

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET

SILVIJA ZLATAR

**ODREĐIVANJE ANTIBAKTERIJSKE MINIMALNE INHIBITORNE
KONCENTRACIJE MEDA**

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2014.

Sveučilište u Zagrebu

Veterinarski fakultet

Zavod za biologiju i patologiju riba i pčela

PREDSTOJNICA:

Doc. dr. sc. Ivana Tlak Gajger

MENTORICE:

Doc. dr. sc. Ivana Tlak Gajger

Dr. sc. Josipa Vlainić

Članovi povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. Prof. dr. sc. Ivan Kosalec
2. Dr. sc. Josipa Vlainić
3. Doc. dr. sc. Ivana Tlak Gajger

ZAHVALE

Zahvaljujem mentoricama doc. dr. sc. Ivani Tlak Gajger i dr. sc. Josipi Vlainić na pruženoj mogućnosti, podršci i savjetima, kao i prof. dr. sc. Ivanu Kosalecu na pomoći pri izradi eksperimentalnog dijela ovog rada.

Također zahvaljujem obitelji i prijateljima na podršci i razumijevanju tijekom studiranja.

Rad je izrađen na Zavodu za biologiju i patologiju riba i pčela, te Zavodu za mikrobiologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Dio istraživanja je proveden u Laboratoriju za molekularnu neurofarmakologiju u Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković, Zagreb.

POPIS TABLICA

Tablica 1. Vrijednost standarda na McFarland skali.

Tablica 2. Minimalna inhibitorna koncentracija meda amorge.

Tablica 3. Minimalna inhibitorna koncentracija meda bagrema.

Tablica 4. Minimalna inhibitorna koncentracija meda bijele djeteline.

Tablica 5. Minimalna inhibitorna koncentracija meda divljeg duhana.

Tablica 6. Minimalna inhibitorna koncentracija meda drače.

Tablica 7. Minimalna inhibitorna koncentracija meda hrasta medunca.

Tablica 8. Minimalna inhibitorna koncentracija meda kadulje.

Tablica 9. Minimalna inhibitorna koncentracija meda kestena.

Tablica 10. Minimalna inhibitorna koncentracija meda kupine.

Tablica 11. Minimalna inhibitorna koncentracija meda lavande.

Tablica 12. Minimalna inhibitorna koncentracija meda lipe.

Tablica 13. Minimalna inhibitorna koncentracija meda medljike jele.

Tablica 14. Minimalna inhibitorna koncentracija meda ružmarina.

Tablica 15. Minimalna inhibitorna koncentracija meda suncokreta.

Tablica 16. Minimalna inhibitorna koncentracija meda tilovine.

Tablica 17. Minimalna inhibitorna koncentracija meda vrieska.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. PODATCI IZ LITERATURE	2
2.1. Med	2
2.2. Vrste meda i kemijski sastav	3
2.2.1. <i>Medonosno bilje</i>	6
2.3. Bakterije.....	9
2.3.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	9
2.3.2. <i>Enterococcus faecalis</i>	10
2.3.3. <i>Bacillus subtilis</i>	10
2.3.4. <i>Listeria monocytogenes</i>	10
2.3.5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
2.3.6. <i>Salmonella enteritica</i>	11
2.3.7. <i>Escherichia coli</i>	11
2.3.8. <i>Escherichia coli</i> 0157:H7.....	12
3. MATERIJALI I METODE.....	13
3.1. Uzorkovanje.....	13
3.1.1. <i>Melisopalinološka analiza uzoraka meda</i>	13
3.1.2. <i>Umjetni med</i>	14
3.2. Određivanje pH.....	14
3.3. Odabir bakterija i određivanje gustoće bakterijske suspenzije	14
3.4. Hranjiva podloga.....	15
3.5. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije meda.....	16
4. REZULTATI	17
4.1. Antimikrobna svojstva meda amorfe	17
4.2. Antimikrobna svojstva meda bagrema	17
4.3. Antimikrobna svojstva meda bijele djeteline.....	18

4.4. Antimikrobna svojstva meda divljeg duhana.....	19
4.5. Antimikrobna svojstva meda drače.....	20
4.6. Antimikrobna svojstva meda hrasta meduna	20
4.7. Antimikrobna svojstva meda kadulje	21
4.8. Antimikrobna svojstva meda kestena	22
4.9. Antimikrobna svojstva meda kupine	23
4.10. Antimikrobna svojstva meda lavande	23
4.11. Antimikrobna svojstva meda lipe	24
4.12. Antimikrobna svojstva meda medljikovca jele.....	25
4.13. Antimikrobna svojstva meda ružmarina	25
4.14. Antimikrobna svojstva meda suncokreta	26
4.15. Antimikrobna svojstva meda tilovine	27
4.16. Antimikrobna svojstva meda vrijeska.....	27
5. RASPRAVA.....	29
6. ZAKLJUČCI	33
7. LITERATURA	34
8. SAŽETAK	36
9. SUMMARY	37
10. ŽIVOTOPIS	38

1. UVOD

Med se kao hrana i prirodni zaslađivač koristi od najstarijih vremena. Tako se njegova primjena spominje već u sumeranskim zapisima, i to, ne samo kao hrane, nego i kao ljekovitog sredstva. Med se u mnogim civilizacijama i kulturama tijekom povijesti koristio u medicinske svrhe, te za poboljšanje općeg fiziološkog stanja. Međutim, tek je u novije vrijeme medicinski prepoznata njegova učinkovitost.

Poznato je da med ima određena protuupalna svojstva, te se koristi se kao prirodni konzervans jer zaustavlja oksidacijske reakcije. Različite vrste meda mogu s različitom učinkovitošću inhibitorno djelovati na rast mnogobrojnih mikroorganizama koji uzrokuju bolesti i infekcije ljudi i/ili životinja. Iz navedenog razloga medu se pripisuje antimikrobno djelovanje obzirom na njegovu kiselost, osmolarnost, enzimsko stvaranje vodikovog peroksida preko glukoza – oksidaze, te prisutnosti specifičnih tvari u sastavu pojedinog meda kao što su aromatske kiseline, fenolni spojevi i flavonoidi. Također, različiti peroksidni i neperoksidni sastojci meda mogu značajno utjecati na rast i umnažanje niza patogenih bakterija uzročnika infekcija ili kvarenja hrane.

Sastav meda je iznimno promjenjiv i primarno ovisi o botaničkom porijeklu, no istodobno na isti mogu utjecati mnogostruki okolišni čimbenici. Budući su antibakterijska svojstva meda poznata dugo godina, a nedovoljno znanje o sastojcima i čimbenicima koji su nosioci takve aktivnosti čine glavnu prepreku za njegovu moguću kliničku primjenu, nužno je istražiti antibakterijska svojstva različitih vrsta meda obzirom na botaničko i zemljopisno porijeklo tijekom više uzastopnih godina.

Cilj ovog istraživanja je odrediti minimalne inhibitorne koncentracije uzoraka meda različitog biljnog porijekla s područja Dalmacije i dalmatinskog zaleđa, te kontinentalnog dijela Republike Hrvatske (RH).

2. PODATCI IZ LITERATURE

2.1. Med

Pčele proizvode više pčelinjih proizvoda: matičnu mliječ, vosak i pčelinji otrov koje proizvode u svojem tijelu; te med, pelud i propolis koje skupljaju u prirodi te prerađuju dodavanjem specifičnih tvari. Od pobrojanih med se smatra glavnim pčelinjim proizvodom, no razvojem apiterapije i drugi dobivaju na značenju.

Med je prirodan proizvod kojeg proizvode medonosne pčele (*Apis mellifera*), od skupljenog nektara i medne rose. Med se kao hrana i prirodni zaslađivač koristi od najstarijih vremena. Tako se njegova primjena spominje već u sumeranskim zapisima. Med se u mnogim civilizacijama i kulturama tijekom povijesti koristio kao hrana ali i u medicinske svrhe. Med se koristi kao topičko sredstvo kod opekлина, katarakte, ulkusa i za cijeljenje rana. Naime, zbog fizikalnih svojstava med čini svojevrsnu zaštitu rane te stvara pogodne uvjete za cijeljenje. Poznato je također da med ima određena protuupalna svojstva. Također, koristi se i kao prirodni konzervans jer zaustavlja oksidacijske reakcije kao što su lipidna oksidacija mesa, enzimsko tamnjenje voća i povrća, gubitak boje uslijed oksidacije kao posljedice izloženosti svjetlu, toplini ili nekim metalima.

Sastav meda je iznimno promjenjiv i primarno ovisi o botaničkom porijeklu, no istodobno o sastavu tla na kojem je rasla medonosna biljka, vlazi zraka, temperaturi i procesu zrenja meda. Med sadrži najmanje 180 spojeva. On je prezasićena otopina šećera, prvenstveno monosaharida fruktoze (38 %) i glukoze (31 %), a sadrži minerale, bjelančevine, slobodne aminokiseline, organske kiseline, fitokemikalije, enzime i vitamine (ALVAREZ-SUAREZ i sur., 2013.).

Med ima veliku mogućnost upotrebe jer djeluje kao antioksidans u različitim sustavima. Tako se koristi kao prirodni konzervans hrane, posebice mesa, jer sprječava rast mikroorganizama i inhibira oksidativne reakcije (McKIBBEN i ENGESETH, 2002.). Osim pobrojanog, med učinkovito štiti od kemijski potaknute lipidne peroksidacije jetre, mozga i bubrega kod štakora. Smatra se kako antioksidacijski kapacitet meda može biti indikator prisutnosti bioaktivnih molekula u medu. Antioksidacijski kapacitet ovisi o botaničkom porijeklu meda, a zbog razlike u sekundarnim metabolitima koji se nalaze u biljkama. Antioksidacijski kapacitet meda značajno korelira sa sadržajem ukupnih fenola (GHELDOLF i sur. 2002.), a smatra se da su polifenoli najvažniji za isti. Flavonoidi su

kelatori metala, izvrsno vežu slobodne radikale te kao modulatori gena vrlo učinkovito djeluju na enzimske i ne-enzimske sustave kojima stanica regulira redoks ravnotežu (JAZVINŠČAK JEMBREK i sur., 2012.). Budući da oksidacijske modifikacije lipoproteina imaju važnu ulogu u patogenezi ateroskleroze, pokazalo se kako med učinkovito djeluje u njenoj prevenciji, a dodatno to čini i pozitivnim djelovanjem na funkciju endotela krvnih žila (BERETTA i sur., 2008.). YAGHOوبي i suradnici (2008.) pokazali su kako med ima pozitivne učinke na kardiovaskularne rizične čimbenike te hipertenziju i smanjenje oksidativnog stresa. Rezultati istraživanja su također pokazali pozitivne učinke polifenola iz meda u inhibiciji mutageneze i indukciji apoptoze kod karcinogeno promijenjenih stanica (antiproliferativni učinak). Med bi se, također, mogao koristiti i kao preventiva protiv razvoja degenerativnih bolesti (BERETTA i sur. 2005.).

