

Sinergijski učinak meda i antibiotika na klinički značajne bakterije višestruko otporne na antibiotike

Ivešić, Antonia

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:232879>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-29**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Antonia Ivešić

Sinergijski učinak meda i antibiotika na klinički značajne bakterije višestruko otporne na
antibiotike

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2019

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Antonia Ivešić

Sinergijski učinak meda i antibiotika na klinički značajne bakterije višestruko otporne na
antibiotike

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2019

Ovaj rad je izrađen na Institutu za zdravlje i sigurnost hrane u Zenici, na Zavodu za mikrobiologiju, pod mentorstvom mentora docenta Amira Ibrahimagića. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

Veliku zahvalu upućujem doc. dr. sc. Amiru Ibrahimagiću na ukazanoj pomoći, predanom radu i ugodne trenutke provedene u laboratoriju tijekom istraživanja, te cijelom osoblju kemijskog i mikrobiološkog laboratorija, na Institutu za zdravlje i sigurnost hrane u Zenici.

Posebnu zahvalu upućujem doc. dr. sc. Silviji Černi za savjetovanje, prenesene vještine i strpljenje koje je imala za mene tijekom izrade ovog rada.

Hvala mojoj obitelji i prijateljima koji su mi bili veliki oslonac tijekom mog studiranja, a najljepšu zahvalu i posvetu ovog diplomskog rada upućujem majci Ani za bezuvjetnu podršku i beskonačnu ljubav.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

SINERGIJSKI UČINAK MEDA I ANTIBIOTIKA NA KLINIČKI ZNAČAJNE BAKTERIJE VIŠESTRUKO OTPORNE NA ANTIBIOTIKE

Antonia Ivešić

Roosveltov trg 6, 10 000 Zagreb

U današnje vrijeme raste broj klinički značajnih bakterija koje pokazuju višestruku otpornost na antibiotike. Istraživanja ukazuju na antimikrobni učinak meda, temeljen na fizikalno-kemijskim svojstvima i kemijskom sastavu meda. Hipoteza rada je da med povećava osjetljivost na antibiotike kod bakterija kojima je antibiogramom potvrđena višestruka otpornost. Svrha istraživanja je potvrditi antibakterijsko djelovanje bagremovog, kaduljinog, lipovog i livadskog meda. Antibakterijski potencijal ovih medova testiran je na osam bakterija: *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter sakazakii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Providentia rettgeri* i *Pseudomonas aeruginosa*. Nakon analize antibiograma, uzorci su tretirani različitim koncentracijama meda te je svakoj vrsti meda, metodom razrjeđenja, utvrđena minimalna inhibitorna i minimalna baktericidna koncentracija. Nakon tretmana medom, ponovljen je antibiogram, zbog usporedbe rezultata antibiograma prije i nakon djelovanja meda. Mjerenjem zona inhibicije, jako antimikrobno djelovanje pokazali su med bagrema i kadulje u synergizmu s antibiotikom sulfometoksazol-trimetoprim, no statistički značajni rezultati mjerenja zona inhibicije prije i nakon tretmana ispitivanim vrstama meda, pokazali su se jedino rezultati kod bakterije *P. mirabilis*, a analizom je utvrđeno kako med kadulje i livade imaju najveći utjecaj na porast inhibicijskih zona antibiotika. Istraživanje ukazuje da med može postati antimikrobno sredstvo, međutim, nepredvidiva i nestandardizirana antibakterijska aktivnost meda otežava njegovu primjenu kao antimikrobnog agensa.

(66 stranica, 14 slika, 25 tablica, 60 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: anitmikrobna tvar; antibiotska otpornost; terapija

Voditelj: dr. sc. Amir Ibrahimagić, docent

Suvoditelj: dr. sc. Silvija Černi, docentica

Ocjenitelji: doc. dr. sc. Silvija Černi, doc. dr. sc. Romana Gračan, izv.prof. dr. sc. Ana Galov

Zamjena: doc. dr. sc. Marin Ježić

Datum obrane: 30. rujna 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

THE SYNERGISTIC EFFECT OF HONEY AND ANTIBIOTICS ON CLINICALLY SIGNIFICANT BACTERIA DISPLAYING MULTIPLE ANTIBIOTIC RESISTANCE

Antonia Ivešić

Roosveltov trg 6, 10 000 Zagreb

Today, there is a growing number of clinically relevant bacteria showing resistance toward multiple antibiotics. Research indicates the antimicrobial effect of honey, based on the physicochemical properties and chemical composition of honey. The working hypothesis is that honey increases antibiotic susceptibility in bacteria that have been confirmed to be resistant to multiple drugs by antibiogram. The purpose of the study is to confirm the antibacterial activity of acacia, sage, linden and meadow honeys. The antibacterial potential of these honey was tested for eight bacteria: *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter sakazakii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Providentia rettgeri* and *Pseudomonas aeruginosa*. After antibiogram analysis, the samples were treated with different concentrations of honey and a minimum inhibitory and minimum bactericidal concentration were determined for each type of honey by the dilution method. After the honey treatment, the antibiogram was repeated to compare the results of antibiograms before and after treatment of bacteria with honeys. Measurement of the zones of inhibition showed strong antimicrobial activity of acacia and sage honeys, having synergistic effect with sulfamethoxazole-trimethoprim antibiotic. Statistically significant changes in zones of inhibition before and after treatment were obtained only in *P. mirabilis*, but the analysis showed that sage and meadow honeys have been found to influence the increase of antibiotic inhibition zones. Research indicates that honey can become an antimicrobial agent, however, the unpredictable and non-standardized antibacterial activity of honey hinders its use as an antimicrobial agents.

(66 pages, 14 figures, 25 tables, 60 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: antibiotic resistance; antimicrobial agent; therapy

Supervisor: Amir Ibrahimagić, PhD, Asst. Prof.

Co-supervisor: Silvija Černi, PhD, Asst. Prof.

Reviewers: Silvija Černi, PhD, Asst. Prof., Romana Gračan, PhD, Asst. Prof., Ana Galov PhD, Assoc. Prof.

Backup reviewer: Marin Ježić, PhD, Asst. Prof.

Thesis accepted: September 30, 2019

SADRŽAJ:

1. UVOD.....	1
1.1. Bakterije.....	3
1.2. Građa bakterijske stanice	3
1.2.1. Stanična stjenka bakterijske stanice	4
1.3. Patogenost bakterija.....	5
1.4. Klinički značajne, višestruko otporne bakterije	5
1.5. Klase antibiotika i mehanizmi otpornosti na njih.....	9
1.6. Postupci testiranja bakterija na djelovanje antibiotika	11
1.7. Definicija i vrste meda.....	12
1.8. Sastav i nutritivna svojstva meda	12
1.8.1. Antibakterijske komponente u medu.....	13
1.9. Medonosno bilje	16
2. CILJEVI RADA.....	18
3. MATERIJALI I METODE	19
3.1. Korištene bakterije.....	19
3.1.1. Kultiviranje bakterija.....	19
3.2. Korišteni uzorci meda.....	20
3.3. Korišteni antibiotici	20
3.4. Određivanje antibakterijske osjetljivosti/otpornosti bakterija na antibiotike	21
3.5. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije	22
3.6. Određivanje minimalne baktericidne koncentracije	23
3.7. Određivanje antibakterijske osjetljivosti/otpornosti bakterija na antibiotike nakon tretmana medom	24
3.8. Statistička analiza rezultata	25
3.8.1. Studentov T-test	25
3.8.2. Analiza ANOVA	25
4. REZULTATI.....	26
4.1. Rezultati antibiograma.....	26
4.2. Rezultati ispitivanja minimalne inhibitorne i baktericidne vrijednosti testiranih medova.....	27
4.2.1. Antimikrobno djelovanje meda bagrema	27
4.2.2. Antimikrobno djelovanje kaduljinog meda.....	28
4.2.3. Antimikrobno djelovanje meda lipe	29
4.2.4. Antimikrobno djelovanje meda livade	30

4.2.5.	Anitmikrobno djelovanje umjetnog meda.....	31
4.2.6.	Zbirni rezultati mjerenja	32
4.3.	Rezultati antibiograma nakon tretmana bakterija medom	33
4.3.1.	<i>Acinetobacter baumannii</i>	34
4.3.2.	<i>Citrobacter freundii</i>	35
4.3.3.	<i>Enterobacter sakazakii</i>	37
4.3.4.	<i>Escherichia coli</i>	39
4.3.5.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	41
4.3.6.	<i>Proteus mirabilis</i>	43
4.3.7.	<i>Providentia rettgerii</i>	46
4.3.8.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	47
4.4.	Kontrolni sojevi	49
4.4.1.	Pozitivna kontrola KPC- <i>Klebsiella pneumoniae</i>	49
4.4.2.	Negativna kontrola <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	50
4.5.	Zbirni rezultati mjerenja	51
5.	RASPRAVA	53
6.	ZAKLJUČAK	60
7.	LITERATURA	61
8.	ŽIVOTOPIS	66

UVOD

Ljudski organizam je stanište brojnim bakterijama od kojih je većina bezopasna, te kao takve čine normalnu, fiziološku mikrobiotu čovjeka. Stalnu mikrobiotu čine mikroorganizmi koji trajno nastanjuju organizam te predstavljaju autohtonu biotu čovjeka i ne izazivaju bolest. Prolazna mikrobiota je skupina bakterija koja u ljudski organizam dopijeva iz vanjske sredine dodiranjem, vodom i hranom (Jerković 2014).

Nevelik broj bakterija ima svojstvo patogenosti, odnosno sposobnost da uzrokuje infekciju. Infekcije uzrokovane bakterijama, liječe se antibioticima još od 1940-tih godina i mnoge grane medicine su napredovale zahvaljujući antibioticima. Značajne zarazne bolesti stavljene su pod kontrolu, uz bitno smanjenje smrtnosti. Istovremeno, neracionalna i nepravilna uporaba antibiotika, dovela je do razvijanja otpornosti bakterija na iste. Već je A. Fleming najavio da će velika uporaba penicilina nužno dovesti do razvoja otpornosti bakterija na ovaj antibiotik (Andrašević 2014). Do danas su bakterije razvile mehanizme otpornosti na sve grupe antibiotika koji se sistemski upotrebljavaju u medicini. Najčešći mehanizmi otpornosti uključuju promjenu ciljnog mjesta, inaktivaciju antibiotika proizvodnjom enzima, smanjenu propustljivost stijenke za ulaz antibiotika ili aktivno izbacivanje antibiotika iz stanice (Andrašević 2014). Iako su stručnjaci već kod prve primjene antibiotika bili svjesni kako će uporaba antibiotika stimulirati u bakterija razvoj otpornosti na njih, na početku antibiotske ere vladalo je optimističko uvjerenje da će taj problem biti nadvladan izumom novih antibiotika. Danas se zna da je teško doći do tvari koje bi na potpuno nov način uništavale bakterije, a istovremeno bile netoksične za čovjeka. Ovakav globalni, zdravstveni problem zahtjeva istraživanja koja uključuju alternativnu terapiju, bez neželjenih nuspojava. Preliminarna istraživanja (Agbaje i sur. 2006, Aamer i sur. 2014, Gobin i sur. 2018) ukazala su na moguće djelovanje meda na povećanje osjetljivosti bakterija na antibiotike. Med je prirodan proizvod kojeg proizvode medonosne pčele (*Apis mellifera*), od skupljenog nektara i medne rose (Batinić i Palinić 2014). U mnogim civilizacijama i kulturama tijekom povijesti, med je korišten u medicinske svrhe, te za poboljšanje općeg fiziološkog stanja. Međutim, tek je u novije vrijeme medicinski prepoznata njegova učinkovitost, no šira uporaba meda onemogućena je zbog nedovoljnog znanstvenog istraživanja (Israili 2014).

Zbog opisane problematike otpornosti bakterija na antibiotike, ali i zbog manjka podataka o antimikrobnom potencijalu meda, cilj ovog istraživanja je ispitati učinak različitih vrsta medova na promjenu osjetljivosti na antibiotike nekoliko klinički značajnih bakterija.

1.1. Bakterije

Bakterije su najbrojnija skupina živućih organizama, široko rasprostranjeni jednostanični prokarioti. Iako su veličinom najmanji živući organizmi, zajednički čine najveću biomasu na Zemlji. Odlikuju se brzim rastom, kratkim životnim vijekom i izuzetnom fiziološkom raznolikošću. Zbog malog obujma stanice, imaju veliku dodirnu površinu s vanjskom sredinom, što omogućava veliku brzinu mikrobioloških procesa u prirodi - efikasna razmjena tvari i ekonomično trošenje energije (Jerković 2014).

1.2. Građa bakterijske stanice

Relativna jednostavnost građe i uzgoja u laboratorijskim uvjetima, pružila je mogućnost za detaljno proučavanje stanične strukture bakterija. Brojne funkcije za koje eukarioti posjeduju specijalizirane organele kao mitohondrije, kloroplaste, endoplazmatski retikulum, lizosome i dr., u bakterija obavlja plazma membrana. Za plazma membranu su vezani brojni enzimi i pigmenti koji omogućavaju respiraciju, fotosintezu, replikaciju DNA, diobu i druge bitne procese. Pri dijeljenju bakterijske stanice, dvije molekule DNA nastale replikacijom, vezane su za staničnu membranu, čime se osigurava njihova pravilna segregacija u novonastale stanice. Bakterijska stanica ima jednostavniju unutarnju građu, ali su zato njeni vanjski omotači složenije građeni u odnosu na eukariotsku stanicu (Jerković 2014).

Osim stanične membrane, bakterijska stanica ima i staničnu stjenku. Stoga je većina bakterije morfološki stabilna, upravo zahvaljujući građi njihove stanične stjenke. Za razliku od stanične stjenke biljaka i gljiva, njihova stjenka ne sadrži celulozu ni hitin. Osim stjenke, bakterije mogu posjedovati i dodatne strukture s vanjske strane staničnog zida u vidu kapsule ili sluzavog ovoja – glikokaliksa (Jerković 2014).

Stanična membrana obavlja unutarnji sadržaj stanice – protoplazmu. U njoj se nalaze DNA, ribosomi i inkluzije. Bakterijska DNA je dugačka, dvolančana, najčešće prstenasta molekula koja nije povezana histonima. DNA je gušća od okolne citoplazme te je specifično nazvana nukleoid. Prokarioti su haploidni organizmi, što znači da su im svi geni prisutni u samo jednoj kopiji (Jerković 2014).

U stanici bakterija se zapažaju ribosomi, frakcije 70 S. Nerijetko su prisutni u tolikoj količini da bakterijskoj stanici daju granuliran izgled. Bakterije pohranjuju rezervne tvari u vidu nakupina koje se nazivaju inkluzije (Jerković 2014).

Prema načinu ishrane, odnosno ovisno o tome stvaraju li same hranjive tvari ili uzimaju gotove iz prirode, bakterije se dijele na autotrofe i heterotrofe. Autotrofne bakterije koriste se fotosintezom ili kemiosintezom, a heterotrofne bakterije difuzijom primaju male otopljene molekule iz okoline. Bakterije mogu biti pokretne i nepokretne, pokrete izvide pomoću flagela i aksijalnih niti. Osnovni oblici bakterija su kuglasti, štapićasti i spiralni, no pojavljuju se i u končastom, zvjezdolikom i pleomorfnom obliku (Jerković 2014).

1.2.1. Stanična stjenka bakterijske stanice

Stanična stjenka bakterija je jedinstvena po kemijskom sastavu u živućem svijetu jer sadrži murein. Ovaj polutvrđi peptidoglikan, okružuje plazma membranu i štiti unutarnje strukture bakterija. Stjenka je esencijalna struktura prokariotske stanice jer daje oblik i integritet bakteriji, štiti stanicu od mehaničkih oštećenja. Osim toga ona sadrži brojne antigene, te je jedno od ciljnih mjesta djelovanja antibiotika. (Jerković 2014).

Christian Gram (1884) je uveo diferencijalnu tehniku bojenja bakterija i na osnovu reakcije na bojanje, bakterije se svrstane u gram-pozitivne i gram-negativne bakterije. Stjenka gram-pozitivnih bakterija je relativno debela (15-80 nm), građena je od velikog sloja peptidoglikana i kiselog polisaharida teihonske kiseline. Uloge teihonske kiseline ogledaju se u održavanju strukture stjenke, a doprinosi negativnom naboju i nosi antigenske determinante. Gram-negativna stjenka je tanja (10-15 nm), ali kompleksnije građena u odnosu na gram-pozitivnu stjenku. Sadrži tanki sloj peptidoglikana i nema teihonske kiseline. Osim peptidoglikana, gram-negativna stjenka sadrži dodatnu vanjsku membranu koja zajedno s plazmom izgrađuje periplazmatski prostor. Za gram-negativnu stjenku karakteristične su dvije vrste molekula; lipopolisaharidi u sastavu vanjske membrane i lipoproteini koji povezuju vanjsku membranu i peptidoglikanski sloj. Vanjska membrana sadrži enzime koji inaktiviraju neke antibiotike, primjerice beta-laktamaze i aminoglikozid-fosforilaze. Također, neke gram-negativne bakterije se štite od djelovanja beta-laktamskih antibiotika tako što akumuliraju beta-laktamaz u svom periplazmatskom prostoru (Jerković 2014). Samim time, gram-

negativne bakterije su manje osjetljive na antibiotike, jer njihova građa predstavlja svojevrsnu barijeru za ulazak antibiotika.

1.3. Patogenost bakterija

Ljudski organizam je stanište brojnim mikroorganizmima od kojih je većina bezopasna. Samo manji broj tih organizama čine patogene bakterije. Patogenost je genski determinirano svojstvo koje predstavlja sposobnost jednog organizma da izazove bolest. Od svih poznatih vrsta bakterija, njih nekoliko stotina mogu izazvati oboljenja ljudi (Andrašević 2014). Prema svojoj patogenosti, dijelimo ih na primarno patogene, uvjetno patogene i nepatogene bakterije. Primarno patogene bakterije imaju sposobnost da izazovu infekciju i bolest kod osoba s očuvanim imunim sustavom. Uvjetno patogene bakterije su uzročnici infekcija kod imunokompromitiranih osoba. Takve bakterije su najčešće prisutne na koži i sluznicama kao dio normalne fiziološke mikrobiote, a promjenom mjesta kolonizacije ili prodorom u anatomske regije organizma koje su primarno sterilne, izazivaju oštećenje tkiva i pojavu bolesti. Normalna mikrobiota je izuzetno značajna za organizam i narušavanje njene ravnoteže tijekom dugotrajne uporabe antibiotika može dovesti do prekomjernog umnožavanja nekih uvjetno patogenih bakterija (Jerković 2014).

Virulencija predstavlja stupanj patogenosti i određena je invazivnošću, infektivnošću i patogenim potencijalom. Unutar jedne iste vrste postoje različiti sojevi bakterija koji imaju različit stupanj virulencije. Faktori bakterijske virulencije svrstani su u dvije osnovne skupine; strukture bakterijske stanice (peptidoglikan, kapsula) i vanjski proizvodi bakterijske stanice (toksini i enzimi) (Jerković 2014).

