Antimikrobno djelovanje apitoksina na korisne i potencijalno patogene mikroorganizme izolirane iz hrane

Gugić, Domenika

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:095286

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-18**

Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

ANTIMIKROBNO DJELOVANJE APITOKSINA NA KORISNE I POTENCIJALNO PATOGENE MIKROORGANIZME IZOLIRANE IZ HRANE

DIPLOMSKI RAD

Domenika Gugić

Zagreb, rujan, 2020.

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture

Diplomski studij:
Agroekologija - Mikrobna biotehnologija u poljoprivredi

ANTIMIKROBNO DJELOVANJE APITOKSINA NA KORISNE I POTENCIJALNO PATOGENE MIKROORGANIZME IZOLIRANE IZ HRANE

DIPLOMSKI RAD

Domenika Gugić

Mentor:
Izv. prof. dr. sc. Mirna Mrkonjić Fuka

Zagreb, rujan, 2020.

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture

IZJAVA STUDENTA

O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Domenika Gugić**, JMBAG 0178103145, rođena 01.08.1995. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

ANTIMIKROBNO DJELOVANJE APITOKSINA NA KORISNE I POTENCIJALNO PATOGENE MIKROORGANIZME IZOLIRANE IZ HRANE

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____ _____

Potpis studentice

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice **Domenike Gugić**, JMBAG 0178103145, naslova

ANTIMIKROBNO DJELOVANJE APITOKSINA NA KORISNE I POTENCIJALNO PATOGENE MIKROORGANIZME IZOLIRANE IZ HRANE

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____ , dana _____ .

Povjerenstvo:			potpisi:
1.	Izv. prof. dr. sc. Mirna Mrkonjić Fuka	mentor	_____
2.	Izv. prof. dr. sc. Marko Vinceković	član	_____
3.	Doc. dr. sc. Lidija Svečnjak	član	_____

Zahvala

Najprije se želim zahvaliti svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Mirni Mrkonjić Fuka na omogućenoj temi diplomskog rada. Posebno hvala za ustupljeno vrijeme prilikom realizacije ovog rada te neprocjenjivo laboratorijsko radno iskustvo i preneseno znanje.

Veliko hvala mag. ing. agr. Irini Tanuwidjaja na svim savjetima i sugestijama tijekom istraživanja, neumornoj pomoći, strpljenju i pristupačnosti bez obzira na radno vrijeme.

Zahvaljujem se osoblju na Zavodu za kemiju i Zavodu za fitopatologiju Agronomskog fakulteta na omogućenom pristupu laboratorijskoj aparaturi i kemikalijama.

Hvala svim mojim prijateljima koji su uljepšali i upotpunili moje studentske dane.

Posebno hvala mojoj obitelji, mojim roditeljima, bratu i sestri što su bili moja podrška i oslonac tijekom studiranja.

Ivore, tebi hvala na svim lijepim trenucima, podršci i što si uvijek uz mene.

Sadržaj

1. Uvod 1
1.1. Hipoteza, opći i specifični ciljevi rada 3
2. Pregled literature 4
2.1. Apitoksin 4
2.1.1. Kemijska svojstva apitoksina 5
2.1.2. Antimikrobna svojstva apitoksina 7
2.1.3. Mehanizmi antimikrobnog djelovanja apitoksina 8
2.2. Zoonoze kao izvor mikrobiološke neispravnosti namirnica i gena antibiotičke rezistencije 10
2.2.1. Apitoksin u suzbijanju zoonoza i kao promotor rasta 11
2.3. Glavne karakteristike testiranih gram negativnih potencijalno patogenih vrsta 12
2.4. Glavne karakteristike testiranih gram pozitivnih potencijalno patogenih vrsta 13
2.5. Utjecaj antimikrobika na korisne mikroorganizme u prehrambenom proizvodnom lancu 15
2.6. Glavne karakteristike testiranih korisnih bakterija 16
2.7. *In vitro* metode za utvrđivanje antimikrobnog djelovanja tvari 17
2.7.1. Dilucijska metoda u tekućem hranjivom mediju 18
2.7.2. Disk difuzijska metoda za određivanje antimikrobne aktivnosti 18
3. Materijali i metode 19
3.1.1. Korištene otopine 20
3.1.2. Fiziološka otopina (0,85%) 20
3.1.3. McFarland standard 0,5 20
3.1.4. Koncentrirana otopina apitoksina (1 mg/mL) 20
3.1.5. Hranjive podloge za uzgoj bakterijske biomase za ispitivanje antimikrobne aktivnosti apitoksina 20
3.1.6. BHI tekuća hranjiva podloga (engl. *Brain Heart Infusion*) 20
3.1.7. BHI kruta hranjiva podloga (engl. *Brain Heart Infusion*) 20
3.1.8. Müller-Hinton tekuća hranjiva podloga 21
3.1.9. Müller-Hinton kruta hranjiva podloga 21
3.2. Prikupljanje apitoksina 21
3.3. Antibiotici 21
3.4. Odabir i uzgoj biomase 21
3.5. Određivanje minimalne inhibitorne i bakteriocidne koncentracije apitoksina 22
3.6. Određivanje i usporedba antimikrobnog djelovanja apitoksina i antibiotika 24
3.7. Statistička analiza 25
4. Rezultati 26
4.1. Morfološka karakterizacija odabranih izolata 26
4.2. Vizualno i spektrofotometrijsko određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) apitoksina 27
4.3. Određivanje minimalne bakteriocidne koncentracije (MBK) apitoksina 30
4.4. Utjecaj različitih koncentracija apitoksina na brojnost bakterija 32
4.5. Određivanje udjela antibiotičke aktivnosti apitoksina 36

4.5.1. Određivanje udjela antibiotičke aktivnosti gram pozitivnih bakterija 36
4.5.2. Određivanje udjela antibiotičke aktivnosti apitoksina gram negativnih bakterija 38
5. Rasprava 41
6. Zaključci 44
7. Popis literature 46
8. Prilog 55
8.1. Popis kratica 55
8.2. Tablice 57

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Domenike Gugić**, naslova

ANTIMIKROBNO DJELOVANJE APITOKSINA NA KORISNE I POTENCIJALNO PATOGENE MIKROORGANIZME IZOLIRANE IZ HRANE

Jedan od glavnih uzroka pojave mikrobne rezistencije na konvencionalne antibiotike je nekritično korištenje antibiotika u poljoprivrednoj proizvodnji. Stoga je nužno pronaći alternativna rješenja i nove tvari s visokoselektivnim i specifičnim antimikrobnim djelovanjem koji ne uzrokuju razvoj antibiotičke rezistencije. Među takvim spojevima ističu se kationski antimikrobni peptidi. U značajne izvore takvih peptida spada apitoksin (pčelinji otrov) kojeg luče medonosne pčele (*Apis mellifera* L.). Antimikrobno djelovanje apitoksina uglavnom se pripisuje melitinu, dominantnom peptidu u apitoksinu i enzimu fosfolipazi A_2. Cilj ovog rada je ispitati potencijal apitoksina u kontroli mikrobnog rasta. Ispitano je njegovo *in vitro* antimikrobno djelovanje u rasponu koncentracija 12,5 – 800 µg/mL, na korisne (*Lb. sakei* LS0296, *E. durans* ED004, *Lc. lactis* LL8307) te gram pozitivne (*S. aureus* subsp. *aureus* DSM 20231, *L. innocua* ATCC 33090, *B. cereus* DSM 6791) i gram negativne (*E. coli* ATCC 25922, *S. enterica* subsp. *enterica* DSM 14221) potencijalno patogene mikroorganizme te su određene minimalne inhibitorne (MIK) i bakteriocidne (MBK) koncentracije apitoksina za različite biomase ispitivanih bakterija (log 3, 6 i 8 CFU/mL). Nadalje, njegov učinak je uspoređen s konvencionalnim antibioticima. Utvrđeno je da apitoksin djeluje antimikrobno na sve ispitivane izolate. Rast izolata je obrnuto proporcionalan koncentraciji apitoksina, dok su MIK i MBK vrijednosti proporcionalne početnoj biomasi svih izolata. Iako su se vizualno MIK vrijednosti mogle odrediti nakon 24 h, pokazalo se da je spektrofotometrijska metoda osjetljivija i točnija od vizualne detekcije. U pravilu, MBK vrijednosti su jednake (kod izolata gdje je MIK≤12,5 µg/mL) ili dva puta veće od MIK vrijednosti. Pri biomasi od 8 log CFU/mL, djelovanje apitoksina na izolate *L. innocua*, *E. coli* i *S. enterica* subsp. *enterica* je bilo odgođeno i MIK vrijednosti su mogle biti određene tek nakon 48 h. Neočekivano visoke MBK vrijednosti zabilježene su kod *E. coli* (biomasa log 8 CFU/mL, 400 µg/mL) i *B. cereus* (3 log CFU/mL, 50 µg/mL). U oba slučaja se radi o bakterijama s dodatnim mehanizmima preživljavanja nepovoljnih uvjeta. Svi ispitivani izolati osjetljivi su na ispitivne konvencionalne antibiotike. Gram pozitivni izolati (*E. durans* ED004, *Lc. lactis* LL8307, *Lb. sakei* LS0296, *S. aureus*, *B. cereus* i *L. innocua*) osjetljivi su na koncentracije apitoksina >50 µg/disk i pokazuju do 40,7% efikasnosti tetraciklina i 52,2% efikasnosti eritromicina, dok su gram negativni (*E. coli, S. enterica*) osjetljivi na koncentracije >100 µg/disk i pokazuju 21,2% efikasnosti ciprofloksacina i 34,6% efikasnosti ampicilin-sulbaktama.

Ključne riječi: apitoksin, korisni mikroorganimi, patogeni iz hrane, MBK, MIK

Summary

Of the master's thesis – student **Domenika Gugić,** entitled

THE ANTIMICROBIAL EFFECT OF APITOXIN ON BENEFICIAL AND POTENTIAL PATHOGENS ISOLATED FROM FOOD

One of the main causes of microbial resistance to conventional antibioitics is non-critical antibiotics usage in agricurtural industry. This urges a need for alternative solutions and new substances with highly selective and specific microbial activity, while avoiding development of antimicrobial resistance. Cationic antimicrobial peptides are known as such substances. Important member of such peptides is apitoxin (bee venom), compound excreted by western honey bee (*Apis melifera* L.). In general, antimicrobial activity of apitoxin is attributed to melittine, predominant peptide isolated from apitoxin and phospholipase A_2 enzyme. The aim of this research was to examine inhibitory and bacteriocidal properties of apitoxin as potential antimicrobial agent. Antimicrobial properties of apitoxin was examined *in vitro*, using concentrations in range of 12.5 – 800 μg/mL to treat gram positive beneficial bacteria (*Lb. sakei* LS0296, *E. durans* ED004, *Lc. lactis* LL8370) as well as gram positive potential pathoges (*S. aureus* subsp. *aureus* DSM 20231, *L. innocua* ATCC 25922, *S. enterica* subsp. *enterica* DSM 14221). Minimal inhibitory (MIC) and bacteriocidal (MBC) concentrations of apitoxin for different biomasses of examined bacteria (log 3, 6 and 8 CFU/mL) were determined. Furthermore, its effect was compared with conventional antibiotics. It was shown that apitoxin has antimicrobial effect against all examined isolates. Bacterial growth was determined to be inversely proportional to apitoxin concentrations, while MIC and MBC values were proportionate to initial biomass of all isolates. Despite the visual measurability of MIC value after 24 h, spectrophotometry was found to be much more sensitive and precise than visual detection. In general, MBC values were equal (in isolates where MIK</=12.5μg/mL) or twice the MIK values. At 8 log CFU/mL, apitoxin had an delayed effect on isolates of *L. innocua*, *E. coli* and *S. enterica* subsp. *enterica* and MIC values were measurable after 48 h. Unexpectedly high MBC values were detected in *E. coli* (biomass log 8 CFU/mL, 400 μg/mL) and *B. cereus* (3 log CFU/mL, 50 μg/mL). Both cases include bacteria with additional survival mechanisms for unfavorable conditions. All examined isolates were resistant to conventional antibiotics. Gram positive isolates (*E. durans* ED004, *Lc.lactis* LL8307, *Lb. sakei* LS0296, *S. aureus*, *B. cereus* and *L. innocua*) are sensitive to apitoxin concentrations of >50 μg/disc with efficiency of tetracycline being 40.7% and eritromycine being 52.2%, while gram negative (*E. coli, S. enterica*) are sensitive to apitoxin concentrations >100μg/disc with efficiency of ciprofloxacine being 21.2% and ampiciline-sulbactam being 34.6%.

Keywords: apitoxin, beneficial microorganisms, foodborne pathogens, MBC, MIC

1. Uvod

Ubrzani porast poljoprivredne proizvodnje i nekritično korištenje antibiotika uzrokovali su globalnu pojavu mikrobne rezistencije na konvencionalne antibiotike te naglasili nužnost pronalaska alternativnih rješenja. Jedno od takvih rješenja su antimikrobni peptidi (AMP). Antimikrobni peptidi predstavljaju jedan od najstarijih i visoko učinkovitih oblika antimikrobne obrane kod brojnih viših oblika života, poput biljaka, insekata, vodozemaca i nekih sisavaca, a obično se luče kao odgovor na stres. Istovremeno, mikroorganizmi rijetko razvijaju rezistenciju na ove spojeve (Zasloff 2002.). Uz bakteriocidno djelovanje na gram pozitivne i gram negativne bakterije, brojni AMP posjeduju i antiviralnu i antikancerogenu aktivnost (Hancock i Diamond 2000.). Među AMP se posebno ističu kationski antimikrobni peptidi (CAP) koji ubijaju bakterijske stanice narušavajući integritet citoplazmatskih membrana (Pandidan i Mechler 2019.).

Jedan od značajnih izvora CAP-a je apitoksin (pčelinji otrov) kojeg proizvode medonosne pčele (*A. mellifera* L.) u specijaliziranim otrovnim žlijezdama i luče ga u žalčani aparat te im služi kao prirodni mehanizam za obranu ili napad (Choi i sur. 2015.). Sam apitoksin je složena mješavina biološki aktivnih tvari, kao što su: enzimi, peptidi, biogeni amini i drugi spojevi (Pascoal i sur. 2019.). Često u svojem sastavu sadrži i toksične spojeve koji su visoko selektivni i djeluju specifično (Zolfagharian i sur. 2016.). Pčelinji otrov je poznat po tome što pokazuje antimikrobno djelovanje koje se pripisuje prisutnosti nekih peptida, posebice melitinu, dominantnom peptidu u apitoksinu (50 – 60%) (Habermann 1972.) i enzimu fosfolipazi A_2 (PLA_2) (Boutrin i sur. 2008.). Istraživanja su pokazala da, uz antimikrobnu, pokazuje i citolitičku (Gajski i Garaj-Vrhovac 2013.) i hemolitičku (Tossi i sur. 2000.) aktivnost, te ujedno, njegovo protuupalno i imunostimulativno djelovanje može štititi od infekcija uzrokovanih patogenima (Ali i Mohanny 2012.).

Do sada je dokazan pozitivan učinak apitoksina na rast i zdravlje pilića (Han i sur. 2010.) i svinja (Choi i sur. 2003.), povoljan učinak u liječenju rana i kožnih bolesti životinja (Han i sur. 2011.) kao i antimikrobno djelovanje na neke potencijalne patogene mikroorganizme važne u govedarstvu, mljekarstvu (Park i sur. 2013; Shebeeb i sur. 2020.) i akvakulturi (Han i sur. 2013.). Nadalje, inhibitoran učinak melitina, glavne sastavnice apitoksina, na formiranje biofilmova (Picoli i sur. 2017.; Arteaga i sur. 2019.), antimikrobno djelovanje na neke rezistentne patogene (Choi i sur. 2015.) i sinergističko djelovanje s antibioticima (Memeriani i sur. 2019.) čine ga dobrim kandidatom za kreiranje novih antibmikrobnih lijekova i suzbijanje patogena.

Dok je inhibitorno djelovanje na patogene ključno svojstvo antimikrobnih spojeva, djelovanje na korisnu mikrobiotu nije poželjno. Poznato je da su bakterije mliječne kiseline (BMK) uobičajena mikrobiota pčela, posebice rodovi *Lactobacillus* i *Enterococcus* (Gilliam 1997.; Rada i sur. 1997.; Olofsson i Vásquez 2008.; Carina Audisio i sur. 2011.) te su sastavni dio mikrobiote različitih tipova fermentiranih namirnica i probiotičkih pripravaka (Chaucheyras-Durandi i Durand 2010.).

U ovom radu je provedeno istraživanje antimikrobnog utjecaja apitoksina sakupljenog pomoću specijalno dizajniranog električnog sakupljača, na štetnu mikrobiotu koja spada u skupinu zoonoza koje, osim što izazivaju bolesti kod ljudi i životinja, vrlo često kontaminiraju namirnice životinjskog porijekla. Nadalje, istražen je utjecaj apitoksina na korisnu mikrobiotu bakterija mliječne kiseline (BMK). Određene su minimalne inhibitorne i bakteriocidne koncentracije apitoksina prema pet potencijalno patogenih vrsta (*Salmonella enterica* subsp. *enterica*, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, *Listeria innocua*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*) te potencijalnim probiotičkim i biotehnološki značajnim sojevima BMK (*Lactobacillus sakei*, *Lactococcus lactis* i *Enterococcus durans*). Ujedno je ispitana i uspoređena osjetljivost navedenih izolata prema komercijalnim antibioticima te na apitoksin.

1.1. Hipoteza, opći i specifični ciljevi rada

Svi ispitivani autohtoni sojevi bakterija mliječne kiseline (BMK) (*Lactobacillus sakei* LS0296, *Lactococcus lactis* LL8307 i *Enterococcus durans* ED004) su izolirani i detaljno molekularno-biološki karakterizirani u prethodnim istraživanjima te pokazuju potencijal za primjenu u obliku starter kultura. Uz korisne sojeve, biti će ispitani i predstavnici gram pozitivnih (*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* DSM 20231, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Bacillus cereus* DSM 6791) i gram negativnih (*Salmonella enterica* subsp. *enterica* DSM 14221 i *Escherichia coli* ATCC 25922) potencijalnih patogenih bakterija koji se prenose hranom.

Opći cilj ovog rada je ispitati *in vitro* antimikrobnu aktivnost apitoksina na autohtone sojeve bakterija mliječne kiseline (BMK) i patogene koji se prenose hranom, te usporediti njegovo djelovanje s antibioticima, kako bi se utvrdio njegov potencijal u kontroli mikrobnog rasta.

Hipoteza ovog istraživanja je da će apitoksin u manjim koncentracijama djelovati inibitorno i/ili bakteriocidno na bakterijske kulture, te da će pokazati antimikroban učinak usporediv s konvencionalnim antibioticima i kao takav predstavljati alternativno rješenje u suzbijanju zoonoza.

Specifični ciljevi rada:

1. Odrediti sposobnost rasta ispitivanih sojeva i izolata ovisno o u prisutnosti različitih koncentracija apitoksina nakon 0 h, 24 h i 48 h.

2. Utvrditi minimalnu inhibitornu koncentraciju apitoksina za ispitivane izolate.

3. Utvrditi minimalnu bakteriocidnu koncentraciju apitoksina za ispitivane izolate.

4. Utvrditi utjecaj različitih koncentracija apitoksina na brojnost ispitivanih izolata.

5. Usporediti osjetljivost izolata na antibiotike i apitoksin.

2. Pregled literature

2.1. Apitoksin

Apitoksin ili pčelinji otrov je izlučevina koju proizvode medonosne pčele (*A. mellifera* L.) pomoću otrovne žlijezde (smještene u stražnjem dijelu šupljine zatka) koja je povezana sa žalčanim aparatom (Bridges i sur. 1984.). Osnovna biološka namjena apitoksina je obrana pčelinje zajednice od neprijatelja, a odrasla jedinka (pčela radilica) prilikom napada može injektirati do 0,1 mg otrova iz žalca (Schmidt i Buchmann 2005.).

Tijekom povijesti se koristio u narodnoj medicini za liječenje kožnih bolesti, artritisa, kardiovaskularnih bolesti, multiple skleroze i kancerogenih tumora (Cherniack i sur. 2010.; Alqutub i sur. 2011.). Danas se sve više prepoznaje njegov potencijal za primjenu u poljoprivrednoj i stočarskoj industriji.

U prirodnom obliku apitoksin je prozirna, viskozna tekućina, gorkog okusa i bez mirisa, dok je u dehidriranom obliku krupni prah svijetlo-žute boje (**Slika 2.1**.). Vrlo je postojan pri niskim temperaturama, a u kontaktu s kisikom mijenja boju u smeđe žutu, prilikom čega može izgubiti korisna farmakološka svojstva, dok toksikološka svojstva ostaju očuvana (Shimpi i sur. 2016.).

Apitoksin je složena mješavina bioaktivnih tvari, a njegova antimikrobna aktivnost se pripisuje prvenstveno peptidima (Shimpi i sur. 2016.). Osim cjelovitog otrova, sve se više ispituje i djelovanje njegovih pojedinačnih sastavnica, a utvrđeno je da neke od njih uspješno hidroliziraju staničnu membranu i učinkovito suzbijaju razvoj biofilmova (Picoli i sur. 2017.; Fadl 2018.; Arteaga i sur. 2019.).

Slika 2.1. Prah cjelovitog apitoksina u dehidriranom obliku

2.1.1. Kemijska svojstva apitoksina

Kompleksni kemijski sastav apitoksina je detaljno istražen zahvaljujući metodama frakcijskog razdvajanja smjesa i pojavom novih „omičkih“ znanosti (Pucca i sur. 2019.). Otrovi vrsta roda *Apis* su sličnog sastava, no postoje male razlike unutar podvrsta (Hegazi i sur. 2012.).

Sastav apitoksina ovisi o brojnim čimbenicima, uključujući starost pčele, vremenu i metodi prikupljanja te rukovanju i skladištenju. pH apitoksina se kreće od 4,5 do 5,5. Topiv je u vodi, ali ne u alkoholu i amonij sulfatu (Ali, 2012.). Sastoji se od oko 88% vode i najmanje 18 farmakološki značajnih sastavnica (Surendra i sur. 2011.). Glavne sastavnice apitoksina su: melitin, fosfolipaza A_2, apamin i peptid koji degranulira mastocite (MCD peptid, engl. *mast cell degranulating)* (Rader i sur. 1987; Szokan i sur. 1994; Packaova i sur. 1995; Kokot i Matysiak 2008.).

Bioaktivne tvari pčelinjeg otrova mogu se podijeliti u 3 skupine:

1. proteini: melitin, apamin, peptid koji degranulira mastocite (MCD peptid, engl. *mast cell degranulating)* i adolapin
2. enzimi: fosfolipaza A_2 (PLA_2), hijaluronidaza, α-glukozidaza, kisela fosfomonoesteraza, lizofosfolipaza
3. ostali spojevi: aminokiseline, fosfolipidi i hlapljive sastavnice (Surendra i sur. 2011.).

Detaljan kemijski sastav apitoksina, kao i udjeli pojedinačnih sastavnica prikazani su u **Tablici 2.1.**

Tablica 2.1. Popis glavnih sastavnica apitoksina i njihovih udjela u suhoj tvari (Bogdanov 2017.).

Skupina tvari	Sastavnica	Udio u suhoj tvari (%)
Proteini (enzimi)	Fosfolipaza A_2	10 – 12
	Fosfolipaza B	1
	Hijaluronidaza	1 – 2
	Fosfataza	1
	α - glukozidaza	0,6
Peptidi	Melitin	40 – 50
	Apamin	2 – 3
	MCD peptidi	2 – 3
	Sekapin	0,5 – 2
	Pamin	1 – 3
	Minimin	2
	Adolapin	0,5 – 1
	Prokamin A, B	1 – 2
	Inhibitor proteaze	0,1 – 0,8
	Terciapin, kardiopep, melitin F	1 – 2
Fosfolipidi		1 – 3
Biogeni amini	Histamin	0,5 – 2
	Dopamin	0,2 – 1
	Noradrenalin	0,1 – 0,5
Aminokiseline	α-aminokiseline, aminomaslačna kiselina	1
Šećeri	Glukoza, fruktoza	2 – 4
Hlapljive sastavnice (feromoni)	Složeni eteri	4 – 8
Minerali	P, Ca, Mg	3 – 4

2.1.2. Antimikrobna svojstva apitoksina

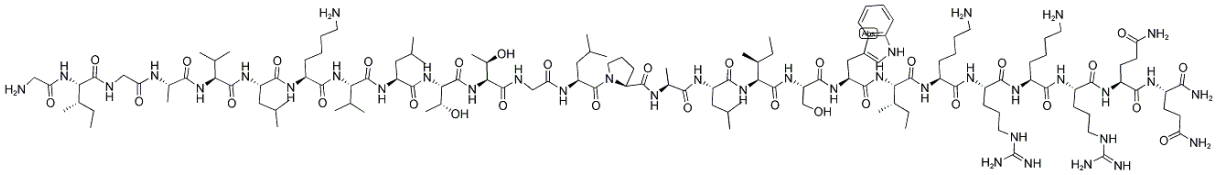
Antimikrobna svojstva apitoksina se pripisuju prvenstveno djelovanju antimikrobnih peptida (AMP) koji čine velik udio suhe tvari otrova. Osamdesetih godina 20. stoljeća jedan od prvih antimikrobnih peptida je izoliran upravo iz medonosne pčele (*A. mellifera* L.) i nazvan je melitin (Moreno i Giralt 2015.).