Antimikrobno djelovanje meda je vrlo složeno zbog brojnih sastojaka koje su u njega uključene, ali i zbog velike promjenjivosti istih. Dosadašnja istraživanja pokazala su kako su visoki sadržaj šećera, vodikov peroksid, niski pH, te u novije vrijeme, flavonoidi, metilglioksal i protein pčelinji defenzin-1, važni antimikrobni sastojci meda (MOLAN, 1992.a, ALVAREZ-SUAREZ i sur., 2013.).

2.2. Vrste meda i kemijski sastav

Prema Pravilniku o kakvoći meda i drugih pčelinjih proizvoda (N.N. 20/00) med „jest sladak, gust, viskozni, tekući ili kristaliziran proizvod što ga medonosne pčele (*Apis mellifera*) proizvode od nektara medonosnih biljaka ili sekreta živih dijelova biljaka ili izlučevina kukaca koji sišu na živim dijelovima biljaka, koje pčele skupljaju, dodaju mu vlastite specifične tvari, izdvajaju vodu i odlažu u stanice saća do sazrijevanja“ (ANON, 2000.). Codex standard med definira kao prirodnu slatku tvar koju od nektara biljaka ili izlučevina živih dijelova biljaka, odnosno izlučevina kukaca koji sišu sokove na živim dijelovima biljaka, proizvode medonosne pčele, na način da iste skupljaju, preinačuju dodajući im vlastite specifične tvari, odlažu, ishlapljaju, pohranjuju i ostavljaju u saću da sazrije. U ovim definicijama, ogleda se dvostruko podrijetlo meda: biljno i životinjsko.

Prema porijeklu razlikujemo dvije osnovne vrste meda: cvjetni ili nektarni med (med dobiven od nektara biljaka) i medljikovac ili medun (med dobiven uglavnom od

izlučevina kukaca koji žive na živim dijelovima biljaka ili od sekreta živih dijelova biljaka).

Kemijski sastav meda djelomice ovisi o sirovinama iz kojeg su ga pčele proizvele, odnosno neke tvari u medu vode podrijetlo od medonosne biljke, neke od njih u med dodaju pčele, a neke nastaju tijekom zrenja meda u saću.

Voda čini 15 do 23% meda. Količina vode u medu značajno utječe na određena fizikalna svojstva meda (kristalizacija, viskoznost, specifična težina) a ovisi o klimatskim uvjetima, vlažnosti zraka, uvjetima prerade i o samom botaničkom podrijetlu meda. Količina vode u medu nije stalna nego se mijenja pri čuvanju ovisno o količini vlage u zraku (TUCAK i sur., 1999.). Udio vode u medu je najvažniji parametar kakvoće budući da određuje stabilnost meda i otpornost na mikrobiološko kvarenje tijekom čuvanja.

Ugljikohidrati su glavni sastojak meda i njihov udio je 73 do 83%, što med čini prezasićenom otopinom šećera. Monosaharidi glukoza i fruktoza čine prosječno 88 do 95 % ukupnih ugljikohidrata, a daju medu slatkoću i energetska vrijednost. Glukoza i fruktoza najviše utječu na fizikalna svojstva meda kao što su viskoznost, gustoća, ljepljivost, sklonost kristalizaciji, higroskopnost te mikrobiološka aktivnost. Količina pojedinih šećera u nektaru, a slijedom toga i u medu, ovisi o vrsti biljke, ali i o klimatskim, zemljopisnim i drugim okolišnim uvjetima.

U medu nalazimo *organske kiseline* u malim količinama (udio organskih kiselina u medu je prosječno 0,57%). Neke kiseline se unose u med nektarom, odnosno medljikom, a neke nastaju tijekom sazrijevanja i pohrane meda. U medu su prisutne glukonska, mravlja, oksalna, jantarna, limunska, vinska, mliječna, maslačna, maleinska, pirog glutaminska, valerijanska i benzojeva kiselina. Najzastupljenija je glukonska kiselina koja u medu nastaje iz glukoze djelovanjem enzima glukoza oksidaze. Ukupna kiselost (pH) je važan pokazatelj kakvoće meda, zbog povezanosti udjela kiselina s fermentacijskim procesima, okusom i mirisom te baktericidnim svojstvima. Općenito gledano, tamniji medovi imaju veću kiselost.

Sastav *mineralnih tvari* ovisi o botaničkom podrijetlu meda, ali i o klimatskim uvjetima i kemijskom sastavu tla na kojem je rasla medonosna biljka. Udio mineralnih tvari je malen (do najviše 1%), no sadrži gotovo sve elemente koji su značajni za ljudski organizam. U medu prevladavaju natrij, kalcij, sumpor, fosfor, kalij, željezo, magnezij i

aluminij, dok se u malim količinama mogu naći krom, mangan, bakar, arsen i selen. Tamnije vrste meda su bogatije mineralnim tvarima te pretežno sadrže kalcij, magnezij, fosfor i aluminij, dok su kod svijetlih medova najzastupljeniji kalij, natrij, silicij, fosfor i kalcij (TUCAK i sur., 1999.).

Fitokemikalije u medu potječu iz biljaka s kojih su pčele skupljale nektar ili mednu rosu, te mogu povoljno utjecati na brojne procese u organizmu. Neke fitokemikalije u medu djeluju kao antioksidansi. Antioksidansi u medu su različitog podrijetla, a mogu biti enzimski (katalaza, glukoza-oksidaža) i ne-enzimski (organske kiseline, proizvodi Maillardovih reakcija, aminokiseline, bjelančevine, flavonoidi, fenoli, vitamin C, vitamin E, karotenoidi).

Flavonoidi koji se najčešće nalaze u medu su pinocembrin, apigenin, kamferol, kvercetin, galangin, krisin, pinobanksin, luteolin i hesperitin. Osim što imaju antioksidativni učinak, flavonoidi djeluju antimikrobno, inhibiraju razne enzime, imaju citotoksični, protutumorski učinak te djeluju kao estrogeni.

Bjelančevine u medu su albumini, globulini i peptoni, a većina ih u med dospijeva iz žlijezda slinovnica pčela. U novije je vrijeme prepoznat značaj pčelinjeg proteina defenzina 1. Količina ukupnih bjelančevina u medu iznosi 0 do 1,7 %.

Vitamine u medu nalazimo u vrlo malim količinama, nedovoljnim za zadovoljenje potreba ljudskog organizma. U medu se može naći vitamin C, vitamini B kompleksa, niacin, pantotenska kiselina, biotin i folna kiselina a količina im uvelike ovisi o biljnom porijeklu meda, zrelosti meda, količini peludnih zrnaca u medu kao i o načinu skladištenja meda.

Neki *enzimi* u med dospijevaju već u mednom mjehuru pčela dok drugi potječu iz peluda, nektara ili ih stvaraju i otpuštaju gljive i bakterije, koje se ponekad može utvrditi u medu. Istraživanjima je utvrđeno da primjerice enzim glukoza oksidaža posredno utječe na antimikrobnu aktivnost meda oksidacijom glukoze pri čemu nastaje vodikov peroksid (SCHEPARTZ, 1965.).

Med sadrži i jako male količine *lipida* (triglicerida, fosfolipida, sterola, slobodnih masnih kiselina i estera masnih kiselina), koji pretežno potječu iz pčelinjeg voska.

2.2.1. Medonosno bilje

Amorfa (*Amorpha fruticosa* L.) se još naziva kineski bagrem ili bagremac jer je oblikom lista slična bagremu. To je korovna biljka koja je u Republiku Hrvatsku (RH) unesena i proširila se početkom 20. stoljeća iz susjedne Mađarske. Raste u Posavini u ritovima pored Dunava, u poplavnim područjima te uz rubove šuma i oranica. Raste grmoliko u gustim skupinama s mnogo šiba do dva metra visine. Ima ljubičaste do tamnocrvenkaste cvjetice koji se nalaze u klasastim cvatovima na vrhu grančica. Ne cvatu svi cvjetići odjednom, te pčele pojedine cvatove posjećuju čitavo vrijeme cvatnje. Cvate početkom lipnja. Med je tamnocrvenkast, blagog mirisa i finog okusa. Zbog bogatstva mineralnog i vitaminskog sastava cijenjen je u prehrani (BELČIĆ i SULIMANOVIĆ, 1982.).

Bagrem (*Robinia pseudoacacia* L.) potječe iz Sjeverne Amerike odakle je prenesen u Europu. Najviše ga ima u Baranji, Podravini, Hrvatskom zagorju i Moslavini, i to u nizinskim i brežuljkastim područjima, te na blagim i zaštićenim položajima. Cvate, ovisno o nadmorskoj visini, u svibnju i početkom lipnja (rana i kasna bagremova paša). Na jednom mjestu cvate do 20 dana. Može dobro mediti, a prinos po košnici može iznositi 15 do čak 50 kilograma meda. Lučenju nektara pogoduje mirno vrijeme i umjerene temperature zraka. Bagremov med je vrlo svijetao, bistar, ponekad ima žućkastu boju, blagog i ugodnog je mirisa, sporo kristalizira. Med bagrema je lagan i ukusan i ubraja se u najcjenjenije vrste meda (BELČIĆ i SULIMANOVIĆ, 1982.).