1.4. Klinički značajne, višestruko otporne bakterije

Usporedbom velikog broja saprofitskih vrsta, mali je broj bakterija koje uzrokuju razne bolesti, no liječenje bakterijske infekcije postaje sve otežanije obzirom na brzinu razvijanja novih mehanizama otpornosti na antimikrobne agense. Izlaganjem antibioticima, mali broj bakterija mutira i postaje otporno na isti antibiotik. Neracionalnim korištenjem antibiotika, bakterije su u visokim postotcima postale otporne na razne antibiotike te za neke teške infekcije postoji oskudan izbor antibiotika. Klinički značajni patogeni su uzročnici bolničkih epidemija, a sporadično se pojavljuju i kao uzročnici akutnih, izvanbolničkih

infekcija (Hrenović i sur. 2017). Uspjeh takvih patogenih bakterija tumači se brzim razvojem otpornosti na različite antibiotike i mogućnošću preživljavanja u nepovoljnim okolišnim uvjetima izvan čovjeka ili životinja. Osim široke stečene otpornosti na antibiotike, klinički značajne bakterije pokazuju visok potencijal za izazivanje infekcije i širenje s čovjeka na čovjeka.

Faktori virulencije imaju važnu ulogu u patogenezi bakterijske infekcije. Većina bakterija posjeduje više faktora virulencije i svaki od njih ima ulogu u različitim stadijima bolesti. Najčešći faktori virulencije koji se pojavljuju kod klinički značajnih bakterija su fimbrije, kapsula i sluzavi omotač, različiti proteini koji pokrivaju površinu bakterija i time sprječavaju opsonizaciju i fagocitozu te bakterijski egzotoksini i endotoksini.

Višestruka otpornost na antibiotike (*multidrug-resistance*; MDR) definira se kao otpornost na tri ili više reprezentativnih antibiotika različitih klasa. Ova otpornost obuhvaća niz mehanizama, koji se pojedinačno mogu razlučiti na razini genoma. Tako pojedini sojevi iste vrste pokazuju velike međusobne razlike genske strukture, što je rezultat izrazite genetičke plastičnosti višestruko otpornih bakterija (Poirel i sur., 2011). Kod liječenja infekcija uzrokovanih višestruko otpornim bakterijama, jako bitno je uskladiti antibiotsku terapiju s rezultatima antibiograma, ali uspješno kontroliranje kliničkih infekcija izazvanih ovakvim uzročnicima uvelike ovisi o osobnoj odgovornosti zdravstvenih radnika.

Najpoznatija klinički značajna bakterija je višestruko otporni *Staphylococcus aureus*. Ubrzano se počeo širiti krajem prošlog stoljeća i do danas je postao dominantni stafilokok u mnogim bolnicama. Sljedeće bakterije su, nakon zlatnog stafilokoka, vodeći patogeni 21. stoljeća, zajedničko im je da pripadaju gram-negativnoj skupini bakterija, obično imaju nekoliko mehanizama otpornosti na antibiotike, od kojih su najznačajniji smanjenje koncentracije antibiotika u stanici (uslijed otežanog ulaska ili aktivnog izbacivanja antibiotika iz stanice), promjena ciljnog mjesta djelovanja antibiotika i inaktivacija antibiotika prirodnim ili stečenim bakterijskim enzimima.

- ***Acinetobacter baumannii*** – bakterija iz roda *Acinetobacter*, aerobna, inkapsulirana i nepokretljiva, oksidaza negativna, katalaza pozitivna, ne reducira nitrate i ne raste anaerobno. Rod *Acinetobacter* ima mali broj faktora virulencije i nema citotoksine, pa se bakterije ponašaju kao oportunisti. Ova bakterija kapsulom inhibira fagocitozu, raste pri nižem pH, kao i na suhim površinama (Uzunović 2009). *Acinetobacter baumannii* je česta kod imunokompromitiranih osoba, naročito kod pacijenata koji imaju produženi bolnički

boravak (>90 dana). Iako se po definiciji smatra oportunističkim patogenom i povezuje s infekcijama u bolničkom okruženju, sve je veća učestalost infekcija vanbolničke populacije.

- ***Citrobacter freundii*** je bakterija klasificirana u porodicu Enterobacteriaceae, gram-negativna, nepravilno raspoređena u polju i mikroskopski se teško razlikuje od ostalih vrsta iz porodice Enterobacteriaceae. Vrste roda *Citrobacter* su citrat-pozitivne, ne fermentiraju laktozu i pokretne. Faktori virulencije su endotoksini i lipopolisaharidna kapsula (Kalenić i sur. 2013) i uvjetni je patogen, jer može dugo obitavati u domaćinu, ne izazivajući bilo kakve patološke promjene. Tek pod određenim uvjetima i kod osoba sa slabijim imunim sustavom izaziva infekcije, no zbog brze prilagodbe i mutacije gena, vrlo brzo postaje otporna na antibiotike.

- ***Enterobacter sakazakii*** – mala štapičasta bakterija koja nerijetko formira lance. Pokretna je vrsta i posjeduje peritrihne flagele. Nesporogene su i fakultativni anaerobi. Obzirom da imaju minimalne i jednostavne prehrambene potrebe, rastu na različitim jednostavnim hranjivim podlogama. Oksidaza su negativni i to ih razlikuje od drugih gram-negativnih štapičastih vrsta. *Enterobacter sakazakii* je oportunistički patogen, a osnovni faktori patogenosti su kolonizacija, invazivnost kroz epitel sluznice i endotoksini (Kalenić i sur. 2013). Enterobakterija je široko rasprostranjena bakterija u prirodi, dio je normalne flore probavnog sustava i čovjeka. Primarne infekcije uzrokovane ovim patogenom najčešće su kod novorođenčadi, imunokompromitiranih osoba i bolesnika nakon dijagnostičko-terapijskih zahvata.

- ***Escherichia coli*** je gram-negativna, štapičasta bakterija, fakultativni anaerob, ne formira spore, pokreće se pomoću peritrihijalnih flagela i može stvarati kapsulu. *Escherichia coli* raste dobro i na običnim i selektivnim hranjivim podlogama (Uzunović 2009). Posjeduje brojne faktore virulencije koje su zajedničke svim članovima porodice Enterobacteriaceae (endotoksin, kapsula). Ova bakterija je stanovnik crijeva ljudi i životinja. Putem stolice ljudi i izmeta životinja, dospijeva u vanjsku okolinu, zbog čega se *E. coli* dokazuje u vodi kao element fekalnog zagađenja. *Escherichia coli* je najčešća gram-negativna bakterija koja se izolira u bolesnika sa sepsom, uzrokuje više od 80% infekcija mokraćnog sustava te brojne bolničke infekcije.

- ***Klebsiella pneumoniae*** pripada obitelji Enterobacteriaceae, nepokretna, fakultativno anaerobna bakterija koja fermentira laktozu. Dio je normalne flore probavnog sustava čovjeka i životinja, no može živjeti slobodno u prirodi. Česta je na koži i sluznici nazofarinksa. Polisaharidna kapsula organizma je najvažniji faktor virulencije i omogućuje bakterijama da

izbjegnu uništavanje od strane antibiotika (Uzunović 2009). Uzročnik je infekcija kod pacijenata koji duže borave u bolnicama i kod imunokompromitiranih osoba.

- ***Proteus mirabilis*** je fakultativno anaerobna, bakterija koja ne fermentira laktozu, fermentativno aktivna štapičasta bakterija iz porodice Enterobacteriaceae koja je značajan uzročnik bolničkih i izvanbolničkih infekcija. *Proteus mirabilis* može se naći u različitim okruženjima, uključujući tlo, izvore vode i kanalizaciju, ali je pretežno prisutan u gastrointestinalnom traktu ljudi i životinja (Kalenić, 2000). Budući da ima jako dobre razvijene mehanizme otpornosti na antibiotike, infekcija uzrokovana ovim patogenom se liječi kombiniranom antibiotskom terapijom. Najčešća infekcija koju ovaj patogen uzrokuje jest infekcija mokraćnog sustava. *Proteus mirabilis* stvara veliku količinu ureaze koja cijepa ureju na ugljikov dioksid i amonijak, te na taj način podiže pH vrijednost urina što omogućava formiranje bubrežnih kamenaca. Ovakva infekcija je uobičajena kod dugotrajno kateteriziranih pacijenata (Kalenić 2000).

- ***Providentia rettgeri*** - vrste roda *Providentia* su fakultativni anaerobi koji ne fermentiraju laktozu. Ova bakterija ima peritrihijalno raspoređene flagele, raste i razmnožava se na jednostavnim hranljivim podlogama. Oportunistički je patogen. Kod dojenčadi i djece mlađeg uzrasta izazivaju enterokolitise, a kod odraslih osoba su često uzročnik oboljenja urogenitalnog trakta. Česti slučajevi višestruke otpornosti na antibiotike i kemoterapeutike predstavljaju veliki problem u liječenju infektivnih oboljenja izazvanih ovom bakterijom (Rogers 2017).

- ***Pseudomonas aeruginosa*** je tipski predstavnik roda *Pseudomonas* i niza drugih vrsta. Vrste roda *Pseudomonas* su strogi aerobi i koriste kisik kao krajnji akceptor elektrona. *Pseudomonas aeruginosa* je pokretna bakterija zahvaljujući polarnim flagelama (politrihe). Nesporogena je, pravilna ili blago zakrivljena, u reakciji katalaze i oksidaze je pozitivna. Ne fermentira ugljikohidrate, ali oksidativno može razgraditi glukozu i ksilozu (Uzunović 2009). *Pseudomonas aeruginosa* ima broje faktore virulencije, uključujući strukturne dijelove, toksine i enzime. Polisaharidna kapsula sudjeluje u adheziji, štiti od fagocitoze, antitijela i antibiotika. U zdravom ljudskom organizmu *Ps. aeruginosa* je rijetko sastavni dio fiziološke flore, i to gastrointestinalnog trakta (2-20% osoba). Međutim, invazivan je i toksičan oportunistički patogen i najčešći uzročnik bolničkih infekcija (Uzunović 2009).

1.5. Klase antibiotika i mehanizmi otpornosti na njih

Poznato je da neke gljive i bakterije luče tvari koje aktivno djeluju protiv drugih mikroorganizama, takvo negativno djelovanje jednih mikroorganizama na druge naziva se antibioza. Ovakvu je pojavu je opazio engleski mikrobiolog A. Fleming i on se smatra začetnikom antimikrobne terapije jer je pronalaskom penicilina 1928. godine otvoreno novo poglavlje u mikrobiologiji.

Antibiotici koji su u uporabi pri liječenju infekcija su kemijske tvari koje inhibitorno djeluju na rast uzročnika infekcija. Danas je poznat velik broj antibiotika, od kojih svega oko stotinu ima kliničku primjenu. Antibiotici se kategoriziraju prema njihovoj kemijskoj strukturi (tablica 1) na β -laktame, tetracikline, kloramfenikole, polimiksine i aminoglikozide.

U β -laktame se ubrajaju derivati penicilina, cefemi (cefalosporini i cefamicini), monobaktami i karbapenemi. Neke od dostupnih β -laktamskih antibiotika prirodno sintetiziraju određeni mikroorganizmi. Primjerice, penicilin sintetizira *Penicillium chrysogenum*, dok rod *Acremonium* sintetizira cefalosporine. Većina β -laktamskih antibiotika djeluje na način da inhibira biosintezu stanične stijenke na razini esencijalnih enzima biosinteze peptidoglikana (Kong i sur., 2010). Ciljna mjesta djelovanja β -laktamskih antibiotika su enzimi usidreni u staničnu membranu, koji sudjeluju u posljednjoj fazi biosinteze peptidoglikana. Bakterije se štite od djelovanja beta-laktamskih antibiotika tako što akumuliraju beta-laktamazu u svom periplazmatskom prostoru, no neke vrste kao *A. baumannii* svoju otpornost temelje na djelovanju inhibirajućih enzima koji se nalaze integrirani u membrani. (Zeng i sur. 2013).

Tetraciklini su klasa antibiotika otkriveni 1940. godine. Prirodni tetraciklin proizvodi bakterija roda *Streptomyces*. Mehanizam djelovanja tetraciklina uključuje inhibiciju sinteze proteina tako što se veže za bakterijske ribosome i priječi translaciju proteina u bakterijskoj stanici. Ovoj skupini antibiotika pripada doksiciklin, metaciklin i mikociklin (Li i sur., 2012). Sličan način djelovanja ima i antibiotik kloramfenikol, međutim njegova je uporaba klinički smanjena zbog toksičnog djelovanja na koštano srž. Bakterijama, primjerice, otpornost na tetracikline omogućuju membranske crpke, koje izbacuju tetracikline iz stanice. Nadalje, postoje proteini, homologni elongacijskim faktorima, koji sudjeluju u zaštiti ribosoma od vezanja tetraciklina. Primjer ovakvih proteina je TetM (Li i sur., 2012). Ovakav način obrane od antibiotika razvijen je kod bakterije *En. sakazakii* i *A. baumannii*.

Polimiksini djeluju na način da narušava negativan naboj s vanjske strane membrane gram-negativnih bakterija. Polimiksin B i kolistin (polimiksin E) koriste se kao posljednji pokušaj tretiranja visoko otpornih gram-negativnih bakterijskih patogena. Radi se o pozitivno nabijenim peptidima koji elektrostatski vežu negativno nabijen lipid A, sastavnicu lipopolisaharida, što rezultira narušavanjem vanjske i unutarnje membrane (Olaitan i sur., 2014). Najpoznatiji mehanizam kojim bakterije održavaju otpornost na ove antibiotike jest tako postižu redukciju negativnog naboja proteina s vanjske strane membrane modificiranjem lipida A, esencijalne komponente bakterijskog lipopolisaharida (Li i sur., 2012).

Aminoglikozidi su baktericidi širokog spektra – djeluju na većinu klinički izoliranih patogena i oportunističkih patogena. Većinu aminoglikozida prirodno sintetiziraju određeni mikroorganizmi ili se radi o polu-sintetičkim derivatima prirodnih spojeva. Ovi antibiotici inhibiraju rast bakterija u dva koraka – unosom antibiotika u stanicu te vezanjem na ribosom. Primjenjuju se u stacionarnoj fazi rasta bakterija. Glavni mehanizam otpornosti na aminoglikozide kod gram-negativnih bakterija je enzimska modifikacija amino i hidroksilnih skupina aminoglikozida, čime se reducira ili potpuno onemogućuje njegovo vezanje na ribosom (Zeng i sur., 2013).

Tablica 1. *Mehanizmi djelovanja osnovnih klasa antibiotika*

Antibiotik	Mehanizam djelovanja
β -laktam	inhibicija sinteze stanične stijenke
Tetraciklin	inhibicija biosinteze proteina
Kloramfenikol	
Polimiksin	oštećenje plazma membrane bakterija
Aminoglikozid	inhibicija biosinteze proteina

Bakterije mogu steći otpornost *de novo* mutacijom ili razmjenom gena otpornosti iz drugih organizama. Stjecanje novog genskog materijala od bakterija osjetljivih na antimikrobne tvari iz otpornih sojeva bakterija može se dogoditi putem konjugacije, transformacije ili transdukcije s transpozonima koji često olakšavaju ugradnju višestrukih gena otpornosti u genom domaćina (Tenover 2006).

Vrlo je dobro dokumentirano u brojnim radovima da je otpornost bakterija na antibiotike vrlo različita u različitim područjima svijeta; nadalje, u različitim dijelovima jedne zemlje, te napokon, na različitim odjelima jedne te iste bolnice (Tripković i sur. 1998, White i sur. 2000, Kalenić 2000). Stoga, bez obzira na poznavanje općenitih trendova, na svakom odjelu, u svakoj bolnici, u svakom dijelu neke zemlje, treba poznavati lokalne otpornosti pojedinih bakterijskih vrsta na antibiotike koji se upotrebljavaju na tom području.

1.6. Postupci testiranja bakterija na djelovanje antibiotika

Osjetljivost bakterija na antibiotike može se testirati na dva načina; postupkom dilucije – razrjeđenja i postupkom difuzije – *Kirby Bauerov* disk test (Jerković i sur. 2014).

U postupku razrjeđenja, epruvete se inokuliraju sterilnom tekućom podlogom koje sadrže nisku koncentraciju odabranog antibiotika sa standardnom koncentracijom testirane bakterije. Nakon 24 sata inkubacije, određuje se inhibirajuća koncentracija antibiotika, odnosno to je epruveta s najnižom koncentracijom antibiotika u kojoj nema vidljivog porasta bakterije (Jerković i sur. 2014).

Kirby Bauerov disk test se obavlja tako što se na odgovarajuću čvrstu podlogu štapićastim brisom nanese inokulirana tekućina koji sadrži testiranu bakteriju. Nakon što se inokulirana tekućina apsorbira u podlogu sterilnom pincetom na površinu podloge se stavljaju diskovi impregnirani antibiotikom. Nakon inkubacije, djelotvornost antibiotika se očituje kao vidljiva zona inhibicije rasta, odnosno prozirna zona oko diska. Zona inhibicije se mjeri milimetarskim papirom te se izmjerene vrijednosti uspoređuju s vrijednostima datim od strane proizvođača za svaki antibiotik (Jerković i sur. 2014).

1.7. Definicija i vrste meda

Prema Pravilniku o medu „med je sladak, gust, viskozan, tekuć ili kristaliziran proizvod što ga medonosne pčele (lat. *Apis mellifera*) proizvode od nektara medonosnih biljaka, sekreta živih dijelova biljaka ili izlučevina kukaca koji sišu na živim dijelovima biljaka, koji pčele sakupljaju, dodaju mu vlastite specifične tvari, izdvajaju vodu i odlažu u stanice saća do sazrijevanja” (Pravilnik o medu Narodne novine: Zagreb, 2009).

Dok naziv ”uniflorni med” služi za opis meda koji potječe dominantno od nektara (ili medne rose) jedne biljne vrste, postoje i medovi koji potječu od mješavine nektara više različitih biljnih vrsta i kao takvi se nazivaju ”multiflorni medovi” (Persano i sur. 2004, Malacalza i sur. 2005).

Kada se govori o podrijetlu meda, prije svega se misli na njegovo botaničko podrijetlo, tj. na podrijetlo nektara ili medne rose, koje pčele svojom aktivnošću prerade u med. Nektar je šećerna otopina koja potječe od biljnih sokova viših biljaka, iz cvijeta (floralni) ili pak kao sekret posebnih biljnih organa za lučenje nektara, nektarija. Biljke luče nektar kako bi privukle kukce, a oni izvršili oprašivanje prilikom pristupa nektaru. Drugi izvor meda, mednu rosu, luče parazitski kukci koji za svoj metabolizam, stiletima smještenim u rostrumu (specijalni usni aparat) buše ili zarezuju žile listova, odnosno stabljika i hrane se uglavnom bjelančevinama sadržanim u biljnim sokovima koje sišu. Po iskorištenju proteinske dušične komponente za vlastite metaboličke procese, mednu rosu, vodenu otopinu bogatu šećerima, paraziti izbacuju iz organizma. Ona pada po biljkama i tlu, a pčele je, uz druge zainteresirane kukce, sakupljaju i prerađuju u med (Faria i sur. 2008). Nakon što pčela unese nektar ili mednu rosu usnim aparatom, ona se apsorbira u mednom mjehuru pčele, gdje mu on dodaje vlastite enzime. Takva otopina prebacuje se u košnice, gdje pčele svojom aktivnošću utječu na isparavanje viška vlage te ga deponiraju u saće da sazrije prije uporabe (Sabatini i sur. 2009).