Antimikrobni peptidi su bioaktivni spojevi koji posjeduju antimikrobna svojstva i sposobnost modulacije imunosnog sustava. Smatraju se ubikvitarnima i dio su urođenog imunosnog sustava svih živih bića (Ganz i sur. 1997.). Djeluju na staničnu stijenku i membranske lipide, povećavaju permeabilnost stanične membrane, uzrokuju lizu i u konačnici smrt stanice (Brogden 2005.), pritom rijetko uzrokujući razvoj antibiotičke rezistencije (Zasloff i sur. 2002.).

Peptid melitin i enzim fosfolipaza A_2 su dvije najvažnije sastavnice apitoksina i smatra se da su odgovorni za većinu antimikrobnih učinaka apitoksina, te da često djeluju sinergistički (Asthana i sur. 2004.).

Melitin

Melitin se smatra najvažnijom antimikrobnom sastavnicom apitoksina i čini 50 – 60% suhe tvari pčelinjeg otrova (Habermann 1972.). To je amfipatski polipetid koji se sastoji od 26 aminokiselina (**Slika 2.2.**) i čija je primarna sekvenca: Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln (Woods i sur. 2017.). Terminalna amino regija (aminokiseline 1 – 20) je hidrofobna i ne pokazuje litičku aktivnost, dok je terminalna karboksilna regija (aminokiseline 21 – 26) hidrofilna i odgovorna za litičko djelovanje (Schroder i sur. 1971.; Gevod i sur. 1984.).



Slika 2.2. Amfipatska građa melitina (Gajski i Garaj-Vrhovac 2013.).

Amfipatska svojstva ga čine topivim u vodi, omogućavaju mu vezanje na staničnu membranu poput deterdženta i posljedičnu razgradnju fosfolipidnih slojeva. Njegovim djelovanjem se stvaraju pore u staničnoj membrani, što mijenja njezinu permeabilnost i dovodi do stanične lize (Papo i Shai 2003.). Stoga se antimikrobna (Gajski i Garaj-Vrhovac 2013.), antifungalna, hemolitička i antitumorska aktivnost apitoksina uglavnom pripisuje citolitičkom djelovanju melitina. Također, katalizira djelovanje i djeluje sinergistički s fosfolipazom A_2 (Sharma 1993.).

Fosfolipaza A_2 (PLA_2)

Enzim fosfolipaza A_2 (PLA_2) je najletalniji enzim pčelinjeg otrova i čini 12 – 15% sastava suhog otrova. To je polipetid male molekulske mase koji se sastoji od 128 aminokiselina (Shipolini i sur. 1974.). Ima važnu ulogu u metabolizmu fosfolipida, induciranju T-stanica, imunosnom odgovoru na patogene i usporavanju napretka moždanih i neuropatskih bolesti (Alvarez-Suarez 2017.).

Fosfolipaza A_2 primarno katalizira hidrolizu fosfolipida, glavnog sastojka staničnih membrana, čemu se pripisuje njegovo snažno antimikrobno djelovanje (Balsinde i sur. 2002.). Vrijeme i način njegovog djelovanja na prokariote ovisi prvenstveno o strukturi stanične stijenke (Van Boeckel i sur. 2015.). Iako su neka istraživanja pokazala da PLA_2 uspješno hidrolizira membranske fosfolipide i gram pozitivnih i gram negativnih bakterija (Harwig i sur. 1995.) utvrđeno je da PLA_2 ima drugačije mehanizme djelovanja ovisno o građi stanične stijenke (Nevalainen i sur. 2008.).

PLA_2 može neometano penetrirati peptidoglikanski sloj gram pozitivnih bakterija, što joj omogućuje lakšu hidrolizu fosfolipida. Stanična stijenka gram negativnih bakterija je drugačije građena od stanične stijenke gram pozitivnih bakterija. Uz fosfolidnu membranu prekrivenu peptidoglikanskim slojem, stanična stijenka gram negativnih bakterija sadrži i dodatnu vanjsku dvoslojnu lipopolisaharidnu membranu koja prekriva peptidoglikanski sloj (Raetz i Dowhan 1990.). Zbog ovakve građe, gram negativne bakterije posjeduju urođenu rezistenciju na PLA_2 i antimikrobni učinak PLA_2 je moguć samo ako je vanjska membrana prethodno razgrađena pod utjecajem nekog drugog čimbenika.

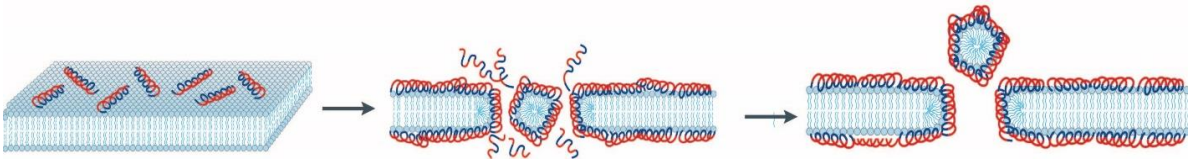
2.1.3. Mehanizmi antimikrobnog djelovanja apitoksina

a) Razaranje staničnog membranskog sustava

Antimikrobno djelovanje apitoksina se najvećim dijelom pripisuje melitinu, kationskom antimikrobnom peptidu (CAP). Njegove karakteristike, kao što su amfipatska priroda, naboj, veličina i aminokiselinski sastav, omogućavaju mu prijanjanje uz staničnu membranu i umetanje u fosfolipidni dvosloj, što uzrokuje promjene u permeabilnosti stanične membrane. Postoje dva modela koja objašnjavaju djelovanje apitoksina na razaranje staničnog membranskog sustava: karpetni (tzv. „tepih“, engl. „*carpet*“) i toroidalni model (Brogden 2005.).

Karpetni model

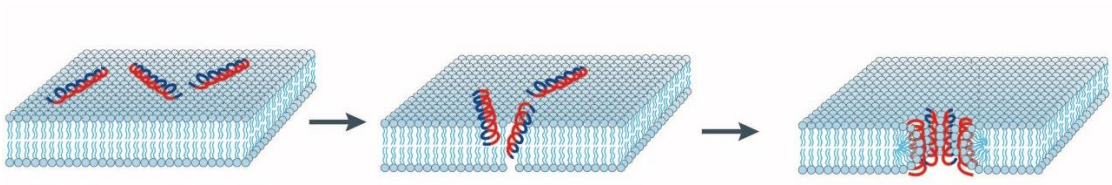
Kod karpetnog modela peptidi se nakupljaju na staničnoj membrani i usmjereni su paralelno s lipidnim dvoslojem. CAP se vežu na više mjesta na staničnoj membrani, za polarne fosfolipidne glave slabim elektrostatskim vezama formirajući pritom peptidni prekrivač (tzv. „tepih“, engl. *„carpet“*). Pretpostavlja se da petidni prekrivač djeluje kao deterdžent i uzrokuje stvaranje micela. Kada se na staničnoj membrani nakupi kritična koncentracija peptida, dolazi do formiranja kanala u staničnoj membrani, što omogućava vezanje dodatnih peptida, formiranje micela i razaranje membrane (**Slika 2.3**.).



Slika 2.3. Karpetni model razaranja membranskog sustava: hidrofilna regija CAP je prikazana crvenom, a hidrofobna regija plavom bojom. (Brogden 2005.).

Toroidalni model

Kod toroidalnog modela (**Slika 2.4**.) peptidi se umeću u staničnu membranu, agregiraju i induciraju savijanje lipidnog monosloja kroz pore. Pritom nastaju toroidalne hidrofilne pore čiji su zidovi građeni od hidrofilnih regija CAP i polarnih fosfolipidnih glava stanične membrane. Ovako formirani transmembranski kanali mijenjaju permeabilnost, što dovodi do razaranja staničnih membrana.



Slika 2.4. Toroidalni model razaranja membrane: hidrofilna regija CAP je prikazana crvenom, a hidrofobna regija plavom bojom. (Brogden 2005.).

b) Razaranje bakterijskih biofilmova

Antimikrobni peptidi, poput melitina, mogu djelovati na bakterijske biofilmove u različitim fazama formiranja. AMP mogu prodrijeti u matriks biofilma i ubiti stanice koje ga tvore (Dosler i Karaaslan 2014.; Batoni i sur. 2016.) razaranjem njihovog membranskog sustava. Apitoksin djeluje inhibitorno i na multirezistentne bakterije roda *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Klebsiella* i *Enterococcus* koji su poznati po tvorbi snažnih biofilmova (Fadl 2018.).

c) Vezanje za bakterijske lipopolisaharide

Vanjska membrana stanične stijenke gram negativnih bakterija sadrži lipopolisaharide (LPS) (Nikaido 1994.). LPS se smatra endotoksinom jer djeluje toksično, uzrokuje upalne procese i sepsu u ljudi. Bhunia i sur. (2007.) su pokazali da se melitin zbog svoje specifične α-helikalne građe može vezati za LPS svojim karboksilnim terminalnim krajem, što mu omogućuje prodiranje u bakterijske stanične membrane te njihovo razaranje.

2.2. Zoonoze kao izvor mikrobiološke neispravnosti namirnica i gena antibiotičke rezistencije

Bolesti uzrokovane mikrobiološki neispravnim namirnicama velik su globalni problem. Procjenjuje se da od trovanja hranom obolijeva trećina ljudske populacije svake godine, a glavni uzročnici tih bolesti su upravo zoonoze (Schlundt i sur. 2004.). S druge strane, pojačanu zabrinutost izaziva i pojava antibiotičke rezistencije u bakterija, čija se transmisija odvija i kroz prehrambeni lanac.

Zoonoze ili bolesti animalnog podrijetla su bolesti koje se prenose sa životinje na čovjeka kao posljedica izravnog ili neizravnog kontakta sa zaraženom životinjom ili putem kontaminirane hrane (EFSA 2016.). Do danas je istraženo oko 1400 ljudskih patogena, a otprilike 800 njih je animalnog podrijetla (Cantas i sur. 2014.). U Europskoj uniji se svake godine bilježi preko 200,000 prijavljenih slučajeva zaraze bakterijskim zoonozama, a najčešći uzročnici su: *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Listeria* spp., te vrste iz porodice *Enterobacteriaceae* (Chlebicz i sur. 2018.).

Prema tome, sve se intenzivnije traga za alternativnim antimikrobnim spojevima koji će učinkovito suzbijati zoonoze, smanjiti pojavljivanje rezidua lijekova u namirnicama i spriječiti širenje antimikrobne rezistencije (AMR), a naposlijetku i sačuvati djelotvornost postojećih antibiotika (Brogden 2005.).

2.2.1. Apitoksin u suzbijanju zoonoza i kao promotor rasta

1940-ih godina započela je intenzivna primjena antibiotika u veterinarskoj medicini i do danas je glavni način suzbijanja bolesti na farmama. U nekim je zemljama potrošnja antibiotika u veterinarskoj medicini premašila upotrebu antibiotika u humanoj medicini, npr. u SAD iznosi 70% ukupne potrošnje antibiotika (O'Neill i sur. 2015.).

Do danas je utvrđeno da apitoksin i njegove sastavnice pokazuju snažno antimikrobno djelovanje na mnoge patogene koji uzrokuju bolesti u akvakulturi, peradarstvu, svinjogojstvu i mljekarstvu, najvećim poljoprivrednim potrošačima antibiotika. Osim toga, mnoga istraživanja ukazuju na njegovu potencijalnu primjenu u svinjogojstvu, u suzbijanju respiratornih bolesti svinja (Choi i sur. 2003.) i neonatalne dijareje u prasaca uzrokovane bakterijama *E. coli, Streptococcus* spp., *Salmonella* spp. i *Staphylococcus* spp. (Choi i sur. 2001.).

Infekcije uzrokovane *S. aureus* i *E.coli* predstavljaju ekonomski problem i u mljekarskoj industriji jer uzrokuju upalu vimena mliječnih krava (mastitis) i neki autori su pokazali da bi upravo tretman apitoksinom mogao biti djelotvoran u liječenju mastitisa (Cho i Kang 2001.; Han i sur. 2009.; Park i sur. 2013.). Također, sastavnica melitin ima velik potencijal za primjenu u obliku dezinficijensa za aparaturu u proizvodnim pogonima mliječnih proizvoda, npr. sira. Snažno inhibira formiranje biofilmova (Fadl 2018.) i može učinkovito suzbiti patogene koji zaostaju na površini opreme za proizvodnju (Galdiero i sur. 2019.).

Također, njegov potencijal je prepoznat i u akvakulturi jer je utvrđeno da uspješno inhibira neke riblje patogene (Kim i sur. 2011.). Nadalje, pretpostavlja se da se može koristiti u prehrani stoke kao prirodni antibiotik protiv *B. cereus* sojeva, kao i nekih drugih vrsta patogena (Han i sur. 2018.).

Poznat je i njegov sinergistički učinak s ampicilinom ili penicilinom na meticilin-rezistentan *Staphylococcus aureus* (MRSA), a zabilježeno je i njegovo djelovanje protiv drugih multirezistentnih izolata (Choi i sur. 2015.).

B. cereus, E. coli, L. innocua, S. enterica subsp. *enterica* i *S. aureus* su vrlo česti uzročnici bolesti nastalih konzumacijom mikrobiološki neispravnih namirnica. Kontrola i prevencija širenja ovih patogena, već u samom uzgoju životinja, najučinkovitiji je način ograničavanja pojave bolesti zoonoza u namirnicama (Layton i sur. 2017.).

Apitoksin je istraživan i kao moguća zamjena promotorima rasta u peradarstvu koji se koriste radi povećanja proizvodnje mesa i jaja. Utvrđen je pozitivan utjecaj apitoksina na rast i razvoj brojler pilića nakon dodavanja apitoksina u vodu za napajanje (Ali i Mohanny 2014.), kao i povećanje tjelesne mase i jačanje njihova imunosnog sustava (Jung i sur. 2013.), a prilikom čega nije bilo nikakvih negativnih učinaka na tretirane životinje.

2.3. Glavne karakteristike testiranih gram negativnih potencijalno patogenih vrsta

Vrsta *E. coli* je gram negativna bakterija štapićastog oblika. Pripada odjeljku *Proteobacteria,* rodu *Escherichia* i porodici *Enterobacteriaceae.* Stanice *E. coli* mogu biti pokretne ili nepokretne. Fakultativni je anaerob i ne tvori spore.

Vrlo je važna vrsta u kliničkoj mikrobiologiji, okolišnoj mikrobiologiji i mikrobiologiji hrane. Izolirana je iz organizma ljudi, životinja, tla, vode i hrane. Kao komenzal najčešći je stanovnik gastrointestinalnog (GI) trakta u ljudi i toplokrvnih životinja, a isto tako je jedan od najčešćih ljudskih i životinjskih patogena te može izazvati cijeli niz potencijalno smrtonosnih infekcija. Najčešće izaziva enterokolitis, a od ostalih infekcija uobičajene su infekcije mokraćnih puteva, neonatalni meningitis i sepsa (Allocati i sur. 2013.).

U sigurnosti hrane su najvažniji sojevi koji uzrokuju bolesti probavnog sustava ljudi i životinja i koji umanjuju kvalitetu namirnica, npr. kvarenje mliječnih proizvoda, bubrenje i pucanje sira (Desmarchelier i Fegan 2016.). U mesne namirnice najčešće dospijeva tijekom evisceracije životinje i rukovanja mesom, posebice tijekom ispiranja trupova kontaminiranom vodom (Álvarez i sur. 2013.). *E. coli* je također indikator higijene hrane i upućuje na direktnu ili indirektnu kontaminaciju fekalijama. Najčešće se prenosi putem kontaminirane hrane ili vode, nedovoljno kuhanog mesa i nepasterizirnaog mlijeka (https://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/ecoli/en/). Unutar vrste postoje sojevi uzročnici intoksikacije hranom i mogu producirati termolabile ili termostabile enterotoksine, a razlikujemo 6 skupina: enterotoksičnu *E. coli* (ETEC), enteropatogenu *E. coli* (EPEC), eneteroagregacijsku *E. coli* (EAEC), difuzno-adhezivnu *E. coli* (DAEC), enteroinvazivnu *E. coli* (EIEC) i enterohemoragičnu *E. coli* (EHEC), također poznata kao shiga toksin producirajuća (STEC) i verotoksin producirajuća *E. coli* (VTEC) (Ekici i Dümen 2019.).

Neki sojevi *E. coli* izolirani iz životinjskog organizma pokazali su antibiotičku rezistenciju na mnoge konvencionalne antibiotike (ampicillin, sulfonamid, tetraciklin, cefalotin, trimetoprim-sulfametoksazol, streptomicin, klorampenikol, cefoksitin, gentamicin, amoksicilin-klavulanska kiselina, kanamicin), što je rezultat primjene antibiotika kao promotora rasta ili liječenja životinja. Također, i u ljudi su ustanovljeni rezistentni sojevi na ampicillin, sulfonamid i tetraciklin (Tadesse i sur. 2012.).

Vrsta *S. enterica* je gram negativna bakterija štapićastog oblika. Pripada odjeljku *Proteobacteria,* rodu *Salmnonella* spp. i porodici *Enterobacteriaceae.* Stanice *S. enterica* su pokretne. Fakultativni je anaerob i ne tvori spore.

Vrlo je važna vrsta u kliničkoj mikrobiologiji i mikrobiologiji hrane. Jedan je od najčešćih uzročnika enteričnih bolesti, uzrokujući bol u predjelu abdomena, grozncu, mučninu, povraćanje, akutni enterokolitis, dijareju i dehidriranje. U humanoj medicini je najvažnija

vrsta *S. enterica* subsp. *enterica* koja broji oko 1586 poznatih serotipova (Issenhuth i sur. 2014.).

U sigurnosti hrane su najvažniji sojevi koji uzrokuju poremećaje probavnog sustava ljudi i životinja te kvarenje svježih namirnica. *Salmonella* spp. vrste se mogu pronaći u GI traktu ljudi i životinja, uzrokujući razna patološka stanja, a glavni izvor zaraze s ovom bakterijom su voda i hrana kontaminirani fekalijama. Vrsta *S. enterica* je među najčešćim patogenima uzročnicima enteričnih bolesti, a *S. enterica* subsp. *enterica* je odgovorna za oko 99% salmoneloza u ljudi i toplokrvnih životinja (de Jesús Cortés Sánchez i sur. 2017.).

Neki sojevi su također razvili antibiotičku rezistenciju, posebice na sulfonamide, tetraciklin, β-laktamske antibiotike, a smatra se da je glavni i najveći izvor širenja gena antibiotičke rezistencije ovog soja peradarska industrija (Issenhuth i sur. 2014.).

2.4. Glavne karakteristike testiranih gram pozitivnih potencijalno patogenih vrsta

Vrsta *S. aureus* je gram pozitivna bakterija kokoidnog oblika. Pripada odjeljku *Firmicutes,* rodu *Staphylococcus* i porodici *Staphylococcaceae.* Stanice *S. aureus* nisu pokretne. Fakultativni je anaerob i ne tvori spore.

Ubikvitarna je vrsta i pripada uobičajenoj mikrobioti ljudi i toplokrvnih životinja, najčešće kolonizirajući kožu i sluznicu.

Vrlo je važna vrsta u kliničkoj mikrobiologiji i mikrobiologiji hrane. Jedan je od najčešćih oportunističkih patogena i uzročnika bolesti koje se prenose ingestijom kontaminirane hrane. Značajan je ljudski patogen koji može uzorkovati relativno benigne kožne infekcije, dok neki sojevi mogu prouzročiti teške ili fatalne infekcije uzrokovane njezinim invazivnim djelovanjem na krvožilni sustav (Chambers i De Leo 2009.).

Nadalje, brojni sojevi su razvili rezistenciju na neke konvencionalne antibiotike, a to se u prvom redu odnosi na meticilin-rezistentne *S. aureus* (MRSA) i vankomicin-rezistentne *S. aureus* (Corey 2009.). Antibiotik vankomicin je jedan od najsnažnijih načina obrane od bakterijskih infekcija, no posljednjih desetljeća su pojedini klinički izolati *S. aureus* razvili srednju ili potpunu rezistenciju na vankomicin i time postali jedan od najvećih zdravstvenih izazova u svijetu (Corey 2009.).

U sigurnosti hrane su najvažniji sojevi koji mogu producirati vrlo stabilne enterotoksine koji uzrokuju mučninu, povraćanje, dijareju ili kolabiranje (Ondusko i Nolt 2018.). U namirnice dospijevaju najčešće tijekom proizvodnje i prerade svježih proizvoda, kao što su meso i nepasterizirano mlijeko. Vrlo dobro preživljava uvjete tehnološkog procesa, pa se često nalazi

na površini opreme za proizvodnju hrane (Ondusko i Nolt 2018.). Glavni izvor zaraze je loša higijena proizvodnje prilikom rukovanja namirnicom.

Vrsta *B. cereus* je gram pozitivna bakterija štapićastog oblika. Pripada odjeljku *Firmicutes*, rodu *Bacillus* i porodici *Bacillaceae*. Stanice *B. cereus* su pokretne. Fakultativni je anaerob i tvori spore.

Vrlo je važna vrsta u kliničkoj mikrobiologiji, okolišnoj mikrobiologiji i mikrobiologiji hrane. Jedan je od najčešćih uzročnika trovanja hranom, uzrokujući povraćanje, dijareju i mučninu (Peng i sur. 2001.).

U sigurnosti hrane su najvažniji sojevi koji uzrokuju poremećaje probavnog sustava ljudi te kvarenje namirnica. Unutar vrste *B.cereus* postoje sojevi koji mogu uzrokovati dvije vrste bolesti uzrokovane ingestijom hrane: intoksikaciju toksinom iz hrane i infekciju ingestijom stanica koje produciraju enterotoksine (Peng i sur. 2001.).

Sporogenost joj omogućava adaptaciju i preživljavanje u uvjetima tehnološkog procesa. Može preživljavati na površinama nehrđajućeg čelika i rezistentna je na većinu kemikalija za čišćenje proizvodne opreme (Peng i sur. 2001.).

Široko je rasprostranjena u prirodi i prisutna je u smjesi aerosola, svježim namirnicama te je sastavni dio mikrobiote tla. Glavni izvori zaraze vezane uz hranu su: teletina, puretina, riža, grah, povrće. Uzročnici dijareje se posebice javljaju u mesu, mlijeku, povrću, ribi. Poznato je da uzrokuje slatkast i gorak defektan okus u mlijeku (Huang i sur. 1999.) te kvarenje i umanjivanje kvalitete pasteriziranog mlijeka i mliječnih proizvoda (Christiansson i sur. 1999.).

Također, u nekih sojeva izoliranih iz mliječnih proizvoda je zabilježena antibiotička rezistencija na β-laktamske antibiotike, tetraciklin, eritromicin i rifampin (Ozcelik i Citak 2009.).

Vrsta *L. innocua* je gram pozitivna bakterija štapićastog oblika. Pripada odjeljku *Firmicutes,* rodu *Listeria* i porodici *Listeriaceae*. Stanice *L. innnocua* su pokretne. Fakultativni je anaerob i ne tvore spore (Bayoub i sur. 2010.).

Vrsta *L. innocua* široko je rasprostranjena u okolišu i može se pronaći u hrani. Pokazalo se da dobro tvori biofilmove. Izolirana je iz sirovog i nepasteriziranog mlijeka, sira, sladoleda, povrća, fermentiranog mesa i kobasica, kuhanih pilećih proizvoda, sirovog mesa, sirovih ili dimljenih morskih proizvoda (Amusan i Sanni 2018.).

Pojedini sojevi su važni u kliničkoj mikrobiologiji i mikrobiologiji hrane. Virulentnost ove vrste još uvijek nije u potpunosti istražena (Orsi i Wiedmann 2016.). Pripada skupini *sensu stricto* listerijama, zajedno s *L. monocytogenes, L. seeligeri, L. marthii, L. ivanovii, L.*

welshimeri (Chiara i sur 2015.), druga skupina, *sensu lato,* sačinjava 11 vrsta *Listeria* (Orsi i Wiedmann 2016.).

U sigurnosti hrane su najvažniji sojevi za koje se pretpostavlja da mogu uzrokovati teška oboljenja u ljudi i sojevi za koje se smatra da imaju učinak poput *L. monocytogenes*. Izvori zaraze mogu biti: fekalije, meso i mliječni proizvodi (Orsi i Wiedmann 2016.).

Također, poznato je da su neki sojevi *L. innocua* izolirani iz nepasteriziranog mlijeka razvili rezistentnost na tetraciklin (Slade i sur., 1991), a isto je ustanovljeno i u ostalim mliječnim proizvodima i mesu (Facinelli i sur. 1991.).

