Antimikrobni potencijal meda iz Republike Hrvatske

Kovač, Ana-Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:178:145525

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Veterinary Medicine - Repository of PHD, master's thesis

zir.nsk.hr

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET

ANA MARIJA KOVAČ

Antimikrobni potencijal meda iz Republike Hrvatske

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2017.

Sveučilište u Zagrebu

Veterinarski fakultet

Zavod za biologiju i patologiju riba i pčela

PREDSTOJNICA:

Izv. prof. dr. sc. Ivana Tlak Gajger

MENTORICE:

Izv. prof. dr. sc. Ivana Tlak Gajger

Dr. sc. Josipa Vlainić

Članovi povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. Izv. prof. dr. dc. Emil Gjurčević
2. Dr. sc. Josipa Vlainić, Institut Ruđer Bošković
3. Izv. prof. dr. sc. Ivana Tlak Gajger

Zahvale

Posebnu zahvalu dugujem svojim mentoricama, izv. prof. dr. sc. Ivani Tlak Gajger i dr. sc. Josipi Vlainić, na ukazanom povjerenju, strpljenju i savjetima prilikom izrade ovog diplomskog rada, kao i na velikoj podršci tijekom studiranja.

Također, zahvaljujem se svim djelatnicima Veterinrskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a naročito djelatnicima Zavoda za biologiju i patologiju riba i pčela.

Veliku zahvalnost iskazujem cijeloj svojoj obitelji, napose roditeljima, koji su mi omogućili studiranje i svojom ga potporom olakšali.

Naposljetku, najveću zaslugu za ono što sam postigla pripisujem dedi Ivecu i baki Gabri, koji su me od malih nogu usmjeravali na pravi put te mojem Filipu, koji me je svojom bezuvjetnom ljubavlju gurao naprijed.

Hvala.

Rad je izrađen na Zavodu za biologiju i patologiju riba i pčela Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te na Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu.

SAŽETAK

1. UVOD 1

2. PODACI IZ LITERATURE 4

2.1. Med 4

2.2. Sastav meda 5

2.3. Medonosne biljke primorske Hrvatske 7

2.3.1. Planika (*Arbutus unedo* L.) 7

2.3.2. Mandarina (*Citrus unshiu* Marc.) 7

2.3.3. Vrijes (*Erica*) 8

2.4. Medonosne biljke kontinentalne Hrvatske 8

2.4.1. Pitomi kesten (*Castanea sativa* Mill.) 8

2.5. Patogeni korišteni u istraživanju 8

2.5.1. Bakterija *Escherichia coli* 8

2.5.2. Bakterija *Staphylococcus aureus* 9

2.5.3. Bakterija *Helicobacter pylori* 9

2.5.4. Bakterija *Mycobacterium fortuitum* 10

2.5.5. Gljivica *Candida albicans* 10

3. MATERIJAL I METODE 11

3.1. Uzorkovanje 11

3.1.1. Melisopalinološka analiza uzoraka meda 11

3.2. Odabir patogenih mikroorganizama i određivanje gustoće bakterijske suspenzije 12

3.3. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije meda 13

3.4. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola 14

3.5. Spektrofotometrijsko određivanje flavonoida 14

3.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti uzoraka meda 15

3.6.1. Metoda sa željezo(III)-tripiridiltirazin (Fe3+-TPTZ) kompleksom - FRAP metoda 15

3.6.2. Metoda gašenja DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikala 15

3.7. Statistička analiza 16

4. REZULTATI 17

4.1. Antimikrobni učinci istraživanih uzoraka meda na bakteriju *E. coli* 17

4.2. Antimikrobni učinci istraživanih uzoraka meda na bakteriju *S. aureus* 18

4.3. Antimikrobni učinci istraživanih uzoraka meda na bakteriju *H. pylori* 21

4.4. Antimikrobni učinci istraživanih uzoraka meda na bakteriju *M. fortuitum* 21

4.5. Antimikrobni učinci istraživanih uzoraka meda na gljivicu *C. albicans* 22

4.6. Ukupni fenoli u istraživanim uzorcima meda 23

4.7. Količina flavonoida u uzorcima meda 24

4.8. Antioksidacijska aktivnost meda 25

4.8.1. Antioksidacijska aktivnost uzoraka meda određena FRAP metodom 25

4.8.2. Antioksidacijska aktivnost uzoraka meda određena metodom gašenja DPPH radikala 26

5. RASPRAVA 27

6. ZAKLJUČCI 31

7. LITERATURA 32

8. SAŽETAK 36

9. SUMMARY 37

10. ŽIVOTOPIS 38

Popis slika i tablica

Slika 1. Minimalna inhibitorna koncentracija istraživanih uzoraka meda na bakteriju *E. coli* (inhibiran rast više od 80 % bakterija).

Slika 2. Minimalna inhibitorna koncentracija istraživanih uzoraka meda na bakteriju *E. coli* (inhibiran rast više od 50 % bakterija).

Slika 3. Minimalna inhibitorna koncentracija istraživanih uzoraka meda na bakteriju *S. aureus* (inhibiran rast više od 80 % bakterija).

Slika 4. Minimalna inhibitorna koncentracija istraživanih uzoraka meda na bakteriju *S. aureus* (inhibiran rast više od 50 % bakterija).

Slika 5. Mikrotitracijska pločica s dvostrukim serijskim razrjeđenjima meda te bakterijskom suspenzijom *S.aureus,* nakon inkubacije.

Slika 6. Minimalna inhibitorna koncentracija istraživanih uzoraka meda na bakteriju *M. fortuitum* (inhibiran rast više od 80 % bakterija).

Slika 7. Minimalna inhibitorna koncentracija istraživanih uzoraka meda na gljivicu *C. albicans* (inhibiran rast više od 80 % gljivica).

Slika 8. Ukupni fenoli u uzorcima meda određeni Folin-Ciocalteu metodom.

Slika 9. Količina flavonoida u uzorcima meda, određena kolorimetrijski, s $AlCl_3$.

Slika 10. Antioksidacijska aktivnost meda određena FRAP metodom.

Slika 11. Antioksidacijska aktivnost meda određena metodom gašenja DPPH radikala.

Tablica 1. Botaničko i geografsko podrijetlo istraživanih uzoraka meda.

Tablica 2. Vrijednost standarda na McFarland skali.

1. UVOD

Najraniji zapis čovjekovog zanimanja za med seže iz doba paleolitika (TONSLEY, 1969.). Sakupljajući hranu, u šupljinama drveća i stijena, čovjek je otkrio pčele i med (BELČIĆ i sur., 1985.; RELIĆ, 2006.). Med je proizvod kojeg izrađuju medonosne pčele (*Apis mellifera*), sakupljajući sokove nektarija i/ili druge slatke sokove te dodajući enzim invertazu. Sadrži primarno monosaharide, fruktozu (38%) i glukozu (31%), više od 180 različitih spojeva i elemenata, uključujući minerale, bjelančevine, slobodne aminokiseline, organske kiseline, fitokemikalije, enzime i vitamine (ALVAREZ-SUAREZ i sur., 2013.).

Godinama se, u mnogim kulturama i civilizacijama, med koristio kao hrana, prirodni zaslađivač i konzervans (LAKTIĆ i ŠEKULJA, 2008.). Osim navedenog, poznato je i ljekovito djelovanje meda kod različitih bolesti i poremećaja općeg stanja, naročito tegoba želučano-crijevnog sustava (STOMAFAY-STITZ, 1960.; ZUMLA i LULAT, 1989.; KWAKMAN i ZAAT, 2012.). Rezultati brojnih istraživanja pokazuju da med posjeduje antimikrobna svojstva, na način da uništava i/ili inhibira rast patogenih mikroorganizama (MOLAN, 1992.a,b; BALTRUŠAITYTE i sur., 2007.). Pritom, antimikrobnoj učinkovitosti doprinose prvenstveno kiselost u kombinaciji s enzimatskim djelovanjem vodikovog peroksida te osmolarnost (DUSTMANN, 1979.; MOLAN, 1992.a; IRISH i sur., 2011.). Novija istraživanja pokazuju kako i drugi sastavni dijelovi meda značajno pridonose antimikrobnoj učinkovitosti, naročito polifenoli, koji zaštitno djeluju na sluznicu želuca te posjeduju izrazito protutumorsko i antivirusno djelovanje (NARAYANA i sur., 2001.). Antimikrobna učinkovitost pojedinih vrsta meda ovisi i o njegovom botaničkom podrijetlu. Nadalje, geografska lokacija, okolišni čimbenici te zdravlje pčelinje zajednice mogu utjecati na razinu i aktivnost glukoza-oksidaze, enzima odgovornog za stvaranje vodikovog peroksida (IRISH i sur., 2011.).

Različite vrste meda mogu s različitom učinkovitošću inhibitorno djelovati na rast mnogobrojnih mikroorganizama koji uzrokuju bolesti i infekcije ljudi i/ili životinja. Budući da je za niz patogenih bakterija (*Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Helicobacter pylori, Mycobacterium fortuitum)* (NAGLIĆ i sur., 2005.; TALARO, 2005.) i neke gljivice (*Candida albicans*) (NAGLIĆ i sur., 2005.), zbog višekratno ponavljane ili česte uporabe kemoterapeutika i antibiotika u liječenju, utvrđena rezistencija, sve više se razvija i primjenjuje tzv. alternativna medicina. Ista obuhvaća i apiterapiju, koja podrazumijeva uporabu pčelinjih proizvoda, primarno meda, u liječenju različitih infekcija. Inhibicijska

djelotvornost meda od planike (*Arbutus unedo* L.), mandarine (*Citrus unshiu* Marc.), vrijesa (*Erica* sp.) i pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.), iz Hrvatske, na umnažanje gore navedenih mikroorganizma dosad nije istraživana. Antimikrobna svojstva meda su općenito malo istražena, a nedovoljno znanje o sastojcima i čimbenicima, nositeljima takvog učinka, predstavlja glavni problem moguće kliničke primjene meda u terapiji određenih infekcija. Nužno je istraživanja ovakvog tipa provoditi tijekom više uzastopnih godina i na velikom broju uzoraka meda različitog botaničkog sastava, kako bi se točnije odredila djelotvornost pojedinih vrsta meda te u konačnici odredio med medicinskog razreda u okviru mednih sorti u Republici Hrvatskoj, kao što je, primjerice, učinjeno u Australiji (manuka med).

Postoje značajne razlike u antimikrobnoj aktivnosti pojedinih vrsta meda. Dapače, utvrđeno je da med iste vrste, ali drugačijeg geografskog podrijetla, također pokazuje očite razlike u antimikrobnoj učinkovitosti. Rezultati dosadašnjih istraživanja pokazali su kako visoka koncentracija šećera, vodikov peroksid, niski pH te flavonoidi, metilglioksal i protein pčelinji defenzin-1, predstavljaju važne antimikrobne sastojke meda (MOLAN, 1992.a; ALVAREZ-SUAREZ i sur., 2013.). Visoki udio šećera čini med prezasićenom otopinom. Šećeri i voda međusobno reagiraju, pa za život mikroorganizama ostaje malo slobodnih molekula vode. Visoki sadržaj šećera u medu i niski sadržaj vode izazivaju osmozu te voda iz mikroorganizama izlazi u med. Kiselost meda (pH), koja iznosi 3,2 do 4,5, djeluje inhibitorno na veliki broj patogenih mikroorganizama, budući im za rast i umnažanje više odgovaraju lužnate sredine. Također, vodikov peroksid, koji nastaje u medu enzimatskim procesima, toksičan je za veliki broj uzročnika infekcija u ljudi i životinja. S obzirom da pojedini patogeni mikroorganizmi, česti uzročnici infekcija i onečišćenja hrane, nakon česte i dugotrajne primjene mogu razviti rezistenciju na određene antimikrobne pripravke, upotreba alternativnih metoda liječenja postaje nužnost. Između ostalog, primjena potvrđeno djelotvornih vrsta meda.

Zbog nedovoljnog poznavanja sastava meda i varijabilnosti rezultata pojedinih istraživanja, utvrđivanje antimikrobne djelotvornosti meda, različitog geografskog i botaničkog podrijetla, izuzetno je važno kako bi se sustavno pratila antimikrobna učinkovitost, sa svrhom primjene meda u terapijske svrhe.