1.8. Sastav i nutritivna svojstva meda

Med je namirnica koja je dominantno sastavljena od različitih šećera i vode. Kada se izuzme sadržaj vode (u pravilu 15 – 20%), ugljikohidrati čine 95 do 99% suhe tvari meda; uglavnom su to jednostavni šećeri, fruktoza i glukoza (85 – 95% ukupnih šećera) uz nekoliko drugih monosaharida. Većinom je nešto više fruktoze u odnosu na glukozu, a posebice je ta razlika izraženija kod tzv. cvjetnih (nektarnih) vrsta meda u odnosu na medune, odnosno

medljikovce. Određeni sadržaj kompleksnih šećera također je prisutan i to su uglavnom disaharidi, saharoza, maltoza i izomaltoza, te nekoliko trisaharida i oligosaharida, kako je prikazano u tablici 2. Prevladavanje jednostavnih šećera u medu uvelike je odgovorno za većinu fizičkih i nutritivnih svojstava meda. Drugi najzastupljeniji sastojak meda je voda i njezina količina kreće se od 15% do, zakonski maksimalno dozvoljenih, 20% (Sabatini i sur. 2001). Ostale tvari prisutne u medu uglavnom se ubrajaju u organske kiseline, mineralne tvari, proteine i slobodne aminokiseline, enzime, vrlo malo u vitamine, hidroksimetilfurfural (HMF), pigmente tvari, arome – kiseline, alkohole, ketone, aldehide i sl. Uzimajući u obzir navedeni sastav šećera, jednostavnom računom o energetske vrijednosti meda, jasno je da je njegova energetska vrijednost barem 15 do 20% manja (uzimajući u obzir i sadržaj vode) u odnosu na istu količinu običnog, kristalnog šećera (med – 1338.88 kJ/100 g, saharoza – 1673,3 kJ/100 g) (Bogdanov i sur. 2010).

Tablica 2. Sastav meda (Sabatini i sur. 2001)

Komponenta u medu	Prosječni sadržaj (%)
Fruktoza	38
Glukoza	31
Saharoza i ostali disaharidi	8
Ostali šećeri (a)	2
Voda	17
Ostale tvari (b)	4

(a) Ostali šećeri: gentobioza, izomaltoza, maltoza, saharoza, trehaloza, centozo, 1-ketozo, erloza i dr.

(b) Ostale tvari: kiseline, minerali, proteini i aminokiseline, enzimi i vitamini, arome, lipidi i čestični elementi.

1.8.1. Antibakterijske komponente u medu

Antibakterijsku aktivnost meda prvi je otkrio van Ketel 1892. godine (Gobin i sur. 2014). Do danas su uloženi veliki naponi da se jasno protumači antibakterijska aktivnost meda i njegov antibakterijski potencijal iskoristi na najbolji mogući način. Medovi općenito posjeduju dvije osnovne grupe mehanizama kojima ostvaruju antibakterijsku aktivnost. Prvoj grupi pripadaju mehanizmi antibakterijske aktivnosti zasnovani na njegovim fizičko-kemijskim osobinama (osmolarnost, viskoznost, pH vrijednost, odnosno aciditet). Druga grupa mehanizama antibakterijske aktivnosti meda zasnovana je na kemijskim tvarima koje su

u njemu prisutne (vodikov peroksid, metilglioksal i antimikrobni peptid pčelinji defensin-1) (Molan 1992).

Visoka osmolarnost meda - med je u osnovi prezasićena otopina šećera s niskim aktivitetom vode (aw), što znači da je vrlo malo vode na raspolaganju za rast i razvoj bakterija i gljiva. Mnoge vrste bakterija rast će samo ako je aktivitet vode (aw) 0,94 – 0,99, dok se prosječan aktivitet vode u medu kreće u rasponu od 0,56 do 0,62. Visoka osmolarnost meda važna je u kontekstu kvarljivosti, stoga med ubrajamo u slabo kvarljive namirnice (Lušić 2011). Cooper i sur. pokazali su da određene vrste meda čak i u koncentraciji od 2% (v/v) potpuno inhibiraju rast *S. aureus*, odnosno u koncentraciji od 4% (v/v) inhibiraju rast *S. aureus* otpornog na meticilin (*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, MRSA). U istoj studiji minimalna inhibicijska koncentracija (*minimal inhibitory concentration*, MIC) za sirup, koji se sastojao od smjese šećera u istoj koncentraciji kao i u medu, iznosila je 30% (v/v) i tek u navedenoj koncentraciji sirup je inhibirao rast spomenutih mikroorganizama (Cooper i sur. 2002).

Kiselost meda - za antibakterijska svojstva meda djelomično je zaslužna i kiselost koja pak ovisi o prisutnosti organskih kiselina, prvenstveno glukonske kiseline. pH meda uglavnom se kreće u rasponu od 3,2 do 4,5 i dovoljno je nizak da djeluje inhibicijski na velik broj mikroorganizama (Molan 1992). Studije pokazuju da kiselost meda inhibira rast pojedinih bakterija te je minimalna inhibitorna koncentracija meda za *Corynebacterium diphtheriae* porasla sa 4,5% na 10% nakon što je kiselost meda bila neutralizirana. Zanimljivo je da je *Bacillus cereus* pokazao osjetljivost prema parametru kiselosti meda, dok je inhibicija bakterijskog porasta nestala korištenjem neutralizacijskog pufera (Molan 2009).

Vodikov peroksid - dokazano je da je vodikov peroksid jedna od najznačajnijih antimikrobnih komponenti meda. White i sur. uočili su da se antibakterijska aktivnost meda može smanjiti ili potpuno ukloniti dodatkom enzima katalaze. Također su demonstrirali izravnu povezanost vodikovog peroksida s antibakterijskim djelovanjem različitih vrsta meda (White i sur. 1963). Vodikov peroksid u medu nastaje kao rezultat djelovanja enzima glukoza oksidaze, koju u nektar izlučuje pčela. Produkcija vodikovog peroksida tijekom sazrijevanja meda sprječava kvarenje meda (Molan 1992). Dio uzoraka meda nakon neutralizacije vodikovog peroksida ipak je zadržao minimalnu antibakterijsku aktivnost (Israili 2014). Na smanjenje nakupljanja vodikovog peroksida u medu utječe inaktivacija enzima glukoza oksidaze kao posljedica izlaganja meda toplini ili svjetlosti, radi čega dolazi do razgradnje vodikovog peroksida u medu (Molan 1992). Koncentracija vodikova peroksida u razrijeđenom medu varira od uzorka do uzorka, odnosno ovisi o različitim vrstama meda. To

se povezuje s botaničkim izvorom, budući da neke biljne komponente sastava mogu djelovati na enzimsku aktivnost koja će rezultirati ili povećanjem količine ili uništavanjem vodikova peroksida (Molan 1992).

Metilglioksal (MGO) - mnogi medovi posjeduju znatnu neperoksidnu antibakterijsku aktivnost (NPA) (Molan 1992, Allen i sur. 1991). Med manuke (podrijetlom s grma manuke – lat. *Leptospermum scoparium*) najdetaljnije je ispitan i u njemu su identificirani mnogi neperoksidni antimikrobni sastojci. Nedavno je pronađena iznimno visoka razina antimikrobnog spoja MGO u medu manuke (Mavric 2008). Visoka razina MGO-a u medu manuke nastaje konverzijom dihidroksiacetona (DHA) prisutnog u izuzetno visokim koncentracijama u nektaru cvjetova grma *L. scoparium* (Adams i sur. 2009). MGO je također prisutan i u medovima podrijetlom iz drugih medonosnih biljaka, ali u ispitivanja 106 različitih uzoraka meda koncentracija MGO-a nije prešla 24 mg/kg (Mavric i sur. 2008, Kwakman i sur. 2010). Zbog jake korelacije između razine MGO-a i inhibicije rasta *S. aureus* pretpostavilo se da je ovaj spoj zaslužan za uočena snažna antibakterijska svojstva meda manuke. No iako je neutralizacija ovog spoja poništila antibakterijsku aktivnost protiv *S. aureus*, te smanjila antibakterijsku aktivnost protiv *B. subtilis*, nije utjecala na antibakterijsko djelovanje protiv *E. coli* i *Ps. aeruginosa* (Kwakman i sur. 2011). Stoga MGO zasigurno ne predstavlja jedinu komponentu sastava odgovornu za neperoksidnu antibakterijsku aktivnost meda manuke.

Pčelinji defensin-1 – identificiran je antimikrobni peptid pčela defensin-1 u medicinskom medu Revamil® koji je odobren u kliničkoj primjeni (Kwakman i sur. 2010). Ovaj peptid (poznat i pod nazivom rojalisin) prethodno je identificiran u organizmu pčele te u matičnoj mliječi, ali nikada nije bio otkriven u sastavu meda (Klaudiniy i sur. 2005). Pčelinji defensin-1 ima snažno djelovanje, ali samo protiv gram-pozitivnih bakterija, uključujući *B. subtilis*, *S. aureus* i *Paenibacillus larvae* (Kwakman i sur. 2010, Gobin i sur. 2018). Potonja vrsta uzročnik je američke gnjiloće pčelinjeg legla, široko rasprostranjene i vrlo tvrdokorne bolesti pčela. Nakon eksperimentalne infekcije s *E. coli*, u hemilimfi pčela stvaraju se četiri vrste različitih antimikrobnih peptida: hemonoptecin, pčelinji defensin-1, apidaecin i skupina abaecin peptida. Svaki od tih antimikrobnih peptida ima različit spektar antimikrobnog djelovanja (Kwakman i sur. 2010). Iako je pčelinji defensin-1 relativno lako detektirati u medicinskom medu Revamil®, u medu manuke nije dokazana njegova prisutnost (Kwakman i sur. 2011). Prisutnost pčelinjeg defensina-1 u različitim vrstama meda još nije sustavno istražena.

Od ostalih antimikrobnih tvari prisutnih u medu značajni su fenolni spojevi, to su spojevi koji potječu iz biljnog nektara predloženi su kao važni čimbenici za neperoksidno antibakterijsko djelovanje meda. Nekoliko antibakterijskih fenolnih spojeva identificirano je u medu, ali njihov doprinos na ukupnu aktivnost meda za sada ipak ostaje nejasan, s obzirom na to da je koncentracija pojedinačnih fenola izoliranih iz meda suviše niska da bi mogla značajnije pridonijeti antibakterijskom djelovanju (Molan 1992, Aamer i sur. 2014). Bakterije i gljive izolirane iz meda također mogu biti potencijalni izvor antimikrobnih tvari u medu. U *in vitro* pokusima pokazano je da bakterije iz meda produciraju aktivne antimikrobne tvari, ali još uvijek se ne zna jesu li one prisutne u medu i u kojoj koncentraciji (Lee i sur. 2008).

1.9. Medonosno bilje

Bagrem (*Robinia pseudoacacia L.*) potječe iz Sjeverne Amerike odakle je prenesen u Europu. Cvate, ovisno o nadmorskoj visini, u svibnju i početkom lipnja. Na jednom mjestu cvate do 20 dana. Može dobro mediti, a prinos po košnici može iznositi 15 do čak 50 kilograma meda. Lučenju nektara pogoduje mirno vrijeme i umjerene temperature zraka. Bagremov med je vrlo svijetao, bistar, ponekad ima žućkastu boju, blagog i ugodnog je mirisa, sporo kristalizira. Med bagrema je lagan i ukusan i ubraja se u najcjenjenije vrste meda (Stanimirović i sur. 2000).

Kadulja (*Salvia officinalis L.*) je višegodišnji drvenasti grm i poslije bagrema je najvrjednija pčelinja paša. Kadulja počinje cvasti koncem travnja i početkom svibnja, a cvatnja u unutrašnjosti i u višim predjelima završava oko polovice lipnja. Najbolje medi kad je toplo vrijeme s dosta vlage u zraku. Na medenje negativno utječe promjenjivo, kišno i hladno, kao i jako suho i vjetrovito vrijeme. Kaduljin med je svijetložute, blago zelenkaste boje. Ugodnog je do blago gorkog okusa i ima izraziti miris po cvijetu biljke (Stanimirović i sur. 2000).

Lipa (*Tilia cordata Mill.*) raste kao stablašica s velikim, pravilnim, gustim krošnjama. Cvatovi su paštiti s žutim dvospolnim pravilnim cvjetovima, zaštićenim pricvjetnim uskim listovima koji pomažu raspršivanju plodova na vjetru. Većih lipovih šuma u našim područjima je malo te se većinom sade u parkovima i oko naselja. Lipa cvate od kraja svibnja do sredinje lipnja. Med je blago žut do zelenkast, ugodna i oštra mirisa te se ubraja u prvoklasne vrste meda (Stanimirović i sur. 2000).

Zahvaljujući pčelama koje oprašuju razno livadno cvijeće, poznat je livadni ili cvjetni med čiji sastav ovisi o geografskom položaju pašnjaka, ali i o vremenskom „ulovu meda“, odnosno je li riječ o jesenjem ili proljetnom pašnjaku.

Osim navedenog bilja, značajne medonosne biljke na području Hrvatske i Bosne i Hercegovine su amorfa, bijela djetelina, kesten, lavanda, ružmarin i suncokret.

2. CILJEVI RADA

Cilj ovog rada je dokazati pozitivan utjecaj meda na antibiotsku osjetljivost kod bakterija kojima je potvrđena višestruka otpornost na antibiotike. Kako bi se potvrdio sinergijski učinak meda i antibiotika uspoređivane su promjene inhibicijskih zona antibiotika prije i nakon djelovanja meda na bakterije. Da bi cilj rada bio ostvaren, bilo je potrebno ostvariti sljedeće korake:

- testirati osjetljivosti više medicinski značajnih vrsta gram-negativnih bakterija (*Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter sakazakii*, *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*, *Providentia rettgerii*, *Klebsiella pneumoniae* i *Escherichia coli*) na 18 vrsta antibiotika iz različitih skupina,
- odrediti vrijednosti minimalne inhibitorne koncentracije i minimalne baktericidne učinkovitosti bagremovog, kaduljinog, lipovog i livadnog meda kod navedenih vrsta gram-negativnih bakterija višestruko otpornih na antibiotike,
- ponoviti testiranje osjetljivosti na antibiotike za sve navedene vrste bakterija nakon tretmana medom te usporediti dobivene rezultate prije i nakon tretmana,
- donijeti zaključke o učinku meda na eventualno povećanje osjetljivosti na antibiotike kod višestruko otpornih bakterija.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Korištene bakterije

Istraživanje je rađeno na sljedećim, gram-negativnim, bakterijama: *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter sakazaki*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Providentia rettgeri* i *Pseudomonas aeruginosa*. Bakterije su klinički izolati različitog porijekla; rana, endotrahealnog tubusa, nosa i urina. Bakterije su izolirane kod hospitaliziranih pacijenata na različitim odjelima u Općoj bolnici u Travniku, Kantonalnoj bolnici u Zenici i u Sveučilišnoj kliničkoj bolnici u Mostaru, a bakterijski izolati su pohranjeni u Mikrobiološkom laboratoriju Službe za mikrobiologiju Kantonalne bolnice Zenica. Kod svih je bakterija, prije ovog istraživanja, metodom lančane reakcijom polimerazom detektirani su SHV, TEM, CTX-M, PER i AmpC β -latkamaza, čime je utvrđena višestruka otpornost na antibiotike. Molekularna karakterizacija je rađena u Laboratoriju za molekularnu biologiju, KBC-a Rebro, Zagreb.

3.1.1. Kultiviranje bakterija

Bakterije su čuvane pri -80°C u glicerolnom bujonu (glicerol 10%), a za eksperiment, odmrznute su na sobnoj temperaturi. Nakon odmrzavanja klinički materijal je inokuliran na krvni (5%) Columbia agar base i McConkeyev agar (Oxoid, Basingstoke, UK), koji je inkubiran preko noći u termostatu pri 37°C . Gram-negativni izolati su potvrđeni standardnim mikrobiološkim metodama, a biokemijskim testovima je određena njihova pripadnost određenoj vrsti.

3.2. Korišteni uzorci meda

Uzorci korištenih medova, prikupljeni su kod pčelara, s područja srednje Bosne i Hercegovine, zeničko-dobojske županije. Čuvani su u sterilnim posudama, na tamnom pri 8°C. Vrste uzoraka meda korištenih u ovom istraživanju su: bagremov, kaduljin, lipov i livadski. Odabrani su zbog toga što su najviše upotrebljavani u prehrani na ovom geografskom području. Prije nego su bili upotrijebljeni u eksperimentu, svaka vrste meda je odvagano 1,200 mg i nakon toga je razmazana na hranjivoj podlozi (Oxoid, Basingstoke, UK) te inkubirana 24 sata, pri 37°C kako bi se potvrdila odsutnost bilo kakvih bakterija u medu.

Kao negativna kontrola korišten je umjetni med koji je gotovo istovjetan medu po sastavu šećera. To je nužno budući da osnovni sastojci šećera interferiraju u pojedinim testovima mogu dati lažno pozitivne, odnosno, lažno negativne rezultate. Umjetni med je pripremljen 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). Nakon što se dovoljno zgusnuo, ostavljen je na hlađenje, u sterilnoj posudi na tamnom, pri 8°C

3.3. Korišteni antibiotici

Na početku istraživanja je određena osjetljivost navedenih bakterija na antimikrobne lijekove. Antimikrobna osjetljivost/otpornost testirana je disk-difuzijskom metodom (Kirby-Bauer) na Mueller-Hinton agaru (MHA) (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*, 2002) u skladu sa standardnim protokolom CLSI iz 2010. (*Clinical and Laboratory Standards Institute*). Kao pozitivni kontrolni izolati korišteni su višestruko otporni sojevi bakterija kojima su utvrđeni geni odgovorni za proizvodnju beta-laktamaza proširenog spektra djelovanja (eng. *Extended spectrum beta lactamases* - ESBLs): *Klebsiella* spp. – KPC otporna na karbapanem, sojevi bakterija *Klebsiella* spp. koji proizvode oksacilinazu (OXA – 48 i OXA – 24) te *Proteus mirabilis* AmpC koji proizvodi beta-laktamazu. Kao negativna kontrola, korišten je osjetljivi soj bakterije *E. coli* ATCC 25922. Kod navedenih izolata testirana je osjetljivost na 18 antibiotika (Becton, Dickinson and Company, USA) iz različitih skupina prikazanih u tablici 3: aminoglikozidi, penicilini, fluorokinoli, cefalosporini i karbapenemi.