Bijela djetelina (*Trifolium repens* L.) je najviše zastupljena među medonosnim biljkama naših livada. Raste na brdskim i nizinskim pašnjacima i livadama te je rastom najniža od svih vrsta djetelina. Cvate od svibnja do pojave mrazova. Med je svijetao, bistar i proziran (BELČIĆ i SULIMANOVIĆ, 1982.).

Divlji duhan (*Asclepias syriaca* L.) je biljka poznata pod nazivom cigansko perje ili svilenica. Višegodišnja je zeljasta biljka, s jakim uspravnim stablom visine čak do 1,5 m. Listovi su izduženo eliptični, s naličja svijetlo zeleni, a s lice tamnije zeleni, pri vrhu zašiljeni. Cvjetovi su krupni, blijedo ružičaste do crvene boje.

Biljka uspijeva na sunčanim mjestima, na pjeskovitom i plodnom zemljištu. Naročito joj odgovaraju poplavna područja. Cvjeta u drugoj polovici lipnja. Med je svijetlo žute boje, ugodnog mirisa i arome. Prinosi nisu veliki i ovise o vlazi zraka, a ovisno o vremenskim uvjetima ponekad prije i u vrijeme cvatnje biljka ispušta mliječnu tekućinu na koju se lijepe pčele što može izazvati ozbiljne gubitke u pčelinjoj zajednici (BELČIĆ i SULIMANOVIĆ, 1982.).

Kadulja (Salvia officinalis L.) je višegodišnji drvenasti grm i poslije bagrema je najvrjednija pčelinja paša. U RH je široko raširena na područjima primorskog i dalmatinskog krša te u dijelovima Istre. Kadulja počinje cvasti koncem travnja i početkom svibnja, a cvatnja u unutrašnjosti i u višim predjelima završava oko polovice lipnja. Najbolje medi kad je toplo vrijeme s dosta vlage u zraku. Na medenje negativno utječe promjenjivo, kišno i hladno, kao i presuho i vjetrovito vrijeme. Kaduljin med je svijetložute, blago zelenkaste boje. Ugodnog je do blago gorkog okusa i ima izraziti miris po cvijetu biljke (BELČIĆ i SULIMANOVIĆ, 1982.).

Kesten (Castanea sativa Mill.) je unesen iz Azije i proširio se po cijeloj Europi. Raste u samoniklim šumama od kojih su najveće u okolici Petrinje, Hrvatske Kostajnice, Dvora na Uni, Zagreba (Medvednica) i u Istri. Duljina cvatnje ovisi o zemljopisnom položaju i nadmorskoj visini na kojoj biljka raste, a počinje u drugoj polovici lipnja i traje 10 do gotovo 20 dana. S ženskih cvjetova pčele skupljaju nektar, a s muških pelud (kesten se smatra najbogatijim izvorom peluda od svih medonosnih biljaka). Kestenov med je tamne boje, trpkog gotovo gorkog okusa, vrlo intenzivnog mirisa (BELČIĆ i SULIMANOVIĆ, 1982.).

Lavanda (Lavandula officinalis L.) je u našu zemlju prenesena iz Francuske, i vrlo je raširena u dalmatinskom području (posebice otoku Hvaru). Prvenstveno se uzgaja radi dobivanja eteričnog ulja. Cvate u lipnju i srpnju, oko 30 dana. Lavandin cvijet je veoma bogat izvor nektara te su prinosi meda po košnici visoki, a smatra se i jednom od najsigurnijih pčelinjih paša. S druge strane, cvjetovi lavande nemaju dovoljno peluda, tako da i za najbolje paše pčele redovito oslabe, a matica prestane nesti, pa može doći do potpunog nestanka

legla. Lavandin med je svijetložut, bistar i proziran, jakog mirisa po biljci i oštrog okusa (BELČIĆ i SULIMANOVIĆ, 1982.).

Lipa (Tilia cordata Mill.) raste kao stablašica s velikom, pravilnom, gustom krošnjama. Cvatovi su paštastasti s žutim dvospolnim pravilnim cvjetovima, zaštićenim pricvjetnim uskim listovima koji pomažu raspršivanju plodova na vjetru. Većih lipovih šuma u RH je malo te se većinom sade u parkovima i oko naselja. Lipa cvate od polovice lipnja do polovice srpnja. Med je blago žut do zelenkast, ugodna i oštra mirisa te se ubraja u prvoklasne vrste meda (BELČIĆ i SULIMANOVIĆ, 1982.).

Medljikovac je još poznat pod nazivom medna rosa, medun ili mana. Ima ga u šumama bjelogorice i crnogorice. Medljike ima najviše u hrastovim šumama Slavonije, Turopolju i okolici Siska. Prvu medljiku u svibnju na hrastu proizvode štitaste uši (*Coccidae sp.*) koje svojim rilcem sišu biljni sok i proizvode otpadnu tvar (mednu rosu), koju pomoću posebnih organa izbacuju iz organizma. Ponekad ju mogu proizvoditi i lisne uši (*Lachnidae sp.*), posebice vrbove uši (*Lachnus viminalis*). Medljika je za pčele zbog velike količine šećera melecitoze teško probavljiva te im kristalizira u zadnjem crijevu uzrokujući opterećenje, oštećenja crijevne stijenke i ugibanja. Hrastova medljika je tamnocrvenkasta dok je jelova tamnozelenkasta (BELČIĆ i SULIMANOVIĆ, 1982.).

Ružmarin (Rosmarinus officinalis L.) je još poznat i kao zimrad. Raste kao samonikli odrvenjeli grm s mnogo šibastih ogranaka u Sredozemnom pojasu. Kod nas raste na dalmatinskim otocima. Cvate krajem listopada, a u rujnu osigurava pčelama vrlo dobru pašu. Ako je zimi jako niska temperatura, ružmarin će procvasti u ožujku i ako mu posluži dobro vrijeme, može dati bolju pašu nego u jesen. Med je svijetao, proziran i bistar, kao ulje. Bez mirisa je, ugodnog i blagog okusa (BELČIĆ i SULIMANOVIĆ, 1982.).

Suncokret (Helianthus annus L.) je jednogodišnja uljana biljka koja potječe iz Meksika i Perua, odakle je proširen diljem svijeta. Na vrhu stabla izraste žuta cvjetna

glavica s više od 1000 cvjetova. Najviše ga ima u Slavoniji. Cvate na kraju lipnja i cvatnja traje oko 20 dana. Dobro medi, ali to ovisi o području. Medenju pogoduje stalno lijepo vrijeme s dosta vlage u zraku. Iza jakih pljuskova, magle i hladnoće medenje suncokreta zna potpuno prestati. Na suši sredina cvijeta izlučuje ljepljivu smolu od koje stradavaju pčele. Kada suncokret procvjeta najprije se otvore i mede krajnji cvjetovi, a središnji tek za pet do šest dana. Med je jantarno žut (BELČIĆ i SULIMANOVIĆ, 1982.).

Tilovina (Petteria ramentacea L.) je još poznata pod nazivom zanovet. Tilovina je visoka do četiri metra i grmolikog je oblika. Cvat je na vrhu grane klasasta izgleda, sa žutim cvjetovima. Ima jak omamljujući miris, koji se osjeti i u mlijeku stoke ukoliko ju konzumira. Cvate krajem ožujka ili početkom travnja i cvatnja traje do 30 dana. Spada u vrlo medonosne biljke. Med je tamnocrvenkast, mutna izgleda i neugodnog okusa. Med se sporo i nejednoliko kristalizira (BELČIĆ i SULIMANOVIĆ, 1982.).

Vrijesak (Satureja montana L.) je mediteranska biljka koja raste na području krša na nadmorskim visinama iznad 400 m i jedna je od najznačajnijih medonosnih biljaka u RH. Cvate od srpnja do listopada. Medi preko cijelog dana a najintenzivnije sredinom dana. Za obilnijeg medenja je dnevni unos u košnicu i do 14 kg nektara. Vrijeskov med je žut do tamnožut, slaba mirisa, ugodna specifična okusa (BELČIĆ i SULIMANOVIĆ, 1982.).

2.3. Bakterije

2.3.1. *Staphylococcus aureus*

S. aureus je gram-pozitivna, okrugla bakterija. Tvori brojne enzime i toksine koji značajno utječu na virulenciju pojedinih sojeva. Enterotoksini u ljudi uzrokuju alimentarne intoksikacije koje se očituju akutnim enteritisom s proljevom i povraćanjem. Toksini obično nastanu u hrani koja sadrži znatne količine ugljikohidrata (kolači, kreme, sladoled) kada se te namirnice drže u neprikladnim uvjetima. Sekundarne infekcije posebno su česte

nakon ranjavanja i kirurških zahvata. Ubraja se među najotpornije nesporigene bakterije (NAGLIĆ i sur., 2005.).

2.3.2. *Enterococcus faecalis*

Široko raširena gram-pozitivna, okrugla bakterija koja se redovito nalazi u crijevu ljudi i životinja, namirnicama, otpadnim vodama i biljkama. U ljudi ponekad uzrokuje mokraćno-spolne infekcije, endokarditis, meningitis, septikemiju, pneumoniju, enteritis, infekciju kože i rana. Kao uzročnik infekcija lako postane otporan prema antimikrobnim lijekovima (NAGLIĆ i sur., 2005.).

2.3.3. *Bacillus subtilis*

B.subtilis je gram-pozitivna, štapićasta bakterija koja je čest onečišćivač materijala za bakteriološku pretragu. Vrlo je proširena u okolišu. U ljudi ponekad uzrokuje trovanje hranom, posebice rižom. Bolest se očituje proljevom i povraćanjem koje uzrokuje toksin (emetički toksin i tri sekrecijska toksina) (NAGLIĆ i sur., 2005.).

2.3.4. *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes je gram-pozitivna, kokobacilarna ili štapićasta bakterija koja se nalazi u tlu, vodi i na površini biljaka. Njome je često onečišćena hrana biljnog i životinjskog podrijetla. Stvara hemolizin koji se naziva listeriolizin O kojim sprječava djelotvornost fagocitoze u napadnutom organizmu. U odraslih preživača izaziva meningoencefalitis dok u mladih preživača, monogastričnih sisavaca i ptica ima septikemijski oblik. Od listerioze najčešće obole djeca i trudnice. Odrasle osobe obole sa znacima sličnim gripi i to često preko onečišćene hrane. Pojavi bolesti pogoduju različiti čimbenici koji smanjuju otpornost organizma (NAGLIĆ i sur., 2005.).

