Macrolepiotia procera*, *Lactarius piperatus*, *Hydnum repandum*, *Clitocybe nebularis* and *Craterellus cornucopioides* collected in the forests of the Primorsko-goranska county.

Methanol extracts of the selected mushrooms were tested against two gram negative (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) and two gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 292129). The antimicrobial effect was determined using diffusion methods (disc diffusion and diffusion in the wells) and a microdilution method which determines minimal inhibitory and minimal bactericidal concentrations.

At the highest concentration tested (200 mg/mL), all fungi showed an inhibitory effect on all selected bacteria, except *M. procera* which did not inhibit the growth of bacterium *E. faecalis* even at the highest concentration. *M. procera* showed the weakest antimicrobial activity compared to other investigated mushrooms. *C. nebularis* extract has modest antimicrobial efficacy, especially against gram-positive bacteria. The best antimicrobial effect was observed for fungi *C. cornucopioides* and *H. repandum*, which at concentrations of 100 mg/mL acted bacteriostatic against all selected bacteria. Among the gram-positive bacteria, *S. aureus* proved to be more susceptible to mushrooms extract, while among gram-negative more susceptible was *P. aeruginosa*. *E. faecalis* was the most resistant among the bacteria tested.

The results have shown that edible mushroom extracts, especially *C. cornucopioides* and *H. repandum* with expressed antimicrobial effects, can be the source of new bioactive compounds with potential use in medicine, as well as pharmaceutical and food industry.

Key words: antimicrobial activity, bacteria, mushroom extract

8 Literatura

1. Poucheret P, Fons F, Rapior S. Biological and pharmacological activity of higher fungi: 20-Year retrospective analysis. *Mycologie* 2006; 27: 311–333
2. Barros L, Baptista P, Estevinho LM, Ferreira, IC. Effect of fruiting body maturity stage on chemical composition and antimicrobial activity of *Lactarius* sp. mushrooms. *J Agric Food Chem.* 2007; 55: 8766-8771
3. Alves MJ, Ferreira IC, Dias J, Teixeira V, Martins A, Pintado M. A Review on Antimicrobial Activity of Mushroom (Basidiomycetes) Extracts and Isolated Compounds. *Planta Med* 2012; 78: 1707–1718.
4. Jurica K, Brčić Karačonji I, Gobin I. Ljekovito bilje i biljni pripravci u liječenju urinarnih infekcija. *Medicina fluminensis* 2018; 54: 262-267
5. Peruč D, Gobin I, Abram M, Broznić D, Svalina T, Štifter S et al. Antimycobacterial potential of the juniper berry essential oil in tap water. *Arh Hig Rada Toksikol* 2018;69:46-54
6. Lindequist U, Niedermeyer THJ, Jülich WD. The pharmacological potential of mushrooms. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2005; 2: 285–299
7. Rao JR, Smyth TJ, Millar BC, Moore JE. Antimicrobial properties of shiitake mushrooms (*Lentinula edodes*). *Int J Antimicrob Agents.* 2009; 33: 591-592
8. Sharma S, Prakash S. To detect the minimum inhibitory concentration and time-kill curve of shiitake mushroom on periodontal pathogens: An in vitro study. *J Indian Soc Periodontol.* 2019; 23: 216-219.
9. Lukić T. Toksikologija gljiva. Slavonski Brod: Posavska Hrvatska; 2012.
10. Božac R. Gljive: Morfologija Sistematika Toksikologija. 6. izd., Zagreb: Školska knjiga; 2013.
11. Novak B. Uzgoj gljiva. *Glasnik zaštite bilja* 2009; 4: 64-70