Tablica 3. Popis korištenih antibiotika s naznačenom količinom i njihova pripadnost skupini antibiotika

SKUPINA ANTIBIOTIKA						
β LAKTAMI			AMINOGLI-KOZIDI	FLUORO-KINOLI	SULFONAMIDI I TRIMETOPRIM	DERIVATI NITROFURANA
cefalosporin	karbapanem	penicilin	gentamicin (10 µg)	ciprofloksacin (10 µg)	sulfometoksazol/trimetoprim (1,25/23,75 µg)	nitrofurantoin (30 µg)
Cefaleksin (30 µg)	meropenem (10 µg)	amoksicilin/ klavulanska kiselina (20/10 µg)	amikacin (30 µg)			
Cefuroksim (30 µg)	imipenem (10 µg)					
Ceftazidim (30 µg)						
Cefepim (30 µg)						
Ceftriakson (30 µg)						
Cefotaksim (30 µg)						
Cefpodoksim (10 µg)						
Cefiksim (5 µg)						

3.4. Određivanje antibakterijske osjetljivosti/otpornosti bakterija na antibiotike

Osjetljivost na antibiotike odredili smo difuzijskom metodom – *Kirby Bauerov* disk test. Metoda se zasniva na principu difuzije antibiotika kroz čvrstu hranjivu podlogu (Mueller-Hinton agar, Oxoid, Basingstoke, UK), koju smo prethodno, uz pomoć etalera (Copan, Italija), inokulirali tekućinom koja sadrži ispitivanu bakterijsku kulturu koja je prenoćila nakon kultiviranja u termostatu. Gustoću bakterijskih suspenzija odredili smo prema McFarlandovom standardu čiji je princip uspoređivanje sa suspenzijom poznatog zamućenja, a koja se nalazi u ampuli jednakog promjera. Uporaba McFarland standarda je neophodna pri standardizaciji mikrobioloških metoda. U ovom istraživanju smo koristili Standard 0.5 kod kojeg koncentracija bakterija iznosi 150×10^6 /mL. Nakon što je podloga apsorbirala

inokuliranu tekućinu, sterilnom pincetom na površinu podloge stavili smo papirnati disk natopljen standardiziranom količinom testiranog antibiotika (slika 1). Tako pripremljenu podlogu, postavili smo u inkubator (Selecta, Španjolska) na temperaturu od 37°C tijekom 24 sata. Tijekom inkubacije, antibiotik iz diska difundira u podlogu, te smo njegovu djelotvornost uočili kao izostanak rasta bakterije oko diska – prozirnu zonu inhibicije. Ukoliko antibiotik nije učinkovit, odnosno ako je ispitivana bakterija otporna na testirani antibiotik, rast ispitivane bakterije je vidljiv potpuno oko diska-antibiotika, bez ikakve zone izostanka rasta, odnosno inhibicijske zone. Inhibicijska zona mjerena je u milimetrima uz pomoć milimetarskog papira.



Slika 1. Određivanje antibakterijske osjetljivosti/otpornosti bakterije *Enterobacter sakazakii* na antibiotike

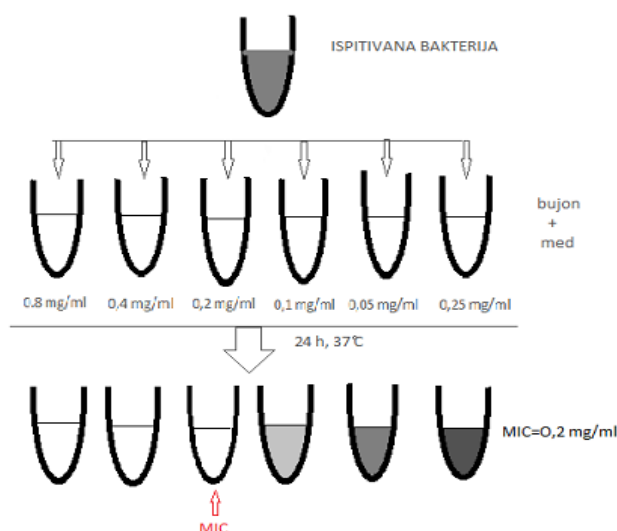
3.5. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije

Minimalna inhibitorna koncentracija (*minimum inhibitory concentration*, MIC) definirana je kao najniža koncentracija antimikrobnog agensa koja će spriječiti vidljiv rast mikroorganizama nakon inkubacije (Andrews 2001) i izražava se u mg/ml.

Ove vrijednosti određene su metodom razrjeđivanja u skladu s protokolom Europskog odbora za ispitivanje antimikrobne osjetljivosti (EUCAST, *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*).

Za određivanje vrijednosti MIC, najprije smo uz pomoć analitičke digitalne vage (Sartorius, Njemačka) odvagali 3,2 mg uzorka ispitivanog meda. Nakon toga, koristili smo šest, brojevima označenih, sterilnih epruveta. U epruvete smo pipetom (Eppendorf, Njemačka) prenijeli 2 ml hranjivog bojana – peptonske vode (Oxoid, Basingstoke, UK) kako

bismo pripravili dvostruko serijsko razrjeđenje meda. Dvostruko serijsko razrjeđenje pripravljeno je tako što smo pipetom prenosili 1 ml sadržaja iz epruvete 1 u epruvetu 2, zatim iz epruvete 2 u epruvetu 3 itd. Postupak smo ponavljali sve dok nismo dobili konačne koncentracije ispitivane vrste meda krenuvši od epruvete 1; 0.8 mg/ml, epruvete 2; 0.4 mg/ml, epruvete 3; 0.2 mg/ml, epruvete 4; 0.1 mg/ml, epruvete 5; 0.05 mg/ml i epruvete 6; 0.025 mg/ml. Nakon svakog prijenosa pipetom, zatvorenu epruvetu miješali smo na vrtložnoj miješalici (Vortex-Vib, Selecta, Španjolska) 5 - 10 sekundi, radi homogenizacije sadržaja. Pomoću pipete u svaku epruvetu dodali smo 50 μ l ispitivanih bakterija (slika 2). Epruvete s bakterijskim kulturama inkubirali smo pri 37°C tijekom 24 sata. Najveće razrjeđenje ispitivanog meda koji sprječava rast (epruveta u kojoj nema замуćenja, sadržaj je bistar) smatrano je MIC vrijednošću tog meda protiv ispitivane bakterijske vrste (EUCAST).



Slika 2. Određivanje vrijednosti minimalne inhibitorne koncentracije metodom razrjeđenja

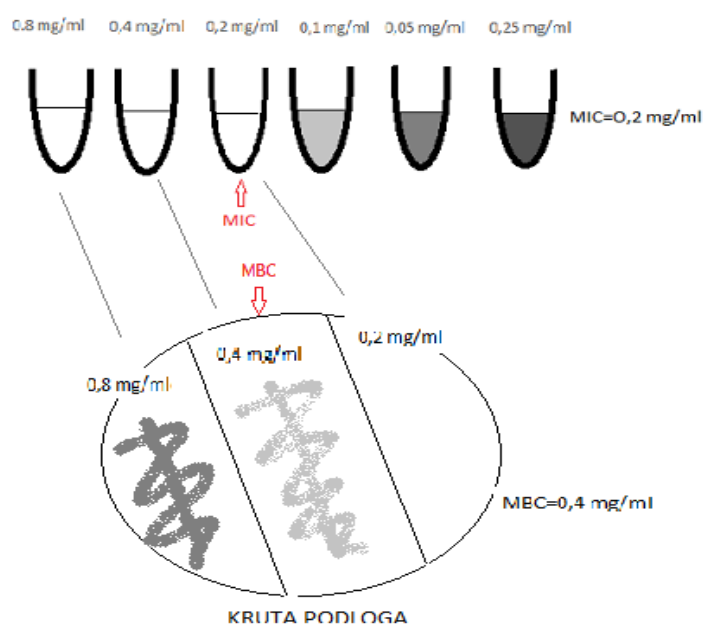
3.6. Određivanje minimalne baktericidne koncentracije

Vrijednost minimalne baktericidne koncentracije (*minimal bactericidal concentration*, MBC) je ona koncentracija antimikrobne tvari (meda) koja će spriječiti rast organizma nakon kultiviranja na čvrstu hranjivu podlogu bez antibiotika (Andrews 2001) i također se izražava u mg/ml. Prema pravilu, MBC je veća ili jednaka od vrijednosti MIC.

Nakon što smo odredili MIC vrijednost, iz epruveta u kojima nije bilo vidljivog znaka rasta bakterija, sterilnom ezom, inokulirali smo svaki uzorak na čvrstu hranjivu podlogu. Uzorke smo ostavili na inkubaciju 24 sata pri 37°C (slika 3). Nakon inkubacije, čvrsta

hranjiva podloga (krvni – hranjivi agar, Oxoid, Basingstoke, UK), s najmanjom koncentracijom meda, na kojem nije bilo rasta bakterije, smatrana je MBC vrijednošću ispitivanog meda u odnosu na ispitanu bakterijsku vrstu (EUCAST).

Vrijednosti MIC i MBC određene su za svaku bakterijsku vrstu tretiranu svakim od navedenih uzoraka meda.



Slika 3. Određivanje vrijednosti minimalne baktericidne vrijednosti

3.7. Određivanje antibakterijske osjetljivosti/otpornosti bakterija na antibiotike nakon tretmana medom

Nakon što su određene vrijednosti minimalne inhibitorne i baktericidne koncentracije meda, izrasle kolonije s krutog medija, na kojem su određene vrijednosti minimalne baktericidne koncentracije, sterilnom ezom smo prenijeli u epruvetu s fiziološkom otopinom. Potom smo epruvetu sa sadržajem mješali kako bismo dobili homogeniziranu smjesu i sterilnim etalerom inokulirali svježe sterilne hranjive Mueller Hinton podloge te je ispitivani uzorak bakterije ponovno podvrgnut testu osjetljivost na antibiotike prema protokolu opisanom u poglavlju 6.4. postupak smo ponovili za svaku ispitanu bakteriju koje su prethodno tretirane testiranim vrstama meda.

3.8. Statistička analiza rezultata

Dobivene podatke iz određivanja vrijednosti minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije obradili smo pomoću Studentova T-testa, a rezultate mjerenja inhibitornih zona, kod ispitivanja osjetljivosti bakterija na antibiotike, analizirali smo statističkom analizom ANOVA.

3.8.1. Studentov T-test

Razlike između testiranih uzoraka meda, obzirom na dobivene vrijednosti MIC i MBC, statistički su analizirani uz pomoć Studentova T-testa. Podaci su uneseni u Microsoft Excel® 2010, a p -vrijednost $\leq 0,05$ smatra se statistički značajnom.

3.8.2. Analiza ANOVA

Obrada podataka je urađena pomoću statističkog programa SPSS. Za ocjenu značajnosti dobivenih rezultata postavljena je razina značajnosti 0.05. Dobivenim rezultatima analizirana je varijanca uz pomoć jednosmjernog ANOVA testa i *post-hoc* Bonferroni testa.

4. REZULTATI

4.1. Rezultati antibiograma

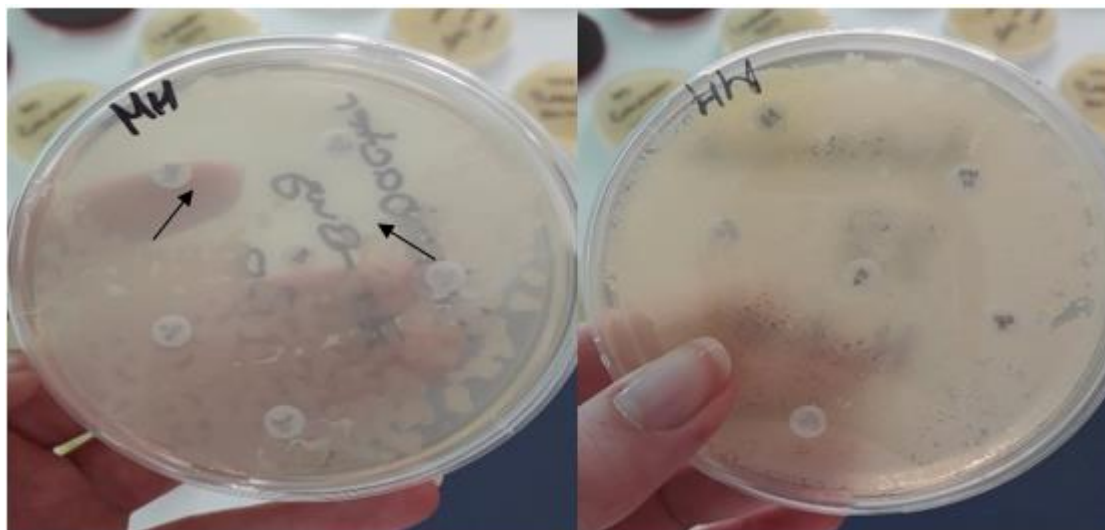
Rezultati iz tablice 4 prikazuju veličine inhibicijskih zona testiranih antibiotika na bakterije, prije nego su bakterije tretirane medom. Vidljive zone inhibicije (slika 4) mjerene su milimetrima u promjeru.

Tablica 3. Rezultati antibiograma prije tretiranja bakterija medom

Antibiotik	<i>A. baumannii</i> Tubus	<i>C. freundii</i> Urin	<i>E. sakazaki</i> Urin	<i>E. coli</i> Urin
AMC	0	0	0	0
CN	0	0	0	0
CXM	0	20	0	0
CAZ	0	30	0	15
FEP	10	30	0	20
FOX	0	0	15	25
GEN	0	20	0	0
A	0	0	0	0
CRO	0	30	0	7
SMZ	0	0	0	0
IPM	0	25	35	31
NIT	0	20	20	24
CT	15	10	15	15
MEM	0	30	30	30
CPD	0	20	0	0
CIP	0	30	0	0
CFM	0	15	0	0
NOR	0	30	0	0
Antibiotik	<i>K. pneumoniae</i> Nos	<i>P. mirabilis</i> Urin	<i>P. aeruginosa</i> Urin	<i>Pr. rettgeri</i> Rana
AMC	0	0	0	0
CN	0	0	0	0
CXM	0	0	0	0
CAZ	20	15	30	0
FEP	20	30	35	20
FOX	25	0	0	22
GEN	0	0	25	20
A	0	0	0	0
CRO	10	15	25	0
SMZ	0	0	0	0
IPM	30	20	30	22
NIT	20	0	0	0
CT	10	0	20	0
MEM	30	30	30	30
CPD	0	0	0	0

CIP	0	0	30	10
CFM	0	0	0	0
NOR	0	0	30	0

AMC - amoksisilin/klavulanska kiselina; CN - cefaleksin; CXM - cefuroksim; CAZ - ceftazidim; FEP - cefepim; FOX - cefoksitin; GEN - gentamicin; A - amikacin; CRO - ceftriakson; SMZ - sulfometaksozol/trimetoprim; IPM - imipenem; NIT - nitrofurantion; CT – cefotaksim; MEM - meropenem; CPD - cefpodoksim; CIP - ciprofloksacin; CFM - cefiksini; NOR - norfoksacin



Slika 4. Antibiogram nakon 24 h inkubacije, testiranje otpornosti bakterije *Citrobacter freundii*: a) ploča s vidljivim zonama inhibicije, označeno strelicama; b) ploča bez vidljivih zona inhibicije

4.2. Rezultati ispitivanja minimalne inhibitorne i baktericidne vrijednosti testiranih medova

Vrijednosti minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne vrijednosti izmjerene su na bagremovom, kaduljinom, lipovom i livadskom medu.

4.2.1. Antimikrobno djelovanje meda bagrema

Bagremov med priređen je u koncentracijama 0,025 mg/ml-0,8 mg/ml te su izmjerene vrijednosti minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije za sve korištene bakterije, uključujući i kontrole. Rezultati su prikazani u tablici 5. Kod svih testiranih bakterija vrijednosti minimalne baktericidne koncentracije bile su jednake ili više od vrijednosti minimalne inhibitorne koncentracije. Kada se uzmu u obzir prikazane vrijednosti minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije, rezultati ukazuju da bagremov

med ima najjače baktericidno djelovanje na *A. baumannii*, dok je ono najslabije kod bakterija *Pr. rettgeri* i *P. mirabilis*.

Tablica 4. Vrijednosti minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije bagremova meda

BAKTERIJA	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0,4	0,4
<i>Citrobacter freundii</i>	0,8	0,8
<i>Enterobacter sakazaki</i>	0,8	0,8
<i>Escherichia coli</i>	0,8	0,8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,4	0,8
<i>Proteus mirabilis</i>	0,8	>0,8
<i>Providentia rettgeri</i>	0,4	>0,8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,8	0,8

Rezultati testiranja pozitivnih (višestruko otpornih) i negativnih (osjetljivih na antibiotike) kontrolnih izolata prikazani su u tablici 6. Rezultati su pokazali kako su potrebne koncentracije iznad 0,8 mg/ml ovog meda kako bi bio inhibiran rast bilo koje ispitivane vrste.

Tablica 5. Vrijednosti minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije bagremovog meda ispitivano na kontrolnim sojevima

BAKTERIJA	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)
KPC – <i>K. pneumoniae</i>	>0,8	>0,8
OXA-48 – <i>K. pneumoniae</i>	>0,8	>0,8
AmpC – <i>P. mirabilis</i>	>0,8	>0,8
<i>E. coli</i> ATCC 25922	>0,8	>0,8

Negativna kontrola: *E. coli* ATCC 25922, pozitivne kontrole: KPC – *K. pneumoniae*, OXA-48 – *K. pneumoniae* i AmpC – *P. mirabilis*

4.2.2. Antimikrobno djelovanje kaduljinog meda

Za ispitivanje, kaduljin med je pripremljen u koncentracijama 0,025 mg/ml-0,8 mg/ml te su izmjerene vrijednosti minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije za sve korištene bakterije, uključujući pozitivne i negativne kontrole. Rezultati prikazani u tablici 7 pokazuju kako je od ispitivanih bakterija *Pr. rettgeri* najosjetljivija na kaduljin med, te ovaj med baktericidno djeluje pri koncentraciji 0,2 mg/ml. Uzimajući u obzir prikazane vrijednosti minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije, za sve ispitivane bakterije, bila je dovoljna najviša primijenjena koncentracija od 0,8 mg/ml, kako bi ovaj med baktericidno i

inhibitorno djelovao na ispitivane bakterije. Kod svih testiranih bakterija vrijednosti minimalne baktericidne koncentracije bile su jednake ili više od vrijednosti minimalne inhibitorne koncentracije.

Tablica 6. Vrijednosti minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije kaduljinog meda

BAKTERIJA	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0,4	0,4
<i>Citrobacter freundii</i>	0,8	0,8
<i>Enterobacter sakazaki</i>	0,8	0,8
<i>Escherichia coli</i>	0,8	0,8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,8	0,8
<i>Proteus mirabilis</i>	0,8	0,8
<i>Providentia rettgeri</i>	0,2	0,2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,4	0,8

Kako je i očekivano, niti jedna primijenjena koncentracija nije bili dovoljna za inhibiranje rasta kontrolnih izolata, kako negativne kontrole *E. coli* ATCC 25922, tako i pozitivnih kontrola KPC – *K. pneumoniae*, OXA-48 – *K. pneumoniae* i AmpC – *P. mirabilis* što je prikazano u tablici 8.