2.3.5. *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa je gram-negativna, štapićasta bakterija koja obitava u tlu i vodi te na biljkama. Često se nalazi na koži, crijevu i izmetinama ljudi i toplokrvnih životinja. Tvori

egzotoksin A koji koči sintezu bjelančevina u stanicama domaćina i djeluje citotoksički. Uzrokuje gnojne infekcije u različitim tkivima (infekcije kože, dišnog sustava, konjunktiva, crijeva, mokraćnog i spolnog sustava te mliječne žlijezde) koje se ponekad razviju u septicemiju. Iako su sojevi *P. aeruginosa* osjetljivi na antibiotike, liječenje je najsigurnije provesti na osnovi rezultata antibiograma (NAGLIĆ i sur., 2005.).

2.3.6. *Salmonella enteritica*

S. enteritica je štapičasta, gram-negativna bakterija koja ima više od 2400 serovarova. Salmonele su česti obitavatelji toplokrvnih i hladnokrvnih životinja i ljudi. Patogenost je izražena kod organizama oslabljenog imuniteta. Ako se jako umnože u probavnom traktu uzrokuju gastroenteritis, povraćanje, proljev te upalu mokraćnih kanala. Uzrokuju alimentarne toksoinfekcije, infekcije kroničnih rana i opekotina, rijede sepsu, meningitis, upalu uha i konjunktivitis. Dosta su otporne na nepovoljne uvjete i u okolišu ponekad prežive i dulje od devet mjeseci. Salmonele proizvode endotoksine. U akutnom obliku salmoneloza se općenito očituje znacima groznice, anoreksijom, dehidracijom, jakim smrdljivim proljevom s čestim nalazom krvi i sluzi. Ljudi se mogu inficirati onečišćenim mesom ili mesnim prerađevinama, jajima ili jelima sa sirovim jajima, rjeđe onečišćenim mlijekom, vrhnjem, hranom morskog podrijetla ili salatama (NAGLIĆ i sur., 2005.).

2.3.7. *Escherichia coli*

E. coli je gram-negativna, štapičasta bakterija koja uobičajeno obitava u debelom crijevu i završnom dijelu tankog crijeva svih sisavaca. Izmetinama u velikom broju dospjeva u okoliš gdje tjednima i mjesecima može preživjeti u tlu, vodi i na drugim materijalima. Pod određenim uvjetima izaziva bolesti koje se obično nazivaju kolibacilozom (upalne promjene u crijevu, septicemija ili upalne promjene lokalizirane u različitim organima i tkivima). Osjetljiva je na različite antibiotike i kemoterapeutike (NAGLIĆ i sur., 2005.).

2.3.8. *Escherichia coli* 0157:H7

Soj *E. coli* 0157:H7 spada u skupinu tzv. enterohemoragičnih sojeva. Poznat je po tome što tvori verotoksine koji uništavaju crijevne mikrovile i uzrokuju hemoragične proljeve. Ovaj se soj smatra posebno patogenim. Rezervoar infekcije su goveđe, ovčje i kozje izmetine, a hrana se njima može onečistiti prilikom klaoničke obrade ili mužnje u nehigijenskim uvjetima (NAGLIĆ i sur., 2005.).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzorkovanje

U istraživanju smo analizirali antimikrobne učinke i karakteristike 13 monofloernih uzoraka meda. Uzorke smo prikupili kod pčelara prilikom vrcanja, a nakon homogenizacije meda tijekom 2011. godine. Uzorkovani med je spremljen u sterilne staklene posude i spremljen na tamno i hladno mjesto do trenutka provođenja istraživanja.

3.1.1. *Melisopalinološka analiza uzoraka meda*

Botaničko podrijetlo meda smo potvrdili tradicionalnom kvalitativnom mikroskopskom analizom i određivanjem količine peludnih zrnaca pojedine biljke, odnosno melisopalinološkom analizom. Melisopalinološka analiza od izuzetne je važnosti za kontrolu kakvoće meda jer omogućava određivanje i kontrolu zemljopisnog i botaničkog podrijetla meda (LOUVEAUX i sur., 1978.).

Za izradu preparata uzimano je 10 grama dobro izmiješanog meda od svakog uzorka i otopljeno u 20 mL destilirane vode. Uzorak smo zagrijali u vodenoj kupelji na temperaturu od 45 °C tijekom 15 minuta. Nakon zagrijavanja otopinu meda smo prenijeli u kivetu od 50 mL i centrifugirali 15 minuta na 3500 okretaja/min. Tekući dio smo odlili, a sediment prenijeli mikropipetom na predmetno stakalce i ravnomjerno razmazali po površini predmetnice. Od svakog prikupljenog uzorka pripremili smo po tri mikroskopska preparata. Preparate smo osušili na sobnoj temperaturi. Mikroskopiranje je provedeno na svjetlosnom mikroskopu (Olympus) pri povećanju od 400 puta. Određivanje vrste peludnih zrnaca napravljeno je usporedbom s referentnim preparatima.

Nektarni med može biti monofloorni i polifloorni. Med u kojem je utvrđena prisutnost peluda pojedine svojte veća od 45% u odnosu na ukupni spektar smatra se monofloornim (LOUVEAUX i sur., 1978.), uz iznimke za med pitomog kestena (*C. sativa*) gdje je potrebno izbrojati 85% peludnih zrnaca u netopivom sedimentu, odnosno za med bagrema (*R. pseudoacacia*), lavande (*L. officinalis* L.) i kadulje (*S. officinalis* L.) svega 20% peludnih zrnaca. Polifloorni med je mješavina meda porijekla različitih vrsta biljaka.

3.1.2. Umjetni med

Umjetni med je gotovo istovjetan medu po sastavu šećera, a koristili smo ga kao kontrolu. To je nužno budući osnovni sastojci šećera interferiraju u pojedinim testovima mogu dati lažno pozitivne, odnosno, lažno negativne rezultate. Umjetni med je pripravljen otapanjem saharoze (1,5 g), maltoze (7,5 g), fruktoze (40,5 g) i glukoze (33,5 g) u 17 mL deionizirane, sterilne vode (COOPER i sur., 2002.).

3.2. Određivanje pH

pH 50 %-tne otopine meda odredili smo pH metrom.

3.3. Odabir bakterija i određivanje gustoće bakterijske suspenzije

Odabrali smo osam bakterija najučestalijih uzročnika onečišćenja hrane životinjskog podrijetla i infekcija. To su gram pozitivne *E. faecalis*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *B. subtilis* te gram negativne *E. coli*, *E. coli* 0157, *P. aeruginosa* i *S. enteritica*. Bakterije smo čuvali u glicerol bujonu u zamrzivaču na -80 °C.

Gustoću bakterijskih suspenzija odredili smo prema McFarlandovom standardu čiji je princip uspoređivanje sa suspenzijom poznatog zamućenja, a koja se nalazi u ampuli jednakog promjera. Uporaba McFarland standarda je neophodna pri standardizaciji mikrobioloških metoda, a standardi su sukladni brojevima na McFarland skali (Tablica 2.). U ovom istraživanju smo koristili Standard 0.5 kod kojeg koncentracija bakterija iznosi $150 \times 10^6/\text{mL}$.

Tablica 1. Vrijednost standarda na McFarland skali.

Standard	Koncentracija bakterija ⁽¹⁾ x 10 ⁶ /ml	Teoretska optička gustoća ² na 550 nm
0,5	150	0,125
1	300	0,25
2	600	0,50
3	900	0,75
4	1200	1,00
5	1500	1,25

¹Koncentracija bakterija ovisi o njihovoj veličini, a brojevi prikazuju prosječnu vrijednost.

²Vrijednosti odgovaraju optičkoj gustoći bakterijske suspenzije.

3.4. Hranjiva podloga

U pokusu smo bakterije nasađivali na Muller Hintonov bujon (Merck, Njemačka) koji je neselektivna podloga na kojoj rastu brojni mikroorganizmi. Također ova podloga sadrži relativno visoku koncentraciju škroba, koji djelomično apsorbira bakterijske toksine te oni ne interferiraju s određivanjem minimalne bakterijske koncentracije ispitivane tvari, u našem istraživanju, meda.

Sastav podloge (u jednoj litri):

- Goveđi ekstrakt 2,0 g
- Kiseli hidrolizat kazeina 17,5 g
- škrob 1,5 g
- agar 17,0 g

Pripremljenu podlogu sterilizirali smo na 121 °C tijekom 15 minuta. Kada se podloga ohladila na približno 50 °C aseptičkim postupkom smo dodali 5% sterilne defibrinirane ovčje krvi. pH podloge smo nakon hlađenja na sobnu temperaturu podesili na $7,4 \pm 0,2$ prema uputi proizvođača.

3.5. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije meda

Prije tretmana odvagali smo med kako bi dobili otopinu meda u omjeru 1:1, odnosno, kako bi dobili 1g meda po mililitru sterilne fiziološke otopine. Pokus je izveden na mikrotitarskim pločicama s 96 jažica. U svaku je jažicu otpipetirano 100 μ L Muller Hinton bujona (MH bujon). U prvu jažicu u nizu je dodano 100 μ L otopine pojedinog ispitivanog uzorka meda, te je nakon miješanja iz nje prenešeno 100 μ L u drugu jažicu i dalje redom kako bi se dobila dvostruka i serijska razrjeđenja uzorka meda (0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125 i 0,012526 mg/mL).

Nakon što smo dobili razrjeđenja ispitivanog uzorka meda, u svaku je jažicu dodano 20 μ L bakterijske suspenzije. Odnosno, u svaku je jažicu inokulirano 300×10^3 bakterija (gustoća korištene bakterijske suspenzije je 0,5 na McFarland skali, što iznosi 150×10^6 bakterija/mL). Tako priređenu pločicu smo stavili na inkubaciju na 37 °C tijekom 24 sata. Nakon inkubacijskog perioda u svaku je jažicu dodano 50 μ L trifenil tetrazolij klorida (TTC ili tetrazolij klorid reagens). TTC (2,3,5-Triphenyl-2H-tetrazolium klorid) reagens se koristi kao indikator reducirajućih tvari u podlozi što je vidljivo prema promjeni boje medija. U našem smo istraživanju koristili TTC reagens otopljen u sterilnoj fiziološkoj otopini u koncentraciji 0,5 mg/mL.