2.5. Utjecaj antimikrobika na korisne mikroorganizme u prehrambenom proizvodnom lancu

Mikrobiološka ravnoteža gastrointestinalnog (GI) sustava životinja često je narušena upotrebnom raznih antimikrobnih lijekova, što utječe na kasniji mikrobiološki sastav namirnice, a ostavlja i nepoželjne rezidue lijekova. Kada je riječ o korisnoj mikrobioti životinja, tada najčešće govorimo o bakterijama mliječne kiseline (BMK). Obično se upotrebljavaju i kao starter, bioprotektivne ili probiotičke kulture u poljoprivrednoj i prehrambenoj proizvodnji fermentiranih namirnica animalnog podrijetla (Chaucheyras-Durandi i Durand 2010.). Koriste se u liječenju bolesti zoonoza, a također je poznato i njihovo inhibitorno djelovanje na patogene u GI traktu (Chaucheyras-Durandi i Durand 2010.). Probioticima se smatraju žive, nepatogene bakterije koje se unose u GI sustav domaćina i koloniziraju ga, pozitivno djeluju na probavu i imunološki sustav (FAO/WHO 2002.). Smatraju se sigurnima za ljudsku i životinjsku upotrebu i spadaju u skupinu GRAS (engl. *generally regarded as safe)* mikroorganizama.

Probiotici se mogu koristiti u veterinarskoj industriji u peradarstvu, svinjogojstvu i uzgoju preživača. Mikrobiota GI sustava životinja igra ključnu ulogu u procesu probavljanja hrane te općenito utječe na njihovo zdravlje, opskrbljujući životinju dodatnim nutrijentima i enzimima (Hooper i sur. 2002.; Wang 2007.). Utvrđeno je da mogu poboljšati ukupnu masu peradi i povećati proizvodnju mlijeka u mliječnih krava (Krehbiel i sur. 2003.). Koriste se i u liječenju dijareje u prasaca, mastitisa u mliječnih krava, te za jačanje imunosnog sustava životinje (FAO 2016.).

Još nije poznato kakav je utjecaj apitoksina kao antimikrobika na korisne mikroorganizme, ali neki autori tvrde da probiotici u kombinaciji s apitoksinom povoljno utječu na rast i razvoj prasaca (Choi i sur. 2003.). Između ostalog, i sam GI trakt pčela sadrži većinom bakterije mliječne kiseline, posebice rodove *Lactobacillus* i *Enterococcus* (Olofsson i Vasquez 2008.).

Vrste rodova *Lactococcus, Lactobacillus i Enterococcus* također pripadaju skupini bakterija mliječne kiseline i pojavljuju se u hrani i fermentiranim namirnicama, a iako je poznato da ih suzbijaju brojni antibiotici koji se upotrebljavaju u liječenju zoonoza, utjecaj apitoksina na njih još uvijek nije poznat.

2.6. Glavne karakteristike testiranih korisnih bakterija

Vrsta *Lc. lactis* je gram pozitivna bakterija kokoidnog oblika. Pripada odjeljku *Firmicutes*, rodu *Lactococcus* i porodici *Streptococcaceae.* Stanice *Lc. lactis* nisu pokretne. Fakultativni je anaerob i ne tvori spore.

Vrlo je važna vrsta u mikrobiologiji hrane te u genetičkom inženjerstvu. Pripadaju skupini BMK, što ih čini vrlo važnim mikroorganizmima za prehrambenu industriju (Fijan 2014.). Rod *Lactococcus* je jedan od najvažnijih skupina BMK koje se koriste u mliječnoj industriji. Glavna mu je uloga prozvodnja mliječne kiseline iz laktoze, hidroliza kazeina i fermentacija limunske kiseline (Fijan 2014.). Zbog toga ima znatan utjecaj na teksturu i okus krajnjeg proizvoda. Vrlo su važni i u prevenciji rasta mikroorganizama kvarenja namirnica u mlijeku. Proizvode nizin i često se koriste u kombinaciji s drugim probioticima za liječenje dijareje (Fijan 2014.). Također, neki sojevi mogu proizvoditi antigene, pa stoga imaju dobar potencijal za nositelje cjepiva (Pouwels i sur. 1998.).

Vrsta *Lb. sakei* je gram pozitivna bakterija iz odjeljka *Firmicutes.* Pripada rodu *Lactobacillus* i porodici *Lactobacillaceae.* Stanice su štapićastog oblika i ne tvore spore. Anaerobni su mikroorganizmi. Stanice *Lb. sakei* nisu pokretne.

Pripadaju skupini BMK, što ih čini vrlo važnim mikroorganizmima za prehrambenu industriju. Dio su uobičajene mikrobiote usta, GI trakta i uro-genitalnog sustava ljudi i životinja. (Fijan 2014.).

Proizvode mliječnu kiselinu i time pridonose produljenju vijeka namirnice. Pojedini sojevi su vrlo važni u biotehnologiji, jer osim produkcije mliječne kiseline, mogu proizvoditi bakteriocine i imati povoljna probiotička svojstva. Prema FDA (*Food and Drug Administration*), smatra se GRAS organizmom.

Vrsta *E. durans* je gram pozitivna bakterija kokoidnog oblika. Pripada odjeljku *Firmicutes,* rodu *Enterococcus* i porodici *Enterococcaceae.* Stanice *E. durans* nisu pokretne. Fakultativni je anaerob i ne tvore spore.

Vrlo je važna vrsta u kliničkoj mikrobiologiji, okolišnoj mikrobiologiji i mikrobiologiji hrane. Enterokoki pripadaju skupini BMK. Izolirani su kao ubikvisti iz okoliša i GI trakta. Zbog visoke tolerancije na kiseline i sol, oni su visoko prilagođeni u raznim procesima obrade hrane, a također su uključeni u fermentacijske procese tradicionalne proizvodnje sira i suhih kobasica u kojima vjerojatno pridonose razvoju organoleptičnih svojstava (Foulquié Moreno i sur. 2006.). Poznato je i da proizvode bakteriocine (Yang i sur. 2014.). Do danas, rod *Enterococcus* nije dobio status GRAS organizma (Huys i sur. 2013.), iako se pojedini, detaljno karakterizirani sojevi, koriste kao probiotici (Franz i sur. 2011.).

Zbog visoke tolerancije na nisku pH vrijednost i sol, vrlo su adaptibilni na tehnološke procese u proizvodnji hrane, a također su uključeni u fermentacijske procese tradicionalne proizvodnje sira i suhih kobasica, u kojima pridonose razvoju organoleptičnih svojstava (Foulquié Moreno sur. 2006.). Pojedini sojevi enterokoka imaju mogućnosti produkcije enterocina, zbog čega mogu pridonijeti inhibiciji mikroorganizama kvarenja i patogena (Avci i Tuncer 2017.).

S druge strane, mnogi sojevi roda *Enterococcus* uzročnici su teških infektivnih oboljenja te posjeduju gene za antibiotičku rezistenciju. To se posebno odnosi na vankomicin-rezistentne enterokoke (VRE). Stoga, znanstvenici su često u dvojbi kada je riječ o primjeni enterokooka u prehrambenoj industriji i samo sojevi koji dokazano ne nose gene za virulenciju ili stečenu antibiotičku rezistenciju mogu biti primjenjeni kao mikrobne kulture (Jahan i sur. 2015).

2.7. *In vitro* metode za utvrđivanje antimikrobnog djelovanja tvari

Brojne metode se mogu koristiti za brzi probir i ispitivanje osjetljivosti mikroorganizama na čiste tvari ili ekstrakte s potencijalnom antimikrobnom aktivnošću. Osnovne metode uključuju dilucijske metode u tekućem hranjivom mediju i disk difuzijske testove.

Dilucijske metode u tekućem hranjivom mediju su važne za određivanje minimalne inhibitorne i minimalne bakteriocidne koncentracije. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) je najmanja koncentracija antimikrobne tvari koja će inhibirati vidljivi rast mikroorganizama, dok je minimalna bakteriocidna koncentracija (MBK) najmanja koncentracija te iste tvari koja će u potpunosti spriječiti rast nekog mikroorganizma nakon uzgoja na čvrstom mediju (Andrews 2001.).

Rezultati ovih metoda su presudne za utvrđivanje antimikrobnih koncentracija, stoga se smatraju „zlatnim standardom“ i uobičajeno se koriste u istraživanju i laboratorijskoj dijagnostici (Andrews 2001.). Najprepoznatljiviji standardi propisani su od strane Instituta za kliničke i laboratorijske standarde (engl. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, CLSI) i Europskog povjerenstva za ispitivanje antimikrobne osjetljivosti (engl. *European Committe on Antimicrobial Susceptibility Testing*, EUCAST).

2.7.1. Dilucijska metoda u tekućem hranjivom mediju

Dilucijska metoda podrazumijeva serijsko razrjeđenje antimikrobne tvari u tekućem hranjivom mediju. To je osnovna i jedna od najčešćih metoda za testiranje osjetljivosti mikroorganizama na različite koncentracije antimikrobne tvari. Izvodi se dvostrukim serijskim razrjeđivanjem djelatne tvari u tekućem hranjivom mediju. Testiranje se provodi u tubicama volumena do 2 mL (makrodilucija) ili u mikrotitarskim pločama s 96 jažica za manje volumene (mikrodilucija). Faktor razrjeđenja ovisi o rasponu koncentracija koje se žele ispitati. Prekonoćna kultura ili poznata biomasa mikroorganizma se tretira odabranim koncentracijama djelatne tvari. Nakon 24 h inkubacije, očitava se rast kultura. Najmanja vrijednost pri kojoj nema vidljivog rasta se naziva MIK (CLSI 2012.). MBK se određuje precjepljivanjem tretiranog mikroorganizma na kruti Müller Hinton agar i koncetracija pri kojoj rast u potpunosti izostaje predstavlja vrijednost MBK (CLSI 1998.).

2.7.2. Disk difuzijska metoda za određivanje antimikrobne aktivnosti

Metoda difuzije tvari iz diskova u agar provodi se testiranjem na nacijepljenom agaru na koji se potom polažu celulozni diskovi s antimikrobnom tvari. Antimikrobno djelovanje se utvrđuje mjerenjem radijusa zona inhibicije oko diskova, a razina osjetljivosti izolata se utvrđuje pomoću antibiograma kao: osjetljiv, srednje osjetljiv ili rezistentan izolat.

Glavni nedostatak ove metode je što nije moguće utvrditi točnu količinu tvari koja difundira iz diskova u agar i stoga nije prikladna za određivanje MIK-a, niti je njome moguće razlikovati bakteriocidno i bakteriostatsko djelovanje (Balouiri i sur. 2016.).

3. Materijali i metode

Osnovne kemikalije

- agar (Biolife, Italija)
- barijev klorid ($BaCl_2$) (Kemig, Hrvatska)
- BHI (Biolife, Italija)
- Müller-Hinton bujon (Biolife, Italija)
- natrijev klorid (VWR Chemicals, Belgija)
- sulfatna kiselina (H_2SO_4) (Kemig, Hrvatska)

Antimikrobne tvari i antibiotici

- apitoksin (Bjelovarsko-bilogorska županija, Hrvatska)
- ciprofloksacin (5 µg) (BBL™ Sensi-Disc™, Francuska)
- eritromicin (15 µg) (BBL™ Sensi-Disc™, Francuska)
- tetraciklin (30 µg) (BBL™ Sensi-Disc™, Francuska)
- ampicilin-sulbaktam (10/10 µg) (BBL™ Sensi-Disc™, Francuska)

Laboratorijski pribor i aparatura

- celulozni diskovi (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, Francuska)
- inkubator s tresilicom (Orbital Shaker-Incubator ES-20, Biosan, Latvia)
- membranski filter (0,22 µm) (VWR International, Leuven, Belgija)
- mikrotitarske ploče (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Njemačka)
- optički čitač mikrotitarskih ploča (EL800, BioTek Instruments, Winooski, VT, SAD)

3.1.1. Korištene otopine

3.1.2. Fiziološka otopina (0,85%)

Fiziološka otopina (0,85%) je pripremljena otapanjem 0,85 g natrijevog klorida (Merck, Njemačka) u 1000 mL destilirane vode. Sterilizirana je u autoklavu na temperaturi od 121 °C tijekom 15 min.

3.1.3. McFarland standard 0,5

McFarland standard 0,5 je pripremljen miješanjem 1,175% 0,05 mL barijevog klorida i 9,95 mL 1% sulfatne kiseline. Turbiditet ovako pripremljene smjese odgovara zamućenju koje odgovara brojnosti bakterija od 1,5 x 10^8 CFU/mL.

3.1.4. Koncentrirana otopina apitoksina (1 mg/mL)

Koncentrirana otopina apitoksina (1 mg/mL) je pripremljena otapanjem 1 mg apitoksina u 1 mL sterilne destilirane vode. Otopina je potom sterilno filtrirana membranskim filterom promjera pora 0,22 µm (VWR International, Leuven, Belgija).

3.1.5. Hranjive podloge za uzgoj bakterijske biomase za ispitivanje antimikrobne aktivnosti apitoksina

3.1.6. BHI tekuća hranjiva podloga (engl. *Brain Heart Infusion*)

BHI (Biolife, Italija) tekuća hranjiva podloga je pripremljena otapanjem 37 g BHI hranjive podloge u 1000 mL destilirane vode i sterilizirana u autoklavu na temperaturi od 121 °C tijekom 15 min.

3.1.7. BHI kruta hranjiva podloga (engl. *Brain Heart Infusion*)

BHI (Biolife, Italija) kruta hranjiva podloga je pripremljena otapanjem 37 g BHI hranjive podloge u 1000 mL uz dodatak 15 g agara (Biolife, Italija). Nakon dodavanja agara, podloga je sterilizirana u autoklavu na temperaturi od 121 °C tijekom 15 min.

3.1.8. Müller-Hinton tekuća hranjiva podloga

Müller-Hinton (Biolife, Italija) tekuća hranjiva podloga je pripremljena otapanjem 22 g u 1000 mL destilirane vode i sterilizirana je u autoklavu na temperaturi od 121 °C tijekom 15 min.

3.1.9. Müller-Hinton kruta hranjiva podloga

Müller-Hinton (Biolife, Italija) kruta hranjiva podloga je pripremljena otapanjem 22 g u 1000 mL destilirane vode uz dodatak 15 g agara. Nakon dodavanja agara, otopina je sterilizirana u autoklavu na temperaturi od 121 °C kroz 15 min.

3.2. Prikupljanje apitoksina

Apitoksin je prikupljen na obiteljskom poljoprivrednom gospodarstvu na području Bjelovarsko-bilogorske županije, tijekom 2018. godine. Prikupljen je od zdravih medonosnih pčela (*A. mellifera* L.) pomoću specijalno dizajniranog električnog sakupljača, postavljenog pri vrhu košnice (satonoše) prekrivene kupolom. Sakupljač se sastojao od uređaja koji proizvodi električne impulse i folijom obložene staklene ploče. Kod prikupljanja, električni impulsi napona 7 – 12 V generirani su intervalima u trajanju od 10 s tijekom kojih su pčele bole staklo. Pri ubadanju, na foliji su zaostali nektar i ostale nečistoće, a čisti apitoksin se zadržao na staklenoj ploči. Između svakog intervala, pčele su ostavljene po 10 s kako bi se odmorile. Apitoksin je prikupljen po izvlačenju uređaja iz košnice i sušenja staklene ploče i uskladišten u obliku praha na temperaturi od -20 °C u uvjetima bez vlage i svjetlosti.

3.3. Antibiotici

Razina antibiotičke osjetljivosti izolata ispitana je difuzijskom metodom diskova impregniranih odgovarajućim antibiotikom u agar. Antibiotički diskovi (BBL™ Sensi-Disc™, Francuska) su upotrebljeni za ispitivanje gram negativnih bakterija: ampicilin-sulbaktam (10/10 µg), ciprofloksacin (5 µg) i za ispitivanje gram pozitivnih bakterija eritromicin (15 µg) i tetraciklin (30 µg) kao što je prikazano u **Tablici 3.2.**

3.4. Odabir i uzgoj biomase

U ovom istraživanju korišteni su autohtoni sojevi izolirani iz tradicionalnih, spontano fermentiranih kobasica od mesa divljači (*Lb. sakei* LS0296, *E. durans* ED004) i tradicionalnog istarskog sira (*Lc. lactis* LL8307). Korišteni izolati su identificirani i detaljno sigurnosno i tehnološki okarakterizirani molekularno-biološkim metodama u okviru prijašnjih istraživanja (Mrkonjić Fuka i sur. 2013.; Mrkonjić Fuka i sur. 2020.). Uz korisne izolate, korišteni su i gram pozitivni (*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (DSM 20231), *Listeria innocua* (ATCC 33090) i *Bacillus cereus* (DSM 6791)) i gram negativni (*Escherichia coli*

(ATCC 25922), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (DSM 14221) potencijalno patogeni mikroorgnizmi. Svi izolati su pohranjeni u glicerolu (80%) pri temperaturi od -20 °C u Zavodu za mikrobiologiju Agronomskog fakulteta u Zagrebu do njihovog korištenja u mikrobiološkim analizama.

Kako bi se uzgojila potrebna biomasa, izolati su pročišćeni do monokulture metodom iscrpljenja na krutoj BHI podlozi (Biolife, Italija) te inkubirani pri optimalnim temperaturama rasta. *E. durans* ED004, *Lc. lactis* LL8307, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, *Listeria innocua*, *Bacillus cereus* i *Escherichia coli* inkubirani su aerobno pri 30 °C tijekom 24 h, a *S. enterica* subsp. *enterica* i *Lb. sakei* LS0296 anaerobno pri pri 30 °C tijekom 24 h. Nakon inkubacije, po jedna kolonija za svaki izolat je sterilno nacijepljena u 2 mL tekuće BHI podloge i inkubirana na temperaturi od 30 °C preko noći i precjepljena na krute BHI podloge. Nakon inkubacije, nasumično odabrane kolonije za svaki izolat su obojane po gramu i mikroskopskim pregledom je svaka vrsta morfološki okarakterizirana. Ovako pripremljene kolonije predstavljaju pročišćene monokulture korištene u daljnjim analizama.

3.5. Određivanje minimalne inhibitorne i bakteriocidne koncentracije apitoksina

Izolati za određivanje minimalne inhibitorne (MIK) i minimalne bakteriocidne koncentracije (MBK) apitoksina uzgojeni su kao što je opisano u **Odjeljku 3.4.** MIK i MBK su određeni za 3 različite biomase (10^3, 10^6 i 10^8 CFU/mL). Za svaki je izolat nekoliko kolonija sterilno precijepljeno i resuspendirano u 10 mL 0,85% fiziološke otopine do postizanja zamućenja koje odgovara zamućenju 0,5 Mc Farland standarda. Pripremljene suspenzije svakog izolata su razrijeđene u omjeru 1:10, kako bi se dobile odgovarajuće biomase (10^3, 10^6 i 10^8 CFU/mL).

Ispitivane koncentracije apitoksina varirale su u rasponu od 12,5 – 800 µg/mL, a dobivene su metodom dvostrukog serijskog mikrorazrjeđenja u Müller-Hinton tekućoj hranjivoj podlozi. Za određivanje MIK i MBK, korištene su mikrotitarske pločice s 96 jažica (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Njemačka). Svaka jažica je sadržavala 90 µL otopine apitoksina ispitivane koncentracije i 10 µL suspenzije svakog izolata odgovarajuće biomase. Za kontrolu bakterijskog rasta 10 µL određene bakterijske biomase svakog izolata dodano je u 90 µL Müller-Hinton bujona bez dodatka apitoksina (**Slika 3.1.**).

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
		Izolat 1 10^8 CFU/ml	Izolat 1 10^6 CFU/ml	Izolat 1 10^3 CFU/ml	Izolat 2 10^8 CFU/ml	Izolat 2 10^6 CFU/ml	Izolat 2 10^3 CFU/ml	Izolat 3 10^8 CFU/ml	Izolat 3 10^6 CFU/ml	Izolat 3 10^3 CFU/ml	Izolat 4 10^8 CFU/ml	Izolat 4 10^6 CFU/ml	Izolat 4 10^3 CFU/ml
800 µg/mL	**A**												
400 µg/mL	**B**												
200 µg/mL	**C**												
100 µg/mL	**D**												
50 µg/mL	**E**												
25 µg/mL	**F**												
12,5 µg/mL	**G**												
Kontrola	**H**												

Slika 3.1. Shematski prikaz mikrotitarske ploče za praćenje rasta i određivanje MIK i MBK.

Mikrotitarske pločice inkubirane su na temperaturi od 37 °C, uz stalno miješanje pri 90 okretaja/min u inkubatoru (Orbital Shaker-Incubator ES-20, Biosan, Latvija), tijekom 24 i 48 h. Nakon 24 i 48 h, rast je detektiran vizualno. Zamućenje podloge se smatra indikatorom rasta. Najniža koncentracija apitoksina kod koje nije došlo do promjene zamućenja nakon inkubacije od 48 h označavala je minimalnu inhibitornu koncentraciju (MIK).

Također, rast je praćen mjerenjem optičke gustoće pri valnoj duljini od 660 nm pomoću optičkog čitača mikrotitarskih ploča (EL800, BioTek Instruments, Winooski, VT, SAD). Absorbancija je očitana nakon 0, 24 i 48 h. Absorbancija je proporcionalna turbiditetu uzrokovanom rastom kulture u tekućem mediju.

Inhibicija rasta izračunata je prema formuli (1):

Inhibicija rasta [%] = $100 \times [1-(\frac{At-A0}{Akt-Ak0})]$ .....(1)

gdje je:

A_t – absorbancija (Müller-Hinton bujon+apitoksin+bakterijska suspenzija) izmjerena nakon 24 ili 48 h

A_0 – absorbancija (Müller-Hinton bujon+apitoksin+bakterijska suspenzija) izmjerena 0 h

A_{kt} – absorbancija (Müller-Hinton bujon+bakterijska suspenzija) + absorbancija (apitoksin) izmjerena nakon 24 ili 48 h

A_0 – absorbancija (Müller-Hinton bujon+bakterijska suspenzija) + absorbancija (apitoksin) izmjerena 0 h

Najniža koncentracija apitoksina kod koje je došlo do 95,0% inhibicije rasta smatra se minimalnom inhibitornom koncentracijom (MIK).

Mikrobiološki sadržaj iz jažica, gdje koncentracija apitoksina odgovara vrijednosti MIK, te jedna neposredno veća i jedna neposredno manja koncentracija apitoksina, je potom serijski razrijeđen u fiziološkoj otopini (0,85%) u omjeru 1:10. Razrijeđen mikrobiološki sadržaj je presađen u volumenu od 100 µL na krutu BHI podlogu u 2 ponavljanja. Podloge su inkubirane kao što je opisano u **Odjeljku 3.4.** Najniža koncentracija apitoksina kod koje je došlo do >99,0% inhibicije rasta nakon uzgoja na krutoj BHI podlozi smatra se minimalnom bakteriocidnom koncentracijom (MBK). Rezultati za MIK i MBK su izraženi u µg/mL.

3.6. Određivanje i usporedba antimikrobnog djelovanja apitoksina i antibiotika

Antimikrobna aktivnost apitoksina je ispitana pomoću difuzijske metode za određivanje antimikrobne aktivnosti u agaru. Kulture su uzgojene kao što je opisano u **Odjeljku 3.4.** i potom suspendirane u fiziološkoj otopini (0,85%) do turbiditeta koji odgovara 0,5 Mc Farland standardu. Na sterilne celulozne diskove je otpipetirano 20 µL određene koncentracije apitoksina (**Tablica 3.1.**) koji potom difundira u diskove na temperaturi od 30 °C tijekom 30 min. Kulture su zatim razmazane sterilnim vatenim štapićem po površini Müller-Hinton agara na koji se polažu celulozni diskovi.

Tablica 3.1. Popis izolata tretiranih koncentracijama apitoksina difuzijom diskova u agar.

Vrsta i oznaka izolata	**Koncentracija apitoksina (µg)**	
E.durans (ED004) *L.innocua* (ATCC 33090) *Lb.sakei* (LS0296)	10 20 50	100 200 300
B.cereus (DSM 6791) *Lc.lactis* (LL8307)	5 10 20	50 100 200
E.coli (ATCC 25922) *S.aureus* (DSM 20231) *S.enterica* (DSM 14221)	50 80 100	200 300 400

Jednakim postupkom su na zasebne podloge postavljeni i antibiotički diskovi (**Tablica 3.2.**). Ispitivanja su provedena u dva ponavljanja. Podloge su potom inkubirane pri temperaturi od 37 °C tijekom 24 h, nakon čega su izmjereni radijusi zona inhibicije oko diskova. Rezultati su izraženi u mm srednjih vrijednosti radijusa i kao postotak (%) antimikrobne aktivnosti eritromicina i tetraciklina za gram pozitivne, odnosno ampicilin-sulbaktama i ciprofloksacina za gram negativne bakterijske kulture.

Tablica 3.2. Popis izolata tretiranih koncentracijama antibiotika difuzijom diskova u agar.