12. Državni zavod za statistiku Republike Hrvatske. Statistički ljetopis Republike Hrvatske 2018. Zagreb, 2018
13. Enciklopedija.hr [Internet]. Zagreb: Leksikografski zavod Miroslav Krleža. Dostupno na: <http://www.enciklopedija.hr> (Pristupljeno: lipanj 2019)
14. Matija Josipović. Očaravajući svijet gljiva. Rijeka: Leo-commerce, 2016.
15. Kalenić S i suradnici. Medicinska mikrobiologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2013.
16. Harbarth S, Harris AD, Carmeli Y, Samore MH. Parallel analysis of individual and aggregated data on antibiotic exposure and resistance in gram-negative bacilli. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 1462–1468
17. Segal-Maurer S, Urban C, Rahal Jr. JJ. Current perspectives on multidrugresistant bacteria. *Epidemiology and control. Infect Dis Clin North Am* 1996; 10: 939–957
18. Abram M, Škrobonja I, Ambrožić D, Repac-Antić D, Bubonja Šonje M. ESKAPE – bakterije koje su uzbunile svijet. *Medicina fluminensis* 2018; 54: 242-253
19. Janeš D, Kreft S, Jurc M, Seme K, Štrukelj B. Antibacterial Activity in Higher Fungi (Mushrooms) and Endophytic Fungi from Slovenia. *Pharmaceutical Biology* 2007; 45: 700-706
20. Abram M. Mikrobiolozi u borbi protiv superbakterija i antimikrobne rezistencije. *Medicina fluminensis* 2018; 54: 240-241
21. Banu A, Kabbin JS, Anand M. Extraintestinal Infections due to Escherichia Coli: An Emerging Issue. *J Clin Diag Res.* 2011; 5: 486-490
22. Manges AR. Escherichia coli and urinary tract infections: the role of poultry-meat. *Clin Microbiol Infect.* 2016; 22:122-129
23. Jawetz, Melnick, Adelberg. Medicinska mikrobiologija. 26. izd., Split: PLACEBO d.o.o; 2015.

24. Kovačić A, Tafra D, Hrenović J, Goić-Barišić I, Dumanić T. Preživljavanje bakterije *Pseudomonas aeruginosa* u destiliranoj vodi. *Hrvatske vode* 2018; 26 105 181-186
25. Gužvinec M, Butić I, Jelić M, Bukovski S, Lucić S, Tambić Andrašević A. Rezistencija na antibiotike u bakterije *Pseudomonas aeruginosa*. *Infektološki glasnik* 2012; 32: 71–80
26. Mohamed N, Timofeyeva Y, Jamrozny D, Rojas E, Hao L, Silmon de Monerri NC et al. Molecular epidemiology and expression of capsular polysaccharides in *Staphylococcus aureus* clinical isolates in the United States. *PLoS One*. 2019; 14. dostupno na <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0208356> (Pristupljeno: lipanj 2019)
27. Budimir A, Bošnjak Z, Kalenić S. Meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA) u Hrvatskoj. *Infektološki glasnik* 2012; 32: 59–66
28. Appelbaum PC. Microbiology of Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 2007; 45: 165-170 dostupno na: https://academic.oup.com/cid/article/45/Supplement_3/S165/269712 (Pristupljeno: lipanj 2019)
29. Repac Antić S, Gobin I, Begić G, Štifter S, Abram M. Fenotipska karakterizacija i antimikrobni profil uropatogenih enterokoka. *Medicina fluminensis* 2018; 54: 304-311
30. Eloff, JN. A Sensitive and Quick Microplate Method to Determine the Minimal Inhibitory Concentration of Plant Extracts for Bacteria. *Planta medica*. 1998; 64:711-713.
31. Aslam B, Wang W, Arshad MI, Khurshid M, Muzammil S, Rasool MH et al. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infect Drug Resist*. 2018; 11: 1645-

- 1658 dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6188119/>
(Pristupljeno: lipanj 2019)
32. Betts JW, Hornsey M, La Ragione RM. Novel Antibacterials: Alternatives to Traditional Antibiotics. *Adv Microb Physiol.* 2018; 73: 123-169
33. Van Ngo T, Scarlett CJ, Bowyer MC, Ngo PD, Van Vuong Q. Impact of Different Extraction Solvents on Bioactive Compounds and Antioxidant Capacity from the Root of *Salacia chinensis* L. *J Food Quality.* 2017; ID 930504 dostupno na: <https://www.hindawi.com/journals/jfq/2017/9305047/> (Pristupljeno: lipanj 2019)
34. Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal.* 2016; 6: 71-79. dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5762448/> (Pristupljeno: lipanj 2019)
35. Klančnik A, Piskernik S, Jeršek B, Smole Možina S. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *J Microbiol Methods.* 2010; 81 :121-6.
36. Bubonja M, Mesarić M, Miše A, Jakovac M, Abram M. Utjecaj različitih čimbenika na rezultate testiranja osjetljivosti bakterija disk difuzijskom metodom. *Medicina* 2008; 44: 280-282
37. Kosanić M, Ranković B, Dašić M. Mushrooms as Possible Antioxidant and Antimicrobial Agents. *Iran J Pharm Res* 2012; 11 (4): 1095-1102.
38. Dimitrijevic MV, Mitic VD, Nikolic JS, Djordjevic AS, Mutic JJ, Stankov Jovanovic VP, et al. First Report about Mineral Content, Fatty Acids Composition and Biological Activities of Four Wild Edible Mushrooms. *Chem Biodivers.* 2019; 16 (2). dostupno na <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cbdv.201800492> (Pristupljeno: lipanj 2019)