Tablica 7. Vrijednosti minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije kaduljinog meda ispitivano na kontrolnim sojevima

BAKTERIJA	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)
KPC – <i>K. pneumoniae</i>	>0,8	>0,8
OXA-48 – <i>K. pneumoniae</i>	>0,8	>0,8
AmpC – <i>P. mirabilis</i>	>0,8	>0,8
<i>E. coli</i> ATCC 25922	>0,8	>0,8

Negativna kontrola: *E. coli* ATCC 25922, pozitivne kontrole: KPC – *K. pneumoniae*, OXA-48 – *K. pneumoniae* i AmpC – *P. mirabilis*

4.2.3. Antimikrobno djelovanje meda lipe

Rezultati ispitivanja minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije meda lipe, prikazani u tablici 9, pokazali su kako lipov med najbolje baktericidno djelovanje pokazuje na bakteriji *A. baumannii*, dok je za sprječavanje rasta *E. coli* potrebna viša koncentracija lipovog meda od primjenjivane u ovom istraživanju vrste meda. Minimalna

baktericidna koncentracija je jednaka minimalnoj inhibitornoj kod bakterija *A. baumannii*, *C. freundii*, *K. pneumoniae* i *Pr. rettgeri*, dok je kod *E. sakazaki*, *E. coli*, *P. mirabilis* i *P. aeruginosa* minimalna baktericidna koncentracija viša od minimalne inhibitorne koncentracije.

Tablica 8. Vrijednosti minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije meda lipe

BAKTERIJA	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0,2	0,2
<i>Citrobacter freundii</i>	0,8	0,8
<i>Enterobacter sakazakii</i>	0,4	0,8
<i>Escherichia coli</i>	0,8	>0,8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,8	0,8
<i>Proteus mirabilis</i>	0,4	0,8
<i>Providentia rettgeri</i>	0,8	0,8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,4	0,8

Lipov med nema značajno inhibitorno djelovanje na kontrolne izolate, kako za negativnu kontrolu *E. coli* ATCC 25922, tako i za pozitivnu kontrolu KPC – *K. pneumoniae*, OXA-48 – *K. pneumoniae* i AmpC – *P. mirabilis* što je prikazano u tablici 10.

Tablica 9. Vrijednosti minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije lipovog meda ispitivano na kontrolnim sojevima

BAKTERIJA	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)
KPC – <i>K. pneumoniae</i>	>0,8	>0,8
OXA-48 – <i>K. pneumoniae</i>	>0,8	>0,8
AmpC – <i>P. mirabilis</i>	>0,8	>0,8
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,8	>0,8

Negativna kontrola: *E. coli* ATCC 25922, pozitivne kontrole: KPC – *K. pneumoniae*, OXA-48 – *K. pneumoniae* i AmpC – *P. mirabilis*

4.2.4. Antimikrobno djelovanje meda livade

Koncentracije livadskog meda pripravljene su u rasponu 0,025 mg/ml-0,8 mg/ml. Analizirajući vrijednosti minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne vrijednosti livadskog meda, prikazanih u tablici 11, vidljivo je da testirani med inhibitorno djeluje na bakteriju *A. baumannii* gdje je dovoljna koncentracija 0,1 mg/ml kako bi se spriječio raste ove bakterije, međutim za bakterije *En. sakazakii*, *E. coli* i *P. mirabilis*, najviša primijenjena

koncentracija 0,8 mg/ml nije bila dovoljna kako bi djelovala baktericidno. Minimalna baktericidna koncentracija je veća od minimalne inhibitorne koncentracije kod svih ispitivanih bakterija osim *K. pneumoniae* i *P. aeruginosa*, gdje su ove dvije vrijednosti jednake.

Tablica 10. Vrijednosti minimalne inhibitorne i minimalna baktericidne koncentracije livadskog meda

BAKTERIJA	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0,1	0,2
<i>Citrobacter freundii</i>	0,2	0,4
<i>Enterobacter sakazakii</i>	0,8	>0,8
<i>Escherichia coli</i>	0,8	>0,8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,8	0,8
<i>Proteus mirabilis</i>	0,8	>0,8
<i>Providentia rettgeri</i>	0,2	0,4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,4	0,4

Rezultati prikazani u tablici 12 pokazuju kako niti jedna od primijenjenih koncentracija livadskog meda nije bila dovoljna kako bi zaustavila rast kontrolnih izolata.

Tablica 11. Vrijednosti minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije lipovog meda ispitivano na kontrolnim sojevima

BAKTERIJA	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)
KPC – <i>K. pneumoniae</i>	>0,8	>0,8
OXA-48 – <i>K. pneumoniae</i>	>0,8	>0,8
AmpC – <i>P. mirabilis</i>	>0,8	>0,8
<i>E. coli</i> ATCC 25922	>0,8	>0,8

Negativna kontrola: *E. coli* ATCC 25922, pozitivne kontrole: KPC – *K. pneumoniae*, OXA-48 – *K. pneumoniae* i AmpC – *P. mirabilis*

4.2.5. Anitmikrobno djelovanje umjetnog meda

Umjetni med korišten je kao negativna kontrola. Umjetni med ni u jednoj od primjenjivanih koncentracija nije imao ni inhibitorni ni baktericidni učinak, vrijednosti minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije su iznad >0,8 mg/ml za sve ispitivane bakterije (tablica 13).

Tablica 12. Vrijednosti minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije umjetnog meda

BAKTERIJA	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	>0,8	>0,8
<i>Citrobacter freundii</i>	>0,8	>0,8
<i>Enterobacter sakazakii</i>	>0,8	>0,8
<i>Escherichia coli</i>	>0,8	>0,8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>0,8	>0,8
<i>Proteus mirabilis</i>	>0,8	>0,8
<i>Providentia rettgeri</i>	>0,8	>0,8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>0,8	>0,8

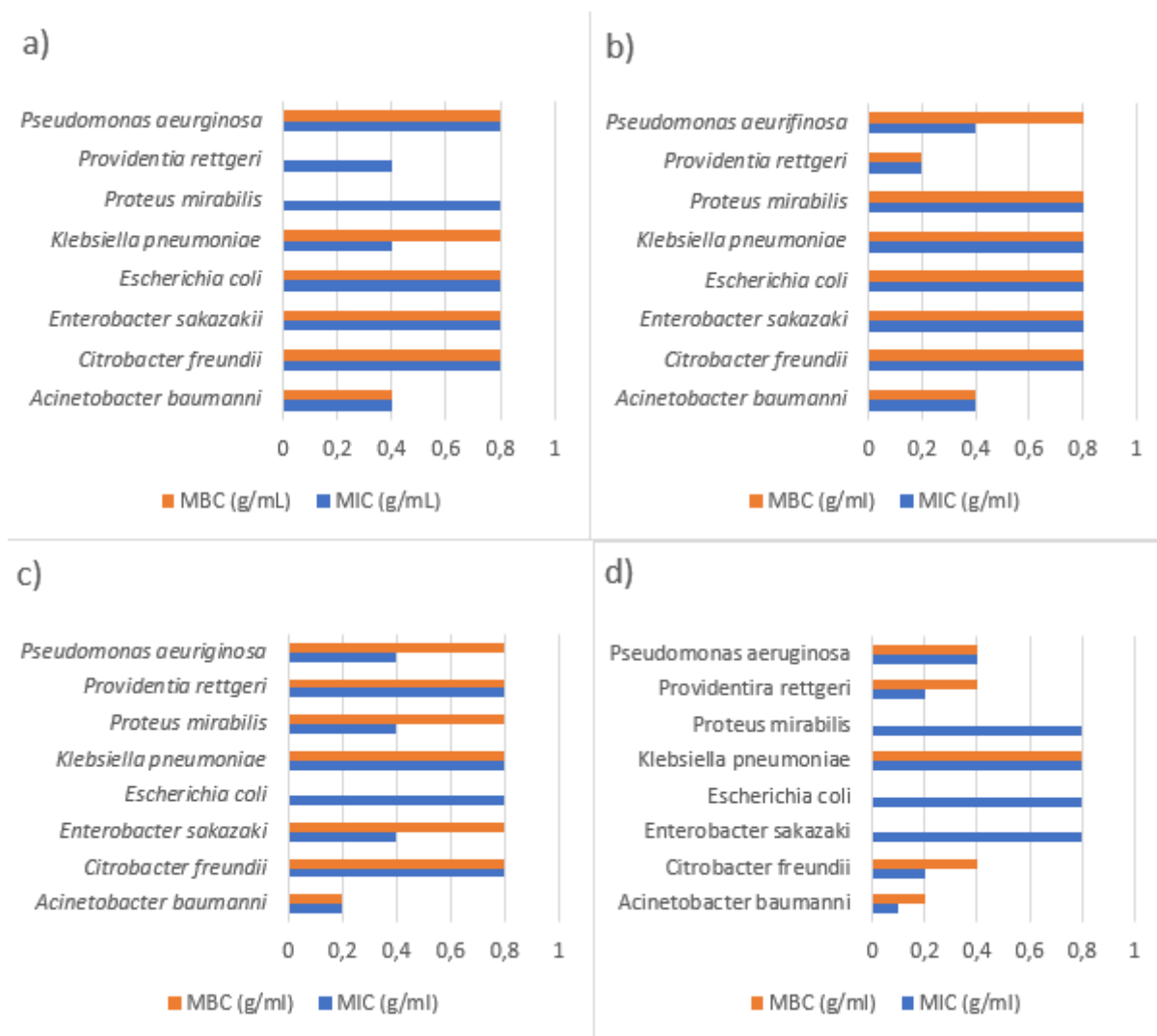
4.2.6. Zbirni rezultati mjerenja

Obrađujući MIC i MBC vrijednosti uz pomoć Studentova T-testa, dobili smo rezultate za med lipe i livade, čije su p vrijednosti niže od 0,05 i te rezultate smatramo statistički značajnim (tablica 14). Utvrđene su i male razlike između meda lipe i livade i zaključeno je kako med lipe ima bolji antibakterijski učinak. p vrijednost za bagremov i kaduljin med je veća od 0,05 i te rezultate ne smatramo statistički značajnim.

Tablica 13. p vrijednost za T-test

Vrsta meda	p vrijednost
Bagrem	0,181
Kadulja	0,175
Lipa	0,003
Livada	0,004

Ono što je grafičkim prikazom na slici 5 uočljivo jest kako med livade ima najniže MIC i MBC vrijednosti kod bakterija *A. baumannii*, *C. freundii*, *Pr. rettgeri* i *Ps. aeruginosa* što potvrđuje njegovo dobro bakteriostatsko djelovanje. Ono što je zajedničko djelovanju meda livade i lipe jest da ni najviša primijenjena koncentracija ove dvije vrste meda (0,8 mg/ml) nije bila dovoljna za baktericidno djelovanje na bakterije *E. coli*. Ovim grafovima također je vidljivo da je MBC vrijednost kod svakog ispitivanog meda jednaka ili veća od MIC vrijednosti, kao što je i očekivano.



Slika 5. Grafički prikaz vrijednosti minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije za različite vrste meda: a) bagrem b) kadulja c) lipa d) livada

4.3. Rezultati antibiograma nakon tretmana bakterija medom

U sljedećim tablicama prikazani su rezultati antibiograma nakon tretmana medom i njihova usporedba s rezultatima antibiograma dobivenim prije tretmana medom. Zone inhibicijskog djelovanja mjerene su u milimetrima.

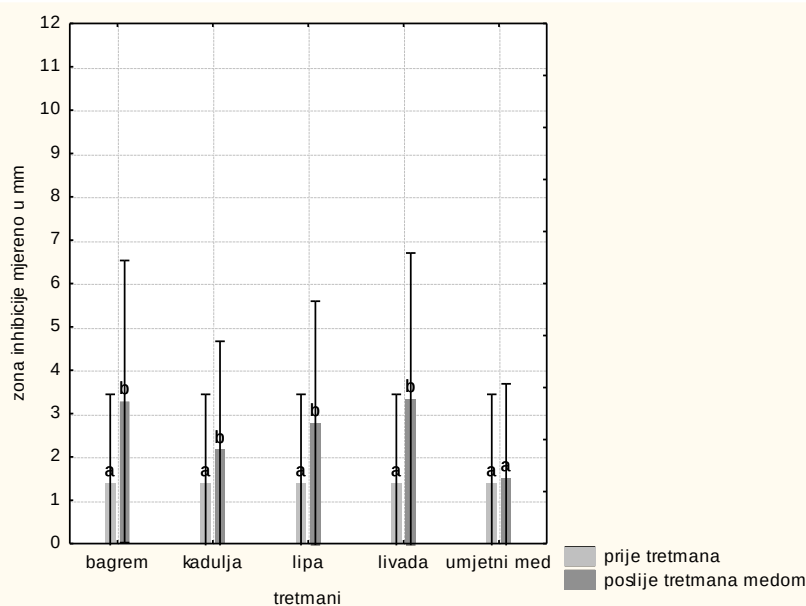
4.3.1. *Acinetobacter baumannii*

Svi antibiotici koji su pokazali inhibicijsko djelovanje na rast bakterije *A. baumannii* prije tretiranja medom, bili su djelotvorniji nakon što je bakterija tretirana medom, te se veličina inhibicijskih zona povećala. Rezultati mjerenja zone inhibicije nakon tretmana antibioticima prikazani su u tablici 15. U slučaju antibiotika sulfametoksazol/trimetoprim i gentamicin, gdje prije tretmana medom nije dokazano inhibitorno djelovanje antibiotika, tretman pojedinim vrstama meda doveo je do inhibitornog učinka navedenih antibiotika. Statistički je utvrđeno kako su sve vrste testiranih medova osim, umjetnog, imali utjecaj na povećanje inhibicijskih zona, a najveći utjecaj imali su medovi bagrema i livade (slika 6).

Tablica 14. Rezultati antibiograma bakterije *Acinetobacter baumannii* prije i nakon tretmana različitim vrstama meda

antibiotik	Zone inhibicije prije tretmana medom (mm)	Zone inhibicije nakon tretmana medom (mm)				
	BEZ MEDA	BAGREM	KADULJA	LIPA	LIVADA	UMJETNI MED
AMC	0	0	0	0	0	0
CN	0	0	0	0	0	0
CXM	0	0	0	0	0	0
CAZ	0	0	0	0	0	0
FEP	10	15	11	14	20	12
FOX	0	0	0	0	0	0
GEN	0	14	13	10	11	0
A	0	0	0	0	0	0
CRO	0	0	0	0	0	0
SMZ	0	10	0	8	10	0
IPM	0	0	0	0	0	0
NIT	0	0	0	0	0	0
CT	15	20	15	18	19	15
MEM	0	0	0	0	0	0
CPD	0	0	0	0	0	0
CIP	0	0	0	0	0	0
CFM	0	0	0	0	0	0
NOR	0	0	0	0	0	0

AMC-amoksisicilin/klavulanska kiselina; CN-cefaleksin; CXM-cefuroksim; CAZ-ceftazidim; FEP-cefepim; FOX-cefoksitin; GEN-gentamicin; A-amikacin; CRO-ceftriakson; SMZ-sulfometaksozol/trimetoprim; IPM-imipenem; NIT-nitrofurantion; CT-cefotaksim; MEM-meropenem; CPD-cefpodoksim; CIP-ciprofloksacin; CFM-cefiksim; NOR-norfoksacin



Slika 6. Grafički prikaz zona inhibicije prije i zona inhibicije nakon tretmana različitim vrstama meda bakterije *Acinetobacter baumannii*. Intervali prikazuju $\pm$ SD, a aritmetičke sredine označene s istim slovima "a" se ne razlikuju statistički značajno s intervalom od 95% pouzdanosti, a gdje se razlikuju označeni su slovima "b" (jednosmjerna Anova).

Statističkom analizom rezultata, uz pomoć analize ANOVA, nisu utvrđene statistički značajne razlike zone inhibicije antibiotika prije i nakon tretiranja različitim vrstama meda bakterije *A. baumannii* ($F=0.370$, $p>0.05$). Razina značajnosti (sig) je 0.830.

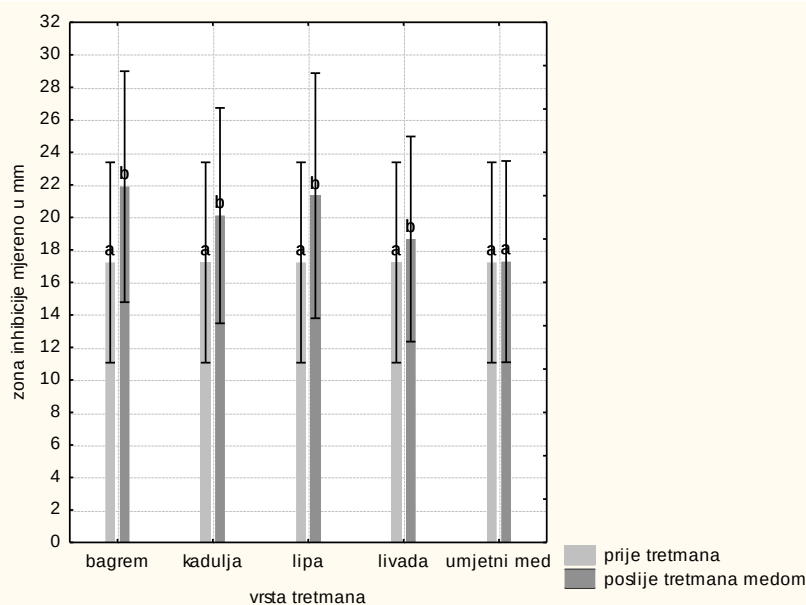
4.3.2. *Citrobacter freundii*

Tablica 16. prikazuje rezultate antibiograma ispitivane na bakteriji *C. freundii*. Iz rezultata je uočljivo da se osjetljivost na antibiotike značajno povećala gotovo na sve antibiotike koji su imali inhibicijsko djelovanje na rast *C. freundii* i prije nego je bakterija bila tretirana pojedinim vrstama meda. Osobito su značajno djelovali med lipe i med bagrema. Djelovanje je najviše vidljivo kod antibiotika sulfometoksazol-trimetoprim, gdje su se zone inhibicije značajno povećale. Na slici 7 grafički je prikazano kako su bagremov i lipov med imali najveći utjecaj na porast inhibicijskih zona ispitivanih antibiotika.