Gram pozitivni izolati	**Antibiotik**	**Koncentracija (µg)**
B.cereus (DSM 6791) *E.durans* (ED004) *L.innocua* (ATCC 33090) *Lb.sakei* (LS0296) *Lc.lactis* (LL8307) *S.aureus* (DSM 20231)	eritromicin tetraciklin	15 30
Gram negativni izolati	**Antibiotik**	**Koncentracija (µg)**
E.coli (ATCC 25922) *S.enterica* (DSM 14221)	ampicilin-sulbaktam ciprofloksacin	10-10 5

3.7. Statistička analiza

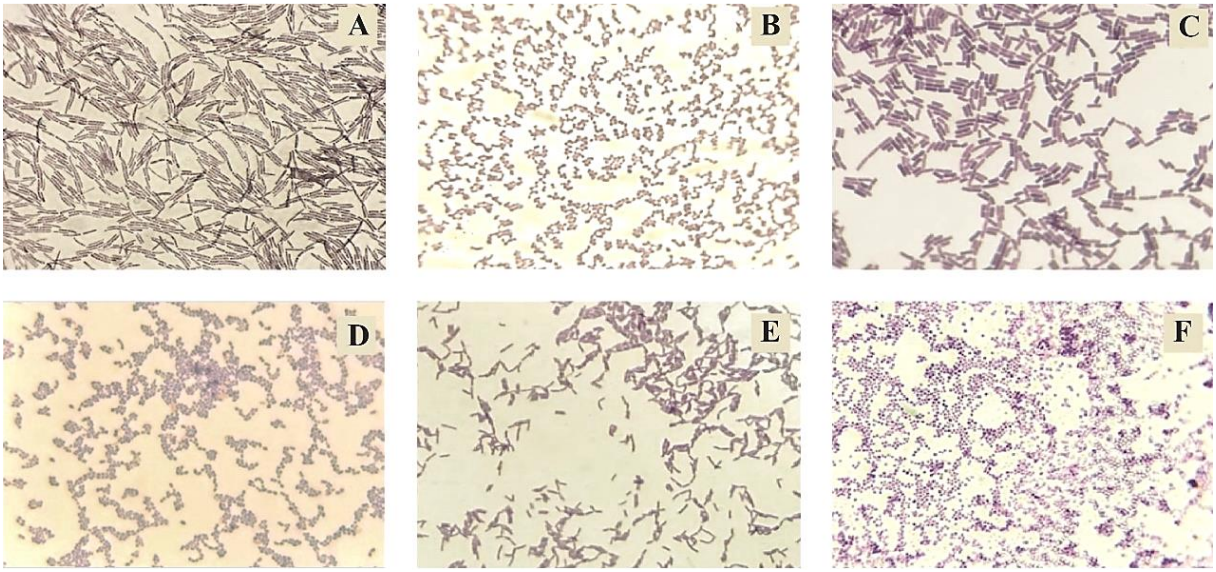
Značajne razlike u djelovanja različitih koncentracija apitoksina na različite biomase ispitivanih izolata određene su dvofaktorskom analizom varijance ANOVA (engl. *two-way ANOVA*), a srednje vrijednosti su međusobno višestruko uspoređene *post-hoc* Tukey HSD testom. Razlike se smatraju značajnima ako je $p<0,01$. Podaci su analizirani u računalnom programu Microsoft Excel 2016 pomoću dodatka Analysis ToolPak.

4. Rezultati

4.1. Morfološka karakterizacija odabranih izolata

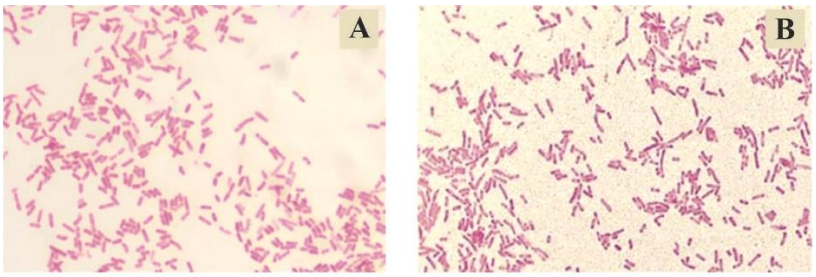
U ovom istraživanju je ispitan antimikrobni utjecaj apitoksina na ukupno osam izolata, tri iz skupine korisnih i pet iz skupine štetnih mikroorganizama. Svi ispitivani izolati su prethodno pročišćeni do monokulture te morfološki okarakterizirani metodom bojanja po gramu i mikroskopskim pregledom nasumično odabranih kolonija.

Svi izolati iz skupine korisnih mikroorganizma (*E. durans* ED004, *Lb. sakei* LS0296 i *Lc. lactis* LL8037) i potencijalno patogenih (*B. cereus* DSMZ 6791, *L. innocua* ATCC 33090 i *S. aureus* subsp. *aureus* DSM 20231) pripadaju gram pozitivnoj skupini bakterija i pokazuju morfologiju karakterističnu za vrstu (**Slika 4.1.**).



Slika 4.1. Morfologija gram pozitivnih izolata. (A) *B. cereus* (DSMZ 6791); (B) *E. durans* (ED004); (C) *Lb. sake*i (LS0296); (D) *Lc. lactis* (LL8307); (E) *L. innocua* (ATCC 33090); (F) *S. aureus* subsp. *aureus* (DSM 20231).

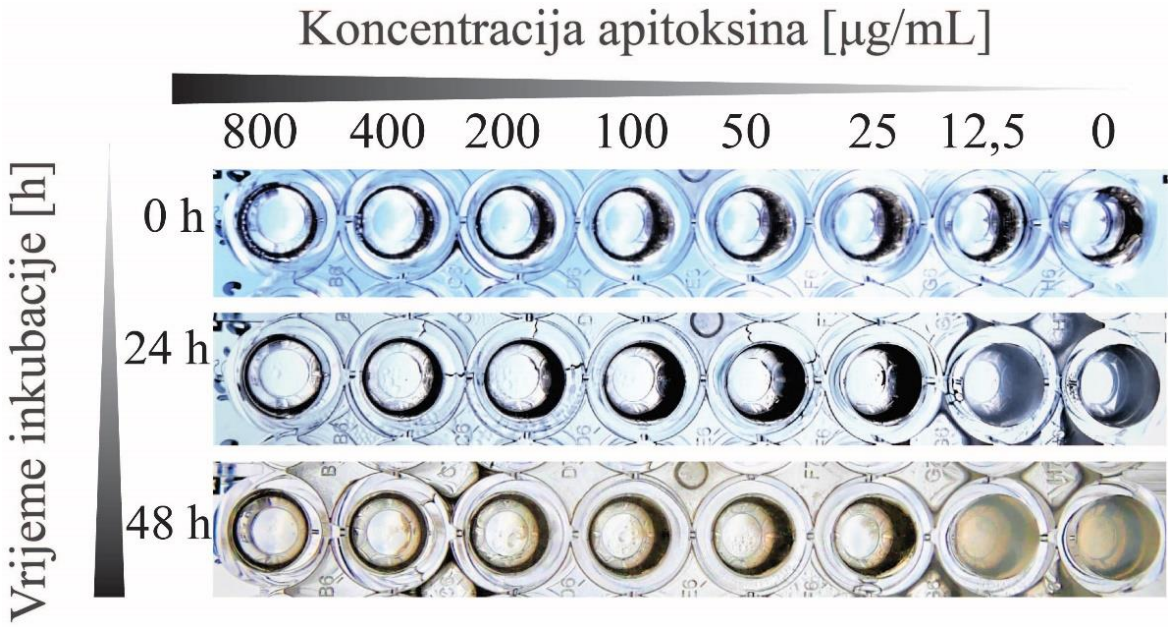
Preostala dva izolata, oportunistički patogen *E. coli* (ATCC 25922) i patogen *S. enterica* subsp. *enterica* (DSM 14221), pripadaju gram negativnoj skupini i pokazuju morfološke karakteristike tipične za vrstu (**Slika 4.2**.).



Slika 4.2. Morfologija gram negativnih izolata. (A) *E. coli* (ATCC 25922) i (B) *S. enterica* subsp. *enterica* (DSM 14221).

4.2. Vizualno i spektrofotometrijsko određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) apitoksina

Metodom dvostrukog serijskog mikrorazrjeđenja u Müller-Hinton bujonu postignut je raspon koncentracija apitoksina 12,5 – 800 μg/mL kojima su tretirane različite biomase (3, 6 i 8 log CFU/mL) svih ispitivanih izolata. Rast mikroorganizama je detektiran vizualno, u obliku pojave zamućenja medija. Za sve izolate turbiditet je rastao sa smanjenjem koncentracije apitoksina i produženom inkubacijom **(Slika 4.3.).**



Slika 4.3. Promjena turbiditeta medija u jažicama tijekom 0 , 24 i 48 h, ovisno o koncentraciji apitoksina i trajanju inkubacije (prikazano na primjeru *E. coli* biomase 6 log CFU/mL).

Kao što je vidljivo u **Tablici 4.1.**, MIK vrijednost se mijenjala ovisno o početnoj biomasi. S porastom biomase potrebne su i veće koncentracije apitoksina za inhibiciju rasta. Pri biomasi 3 log CFU/mL, za sve izolate MIK varira između 12,5 i 25 µg/mL, 6 log CFU/mL između 25 i 50 µg/mL i 8 log CFU/mL između 12,5 i 400 µg/mL. S iznimkom izolata *Lc. lactis* LL8307 i *B. cereus*, MIK vrijednost za sve ostale izolate biomase 3 log CFU/mL iznosi 12,5 µg/mL. Iznimno, pri biomasi 8 log CFU/mL niska koncentracija inhibira rast *L. innocua* (MIK=12,5 µg/mL) i *E. coli* (MIK=25 µg/mL). MIK vrijednosti je bilo moguće vizualno odrediti nakon 24 h i nije se mijenjala s produživanjem inkubacije (**Tablica 4.1.**).

Tablica 4.1. Minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) apitoksina za različite biomase određene vizualno i spektrofotometrijski.

Vrsta	**3 log CFU/mL**		**6 log CFU/mL**		**8 log CFU/mL**	
	MIK_V [µg/mL]	MIK_S [µg/mL]	MIK_V [µg/mL]	MIK_S [µg/mL]	MIK_V [µg/mL]	MIK_S [µg/mL]
E. durans (ED004)	12,5	12,5 (100%)	25	25 (97,4%)	200	50 (100%)
Lc. lactis (LL8307)	12,5	12,5 (99,5%)	25	12,5 (99,4%)	200	100 (98,5%)
Lb. sakei (LS0296)	25	12,5 (100%)	25	25 (99,0%)	50	12,5 (100%)
S. aureus subsp. *aureus* (DSMZ20231)	12,5	12,5 (98,4%)	50	25 (99,7%)	400	200 (100%)
B. cereus (DSMZ6791)	25	12,5 (99,1%)	25	12,5 (97,9%)	50	25 (100%)
L. innocua *(*ATCC33090)	12,5	12,5 (100%)	25	12,5 (100%)	12,5	25 (100%)*
E. coli (ATCC 25922)	12,5	12,5 (100%)	25	25 (100%)	25	200 (100%)*
S. enterica subsp. *enterica* (DSM14221)	12,5	12,5 (99,3%)	50	25 (100%)	200	200 (100%)*

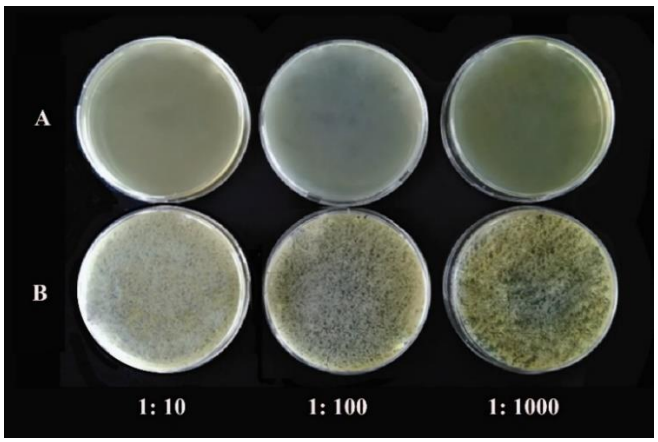
MIK_V – vizualno određena minimalna inhibitorna koncentracija (MIK)
MIK_S – spektrofotometrijski određena minimalna inhibitorna koncentracija (MIK)
* Izolati kod kojih se MIK mogla odrediti samo nakon 48 h
U zagradi je prikazan postotak inhibicije rasta.

Osim vizualne detekcije inhibicije rasta, MIK je određen i spektrofotometrijskim očitavanjem apsorbancije pri valnoj duljini od 660 nm nakon 0, 24 i 48 h. Najniža koncentracija kod koje je inhibirano 95,0% rasta smatra se MIK vrijednosti. Općenito, spektrofotometrijski određeni MIK-ovi se ne podudaraju s vizualno određenim MIK-ovima. Iznimka su MIK-ovi koji inhibiraju rast početne biomase od 3 log CFU/mL svih izolata (MIK=12,5 µg/mL). Pri biomasi od 6 log CFU/mL, MIK-ovi se kreću u rasponu od 12,5 do 25 µg/mL, a kod 8 log CFU/mL od 12,5 do 200 µg/mL. U pravilu, spektrofotometrijsko određivanje MIK-a, kod većih biomasa, je osjetljivije od vizualnog i omogućava detekciju nižih MIK vrijednosti (**Tablica 4.1.**).

Nadalje, pri biomasi 8 log CFU/mL izolata *L. innocua*, *E. coli* i *S. enterica* subsp. *enterica*, nije bilo moguće odrediti MIK nakon 24 h, već tek nakon 48 h kada je inhibicija rasta iznosila 100%.

4.3. Određivanje minimalne bakteriocidne koncentracije (MBK) apitoksina

Minimalne bakteriocidne koncentracije (MBK) apitoksina su utvrđene metodom dvostrukog serijskog mikrorazrjeđenja u tekućem Müller-Hinton mediju, nakon čega su odgovarajuće suspenzije bakterija i apitoksina serijski razrijeđene i precijepljene na neselektivni BHI agar. Nakon inkubacije je određen postotak preživjelih bakterijskih stanica. Najmanja koncentracija koja je reducirala bakterijsku brojnost za >99,0% predstavlja MBK (**Slika 4.4**.).



Slika 4.4. Određivanje MBK apitoksina. Usporedba djelovanja (A) MBK 25 µg/mL i (B) MIK 12,5 µg/mL na primjeru *E. coli* biomase 6 log CFU/mL.

Apitoksin pokazuje bakteriocidno djelovanje na sve ispitivane izolate. MBK je proporcionalna porastu korištene početne biomase. Za početnu biomasu 3 log CFU/mL MBK se kretala između 12,5 i 50 µg/ml i reducirala je brojnosti svih izolata za 100%. MBK za biomasu 6 log CFU/mL je iznosila 25 do 50 µg/mL (99,4 – 100% redukcija brojnosti), a za 8 log CFU 50 i 400 µg/mL (99,9 – 100% redukcija brojnosti).

Za biomasu 3 log CFU/mL, najvišu MBK vrijednost imao je izolat *B. cereus* (50 μg/mL). Slijede ga izolati *E. coli, L. innocua* i *S. enterica* s MBK 25 μg/mL, dok za preostale izolate vrijedi da je MBK ≤ 12,5 μg/mL.

Povećanjem bakterijske biomase na brojnost 6 log CFU/mL nije došlo do promjene MBK vrijednosti za *B. cereus* i *E. coli*, dok je za *E. durans* i *Lb. sakei* MBK=25 μg/mL. Rast preostalih izolata, *Lc. lactis, L. innocua, S. aureus* i *S. enterica*, u potpunosti je inhibiran pri MBK 50 μg/mL.

Povećanjem biomase na 8 log CFU/mL MBK, vrijednosti su mnogo više u odnosu na 3 i 6 log CFU/mL. Najvišu MBK vrijednost su imali izolati *E. coli* i *S. aureus* i iznosila je 400 μg/mL. Izolat *E. durans* je imao MBK 200 μg/mL. Slijede *Lb. sakei* i *L. innocua* s MBK 100 μg/mL, te izolati *B. cereus* i *Lc. lactis* s najnižom MBK 50 μg/mL (**Tablica 4.2.**).

Tablica 4.2. Minimalne bakteriocidne koncentracije (MBK) apitoksina za različite biomase.

Vrsta	**MBK [μg/mL]**		
	3 log CFU/mL	**6 log CFU/mL**	**8 log CFU/mL**
E. durans (ED004)	12,5 (100%)	25 (100%)	200 (100%)
Lc. lactis (LL8307)	12,5 (100%)	50 (100%)	50 (100%)
Lb. sakei (LS0296)	50 (100%)	25 (100%)	100 (100%)
S. aureus subsp. *aureus* (DSMZ20231)	12,5 (100%)	50 (99,7%)	400 (99,3%)
B. cereus (DSMZ6791)	50 (100%)	50 (97,0%)	50 (100%)
*L. innocua (*ATCC33090)	25 (100%)	50 (100%)	100 (100%)*
E. coli (ATCC 25922)	25 (100%)	25 (100%)	400 (99,9%)*
S. enterica subsp. *enterica* (DSM14221)	25 (100%)	50 (100%)	200 (99,9%)*

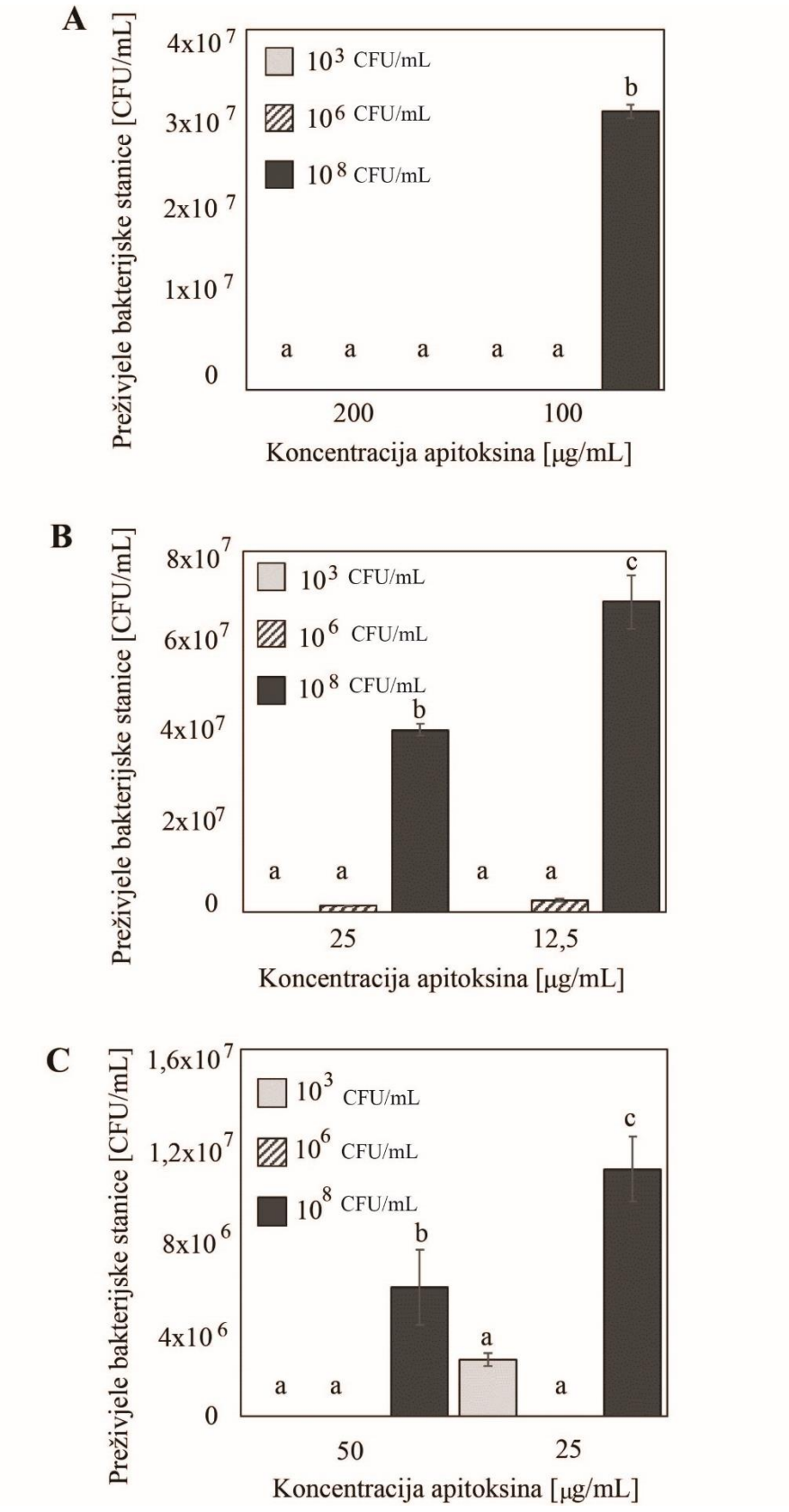
4.4. Utjecaj različitih koncentracija apitoksina na brojnost bakterija

Nakon određivanja MIK vrijednosti za različite biomase, određena je brojnost preživjelih bakterijskih stanica serijom razrjeđenja. Za ovu analizu je korišten sadržaj iz mikrotitarskih jažica koji je odgovarao MIK vrijednosti apitoksina, te nekoliko neposredno većih i jedna neposredno manja koncentracija apitoksina.

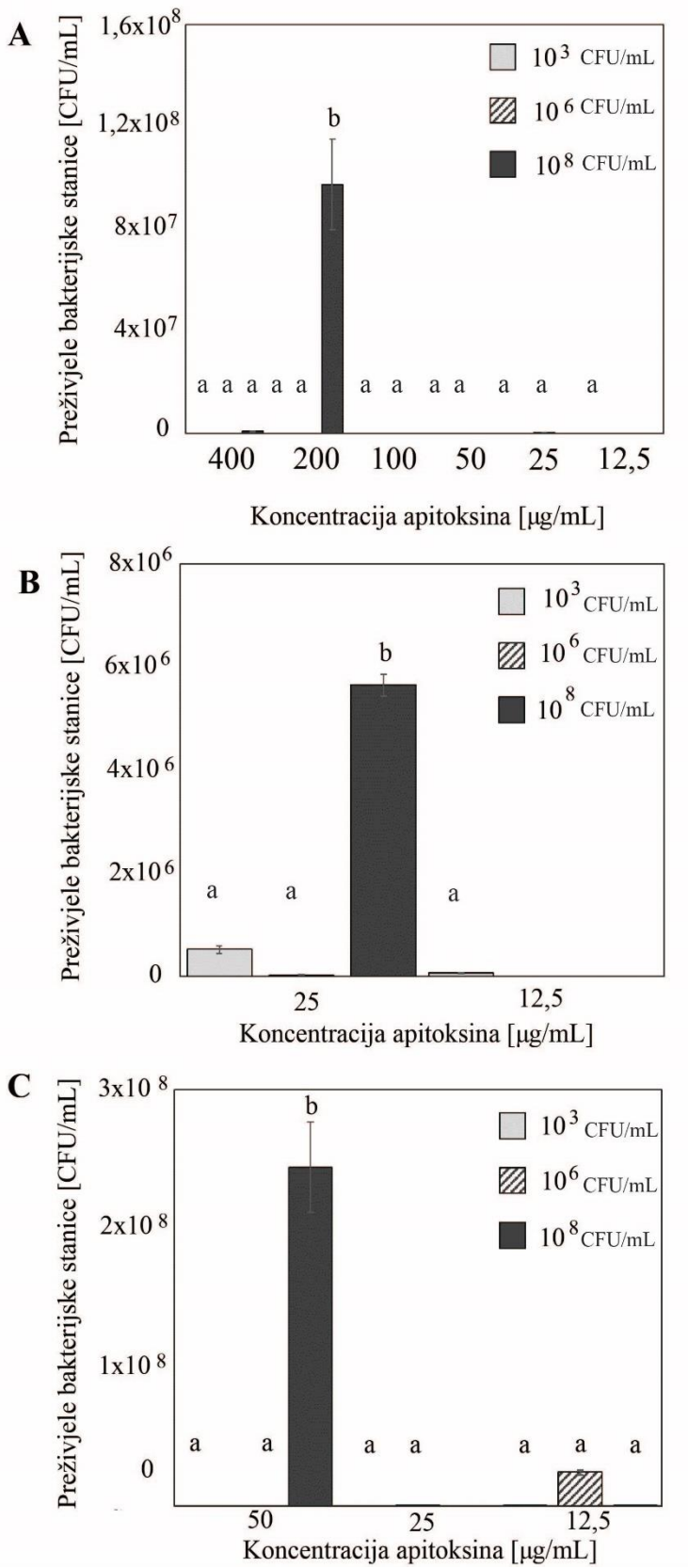
Predstavnici korisne mikrobiote (izolati BMK) su preživjeli koncentracije apitoksina do 100 µg/mL samo kada su apitoksinom tretirane velike početne biomase (6 i 8 log CFU/mL). Nakon tretmana početne biomase 8 log CFU/mL srednje visokim koncentracijama apitoksina (100 µg/mL), preživio je samo izolat *E. durans* ED004 ($3{,}1x10^7 \pm 7{,}1x10^5$ CFU/mL; 69,1%) i izolat *Lb. sakei* LS0296 ($5{,}7x10^6 \pm 1{,}6x10^6$ CFU/mL; 94,4%) pri 50 µg/mL, dok su tretman niskim koncentracijama od 25 µg/mL preživjeli izolati *Lc. lactis* LL8307 i *Lb. sakei* LS0296 (**Slika 4.5.**).