Promjene nastale rastom, odnosno inhibicijom rasta bakterija, očitali smo nakon dodavanja TTC reagensa i dodatne inkubacije u trajanju tri sata na 37 °C. Rezultati iz mikrotitar pločice očitavani su golim okom. Naime, promjena boje uz pojavu zamućenja ili taloga na dnu mikrotitar pločice bili su znak rasta bakterija. Pojava taloga i promjena boje dodatno su uspoređivani s kontrolnim jažicama. U jednoj kontrolnoj jažici su inokulirane bakterije dok je u drugoj kontrolnoj jažici osim bakterija i medija dodan pripravak umjetnog meda. Najveće razrjeđenje meda pri kojem je došlo do pojave zamućenja predstavlja minimalnu inhibitornu koncentraciju pojedinog uzorka meda.

4. REZULTATI

4.1. Antimikrobna svojstva meda amorfe

Antimikrobna svojstva meda amorfe istražili smo na osam patogenih bakterija određivanjem minimalne koncentracije meda koja uzrokuje inhibiciju bakterijskog rasta (MIK). Iz dobivenih rezultata (Tablica 2.) vidljivo je da med amorfe u relativno malim koncentracijama inhibira rast gram pozitivnih bakterija *B. subtilis* i *S. aureus*, te gram negativne bakterije *E. coli*.

Tablica 2. Minimalne inhibitorne koncentracije meda amorfe.

Med amorfe MIK (g/mL)	
<i>B. subtilis</i>	0,063
<i>L. monocytogenes</i>	0,125
<i>S. aureus</i>	0,083
<i>E. faecalis</i>	0,25
<i>S. enteritica</i>	0,20
<i>P. aeruginosa</i>	0,10
<i>E. coli</i>	0,083
<i>E. coli O157:H7</i>	0,125

4.2. Antimikrobna svojstva meda bagrema

Za med bagrema odredili smo minimalne inhibitorne koncentracije za rast četiriju gram pozitivnih i četiri gram negativne bakterije, te se pokazalo kako med bagrema ima inhibitorno djelovanje u najvišoj primijenjenoj koncentraciji (Tablica 3.). Slijedom navedenog zaključujemo kako su antimikrobna svojstva ispitivanog uzorka relativno slaba.

Tablica 3. Minimalne inhibitorne koncentracije meda bagrema.

Med bagrema MIK (g/mL)	
<i>B. subtilis</i>	0,25
<i>L. monocytogenes</i>	0,25
<i>S. aureus</i>	0,25
<i>E. faecalis</i>	0,25
<i>S. enteritica</i>	0,25
<i>P. aeruginosa</i>	0,20
<i>E. coli</i>	0,25
<i>E. coli O157:H7</i>	0,22

4.3. Antimikrobna svojstva meda bijele djeteline

Antimikrobna svojstva meda bijele djeteline istražili smo na osam patogenih bakterija određivanjem minimalne koncentracije meda koja uzrokuje inhibiciju bakterijskog rasta (MIK). Iz dobivenih rezultata (Tablica 4.) vidljivo je da med bijele djeteline djeluje inhibicijski u najvišoj primijenjenoj koncentraciji, odnosno na gram pozitivnu bakteriju *E. faecalis* ne djeluje u nijednoj primijenjenoj koncentraciji (određena je $MIK > 0,25$ g/mL). Odnosno, rezultati pokazuju vrlo slabo ili neznatno djelovanje meda bijele djeteline na istraživane mikroorganizme.

Tablica 4. Minimalne inhibitorne koncentracije meda bijele djeteline.

Med bijele djeteline MIK (g/mL)	
<i>B. subtilis</i>	0,20
<i>L. monocytogenes</i>	0,25
<i>S. aureus</i>	0,25
<i>E. faecalis</i>	>0,25
<i>S. enteritica</i>	0,25
<i>P. aeruginosa</i>	0,25
<i>E. coli</i>	0,22
<i>E. coli O157:H7</i>	0,25

4.4. Antimikrobna svojstva meda divljeg duhana

Rezultati istraživanja su pokazali kako testirani uzorak meda divljeg duhana ima inhibitorno djelovanje u koncentraciji 0,20 g/mL prema bakterijama *E. faecalis*, *S. enteritica* *P. aeruginosa*, u koncentraciji 0,125 g/mL prema bakterijama *L. monocytogenes* i *E. coli*, te u relativno niskim koncentracijama prema ostalim testiranim bakterijama (0,063, odnosno 0,083 g/mL). Rezultati su prikazani u Tablici 5.

Tablica 5. Minimalne inhibitorne koncentracije meda divljeg duhana.

Med divljeg duhana MIK (g/mL)	
<i>B. subtilis</i>	0,083
<i>L. monocytogenes</i>	0,125
<i>S. aureus</i>	0,083
<i>E. faecalis</i>	0,20
<i>S. enteritica</i>	0,20
<i>P. aeruginosa</i>	0,20
<i>E. coli</i>	0,125
<i>E. coli O157:H7</i>	0,063

4.5. Antimikrobna svojstva meda drače

Za ispitivanje antimikrobnog učinka meda drače prikupili smo i odabrali dva uzorka s različitih zemljopisnih lokacija. Iz rezultata je vidljivo (Tablica 6.) kako su ova dva uzorka relativno sličnog antimikrobnog djelovanja, osim za gram pozitivnu bakteriju *E. faecalis* (MIK uzorka 1 je 0,22 g/mL, a uzorka 2 0,063 g/mL) i gram negativnu bakteriju *P. aeruginosa* (MIK uzorka 1 je 0,18 g/mL, a uzorka 2 0,063 g/mL).

Tablica 6. Minimalne inhibitorne koncentracije meda drače.

Med drače 1 i 2 MIK (g/mL)		
<i>B. subtilis</i>	0,083	0,063
<i>L. monocytogenes</i>	0,125	0,083
<i>S. aureus</i>	0,083	0,083
<i>E. faecalis</i>	0,22	0,063
<i>S. enteritica</i>	0,125	0,083
<i>P. aeruginosa</i>	0,18	0,063
<i>E. coli</i>	0,08	0,20
<i>E. coli O157:H7</i>	0,083	0,063

4.6. Antimikrobna svojstva meda hrasta meduna

Rezultati antimikrobne analize uzorka meda hrastova meduna prikazani su u Tablici 7. Ovaj med ima jako antimikrobno djelovanje protiv svih istraživanih bakterija. Naime, minimalna inhibicijska koncentracija meda potrebnog za protubakterijsko djelovanje kod ovog je uzorka relativno mala, te se kreće, ovisno o testiranom mikroorganizmu između 0,031 i 0,063 g/mL.

Tablica 7. Minimalne inhibitorne koncentracije meda hrasta meduna.

Med hrasta medunca MIK (g/mL)	
<i>B. subtilis</i>	0,063
<i>L. monocytogenes</i>	0,063
<i>S. aureus</i>	0,031
<i>E. faecalis</i>	0,063
<i>S. enteritica</i>	0,035
<i>P. aeruginosa</i>	0,031
<i>E. coli</i>	0,060
<i>E. coli O157:H7</i>	0,031

4.7. Antimikrobna svojstva meda kadulje

Za određivanje antimikrobnog učinka meda kadulje prikupili smo i odabrali tri uzorka s različitih zemljopisnih lokacija. Rezultati istraživanja su pokazali kako su ova tri uzorka relativno sličnog antimikrobnog djelovanja (Tablica 8.), osim za gram negativnu bakteriju *S. enteritica*.

Naime, na sve bakterije u našem istraživanju uzorci meda kadulje pokazuju relativno dobro antimikrobno djelovanje, odnosno potrebna je relativno niska koncentracija meda kako bi se postiglo inhibicijsko djelovanje spram testiranog mikroorganizma (MIK vrijednosti u rasponu od 0,03 do 0,125 g/mL). Kod djelovanja na bakteriju *S. enteritica* dobra antimikrobna svojstva su pokazala dva uzorka meda kadulje (uzorci 2 i 3), dok je potrebna nešto viša koncentracija uzorka 3 kako bi se ostavio inhibicijski učinak na spomenutu bakteriju (MIK vrijednost 0,22 g/mL).

Tablica 8. Minimalne inhibitorne koncentracije meda kadulje.

Med kadulje 1, 2 i 3 MIK (g/mL)			
<i>B. subtilis</i>	0,10	0,04	0,05
<i>L. monocytogenes</i>	0,125	0,063	0,063
<i>S. aureus</i>	0,10	0,04	0,035
<i>E. faecalis</i>	0,25	0,10	0,20
<i>S. enteritica</i>	0,22	0,063	0,083
<i>P. aeruginosa</i>	0,083	0,063	0,063
<i>E. coli</i>	0,012	0,063	0,080
<i>E. coli O157:H7</i>	0,125	0,063	0,083

4.8. Antimikrobna svojstva meda kestena

Rezultati istraživanja su pokazali kako istraženi uzorak meda kestena ima relativno dobro antimikrobno djelovanje (Tablica 9.), što je vidljivo prema relativno niskim koncentracijama potrebnim za zaustavljanje rasta testnih mikroorganizama.

Tablica 9. Minimalne inhibitorne koncentracije meda kestena.

Med kestena MIK (g/mL)	
<i>B. subtilis</i>	0,063
<i>L. monocytogenes</i>	0,09
<i>S. aureus</i>	0,04
<i>E. faecalis</i>	0,063
<i>S. enteritica</i>	0,083
<i>P. aeruginosa</i>	0,083
<i>E. coli</i>	0,083
<i>E. coli O157:H7</i>	0,083

4.9. Antimikrobna svojstva meda kupine

Rezultati antimikrobne analize uzorka meda kupine prikazani su u Tablici 10., te je iz njih vidljivo kako ovaj med ima jako antimikrobno djelovanje protiv svih testiranih bakterija. Naime, minimalna inhibicijska koncentracija meda potrebna za protubakterijsko djelovanje kod ovog je uzorka relativno mala te se kreće, ovisno o testiranom mikroorganizmu između 0,035 i 0,083 g/mL. Izuzetak od ovoga je djelovanje meda kupine na gram pozitivnu bakteriju *E. faecalis* (MIK 0,20 g/mL).