Stoga je cilj ovog istraživanja odrediti minimalne inhibitorne koncentracije 14 uzoraka meda, različitog botaničkog podrijetla, skupljenih na području južne Dalmacije i kontinentalnog dijela Republike Hrvatske. Istraženi su med planike, mandarine, vrijesa i pitomog kestena. Patogeni mikroorganizmi na kojima je istražena antimikrobna djelotvornost meda su bakterije *E. coli, S. aureus, M. fortuitum* i *H. pylori,* te gljivica *C. albicans.* Kako bi se što bolje razjasnila utvrđena učinkovitost pojedinih istraživanih uzoraka meda, potrebno je utvrditi i vrijednosti ukupnih fenola, flavonoida te antioksidacijsku aktivnost.

2. PODACI IZ LITERATURE

2.1. Med

Sukladno Pravilniku o medu (Narodne novine, 93/2009), med je sladak, gust, viskozan, tekući ili kristaliziran proizvod što ga proizvode medonosne pčele (*Apis mellifera*) od nektara medonosnih biljaka ili sekreta živih dijelova biljaka ili izlučevina kukaca koji sišu na živim dijelovima biljaka, koje pčele sakupljaju, dodaju mu vlastite specifične tvari, izdvajaju vodu i odlažu u stanice saća do sazrijevanja (ANON, 2009.). Ustroj pčelinje zajednice od iznimne je važnosti za proizvodnju pčelinjih proizvoda. U pčelinjoj zajednici razlikujemo radilice, trutove te maticu. Upravo su radilice zadužene za sakupljanje nektara, peluda, propolisa te vode. One pomoću rilca sišu nektar iz žlijezda nektarija medonosnog bilja, privremeno ga smještaju u medni mjehur i, nakon vraćanja u košnicu, izručuju ga mladim pčelama, koje ga raznose po saću (BELČIĆ i SULIMANOVIĆ, 1982.; BELČIĆ i sur., 1985.). Proizvodnja meda započinje predajom nektara pčela sabiračica kućnim pčelama, s rilca na rilce, prilikom čega pčele izlučuju enzim invertazu (razgrađuje saharozu na jednostavne šećere). Tijekom pretvorbe u med, pčele nektar obogaćuju organskim kiselinama, vitaminima, bjelančevinama, aminokiselinama i drugim tvarima (LAKTIĆ i ŠEKULJA, 2008.). Kada iz nezrelog meda, koji se nalazi u saću, ispari višak vode (preostane 18-20 %), pčele isti poklope voštanim poklopcima te se takav med naziva zrelim medom (BELČIĆ i SULIMANOVIĆ, 1982.; BELČIĆ i sur., 1985.).

Cvjetni ili nektarni med potječe od cvjetova raznih biljaka, a u manjem dijelu od izvancvjetnih nektarija. Nektarije su posebne žlijezde biljaka koje luče slatku tekućinu, nektar. Različite biljke sadrže različite koncentracije šećera u nektaru. U nektaru se, pored složenih šećera, nalaze i jednostavni šećeri, glukoza i fruktoza (BELČIĆ i sur., 1985.; BUČAR, 2008.; LAKTIĆ i ŠEKULJA, 2008.). Botaničko i geografsko podrijetlo meda određuje se na osnovu rezultata melisopalinološke analize. Cvjetni med može biti pretežno od jedne (monoflorni med) ili više vrsta biljaka (poliflorni med) (KATALINIĆ, 1990.; LAKTIĆ i ŠEKULJA, 2008.). Sukladno Pravilniku o kakvoći uniflornog meda (Narodne novine, 122/2009), med se može označiti prema određenoj biljnoj vrsti, ako u netopljivom sedimentu sadrži najmanje 45% peludnih zrnaca iste biljne vrste, uz iznimke za med pitomog kestena (*C. Sativa* Mill.), gdje je potrebno izbrojati 85%, odnosno za med vrijeska (*S. montana* L.) 20%

peludnih zrnaca, a za med planike (*A. unedo* L.) i agruma (*Citrus* spp.) samo 10% peludnih zrnaca u netopivom sedimentu (ANON, 2009.).

2.2. Sastav meda

Sastav meda je iznimno promjenjiv i primarno ovisi o botaničkom podrijetlu, no istodobno i o sastavu tla na kojem je rasla medonosna biljka, vlazi zraka, temperaturi i procesu zrenja meda. Pojedine tvari u medu potječu od medonosne biljke, neke od njih dodaju pčele, dok određene nastaju tijekom zrenja meda u saću (KRELL, 1996.). Glavnu karakteristiku medu daje šećer, zatim voda, a sastavni dijelovi koji se nalaze u malim količinama, odlučni su za razlike između pojedinih vrsta meda (BELČIĆ i sur., 1985.).

Oko 80 % meda čine ugljikohidrati, što med čini prezasićenom otopinom šećera. Med je koncentrirana otopina fruktoze (voćnog šećera), koje ima oko 40%, zatim glukoze (grožđanog šećera), koje ima oko 34%, te saharoze (običnog šećera), koje ima najmanje (oko 3%). Navedeni omjeri šećera su promjenjivi i ovise o vrsti paše, ali i o enzimu invertazi (BELČIĆ i sur., 1985.; LAKTIĆ i ŠEKULJA, 2008.). Enzim invertaza nastavlja svoje djelovanje u medu i poslije vrenja, pa shodno tome, med stajanjem zori, odnosno posjeduje sve manje složenog šećera (BELČIĆ i sur., 1985.).

Jedna od najvažnijih sastavnica meda je voda, budući izravno utječe na njegovu kvalitetu, granulaciju i održivost. Količina vode u medu iznosi 15 do 23%, a ovisi o vremenu sakupljanja meda, vlažnosti, temperaturi te jačini pčelinje zajednice. Budući je med higroskopan, količina vode je promjenjiva, ovisno o vlazi zraka te načinu čuvanja. S obzirom da fruktoza jače veže vodu nego glukoza i saharoza, može se pretpostaviti da je sposobnost fruktoze da veže vodu glavni uzrok higroskopnosti meda. Postotak vode u medu moguće je ustanoviti pomoću refraktometra, mjereći indeks refrakcije. Kontrola količine vode od iznimne je važnosti, jer veći postotak može izazvati vrenje meda i njegovu neupotrebljivost (LAKTIĆ i ŠEKULJA, 2008.).

Enzimi u medu imaju važnu ulogu pri stvaranju meda iz raznih vrsta nektara. Predominantni enzimi meda su invertaza, dijastaza (amilaza), katalaza i kisela fosfataza. Dijastaza, enzim koji ima veliko značenje za kontrolu kvalitete meda, osjetljiva je na više temperature. Kao pokazatelj dijastaze koriste se jedinice po Gotheu, a kvalitetan med mora imati 8 navedenih jedinica (LAKTIĆ i ŠEKULJA, 2008.).

Udio mineralnih tvari u medu iznimno je malen (do 1%), a ovisi o izvoru i jakosti paše te kemijskom sastavu tla na kojem raste medonosna biljka (TUCAK i sur., 1999.; LAKTIĆ i ŠEKULJA, 2008.). U medu prevladavaju natrij, kalcij, sumpor, fosfor, kalij, željezo, magnezij i aluminij, dok su u malim količinama prisutni krom, mangan, bakar, arsen i selen. Tamnije vrste meda bogatije su mineralnim tvarima te pretežno sadrže kalcij, magnezij, fosfor i aluminij, dok su kod svjetlijih najzastupljeniji kalij, natrij, silicij, fosfor i kalcij (TUCAK i sur., 1999.).

U medu se nalazi vrlo mala količina bjelančevina i aminokiselina (0-1,67%). Izvor bjelančevina je pelud, ali i same pčele (LAKTIĆ i ŠEKULJA, 2008.).

Također, u medu se, u malim količinama, nalaze organske kiseline, prosječno 0,57%. Prisutne su glukonska, mravlja, oksalna, jantarna, limunska, vinska, mliječna, maslačna, maleinska, piroglutaminska, valerijanska i benzojeva kiselina. Najzastupljenija, glukonska kiselina, u medu nastaje iz glukoze djelovanjem enzima glukoza-oksidaze. Ukupna kiselost (pH) je važan pokazatelj kakvoće meda, zbog povezanosti udjela kiselina s fermentacijskim procesima, okusom i mirisom te baktericidnim svojstvima. Općenito gledano, tamniji medovi imaju veću kiselost.

Fitokemikalije u medu potječu iz biljaka s kojih su pčele skupljale nektar ili mednu rosu, te mogu povoljno utjecati na brojne procese u organizmu. Neke fitokemikalije u medu djeluju kao antioksidansi te smanjuju rizik od oksidativnih oštećenja stanica nastalih djelovanjem slobodnih radikala, koji nastaju kao nusprodukti pretvorbe kisika. Nadalje, antioksidansi u medu sprječavaju kvarenje uzrokovano oksidativnim promjenama uslijed djelovanja svjetlosti, topline i nekih metala.

Flavonoidi koji se najčešće nalaze u medu su pinocembrin, apigenin, kamferol, kvercetin, galangin, krisin, pinobanksin, luteolin i hesperitin. Osim antioksidativnog učinka, flavonoidi djeluju antimikrobno, inhibiraju razne enzime, te imaju citotoksično i protutumorsko djelovanje (JAZVINŠĆAK JEMBREK i sur., 2012.).

2.3. Medonosne biljke primorske Hrvatske

2.3.1. Planika (*Arbutus unedo* L.)

Planika je zimzeleno drvo, visine do 6 metara. Rasprostranjena je u zemljama Sredozemlja, dok u Republici Hrvatskoj raste na dalmatinskim otocima. Cvjetovi su bjeličasti, zvonolikog oblika, zbijeni u obješenim cvatima. Planika cvate u listopadu, studenom i prosincu. Daje dosta nektara i nešto peluda, a predstavlja najkasniju pašu u našoj zemlji. Uslijed mogućeg naglog zahlađenja u vrijeme cvata, nektar može ostati neprerađen, pa se nezreli med ponekad pokvari. Med planike je žut, gorkog okusa (BELČIĆ i sur., 1985.; UMELJIĆ, 2008.).

2.3.2. Mandarina (*Citrus unshiu* Marc.)

Mandarina je vazdazelena biljna vrsta, čiji se cvijet razvija iz cvjetnih pupova koji se mogu nalaziti u pazušcu lista ili na vrhu izboja, pojedinačno ili u gronji, bijeli s brojnim prašnicima. Cvatnja obično počinje u prvim danima svibnja, pri srednjim dnevnim temperaturama zraka i traje 16-18 dana, dok pri nižim temperaturama cvatnja započinje kasnije i traje duže. Najveće izlučivanje nektara je pri temperaturi od 28 °C i 96 % relativne vlažnosti zraka. Nagli prestanak medenja uzrokuju vrući, suhi vjetrovi ili prejako djelovanje sunca na same cvatove. Ukoliko se vrijeme cvatnje odvija u povoljnim klimatskim uvjetima, prinos meda po pčelinjoj zajednici može iznositi i do 30 kilograma. U povoljnim godinama, mandarina izlučuje velike količine nektara, pa se ubraja među najmedonosnije biljne vrste. Zbog svojih senzorskih svojstava, med od agruma vrlo je tražen. Čisti med od mandarine, bez udjela nektara drugih biljnih vrsta, u tekućem stanju je svijetložute do narančastosmeđe boje, intenzivnog mirisa (MRAVAK, 2013.).

2.3.3. Vrijes (*Erica*)

Rod vrijesova odlikuje se mnogim vrstama, koje su raširene na području Sredozemlja. U Hrvatskoj su najpoznatije četiri vrste: proljetna crnuša (*E. carenea* L.), vrijes mnogocvjetni (*E. multiflorea* L.), manji vrijes (*E. verticilata* L.) i veliki drveni vrijes (*E. arborea* L.), koji rastu pretežno na otocima, poluotoku Pelješcu te u okolici Dubrovnika. Mnogocvjetni vrijes cvjeta u jesen bjelkastim ili ljubičastim cvjetovima. U povoljnim uvjetima daje 40 do 50 kg meda po košnici. Veliki drveni vrijes cvjeta od siječnja do travnja. Iako je gotovo bez peluda, daje nektar. Manji vrijes cvjeta od listopada do studenog. Med svih vrsta vrijesa je približno jednak, tamnožut, mutnog izgleda, gorkog okusa te brzo kristalizira (BELČIĆ i sur., 1985.; LAKTIĆ i ŠEKULJA, 2008.).