Tablica 15. Rezultati antibiograma bakterije Citrobacter freundii prije i nakon tretmana različitim vrstama meda

antibiotik	Zone inhibicija prije tretiranja medom (mm)	Zone inhibicije nakon tretiranja medom (mm)				
	BEZ MEDA	BAGREM	KADULJA	LIPA	LIVADA	UMJETNI MED
AMC	0	0	0	0	0	0
CN	0	15	0	0	0	0
CXM	20	28	25	28	22	20
CAZ	30	36	37	33	33	31
FEP	30	38	35	37	30	29
FOX	0	0	0	0	0	0
GEN	20	27	24	22	20	20
A	0	0	0	0	0	0
CRO	30	33	30	33	28	30
SMZ	0	10	12	14	6	0
IPM	25	33	28	33	25	25
NIT	20	25	20	25	19	20
CT	10	18	15	18	15	10
MEM	30	30	30	33	30	30
CPD	20	26	25	29	25	22
CIP	30	37	34	40	36	30
CFM	15	15	12	16	14	14
NOR	30	38	35	39	33	30

AMC-amoksisilin/klavulanska kiselina; CN-cefaleksin; CXM-cefuroksim; CAZ-ceftazidim; FEP-cefepim; FOX-cefoksitin; GEN-gentamicin; A-amikacin; CRO-ceftriakson; SMZ-sulfometaksozol/trimetoprim; IPM-imipenem; NIT-nitrofurantion; CT-cefotaksim; MEM-meropenem; CPD-cefpodoksim; CIP-ciprofloksacin; CFM-cefiksim; NOR-norfoksacin



Slika 7. Grafički prikaz zona inhibicije prije i zona inhibicije antibiograma nakon tretmana različitim vrstama meda bakterije *Citrobacter freundii*. Intervali prikazuju $\pm$ SD, aritmetičke sredine označene s istim slovima "a" se ne razlikuju statistički značajno s intervalom od 95% pouzdanosti, a gdje se razlikuju označeni su slovima "b" (jednosmjerna Anova).

Analizom testa ANOVA, nisu utvrđene statistički značajne razlike zone inhibicije antibiotika prije i nakon tretiranja različitim vrstama meda bakterije *C. freundii* ($F=0.358$, $p>0.05$).

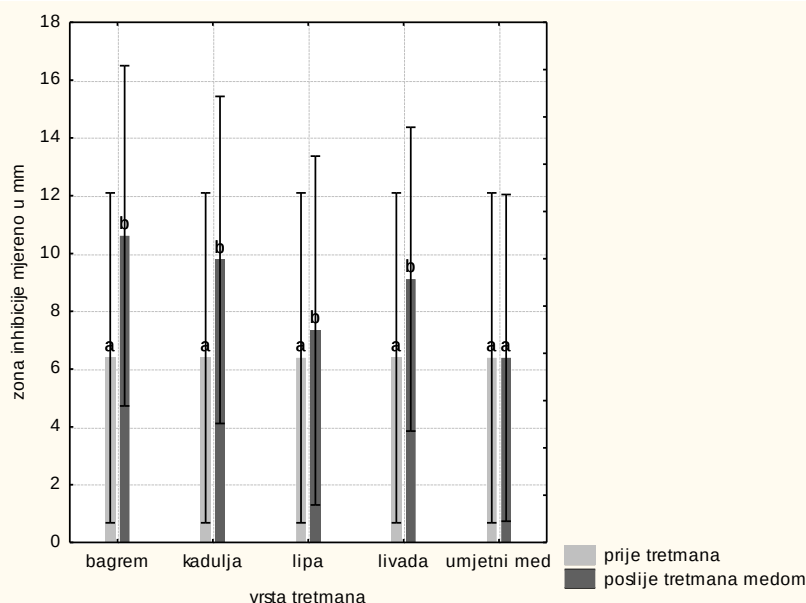
4.3.3. *Enterobacter sakazakii*

Analizirajući podatke iz tablice 17, uočeno je kako prije tretmana ispitivanim medovima, inhibicijski su djelovali na rast bakterije *En. sakazakii* antibiotici cefoksitin, imipenem, nitrofurantion, cefotaksim i meropenem. Veličine inhibicijskih zona navedenih antibiotika bile su iste ili povećane i nakon tretmana pojedinim vrstama meda. Značajno je spomenuti kako su se zone inhibicije sljedećih antibiotika pojavile nakon tretmana medom, što znači da je med stimulirao djelovanje antibiotika cefaleksina, ceftazidima, cefepima, gentamicina, ceftriaksona i sulfmetaksozola/trimetoprima. Utvrđeno je i grafički prikazano na slici 8, kako med bagrema ima daleko najveći utjecaj na povećanje inhibicijskih zona testiranih antibiotika.

Tablica 16. Rezultati antibiograma bakterije *Entertobacter sakazakii* prije i nakon tretmana različitim vrstama meda

Antibiotik	Zone inhibicije prije tretiranja medom (mm)	Zone inhibicije nakon tretiranja medom (mm)				
	BEZ MEDA	BAGREM	KADULJA	LIPA	LIVADA	UMJETNI MED
AMC	0	12	0	0	8	0
CN	0	10	8	0	7	0
CXM	0	0	0	0	7	0
CAZ	0	10	8	8	8	0
FEP	0	10	8	0	7	0
FOX	15	18	15	16	15	16
GEN	0	8	10	0	0	0
A	0	0	0	0	0	0
CRO	0	10	10	0	0	0
SMZ	0	0	8	0	12	0
IPM	35	39	38	38	35	33
NIT	20	20	22	22	20	20
CT	15	20	17	18	15	15
MEM	30	34	32	30	30	31
CPD	0	0	0	0	0	0
CIP	0	0	0	0	0	0
CFM	0	0	0	0	0	0
NOR	0	0	0	0	0	0

AMC-amoksicilin/klavulanska kiselina; CN-cefaleksin; CXM-cefuroksim; CAZ-ceftazidim; FEP-cefepim; FOX-cefoksitin; GEN-gentamicin; A-amikacin; CRO-ceftriakson; SMZ-sulfometaksozol/trimetoprim; IPM-imipenem; NIT-nitrofurantion; CT-cefotaksim; MEM-meropenem; CPD-cefpodoksim; CIP-ciprofloxacina; CFM-cefiksim; NOR-norfoksacin



Slika 8. Grafički prikaz zona inhibicije prije i zona inhibicije nakon tretmana različitim vrstama meda bakterije *Enterobacter sakazakii*. Intervali prikazuju $\pm$ SD, aritmetičke sredine označene s istim slovima "a" se ne razlikuju statistički značajno s intervalom od 95% pouzdanosti, a gdje se razlikuju označeni su slovima "b" (jednosmjerna Anova).

Nakon što su rezultati analizirani ANOVA testom, utvrđeno je da nema statistički značajne razlike zone inhibicije prije i nakon tretiranja različitim vrstama meda antibiograma bakterije *En. sakazakii* ($F = 0.415$, $p > 0.05$).

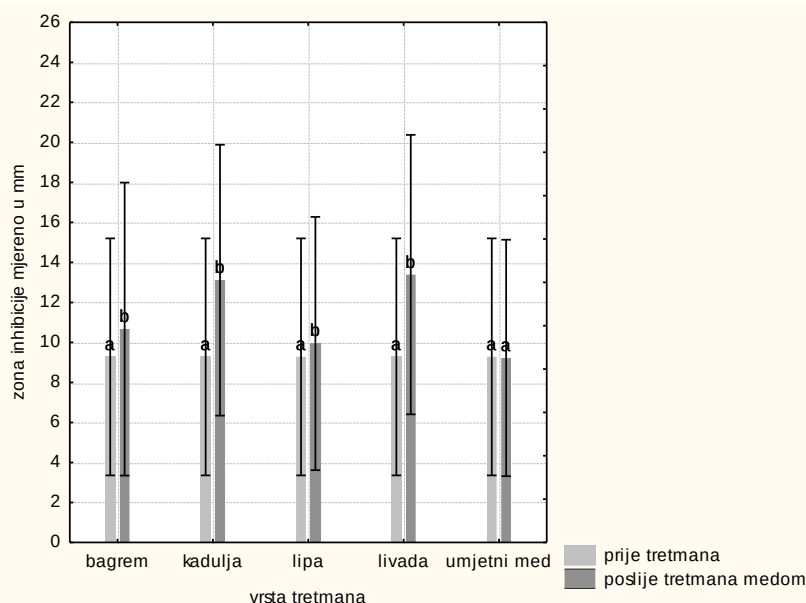
4.3.4. *Escherichia coli*

Rezultati iz tablice 18 prikazuju kako su se zone inhibicije rasta *E. coli* bitno povećale pod utjecajem kaduljinog meda i antibiotika cefepim, te u kombinaciji meda livade i antibiotika gentamicin i meda kadulje i antibiotika gentamicin. Pojačano je i inhibicijsko djelovanje antibiotika imipenem, meropenem, cefotaksim i norfoksacin nakon tretmana pojedinim vrstama meda. Prije nego je bakterija *E. coli* tretirana medom, antibiotik sulfometaksozol/trimetoprim nije pokazao inhibicijsko djelovanje, no nakon što je bakterija tretirana medom kadulje i livade, ovaj antibiotik je pokazao inhibicijsku zonu. Na slici 9, grafički je prikazan utjecaj ispitivanih medova na povećanje inhibicijskih zona i vidljivo je kako kaduljin i livadski med imaju najbolji utjecaj na djelovanje antibiotika.

Tablica 17. Rezultati antibiograma bakterije *Escherichia coli* prije i nakon tretmana različitim vrstama meda

antibiotik	Zone inhibicije prije tretmana medom (mm)	Zone inhibicije nakon tretmana medom (mm)				
	BEZ MEDA	BAGREM	KADULJA	LIPA	LIVADA	UMJETNI MED
AMC	0	0	0	0	0	0
CN	0	0	0	0	0	0
CXM	0	0	0	0	7	0
CAZ	15	19	17	19	15	15
FEP	20	20	26	22	22	20
FOX	25	30	22	25	29	25
GEN	0	0	18	0	16	0
A	0	0	0	0	0	0
CRO	7	0	12	7	8	7
SMZ	0	0	17	0	10	0
IPM	31	38	40	30	33	31
NIT	24	28	27	23	33	24
CT	15	18	22	17	28	14
MEM	30	39	35	36	40	30
CPD	0	0	0	0	0	0
CIP	0	0	0	0	0	0
CFM	0	0	0	0	0	0
NOR	0	0	0	0	0	0

AMC-amoksisilin/klavulanska kiselina; CN-cefaleksin; CXM-cefuroksim; CAZ-ceftazidim; FEP-cefepim; FOX-cefoksitin; GEN-gentamicin; A-amikacin; CRO-ceftriakson; SMZ-sulfometaksozol/trimetoprim; IPM-imipenem; NIT-nitrofurantion; CT-cefotaksim; MEM-meropenem; CPD-cefpodoksim; CIP-ciprofloksacin; CFM-cefiksim; NOR-norfoksacin



Slika 9. Grafički prikaz zona inhibicije prije i zona inhibicije nakon tretmana različitim vrstama meda bakterije *Escherichia coli*. Intervali prikazuju $\pm$ SD, aritmetičke sredine označene s istim slovima "a" se ne razlikuju statistički značajno s intervalom od 95% pouzdanosti, a gdje se razlikuju označeni su slovima "b" (jednosmjerna Anova).

Nisu utvrđene statistički značajne razlike zone inhibicije prije i nakon tretiranja različitim vrstama meda antibiograma bakterije *E. coli* ($F = 0.348$, $p > 0.05$). Razina značajnosti (sig) je 0.045.

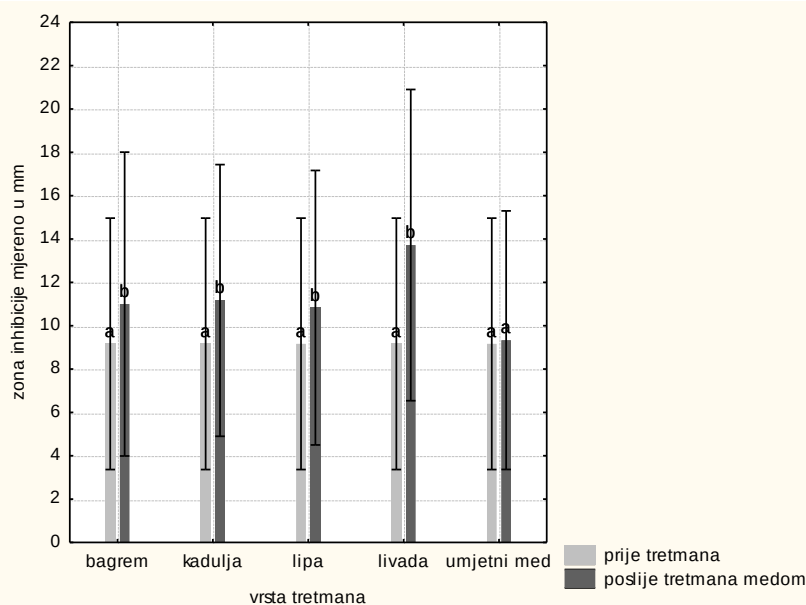
4.3.5. *Klebsiella pneumoniae*

Zone inhibicije kod bakterije *K. pneumoniae*, nakon tretiranja medom, značajno su povećane, posebice u sinergističkom djelovanju livadskog meda s antibioticima ceftazidim, cefepim, ceftriakson i imipenem. Na inhibitorno djelovanje antibiotika stimulativno djeluje i med bagrema. U tablici 19 prikazani su i ostali rezultati od kojih se još ističe sinergističko djelovanje meda kadulje i antibiotika ceftazidim, te meda kadulje i antibiotika gentamicina. Antibiotik gentamicin, prije tretiranja medom, nije imao inhibitorni učinak na rast bakterije *K. pneumoniae*, što se promijenilo nakon što je bakterija tretirana medom kadulje, lipe i livade. Med bagrema nije imao učinka na djelovanje antibiotika gentamicin. Grafički prikazano na slici 10 kako svi testirani medovi, osim umjetnog, imaju utjecaja na rast inhibicijskih zona, a najbolje se ističe livadski med.

Tablica 18. Rezultati antibiograma bakterije *Klebsiella pneumoniae* prije i nakon tretmana različitim vrstama meda

Antibiotik	Zone inhibicije prije tretmana medom (mm)	Zone inhibicije nakon tretmana medom (mm)				
	BEZ MEDA	BAGREM	KADULJA	LIPA	LIVADA	UMJETNI MED
AMC	0	0	0	0	0	0
CN	0	0	0	0	0	0
CXM	0	0	0	0	0	0
CAZ	20	20	26	22	27	20
FEP	20	22	20	22	25	20
FOX	25	30	28	25	30	25
GEN	0	0	16	7	15	0
A	0	0	0	0	0	0
CRO	10	10	10	10	18	10
SMZ	0	0	0	0	0	0
IPM	30	36	30	33	38	30
NIT	20	26	22	25	27	20
CT	10	16	16	18	25	10
MEM	30	38	33	33	36	33
CPD	0	0	0	0	6	0
CIP	0	0	0	0	0	0
CFM	0	0	0	0	0	0
NOR	0	0	0	0	0	0

AMC-amoksisilin/klavulanska kiselina; CN-cefaleksin; CXM-cefuroksim; CAZ-ceftazidim; FEP-cefepim; FOX-cefoksitin; GEN-gentamicin; A-amikacin; CRO-ceftriakson; SMZ-sulfometaksozol/trimetoprim; IPM-imipenem; NIT-nitrofurantion; CT-cefotaksim; MEM-meropenem; CPD-cefpodoksime; CIP-ciprofloksacin; CFM-cefiksim; NOR-norfoksacin



Slika 10. Grafički prikaz zona inhibicije prije i zona inhibicije nakon tretmana različitim vrstama meda bakterije *Klebsiella pneumoniae*. Intervali prikazuju $\pm$ SD, aritmetičke sredine označene s istim slovima "a" se ne razlikuju statistički značajno s intervalom od 95% pouzdanosti, a gdje se razlikuju označeni su slovima "b" (jednosmjerna Anova).

Nisu utvrđene statistički značajne razlike zone inhibicije prije i nakon tretiranja različitim vrstama meda antibiograma bakterije *K. pneumoniae* ($F=0.278$, $p>0.05$).

4.3.6. *Proteus mirabilis*

Analizirajući rezultate antibiograma koji je rađen nakon tretiranja bakterija medom, iz tablice 20 zaključuje se kako sva četiri testirana meda pokazuju izuzetno dobro djelovanje gotovo na sve antibiotike. Prema mjerenjima zona inhibicije, najviše se ističe med bagrema koji je svojim djelovanjem povećao inhibicijske zone skoro svih testiranih antibiotika. Najslabije djelovanje med bagrema je imao na inhibicijski učinak antibiotika meropenema. Osim bagremovog meda, jako dobar utjecaj na povećanje zona inhibicije testiranih antibiotika, pokazao je i livadski med. Antibiotici amoksisilin/klavulanska kiselina, cefaleksin, cefuroksim, cefoksitin, gentamicin, amikacin, sulfametaksazol/trimetoprim, nitrofurantion, cefotaksim, cefpodoksim, ciprofloksacin, cefiksim i norfoksacin nisu sprječavali rast bakterije *P. mirabilis* prije nego je ona tretirana medom.

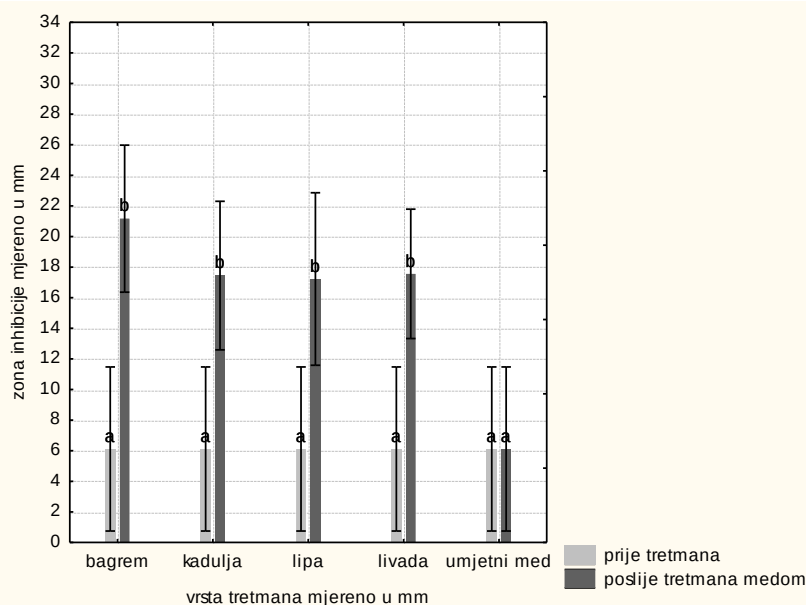
Nakon tretmana, med je sinergistički djelovao sa svim antibioticima te se pojačao njihov inhibicijski učinak na rast ispitivane bakterije. Statistički je utvrđeno i grafički prikazano da

postoje značajne razlike između veličina zona inhibicija prije i nakon tretiranja medom, najbolje se ističe med bagrema (slika 11).