Gram pozitivni potencijalno patogeni mikroorganizmi su preživjeli visoke koncentracije apitoksina do 400 µg/mL (*S. aureus*), kada su apitoksinom tretirane velike početne biomase (6 i 8 log CFU/mL) te niske koncentracije do 25 µg/mL pri svim početnim biomasama. Nakon tretmana početne biomase 8 log CFU/mL visokim koncentracijama apitoksina, 400 µg/mL ($7{,}5x10^5 \pm 2{,}1x10^5$ CFU/mL; 0,8%) i 200 µg/mL ($9{,}8x10^7 \pm 1{,}8x10^7$ CFU/mL; 97,5%), preživio je samo izolat *S. aureus.* Nakon tretiranja izolata *B. cereus* svih početnih biomasa apitoksinom, koncentracije 25 µg/mL, broj preživjelih mikrobnih stanica kretao se u rasponu od $3{,}0x10^4 \pm 8{,}5x10^3$ do $5{,}7x10^6 \pm 2{,}1x10^5$ CFU/mL (3,0 do 5,7%), a koncentracija 12,5 µg/mL je gotovo 100% inhibirala rast svih početnih biomasa. Srednje visoka koncentracija apitoksina od 50 µg/mL inhibirala je rast izolata *L. innocua* biomase 3 i 6 log CFU/mL (100%), dok je inhibitorni učinak na biomasu 8 log CFU/mL u potpunosti izostao. Niske koncentracije (12,5 µg/mL) nisu bitnije inhibirale rast ili su inducirale rast biomase 3 log CFU/mL (preživjelo $9{,}0x10^2 \pm 1{,}4x10^2$, 90,0%) i 6 log CFU/mL (preživjelo $2{,}4x10^7 \pm 1{,}6x10^6$) (**Slika 4.6.).**

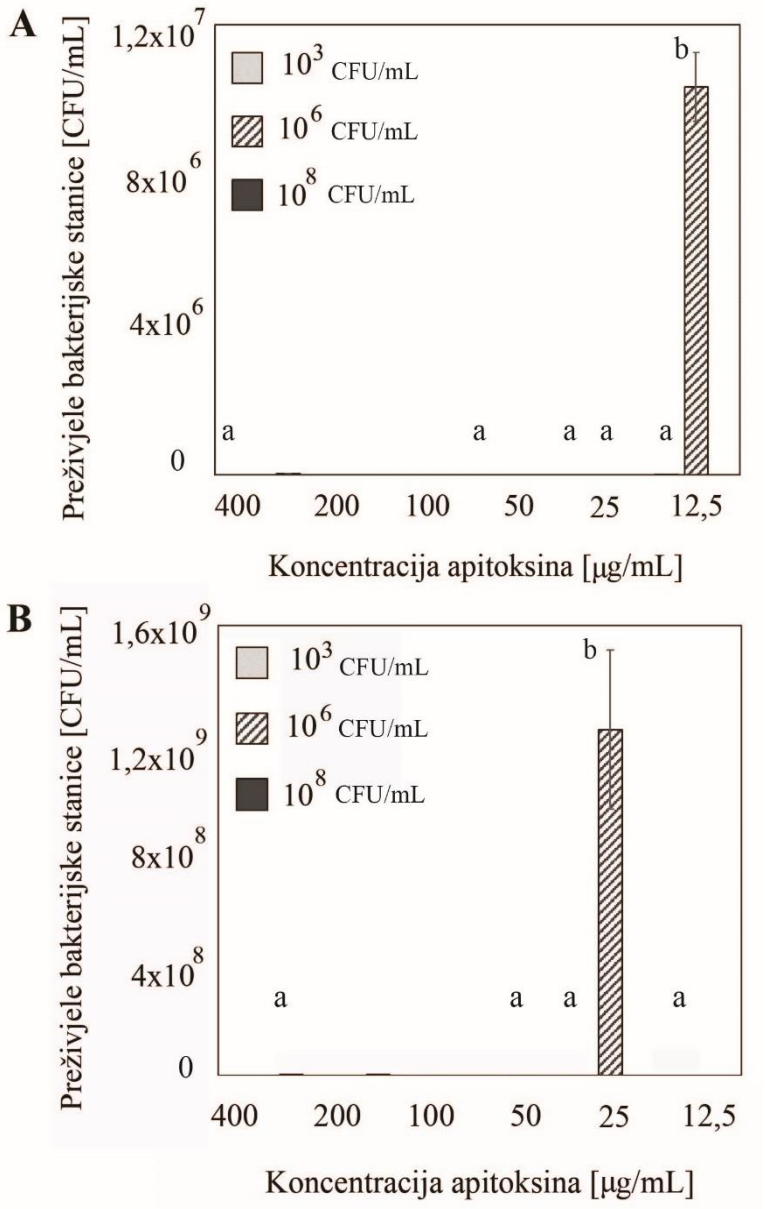
Gram negativni izolati su preživjeli visoke koncentracije apitoksina (400 µg/mL) samo kada su apitoksinom tretirane velike početne biomase (8 log CFU/mL). Nakon tretmana početne biomase 8 log CFU/mL, u tim koncentracijama preživjeli su izolati *E. coli* ($4{,}0x10^4 \pm 0{,}0x10^4$ CFU/mL; 0,04%) i *S. enterica* ($4{,}7x10^4 \pm 7{,}1x10^2$ CFU/mL; 0,05%), dok tretman s 12,5 µg/mL biomase log 3 CFU/mL potiče rast *E.coli* i inhibira izolat *S. enterica* ($1{,}5x10^2 \pm 7{,}1x10^1$ CFU/mL; 1, 5%) (**Slika 4.7.**).



Slika 4.5. Utjecaj različitih koncentracija apitoksina na preživljavanje korisnih izolata. (A) *E. durans* ED004, (B) *Lc. lactis* LL8307 i (C) *Lb. sakei* (LS0296).



Slika 4.6. Utjecaj različitih koncentracija apitoksina na preživljavanje gram pozitivnih izolata. (A) *S. aureus* DSM 20231, (B) *B. cereus* DSM 6791 i (C) *L. innocua* ATCC 33092.



Slika 4.7. Utjecaj različitih koncentracija apitoksina na preživljavanje gram negativnih izolata. (A) *E. coli* ATCC 25922 i (B) *S. enterica* subsp. *enterica* DSM 14221.

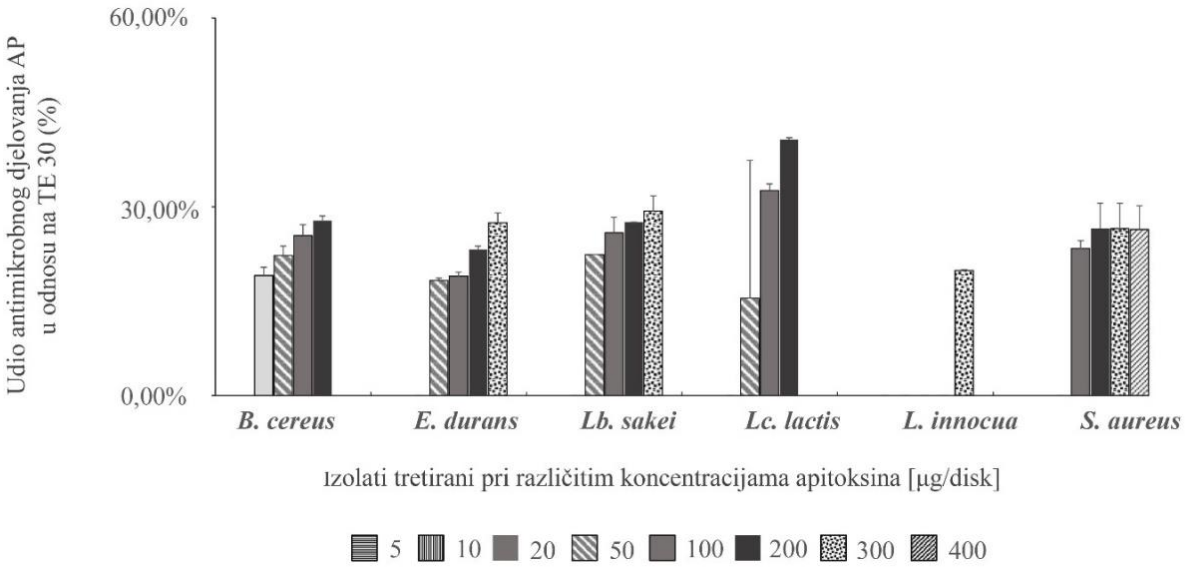
Dvofaktorskom analizom varijance (engl. *two-way ANOVA*) utvrđena je statistički značajna razlika u preživljavanju svih korisnih, gram pozitivnih i gram negativnih izolata ovisno o tretiranoj početnoj biomasi i testiranoj koncentraciji apitoksina (p<0,01). *Post-hoc* Tukey HSD testiranjem utvrđeno je da svi ispitivani izolati početne biomase 8 log CFU/mL značajno bolje preživljavaju sve koncentracije apitoksina od izolata početne biomase 3 i 6 log CFU/mL (**Slike 4.5.-4.7.**, **Tablice P1-P16**.).

4.5. Određivanje udjela antibiotičke aktivnosti apitoksina

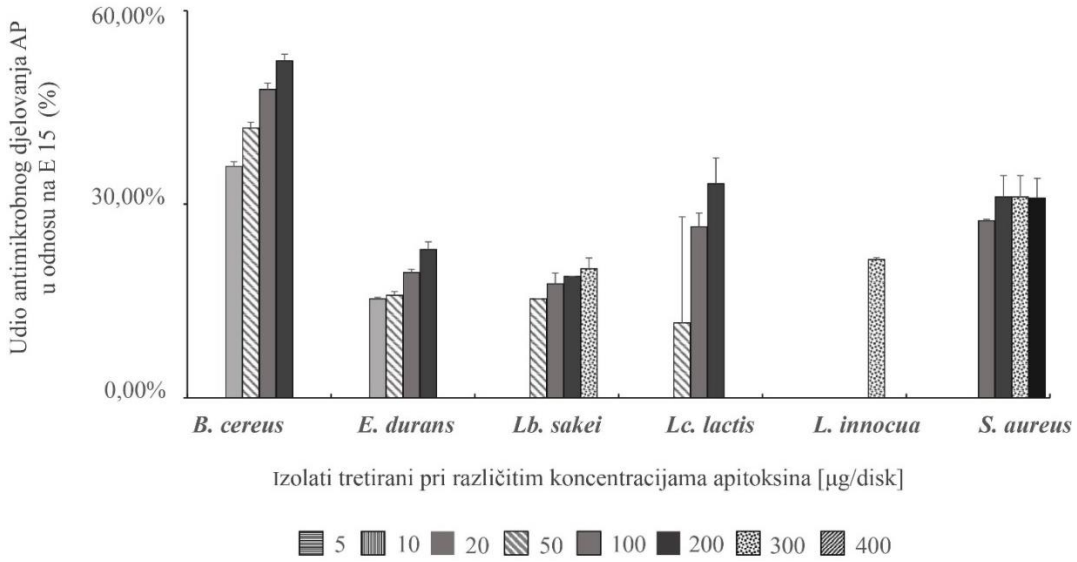
4.5.1. Određivanje udjela antibiotičke aktivnosti gram pozitivnih bakterija

Prema BBL standardima je utvrđeno da su svi ispitivani gram pozitivni izolati osjetljivi na antibiotike tetraciklin 30 μg (TE 30) i eritromicin 15 μg (E 15). Antimikrobno djelovanje apitoksina je ispitano u koncentracijama 5 – 400 μg/disk, a niti jedan izolat nije pokazao inhibiciju rasta prilikom difundiranja koncentracija apitoksina od 5 i 10 μg/disk, odnosno, imao je 0 ± 0,00% djelovanja u odnosu na tetraciklin i eritromicin. Svi izolati su pokazali osjetljivost na vrijednosti između 200 i 300 μg/disk nakon tretmana od 24 h (**Graf 4.5**. i **Graf 4.6.**).

U usporedbi s tetraciklinom i eritromicinom, apitoksin je pokazao veći udio antibiotičkog djelovanja eritromicina za polovinu gram pozitivnih izolata: *B. cereus, L.innocua* i *S. aureus.* Na preostale izolate: *E. durans*, *Lb. sakei* i *Lc. lactis*, apitoksin je imao veći udio antibiotičkog djelovanja tetraciklina nego eritromicina.



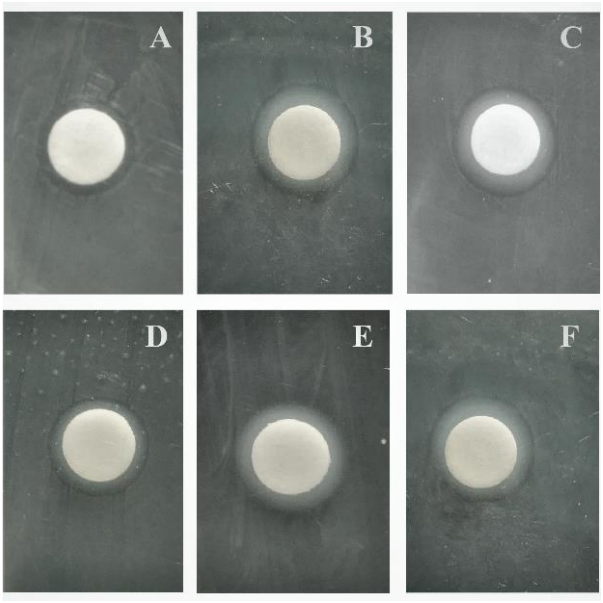
Graf 4.5. Udio antibiotičkog djelovanja apitoksina (AP) pri različitim koncentracijama, s pripadajućim standardnim devijacijama, u odnosu na tetraciklin (TE 30).



Graf 4.6. Udio antibiotičkog djelovanja apitoksina (AP) pri različitim koncentracijama, s pripadajućim standardnim devijacijama, u odnosu na eritromicin (E 15).

Pri koncentraciji apitoksina od 200 µg/disk zabilježeno je djelovanje od 27,80 ± 0,75% u odnosu na tetraciklin te 52,23 ± 1,01% u odnosu na eritromicin za *B. cereus*. Pri istoj koncentraciji apitoksina zabilježeno je 40,69 ± 0,31% djelovanja u odnosu na tetraciklin za izolat *Lc. lactis* te 33,18 ± 3,99% u odnosu na eritromicin. Pri koncentraciji 300 µg/disk, evidentirano je 27,48 ± 1,54% udjela antibiotičke aktivnosti u odnosu na tetraciklin za *E. durans*, dok je u odnosu na eritromicin zabilježeno 22,95 ± 1,21% djelovanja. Pri istoj koncentraciji apitoksina, zabilježeno je 29,31 ± 2,44% antimikrobnog djelovanja u odnosu na tetraciklin za *Lb. sakei* te 20,02 ± 2,00% u odnosu na eritromicin. 19,88 ± 0,16% djelovanja u odnosu na tetraciklin te 21,44 ± 0,26% u odnosu na eritromicin detektirano je za *L. innocua*. Kod koncentracije apitoksina od 400 µg/disk za *S. aureus* zabilježeno je 26,42 ± 3,78% djelovanja u odnosu na tetraciklin te 30,95 ± 3,05% u donsu na eritromicin.

Kako je vidljivo iz **Slike 4.5.**, zona inhibicije rasta se povećavala porastom koncentracija apitoksina. Najveće zone inhibicije su zabilježene pri najviše ispitivanim kocnetracijama apitoksina.



Slika 4.5. Antimikrobno djelovanje apitoksina na gram pozitivne izolate.
A) *B. cereus* (200 μg/mL); B) *E. durans* (300 μg/mL); C) *Lb. sakei* (300 μg/mL); D) *Lc. lactis* (200 μg/mL); E) *L. innocua* (300 μg/mL); F) *S. aureus* (400 μg/mL).

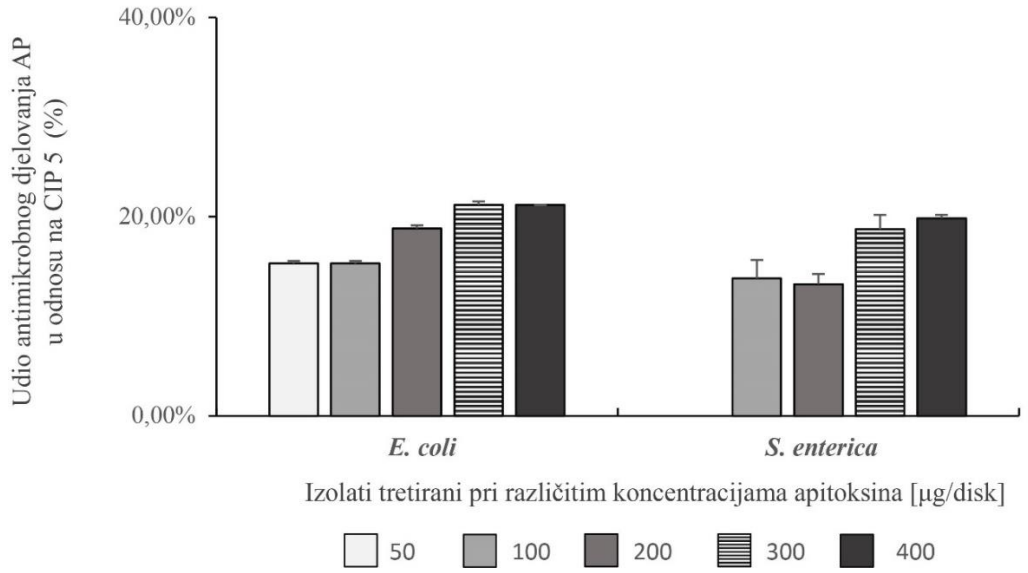
4.5.2. Određivanje udjela antibiotičke aktivnosti apitoksina gram negativnih bakterija

Prema BBL standardima je utvrđeno da su svi ispitivani gram negativni izolati osjetljivi na antibiotike ciprofloksacin 5 μg (CIP 5) i ampicilin-sulbaktam 20 μg (SAM 20). Antimikrobno djelovanje apitoksina je ispitano u koncentracijama 50 – 400 μg/disk, a oba ispitivana izolata u ovom radu su pokazala inhibiciju rasta prilikom difundiranja koncentracija apitoksina 100 – 400 μg/disk (**Graf 4.7.** i **Graf 4.8.**).

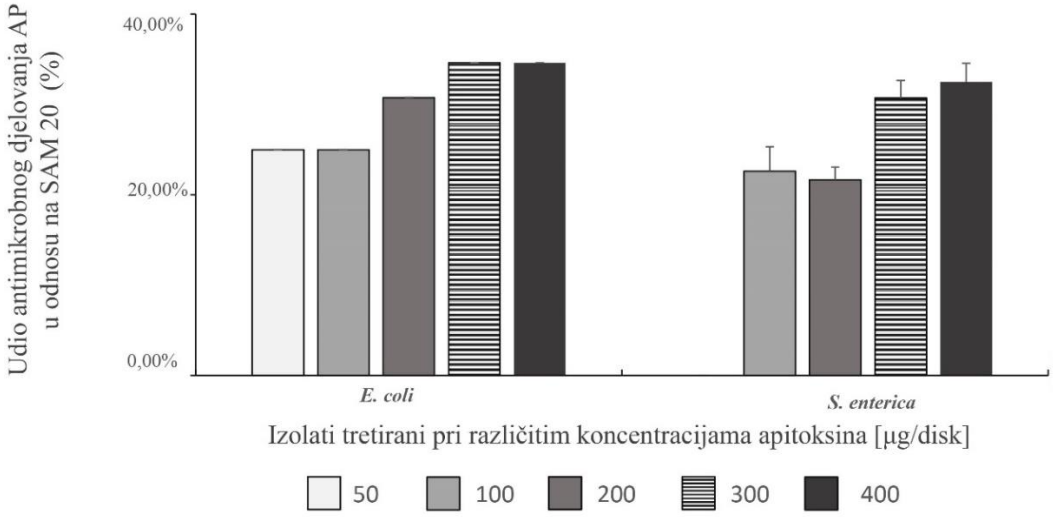
U usporedbi s ciprofloksacinom i ampicilin-sulbaktamom, apitoksin je pokazao veći udio antibiotičkog djelovanja ampicilin-sulbaktama nego ciprofloksacina za oba izolata.

Izolat *E. coli* je pokazao veću osjetljivost na apitoksin nego *S. enterica* subsp. *enterica*. Oba izolata su pokazala inhibiciju rasta pri ispitivanim koncentracijama, a iznimno, *S. enterica* subsp. *enterica* nije inhibirana jedino pri konentraciji apitoksina od 50 μg/disk.

Pri koncentraciji apitoksina od 400 μg/disk zabilježeno je djelovanje od 21,18 ± 0,35% u odnosu na CIP 5 i 34,62 ± 0,00% u odnosu na SAM 20 za *E. coli*. Pri istoj koncentraciji apitoksina zabilježeno je 19,84 ± 0,00% djelovanja u odnosu na CIP 5 za *S. enterica* subsp. *enterica* te 32,50 ± 2,07% u odnosu na SAM 20.

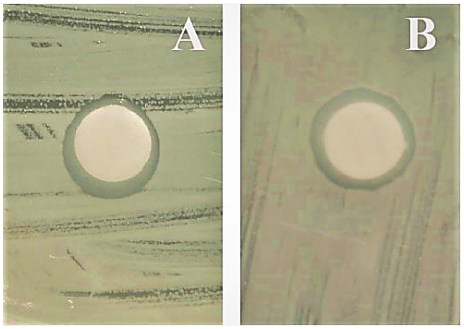


Graf 4.7. Udio antibiotičkog djelovanja apitoksina pri različitim koncentracijama apitoksina s pripadajućim standardnim devijacijama u odnosu na CIP 5 µg.



Graf 4.8. Udio antibiotičkog djelovanja apitoksina pri različitim koncentracijama apitoksina s pripadajućim standardnim devijacijama u odnosu na SAM 20 µg.

Kao i kod gram negativnih potencijalno patogenih mikroorganizama, zona inhibicije rasta se povećavala porastom koncentracija apitoksina. Najveće zone inhibicije su zabilježene pri najviše ispitivanim kocnetracijama apitoksina (**Slika 4.6.**).



Slika 4.6. Antimikrobno djelovanje apitoksina na gram negativne izolate. A) *E. coli* (400 μg/mL); B) *S. enterica* subsp. *enterica* (400 μg/mL).

5. Rasprava

Različita istraživanja su pokazala da apitoksin djeluje inhibitorno na određene gram pozitvne i gram negativne bakterije (Han i sur. 2009.; Park i sur. 2014.; Al-Ani i sur. 2015.; Picoli i sur. 2017.). Antimikrobno djelovanje prvenstveno se pripisuje melitinu, kationskom antimikrobnom peptidu (CAP), glavnoj sastavnici apitoksina (Habermann 1972.; Asthana i sur. 2004.; Pandidan i Mechler 2019.). Nadalje, gram pozitivni mikroorganizmi su osjetljiviji na apitoksin od gram negativnih, što se pripisuje razlikama u građi njihove stanične stijenke. Apitoksin lakše prodire kroz peptidoglikanski sloj gram pozitivnih bakterija i dopire do stanične membrane, primarnog mjesta njegovog antimikrobnog djelovanja (Papo i Shai 2003.). Za razliku od gram pozitivnih bakterija, stanična stijenka gram negativne bakterije dodatno je zaštićena vanjskim slojem lipopolisaharida koji otežavaju prodor apitoksina do stanične membrane (Raetz i Dowhan 1990.).

Ovo istraživanje je pokazalo da pri nižim početnim biomasama slične koncentracije apitoksina (3 log CFU/mL: MIK=12,5 – 25 µg/mL; 6 log CFU/mL: MIK=25 – 50 µg/mL) djeluju inhitorno, odnosno baktriocidno i na gram pozitivne i na gram negativne izolate, što nije u skladu s dosadašnjim istraživanjima. Tek pri visokoj početnoj biomasi (8 log CFU/mL: MIK=12,5 – 400 µg/mL), u pravilu, su potrebne veće koncentracije apitoksina kako bi se postigao inhibitoran ili bakteriocidan učinak apitoksina na gram negativne bakterije (*E. coli* i *S. enterica* subsp. *enterica*), nego na gram pozitivne. Nadalje, u ovom istraživanju sve MIK vrijednosti apitoksina su vrlo varijabilne i ispitivan je učinak apitoksina na različite biomase, dok je u ostalim istraživanjima ispitan učinak samo na jednu biomasu (5 log CFU/mL). Tako da, u ovom istraživanju, ovisno o biomasi, MIK vrijednost varira od 12,5 do 400 µg/mL (*S. aureus* DSM 20231), 12,5 – 200 µg/mL (*E. durans* ED004, *Lc. lactis* LL8307, *Lb. sakei* LS0296, *E. coli* ATCC 25922 i *S. enterica* subsp. *enterica* DSM 14221), 25 – 50 µg/mL (*B. cereus* DSM 6791) i 12,5 – 25 µg/mL (*L. innocua* ATCC 33090). Druga istraživanja su pokazala da su MIK vrijednosti za apitoksin niže te da djeluje u užem rasponu pri aplikaciji na biomasu reda veličine 5 log CFU/mL. Primjerice, za *E. faecalis* MIK vrijednost se kreće u rasponu 1 – 6,3 µg/mL, *Lb. casei* 4 µg/mL, *S. aureus* 0,06 – 6,3 µg/mL, *B. subtilis* 0,6 – 12,5 µg/mL, *B. megaterium* 0,3 µg/mL, *L. monocytogenes* 2 – 3,3 µg/mL, *E. coli* 16 – 50 µg/mL i *Salmonella* spp. 32 – 64 µg/mL (Oren i Shai 1997.; Moerman i sur. 2002.; Han i sur 2009.; Dosler i sur. 2015.; Ebbensgaard i sur. 2015.; Leandro i sur. 2015.). Ovakve razlike mogle bi se pripisati činjenici da su u drugim istraživanjima korištene druge vrste i sojevi, biomasa od 5 log CFU/mL i komercijonalno dostupan čisti melitin ili apitoksin veće čistoće, dok je u ovom istraživanju korišten izravno prikupljen apitoksin bez dodatnog pročišćavanja i izdvajanja pojedinačnih sastavnica s antimikrobnim djelovanjem. Ujedno, u ovom istraživanju, donja ispitivana koncentracija apitoksina je iznosila 12,5 µg/mL. Kako bi se povećala rezolucija, potrebno je ispitati dodatne, niže koncentracije (<12,5 µg/mL) apitoksina.