2.4. Medonosne biljke kontinentalne Hrvatske

2.4.1. Pitomi kesten (*Castanea sativa* Mill.)

Pitomi kesten raste na kiselim staništima. Prašnički cvjetovi su dugačke bijele rese. Cvjeta u lipnju, pojedino stablo cvjeta deset dana, a kako sva stabla ne počnu cvasti u isto vrijeme, cvjetanje se produži do 20 dana. Medenje pitomog kestena najviše ovisi o vremenu, no zbog izuzetno mnogo peluda, pčele zatrpaju košnice peludom kao ni na jednoj drugoj paši. Dnevni prinosi meda mogu se kretati najviše do 5 kg. Med je svijetlosmeđe boje, jakog i oštrog mirisa te gorkastog okusa (BELČIĆ i sur., 1985.; BUČAR, 2008.; LAKTIĆ i ŠEKULJA, 2008.; UMELJIĆ, 2008.).

2.5. Patogeni korišteni u istraživanju

2.5.1. Bakterija *Escherichia coli*

E. coli je gram-negativna, štapićasta bakterija koja ne tvori spore. Veliki broj sojeva ima dobro razvijenu kapsulu ili posjeduje mikrokapsulu. Ubraja se u fakultativno anaerobne bakterije. Svi sojevi navedene bakterije tvore endotoksine, dok neki mogu tvoriti egzotoksine, koji imaju važnu ulogu u patogenezi bolesti. Ubikvitarna je bakterija, koja uobičajeno obitava u debelom crijevu i završnom dijelu tankog crijeva sisavaca te izmetinama u velikom broju

dospijeva u okoliš, gdje tjednima i mjesecima posjeduje mogućnost opstanka. U određenim uvjetima uzrokuje infekcije (kolibaciloze). Osjetljiva je prema različitim antibioticima i terapeuticima, no zbog česte uporabe istih u liječenju, lako razvija rezistenciju (NAGLIĆ i sur., 2005.). Najčešći izvor infekcije predstavljaju inficirana hrana, voda te nedovoljno termički obrađeno govođe meso (TALARO, 2005.).

2.5.2. Bakterija *Staphylococcus aureus*

S. aureus je gram-pozitivna, nepokretna, nesporogena i fakultativno anaerobna bakterija, kuglastog oblika. Osobito je rasprostranjena na koži i sluznicama te se ubraja među najotpornije nesporogene bakterije. Uvjetno je patogena bakterija, a infekcije mogu zahvatiti različite organske sustave te su obično gnojne naravi. Tvori brojne enzime i toksine, koji bitno utječu na virulenciju pojedinih sojeva. Dapače, neki sojevi tvore enterotoksine, uzrokujući u ljudi alimentarne intoksikacije, koje se očituju akutnim enteritisom s povraćanjem i proljevom. Hrana koja sadrži znatne količine ugljikohidrata neprikladnim držanjem postaje pogodan medij za razmnožavanje stafilokoka i nastanak toksina. Sekundarna stafilokokna infekcija posebno je učestala nakon ranjavanja i kirurških zahvata, te virusnih i nekih drugih bolesti (NAGLIĆ i sur., 2005.).

2.5.3. Bakterija *Helicobacter pylori*

H. pylori je gram-negativna, mikroaerofilna, pokretna bakterija, zavojitog oblika. Teško se uzgaja na umjetnim hranjivim podlogama. Izolirana je u ljudi oboljelih od aktivnog kroničnog gastritisa i želučanog ili duodenalnog čira (vrijeda). Posebno zabrinjava podudarnost nalaza dotične bakterije s nalazom karcinoma želuca i malignih limfoma (MALT limfoma). Uzročnik se od inficirane na neinficiranu osobu prenosi pretežo izravnim kontaktom, oralno-oralnim ili fekalno-oralnim putem, a može preživjeti u kiselom pH želuca te jednom uspostavljena infekcija traje cijeloga života. Patogenost ovisi o aktivnosti ureaze, pokretljivosti, površinskim adhezinima i tvorbi tvari bjelančevinaste građe, od kojih neke djeluju kao enzimi. Posebnu važnost s epidemiološkog stajališta treba pridati nalazu bakterije

H. pylori u kućnih ljubimaca, naročito mačaka te potencijanoj infekciji držatelja inficiranih životinja (NAGLIĆ i sur., 2005.).

2.5.4. Bakterija *Mycobacterium fortuitum*

M. fortuitum nema kapsulu, nesporogena je i nepokretna, aerobna bakterija. Spada u brzorastuće mikobakterije (RGM; eng. *rapidly growing mycobacteria*) i uobičajeno stvara kolonije unutar sedam dana od početka inkubacije. Brzorastuće mikobakterije uzrokuju infekcije kože i rane te bronhopulmonalne infekcije, a ujedno mogu dovesti do bakterijemije, limfadenitisa te endokarditisa (HAN i sur., 2007.).

2.5.5. Gljivica *Candida albicans*

C. albicans je ubikvitarna, kvascima slična gljivica, koja se redovito nalazi na koži i sluznicama ljudi i životinja, a također obitava u tlu, bilju te vodi. U kulturi i tkivu nalazi se u obliku blastospora, koje se pupanjem izdužuju, a nastaju tvorevine, pseudohife. Za rast su potrebni aerobni uvjeti te hranjiva podloga sa cikloheksimidom (aktidionom). Dio je normalne mikroflore, a razmnožavanju pogoduje dugotrajna uporaba antibiotika, poremećena stanična imunosna otpornost te ozljede kože i sluznica. Patogenost ovisi o tvorbi adhezina, proteaza i fosfataza, glikoproteina kao i ostalim faktorima virulencije. Bolest izazvana navedenom gljivicom (kandidijaza) zahvaća sluznice probavnog i mokraćno-spolnog sustava, s mogućnošću hematogenog širenja. Otpornost prema pojedinim antimikotičkim pripravcima sve je učestalija, posebno u sojeva izdvojenih iz ljudi (NAGLIĆ i sur., 2005.).

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Uzorkovanje

Istraženo je 14 uzoraka meda skupljenih od pčelara prilikom vrcanja, a nakon homogenizacije, tijekom aktivne pčelarske sezone 2013. godine. Uzorkovani med pohranjen je u sterilne staklene posude i spremljen na hladno i mračno mjesto, do početka istraživanja.

Tablica 1. Botaničko i geografsko podrijetlo istraživanih uzoraka meda.

Uzorak meda	***Botaničko podrijetlo***	***Geografsko podrijetlo***
Planika A	*Arbutus unedo* L.	Brač
Planika B		Konavle
Planika C		Pelješac
Vrijes A	*Erica* sp.	Mokošica
Vrijes B		Konavle
Vrijes C		Dubrovačko primorje
Mandarina A	*Citrus unshiu* Marc.	Opuzen A
Mandarina B		Opuzen B
Mandarina C		Opuzen C
Mandarina D		Opuzen D
Mandarina E		Opuzen E
Kesten A	*Castanea sativa* Mill	Gospić
Kesten B		Banovina
Kesten C		Ozalj

3.1.1. Melisopalinološka analiza uzoraka meda

Melisopalinološkom analizom potvrđuje se botaničko podrijetlo meda, a zasniva se na kvalitativnoj mikroskopskoj analizi i određivanju količine peludnih zrnaca pojedine biljke (LOUVEAUX i sur., 1978.). Prilikom izrade preparata uzimano je 10 g dobro izmiješanog meda svakog pojedinačnog uzorka te potom otopljeno u 20 mL destilirane vode. Uzorci su zagrijavani u vodenoj kupelji (45 °C, 15 min.) i centrifugirani (3500 okretaja/min., 15 min.), a talog je prenesen na predmetno stakalce i ravnomjerno razmazan. Od svakog prikupljenog uzorka pripremljena su tri mikroskopska preparata, koji su pretraženi pomoću svjetlosnog

mikroskopa (povećanje 400×). Vrsta i broj peludnih zrnaca utvrđena je metodom prema BUCHERU i suradnicima (2004.) te usporedbom s referentnim preparatima.

3.2. Odabir patogenih mikroorganizama i određivanje gustoće bakterijske suspenzije

Za istraživanje su odabrane četiri bakterije te jedna gljivica, česti uzročnici infekcija: gram-negativne bakterije *E. coli* (ATCC 10536) i *H. pylori* (klinički izolat), gram-pozitivna bakterija *S. aureus* (ATCC 6538), acidoalkoholorezistentna bakterija *M. fortuitum* (MFBF), te gljivica *C. albicans* (ATCC 90028). Gustoća bakterijskih suspenzija određena je prema McFarland standardu (Tablica 2.).

Tablica 2. Vrijednost standarda na McFarland skali.

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

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

[2]Vrijednosti odgovaraju optičkoj gustoći bakterijske suspenzije

Umjetni med služio je kao kontrola, s obzirom da osnovne šećerne komponente interferiraju u pojedinim testovima i daju lažno pozitivne, odnosno, lažno negativne rezultate. Umjetni med je pripravljen otapanjem saharoze (1,5 g), maltoze (7,5 g), fruktoze (40,5 g) i glukoze (33,5 g) u 17 mL deionizirane, sterilne vode (COOPER i sur., 2002.).

3.3. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije meda

Med je odvagan te otopljen u redestiliranoj vodi u omjeru 1:1 (w/v). U svaku jažicu mikrotitracijske pločice s 96 jažica otpipetirano je 100 µL bujona (za bakterije *E. coli* i *S. aureus* uporabljen je Muller Hinton, za bakteriju *M. fortuitum* MyCO, za bakteriju *H. pylori Brain heart* iscrpina s dodatkom 2 % FBS (eng. *Heat Inactivated Fetal Bovine Serum*), a za gljivicu *C. albicans* RPMI bujon). U prvu jažicu, prvog reda, dodano je 100 µL otopine jednog uzorka meda, a postupak je ponavljan dok nisu dodani svi istraživani uzorci meda u svaku sljedeću jažicu u prvom stupcu. Nakon homogenizacije, iz jažica prvog stupca preneseno je 100 µL u jažice drugog stupca i dalje redom, s ciljem dobivanja dvostrukih, serijskih razrjeđenja uzoraka meda (0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125; 0,012526, 0,007813; 0,003906 mg/mL). Nakon razrjeđenja, u svaku jažicu je dodano 20 µL bakterijske suspenzije (McFarland Standard 0.5: u svaku jažicu inokulirano je 300 x 10^4 bakterija). Tako priređena mikrotitracijska pločica inkubirana je na 37 °C tijekom 24 (*E. coli, S. aureus, C. albicans*), odnosno 48 sati (*M. fortuitum*). *H. pylori* inkubiran je tijekom 24 sata u atmosferi s 5 % ugljičnog dioksida. Nakon inkubacije, u svaku jažicu dodano je 30 µL reagensa: 1 %-tni TTC (eng. *2,3,5-Triphenyl-2H-Tetrazolium Chloride*), redoks indikator za diferencijaciju metabolički aktivnih od inaktivnih stanica *E. coli* i *S. aureus*, potom MTT (eng. *3-(4,5-Dimethylthiazol-2-il)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide*) za gljivicu *C. albicans* te resazurin (eng. *7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-one 10-oxide*), kao indikator viabilnosti bakterije *M. fortuitum*. S obzirom na izrazitu aktivnost ureaze kod bakterije *H. pylori*, kao indikator je dodano 50 µL uree. Potom su pločice inkubirane dodatna 3 sata na 37 °C. Zatim je u svaku jažicu dodano 30 µL izopropanola (0,04 M), koji omoguće otapanje nepolarnih spojeva, s ciljem dobivanja vjerodostojnijih očitanja. Promjene nastale rastom, odnosno inhibicijom rasta bakterija, očitane su spektrofotometrijski (540 nm). Cjelokupna analiza napravljena je u triplikatu, s tim da minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) predstavlja razrjeđenje meda pri kojem je inhibiran rast više od 80 % bakterija u ispitivanim jažicama (MIK_{80}), odnosno umnožilo se manje od 20 % bakterija (MIK_{20}) te razrjeđenje pri kojem je inhibiran rast više od 50 % bakterija (MIK_{50}).