Tablica 10. Minimalne inhibitorne koncentracije meda kupine.

Med kupine MIK (g/mL)	
<i>B. subtilis</i>	0,05
<i>L. monocytogenes</i>	0,063
<i>S. aureus</i>	0,035
<i>E. faecalis</i>	0,20
<i>S. enteritica</i>	0,083
<i>P. aeruginosa</i>	0,063
<i>E. coli</i>	0,080
<i>E. coli O157:H7</i>	0,083

4.10. Antimikrobna svojstva meda lavande

U ovom su radu opisana antimikrobna svojstva dvaju uzoraka meda lavande prikupljena na različitim lokacijama (oba na otoku Hvaru). Naše je istraživanje pokazalo kako, iako istog botaničkog podrijetla, ova dva uzorka imaju izrazito različito antimikrobno djelovanje spram testiranih mikroorganizama (Tablica 11.). Naime, uzorak 1 ima relativno slabo djelovanje na mikroorganizme u našim uvjetima što je vidljivo iz relativno visokih koncentracija meda potrebnih za ostvarenja inhibicijskog djelovanja. Suprotno je tome djelovanje uzorka meda lavande 2 koji ima izrazito djelovanje spram svih testiranih mikroorganizama u relativno niskim koncentracijama.

Tablica 11. Minimalne inhibitorne koncentracije meda lavande.

Med lavande 1 i 2 MIK (g/mL)		
<i>B. subtilis</i>	0,17	0,05
<i>L. monocytogenes</i>	0,22	0,083
<i>S. aureus</i>	0,25	0,035
<i>E. faecalis</i>	0,125	0,035
<i>S. enteritica</i>	0,25	0,10
<i>P. aeruginosa</i>	0,22	0,063
<i>E. coli</i>	0,22	0,083
<i>E. coli O157:H7</i>	0,125	0,083

4.11. Antimikrobna svojstva meda lipe

Antimikrobna svojstva meda lipe istražili smo na osam patogenih bakterija određivanjem minimalne koncentracije meda koja uzrokuje inhibiciju bakterijskog rasta (MIK). Iz dobivenih rezultata (Tablica 12.) vidljivo je da med lipe djeluje inhibicijski u relativno visokim primijenjenim koncentracijama. Iz prikazanih rezultata za zaključiti je kako med lipe ima slabo, odnosno neznatno djelovanje na testirane mikroorganizme.

Tablica 12. Minimalne inhibitorne koncentracije meda lipe.

Med lipe MIK (g/mL)	
<i>B. subtilis</i>	0,17
<i>L. monocytogenes</i>	0,20
<i>S. aureus</i>	0,20
<i>E. faecalis</i>	0,25
<i>S. enteritica</i>	0,20
<i>P. aeruginosa</i>	0,20
<i>E. coli</i>	0,20
<i>E. coli O157:H7</i>	0,22

4.12. Antimikrobna svojstva meda medljikovca jele

Rezultati antimikrobne analize uzorka meda medljikovca jele prikazani su u Tablici 13., te je iz njih vidljivo kako ovaj med ima jako antimikrobno djelovanje protiv svih testiranih bakterija. Naime, minimalna inhibicijska koncentracija meda potrebna za protubakterijsko djelovanje kod ovog je uzorka relativno mala te se kreće, ovisno o testiranom mikroorganizmu između 0,031 i 0,063 g/mL.

Tablica 13. Minimalne inhibitorne koncentracije medljike jele.

Med medljikovac jele MIK (g/mL)	
<i>B. subtilis</i>	0,031
<i>L. monocytogenes</i>	0,063
<i>S. aureus</i>	0,031
<i>E. faecalis</i>	0,063
<i>S. enteritica</i>	0,031
<i>P. aeruginosa</i>	0,063
<i>E. coli</i>	0,031
<i>E. coli O157:H7</i>	0,031

4.13. Antimikrobna svojstva meda ružmarina

Iz rezultata dobivenih u ovom istraživanju (Tablica 14.) vidljivo je da med lipe djeluje inhibicijski u relativno visokim primijenjenim koncentracijama. Iz prikazanih rezultata za zaključiti je kako med ružmarina ima relativno slabije djelovanje na testirane mikroorganizme.

Tablica 14. Minimalne inhibitorne koncentracije meda ružmarina.

Med ružmarina MIK (g/mL)	
<i>B. subtilis</i>	0,17
<i>L. monocytogenes</i>	0,20
<i>S. aureus</i>	0,20
<i>E. faecalis</i>	0,125
<i>S. enteritica</i>	0,22
<i>P. aeruginosa</i>	0,22
<i>E. coli</i>	0,25
<i>E. coli O157:H7</i>	0,125

4.14. Antimikrobna svojstva meda suncokreta

U našem smo istraživanju odredili minimalne inhibitorne koncentracije za rast četiri gram pozitivnih i četiri gram negativne bakterije, te se pokazalo kako med suncokreta ima inhibitorno djelovanje u relativno visokim koncentracijama (Tablica 15.). Slijedom navedenog zaključujemo kako su antimikrobna svojstva ispitivanog uzorka relativno slaba.

Tablica 15. Minimalne inhibitorne koncentracije meda suncokreta.

Med suncokreta MIK (g/mL)	
<i>B. subtilis</i>	0,125
<i>L. monocytogenes</i>	0,125
<i>S. aureus</i>	0,20
<i>E. faecalis</i>	0,25
<i>S. enteritica</i>	0,22
<i>P. aeruginosa</i>	0,125
<i>E. coli</i>	0,125
<i>E. coli O157:H7</i>	0,20

4.15. Antimikrobna svojstva meda tilovine

Rezultati su pokazali (Tablica 16.) kako med tilovine ima relativno dobra inhibicijska svojstva, posebice s obzirom na inhibiciju rasta dviju gram pozitivnih bakterija: *B. subtilis* i *S. aureus*. Nešto slabija inhibicijska svojstva testirani uzorak je pokazao spram gram pozitivne bakterije *E. faecalis* (MIK 0,125 g/mL). Slijedom navedenog za zaključiti je kako med tilovine možemo smatrati medom jakih antibakterijskih svojstava.

Tablica 16. Minimalne inhibitorne koncentracije meda tilovine.

Med tilovine MIK (g/mL)	
<i>B. subtilis</i>	0,04
<i>L. monocytogenes</i>	0,063
<i>S. aureus</i>	0,04
<i>E. faecalis</i>	0,125
<i>S. enteritica</i>	0,083
<i>P. aeruginosa</i>	0,063
<i>E. coli</i>	0,063
<i>E. coli O157:H7</i>	0,063

4.16. Antimikrobna svojstva meda vrijeska

Rezultati istraživanja su pokazali kako su dva od tri ispitivana uzorka relativno sličnog antimikrobnog djelovanja (uzorci 2 i 3), dok je uzorak 1 relativno slabijeg djelovanja spram većine testiranih mikroorganizama. Naime, na sve istraživane bakterije uzorci meda vrijeska pokazuju relativno dobro antimikrobno djelovanje, odnosno potrebna je relativno niska koncentracija meda kako bi se postiglo inhibicijsko djelovanje spram testiranog mikroorganizma (MIK vrijednosti u rasponu od 0,035 do 0,125 g/mL) s iznimkom djelovanja uzorka 1 (MIK >0,25 g/mL) i uzorka 3 (MIK 0,25 g/mL) spram gram pozitivne bakterije *E. faecalis*.

Tablica 17. Minimalne inhibitorne koncentracije meda vrieska.

Med vrieska 1, 2 i 3 (g/mL)			
<i>B. subtilis</i>	0,10	0,063	0,063
<i>L. monocytogenes</i>	0,10	0,063	0,10
<i>S. aureus</i>	0,125	0,035	0,083
<i>E. faecalis</i>	>0,25	0,083	0,25
<i>S. enteritica</i>	0,125	0,083	0,125
<i>P. aeruginosa</i>	0.063	0,063	0,083
<i>E. coli</i>	0.12	0,083	0,10
<i>E. coli O157:H7</i>	0.125	0,080	0,083

5. RASPRAVA

Med je primarni pčelinji proizvod. Cvjetni med pčele proizvode od nektara, slatke tekućine koju izlučuju biljne žlijezde nektarije. Osim vode, glukoze i fruktoze, med sadrži i druge ugljikohidrate (saharozu, maltozu, dekstrin), flavonoide, te druge organske tvari (organske kiseline, aminokiseline, proteine, više alkohole, inulin, hormone), enzime, razne derivate klorofila, mineralne tvari, i vitamine (KRELL, 1996.). Različite vrste meda se razlikuju svojim fizikalno-kemijskim svojstvima kao što su vlaga, ukupna kiselost, električna provodljivost, polarizacija, kristalizacija, vrenje, higroskopičnost i specifična težina, viskoznost, slatkoća (sadržaj reducirajućih i nereducirajućih, i ukupnih šećera), te senzorskim svojstvima i antioksidativnim osobitostima (SLAČANAC, 2009.). Med se stoljećima koristi kao zaslađivač i kao hrana, a već u sumerskim zapisima (oko 2500 godina pr. Kr.) i zapisima kineske dinastije Xin (oko 2000 godina pr. Kr.) nalazimo da se med koristio u liječenju rana. Naime, med se kao sredstvo za liječenje inficiranih rana koristio oko 2000 godina prije nego je otkriveno da su bakterije uzročnici infekcija. Razvojem apiterapije prepoznato je povoljno djelovanje meda u različitim patološkim stanjima, a od 19. stoljeća zna se za njegovo antimikrobno djelovanje. U novije vrijeme je otkriveno da med ima inhibitorni učinak na oko 60 različitih gram pozitivnih i gram negativnih bakterija, neovisno o tome jesu li one aerobi ili anaerobi (MOLAN, 1992.b).