Tablica 19. Rezultati antibiograma bakterije *Proteus mirabilis* prije i nakon tretmana različitim vrstama meda

Antibiotik	Zone inhibicije prije tretmana medom (mm)	Zone inhibicije nakon tretmana medom (mm)				
	BEZ MEDA	BAGREM	KADULJA	LIPA	LIVADA	UMJETNI MED
AMC	0	13	15	12	16	0
CN	0	15	12	17	14	0
CXM	0	18	9	22	11	0
CAZ	15	30	19	30	27	15
FEP	30	40	35	35	33	30
FOX	0	17	10	14	16	0
GEN	0	12	17	17	11	0
A	0	11	15	12	8	0
CRO	15	36	30	30	27	15
SMZ	0	17	10	0	0	0
IPM	20	33	33	30	25	20
NIT	0	23	0	0	14	0
CT	0	16	15	0	16	0
MEM	30	35	34	34	31	30
CPD	0	26	22	21	22	0
CIP	0	14	15	16	18	0
CFM	0	10	13	10	12	0
NOR	0	15	10	10	15	0

AMC-amoksisicilin/klavulanska kiselina; CN-cefaleksin; CXM-cefuroksim; CAZ-ceftazidim; FEP-cefepim; FOX-cefoksitin; GEN-gentamicin; A-amikacin; CRO-ceftriakson; SMZ-sulfometaksozol/trimetoprim; IPM-imipenem; NIT-nitrofurantion; CT-cefotaksim; MEM-meropenem; CPD-cefpodoksime; CIP-ciprofloksacin; CFM-cefiksime; NOR-norfoksacin



Slika 11. Grafički prikaz zona inhibicije prije i zona inhibicije nakon tretmana različitim vrstama meda bakterije *Proteus mirabilis*. Intervali prikazuju $\pm$ SD, aritmetičke sredine označene s istim slovima "a" se ne razlikuju statistički značajno s intervalom od 95% pouzdanosti, a gdje se razlikuju označeni su slovima "b" (jednosmjerna Anova).

Utvrđene su statistički značajne razlike zone inhibicije prije i nakon tretiranja različitim vrstama meda antibiograma bakterije *P. mirabilis* ($F=5.801$, $p<0.05$). Prema tome, razina značajnosti (sig.) iznosi 0.000.

Tablica 20. Naknadno testiranje razlika između pojedinih vrsta medova i između situacija prije tretmana pojedinim medom i nakon tretmana pojedinim medom (primjena Bonferroni post hoc testu)

	Bez meda	Bagrem	Kadulja	Lipa	Livada
Bagrem	0.014				
Kadulja	0.000	1.000			
Lipa	0.010	1.000	1.000		
Livada	0.011	1.000	1.000	1.000	
Umjetni	1.000	0.021	0.000	0.015	0.017

Statistički značajno se razlikuju zone inhibicije bez meda i nakon svih drugih tretmana, osim tretmana umjetnim medom. Zone inhibicije bez meda i zone inhibicije tretmana umjetnim medom su značajno niže u odnosu nakon primjenu tretmana ostalih četiri medova. Između različitih vrsta tretmana nije utvrđena statistički značajna razlika (tablica 21).

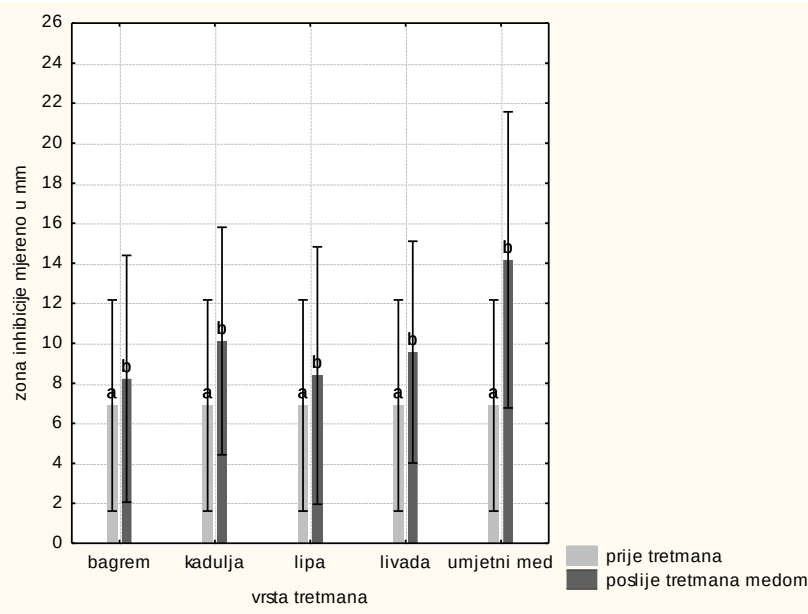
4.3.7. *Providentia rettgeri*

Analizom rezultata prikazanih u tablici 22, uočeno je kako med kadulje pokazuje inhibicijsko djelovanje u sinergizmu s antibioticima amoksicilin i cefuroksim na sprječavanje. Prikazani rezultati potvrđuju dobro djelovanje i ostala tri testirana meda na antibiotike cefepin, cefoxitin, imipenem i cefiksim. Grafički je prikazano na slici 12 kako med kadulje ima najveći utjecaj na porast inhibicijskih zona testiranih antibiotika.

Tablica 21. Rezultati antibiograma bakterije *Providentia rettgeri* prije i nakon tretmana različitim vrstama meda

Antibiotik	Zone inhibicije prije tretmana medom (mm)	Zone inhibicije nakon tretmana medom (mm)				
	BEZ MEDA	BAGREM	KADULJA	LIPA	LIVADA	UMJETNI MED
AMC	0	0	16	0	10	0
CN	0	0	0	0	0	0
CXM	0	0	15	0	0	0
CAZ	0	0	13	0	0	0
FEP	20	29	26	33	22	20
FOX	22	22	22	24	28	22
GEN	20	23	24	22	22	22
A	0	0	0	0	0	0
CRO	0	0	0	0	0	0
SMZ	0	0	0	0	0	0
IPM	22	27	26	27	23	23
NIT	0	0	0	0	0	0
CT	0	0	0	0	13	0
MEM	30	32	30	33	30	32
CPD	0	0	0	0	0	0
CIP	10	15	10	12	15	10
CFM	0	0	0	0	0	0
NOR	0	0	0	0	9	0

AMC-amoksicilin/klavulanska kiselina; CN-cefaleksin; CXM-cefuroksim; CAZ-ceftazidim; FEP-cefepim; FOX-cefoksitin; GEN-gentamicin; A-amikacin; CRO-ceftriakson; SMZ-sulfometaksozol/trimetoprim; IPM-imipenem; NIT-nitrofurantion; CT-cefotaksim; MEM-meropenem; CPD-cefpodoksim; CIP-ciprofloxacina; CFM-cefiksim; NOR-norfoksacin



Slika 12. Grafički prikaz zona inhibicije prije i zona inhibicije nakon tretmana različitim vrstama meda bakterije *Providentia rettgeri*. Intervali prikazuju $\pm$ SD, aritmetičke sredine označene s istim slovima "a" se ne razlikuju statistički značajno s intervalom od 95% pouzdanosti, a gdje se razlikuju označeni su slovima "b" (jednosmjerna Anova).

Nisu utvrđene statistički značajne razlike zone inhibicije prije i nakon tretiranja različitim vrstama meda antibiograma bakterije *Pr. rettgeri* ($F=0.206$, $p>0.05$).

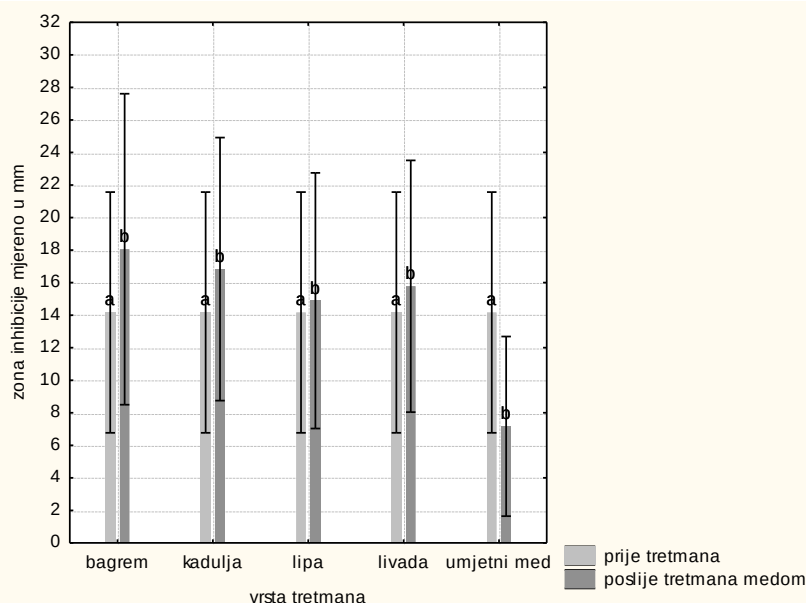
4.3.8. *Pseudomonas aeruginosa*

Iz dobivenih rezultata prikazanih u tablici 23, vidljivo je inhibitorno djelovanje antibiotika ceftadizim, cefepim, imipenem, meropenem, ciprofloksacin i norfoksacin. Valja naglasiti kako je med bagrema imao najviše utjecaja na povećanje zone inhibicije na prethodno navedene antibiotike. Med kadulje povećao je učinkovitost antibiotika amikacin, ovaj antibiotik nije imao inhibitornog učinka na rast ispitivane bakterije prije nego je ona bila tretirana navedenim medom. Na slici 13 grafički je prikazan utjecaj ispitivanih medova na povećanje inhibicijskih zona, te je vidljivo kako je nakon tretmana bagremovim medom došlo do najviše povećanja inhibicijskih zona.

Tablica 22. Rezultati antibiograma bakterije *Pseudomonas aeruginosa* prije i nakon tretmana različitim vrstama meda

Antibiotik	Zone inhibicije prije tretmana medom (mm)	Zone inhibicije nakon tretmana medom (mm)				
	BEZ MEDA	BAGREM	KADULJA	LIPA	LIVADA	UMJETNI MED
AMC	0	0	0	0	0	0
CN	0	0	0	0	0	0
CXM	0	0	0	0	0	0
CAZ	30	41	37	33	30	29
FEP	35	40	33	28	33	35
FOX	0	0	0	0	11	0
GEN	25	30	0	25	25	25
A	0	0	27	0	0	0
CRO	25	22	33	26	30	25
SMZ	0	0	18	0	0	0
IPM	30	38	30	33	33	30
NIT	0	0	0	0	0	0
CT	20	30	20	20	20	20
MEM	30	44	35	38	35	30
CPD	0	0	0	0	0	0
CIP	30	40	32	30	33	31
CFM	0	0	0	0	0	0
NOR	30	40	38	35	34	30

AMC-amoksisilin/klavulanska kiselina; CN-cefaleksin; CXM-cefuroksim; CAZ-ceftazidim; FEP-cefepim; FOX-cefoksitin; GEN-gentamicin; A-amikacin; CRO-ceftriakson; SMZ-sulfometaksozol/trimetoprim; IPM-imipenem; NIT-nitrofurantion; CT-cefotaksim; MEM-meropenem; CPD-cefpodoksime; CIP-ciprofloksacin; CFM-cefiksime; NOR-norfloksacin



Slika 13. Grafički prikaz zona inhibicije prije i zona inhibicije nakon tretmana različitim vrstama meda antibiograma bakterije *Pseudomonas aeruginosa*. Intervali prikazuju $\pm$ SD, aritmetičke sredine označene s istim slovima "a" se ne razlikuju statistički značajno s intervalom od 95% pouzdanosti, a gdje se razlikuju označeni su slovima "b" (jednosmjerna Anova).

Nisu utvrđene statistički značajne razlike zone inhibicije prije i nakon tretiranja različitim vrstama meda antibiograma bakterije *Ps. aeruginosa* ($F=0.160$, $p>0.05$). Razina značajnosti iznosi 0.958.

4.4. Kontrolni sojevi

4.4.1. Pozitivna kontrola KPC-Klebsiella pneumoniae

Pozitivna kontrola, soj KPC – *K. pneumoniae*, kao što je i očekivano, nije znatno promijenila veličine zone inhibicije pod synergističkim utjecajem bilo kojeg ispitivanog meda i bilo koje testiranog antibiotika.

Tablica 23. Rezultati antibiograma bakterije KPC-K. pneumoniae prije i nakon tretmana različitim vrstama meda

Antibiotik	Zone inhibicije prije tretmana medom (mm)	Zone inhibicije nakon tretmana medom (mm)			
	BEZ MEDA	BAGREM	KADULJA	LIPA	LIVADA
AMC	0	0	0	0	0

CN	0	0	0	0	0
CXM	0	0	0	0	0
CAZ	0	0	0	0	0
FEP	0	0	0	0	0
FOX	0	0	0	0	0
GEN	21	18	21	21	20
A	0	0	0	0	0
CRO	0	0	0	0	0
SMZ	20	20	23	25	22
IPM	0	9	9	8	0
NIT	0	9	0	10	0
CT	15	15	15	16	14
MEM	0	0	0	0	0
CPD	0	0	0	0	0
CIP	0	0	0	0	0
CFM	0	0	0	0	0
NOR	0	0	0	0	0

AMC-amoksisicilin/klavulanska kiselina; CN-cefaleksin; CXM-cefuroksim; CAZ-ceftazidim; FEP-cefepim; FOX-cefoksitin; GEN-gentamicin; A-amikacin; CRO-ceftriakson; SMZ-sulfometaksozol/trimetoprim; IPM-imipenem; NIT-nitrofurantion; CT-cefotaksim; MEM-meropenem; CPD-cefpodoksim; CIP-ciprofloksacin; CFM-cefiksim; NOR-norfoksacin

4.4.2. Negativna kontrola *Escherichia coli* ATCC 25922

Soj *E. coli* ATCC 25922 ima neznatan pomak u veličini zone inhibicije pri djelovanju sve četiri vrste meda s antibiotikom ceftriaksonom. Ostali rezultati nisu značajni, niti su pokazali neke velike promjene.

Tablica 24. Rezultati antibiograma bakterije *Escherichia coli* ATCC 25922 prije i nakon tretmana različitim vrstama meda

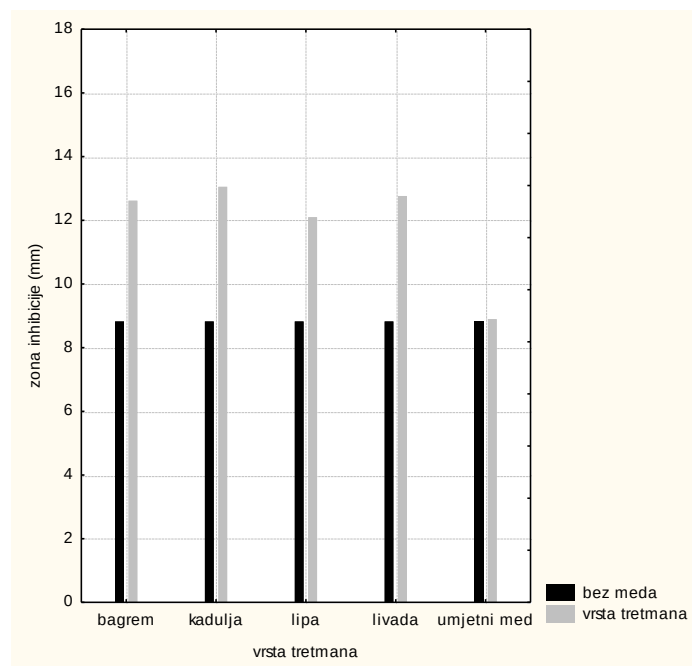
Antibiotik	Zone inhibicije prije tretmana medom (mm)	Zone inhibicije nakon tretmana medom (mm)			
	BEZ MEDA	BAGREM	KADULJA	LIPA	LIVADA
AMC	12	14	10	15	16
CN	13	12	13	13	14
CXM	20	20	20	21	22
CAZ	26	27	27	26	25
FEP	31	31	33	30	28
FOX	20	22	23	22	23

GEN	19	22	22	22	22
A	0	0	0	0	0
CRO	25	30	30	30	31
SMZ	28	32	30	33	33
IPM	29	30	34	30	31
NIT	20	20	23	20	21
CT	13	16	16	16	16
MEM	30	30	32	32	31
CPD	22	23	23	24	22
CIP	30	30	31	32	32
CFM	16	17	17	26	17
NOR	24	27	22	28	29

AMC-amoksisilin/klavulanska kiselina; CN-cefaleksin; CXM-cefuroksim; CAZ-ceftazidim; FEP-cefepim; FOX-cefoksitin; GEN-gentamicin; A-amikacin; CRO-ceftriakson; SMZ-sulfometaksozol/trimetoprim; IPM-imipenem; NIT-nitrofurantion; CT-cefotaksim; MEM-meropenem; CPD-cefpodoksim; CIP-ciprofloksacin; CFM-cefiksini; NOR-norfoksacin

4.5. Zbirni rezultati mjerenja

Uspoređujući rezultate mjerenja inhibicijskih zona te statističkom obradom istih, utvrdilo se kako tretmani bagremovim, kaduljinim, lipovim i livadskim medovima dovode do značajnih promjena u veličini inhibicijskih zona. Grafički je prikazano na slici 14. Situacija u kojoj nema važnih promjena jest tretiranje ispitivanih bakterija umjetnim medom, koji je kao negativna kontrola potvrdio da nema antimikrobni utjecaj. Kada se uspoređuje djelovanje različitih vrsta meda međusobno, primjerice med lipe i bagrema ili med kadulje i livade (a i ostale kombinacije), statistički nema značajnijih razlika.



Slika 14. Grafički prikaz zona inhibicije prije i zona inhibicije nakon tretmana različitim vrstama meda

5. RASPRAVA

Sve je veći broj klinički važnih bakterija koje pokazuju višestruku otpornost na antibiotike. Budući da otpornost bakterija na antibiotike predstavlja globalni zdravstveni problem, istraživanja valja usmjeriti na tvari koje bi inhibirale rast klinički otpornih bakterija, a da pri tome ne bi štetile čovjeku.

U ovom istraživanju med se pokazao kao jako dobar antimikrobni agens koji u sinergizmu s pojedinim antibioticima ima značajan baktericidan učinak. Antimikrobno djelovanje meda, prikazano je usporedbom antibiograma, koji je rađen na osam klinički značajnih bakterija prije nego su bakterije tretirane s pojedinim vrstama meda, s antibiogramom koji je ponovljen na istih osam kliničkih značajnih bakterija, ali nakon što su bakterije tretirane različitim vrstama meda. Osam kliničkih značajnih, višestruko otpornih, bakterija koje su korištene u ovom istraživanju, pripadaju skupini gram-negativnih, oportunističkih patogena, koje jako brzo razvijaju nove mehanizme otpornosti na različite klase antibiotika: *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter sakazakii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Providentia rettgeri* i *Pseudomonas aeruginosa*. Antibiogram je obavljen difuzijskom metodom i korišteno je 18 vrsta antibiotika iz različitih skupina - aminoglikozidi, fluorokinoli, (tablica 4).

Kako bi se pokazao antibakterijski učinak meda, određene su vrijednosti minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije za četiri vrste meda; bagremov, kaduljin, lipov i livadski. Primjenjivane koncentracije za sve četiri vrste meda dobivene su dvostrukim razrjeđenjem i to u rasponu 0,025 mg/ml – 0,8 mg/ml.