3.4. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola

Ukupni fenoli u uzorcima meda određeni su Folin-Ciocalteu metodom (SINGLETON i sur., 1999.). Ukratko, otopini meda (20 µL, 1:1 w/v) u metanolu, dodano je 100 µL Folin-Ciocalteu reagensa (FCR) te nakon 5 minuta 300 µL zasićene otopine natrijevog klorida (NaCl). Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi na tamnom mjestu kroz 2 sata, mjerena je apsorbancija reakcijske smjese (760 nm). Kao standard, korištena je kalibracijska krivulja galne kiseline te su ukupni fenoli izraženi kao miligrami ekvivalenata galne kiseline na kilogram meda (mg GAE/kg meda). Kako bi eliminirali preklapanje sa šećerima (FCR ne reagira samo s fenolima, nego i s drugim reducirajućim tvarima, među njima i reducirajućim šećerima), određeni su ukupni fenoli u umjetnom medu, koji odražavaju osnovne ugljikohidratne sastojke meda, a utvrđene su vrijednosti korištene kao slijepa proba.

3.5. Spektrofotometrijsko određivanje flavonoida

Flavonoidi u medu određeni su kolorimetrijski, reakcijom s aluminijevim kloridom ($AlCl_3$) (ZHISHEN i sur., 1999.), koja se temelji na stvaranju kompleksa iona aluminija i karbonilne te hidroksilne skupine flavonoida. Ukratko, uzorak otopine meda (0,5 mL, 1:1 w/v) u metanolu pomiješan je s destiliranom vodom (0,5 mL), čemu je dodano 60 µL 5 %-tne otopine natrijevog nitrata ($NaNO_2$), a 5 minuta kasnije 60 µL 10 %-tne otopine $AlCl_3$. Nakon dodatnih 6 minuta, dodano je 400 µL 1M otopine natrijevog hidroksida (NaOH) te je podešen volumen reakcijske smjese na 2 mL (destiliranom vodom). Apsorbancija reakcijske smjese mjerena je pri valnoj duljini od 510 nm, u odnosu na slijepu probu (umjetni med). Ukupni flavonoidi su prikazani kao miligrami ekvivalenata katehina po kilogramu meda (mg CE/kg meda).

3.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti uzoraka meda

Brojne su metode kojima se može odrediti antioksidacijska aktivnost meda, no u ovom istraživanju uporabljena je metoda sa željezo(III)-tripiridiltirazin kompleksom (eng. *ferric reducing/antioxidant power assay*, FRAP) te metoda gašenja 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH). Obje metode se zasnivaju na reakciji proba (oksidans) + e^- (antioksidans)→ reducirana proba + oksidirani antioksidans i prijenosu elektrona. Željezo(III)-tripiridiltirazin i 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil su u ovom slučaju probe, oksidansi, koji postaju primatelji elektrona od antioksidansa i time mijenjaju boju. Razina promjene boje je proporcionalna antioksidacijskom kapacitetu mjerenog uzorka, a određuje se kolorimetrijski.

3.6.1. Metoda sa željezo(III)-tripiridiltirazin (Fe^{3}+-TPTZ) kompleksom - FRAP metoda

Metodom sa željezo(III)-tripiridiltirazin (Fe^{3}+-TPTZ) kompleksom određena je antioksidacijska aktivnost istraživanih uzoraka meda (BENZIE i STAIN, 1999.). Princip metode je redukcija Fe^{3}+-TPTZ u prisutnosti antioksidansa. Ukratko, otopini meda u metanolu (50 µL, 1:1 w/v) dodano je 950 µL FRAP reagensa. Apsorbancija reakcijske smjese mjerena je nakon inkubacije (4 do 30 minuta pri 37 ºC), pri valnoj duljini 593 nm, u odnosu na slijepu probu. Reakcijska smjesa, u koju je dodano 50 µL otopine umjetnog meda, predstavljala je slijepu probu. Kalibracijska krivulja je napravljena prema željezovom sulfatu ($FeSO_4$ x $7H_2O$) i rezultati su izraženi kao µmol željezovog sulfata po kilogramu meda (µmol Fe^{2+}/kg meda).

3.6.2. Metoda gašenja DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikala

Sposobnost uzoraka meda da neutraliziraju slobodne radikale određena je uz pomoć DPPH radikala (BRAND- WILLIAMS i sur., 1995). Otopina meda u metanolu (20 µL, 1:1 w/v) pomiješana je s 980 µL 0.0094 mmol/L DPPH reagensa (otopljenog u metanolu). Nakon inkubacije, u trajanju 30 minuta pri sobnoj temperaturi, izmjerena je apsorbancija reakcijske smjese na valnoj duljini od 515 nm, u odnosu na slijepu probu. Kao slijepa proba uporabljena je reakcijska smjesa u koju je dodano 20 µL otopine umjetnog meda. Kalibracijska krivulja je

napravljena korištenjem Trolox-a (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline) a rezultati su izraženi kao Trolox ekvivalenti po kilogramu meda (µmol TE/kg meda).

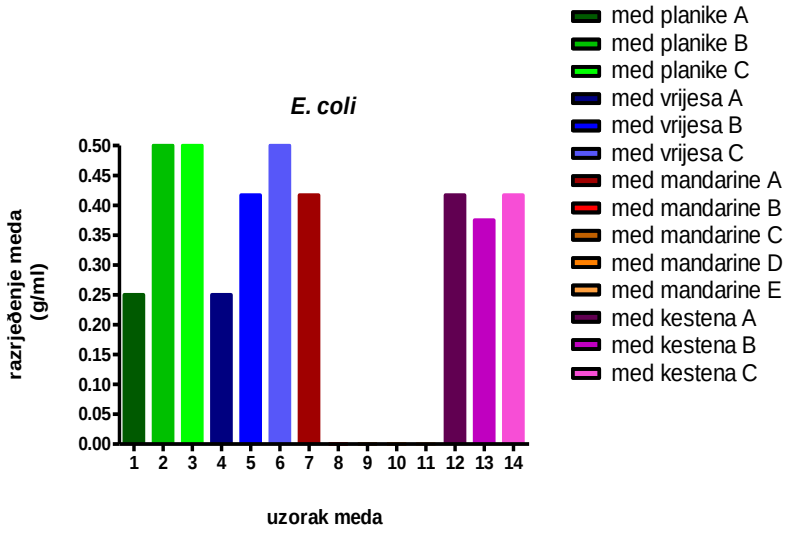
3.7. Statistička analiza

Određene minimalne inhibitorne koncentracije istraživanih uzoraka meda statistički su obrađene u računalnom programu Microsoft Excel. Dobiveni rezultati potom su obrađeni statističkim računalnim programom GraphPad Prism (GraphPad, SAD) (jednosmjerna analiza varijance i posthoc Dunettov test). Statistički značajnim smatran je $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu.

4. REZULTATI

4.1. Antimikrobni učinci istraživanih uzoraka meda na bakteriju *E. coli*

Na slici 1. prikazana je minimalna inhibitorna koncentracija istraženih uzoraka meda na bakteriju *E. coli* (umnožilo se manje od 20 % bakterije, MIK_{20}). Iz grafičkog prikaza vidljivo je da najjače antibakterijsko djelovanje pokazuje med planike uzorak A i vrijesa uzorak A, a najmanju učinkovitost med mandarine (uzorci B, C, D i E). Na slici 2. grafički je prikazana minimalna inhibitorna koncentracija istraživanih uzoraka meda na bakeriju *E. coli*, prilikom čega se u jažicama umnožilo manje od 50 % navedene bakterije (MIK_{50}) te je vidljivo da najučinkovitije inhibitorno djelovanje pokazuje med planike A, a najmanje med kestena A i B.



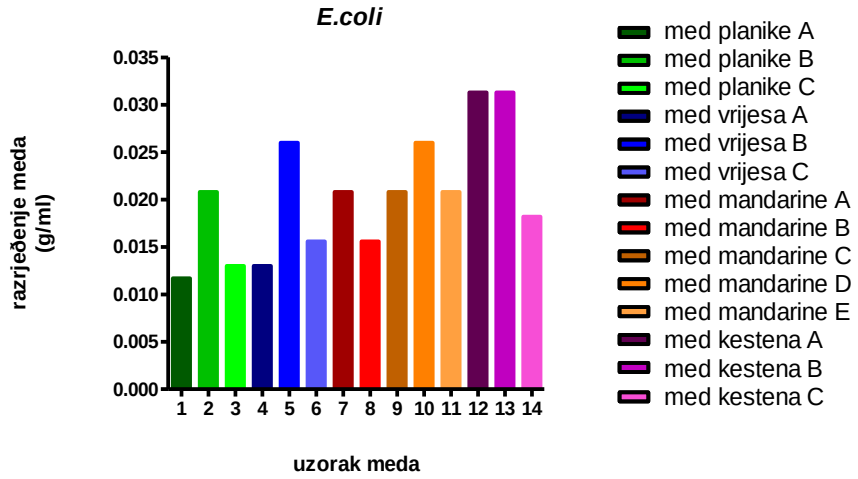
Slika 1. Minimalna inhibitorna koncentracija istraživanih uzoraka meda na bakteriju *E. coli* (inhibiran rast više od 80 % bakterija).

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da med planike učinkovito inhibira rast bakterije *E. coli*. Međutim, ovisno o geografskom podrijetlu, postoje razlike između istraživanih uzoraka meda. Med planike A (uzorak prikupljen na otoku Braču) pokazao je antimikrobnu učinkovitost u koncentraciji nižoj nego ostala dva uzorka meda planike. Stoga je antibakterijska učinkovitost meda planike prikupljenog na otoku Braču veća od meda planike prikupljenog u okolici Konavla i s poluotoka Pelješca.

Antimikrobna svojstva meda vrijesa također se razlikuju. Najveću inhibitornu učinkovitost pokazuje uzorak meda vrijesa A (Mokošica), dok uzorci prikupljeni u području Konavla i Dubrovačkog primorja pokazuju nešto slabiji antimikrobni učinak.

Na temelju dobivenih rezultata istraživanja, ustanovljeno je da med mandarine pokazuje izrazito slabu antimikrobnu učinkovitost na dotičnu bakteriju te je samo uzorak meda mandarine A inhibitorno djelovao na rast više od 80 % bakterija *E. coli* (MIK_{80}).

Od ispitivanih uzoraka meda kestena, najjače antimikrobno djelovanje pokazuje med kestena B (Banovina), dok najmanju koncentraciju pri kojoj je inhibiran rast više od 50 % bakterija pokazuje med kestena C (Ozalj).

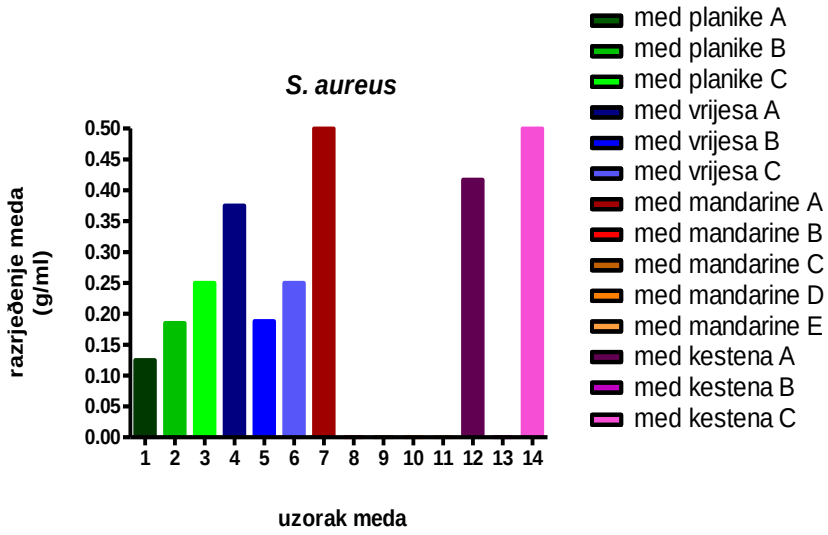


Slika 2. Minimalna inhibitorna koncentracija istraživanih uzoraka meda na bakteriju *E. coli* (inhibiran rast više od 50 % bakterija).