Ranije se pretpostavljalo kako med ima pozitivne učinke za liječenje rane zbog visokog sadržaja šećera, odnosno, zbog izraženog jakog osmotskog učinka. Međutim, studije su pokazale kako se antibakterijska svojstva meda povećavaju primjenom meda u razrijeđenom obliku. Danas se također zna da je antimikrobna učinkovitost meda izražena zbog prisustva različitih bakteriostatskih i baktericidnih spojeva i tvari, a također, pod utjecajem određenih sastojaka meda u organizmu dolazi do pojačanog otpuštanja citokina (eng. „*tumor necrosis factor alpha*“) (TONKS i sur., 2001.) i imunomodulacije (WESTON, 2000.; KWAKMAN i ZAAT, 2012.). Također se zna da botaničko i zemljopisno podrijetlo meda, okolišni i klimatski čimbenici, kao i vrste istraživanih bakterija utječu na njegovu antimikrobnu učinkovitost.

Kako bi odredili minimalnu inhibitornu koncentraciju meda s područja RH prikupili smo 23 različite vrste uniflornih medova, i to med amorfe, bagrema, bijele djeteline, divljeg duhana, kadulje, kestena, lavande, lipe, med medljikovac, ružmarina, suncokreta, tilovine i vrijeska. Uzorci meda su prikupljeni s različitih zemljopisnih lokacija diljem RH. U ovom radu su ispitana antimikrobna svojstva meda u odnosu prema osam patogenih bakterija *S. aureus*, *E. faecalis*, *B. cereus*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *S. enteritica*, *E. coli* i *E. coli 0157:H7*.

Od ispitivanih uzoraka najjaču antimikrobnu aktivnost pokazali su med drače, hrasta medunca, med kestena, med kupine i med medljikovac. Naime, minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) svih pobrojanih medova bile su vrlo niske, odnosno nisu prelazile vrijednost od 0,09 g/mL za niti jednu testiranu bakteriju. Među pobrojanim vrstama meda, najizraženija antibakterijska svojstva protiv svih bakterija koje smo koristili u našem istraživanju, najbolje antibakterijske karakteristike imao je med medljikovac. Ovakvo njegovo djelovanje već je ranije opisano u literaturi (PRIMORAC i sur., 2008.). Naime, meduni ili medljikovci su specifična vrsta meda koju pčele proizvode od medne rose ili medljike, slatkog soka kojeg luče biljke i djelomično kukci koji obitavaju na biljkama, odnosno bjelogoričnom i crnogoričnom drveću. Rezultati prethodnih istraživanja na istom uzorku pokazali su kako su promjeri zona inhibicije za ovaj med najveći, a kretali su se oko 20 mm za sve testirane mikroorganizme (TERE, 2013.). Dobro antibakterijsko djelovanje pokazali su i med amorfe (više vrijednosti MIK-a za *B. cereus*, *S. aureus* i *E. coli*), zatim med divljeg duhana (više vrijednosti MIK-a za *E. faecalis*, *P. aeruginosa* i *S. enteritica*) i med tilovine (MIK za *E. faecalis* iznosio je 0,125 g/mL dok je za ostale bakterije MIK bio niži). Dobra antibakterijska svojstva u našem istraživanju pokazala su i sva tri uzorka meda kadulje. Uzorci 1 i 3 djeluju na gram pozitivnu bakteriju *E. faecalis* te uzorak 1 na *S. enteritica* u nešto višim koncentracijama, dok za ostale bakterije pokazuju inhibicijsko djelovanje pri niskim koncentracijama. Slično tome je djelovanje uzorka meda kadulje 2 koji u niskim koncentracijama djeluje na sve testirane mikroorganizme u smislu inhibicije njihovog rasta i razmnožavanja.

Zanimljivo je gotovo oprečno djelovanje uzoraka meda lavande. Naime, iako su prikupljeni na relativno uskom zemljopisnom području (oba su uzorka s otoka Hvara), njihovo je djelovanje značajno različito. Uzorak meda lavande 1 djeluje inhibicijski spram testiranih mikroorganizama tek u visokim primijenjenim koncentracijama, dok uzorak meda lavande 2 djeluje u niskim koncentracijama. Primjerice oba uzorka meda drače

djeluju u vrlo sličnim koncentracijama protiv gotovo svih mikroorganizama korištenih u našem istraživanju. Slično ovome je djelovanje uzoraka meda vrijeska, kod kojeg sva tri uzorka djeluju spram većine bakterija u niskim koncentracijama. Od ovog je izuzetak djelovanje uzorka meda vrijeska 1 i 3 na bakteriju *E. faecalis*, koja je jedna od najotpornijih mikroorganizama, te stoga slabije djelovanje pojedinih uzoraka meda protiv nje ne čudi. Slični su rezultati već ranije utvrđeni (TERE, 2013.).

Razlike u djelovanju meda iste vrste, no s različitim zemljopisnih lokacija upućuju na činjenicu kako je njihovo različito zemljopisno podrijetlo (sastav tla, mikroklimatski čimbenici) uzrok razlikama u osmolarnosti, koncentraciji fenolnih spojeva, aromatskih kiselina i vodikovog peroksida (SILICI i sur., 2010.). Slijedom navedenog, u daljnjim bi istraživanjima trebalo istražiti upravo utjecaj zemljopisnog podrijetla na antimikrobnu učinkovitost pojedine vrste meda (prikupljanje većeg broja uzoraka meda istog biljnog ali različitog zemljopisnog porijekla), te ukoliko takve pozitivne značajke ostaju iste kroz određeno razdoblje (prikupljanje uzoraka s istog područja tijekom nekoliko godina), bilo bi moguće načiniti kartu s označenim područjima u kojima su prikupljeni uzorci meda s izraženijom antibakterijskom učinkovitošću. Tako je u ovom istraživanju med bagrema imao relativno slabo, a med kestena izraženo antibakterijsko djelovanje što je u skladu s podacima iz literature. Naime, KUNČIĆ i suradnici (2012.) su pokazali kako od brojnih istraživanih vrsta meda upravo med kestena ima najbolja antimikrobna svojstva dok je slabo antibakterijsko djelovanje meda bagrema pokazano spram bakterije *E. coli* (MOLAN, 1992.a). Od istraženih bakterija upravo je *E. coli O157:H7* bila najosjetljivija na djelovanje meda. Njeno umnažanje su zaustavili u relativno niskim koncentracijama gotovo svi uzorci meda. Djelomično to nije iznenađujuće jer je sama bakterija relativno osjetljiva na različite kemijske agense, te je također poznata i njena osjetljivost na različite vrste meda (TAORMINA i sur., 2001.; KUNČIĆ i sur., 2012.).

Inhibitorna aktivnost meda se pripisuje različitim čimbenicima kao što su osmotski učinak meda, prirodno niski pH, visoki sadržaj šećera, stvaranje vodikovog peroksida (WHITE i sur., 1963.; WESTON, 2000.). Istraživanja su pokazala kako antibakterijski učinci meda ovise i o prisustvu fenolnih kiselina (ALVAREZ-SUAREZ i sur., 2010.), lizozima (ISRAILI, 2013.) i flavonoida (TAORMINA i sur., 2001.; KWAKMAN i ZAAT, 2012.). U novije vrijeme, identificirani su metilglioksal i antimikrobni peptid pčelinji defensin-1 kao važne antibakterijske tvari u medu (ISRAILI, 2013.). Vjeruje se kako je

antibakterijsko djelovanje meda vrlo složeno zbog umiješanosti više spojeva, te dodatno zbog velikih razlika u koncentracijama ovih spojeva između različitih vrsta meda.

U našem istraživanju smo osim istraživanih uzoraka meda na hranjivu podlogu uvijek dodavali i nerazrijeđeni umjetni med kao negativnu kontrolu (podaci nisu prikazani). Umjetni med je sličan prirodnom, nepatvorenom medu tek po sastavu šećera i vrijednosti pH (COOPER i sur., 2002.), stoga možemo isključiti osmolarnost kao jedini i najvažniji čimbenik antibakterijske učinkovitosti. Naime, umjetni med ima približno istovjetnu osmolarnost kao prirodni med, a kako on nije inhibirao rast i razvoj niti jedne istraživane bakterije, može se s velikom sigurnošću ustvrditi kako osmolarnost nije čimbenik koji je u našem istraživanju pridonosio antibakterijskom učinku meda. Isto tako, a obzirom na približnu vrijednost pH, možemo pretpostaviti kako niti kiselost nije odlučujući čimbenik koji je sam odgovoran za inhibicijski antimikrobni potencijal meda, nego tek u kombinaciji s brojnim drugim čimbenicima koji su sastavni dio smjese koja čini med. Ovakve zaključke podupire i istraživanje MOLANA (1992.) koje je pokazalo kako je antibakterijska učinkovitost veća kod razrijeđenog meda (smanjena osmolarnosti). Pojedina istraživanja su također pokazala kako su glavni antibakterijski čimbenici u medu vodikov peroksid, katalaza i glukoza oksidaze. Međutim, GIL i suradnici (1995.) su među prvim pokazali kako i neperoksidni čimbenici mogu također doprinijeti antimikrobnim svojstvima meda, te da flavonoidi i drugi fenolne komponente imaju antioksidativni kapacitet i sprječavaju rast brojnih gram negativnih i gram-pozitivnih bakterija. Za uzorke meda koji nisu imali inhibicijski učinak, možemo pretpostaviti kako nemaju potrebne sastojke kojima bi utjecali na bakterije, bilo da se radi o fenolima, flavonoidima, bjelančevinama, hidroksimetilfurfurolu, metilglioksalu ili njihovoj kombinaciji. Naime, antibakterijsko djelovanje meda je vrlo složeno zbog umiješanosti više spojeva, a zbog velikih razlika u koncentracijama različitih tvari i spojeva između različitih vrsta meda nije moguće potpuno jednoznačno odrediti koja je vrsta meda najučinkovitija. Poblje određivanje antibakterijskih spojeva i njihove aktivnosti, odnosno uključenosti u složeno antibakterijsko djelovanje meda, može omogućiti standardizaciju i pomoći ukloniti glavne prepreke za primjenu meda u medicini i terapiji.