Nadalje, MIK vrijednosti detektirane vizualno nakon 24 i 48 h se nisu razlikovale, dok je kod spektrofotometrijskog određivanja detektirano odgođeno djelovanje apitoksina na *L. innocua*, *S. enterica* subsp. *enterica* i *E. coli*. Njihov rast nije bio inhibiran nakon 24 h, već tek nakon

48 h kada je rast bio inhibiran 100%. Poznato je da *L. innocua*, *S. enterica* subsp. *enterica* i *E. coli* formiraju biofilmove (Galie i sur. 2018.; Lee i sur. 2019.) čije karakteristike pružaju brojne prednosti mikroorganizmima. U biofilmovima se formiraju složeni gradijenti hranjivih tvari i kisika, sadrže ekstracelularne enzime važne za prehranu mikrobnih stanica i omogućava prijenos molekula koje sudjeluju u staničnoj komunikaciji. Nadalje, štite mikrobne stanice od nepovoljnih fizikalnih (npr. isušivanje) i kemijskih čimbenika, kao što su tvari s antimikrobnim djelovanjem (Flemming i sur. 2016.).

Ujedno, tijekom ovog istraživanja je uspoređena prikladnost dviju metoda za određivanje MIK vrijednosti, vizualna i spektrofotometrijska detekcija rasta u prisutnosti različitih koncentracija apitoksina. Detektirane MIK vrijednosti ovim metodama se međusobno ponešto razlikuju. Spektrofotometrijski određene MIK vrijednosti su niže za sve biomase te je raspon MIK vrijednosti uži (3 log CFU/mL: MIK = 12,5 μg/mL; 6 log CFU/mL: MIK = 12,5 – 25 μg/mL i 8 log CFU/mL: MIK = 12,5 – 200 μg/mL) u odnosu na vizualno određivanje MIK vrijednosti.

Spektrrofotmetrijsko određivanje MIK vrijednosti je osjetljivija metoda od vizualne. Vizualna metoda je subjektivna i manje osjetljiva od spektrofotometrijske te je njome teško detektirati slabe promjene u intenzitetu turbiditea i razlikovati potencijalne nečištoće od stvarnog turbiditeta. Nadalje, spektrofotometrijska metoda u kombinaciji s mikrotitarskom pločom s 96 jažica omogućuje brzo i reproducibilno određivanje MIK vrijednosti i istovremeno testiranje velikog broja uzoraka uz malu potrošnju tvari s antimikrobnom aktivnošću (Akinduti i sur. 2019.).

Apitoksin djeluje bakteriocidno na sve ispitivane izolate i MBK vrijednost je, kao i MIK, proporcionalna porastu korištene početne biomase. U pravilu, MBK vrijednosti su jednake (kod izolata gdje je MIK≤12,5 μg/mL) ili dva puta veće od MIK vrijednosti, s iznimkom *E. coli* kod koje je MBK vrijednost četiri puta veća od MIK vrijednosti, moguće zbog formiranja biofilma i njegovog zaštitnog djelovanja (Flemming i sur. 2016.) i *B. cereus* male biomase (3 log CFU/mL), čija mu sposobnost formiranja spora omogućava preživljavanje nepovoljnih uvjeta.

Obzirom da MBK vrijednost odgovara najnižoj koncentraciji apitoksina pri kojoj je inhibirano >99,0% rasta nakon subkultivacije na krutim hranjivim podlogama, na hranjive podloge su nacijepljene bakterijske suspenzije iz jažica gdje koncentracija apitoksina odgovara vrijednosti MIK i neposredno viša koncentracija apitoksina. U nekim slučajevima, takvom subkultivacijom detektirana inhibicija rasta na pločama je <99,0%, iako je spektrofotometrijski detektirani rast <1%. To ukazuje da manji broj stanica koji preživlja i ostaje vijabilan, ne mijenja turbiditet tekućeg medija i na nedovoljnu osjetljivost spektrofotometrijskog pristupa.

Disk difuzijskom metodom je pokazano da su svi ispitivani izolati osjetljivi na konvencionalne antibiotike (gram pozitivni na tetraciklin i eritromicin, gram negativni na ciprofloksacin i ampicillin-sulbaktam). Nadalje, pokazano je da je antimikrobno djelovanje

apitoksina vidljivo tek pri višim koncentracijama. Primjerice, svi gram pozitivni izolati, korisni (*E. durans* ED004, *Lc. lactis* LL8307, *Lb. sakei* LS0296) i potencijalni patogeni (*S. aureus, B. cereus* i *L. innocua*), osjetljivi su na apitoksin tek pri koncentracijama >50 µg/disk, a gram negativni (*E. coli, S. enterica*) pri koncentracijama >100 µg/disk. Nadalje, antimikrobna aktivnost apitoksina je tek manja frakcija efikasnosti konvencionalnih antibiotika. Primjerice, kod gram pozitivnih izolata, apitoksin pokazuje do 40,7% efikasnosti tetraciklina i 52,2% efikasnosti eritromicina, dok kod gram negativnih pokazuje 21,2% efikasnosti ciprofloksacina i 34,6% efikasnosti ampicilin-sulbaktama. Neka istraživanja su pokazala da apitoksin pokazuje bolju antimikrobnu aktivnost u kombinaciji s konvencionalnim antibioticima, gdje apitoksin ulazi u interakciju sa staničnim membranama i stvara ionske kanale mijenjajući tako permeabilnost citoplazmatske membrane. Na taj način, istovremeno može omogućiti ulazak drugih tvari, poput antibiotika, u stanicu i uzrokovati staničnu lizu (Yeaman i Yount 2003.; Hancock i sur. 2006.).

Stoga bi se u budućnosti trebalo istražiti djelovanje nepročišćenog apitoksina u koncentracijama nižim od 12,5 µg/mL te također, sinergistička aktivnost s komercijalno dostupnim antibioticima, kako bi se pojačalo djelovanje antibiotika i pri nižim apliciranim dozama.

6. Zaključci

- Apitoksin pokazuje antimikrobno djelovanje prema svim korisnim (*Lb. sakei* LS0296, *E. durans* ED004, *Lc. lactis* LL8307) i potencijalno patogenim (*S. aureus* subsp. *aureus* DSM 20231, *L. innocua* ATCC 33090, *B. cereus* DSM 6791 *E. coli* ATCC 25922, *S. enterica* subsp. *enterica* DSM 14221) bakterijama.

- Rast svih izolata se povećavao sa smanjenjem koncentracije apitoksina i produženom inkubacijom.

- Vrijednost MIK i MBK je proporcionalna početnoj biomasi za sve izolate.

- Pri vizualnom određivanju, MIK vrijednosti su se mogle odrediti nakon 24 h i nisu se mijenjale s produživanjem trajanja inkubacije.

- MIK vrijednost pri biomasi 3 log CFU/mL varira od 12,5 do 25 µg/mL, 6 log CFU/mL od 25 do 50 µg/mL i 8 log CFU/mL od 12,5 i 400 µg/mL, kada se određuje vizualno.

- Raspon MIK vrijednosti je uži i detektirane MIK vrijednosti su niže kada se određuju spektrofotometrijski. Pri biomasi 3 log CFU/mL iznosi 12,5 µg/mL, 6 log CFU/mL od 12,5 do 25 µg/mL i 8 log CFU/mL od 12,5 i 200 µg/mL.

- MIK vrijednosti u ovom istraživanju su više i vaijabilnijeg raspona od MIK vrijednosti detektiranim u drugim istraživanjima.

- Spektrofotometrijskim određivanjem rasta za biomasu 8 log CFU/mL apitoksin je pokazao odgođeno djelovanje na izolate *L. innocua*, *E. coli* i *S. enterica* subsp. *enterica*. MIK vrijednosti su mogle biti određene tek nakon 48 h i tada je inhibicija rasta iznosila 100%.

- Spektrofotometrijsko određivanje MIK vrijednosti za apitoksin je osjetljivija i točnija metoda od vizualne detekcije.

- MBK vrijednosti su jednake (kod izolata gdje je MIK≤12,5 µg/mL) ili dva puta veće od MIK vrijednosti.

- Neočekivano visoke MBK vrijednosti zabilježene su kod *E. coli* (biomasa log 8 CFU/mL, 400 µg/mL) i *B. cereus* (3 log CFU/mL, 50 µg/mL) bakterija koje posjeduju dodatne mehanizme preživljavanja nepovoljnih uvjeta (npr. sposobnost stvaranja biofilmova i spora).

- Redukcija brojnosti gram pozitivnih i gram negativnih bakterija značajno se povećava s povećanjem koncentracije apitoksina i ovisi o početnoj biomasi.

- Svi gram pozitivni i gram negativni izolati osjetljivi su na ispitivne konvencionalne antibiotike.

- Svi gram pozitivni izolati (*E. durans* ED004, *Lc. lactis* LL8307, *Lb. sakei* LS0296, *S. aureus*, *B. cereus* i *L. innocua*) osjetljivi su na koncentracije apitoksina >50 µg/disk, a gram negativni (*E. coli*, *S. enterica* subsp. *enterica*) na koncentracije >100 µg/disk i osjetljivost izolata je proporcionalna koncentraciji apitoksina.

- Antimikrobna efikasnost apitoksina (koncentracija u rasponu 50 – 400 µg/disk) prema *E. durans* ED004 iznosi 18,3 – 27,5 % efikasnosti tetraciklina (%TE) i 15,3 – 23,0 % efikasnosti eritromicina (%E), za *Lc. lactis* LL8307 15,5 – 40,7 %TE i 11,6 – 33,2 %E, *Lb. sakei* LS0296 22,4 – 29,3 %TE i 15,3 – 20,0 %E, za *S. aureus* 23,4 – 26,4 %TE i 27,4 – 31,0 %E i za *B. cereus* 19,1 – 27,8 %TE i 35,8 – 52,2 %E.

- *L. innocua*, je osjetljiva na djelovanje apitoksina samo pri najvišoj koncentraciji od 300 µg/disk, gdje pokazuje 19,9 %TE i 21,4 %E.

- Antimikrobna efikasnost apitoksina (koncentracija u rasponu 100 – 400 µg/disk) prema *E. coli* iznosi 15,3 – 21,2 % efikasnosti ciprofloksacina (%CIP) i 25,0 – 34,6% efikasnosti ampicilin-sulbaktama (%SAM), *S. enterica* subsp. *enterica* 13,8–9,8%CIP i 22,6 – 32,5%SAM.

7. Popis literature

1. Akinduti i sur. (2019) Suitability of spectrophotometric assay for determination of honey microbial inhibition
2. Al-Ani, I., Zimmermann, S., Reichling, J., Wink, M. (2015) Pharmacological synergism of bee venom and melittin with antibiotics and plant secondary metabolites against multi-drug resistant microbial pathogens. Phytomedicine 22(2):245–255.
3. Ali, A., Mohanny, K. (2014) Effect of injection with bee venom extract on productive performance and immune response of broiler chicks. Journal of Animal and Poultry Production 5(5): 237–246.
4. Ali, M. (2012). Studies on Bee Venom and Its Medical Uses. International Journal of Advancements in Research 1:1–15.
5. Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M. F., Di Ilio, C. (2013) Escherichia coli in Europe: An overview. International Journal of Environmental Research and Public Health.
6. Alqutub, A. N., Masoodi, I., Alsayari, K., Alomair, A. (2011) Bee sting therapy-induced hepatotoxicity: A case report. World Journal of Hepatology. 3(10):268–270.
7. Álvarez-Fernández, E., Cancelo, A., Díaz-Vega, C., Capita, R. Alonso-Calleja, C. (2013) Antimicrobial resistance in E. coli isolates from conventionally and organically reared poultry: A comparison of agar disc diffusion and Sensi Test Gram-negative methods. Food Control. 30(1):227–234.
8. Alvarez-Suarez, J. M. (2017) Bee products - chemical and biological properties. Bee Products - Chemical and Biological Properties (pp. 1–306). Springer International Publishing.
9. Amusan, E. E., Sanni, A. I. (2018) Isolation and Identification of Listeria monocytogenes in Fresh Croaker (Pseudotolithus senegalensis). In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science (Vol. 210). Institute of Physics Publishing.
10. Andrews, J. M. (2001) Determination of minimum inhibitory concentrations. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 48(SUPPL. 1):5–16.
11. Arteaga, V., Lamas, A., Regal, P., Vázquez, B., Miranda, J. M., Cepeda, A., Franco, C. M. (2019) Antimicrobial activity of apitoxin from Apis mellifera in Salmonella enterica strains isolated from poultry and its effects on motility, biofilm formation and gene expression. Microbial Pathogenesis 137.
12. Asthana, N., Yadav, S. P., Ghosh, J. K. (2004) Dissection of Antibacterial and Toxic Activity of Melittin. Journal of Biological Chemistry. 279(53):55042–55050.
13. Avci, M. i Tuncer, B. O. (2017) Safety evaluation of enterocin producer Enterococcus sp. strains isolated from traditional Turkish cheeses. Polish Journal of Microbiology. 66(2):223–233.
14. Balouiri, M., Sadiki, M., Ibnsouda, S. K. (2016, April 1). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of Pharmaceutical Analysis. Xi'an Jiaotong University.
15. Balsinde, J., Winstead, M. V., Dennis, E. A. (2002) Phospholipase A2 regulation of arachidonic acid mobilization. FEBS Letters.

16. Batoni, G., Maisetta, G., Esin, S. (2016, May 1). Antimicrobial peptides and their interaction with biofilms of medically relevant bacteria. Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes. Elsevier B.V.
17. Bayoub, K., Baibai, T., Mountassif, D., Retmane, A., Soukri, A. (2010) Antibacterial activities of the crude ethanol extracts of medicinal plants against Listeria monocytogenes and some other pathogenic strains. African Journal of Biotechnology 9 (27):4251–4258.
18. Bee Venom Therapy: Bee Venom, Its Nature, and Its Effect on Arthritic and Rheumatoid Conditions. (1935) JAMA: The Journal of the American Medical Association 104(23):2120
19. Bhunia, A., Domadia, P. N., Bhattacharjya, S. (2007). Structural and thermodynamic analyses of the interaction between melittin and lipopolysaccharide. Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes 1768(12):3282–3291.
20. Boutrin, M. C. F., Foster, H. A., Pentreath, V. W. (2008) The effects of bee (Apis mellifera) venom phospholipase A2 on Trypanosoma brucei brucei and enterobacteria. Experimental Parasitology 119(2):246–251.
21. Bridges, A. R., Owen, M. D. (1984) The morphology of the honey bee (Apis mellifera L.) venom gland and reservoir. Journal of Morphology 181(1): 69–86.
22. Brogden, K. A. (2005) Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? Nature Reviews Microbiology.
23. Cantas, L., Suer, K. (2014) Review: The important bacterial zoonoses in “One Health” concept. Frontiers in Public Health. Frontiers Media S. A.
24. Carina Audisio, M., Torres, M. J., Sabaté, D. C., Ibarguren, C., Apella, M. C. (2011) Properties of different lactic acid bacteria isolated from Apis mellifera L. bee-gut. Microbiological Research 166(1):1–13.
25. Chambers, H. F., i DeLeo, F. R. (2009). Waves of resistance: Staphylococcus aureus in the antibiotic era. Nature Reviews Microbiology.
26. Chaucheyras-Durand, F., Durand, H. (2010) Probiotics in animal nutrition and health. Beneficial Microbes 1(1):3–9.
27. Cherniack EP, Bugs as drugs, part 1: Insects: The" new" alternative medicine for the 21st century. Altern Med Rev, 2010; 15(2):124- 135.
28. Chiara M, Caruso M, D’Erchia AM, Manzari C, Fraccalvieri R, Goffredo E, Latorre L, Miccolupo A, Padalino I, Santagada G, Chiocco D, Pesole G, Horner DS, Parisi A (2015) Comparative genomics of Listeria sensu lato: genus-wide differences in evolutionary dynamics and the progressive gain of complex, potentially pathogenicityrelated traits through lateral gene transfer. Genome Biol Evol 7:2154–2172.
29. Chlebicz, A., Slizewska, K. (2018) Campylobacteriosis, Salmonellosis, Yersiniosis, and Listeriosis as Zoonotic Foodborne Diseases: A Review. International Journal of Environmental Research and Public Health. MDPI AG.
30. Choi, J. H., Jang, A. Y., Lin, S., Lim, S., Kim, D., Park, K., Seo, H. S. (2015) Melittin, a honeybee venom-derived antimicrobial peptide, may target methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Molecular Medicine Reports 12(5):6483–6490.

31. Choi, S. H., Cho, S. K., Kang, S. S., Bae, C. S., Bai, Y. H., Lee, S. H., Pak, S. C. (2003) Effect of apitherapy in piglets with preweaning diarrhea. American Journal of Chinese Medicine 31(2):321–326.
32. Choi, S. H., Kang, S. S. (2001) Therapeutic effect of bee venom in sows with hypogalactia syndrome postpartum. Journal of Veterinary Science (Suwon-Si, Korea) 2(2):121–124.
33. Christiansson, A., Bertilsson, J., Svensson, B. (1999) Bacillus cereus spores in raw milk: Factors affecting the contamination of milk during the grazing period. Journal of Dairy Science 82(2):305–314.
34. CLSI, Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria, Approved Guideline, 2nd. ed., CLSI document M45-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Roadn Suite 2500,Wayne, Pennsylvania 19087, USA, 2010
35. CLSI, Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents. Approved Guideline, CLSI document M26-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Roadn Suite 2500,Wayne, Pennsylvania 19087, USA, 1998.
36. CLSI, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, Approved Standard, 9th ed., CLSI document M07-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA, 2012
37. Corey G. R. (2009) Staphylococcus aureus bloodstream infections: definitions and treatment. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 48 Suppl. 4:S254–S259.
38. de Jesús Cortés-Sánchez, A., Garcia-Barrientos, R., Minor-Pérez, H., Dublán-García, O., Martin-Azocar, A. L. S. (2017) Food Safety and Antimicrobial Resistance an Approach to the Genus Salmonella spp. Journal of Biosciences and Medicines 05(02): 55–71.
39. Desmarchelier, P.,Fegan, N. (2016) Pathogens in Milk: Escherichia coli. In Reference Module in Food Science. Elsevier.
40. Dosler, S., Karaaslan, E. (2014) Inhibition and destruction of Pseudomonas aeruginosa biofilms by antibiotics and antimicrobial peptides. Peptides 62:32–37.
41. Ebbensgaard A, Mordhorst H, Overgaard MT, Nielsen CG, Aarestrup FM, Hansen EB (2015) Comparative evaluation of the antimicrobial activity of different antimicrobial peptides against a range of pathogenic bacteria. PLoS One 10(12):e0144611
42. Ekici, G. i Dümen, E. (2019) Escherichia coli and Food Safety. In The Universe of Escherichia coli [Working Title]. IntechOpen
43. European Food Safety Authority (EFSA); European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. EFSA J. 2016, 14, e04634. [CrossRef]
44. Facinelli, B., Giovanetti, E., Varaldo, P. E., Casolari, P., Fabio, U. (1991, November 16). Antibiotic resistance in foodborne listeria. The Lancet.

45. Fadl, A. E.-W. (2018) Antibacterial and antibiofilm effects of bee venom from (Apis mellifera) on multidrug-resistant bacteria (MDRB). Al-Azhar Journal of Pharmaceutical Sciences 58(2):60–80.
46. FAO/WHO. (2002) Guidelines for the evaluation of probiotics in food (Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food). Food and Agriculture Organization of the United Nations World Health Organization 21(214):1–11.
47. Fijan, S. (2014) Microorganisms with claimed probiotic properties: An overview of recent literature. International Journal of Environmental Research and Public Health. Molecular Diversity Preservation International.
48. Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A. i Kjelleberg, S. (2016) Biofilms: An emergent form of bacterial life. Nature Reviews Microbiology. Nature Publishing Group.
49. Foulquié Moreno, M. R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst, L. (2006) The role and application of enterococci in food and health. International Journal of Food Microbiology.
50. Franz, C. M. A. P., Huch, M., Abriouel, H., Holzapfel, W., Gálvez, A. (2011) Enterococci as probiotics and their implications in food safety. International Journal of Food Microbiology.
51. Gajski, G., Garaj-Vrhovac, V. (2013) Melittin: A lytic peptide with anticancer properties. Environmental Toxicology and Pharmacology.
52. Galdiero, E., Siciliano, A., Gesuele, R., Di Onofrio, V., Falanga, A., Maione, A.,Guida, M. (2019) Melittin inhibition and eradication activity for resistant polymicrobial biofilm isolated from a dairy industry after disinfection. International Journal of Microbiology, 2019, 125654442.
53. Galié, S., García-Gutiérrez, C., Miguélez, E. M., Villar, C. J., i Lombó, F. (2018) Biofilms in the food industry: Health aspects and control methods. Frontiers in Microbiology. Frontiers Media S.A.
54. Ganz, T., Lehrer, R. I. (1997) Antimicrobial peptides of leukocytes. Current Opinion in Hematology. Lippincott Williams and Wilkins.
55. Gevod, V. S., Birdi, K. S. (1984) Melittin and the 8–26 fragment. Differences in ionophoric properties as measured by monolayer method. Biophysical Journal 45(6): 1079–1083.
56. Gilliam, M. (1997, October 1). Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. FEMS Microbiology Letters. Blackwell Publishing Ltd.
57. Habermann, E. (1972). Bee and wasp venoms. Science 177(4046):314–322.
58. Han, S. M., Lee, K. G., Park, K. K., Pak, S. C. (2013) Antimicrobial activity of honey bee venom against select infectious fish pathogens. North American Journal of Aquaculture 75(3):445–448.
59. Han, S. M., Lee, K. G., Yeo, J. H., Hwang, S. J., Chenoweth, P. J., Pak, S. C. (2009) Somatic Cell Count in Milk of Bee Venom Treated Dairy Cows with Mastitis. Journal of ApiProduct and ApiMedical Science 1(4):104–109.
60. Han, S. M., Lee, K. G., Yeo, J. H., Oh, B. Y., Kim, B. S., Lee, W., Pak, S. C. (2010) Effects of honeybee venom supplementation in drinking water on growth performance of broiler chickens. Poultry Science 89(11):396–2400.