4.2. Antimikrobni učinci istraživanih uzoraka meda na bakteriju *S. aureus*

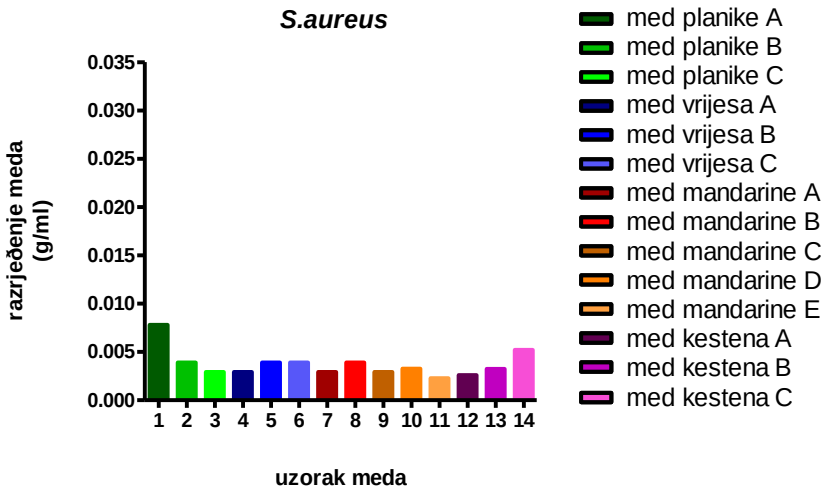
Na slici 3. je prikazan MIK istraživanih uzoraka meda na bakteriju *S. aureus*, prilikom čega je u jažicama umnoženo manje od 20 % bakterija (MIK_{20}). Iz prikaza je vidljivo da najučinkovitije antibakterijsko djelovanje pokazuje med planike A i B te vrijesa A, dok najmanju učinkovitost pokazuje med mandarine B, C, D i E te kestena B. Na slici 4. je prikazan MIK_{50} ispitivanih uzoraka meda na bakeriju *S. aureus.* Najučinkovitije antibakterijsko djelovanje pokazuje med mandarine E, a najmanju učinkovitost med planike

A. Rezultati istraživanja pokazali su izrazito slabo antibakterijsko djelovanje meda mandarine spram bakterije *S. aureus*. Jedino med mandarine A inhibira rast više od 80 % bakterija, dok svih pet uzoraka djeluju, u sličnim koncentracijama, na inhibiciju rasta više od 50 % bakterija. Vidljivo je kako svi istraživani uzorci meda pokazuju antimikrobni učinak, ali postoji razlika ovisno o geografskom podrijetlu. Med planike A (Brač) u najnižoj koncentraciji inhibira rast više od 80 % bakterija, no med planike C u najnižoj koncentraciji inhibira rast više od 50 % bakterija.

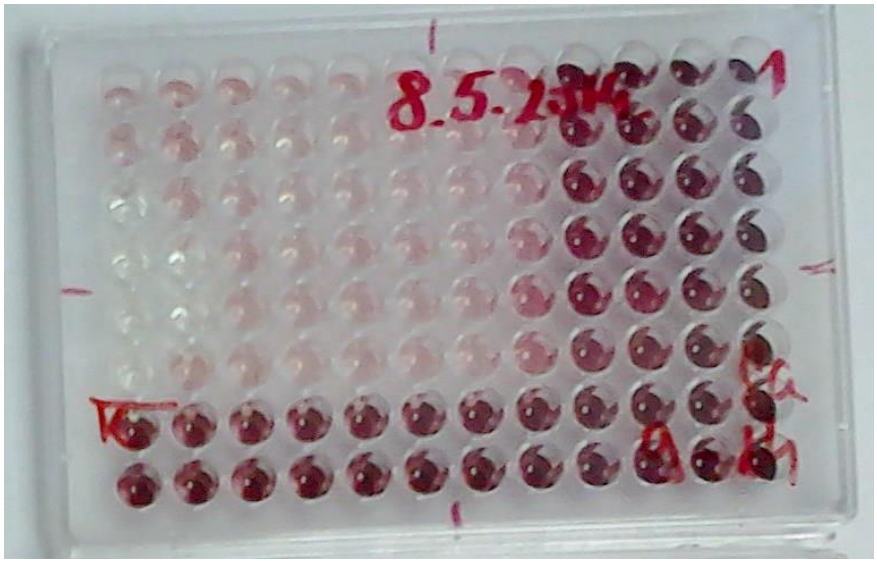


Slika 3. Minimalna inhibitorna koncentracija istraživanih uzoraka meda na bakteriju *S. aureus* (inhibiran rast više od 80 % bakterija).

Svi uzorci meda vrijesa pokazuju antibakterijsko djelovanje na bakteriju *S. aureus*, no prisutna je razlika s obzirom na geografsko podrijetlo. Med vrijesa B (Konavle) u najnižoj koncentraciji inhibira rast više od 80 % bakterija, međutim na inhibiciju rasta više od 50 % bakterija, sva tri uzorka meda vrijesa djeluju u podjednakim koncentracijama. Antimikrobna svojstva meda kestena razlikuju se s obzirom na geografsko podrijetlo ispitivanih uzoraka. Istraživanje pokazuje da jedino kesten s područja Banovine ne inhibira rast više od 80 % bakterija, makar svi uzorci kestena, u sličnim koncentracijama, inhibiraju rast više od 50 % bakterija.



Slika 4. Minimalna inhibitorna koncentracija istraživanih uzoraka meda na bakteriju *S. aureus* (inhibiran rast više od 50 % bakterija).



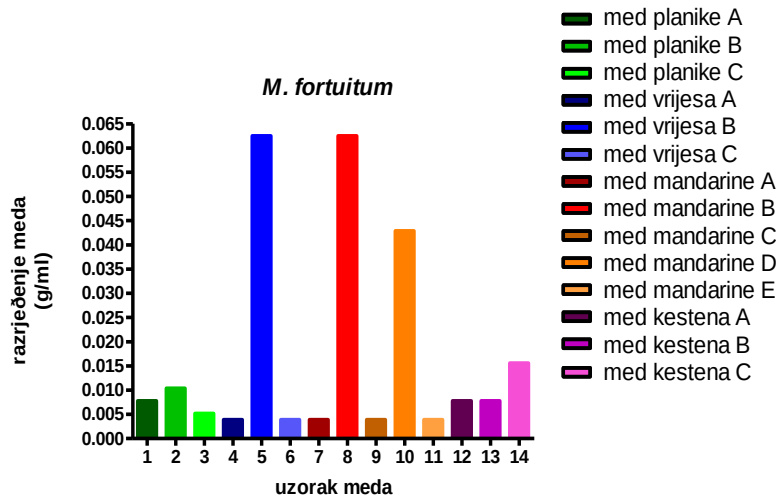
Slika 5. Mikrotitracijska pločica s dvostrukim serijskim razrjeđenjima meda te bakterijskom suspenzijom *S.aureus*, nakon inkubacije.

4.3. Antimikrobni učinci istraživanih uzoraka meda na bakteriju *H. pylori*

Nakon inkubacije mikro pločica s nasađenom *H. pylori* u atmosferi s 5 % ugljičnog dioksida, uočeno je izrazito slabo crveno obojenje u gotovo svim prisutnim jažicama, osim u najmanjim razrjeđenjima pojedinih uzoraka meda planike, vrijesa i kestena. S obzirom na djelomičnu spektrofotometrijsku nečitljivost dobivenih rezultata i nemogućnost statističke obrade, vizualnom procjenom može se zaključiti da uzorci meda planike, vrijesa i kestena, u razrjeđenju 0,5 mg/mL meda, inhibitorno utječu na rast dotične bakterije. Međutim, uzevši u obzir tešku izolaciju i uzgoj pretraživane bakterije te potencijalno onečišćenje enterobakterijama, difteroidnim bakterijama, streptokokima i anaerobnim bakterijama, dobivene rezultate potrebno je uzeti s rezervom te provesti dodatna istraživanja.

4.4. Antimikrobni učinci istraživanih uzoraka meda na bakteriju *M. fortuitum*

Na slici 5. je prikazan MIK_{20} istraživanih uzoraka meda na bakteriju *M. fortuitum* iz čega je vidljivo da najučinkovitije antibakterijsko djelovanje pokazuje med vrijesa A i C te mandarine A, C i E, a najmanju učinkovitost med vrijesa B i mandarine B. Naime, utvrđen je izraziti antimikrobni učinak svih uzoraka meda na bakteriju *M. fortuitum*. Svi ispitivani uzorci, u niskim koncentracijama, inhibirali su rast više od 80 % bakterija (MIK_{80}).

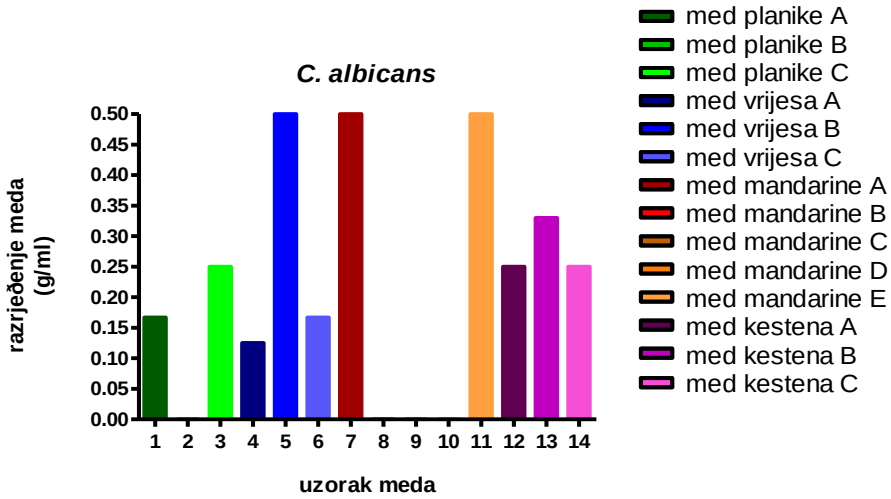


Slika 6. Minimalna inhibitorna koncentracija istraživanih uzoraka meda na bakteriju *M. fortuitum* (inhibiran rast više od 80 % bakterija).

Rezultati istraživanja pokazuju da sva tri uzorka meda planike, u sličnim koncentracijama, inhibiraju rast više od 80 % bakterija. Međutim, med s Pelješca pokazuje najučinkovitije antibakterijsko djelovanje. Antimikrobni učinak istraživanih uzoraka meda vrijesa značajno ovisi o geografskom podrijetlu. Med vrijesa A (Mokošica) i vrijesa C (Dubrovačko primorje) pokazuju bolji antimikrobni učinak, nego med vrijesa B (Konavle). Uočava se antimikrobno djelovanje svih uzoraka meda mandarine s područja Opuzena na bakteriju *M. fortuitum*. Ipak, pojedini uzorci, u različitim koncentracijama, inhibiraju rast više od 80 % bakterija. Med mandarine A, C i E pokazuje bolji antimikrobni učinak od meda mandarine B i D. Svi istraženi uzorci meda kestena, u sličnim koncentracijama, pokazuju značajno antibakterijsko djelovanje na bakteriju *M. fortuitum*.

4.5. Antimikrobni učinci istraživanih uzoraka meda na gljivicu *C. albicans*

Na slici 6. prikazan je MIK ispitivanih uzoraka meda na gljivicu *C. albicans*, prilikom čega se u jažicama umnožilo manje od 20 % istraživane gljivice (MIK_{20}). Vidljivo je da najučinkovitije antimikrobno djelovanje pokazuje med vrijesa B, a najmanju učinkovitost pokazuje med planike B te mandarine B, C i D.

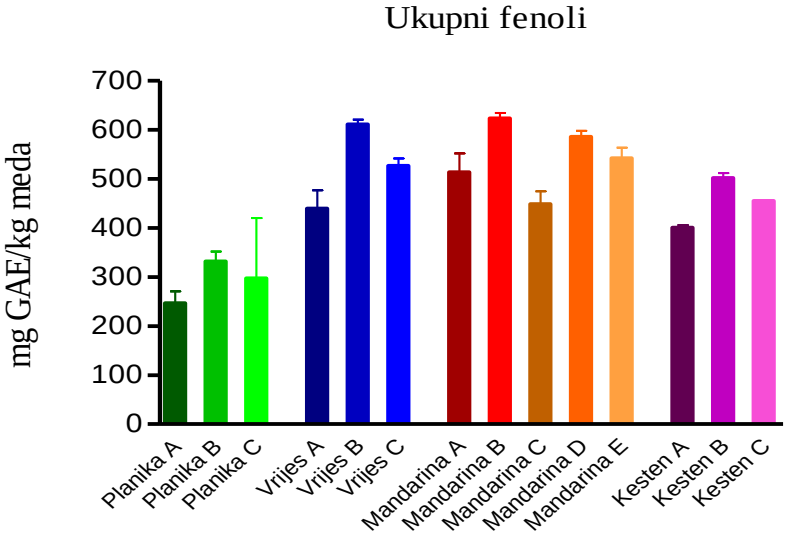


Slika 7. Minimalna inhibitorna koncentracija istraživanih uzoraka meda na gljivicu *C. albicans* (inhibiran rast više od 80 % gljivica).