6. ZAKLJUČCI

- Uzorci meda drače, hrasta meduna, medljikovca jele, kestena i kupine djelovali su u vrlo niskim minimalnim inhibitornim koncentracijama.
- Uzorak meda kadulje djelovao je u relativno niskim koncentracija protiv testiranih bakterija s izuzetkom *E. fecalis* i *S. enteritica*.
- Uzorci meda lavande međusobno su se značajno razlikovali u djelovanju protiv istraživanih mikroorganizama.
- Uzorci meda bagrema, bijele djeteline, lipe, ružmarina i suncokreta imaju određena antibakterijska svojstva, no za učinkovito djelovanje je potrebna njihova visoka koncentracija.

7. LITERATURA

- ALVAREZ-SUAREZ, J. M., F. GIAMPIERI, M. BATTINO (2013): Honey as a source of dietary antioxidants: structures, bioavailability and evidence of protective effects against human chronic diseases. *Curr. Med. Chem.* 20, 621-638.
- ALVAREZ-SUAREZ, J. M., S. TULIPANI, D. DIAZ, Y. ESTEVEZ, S. ROMANDINI, F. GIAMPIERI, E. DAMIANI, P. ASTOLFI, S. BOMPADRE, M. BATTINO (2010): Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. *Food Chem. Toxicol.* 48, 2490-99.
- ANON (2000): Pravilnik o kakvoći meda i drugih pčelinjih proizvoda, Zagreb, Narodne novine, broj 20 (N.N. 20/00).
- BELČIĆ J., Đ. SULIMANOVIĆ (1982): Zlatna knjiga pčelarstva, Matica Hrvatska, Zagreb.
- BERETTA, G., M. ORIOLI, R. M. FACINO (2008): Antioxidant and radical scavenging activity of honey in endothelial cell cultures (EA.hy926). *Planta Med.* 73, 1182-9.
- BERETTA, G., P. GRANATA, M. FERRERO, M. ORIOLI, R. M. FACINO (2005): Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Anal. Chem. Acta* 533, 185-91.
- COOPER, R. A., P. C. MOLAN, K. G. HARDING (2002): The sensitivity to honey of Gram-positive cocci of clinical significance isolated from wounds. *J. Appl. Microbiol.* 93, 857 – 863.
- GHELDOLF, N., X. H. WANG, N. J. ENGESETH (2002): Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *J. Agric. Food Chem.* 50, 5870-5877.
- GIL, M. I., F. FERRERES, A. ORTIZ i sur. (1995): Plant phenolic metabolites and floral origin of rosemary honey. *J. Agric. Food Chem.* 43, 2833–2838.
- ISRAILI, Z. H. (2013): Antimicrobial properties of honey. *Am. J. Ther.* 35, 244-262.
- JAZVINŠČAK JEMBREK, M., A. ČIPAK GAŠPAROVIĆ, L. VUKOVIĆ, J. VLAINIĆ, N. ŽARKOVIĆ, N. ORŠOLIĆ (2012): Quercetin supplementation: insight into the potentially harmful outcomes of neurodegenerative prevention. *Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* 385, 1185-97.
- KRELL, R. (1996): Value-added products from beekeeping. 2. FAO Agricultural Services Bulletin No. 124. Food and Agriculture Organization of the UN.
- KUNČIĆ, M. K., D. JAKLIC, A. LAPANJE, N. GUNDE-CIMERMAN (2012): Antibacterial and antimycotic activities of Slovenian honeys. *Br. J. Biomed. Sci.* 69,154-158.
- KWAKMAN P. H., S. A. ZAAT (2012): Antibacterial components of honey. *IUBMB Life* 64, 48-55.

- LOVEAUX, J., A. MAURIZIO, G. VORWOHL (1978): Methods of melissopalimnology. *Bee World*. 59, 139-57.
- McKIBBEN, J., N. J. ENGESETH (2002): Honey as a protective agent against lipid oxidation in ground turkey. *J. Agric. Food Chem.* 50, 592 – 595.
- MOLAN, P. C. (1992a): The antibacterial activity of honey: The nature of the antibacterial activity. *Bee World* 73, 1, 5 – 28.
- MOLAN, P. C. (1992b): The antibacterial activity of honey: Variation in the potency of the antibacterial activity. *Bee World* 73, 2, 59 – 76.
- NAGLIĆ, T., D. HAJSIG, J. MADIĆ, LJ. PINTER (2005): Veterinarska mikrobiologija – specijalna bakteriologija i mikrobiologija, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatsko mikrobiološko društvo, 43 - 194.
- SCHEPARTZ, A. I. (1965): The glucose oxidase of honey. Kinetics and stoichiometry of the reaction. *Biochem. Biophys. Acta* 99, 161-164.
- SILICI, S., O. SAGDIC, L. EKICI (2010): Total phenolic content, antiradical, antioxidant and antimicrobial activities of *Rhododendron* honeys. *Food Chem.* 121, 238–243.
- SLAČANAC, V. (2009): Med. Interna skripta, Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek.
- TAORMINA, P. J., B. A. NIEMIRA, L. R. BEUCHAT (2001): Inhibitory activity of honey against food borne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. *Int. J. Food Microbiol.* 69, 217–225.
- TONKS. A., R. A. COOPER, A. J. PRICE, P.C. MOLAN, K. P. JONES (2001): Stimulation of TNF-alpha release in monocytes by honey. *Cytokine* 14, 240-2.
- TUCAK, Z., T. BAČIĆ, S. HORVAT, Z. PUŠKADIJA (1999): Pčelarstvo. Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek, 71–195.
- WESTON, R. J. (2000) The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey: a review. *Food Chem.* 71, 235–239.
- WHITE, J. W., M. H. SUBERS, A. I. SHEPARTZ (1963): The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose-oxidase system. *Biochem. Biophys. Acta* 73, 57-70.
- YAGHOUBI, N., N. AL-WAILI, M. GHAOUYUR-MOBARHAN, S. M. PARIZADEH, Z. ABSALTI i suradnici (2008): Natural honey and cardiovascular risk factors; effects on blood glucose, cholesterol, triacylglycerole, CRP, and body weight compared with sucrose. *Sci. World J.* 8, 463-9.
- PRIMORAC LJ., D., BUBALO, D., KENJERIC, I., FLANJAK, A., PERL PIRICKI, M., L. MANDIC (2008): Pollen Spectrum and Physicochemical Characteristics of Croatian Mediterranean Multifloral Honeys. *Deut. Lebensm.-Rundsch.* 4, 170-175.
- TERE, V. (2013): Antimikrobni učinci meda iz Dalmacije i dalmatinskog zaleđa. Diplomski rad. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

8. SAŽETAK

U radu je određivana minimalna inhibitorna koncentracija 16 različitih vrsta meda prikupljenih na području Dalmacije i kontinentalnog dijela Republike Hrvatske. Pri tome su istraženi uzorci meda amorfne, bagrema, bijele djeteline, divljeg duhana, drače, hrasta meduna, kadulje, kestena, kupine, lavande, lipe, medljike jele, ružmarina, suncokreta, tilovine i vrijeska. Njihova antibakterijska učinkovitost je istražena na osam odabranih bakterija onečišćivača hrane i uzročnika infekcija (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus fecalis*, *Salmonella enteritica*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157:H7). Za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije meda uporabljena je metoda nasadivanja bakterija u jažice na mikro pločama u koje su dodavana serijska razrjeđenja istraživanih uzoraka meda. Nakon 24-satne inkubacije očitani su rezultati, a najniža koncentracija meda koja je u potpunosti inhibirala rast istraživanih bakterija smatrana je minimalnom inhibitornom koncentracijom za isti. Od istraživanih uzoraka, med drače, hrasta meduna, medljikovca jele, kestena i kupine pokazali su učinkovito djelovanje u vrlo niskim minimalnim inhibitornim koncentracijama. Uzorak meda kadulje djelovao je u relativno niskim koncentracija protiv testiranih bakterija s izuzetkom na *E. fecalis* i *S. enteritica*. Uzorci meda lavande međusobno su se značajno razlikovali, dok su uzorci meda bagrema, bijele djeteline, lipe, ružmarina i suncokreta pokazali određena antibakterijska svojstva, no za učinkovito djelovanje je potrebna njihova visoka koncentracija.

Ključne riječi: med, antibakterijska učinkovitost, minimalna inhibitorna koncentracija.

9. SUMMARY

DETERMINATION OF ANTIBACTERIAL MINIMAL INHIBITION CONCENTRATIONS OF HONEY

The aim of this research was determination of antibacterial minimal inhibition concentrations of 16 various honeys gathered around Croatia; from different floral sources: acacia, black locust, white clover, wild tobacco, Christ thorn, oak honeydew, sage, chestnut, blackberry, lavender, linden, fir honeydew, rosemary, sunflower, Dalmatian laburnum and heather. Their antibacterial efficiency was tested on eight food spoilage bacteria and infection causers (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus fecalis*, *Salmonella enteritica*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli O157:H7*). Dilution method was used to determine the minimum inhibitory concentrations (MICs) of honey samples, while this is the reference method for antimicrobial susceptibility testing. Following overnight incubation the determination of antibacterial minimal inhibition concentrations were done. From examined honey samples excellent antibacterial efficiency was determined for Dalmatian laburnum, oak honeydew, fir honeydew, chestnut and blackberry honeys with very low minimal inhibition concentrations. In addition, sage honey samples showed relatively low minimal inhibition concentrations, with exception for *E. fecalis* and *S. enteritica*. Lavender honey samples showed various antibacterial activities depending on bacteria tested. For samples of acacia, white clover, linden, rosemary and sunflower honey weak antibacterial effectiveness was obtained; nevertheless in high concentrations they may show respectable antibacterial activity.

Key words: honey, antibacterial activity, minimal inhibition concentration.

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 6. ožujka 1982. godine u Koprivnici. Nakon osnovne škole upisala sam Srednju gospodarsku školu Križevci, smjer veterinarski tehničar. Po uspješno završenom srednjoškolskom obrazovanju 2000. godine upisala sam Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Apsolvirala sam 2007. godine. Udana sam, majka djevojčice Mije.