61. Han, S. M., Woo, S. O., Kim, S. G., Jang, H. R., Lee, K. W. (2018) Antibacterial Effects of Purified Bee Venom against Bacillus cereus, Streptococcus agalactiae, and Pseudomonas aeruginosa. Journal of Apiculture 33(1): –16.
62. Han, S., Lee, K., Yeo, J., Kim, W., Park, K. (2011) Biological effects of treatment of an animal skin wound with honeybee (Apis melifera. L) venom. Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery 64(3).
63. Han, S., Yeo, J., Baek, H., Lin, S. M., Meyer, S. i Molan, P. (2009) Postantibiotic effect of purified melittin from honeybee (Apis mellifera) venom against Escherichia coli and Staphylococcus aureus. Journal of Asian Natural Products Research 11(9):796–804.
64. Hancock R. E., Diamond G. (2000) The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. Trends in microbiology 8(9):402-410.
65. Hancock, R. E. W. i Sahl, H. G. (2006, December). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. Nature Biotechnology.
66. Harwig, S. S. L., Tan, L., Qu, X. D., Cho, Y., Eisenhauer, P. B., Lehrer, R. I. (1995) Bactericidal properties of murine intestinal phospholipase A2. Journal of Clinical Investigation 95(2):603–610.
67. Hegazi, A. G., Abd Allah, F. M. (2012) Antimicrobial activity of different Saudi Arabia honeys. Global Veterinaria 9(1):53–59.
68. Hooper, L. V., Midwedt, T., Gordon, J. I. (2002) How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. Annual Review of Nutrition.
69. Huang, C.C., Lai, S.H., Shin, S.L., Liau, S.M., Peng, J.S., (1999) A study on the spoilage of aseptic packaged long life milkcaused by Bacillus cereus. J. Chin. Soc. Anim. Sci 28:249–260.
70. Huys, G., Botteldoorn, N., Delvigne, F., De Vuyst, L., Heyndrickx, M., Pot, B., Daube, G. (2013) Microbial characterization of probiotics-Advisory report of the Working Group "8651 Probiotics" of the Belgian Superior Health Council (SHC). Molecular Nutrition and Food Research 57(8):1479–1504.
71. Issenhuth-Jeanjean, S., Roggentin, P., Mikoleit, M., Guibourdenche, M., De Pinna, E., Nair, S., Weill, F. X. (2014) Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. Research in Microbiology 165(7):526–530.
72. Jahan, M., Zhanel, G. G., Sparling, R., and Holley, R. A. (2015) Horizontal transfer of antibiotic resistance from Enterococcus faecium of fermented meat origin to clinical isolates of E. faecium and Enterococcus faecalis. Int. J. Food Microbiol 199:78–85.
73. Jung, B. G., Lee, J. A., Park, S. B., Hyun, P. M., Park, J. K., Suh, G. H., Lee, B. J. (2013) Immunoprophylactic effects of administering honeybee (Apis melifera) venom spray against Salmonella Gallinarum in broiler chicks. Journal of Veterinary Medical Science 75(10):1287–1295.
74. Kim, S. Y., Kim, S. R., Oh, M. J., Jung, S. J., Kang, S. Y. (2011) In Vitro antiviral activity of red alga, Polysiphonia morrowii extract and its bromophenols against fish pathogenic infectious hematopoietic necrosis virus and infectious pancreatic necrosis virus. Journal of Microbiology 49(1):102–106.
75. Kokot, Z. J.; Matysiak, J. (2008) The new chromatographic method for honey bee venom analysis. Approach for standardization of the product. 19th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis; Gdańsk, Poland

76. Krehbiel, C., Rust, S., Zhang, G., Gilliland, S. (2003) Bacterial direct-fed microbials in ruminant diets: Performance response and mode of action. Journal of Animal Science. 81(14_suppl_2):E120–E132.
77. Layton, D. S., Choudhary, A., Bean, A. G. D. (2017) Breaking the chain of zoonoses through biosecurity in livestock. Vaccine 35(44):5967–5973.
78. Leandro LF, Mendes CA, Casemiro LA, Vinholis AH, Cunha WR, de Almeida R, Martins CH (2015) Antimicrobial activity of apitoxin, melittin and phospholipase A_2 of honey bee (*Apis mellifera*) venom against oral pathogens. An Acad Bras Cienc 87(1):147–155
79. Lee B. H., Piveteau P., Cole S., Badel-Berchoux S., Guillier L., Felix B., Krezdorn N., Hébraud M., Bernardi T., Sultan I, Piveteau P. (2019) Biofilm formation of Listeria monocytogenes strains under food processing environments and pan-genome-wide association study. Frontiers in Microbiology 10:2698.
80. Moerman L, Bosteels S, Noppe W, Willems J, Clynen E, Schoofs L, Thevissen K, Tytgat J, Van Eldere J, Van Der Walt J, Verdonck F (2002) Antibacterial and antifungal properties of alpha-helical, cationic peptides in the venom of scorpions from southern Africa. Eur J Biochem 269(19):4799–4810
81. Moreno, M., Giralt, E. (2015) Three valuable peptides from bee and wasp venoms for therapeutic and biotechnological use: Melittin, apamin and mastoparan. Toxins. MDPI AG.
82. Mrkonjić Fuka M, Wallisch S, Engel M, Welzl G, Havranek J, Schloter M. (2013) Dynamics of Bacterial Communities during the Ripening Process of Different Croatian Cheese Types Derived from Raw Ewe's Milk Cheeses. PLoS One 8(11): e80734.
83. Mrkonjić Fuka M., Tanuwidjaja I., Zgomba Maksimovic A, Zunabovic-Pichler M., Kublik S., Hulak N., Domig K. J, Schloter M. (2020) Bacterial diversity of naturally fermented game meat sausages: Sources of new starter cultures. LWT-Food Science and Technology 118:108782.
84. Nevalainen, T. J., Graham, G. G., Scott, K. F. (2008) Antibacterial actions of secreted phospholipases A2. Review. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids.
85. Nikaido, H. (1994) Prevention of drug access to bacterial targets: Permeability barriers and active efflux. Science 264(5157):382–388.
86. O'Neill, J., By, C., Neill, J. I. M. O., O'Neill, J. (2015) Securing New Drugs for Future Generations: The Pipeline of Antibiotics. The Review on Antimicrobial Resistance, (May), 42. Olofsson, T. C., Vásquez, A. (2008) Detection and identification of a novel lactic acid bacterial flora within the honey stomach of the honeybee Apis mellifera. Current Microbiology 57(4):356–363.
87. Ondusko, D. S., Nolt, D. (2018) Staphylococcus aureus. Pediatrics in Review 39(6): 287–298.
88. Oren Z, Shai Y (1997) A class of highly potent antibacterial peptides derived from pardaxin, a pore-forming peptide isolated from Moses sole fish *Pardachirus marmoratus*. Eur J Biochem 237(1):303–310

89. Orsi, R. H., Wiedmann, M. (2016, June 1). Characteristics and distribution of Listeria spp., including Listeria species newly described since 2009. Applied Microbiology and Biotechnology. Springer Verlag.
90. Ozcelik, B., and S. Citak. 2009. Evaluation of antibiotic resistance of ¨ Bacillus cereus isolates in ice cream samples sold in Ancara. Turk. J. Pharm. Sci. 6:231–238
91. Pacáková, V., Štulík, K., Thi Hau, P., Jelínek, I., Vinš, I., Sykora, D. (1995) Comparison of high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis for the determination of some bee venom components. Journal of Chromatography A. 700(1–2):187–193.
92. Pandidan, S., Mechler, A. (2019) Nano-viscosimetry analysis of the membrane disrupting action of the bee venom peptide melittin. Scientific Reports. 9(1).
93. Papo, N., Shai, Y. (2003) New lytic peptides based on the D,L-amphipathic helix motif preferentially kill tumor cells compared to normal cells. Biochemistry 42(31): 9346–9354.
94. Park, D., Jung, J. W., Lee, M. O., Lee, S. Y., Kim, B., Jin, H. J.,Kwon, H. W. (2014) Functional characterization of naturally occurring melittin peptide isoforms in two honey bee species, Apis mellifera and Apis cerana. Peptides 53: 185–193.
95. Park, S., Park, B., Yun, S., Kang, H., So, B., Yun, S. (2013) Antimicrobial activities of honey bee venom against pathogens isolated from clinical bovine mastitis in Korea. Planta Medica 79(13).
96. Pascoal, A., Estevinho, M. M., Choupina, A. B., Sousa-Pimenta, M., Estevinho, L. M. (2019, December 1). An overview of the bioactive compounds, therapeutic properties and toxic effects of apitoxin. Food and Chemical Toxicology. Elsevier Ltd.
97. Peng, J. S., Tsai, W. C., Chou, C. C. (2001) Surface characteristics of Bacillus cereus and its adhesion to stainless steel. International Journal of Food Microbiology 65(1–2): 105–111.
98. Picoli, T., Peter, C. M., Zani, J. L., Waller, S. B., Lopes, M. G., Boesche, K. N., Fischer, G. (2017) Melittin and its potential in the destruction and inhibition of the biofilm formation by Staphylococcus aureus, Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa isolated from bovine milk. Microbial Pathogenesis 112, 57–62.
99. Pouwels, P. H., Leer, R. J., Shaw, M., Heijne Den Bak-Glashouwer, M. J., Tielen, F. D., Smit, E., Conway, P. L. (1998) Lactic acid bacteria as antigen delivery vehicles for oral immunization purposes. International Journal of Food Microbiology 41(2): 155–167.
100. Pucca, M. B., Cerni, F. A., Oliveira, I. S., Jenkins, T. P., Argemí, L., Sorensen, C. V., Laustsen, A. H. (2019, September 6). Bee Updated: Current Knowledge on Bee Venom and Bee Envenoming Therapy. Frontiers in Immunology. Frontiers Media S.A.
101. Rada, V., Máchová, M., Huk, J., Marounek, M., Dušková, D. (1997) Microflora in the honeybee digestive tract: Counts, characteristics and sensitivity. Apidologie 28(6): 357–365
102. Rader, K., Wildfeuer, A., Wintersberger, F., Bossinger, P., Mücke, H. W. (1987) Characterization of bee venom and its main components by high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A. 408(C): 341–348.
103. Raetz, C. R. H., Dowhan, W. (1990) Biosynthesis and function of phospholipids in Escherichia coli. Journal of Biological Chemistry.

104. Schlundt, J., Toyofuku, H., Jansen, J., Herbst, S. A. (2004) Emerging food-borne zoonoses. OIE Revue Scientifique et Technique. Office International des Epizootes.
105. Schmidt, O. M. M. E. A., Justino, A. (2015) Other Products of the Hive. In J. M. Graham (Ed.), The hive and the honeybee (pp. 704–775). Hamilton, Illinois: Dadant i Sons, Inc.
106. Schroder, E., Lübke, K., Lehmann, M., Beetz, I. (1971) Haemolytic activity and action on the surface tension of aqueous solutions of synthetic melittins and their derivatives. Experientia 27(7):764–765.
107. Sharma, S. V. (1993) Melittin-induced hyperactivation of phospholipase A2 activity and calcium influx in ras-transformed cells. Oncogene 8(4):939–947.
108. Shebeeb A. K., Ghanim A. F., Awayid H. S. (2020 Antibacterial Activity Of Bee Venom Against Multidrug Resistance Staphylococcus Aureus From Milk Of Cow And Buffaloes. International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences 11(2): 2177-2182.
109. Shimpi, R., Chaudhari, P., Deshmukh, R., Devare, S., Bagad, Y. (2016) a Review : Pharmacotherapeutics of Bee Venom. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 5(7):656–667.
110. Slade, P. J., and D. L. Collins-Thompson. (1991) Listeria, plasmids, antibiotic resistance, and food. Lancet 336:1004.
111. Surendra N.S., Jayaram G.N., Reddy M.S. (2011) Antimicrobial activity of crude venom extracts in honeybees (Apis cerana, Apis dorsata, Apis florea) tested against selected pathogens. African Journal of Microbiology Research 5(18):2765–2772.
112. Szókán, G. Y., Horváth, J., Almás, M., Saftics, G. Y., Palócz, A. (1994) Liquid Chromatographic Analysis and Separation of Polypeptide Components from Honey Bee Venoms. Journal of Liquid Chromatography 17(16):3333–3349.
113. Tadesse, D. A., Zhao, S., Tong, E., Ayers, S., Singh, A., Bartholomew, M. J., McDermott, P. F. (2012) Antimicrobial drug resistance in Escherichia coli from humans and food animals, United States, 1950-2002. Emerging Infectious Diseases.
114. Tossi A., Sandri L., Giangaspero, A. (2000) Amphipathic, α-helical antimicrobial peptides. Peptide Science 55(1):4-30.
115. Van Boeckel, T. P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B. T., Levin, S. A., Robinson, T. P., Laxminarayan, R. (2015) Global trends in antimicrobial use in food animals. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 112(18): 5649–5654.
116. Wang, Y. B. (2007) Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp Penaeus vannamei. Aquaculture: 269(1–4):259–264.
117. Woods, N., Niwasabutra, K., Acevedo, R., Igoli, J., Altwaijry, N. A., Tusiimire, J., Ferro, V. A. (2017). Natural Vaccine Adjuvants and Immunopotentiators Derived From Plants, Fungi, Marine Organisms, and Insects. In Immunopotentiators in Modern Vaccines: Second Edition (pp. 211–229). Elsevier Inc.
118. Yang, S. C., Lin, C. H., Sung, C. T., Fang, J. Y. (2014) Antibacterial activities of bacteriocins: Application in foods and pharmaceuticals. Frontiers in Microbiology. Frontiers Research Foundation.

119. Yeaman, M. R., i Yount, N. Y. (2003) Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. Pharmacological Reviews.
120. Zasloff M. (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. Nature. 415(6870): 389-395.
121. Zolfagharian, H., Mohajeri, M., Babaie, M. (2016) Bee venom (apis mellifera) an effective potential alternative to gentamicin for specific bacteria strains-Bee venom an effective potential for bacteria. Journal of Pharmacopuncture: 19(3):225–230.

Internet literatura:

1. https://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/ecoli/en/ (Pristupljeno 23. rujna 2020.)

8. Prilog

8.1. Popis kratica

°C	stupanj celzijusa
µg	mikrogram
µL	mikrolitar
A_{660}	spektrofotometrijska apsorbancija pri valnoj duljini od 660 nanometara
AMP	antimikorbni peptidi
AP	apitoksin
BHI	moždano-srčani infuzijski medij (engl. brain heart infusion agar)
BMK	bakterije mliječne kiseline
CAP	(engl. *cationic antimicrobial peptides*)kationski antimikrobni peptidi
CFU	broj formiranih kolonija (eng. *colony forming units*)
CIP 5	5 µg ciprofloksacin
E 15	15 µg eritromicin
g	gram
GI	gastrointestinalni trakt
GRAS	(engl. *generally regarded as safe*) mikroorganizama
h	sat
	litra
LPS	lipopolisaharidi
MBK	minimlana bakteriocidna koncetracija
MCD peptid	peptid koji degranulira mastocite (engl. *mast cell degranulating*)
mg	miligram
MHB	Müeller-Hinton bujon
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
min	minuta
mL	mililitar
MRSA	meticilin rezistentan *Staphylococcus aureus*
nm	nanometar
pH	negativan logaritam koncentracije vodikovih iona (H+)
PLA_2	enzim fosfolipaza A_2
s	sekunda

SAM 20	ampicilin-sulbactam 20 µg
spp.	vrsta (lat. *species*)
subsp.	podvrsta (lat. *subspecies*)
TE 30	tetraciklin 30 µg
V	volt

8.2. Tablice

Tablica P1. Utjecaj apitoksina na *E. durans* ED004 – dvofaktorska analiza varijance (*two way* ANOVA).

Izvor varijabilnosti	Suma kvadrata	Stupnjevi slobode	Varijanca	Test statistika F	*p* vrijednost	*Kritična F vrijednost*
Koncentracija **	$3{,}18 \times 10^{14}$	1	$3{,}18 \times 10^{14}$	3819,240	$1{,}21 \times 10^{-9}$	5,143
Biomasa**	$6{,}37 \times 10^{14}$	2	$3{,}18 \times 10^{14}$	3819,240	$4{,}84 \times 10^{-10}$	5,143
Interakcija*	$6{,}37 \times 10^{14}$	2	$3{,}18 \times 10^{14}$	3819,240	$4{,}84 \times 10^{-10}$	5,143
Unutar grupe	$5{,}00 \times 10^{11}$	6	$8{,}33 \times 10^{10}$			
Ukupno	$1{,}59 \times 10^{15}$	11				

Tablica P2. Utjecaj apitoksina na *E. durans* ED004 – *post hoc* Tukey HSD test.

Usporedba	Apsolutna razlika srednjih vrijednosti	$q_{0,001}$ vrijednost	Razina značajnosti (α=0,001)
10^3 (200,0 µg/mL) - 10^3 (100,0 µg/mL)	0,00	0,00	ns
10^3 (200,0 µg/mL) - 10^6 (200,0 µg/mL)	0,00	0,00	ns
10^3 (200,0 µg/mL) - 10^6 (100,0 µg/mL)	0,00	0,00	ns
10^3 (200,0 µg/mL) - 10^8 (200,0 µg/mL)	0,00	0,00	ns
10^3 (200,0 µg/mL) - 10^8 (100,0 µg/mL)	$3{,}09 \times 10^7$	151,38	**
10^3 (100,0 µg/mL) - 10^6 (200,0 µg/mL)	0,00	0,00	ns
10^3 (100,0 µg/mL) - 10^6 (100,0 µg/mL)	0,00	0,00	ns
10^3 (100,0 µg/mL) - 10^8 (200,0 µg/mL)	0,00	0,00	ns
10^3 (100,0 µg/mL) - 10^8 (100,0 µg/mL)	$3{,}09 \times 10^7$	151,38	**
10^6 (200,0 µg/mL) - 10^6 (100,0 µg/mL)	0,00	0,00	ns

10^6 (200,0 µg/mL) - 10^8 (200,0 µg/ µg/mL)	0,00	0,00	ns
10^6 (200,0 µg/mL) - 10^8 (100,0 µg/ µg/mL)	3,09 x 10^7	151,38	**
10^6 (100,0 µg/mL) - 10^8 (200,0 µg/ µg/mL)	0,000	0,00	ns
10^6 (100,0 µg/mL) - 10^8 (100,0 µg/ µg/mL)	3,09 x 10^7	151,38	**
10^8 (200,0 µg/mL) - 10^8 (100,0 µg/mL)	3,09 x 10^7	151,38	**

Kritična vrijednost *q* kod statističke razine značajnosti 5% ($q_{0,05}$) iznosi 5,628, a kod statističke razine značajnosti 1% ($q_{0,01}$) 7,972. Ako je eksperimentalna *q* vrijednost >5,628 razlika je statistički značajna na razini značajnosti 5% (*), a ako je *q* vrijednost >7,972 razlika je statistički značajna na razini značajnosti 1% (**).
ns – nije signifikantno.

Tablica P3. Utjecaj apitoksina na *Lc. lactis* LL8307 – dvofaktorska analiza varijance (*two way* ANOVA).

Izvor varijabilnosti	Suma kvadrata	Stupnjevi slobode	Varijanca	Test statistika F	*p* vrijednost	*Kritična F vrijednost*
Koncentracija **	$2{,}92 \times 10^{14}$	1	$2{,}92 \times 10^{14}$	48,274	$4{,}41 \times 10^{-4}$	5,987
Biomasa**	$7{,}67 \times 10^{15}$	2	$3{,}84 \times 10^{15}$	633,343	$1{,}05 \times 10^{-7}$	5,143
Interakcija*	$5{,}16 \times 10^{14}$	2	$2{,}58 \times 10^{14}$	42,576	$2{,}85 \times 10^{-4}$	5,143
Unutar grupe	$3{,}63 \times 10^{13}$	6	$6{,}06 \times 10^{12}$			
Ukupno	$8{,}52 \times 10^{15}$	11				

Tablica P4. Utjecaj apitoksina na *Lc. lactis* LL8307 – *post hoc* Tukey HSD test.

Usporedba	Apsolutna razlika srednjih vrijednosti	$q_{0,005}$ vrijednost	Razina značajnosti (α=0,005)
10^3 (25,0 µg/mL) - 10^3 (12,5 µg/mL)	0,00	0,00	ns
10^3 (25,0 µg/mL) - 10^6 (25,0 µg/mL)	$1{,}49 \times 10^6$	0,85	ns
10^3 (25,0 µg/mL) - 10^6 (12,5 µg/mL)	$2{,}70 \times 10^6$	1,55	ns
10^3 (25,0 µg/mL) - 10^8 (25,0 µg/mL)	$4{,}05 \times 10^7$	23,25	*
10^3 (25,0 µg/mL) - 10^8 (12,5 µg/mL)	$6{,}89 \times 10^7$	39,57	*
10^3 (12,5 µg/mL) - 10^6 (25,0 µg/mL)	$1{,}49 \times 10^6$	0,85	ns
10^3 (12,5 µg/mL) - 10^6 (12,5 µg/mL)	$2{,}70 \times 10^6$	1,55	ns
10^3 (12,5 µg/mL) - 10^8 (25,0 µg/mL)	$4{,}05 \times 10^7$	23,25	*
10^3 (12,5 µg/mL) - 10^8 (12,5 µg/mL)	$6{,}89 \times 10^7$	39,57	*
10^6 (25,0 µg/mL) - 10^6 (12,5 µg/mL)	$1{,}22 \times 10^6$	0,70	ns
10^6 (25,0 µg/mL) - 10^8 (25,0 µg/mL)	$3{,}90 \times 10^7$	22,39	*

10^6 (25,0 µg/mL) - 10^8 (12,5 µg/mL)	6,74 x 10^7	38,71	*
10^6 (12,5 µg/mL) - 10^8 (25,0 µg/mL)	3,78 x 10^7	21,69	*
10^6 (12,5 µg/mL) - 10^8 (12,5 µg/mL)	6,62 x 10^7	38,01	*
10^8 (25,0 µg/mL) - 10^8 (12,5 µg/mL)	2,84 x 10^7	16,32	*

Kritična vrijednost *q* kod statističke razine značajnosti 5% ($q_{0,05}$) iznosi 5,628, a kod statističke razine značajnosti 1% ($q_{0,01}$) 7,972. Ako je eksperimentalna *q* vrijednost >5,628razlika je statistički značajna na razini značajnosti 5% (*), a ako je *q* vrijednost >7,972razlika je statistički značajna na razini značajnosti 1% (**).
ns – nije signifikantno.

Tablica P5. Utjecaj apitoksina na *Lb.sakei* LS0296 – dvofaktorska analiza varijance (*two way* ANOVA).

Izvor varijabilnosti	Suma kvadrata	Stupnjevi slobode	Varijanca	Test statistika F	*p* vrijednost	*Kritična F vrijednost*
Koncentracija **	$1{,}94 \times 10^{13}$	1	$1{,}94 \times 10^{13}$	24,695	$2{,}53 \times 10^{-3}$	5,987
Biomasa**	$1{,}57 \times 10^{14}$	2	$7{,}86 \times 10^{13}$	99,935	$2{,}48 \times 10^{-5}$	5,143
Interakcija*	$1{,}33 \times 10^{13}$	2	$6{,}63 \times 10^{12}$	8,430	$1{,}81 \times 10^{-2}$	5,143
Unutar grupe	$4{,}72 \times 10^{12}$	6	$7{,}87 \times 10^{11}$			
Ukupno	$1{,}95 \times 10^{14}$	11				

Tablica P6. Utjecaj apitoksina na *Lb.sakei* LS0296 – *post hoc* Tukey HSD test.

Usporedba	Apsolutna razlika srednjih vrijednosti	$q_{0,001}$ vrijednost	Razina značajnosti (α=0,001)
10^3 (50,0 µg/mL) - 10^3 (25,0 µg/ mL)	$2{,}49 \times 10^6$	3,96	ns
10^3 (50,0 µg/mL) - 10^6 (50,0 µg/mL)	0,00	0,00	ns
10^3 (50,0 µg/mL) - 10^6 (25,0 µg/mL)	0,00	0,00	ns
10^3 (50,0 µg/mL) - 10^8 (50,0 µg/mL)	$5{,}65 \times 10^6$	9,01	**
10^3 (50,0 µg/mL) - 10^8 (25,0 µg/mL)	$1{,}08 \times 10^7$	17,22	**
10^3 (25,0 µg/mL) - 10^6 (50,0 µg/mL)	$2{,}49 \times 10^6$	3,96	ns
10^3 (25,0 µg/mL) - 10^6 (25,0 µg/mL)	$2{,}49 \times 10^6$	3,96	ns
10^3 (25,0 µg/mL) - 10^8 (50,0 µg/mL)	$3{,}17 \times 10^6$	5,05	ns
10^3 (25,0 µg/mL) - 10^8 (25,0 µg/mL)	$8{,}32 \times 10^6$	13,26	**
10^6 (50,0 µg/mL) - 10^6 (25,0 µg/mL)	0,00	0,00	ns
10^6 (50,0 µg/mL) - 10^8 (50,0 µg/mL)	$5{,}65 \times 10^6$	9,01	**

10^6 (50,0 µg/mL) - 10^8 (25,0 µg/mL)	1,08 x 10^7	17,22	**
10^6 (25,0 µg/mL) - 10^8 (50,0 µg/mL)	5,65 x 10^6	9,01	**
10^6 (25,0 µg/mL) - 10^8 (25,0 µg/mL)	1,08 x 10^7	17,22	**
10^8 (50,0 µg/mL) - 10^8 (25,0 µg/mL)	5,15 x 10^6	8,21	**

Kritična vrijednost *q* kod statističke razine značajnosti 5% ($q_{0,05}$) iznosi 5,628, a kod statističke razine značajnosti 1% ($q_{0,01}$) 7,972. Ako je eksperimentalna *q* vrijednost >5,628razlika je statistički značajna na razini značajnosti 5% (*), a ako je *q* vrijednost >7,972 razlika je statistički značajna na razini značajnosti 1% (**).
ns – nije signifikantno.

Tablica P7. Utjecaj apitoksina na *L. innocua* (ATCC 33090) – dvofaktorska analiza varijance (*two way* ANOVA).

Izvor varijabilnosti	Suma kvadrata	Stupnjevi slobode	Varijanca	Test statistika F	*p* vrijednost	*Kritična F vrijednost*
Koncentracija **	$2{,}41 \times 10^{16}$	2	$1{,}20 \times 10^{16}$	102,202	$6{,}50 \times 10^{-7}$	4,256
Biomasa**	$2{,}41 \times 10^{16}$	2	$1{,}21 \times 10^{16}$	102,313	$6{,}47 \times 10^{-7}$	4,256
Interakcija*	$5{,}60 \times 10^{16}$	4	$1{,}40 \times 10^{16}$	118,883	$8{,}79 \times 10^{-8}$	3,633
Unutar grupe	$1{,}06 \times 10^{15}$	9	$1{,}18 \times 10^{41}$			
Ukupno	$1{,}05 \times 10^{17}$	17				

Tablica P8. Utjecaj apitoksina na *L. innocua* (ATCC 33090) – *post hoc* Tukey HSD test.