Rezultati istraživanja pokazuju da uzorci meda planike, prikupljeni na različitim lokacijama, pokazuju razlike u antimikrobnom učinku na *C. albicans*. Med planike A (Brač) pokazuje najbolji antimikrobni učinak, dok med planike B (Konavle) uopće ne pokazuje inhibitorni učinak na rast navedene gljivice. Najdjelotvorniji antimikrobni učinak meda vrijesa pokazuje uzorak s područja Mokošice, dok uzorak prikupljen u Konavlima ne pokazuje izraziti antimikrobni učinak. Ispitivani uzorci meda mandarine ne pokazuju značajan antimikrobni učinak na dotičnu gljivicu. Jedino uzorci mandarine A i E inhibitorno djeluju na rast, dok ostali uzorci nisu pokazali antimikrobno djelovanje spram *C. albicans*. Utvrđivanjem minimalne inhibitorne koncentracije meda kestena, uočava se antimikrobni učinak svih uzoraka, u podjednakoj koncentraciji.

4.6. Ukupni fenoli u istraživanim uzorcima meda

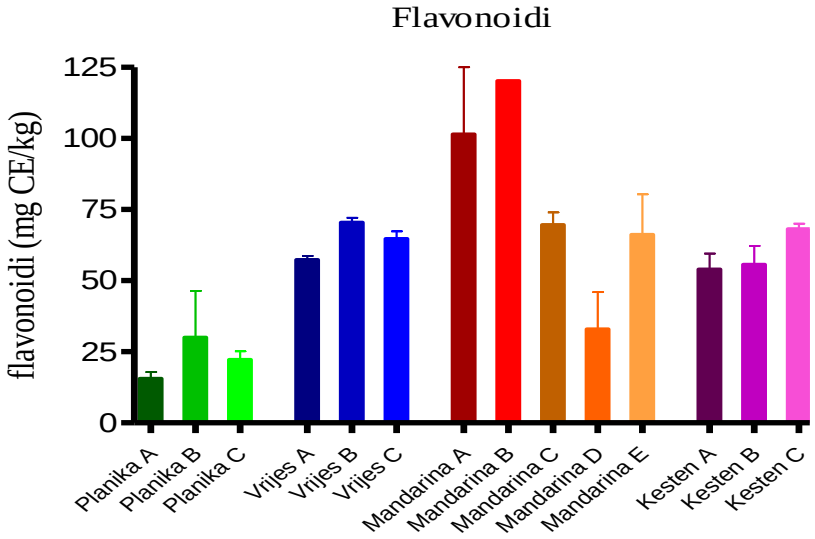
Ukupni fenoli (slika 7.) u istraženim uzorcima meda, različitog biljnog i geografskog podrijetla, utvrđeni su kolorimetrijski, Folin-Ciocalteu metodom. Rezultati pokazuju da je najviša vrijednost ukupnih fenola izmjerena za med vrijesa B (611,0 ± 14,14 mg GAE/kg meda) te med mandarine B (623,5 ± 16,26 mg GAE/kg meda), a najniža za med planike A (246,5 ± 34,65 mg GAE/kg meda). Utvrđena je ovisnost o geografskom podrijetlu, s obzirom da se uočavaju razlike između pojedinih uzoraka meda istog botaničkog sastava.



Slika 8. Ukupni fenoli u uzorcima meda određeni Folin-Ciocalteu metodom.

4.7. Količina flavonoida u uzorcima meda

Količina flavonoida u istraživanim uzorcima meda prikazana je na slici 8. Najviše vrijednosti izmjerene su za med mandarine A (101,6 ± 33,16 mg CE/kg meda) i mandarine B (120,3 ± 0,0 mg CE/kg meda), a najniže za med planike A (15,60 ± 3,253 mg CE/kg meda) i planike C (22,25 ± 4,172 mg CE/kg meda). Dok je količina flavonoida, u svim uzorcima meda planike, vrijesa i kestena, ujednačena, vrijednosti izmjerene za uzorke meda mandarine značajno se razlikuju, usprkos činjenici da su svi uzorci prikupljeni na području Opuzena. Izmjerene vrijednosti za uzorke meda mandarine C (69,60 ± 6,223 mg CE/kg meda) i E (66,20 ± 20,08 mg CE/kg meda), gotovo su dvostruko manje od vrijednosti uzoraka A i B, a vrijednost izmjerena za uzorak D (33,00 ± 18,38 mg CE/kg meda) gotovo je trostruko niža.

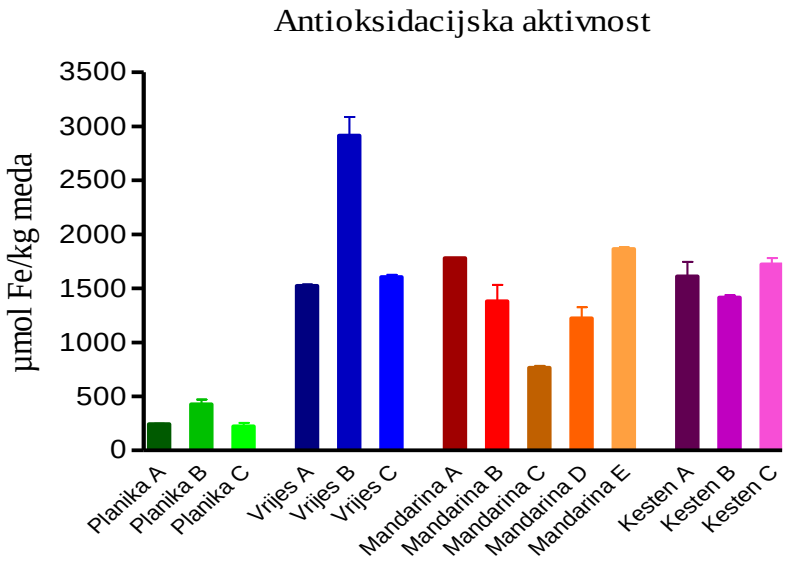


Slika 9. Količina flavonoida u uzorcima meda, određena kolorimetrijski, s $AlCl_3$.

4.8. Antioksidacijska aktivnost meda

4.8.1. Antioksidacijska aktivnost uzoraka meda određena FRAP metodom

Dobivene vrijednosti antioksidacijske aktivnosti pretraženih uzoraka meda prikazane su na slici 9. Najnižu antioksidacijsku aktivnost pokazuje med planike C (223,0 ± 43,84 μmol Fe^{2+}/kg meda), a najvišu med vrijesa B (2916 ± 243,2 μmol Fe^{2+}/kg meda). Postoje značajne razlike u antioksidacijskoj aktivnosti ispitivanih uzoraka meda vrijesa, mandarine i planike, različitog geografskog podrijetla. Med vrijesa B (2916 ± 243,2 μmol Fe^{2+}/kg meda) ima dvostruko veće vrijednosti od meda vrijesa A (1524 ± 16,97 μmol Fe^{2+}/kg meda) i C (1605 ± 28,99 μmol Fe^{2+}/kg meda), a med mandarine A (1780 ± 2,828 μmol Fe^{2+}/kg meda) i E (1866 ± 20,08 μmol Fe^{2+}/kg meda) čak više od 2,5 puta veće vrijednosti od meda mandarine C (766,3 ± 22,20 μmol Fe^{2+}/kg meda).

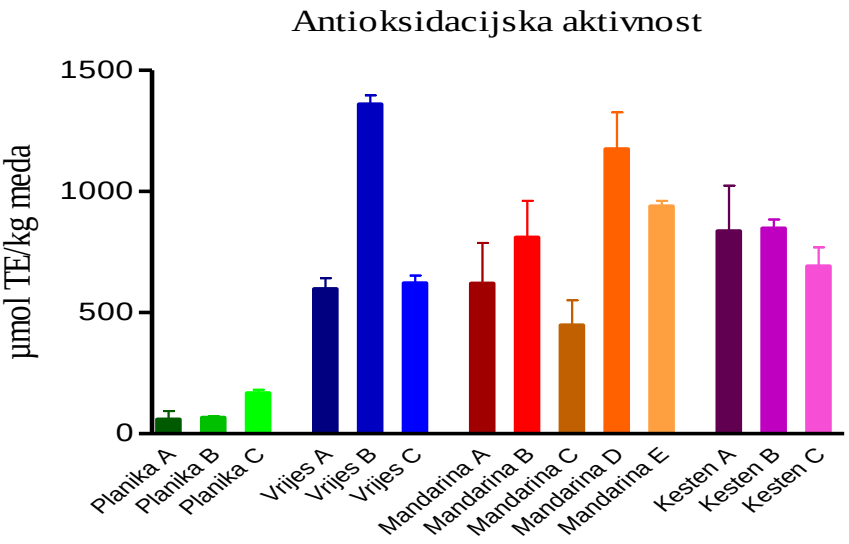


Slika 10. Antioksidacijska aktivnost meda određena FRAP metodom.

Slično je i kod uzoraka meda planike, gdje med B (427,0 ± 63,64 μmol Fe^{2+}/kg meda) ima dvostruko veću antioksidacijsku aktivnost od meda A (244 ± 1,414 μmol Fe^{2+}/kg meda) i C (223,0 ± 43,84 μmol Fe^{2+}/kg meda). Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti meda kestena slične su za sva tri uzorka, iako su prikupljeni s različitih geografskih lokacija.

4.8.2. Antioksidacijska aktivnost uzoraka meda određena metodom gašenja DPPH radikala

Rezultati istraživanja pokazuju da najmanju antioksidacijsku aktivnost (slika 10.) ima med planike A (59,00 ± 4,808 µmol TE/kg meda) i planike B (67,00 ± 7,071 µmol TE/kg meda), dok med vrijesa B ima oko 23 puta višu vrijednost (1361 ± 50,91 µmol TE/kg meda). Također, med mandarine D ima izrazito visoku vrijednost antioksidacijske aktivnosti (1176 ± 213,5 µmol TE/kg meda). Ovisno o geografskom podrijetlu, uočavaju se značajne razlike između pojedinih uzoraka meda, istog botaničkog sastava, osim za med kestena, gdje sva tri uzorka imaju slične vrijednosti. Najveće varijacije između pojedinih uzoraka istog botaničkog, a različitog geografskog podrijetla, zamijećene su u uzorcima meda vrijesa i mandarine.



Slika 11. Antioksidacijska aktivnost meda određena metodom gašenja DPPH radikala.

5. RASPRAVA

Med je slatka tvar koju proizvode medonosne pčele. Važan je i jedinstven prehrambeni proizvod te sadrži bioaktivne tvari, koje potječu od pčela i biljaka (BALTRUŠAITYTE i sur., 2007.). Med je primarno hrana pčelinje zajednice tijekom aktivne pčelarske sezone i zime (JAGANATHAN i MANDAL, 2009.). Oko 80 % sadržaja meda čine šećeri, a voda se nalazi u koncentraciji manjoj od 20 %. Nadalje, med sadržava enzime, minerale, vitamine i bjelančevine (LAKTIĆ i ŠEKULJA, 2008.). Specifičan sastav meda suprimira rast bakterija kvarenja hrane i pridonosi stabilnosti prehrambenih proizvoda, bez potrebe za posebnim uvjetima skladištenja (VOIDAROU i sur., 2011.). Pojedine vrste meda pokazuju razlike u fizikalno-kemijskim svojstvima kao što su vlaga, ukupna kiselost, električna provodljivost, polarizacija, kristalizacija, vrenje, higroskopičnost i specifična težina, viskoznost, slatkoća te senzorska svojstva i antioksidativne osobitosti (SLAČANAC, 2009.). Također, boja meda može varirati od svijetlije prema tamnijoj, ovisno o biljnom podrijetlu i mineralnom sastavu te o tome značajno ovisi okus i kvaliteta (JAGANATHAN i MANDAL, 2009.). Brojna istraživanja pokazuju da med posjeduje antimikrobnu učinkovitost protiv različitih patogenih mikroorganizama. Nekoliko svojstava pridonosi toj učinkovitosti, ponajprije nizak pH i visoka osmolarnost te proizvodnja hidrogen peroksida (IRISH i sur., 2011.), ali i prisustvo fenolnih kiselina, lizozima i flavonoida (TAORMINA i sur., 2001.).