39. Kim YS, Lee IK, Seok SJ, Yun BS. Chemical Constituents of the Fruiting Bodies of *Clitocybe nebularis* and Their Antifungal Activity. *Mycobiology*. 2008; 36: 110-113. dostupno na: <https://pdfs.semanticscholar.org/5821/585f6f16565ed5c29c5a191b9c6e5273e49f.pdf> (Pristupljeno: lipanj 2019)
40. Kol S, Bostanci A, Kocabas A, Uzun Y, Sadi G. Cell growth inhibitory potential of *Craterellus cornucopioides* (L.) Pers together with antioxidant and antimicrobial properties. *Ant J Bot*. 2018; 2: 60-64. dostupno na: <https://dergipark.org.tr/download/article-file/482699> (Pristupljeno: lipanj 2019)
41. Özcan Ö, Ertan F. Beta-glucan Content, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Some Edible Mushroom Species. *Food Scie Technol* 2018; 6: 47-55. dostupno na: <http://www.hrpub.org/download/20180330/FST1-11111327.pdf> (Pristupljeno: lipanj 2019)
42. Chamidah A, Hardoko A, Prihanto AA. Antibacterial Activities of β -Glucan (Laminaran) against Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. The 7th International Conference on Global Resource Conservation. *AIP Conf. Proc.* 1844, 020011-1–020011-7. dostupno na: <https://aip.scitation.org/doi/pdf/10.1063/1.4983422> (Pristupljeno: lipanj 2019)
43. Koohsari H, Ghaemi EA, Sadegh Sheshpoli M, Jahedi M, Zahiri M. The investigation of antibacterial activity of selected native plants from North of Iran. *J Med Life*. 2015; 8: 38-42. dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5327717/> (Pristupljeno: lipanj 2019)
44. Abd Razik BM, Hasan HA, Murtadha MK. The Study of Antibacterial Activity of *Plantago Major* and *Ceratonia Siliqua*. *The Iraqi Postgraduate*. 2012; 11: 130–135.

45. Cock IE. Antibacterial Activity of Selected Australian Native Plant Extracts. The Internet Journal of Microbiology. 2008;4,2:1–8.

9 Životopis

Filip Brnobić je rođen 08.05.1995. godine u Rijeci. Osnovnu školu pohađao je u Buzetu. Nakon završene osnovne škole školovanje je nastavio u Srednjoj školi Buzet smjer gimnazija. Nakon završetka gimnazije 2013. godine je upisao Integrirani preddiplomski i diplomski sveučilišni studij Medicina u Rijeci.

Za vrijeme studiranja bio je 3 godine član organizacijskog odbora kongresa „Javnozdravstveni aspekti gospodarenja otpadom - zaštitimo zdravlje i okoliš“. Sudjelovao je u programu studentskih razmjena te je 2018. godine bio u poljskoj bolnici Berlicki University Hospital na odjelu opće kirurgije. Pohađao je Ljetnu školu intervencijske radiologije. Na kongresu hitne medicine jednom je sudjelovao kao aktivni član, a jednom kao pasivni. U dva navrata sudjelovao je u Natjecanju u kliničkim vještinama. Pohađao je radionicu „Kako napisati dobar prikaz slučaja“ te školu „Osnova znanstvenog izražavanja“.

Od svoje dvanaeste godine aktivan je član Glazbenog društva „Sokol“ Buzet gdje svira u limenoj glazbi i Streljačkog kluba Augustin Vivoda Buzet. Član je Auto kluba Buzet u kojem djeluje kao licencirani sudac HAKS-a.