Usporedba	Apsolutna razlika srednjih vrijednosti	$q_{0,001}$ vrijednost	Razina značajnosti (α=0,001)
10^3 (50,0 µg/mL) - 10^3 (25,0 µg/mL)	0,00	0,00	ns
10^3 (50,0 µg/mL) - 10^3 (12,5 µg/mL)	$9{,}00 \times 10^2$	0,00	ns
10^3 (50,0 µg/mL) - 10^6 (50,0 µg/ml)	0,00	0,00	ns
10^3 (50,0 µg/mL) - 10^6 (25,0 µg/mL)	$3{,}60 \times 10^4$	0,00	ns
10^3 (50,0 µg/mL) - 10^6 (12,5 µg/mL)	$2{,}42 \times 10^7$	3,15	ns
10^3 (50,0 µg/mL) - 10^8 (50,0 µg/mL)	$2{,}44 \times 10^8$	31,79	**
10^3 (50,0 µg/mL) - 10^8 (12,5 µg/mL)	$8{,}50 \times 10^4$	0,01	ns
10^3 (25,0 µg/mL) - 10^3 (12,5 µg/mL)	$9{,}00 \times 10^2$	0,00	ns
10^3 (25,0 µg/mL) - 10^6 (50,0 µg/mL)	0,00	0,00	ns
10^3 (25,0 µg/mL) - 10^6 (25,0 µg/mL)	$3{,}60 \times 10^4$	0,00	ns
10^3 (25,0 µg/ml) - 10^6 (12,5 µg/mL)	$2{,}42 \times 10^7$	3,15	ns

10^3 (25,0 µg/mL) - 10^8 (50,0 µg/mL)	2,44 x 10^8	31,79	**
10^3 (25,0 µg/mL) - 10^8 (12,5 µg/mL)	8,50 x 10^4	0,01	ns
10^3 (12,5 µg/mL) - 10^6 (50,0 µg/mL)	9,00 x 10^2	0,00	ns
10^3 (12,5 µg/mL) - 10^6 (25,0 µg/mL)	3,51 x 10^4	0,00	ns
10^3 (12,5 µg/mL) - 10^6 (12,5 µg/mL)	2,41 x 10^7	3,15	ns
10^3 (12,5 µg/mL) - 10^8 (50,0 µg/mL)	2,44 x 10^8	31,79	**
10^3 (12,5 µg/mL) - 10^8 (12,5 µg/mL)	8,41 x 10^4	0,01	ns
10^6 (50,0 µg/mL) - 10^6 (25,0 µg/mL)	3,60 x 10^4	0,00	ns
10^6 (50,0 µg/mL) - 10^6 (12,5 µg/mL)	2,42 x 10^7	3,15	ns
10^6 (50,0 µg/mL) - 10^8 (50,0 µg/mL)	2,4 x 10^8	31,79	**
10^6 (50,0 µg/mL) - 10^8 (12,5 µg/mL)	8,50 x 10^4	0,01	ns
10^6 (25,0 µg/mL) - 10^6 (12,5 µg/mL)	2,41 x 10^7	3,14	ns
10^6 (25,0 µg/mL) - 10^8 (50,0 µg/mL)	2,44 x 10^8	31,78	**
10^6 (25,0 µg/mL) - 10^8 (12,5 µg/mL)	4,90 x 10^4	0,01	ns
10^6 (12,5 µg/ml) - 10^8 (50,0 µg/mL)	2,20 x 10^8	28,64	**
10^6 (12,5 µg/mL) - 10^8 (12,5 µg/mL)	2,41 x 10^7	3,13	ns
10^8 (50,0 µg/mL) - 10^8 (12,5 µg/mL)	2,44 x 10^8	31,78	**

Kritična vrijednost *q* kod statističke razine značajnosti 5% ($q_{0,05}$) iznosi 5,628, a kod statističke razine značajnosti 1% ($q_{0,01}$) 7,972. Ako je eksperimentalna *q* vrijednost >5,628razlika je statistički značajna na razini značajnosti 5% (*), a ako je *q* vrijednost >7,972 razlika je statistički značajna na razini značajnosti 1% (**).
ns – nije signifikantno.

Tablica P9. Utjecaj apitoksina na *S. aureus* subsp. *aureus* (DSM 20231) - dvofaktorska analiza varijance (*two way* ANOVA).

Izvor varijabilnosti	Suma kvadrata	Stupnjevi slobode	Varijanca	Test statistika F	*p* vrijednost	*Kritična F vrijednost*
Koncentracija **	$5{,}26 \times 10^{15}$	5	$1{,}05 \times 10^{15}$	60,546	$1{,}26 \times 10^{-10}$	2,773
Biomasa**	$2{,}14 \times 10^{15}$	2	$1{,}07 \times 10^{15}$	61,514	$8{,}99 \times 10^{-9}$	3,555
Interakcija*	$1{,}05 \times 10^{16}$	10	$1{,}05 \times 10^{15}$	60,700	$8{,}77 \times 10^{-12}$	2,412
Unutar grupe	$3{,}13 \times 10^{14}$	18	$1{,}74 \times 10^{13}$			
Ukupno	$1{,}82 \times 10^{16}$	35				

Tablica P10. Utjecaj ozona na *S. aureus* subsp. *aureus* (DSM 20231) – *post hoc* Tukey HSD test.

Usporedba	Apsolutna razlika srednjih vrijednosti	$q_{0,001}$ vrijednost	Razina značajnosti (α=0,01)
10^3 (400,0 µg/mL) - 10^3 (200,0 µg/mL)	0,00	0,00	ns
10^3 (400,0 µg/mL) - 10^3 (100,0 µg/mL)	0,00	0,00	ns
10^3 (400,0 µg/mL) - 10^3 (50,0 µg/mL)	0,00	0,00	ns
10^3 (400,0 µg/ml) - 10^3 (25,0 µg/mL)	0,00	0,00	ns
10^3 (400,0 µg/mL) - 10^3 (12,5 µg/mL)	0,00	0,00	ns
10^3 (400,0 µg/mL) - 10^6 (400,0 µg/mL)	0,00	0,00	ns
10^3 (400,0 µg/mL) - 10^6 (200,0 µg/mL)	0,00	0,00	ns
10^3 (400,0 µg/mL) - 10^6 (100,0 µg/mL)	0,00	0,00	ns
10^3 (400,0 µg/mL) - 10^6 (50,0 µg/mL)	0,00	0,00	ns
10^3 (400,0 µg/mL) - 10^6 (25,0 µg/mL)	$4{,}10 \times 10^5$	0,14	ns
10^3 (400,0 µg/mL) - 10^8 (400,0 µg/mL)	$7{,}50 \times 10^5$	0,25	ns

10^3 (400,0 µg/mL) - 10^8 (200,0 µg/mL)	9,75 x 10^7	33,09	**
10^3 (200,0 µg/mL) - 10^3 (100,0 µg/mL)	0,00	0,00	ns
10^3 (200,0 µg/mL) - 10^3 (50,0 µg/mL)	0,00	0,00	ns
10^3 (200,0 µg/mL) - 10^3 (25,0 µg/mL)	0,00	0,00	ns
10^3 (200,0 µg/mL) - 10^3 (12,5 µg/mL)	0,00	0,00	ns
10^3 (200,0 µg/mL) - 10^6 (400,0 µg/mL)	0,00	0,00	ns
10^3 (200,0 µg/mL) - 10^6 (200,0 µg/mL)	0,00	0,00	ns
10^3 (200,0 µg/mL) - 10^6 (100,0 µg/ml)	0,00	0,00	ns
10^3 (200,0 µg/mL) - 10^6 (50,0 µg/mL)	0,00	0,00	ns
10^3 (200,0 µg/mL) - 10^6 (25,0 µg/mL)	4,10 x 10^5	0,14	ns
10^3 (200,0 µg/mL) - 10^8 (400,0 µg/mL)	7,50 x 10^5	0,25	ns
10^3 (200,0 µg/mL) - 10^8 (200,0 µg/mL)	9,75 x 10^7	33,09	**
10^3 (100,0 µg/mL) - 10^3 (50,0 µg/mL)	0,00	0,00	ns
10^3 (100,0 µg/mL) - 10^3 (25,0 µg/mL)	0,00	0,00	ns
10^3 (100,0 µg/mL) - 10^3 (12,5 µg/mL)	0,00	0,00	ns
10^3 (100,0 µg/mL) - 10^6 (400,0 µg/mL)	0,00	0,00	ns
10^3 (100,0 µg/mL) - 10^6 (200,0 µg/mL)	0,00	0,00	ns
10^3 (100,0 µg/mL) - 10^6 (100,0 µg/mL)	0,00	0,00	ns
10^3 (100,0 µg/mL) - 10^6 (50,0 µg/mL)	0,00	0,00	ns
10^3 (100,0 µg/mL) - 10^6 (25,0 µg/mL)	4,10 x 10^5	0,14	ns
10^3 (100,0 µg/mL) - 10^8 (400,0 µg/mL)	7,50 x 10^5	0,25	ns
10^3 (100,0 µg/mL) - 10^8 (200,0 µg/mL)	9,75 x 10^7	33,09	**

10^3 (50,0 µg/mL) - 10^3 (25,0 µg/mL)	0,00	0,00	ns
10^3 (50,0 µg/mL - 10^3 (12,5 µg/mL)	0,00	0,00	ns
10^3 (50,0 µg/mL) - 10^6 (400,0 µg/mL)	0,00	0,00	ns
10^3 (50,0 µg/mL) - 10^6 (200,0 µg/mL)	0,00	0,00	ns
10^3 (50,0 µg/mL) - 10^6 (100,0 µg/mL)	0,00	0,00	ns
10^3 (50,0 µg/mL) - 10^6 (50,0 µg/mL)	0,00	0,00	ns
10^3 (50,0 µg/mL) - 10^6 (25,0 µg/mL)	$4{,}10 \times 10^5$	0,14	ns
10^3 (50,0 µg/mL) - 10^8 (400,0 µg/mL)	$7{,}50 \times 10^5$	0,25	ns
10^3 (50,0 µg/mL) - 10^8 (200,0 µg/mL)	$9{,}75 \times 10^7$	33,09	**
10^3 (25,0 µg/mL) - 10^3 (12,5 µg/mL)	0,00	0,00	ns
10^3 (25,0 µg/mL) - 10^6 (400,0 µg/mL)	0,00	0,00	ns
10^3 (25,0 µg/mL) - 10^6 (200,0 µg/mL)	0,00	0,00	ns
10^3 (25,0 µg/mL) - 10^6 (100,0 µg/mL)	0,00	0,00	ns
10^3 (25,0 µg/mL) - 10^6 (50,0 µg/mL)	0,00	0,00	ns
10^3 (25,0 µg/mL) - 10^6 (25,0 µg/mL)	$4{,}10 \times 10^5$	0,14	ns
10^3 (25,0 µg/mL) - 10^8 (400,0 µg/mL)	$7{,}50 \times 10^5$	0,25	ns
10^3 (25,0 µg/mL) - 10^8 (200,0 µg/mL)	$9{,}75 \times 10^7$	33,09	**
10^3 (12,5 µg/mL) - 10^6 (400,0 µg/mL)	0,00	0,00	ns
10^3 (12,5 µg/mL) - 10^6 (200,0 µg/mL)	0,00	0,00	ns
10^3 (12,5 µg/mL) - 10^6 (100,0 µg/mL)	0,00	0,00	ns
10^3 (12,5 µg/mL) - 10^6 (50,0 µg/mL)	0,00	0,00	ns

10^3 (12,5 µg/mL) - 10^6 (25,0 µg/mL)	4,10 x 10^5	0,14	ns
10^3 (12,5 µg/mL) - 10^8 (400,0 µg/mL)	7,50 x 10^5	0,25	ns
10^3 (12,5 µg/mL) - 10^8 (200,0 µg/mL)	9,75 x 10^7	33,09	**
10^6 (400,0 µg/mL) -10^6 (200,0 µg/mL)	0,00	0,00	ns
10^6 (400,0 µg/mL) - 10^6 (100,0 µg/mL)	0,00	0,00	ns
10^6 (400,0 µg/mL) - 10^6 (50,0 µg/mL)	0,00	0,00	ns
10^6 (400,0 µg/mL) - 10^6 (25,0 µg/mL)	4,10 x 10^5	0,14	ns
10^6 (400,0 µg/mL) - 10^8 (400,0 µg/mL)	7,50 x 10^5	0,25	ns
10^6 (400,0 µg/mL) - 10^8 (200,0 µg/mL)	9,75 x 10^7	33,09	**
10^6 (200,0 µg/mL) - 10^6 (100,0 µg/mL)	0,00	0,00	ns
10^6 (200,0 µg/mL) - 10^6 (50,0 µg/mL)	0,00	0,00	ns
10^6 (200,0 µg/mL) - 10^6 (25,0 µg/mL)	4,10 x 10^5	0,14	ns
10^6 (200,0 µg/mL) - 10^8 (400,0 µg/mL)	7,50 x 10^5	0,25	ns
10^6 (200,0 µg/mL) - 10^8 (200,0 µg/mL)	9,75 x 10^7	33,09	**
10^6 (100,0 µg/mL) - 10^6 (50,0 µg/mL)	0,00	0,00	ns
10^6 (100,0 µg/mL) - 10^6 (25,0 µg/ml)	4,10 x 10^5	0,14	ns
10^6 (100,0 µg/mL) - 10^8 (400,0 µg/mL)	7,50 x 10^5	0,25	ns
10^6 (100,0 µg/mL) - 10^8 (200,0 µg/mL)	9,75 x 10^7	33,09	**
10^6 (50,0 µg/mL) - 10^6 (25,0 µg/mL)	4,10 x 10^5	0,14	ns
10^6 (50,0 µg/mL) - 10^8 (400,0 µg/mL)	7,50 x 10^5	0,25	ns
10^6 (50,0 µg/mL) - 10^8 (200,0 µg/mL)	9,75 x 10^7	33,09	**
10^6 (25,0 µg/mL) - 10^8 (400,0 µg/mL)	3,40 x 10^5	0,12	ns

10^6 (25,0 µg/mL) - 10^8 (200,0 µg/mL)	9,71 x 10^7	32,95	**
10^8 (400,0 µg/mL) - 10^8 (200,0 µg/mL)	9,68 x 10^7	32,84	**

Kritična vrijednost *q* kod statističke razine značajnosti 5% ($q_{0,05}$) iznosi 5,351, , a kod statističke razine značajnosti 1% ($q_{0,01}$) 6,496. Ako je eksperimentalna *q* vrijednost >5,351 razlika je statistički značajna na razini značajnosti 5% (*), a ako je *q* vrijednost >6,496 razlika je statistički značajna na razini značajnosti 1% (**).
ns – nije signifikantno.

Tablica P11. Utjecaj apitoksina na *B. cereus* (DSM 6791)- dvofaktorska analiza varijance (*two way* ANOVA).

Izvor varijabilnosti	Suma kvadrata	Stupnjevi slobode	Varijanca	Test statistika F	*p* vrijednost	*Kritična F vrijednost*
Koncentracija **	$1{,}26 \times 10^{13}$	1	$1{,}26 \times 10^{13}$	1502,357	$1{,}97 \times 10^{-8}$	5,987
Biomasa**	$1{,}92 \times 10^{13}$	2	$9{,}59 \times 10^{12}$	1144,884	$1{,}79 \times 10^{-8}$	5,143
Interakcija*	$1{,}96 \times 10^{13}$	2	$9{,}78 \times 10^{12}$	1167,732	$1{,}68 \times 10^{-8}$	5,143
Unutar grupe	$5{,}02 \times 10^{10}$	6	$8{,}37 \times 10^{9}$			
Ukupno	$5{,}14 \times 10^{13}$	11				

Tablica P12. Utjecaj apitoksina na *B. cereus* (DSM 6791)u zatvorenom sustavu sustavu – *post hoc* Tukey HSD test.

Usporedba	Apsolutna razlika srednjih vrijednosti	q vrijednost 0,001	Razina značajnosti (α=0,001)
10^3 (25 µg/mL) - 10^3 (12,5 µg/mL)	$4{,}64 \times 10^{5}$	7,16	ns
10^3 (25 µg/mL) -10^6 (25,0 µg/mL)	$4{,}96 \times 10^{5}$	7,66	ns
10^3 (25 µg/mL) - 10^8 (25,0 µg/mL)	$5{,}12 \times 10^{6}$	79,20	**
10^3 (12,5 µg/mL) - 10^6 (25,0 µg/mL)	$3{,}20 \times 10^{4}$	0,49	ns
10^3 (12,5 µg/mL) - 10^8 (25,0 µg/mL)	$5{,}59 \times 10^{6}$	86,36	**
10^6 (25,0 µg/mL) - 10^8 (25,0 µg/mL)	$5{,}62 \times 10^{6}$	86,85	**
10^3 (25 µg/mL) - 10^3 (12,5 µg/mL)	$4{,}64 \times 10^{5}$	7,16	ns
10^3 (25 µg/mL) - 10^6 (25,0 µg/mL)	$4{,}96 \times 10^{5}$	7,66	ns
10^3 (25 µg/mL) - 10^8 (25,0 µg/mL)	$5{,}12 \times 10^{6}$	79,20	**
10^3 (12,5 µg/mL) - 10^6 (25,0 µg/mL)	$3{,}20 \times 10^{4}$	0,49	ns

10^3 (12,5 µg/mL) - 10^8 (25,0 µg/mL)	5,59 x 10^6	86,36	**

Kritična vrijednost *q* kod statističke razine značajnosti 5% ($q_{0,05}$) iznosi 5,628, a kod statističke razine značajnosti 1% ($q_{0,01}$) 7,972. Ako je eksperimentalna *q* vrijednost > 5,628razlika je statistički značajna na razini značajnosti 5% (*), a ako je *q* vrijednost >7,972 razlika je statistički značajna na razini značajnosti 1% (**).
ns – nije signifikantno.

Tablica P13. Utjecaj apitoksina na *E. coli (ATCC 25922)* – dvofaktorska analiza varijance (*two way* ANOVA).

Izvor varijabilnosti	Suma kvadrata	Stupnjevi slobode	Varijanca	Test statistika F	*p* vrijednost	*Kritična F vrijednost*
Koncentracija **	$5{,}95 \times 10^{13}$	5	$1{,}19 \times 10^{13}$	253,313	$5{,}04 \times 10^{16}$	2,773
Biomasa**	$2{,}37 \times 10^{13}$	2	$1{,}19 \times 10^{13}$	252,490	$6{,}78 \times 10^{-14}$	3,555
Interakcija*	$1{,}19 \times 10^{14}$	10	$1{,}19 \times 10^{13}$	253,666	$2{,}98 \times 10^{-17}$	2,412
Unutar grupe	$8{,}45 \times 10^{11}$	18	$4{,}69 \times 10^{10}$			
Ukupno	$2{,}03 \times 10^{14}$	35				

Tablica P14. Utjecaj apitoksina na *E. coli (ATCC 25922) – post hoc* Tukey HSD test.

Usporedba	Apsolutna razlika srednjih vrijednosti	q vrijednost 0,001	Razina značajnosti (α=0,001)
10^3 (50,0 µg/mL) - 10^3 (25,0 µg/mL)	0,00	0,00	ns
10^3 (50,0 µg/mL) - 10^3 (12,5 µg/mL)	$3{,}20 \times 10^3$	0,02	ns
10^3 (50,0 µg/mL) - 10^6 (25,0 µg/mL)	0,00	0,00	ns
10^3 (50,0 µg/mL) - 10^6 (12,5 µg/mL)	$1{,}04 \times 10^7$	67,56	**
10^3 (50,0 µg/mL) - 10^8 (400,0 µg/mL)	$4{,}00 \times 10^4$	0,26	ns
10^3 (25,0 µg/mL) - 10^3 (12,5 µg/mL)	$3{,}20 \times 10^3$	0,02	ns
10^3 (25,0 µg/mL) - 10^6 (25,0 µg/mL)	0,00	0,00	ns
10^3 (25,0 µg/mL) - 10^6 (12,5 µg/mL)	$1{,}04 \times 10^7$	67,56	**
10^3 (25,0 µg/mL) - 10^8 (400,0 µg/mL)	$4{,}00 \times 10^4$	0,26	ns
10^3 (12,5 µg/mL) - 10^6 (25,0 µg/ml)	$3{,}20 \times 10^3$	0,02	ns

10^3 (12,5 µg/mL) - 10^6 (12,5 µg/ml)	1,03 x 10^7	67,54	**
10^3 (12,5 µg/mL) - 10^8 (400,0 µg/mL)	3,68 x 10^4	0,24	ns
10^6 (25,0 µg/mL) - 10^6 (12,5 µg/mL)	1,04 x 10^7	67,56	**
10^6 (25,0 µg/mL) - 10^8 (400,0 µg/mL)	4,00 x 10^4	0,26	ns
10^6 (12,5 µg/mL) - 10^8 (400,0 µg/mL)	1,03 x 10^7	67,29	**

Kritična vrijednost *q* kod statističke razine značajnosti 5% ($q_{0,05}$) iznosi 5,351 , a kod statističke razine značajnosti 1% ($q_{0,01}$) 6,496 . Ako je eksperimentalna *q* vrijednost >5,351 razlika je statistički značajna na razini značajnosti 5% (*), a ako je *q* vrijednost >6,496 razlika je statistički značajna na razini značajnosti 1% (**).
ns – nije signifikantno.

Tablica P15. Utjecaj apitoksina na *Salmonella enterica subsp. enterica* (DSM 14221) – dvofaktorska analiza varijance (*two way* ANOVA).

Izvor varijabilnosti	Suma kvadrata	Stupnjevi slobode	Varijanca	Test statistika F	*p* vrijednost	*Kritična F vrijednost*
Koncentracija **	$8{,}40 \times 10^{17}$	5	$1{,}68 \times 10^{17}$	37,822	$6{,}18 \times 10^{-9}$	2,773
Biomasa**	$3{,}36 \times 10^{17}$	2	$1{,}68 \times 10^{17}$	37,821	$3{,}58 \times 10^{-7}$	3,555
Interakcija*	$1{,}68 \times 10^{18}$	10	$1{,}68 \times 10^{17}$	37,823	$4{,}99 \times 10^{-10}$	2,412
Unutar grupe	$8{,}00 \times 10^{16}$	18	$4{,}44 \times 10^{15}$			
Ukupno	$2{,}94 \times 10^{18}$	35				

Tablica P16. Utjecaj apitoksina na *Salmonella enterica subsp. enterica* (DSM 14221) – *post hoc* Tukey HSD test .

Usporedba	Apsolutna razlika srednjih vrijednosti	q vrijednost 0,001	Razina značajnosti (α=0,01)
10^3 (25,0 µg/mL) - 10^3 (12,5 µg/ml)	$1{,}50 \times 10^{2}$	0,00	ns
10^3 (25,0 µg/mL) - 10^6 (50,0 µg/ml)	0,00	0,00	ns
10^3 (25,0 µg/mL) - 10^6 (25,0 g/mL)	$1{,}23 \times 10^{9}$	26,09	**
10^3 (25,0 µg/ml) - 10^8 (400,0 µg/mL)	$4{,}65 \times 10^{4}$	0,00	ns
10^3 (25,0 µg/mL) - 10^8 (200,0 µg/mL)	$5{,}35 \times 10^{3}$	0,00	ns
10^3 (12,5 µg/mL) - 10^6 (50,0 µg/mL)	$1{,}50 \times 10^{2}$	0,00	ns
10^3 (12,5 µg/mL) - 10^6 (25,0 µg/mL)	$1{,}23 \times 10^{9}$	26,09	**
10^3 (12,5 µg/mL) - 10^8 (400,0 µg/mL)	$4{,}64 \times 10^{4}$	0,00	ns
10^3 (12,5 µg/mL) - 10^8 (200,0 µg/mL)	$5{,}20 \times 10^{3}$	0,00	ns

10^6 (50,0 µg/mL) - 10^6 (25,0 µg/ml)	1,23 x 10^9	26,09	**
10^6 (50,0 µg/mL) - 10^8 (400,0 µg/mL)	4,65 x 10^4	0,00	ns
10^6 (50,0 µg/mL) - 10^8 (200,0 µg/mL)	5,35 x 10^3	0,00	ns
10^6 (25,0 µg/mL) - 10^8 (400,0 µg/mL)	1,23 x 10^9	26,09	**
10^6 (25,0 µg/mL) - 10^8 (200,0 µg/mL)	1,23 x 10^9	26,09	**
10^8 (400,0 µg/mL) - 10^8 (200,0 µg/mL)	4,12 x 10^4	0,00	ns

Kritična vrijednost *q* kod statističke razine značajnosti 5% ($q_{0,05}$) iznosi 5,351 , a kod statističke razine značajnosti 1% ($q_{0,01}$) 6,496 . Ako je eksperimentalna *q* vrijednost >5,351 razlika je statistički značajna na razini značajnosti 5% (*), a ako je *q* vrijednost >6,496 razlika je statistički značajna na razini značajnosti 1% (**).
ns – nije signifikantno.