S ciljem određivanja minimalne inhibitorne koncentracije meda s područja Republike Hrvatske, prikupljeno je 14 uzoraka uniflornog meda. Ispitivanje je provedeno na uzorcima meda planike, vrijesa, mandarine i kestena (tablica 1.). Ispitana su antimikrobna svojstva na četiri bakterije, *E. coli, S. aureus, M. fortuitum* i *H. pylori*, te gljivicu *C. albicans*. Na temelju rezultata, možemo zaključiti da pretraženi uzorci meda, različitog botaničkog i geografskog podrijetla, pokazuju izrazite razlike u antimikrobnoj učinkovitosti na različite vrste patogenih mikroorganizama. Međutim, med planike A (prikupljen na otoku Braču) i med vrijesa A (prikupljen u području Mokošice) pokazuju izrazitu inhibitornu aktivnost prema umnažanju svih istraživanih patogenih mikroorganizama. Med planike B (područje Konavla) na inhibiciju rasta više od 80 % bakterije *E. coli* djeluje u dvostruko većoj koncentraciji od meda planike A i vrijesa A, a također uopće ne inhibira rast *C. albicans,* dok na druge patogene bakterije djeluje u sličnoj koncentraciji kao med planike A. Također, med vrijesa B (područje Konavla) u većoj koncentraciji inhibira rast 80 % bakterija *E. coli,* u odnosu na med vrijesa A i planike A, a zamijećen je i slabiji antimikrobni učinak na bakteriju *M. fortuitum* i gljivicu *C.*

albicans, u odnosu na druge istraživane uzorke meda. Međutim, na gram-pozitivnu bakteriju *S. aureus* djeluje u nižim koncentracijama od preostala dva uzorka vrijesa, ali i od drugih uzoraka meda, isključujući planiku A koja ima najbolji antimikrobni učinak na navedene bakterije. Činjenica da med planike i vrijesa, prikupljeni na području Konavla, imaju slabiji antimikrobni učinak na patogene *E. coli, M. fortuitum* i *C. albicans,* od ostalih uzoraka istog botaničkog podrijetla, upućuje na zaključak da određeni okolišni čimbenici, prisutni isključivo na području Konavla, uzrokuju slabiju antimikrobnu učinkovitost. Med mandarine pokazuje izrazito slab antimikrobni učinak, odnosno većina uzoraka ne djeluje inhibitorno na rast većine pretraženih bakterija, isključujući *M. fortuitum*, gdje med mandarine A, C i E, u izrazito niskim koncentracijama (razrjeđenje meda 0,0039 g/mL), inhibira rast dotične bakterije. Usprkos činjenici da su prikupljeni na relativno uskom zemljopisnom području (svi uzorci su iz okolice Opuzena), jedino med mandarine A djeluje inhibitorno na rast više od 80 % bakterija *E. coli* i *S. aureus*, međutim u višim koncentracijama od meda planike i vrijesa. Na *C. albicans* antimikrobno djeluju samo dva uzorka meda mandarine, A i E (razrjeđenje meda 0,5 mg/mL), ali svi ostali uzorci drugog botaničkog podrijetla djeluju u nižim koncentracijama, isključujući med vrijesa B, koji u istoj koncentraciji inhibira rast navedene gljivice. Istraženi uzorci meda kestena inhibitorno djeluju na sve patogene mikroorganizme, u relativno ujednačenim koncentracijama, nešto višim nego pojedini uzorci meda planike i vrijesa. Najbolji antimikrobni učinak pokazuju na *M. fortuitum,* a najslabiji na *S. aureus* (uzorak B ne djeluje inhibitorno) i *E. coli*. Najveću osjetljivost na pretražene uzorke meda pokazuje bakterija *M. fortuitum*, na čije umnažanje svi uzorci meda djeluju inhibitorno u izrazito niskim koncentracijama. U istraživanju je kao kontrola uporabljen umjetni med (rezultati nisu prikazani) zbog sličnosti u sastavu šećera, vrijednosti pH te osmolarnosti, s prirodnim, nepatvorenim medom. S obzirom da umjetni med nije djelovao inhibitorno na istraživane patogene mikroorganizme, može se zaključiti kako osmolarnost, odnosno kiselost nisu jedini i najvažniji čimbenici antimikrobne učinkovitosti. Istraživanje MOLANA (1992.b) pokazuje da je antibakterijska učinkovitost veća kod razrijeđenog meda (smanjena osmolarnost).

Kako bi što bolje istražili mehanizme antimikrobne učinkovitosti meda, u istraživanju je utvrđena količina ukupnih fenola, flavonoida te antioksidacijska aktivnost pojedinih uzoraka meda. Znanstvena istraživanja pokazuju da prisutnost fitokemikalija u medu, koje potječu iz biljaka s kojih pčele skupljaju nektar ili mednu rosu, mogu povoljno utjecati na zdravlje čovjeka ili životinja. Različite vrste meda imaju različit sastav fenola i flavonoida, a time i različito antioksidativno djelovanje (GHELDOF i sur., 2002.). Flavonoidi koji se najčešće

nalaze u medu su pinocembrin, apigenin, kamferol, kvercetin, galangin, krisin, pinobanksin, luteolin i hesperitin (BERETTA i sur., 2005.). ALVAREZ-SUAREZ i suradnici (2013.) navode da, osim što fitokemikalije imaju antioksidativni učinak, djeluju i antimikrobno, inhibiraju razne enzime te posjeduju citotoksični učinak. Međutim, u ovom istraživanju, ustanovljeno je da najbolji antimikrobni učinak posjeduje med planike, usprkos činjenici da sadrži najmanju količinu ukupnih fenola, flavonoida, pa sukladno tome i najnižu antioksidacijsku aktivnost. Također, uzorci meda mandarine, koji nisu pokazali značajno inhibitorno djelovanje na većinu istraženih patogenih mikroorganizama, osim *M. fortuitum*, sadrže najveće vrijednosti ukupnih fenola i flavonoida te relativno visoku antioksidacijsku aktivnost. Uzorak meda vrijesa B (područje Konavla) također sadrži izrazito visoku koncentraciju fenola i flavonoida te ima najveću antioksidacijsku aktivnost, ali slabiji antimikrobni učinak od preostala dva uzorka vrijesa, koji sadrže veću količinu ukupnih fenola i flavonoida od meda planike, makar pokazuju sličnu antimikrobnu aktivnost na većinu bakterija, kao i med planike. Ustanovljena je ujednačena količina ukupnih fenola, flavonoida te antioksidacijska aktivnost između ispitivanih uzoraka meda kestena, različitog geografskog podrijetla, a dobiveni su rezultati u korelaciji s prethodnim istraživanjima (BERTONCELJ i sur., 2007.). Zanimljivo je da pretraženi uzorci meda mandarine imaju značajne razlike u antimikrobnom djelovanju, ali i u sadržaju ukupnih fenola i flavonoida te antioksidacijskom djelovanju, usprkos tome što su svi prikupljeni na području Opuzena, dok uzorci meda kestena, prikupljeni s različitih lokacija, imaju slične vrijednosti. Ta činjenica potvrđuje da, iako fitokemikalije potječu iz biljaka, obrada, manipulacija i skladištenje meda također mogu utjecati na njegov sastav, pa tako i na sastav i količinu ukupnih fenola te flavonoida (GHELDOF i sur., 2002.).

Rezultati brojnih istraživanja pokazali su da je antioksidativni kapacitet meda povezan s vrijednošću ukupnih fenola. Zbog svoje molekularne strukture koja uključuje aromatski prsten, dok hidroksilne skupine sadrže pokretni vodik, fenoli su vrlo učinkoviti hvatači peroksidnih radikala. Štoviše, fenolni spojevi imaju sposobnost vezivanja Fe^{2+} iona, koji kataliziraju peroksidaciju. Polifenoli, a posebice flavonoidi, također su dobri hvatači oksidacijskih tvari. Stoga, količina fenolnih spojeva, odnosno flavonoida, u medu korelira s antioksidacijskim djelovanjem. GHELDOF i suradnici (2002.) su, proučavajući antioksidacijski kapacitet, utvrdili da fenolni spojevi mogu značajno doprinijeti antioksidativnom djelovanju meda, ali i da je ono rezultat kombiniranog djelovanja različitih spojeva, među kojima vodeću ulogu imaju fenoli (primarno fenolne kiseline i flavonoidi), peptidi, organske kiseline, proizvodi Maillardove reakcije i različiti enzimi. Antioksidacijski

kapacitet meda, izmjeren u ovom istraživanju, korelira s vrijednošću ukupnih fenola, no oni ne mogu biti jedini nosioci antioksidacijskog djelovanja meda, s obzirom da ih u medu nalazimo u relativno malim količinama. Pretpostavljamo kako su neki drugi, nefenolni spojevi (proteini, hidroksimetilfurfurol, glukonska i askorbinska kiselina, vodikov peroksid), koje također nalazimo u medu, uključeni u njegovo antioksidacijsko djelovanje, a samim time i u druge biološke učinke. Naime, izrazitije antioksidacijsko djelovanje neke vrste meda povećava njenu potencijalnu terapijsku djelotvornost (ALVAREZ-SUAREZ i sur., 2013.). Osim toga, mjerenja razine ukupnih fenola i antioksidativnog djelovanja mogu se koristiti kao dobri pokazatelji za procjenu kvalitete meda.

Rezultati pokazuju kako je antimikrobna učinkovitost meda izrazito složena te je posljedica djelovanja više različitih čimbenika. Zbog složenog sastava te velikih razlika u koncentracijama različitih tvari, nije jednostavno utvrditi uzroke inhibitornog djelovanja meda na pojedine patogene mikroorganizme. Prema rezultatima MOLANA (1992.b), nema velikih razlika u djelovanju različitih uzoraka meda istog biljnog podrijetla. Ipak, na temelju dobivenih rezultata, može se zaključiti kako navedene rezultate ne možemo primijeniti u ovom istraživanju, osim za med kestena. To je posebice važno istaknuti zbog činjenice da u Hrvatskoj imamo više različitih geografskih i klimatskih područja, što značajno može utjecati na sastav meda. Također, s obzirom na velike razlike u klimatsko-okolišnim čimbenicima te postojećoj varijabilnosti dosadašnjih rezultata istraživanja, uzorke meda istog botaničkog podrijetla trebalo bi višekratno istražiti tijekom narednih godina, s ciljem što vjerodostojnijeg utvrđivanja antimikrobne učinkovitosti, pa posljedično mogućnosti standardizacije meda za primjenu u alternativnoj terapiji različitih bolesti, patoloških stanja ili infekcija.

6. ZAKLJUČCI

- Od četrnaest pretraženih uzoraka meda, s područja Republike Hrvatske, za med planike utvrđena je najbolja antimikrobna učinkovitost.
- Vrlo dobru antimikrobnu učinkovitost pokazali su med vrijesa i med kestena.
- Uzorci meda mandarine pokazali su najslabiju antimikrobnu učinkovitost, osim na bakteriju *M. fortuitum.*
- Najosjetljivijom na antimikrobne učinke meda pokazala se acidoalkoholorezistentna bakterija *M. fortuitum,* dok *E. coli, S. aureus* i *C. albicans* pokazuju otpornost na većinu uzoraka meda mandarine.
- Najveću prosječnu količinu ukupnih fenola ima med mandarine, dok je pojedinačno najviša vrijednost određena u medu vrijesa.
- Najveću količinu flavonoida sadrži med mandarine.
- Najizraženiju antioksidacijsku aktivnost ima med vrijesa uzorkovan na području Konavla.
- Antioksidacijska aktivnost meda korelira sa sadržajem ukupnih fenola i flavonoida.
- Antimikrobni učinci meda ovise o botaničkom, ali i geografskom podrijetlu meda.

7. LITERATURA

ALVAREZ-SUAREZ , J. M., F. GIAMPERI, M. BATTINO (2013): Honey as a source of dietary antioxidants: structures, bioavailability and evidence of protective effects against human chronic diseases. Curr. Med. Chem. 20, 621-638.

ANON (2009): Pravilnik o medu. Narodne novine, broj 93 (NN 93/09).

BALTRUŠAITYTE, V., P. R. VENSKUTONIS, V. ČEKSTERYTE (2007): Antibacterial activity of honey and beebread of different origin against *S. aureus* and *S. epidermidis*. Food Technol. Biotechnol. 45, 2, 201-208.

BERTONCELJ, J., U. DOBERŠEK, M. JAMNIK, T. GOLOB (2007): Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. Food Chem 105, 822-828.

BELČIĆ, J., Đ. SULIMANOVIĆ (1982.): Zlatna knjiga pčelarstva. Matica Hrvatska, Zagreb.

BELČIĆ, J., J. KATALINIĆ, D. LOC, S. LONČAREVIĆ, L. PERADIN, Đ. SULIMANOVIĆ, F. ŠIMIĆ, I. TOMAŠEC (1985.): Pčelarstvo. Nakladni zavod Znanje, Zagreb.

BENZIE, I. F., J. J. STRAIN (1990): Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total power and ascorbic acid concentration. Methods Enzymol. 299, 15-27.

BERETTA, G., P. GRANATA, M. FERRERO, M. ORIOLI, R. M. FACINO (2005): Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. Anal. Chem. Acta 533, 185-191.

BRAND-WILLIAMS, W., M. E. CUVELIER, C. BERSET (1995): Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Food Sci. Technol. 28, 25-30.

BUCHER, E., V. KOFLER, G. VORWOHL, E. ZIEGER (2004): Das Pollenbild der Südtiroler Honige. Herausgeber: Biologisches Labor der landesagentur für Umwelt-und Arbeitsschutz, Leifers, Bozen.

BUČAR, M. (2008.): Medonosne biljke kontinentalne Hrvatske. Matica hrvatska-Petrinja, Učiteljski fakultet Zagreb-podružnica Petrinja, Petrinja, 356-357.

COOPER, R. A., P. C. MOLAN, K. G. HARDING (2002): The sensitivity to honey of Gram-positive cocci of clinical significance isolated from wounds. J. Appl. Microbiol. 93, 857-863.

DUSTMANN, J. H. (1979): Antibacterial effect of honey. Apiacta 14, 7-11.

GHELDOF, N., X. H. WANG, N. J. ENGESETH (2002): Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. J. Agric. Food Chem. 50, 5870-5877.

HAN, X. Y., I. DE, K. L. JACOBSON (2007.): Rapidly Growing Mycobacteria: Clinical and Microbiologic Studies of 115 Cases. American Society for Clinical Pathology, 128, 612-621.

IRISH, J., S. BLAIR, D. A. CARTER (2011): The antibacterial activity of honey derived from Australian flora. PloS ONE. 6, 3, e18229.

JAGANATHAN, S. K., M. MANDAL (2009): Antiproliferative effects of honey and of its polyphenols: a review. J. Biomed. Biotechnol. 1-13.

KATALINIĆ, J. (1990.): Med. U: Pčelarstvo, (J. Katalinić, ur.). Nakladni zavod Znanje, Zagreb, 522-547.

JAZVINŠĆAK JEMBREK, M., A. ČIPAK GAŠPAROVIĆ, L. VUKOVIĆ, J. VLAINIĆ, N. ŽARKOVIĆ, N. ORŠOLIĆ (2012): Quercetin supplementation: insight into the potentially harmful outcomes of neurodegenerative prevention. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 385, 1185-1197.

KRELL, R. (1996): Value-added products from beekeeping. Food and Agriculture Organization of the UN. FAO Agricultural Services Bulletin No. 124.

KWAKMAN, P. H., S. A. ZAAT (2012): Antibacterial components of honey. IUBMB Life 64, 1, 48-55.

LAKTIĆ, Z., D. ŠEKULJA (2008): Suvremeno pčelarstvo. Nakladni zavod Globus, Zagreb.

LOVEAUX, J., A. MAURIZIO, G. VORWOHL (1978): Methods of melissopalinology. Bee World 59, 139-157.

MOLAN, P. C. (1992.a): The antibacterial activity of honey: The nature of the antibacterial activity. Bee World 73, 1, 5-28.

MOLAN, P. C. (1992.b): The antibacterial activity of honey: Variation in the potency of the antibacterial activity. Bee World 73, 2, 59-76.

MRAVAK, A. (2013.): Fizikalno-kemijske odlike meda od mandarine (*Citrus unshiu* Marc.). Diplomski rad. Agronomski fakultet, Zagreb.

NAGLIĆ, T., D. HAJSIG, J. MADIĆ, LJ. PINTER (2005): Veterinarska mikrobiologija: specijalna bakteriologija i mikologija. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatsko mikrobiološko društvo, Zagreb.

NARAYANA, K., S. REDDY, M. CHALUVADI, D. R. KRISHNA (2001): Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. Indian J. Pharmacol. 33, 2-16.

RELIĆ, B. (2006): Pčelarstvo. Neron d.o.o., Bjelovar.

SINGLETON, V. L., R. ORTHOFER, R. M. LAMUELA-RAVENTOS (1999): Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Method Enzymol. 299, 152-178.

SLAČANAC, V. (2009): Med. Interna skripta. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek.

STOMAFAY-STITZ, J. (1960): Honey: an ancient yet modern medicine. The Sci. Counsel. 23, 110-125.

TALARO, K. P. (2005): Foundations in Microbiology: Basic Principles. The McGraw-Hill Companies, Inc., New York.

TAORMINA, P. J., B. A. NIEMIRA, L. R. BEUCHAT (2001): Inhibitory activity of honey against food borne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. Int. J. Food Microbiol. 69, 217-225.

TONSLEY, C. (1969): Honey for health. British Bee Publications Ltd., Geddington.

TUCAK, Z., T. BAČIĆ, S. HORVAT, Z. PUŠKADIJA (1999.): Pčelarstvo. Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek, 71-195.

UMELJIĆ, V. (2008.): Enciklopedija pčelarstva. Veroljub Umeljić, Kragujevac.

VLAINIĆ, T. (2013.): Antimikrobni učinci meda različitog botaničkog porijekla s područja Republike Hrvatske. Diplomski rad, Medicinski fakultet u Zagrebu, Zagreb.

VOIDAROU, C., A. ALEXOPOULOS, S. PLESSAS, A. KARAPANOU, I. MANTZOURANI, E. STAVROPOULOU, K. FOTOU, A. TZORA, I. SCOUFOS, E. BEZIRTZOGLOU (2011): Antibacterial activity of different honeys against pathogenic bacteria. Anaerobe. Elsevier Ltd., Amsterdam.

ZHISHEN, J., T. MENGCHENG, W. JIANMING (1999): The determination of flavonoid content in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chem. 64, 555-559.

ZUMLA, A., A. LULAT (1989): Honey- a remedy re discovered. J. Roy. Soc. Med. 82, 384-385.

8. SAŽETAK

Med, primarni proizvod medonosnih pčela, tisućama godina korišten je kao lijek, no usprkos tome antimikrobna učinkovitost meda još uvijek nije u potpunosti razjašnjena. Za potrebe istraživanja, prikupljeno je 14 uzoraka meda, s različitih lokacija južne Dalmacije i kontinentalne Hrvatske, s ciljem određivanja minimalne inhibitorne koncentracije meda planike, vrijesa, mandarine i kestena. Istražena su antimikrobna svojstva na bakterije *E. coli, S. aureus, H. pylori i M. fortuitum* te gljivicu *C. albicans*. Upotrebljena je metoda nasađivanja bakterija na mikrotitracijske ploče, u koje su prethodno dodana serijska razrjeđenja meda. Nakon inkubacije, očitani su rezultati spektrofotometrom (540 nm) te je utvrđena minimalna koncentracija meda koja inhibira rast više od 50%, odnosno 80% bakterija. Najbolja antimikrobna svojstva pokazuju med planike i vrijesa, a najslabija med mandarine. Modificiranom Folin-Ciocalteu metodom utvrđena je količina ukupnih fenola, kolorimetrijski s $AlCl_3$ određena je količina flavonoida, a antioksidacijska aktivnost meda utvrđena je FRAP metodom te metodom gašenja DPPH radikala. Najmanju koncentraciju ukupnih fenola, flavonoida te antioksidacijsku aktivnost pokazuje med planike, a najveću količinu flavonoida med mandarine. Najveće vrijednosti ukupnih fenola i antioksidacijsku aktivnost posjeduje med vrijesa. Antimikrobna učinkovitost prvenstveno ovisi o botaničkom, a posredno i geografskom podrijetlu.

Ključne riječi: med, antimikrobna učinkovitost, fenoli, flavonoidi, antioksidacijska aktivnost

9. SUMMARY

Antimicrobial potential of honey from Republic of Croatia

Honey, the primary product of honey bees, has been used as a medicine for thousands of years, but antimicrobial effects of honey still are not fully understood. For this study, 14 samples of honey were collected from different locations of southern Dalmatia and Croatian mainland. The main goal was determining the minimum inhibitory concentration of strawberry tree, heather, mandarin and chestnut honey. Used pathogens were bacteria *E. coli*, *S. aureus*, *H. pylori*, and *M. fortuitum*, and the fungus *C. albicans*. We used method of plating the bacteria on a microtitre plate, in which are serial dilutions of honey previously added. After incubation, the results are read with a spectrophotometer (540 nm), and was determined the minimum concentration of honey that inhibits growth of more than 50%, or 80% of bacteria. Best antimicrobial effects show strawberry tree and heather honey, while the weakest mandarin honey. By modified Folin-Ciocalteu method was determined the amount of total phenols, the amount of flavonoids was determined colorimetric with $AlCl_3$, and antioxidant activity of honey was determined by FRAP method and the method of DPPH radicals. The lowest concentration of total phenols, flavonoids and antioxidant activity shows strawberry tree honey, and the highest amount of flavonoids has mandarin honey. The highest values of total phenols and antioxidant activity has heather honey. The antimicrobial effectiveness depends primarily on botanical and, subsequently, geographical origin.

Key words: honey, antimicrobial effect, phenolic content, flavonoids, antioxidant activity

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 23.01.1991. godine u Koprivnici. Odrasla sam u Križevcima, uz mlađeg brata i sestru.

Osnovnu školu Vladimira Nazora u Križevcima završila sam s odličnim uspjehom, a ujedno sam završila i osnovnu glazbenu školu Alberta Štrige u Križevcima, instrument gitara.

Godine 2005. upisala sam Gimnaziju Ivana Zakmardija Dijankovečkoga, koju sam, s odličnim uspjehom u svim razredima srednjoškolskog obrazovanja, završila 2009. godine, te sam, nakon završene Gimnazije, upisala Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Za vrijeme studiranja demonstrirala sam na Zavodu za biologiju i patologiju riba i pčela, na kolegijima Biologija i patologija korisnih kukaca te Biologija i patologija akvatičnih organizama, tijekom akademskih godina 2013./2014., 2014./2015. i 2015./2016. Također sam sudjelovala u obavljanju znanstveno-istraživačkog rada na Zavodu za biologiju i patologiju riba i pčela Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te na Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu.

Od dekana sam primila nagradu za izvrstan uspjeh u akademskim godinama 2009./2010., 2010./2011., 2011./2012., 2013./2014., 2014./2015. i 2015./2016.

Članica sam Hrvatskog kinološkog saveza, uz posebni interes za uzgoj pasmine pasa tornjak.

Istinska sam zaljubljenica u konje te sam tijekom srednjoškolskog obrazovanja, s konjima iz vlastitog uzgoja, aktivno sudjelovala na brojnim preponskim natjecanjima. Trenutno posjedujem četiri konja, a jahanjem se bavim rekreativno.

Publikacije:

- Kovač, Ana Marija; Vlainić, Josipa; Kosalec, Ivan; Bošnjak, Zrinka; Tlak Gajger, Ivana. **Antimicrobial potential of Croatian honey: Is there possibility to treat certain conditions?** // *Book of abstracts of the International Symposium on Bee Products 3rd edition - Annual meeting of the International Honey Commission (IHC)* / Brčić Koračonji, I., Lušić, D. (ur.). Opatija: Faculty of Medicine, University of Rijeka, 2014. 75-75

- Tlak Gajger, Ivana; Ribarić, Jasna; Vlainić, Josipa; Kovač, Ana Marija; Tomljanović, Zlatko. **Concentrations of total proteins and glucose in brood of honeybee colonies fed with food additives** // *Proceedings of 11th COLOSS Conference* / Williams, Geoff (ur.). Lukovica, Slovenija: Ministry of Agriculture, Forestry and Food Slovenia, 2015. 41-41 .

- Tlak Gajger, Ivana; Vlainic, Josipa; Kovač, Ana Marija; Ribarić, Jasna; Pužar, Krunoslav; Nejedli, Srebrenka; Tartaro Bujak; Ivana; Smodiš Škerl, Maja. **Biokemijski i histokemijski profil ličinaka iz pčelinjih zajednica invadiranih mikroporidijom Nosema ceranae i prihranjivanih dodatcima hrani NozevitPlus i BEEWELL Aminoplus** // *Poklukarjevi dnevi* / Smodiš Škerl, Maja Ivana (ur.). Ljubljana : Kmetijski inštitut Slovenije, 2016. 112-120