Za klinički značajnu bakteriju *A. baumannii*, u ovom istraživanju, dobivene su vrijednosti minimalne inhibitorne koncentracije u rasponu od 0,1 mg/ml – 0,4 mg/ml. Vrijednosti koje su dobivene za minimalnu baktericidnu koncentraciju su u rasponu od 0,2 mg/ml 0,4 mg/ml. Najbolje inhibitorno djelovanje na višestruko otpornu bakteriju *A. baumannii*, pokazao je med livade, čija je vrijednost minimalne inhibitorne koncentracije 0,1 mg/ml, a minimalne baktericidne koncentracije 0,2 mg/ml. Kako je i očekivano, vrijednost minimalne baktericidne koncentracije u svim mjerenjima kod ispitivane bakterije bila je jednaka ili veća od vrijednosti minimalne inhibitorne koncentracije.

Bakterija *A. baumannii*, prije tretiranja medom, pokazala je osjetljivost na sljedeće antibiotike: cefepim i cefotaksim, veličina njihovih inhibicijskih zona bila je 10 mm, odnosno

15 mm. Nakon što je ispitivana bakterija tretirana pojedinim vrstama meda, inhibicijska zona ova dva antibiotika povećana je za oko 5 mm. Bakterija *A. baumannii* je tretirana s još 16 vrsta antibiotika na koje je pokazala otpornost, no nakon što je bakterija oslabljena medom, pokazalo se sinergističko djelovanje meda sa sljedeća dva antibiotika: gentamicin i sulfametaksazol/trimetoprim. Nakon tretmana sa sve četiri vrste meda, inhibicijska zona antibiotika gentamicina bila je u rasponu 10 mm-14 mm, ovisno o vrsti meda (tablica 14). Zanimljivo je kako na ispitivanu bakteriju nije djelovao jedino kaduljin med u sinergizmu s antibiotikom sulafametoksazol/trimetoprim, jer je i nakon tretmana bakterije kaduljinim medom, inhibicijska zona ovog antibiotika bila 0 mm, dok su ostala tri meda u sinergizmu s ovim antibiotikom pokazala antimikrobno djelovanje te je zona inhibicije rasta ispitivane bakterije bila oko 10 mm. ANOVA analiza pokazala je rezultate statistički neznačajnim ($F=0.370$, $p>0.05$)

Za višestruko otpornu bakteriju *C. freundii*, izmjerene su vrijednosti minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije za sve četiri vrste meda od 0,2 mg/ml – 0,8 mg/ml. Najbolje inhibitorno i baktericidno djelovanje pokazao je livadski med, čija je MIC vrijednost 0,2 mg/ml, a MBC vrijednost 0,4 mg/ml. Za preostale tri vrste meda, vrijednosti minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije se 0,8 mg/ml.

Od 18 testiranih antibiotika, bakterija *C. freundii* pokazala je otpornost na pet antibiotika, i to amoksisicilin/klavulansku kiselinu, cefaleksin, cefoksitin, amikacin i sulfometoksazol/trimetoprim, te je njihova inhibicijska zona prije tretmana medom, bila 0 mm. Nakon što je bakterija tretirana bagremovim medom, svoje antibakterijsko djelovanje pokazao je antibiotik cefaleksin čija je inhibicijska zona iznosila 10 mm, a sve četiri vrste meda dobro su djelovale s antibiotikom sulfometoksazol/trimetoprim, čija je inhibicijska zona iznosila 5-15 mm, ovisno o vrsti meda. (tablica 15). Kao i kod prethodne bakterije, ANOVA analizom utvrđeno je da rezultati nisu statistički značajni ($F=0.358$, $p>0.05$).

Oportunistički patogen *En. sakazakii*, tretiran je sa sve četiri vrste meda, te vrijednost minimalne inhibitorne koncentracije kreće se 0,4 mg/ml – 0,8 mg/ml, dok je izmjerena vrijednost minimalne baktericidne koncentracije 0,8 mg/ml za bagremov, kaduljin i lipov med. Za livadski med, vrijednost minimalne baktericidne koncentracije iznosi više od 0,8 mg/ml i u ovom istraživanju nije određena. U istraživanju u kojem se primjenjivao američki med (Wasihun 2016) s proljetnih pašnjaka za sprječavanje rasta *E. sakazakii*, MIC vrijednost je iznosila 0,4 g/mL, a MBC 0,8 mg/ml.

Od osamnaest testiranih antibiotika, bakterija *En. sakazakii* nije pokazala otpornost na cefoksitin, imipenem, nitrofurantion, cefotaksim i meropenem. Inhibicijske zone ovih antibiotika izmjerene prije tretmana medom bile su 15 mm - 30 mm. Nakon tretmana, ove inhibicijske zone su se povećale za 3 mm – 5 mm, ovisno od vrste meda. Tretman pojedinim vrstama meda, doveo je do pojave inhibicijskih zona kod antibiotika cefaleksina, ceftazidina, cefepima i ceftriaksona, prije tretmana ove inhibicijske zone su bile 0 mm. Nisu utvrđene statistički značajne razlike zone inhibicije prije i nakon tretiranja različitim vrstama meda antibiograma bakterije *En. sakazakii* ($F=0.415$, $p>0.05$).

Dobivene vrijednosti MIC i MBC meda bagrema i kadulje primjenjivanih na bakteriji *E. coli* su bile 0,8 g/ml, dok su za med lipe i livade potrebne više koncentracije od primjenjivanih, jer pri najvišoj koncentraciji još uvijek nije bio inhibiran rast bakterije *E. coli*. U skladu s ovim rezultatima, ranije istraživanje od Wasihuna i suradnika, pokazalo je kako je potrebna visoka koncentracija meda livade za sprječavanje rasta *E. coli*, najviša primjenjivana koncentracija bila je 0,16 mg/ml i nije bila dovoljna za inhibicijski učinak u njihovom istraživanju (Wasihun i sur. 2016).

Med kadulje i med livade, imali su utjecaj na antibiotsku osjetljivost bakterije *E. coli*, posebice kod antibiotika gentamicina i sulfametoksazola/trimetoprima. Ova dva antibiotika, prije tretmana medom, nisu se pokazali kao dobri antimikrobni agensi, budući da je inhibicijska zona bila 0 mm. Nakon tretmana s ove dvije vrste meda, zona inhibicije se povećala za oko 1 mm. Sve četiri vrste meda povećale su inhibicijske zone antibiotika, koji su i prije tretmana medom, djelovali antibakterijski te inhibirali rast *E. coli*, a to su ceftazidim, cefepim, cefoksitin, ceftriakson, imipenem, nitrofurantion, cefotaksin i meropenem. Inhibicijske zone ovih antibiotika bile su 15 mm – 30 mm. ANOVA analizom, nisu utvrđene statistički značajne razlike zone inhibicije prije i nakon tretiranja različitim vrstama meda antibiograma bakterije *E. coli* ($F=0.348$, $p>0.05$).

Za bakteriju *K. pneumoniae*, vrijednost minimalne inhibitorne koncentracije za med bagrema izmjerena je 0,4 mg/ml, a za preostale tri vrste meda su 0,8 mg/ml. Vrijednost minimalne baktericidne koncentracije za sve četiri ispitivane vrste meda je 0,8 mg/ml.

U testiranju antibiotske osjetljivosti, bakterija *K. pneumoniae* nije bila otporna na sljedeće antibiotike: ceftazidim, cefepim, cefoksitin, ceftriakson, imipenem, nitrofurantion, cefotaksin i meropenem. Inhibicijske zone ovih antibiotika prije tretmana medom izmjerene su u rasponu 10 mm – 30 mm, te se nisu značajnije mijenjale ni nakon tretmana medom

(tablica 18). Medovi kadulje, lipe i livade su utjecali na djelotvornost antibiotika gentamicina, čija je inhibicijska zona nakon tretmana ovim medovima izmjerena u rasponu od 7 mm – 15 mm, a prije tretmana je bila 0 mm. Nisu utvrđene statistički značajne razlike zone inhibicije prije i nakon tretiranja različitim vrstama meda antibiograma bakterije *K. pneumoniae* ($F=0.278$, $p>0.05$).

Adeyemo i suradnici (2017.) objavili su rezultate istraživanja u kojima su mjerili zone inhibicije svijetlog i tamnog meda kod bakterije *K. pneumoniae*. Zone inhibicije su bile veće kod tamnog meda čime su zaključili da ima bolji antibakterijski učinak od svijetlog meda. Koncentracija meda kojom su natopili disk i mjerili inhibicijske zone bila je minimalna baktericidna koncentracija tog meda. Istraživanja nisu uključivala antibiotike.

Višestruko otporna bakterija *P. mirabilis*, pokazala se visoko otporna na med bagrema i livade. Vrijednost minimalne inhibitorne koncentracije za ova dva meda je bila 0,8 mg/ml, dok vrijednost minimalne baktericidne koncentracije nije određena, budući da najviša primijenjena koncentracija nije bila dovoljna za antibakterijsko djelovanje. Koncentracija od 0,4 mg/ml utvrđena je kao minimalna inhibitorna za med lipe, a 0,8 mg/ml za med kadulje. Minimalna baktericidna koncentracija ova dva meda je 0,8 mg/ml.

Prije nego je bakterija *P. mirabilis* tretirana medom, nije bila otporna na antibiotike ceftazidim, cefepim, ceftriakson, imipenem i meropenem. Na preostalih trinaest testiranih antibiotika, prije tretmana medom, ova bakterija je pokazala otpornost. Nakon što je bakterija tretirana sa sve četiri vrste meda, antibiogram je pokazao kako bakterija *P. mirabilis*, nije otporna niti na jedan od 18 antibiotika, što bi potvrdilo odlično djelovanje meda i antibiotika, budući da su izmjerene zone inhibicija bile u rasponu 10 mm – 30 mm (tablica 19). Statističkom analizom ANOVA, utvrđene su statistički značajne razlike zone inhibicije prije i nakon tretiranja različitim vrstama meda antibiograma bakterije *P. mirabilis* ($F=5.801$, $p<0.05$).

Dobivene vrijednosti minimalne inhibitorne koncentracije kod bakterije *Pr. rettgeri* iznosile su 0,2 mg/ml – 0,8 mg/ml. Najniže vrijednosti pokazali su med kadulje i livade. Vrijednost minimalne baktericidne koncentracije bila je najniža kod kaduljinog meda i to 0,4 mg/ml, dok za med bagrema nije određena, budući da je viša od 0,8 mg/ml. Antibiotiku otpornost, bakterija *Pr. rettgeri* nije pokazala na antibiotike cefepim, ceftriakson, gentamicin, imipenem, meropenem i ciprofloxacilin, te su inhibicijske zone ovih antibiotika prije tretmana medom bile 10 mm – 30 mm. Nakon tretmana sa sve četiri vrste meda, inhibicijske zone ovih antibiotika povećale su se za 3 mm – 7 mm. Ostale značajne promjene jesu promjena

otpornosti bakterije *Pr. rettgeri*, nakon tretmana kaduljinim medom, na antibiotike amoksisilin/klavulanska kiselina, cefuroksim i ceftazidim, budući da prije tretmana medom, bakterija je bila otporna na ova tri antibiotika, a nakon tretmana medom pojavila se vidljiva inhibicijska zona veličine oko 15 mm (slika 12). Analizom rezultata antibiograma, nisu utvrđene statistički značajne razlike zone inhibicije prije i nakon tretiranja različitim vrstama meda antibiograma bakterije *Pr. rettgeri* ($F=0.206$, $p>0.05$).

Za ispitivanu bakteriju *Ps. aeruginosa* vrijednosti minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije izmjerene su u rasponu 0,4 mg/ml – 0,8 mg/ml. Za sve izmjerene vrijednosti, kao što je i očekivano, minimalna baktericidna vrijednost je jednaka ili veća od minimalne inhibitorne vrijednosti. U istraživanje koje su objavili Agbaje i suradnici (2006), iznosi rezultate MIC i MBC vrijednosti meda bagrema koje su bile iznad 0,8 g/mL, te su u tom istraživanju bile potrebne trostruko veće koncentracije meda bagrema, od primjenjivanih u našem istraživanju, kako bi se inhibirao rast *Ps. aeruginosa*.

Bakterija *Ps. aeruginosa* nije pokazala otpornost na sljedeće antibiotike: ceftazidim, cefepim, gentamicin, ceftriakson, imipenem, cefotaksim, meropenem, ciprofloksacin i norfoksacin. Inhibicijska zona ovih antibiotika, prije tretmana medom, izmjerena je u rasponu 20 mm – 30 mm. Nakon tretmana medom, gotovo sve inhibicijske zone su se povećale za oko 5 mm. Tretmani medom nisu imali učinke na smanjenje otpornosti ove bakterije na ostale testirane antibiotike, osim meda livade koji je u sinergizmu s antibiotikom cefoksitin inhibitorno djelovao na ispitivanu bakteriju (tablica 21). Nisu utvrđene statistički značajne razlike zone inhibicije prije i nakon tretiranja različitim vrstama meda antibiograma bakterije *Ps. aeruginosa* ($F=0.160$, $p>0.05$).

U svojem istraživanju, El-Hadidy i suradnici (2007) mjerili su zone inhibicije bakterije *Ps. aeruginosa* osjetljivosti na amokscilin/klavulansku kiselinu, zatim na sam med i onda na zajedničko djelovanje navedenog antibiotika i meda. Zona inhibicije oko samog antibiotika iznosila je 15,2 mm, na med 18 mm, a nakon što je bakterija izložena medu i antibiotiku skupa, zona inhibicije iznosila 21 mm. Slična je situacija s antibiotikom imipenemom. U istraživanju nije naznačeno koja je vrsta meda točno korištena.

Utvrđen je statistički značajan utjecaj meda na povećanje zona inhibicija pojedinih antibiotika, osim umjetnog meda, gdje razlike nisu značajne. Standardna devijacija je vezana uz aritmetičku sredinu i u slučaju ovog istraživanja je vrijednost standardne devijacije prilično velika. Velika vrijednost standardne devijacije je opravdana jer u sva tri mjerenja dobivena su velika raspršenja rezultata oko aritmetičke sredine, odnosno srednje vrijednosti, budući da

veličine inhibicijskih zona variraju od 0 mm pa do preko 30 mm. Ukoliko bi rezultati s velikim brojem inhibicijskih zona koje iznose 0 mm bili izbačeni, to ne bi bio realan prikaz situacije, budući da je većina bakterija otporna na ispitivane antibiotike i samim time inhibicijske zone nije moguće mjeriti.

Inhibitorna aktivnost meda se pripisuje različitim čimbenicima kao što su osmotski učinak meda, prirodno niski pH, visoki sadržaj šećera, stvaranje vodikovog peroksida (White i sur., 1963). Istraživanja su pokazala kako antibakterijski učinci meda ovise i o prisustvu fenolnih kiselina (Israili, 2013.) i flavonoida (Kwakman i sur., 2010.). U novije vrijeme, identificirani su metilglioksal i antimikrobni peptid pčelinji defensin-1 kao važne antibakterijske tvari u medu (Israili, 2013.). Vjeruje se kako je antibakterijsko djelovanje meda vrlo složeno zbog umiješanosti više spojeva, te dodatno zbog velikih razlika u koncentracijama ovih spojeva između različitih vrsta meda.

U našem istraživanju smo osim istraživanih uzoraka meda na hranjivu podlogu uvijek dodavali i nerazrijeđeni umjetni med kao negativnu kontrolu. Umjetni med je sličan prirodnom, nepatvorenom medu tek po sastavu šećera (Cooper i sur., 2002.), stoga možemo isključiti osmolarnost kao jedini i najvažniji čimbenik antibakterijske učinkovitosti. Naime, umjetni med ima približno istovjetnu osmolarnost kao prirodni med, a kako on nije inhibirao rast i razvoj niti jedne istraživane bakterije, može se s velikom sigurnošću ustvrditi kako osmolarnost nije čimbenik koji je u našem istraživanju pridonosio antibakterijskom učinku meda. Ovakav zaključak podupire i istraživanje Molana (1992.) koje je pokazalo kako je antibakterijska učinkovitost veća kod razrijeđenog meda (smanjena osmolarnosti). Pojedina istraživanja su također pokazala kako su glavni antibakterijski čimbenici u medu vodikov peroksid, katalaza i glukoza oksidaze. Međutim, Gik i suradnici (1995.) su među prvim pokazali kako i neperoksidni čimbenici mogu također doprinijeti antimikrobnim svojstvima meda, te da flavonoidi i drugi fenolne komponente imaju antioksidativni kapacitet i sprječavaju rast brojnih gram negativnih i gram-pozitivnih bakterija. Za uzorke meda koji nisu imali inhibicijski učinak, možemo pretpostaviti kako nemaju potrebne sastojke kojima bi utjecali na bakterije, bilo da se radi o fenolima, flavonoidima, bjelančevinama, metilglioksalu ili njihovoj kombinaciji. Naime, antibakterijsko djelovanje meda je vrlo složeno zbog umiješanosti više spojeva, a zbog velikih razlika u koncentracijama različitih tvari i spojeva između različitih vrsta meda nije moguće potpuno jednoznačno odrediti koja je vrsta meda najučinkovitija. Poblje određivanje antibakterijskih spojeva i njihove aktivnosti, odnosno

uključenosti u složeno antibakterijsko djelovanje meda, može omogućiti standardizaciju i pomoći ukloniti glavne prepreke za primjenu meda u medicini i terapiji.

ZAKLJUČAK

Svih osam ispitivanih bakterija u ovom istraživanju, pokazale su određenu osjetljivost na testirane vrste meda.

Najprije, antibiogramom je utvrđena osjetljivost bakterija na 18 ispitivanih antibiotika. Mjerenjem zona inhibicije, potvrđena je potpuna otpornost svih osam ispitivanih bakterija na antibiotike: amoksisilin/klavulanska kiselina, cefaleksin i sulfametoksazol/trimetoprim. Okolo navedenih antibiotika, nije bilo vidljive inhibicijske zone.

Za sve četiri vrste meda, bagremov, kaduljin, lipov i livadski, utvrđene su vrijednosti minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije. Najniža inhibitorna koncentracija, 0,1 mg/ml određena je za med livade na bakteriji *A. baumannii*, a najniža baktericidna koncentracija određena je za med kadulje na bakteriji *Pr. rettgeri* i med livade na bakteriji *A. baumannii*, od 0,2 mg/ml. Rezultati su analizirani uz pomoć T-testa, statistički značajni rezultati su rezultati lipovog i livadskog meda, gdje je vrijednost p niža od 0,05, dok je statističkom analizom utvrđeno da su rezultati meda bagrema i kadulje statistički neznačajni, budući da je vrijednost $p > 0,05$.

Nakon utvrđivanja vrijednost minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije ispitivanih medova, bakterije su tretirane ispitivanim medovima i ponovnim antibiogramom je utvrđeno da se osjetljivost bakterija na pojedine antibiotike povećala. Najbolje sinergističko djelovanje sve četiri vrste meda pokazale su s antibioticima gentamicinom i sulfametoksazolom/trimetoprimom, no statističkom analizom, utvrđeni su značajni rezultati samo za bakteriju *P. mirabilis*. ANOVA analiza ukazala je na to kako ostali rezultati nisu statistički značajni, iako je mjerenje inhibicijskih zona nakon tretmana medom, kod svih bakterija pokazalo povećanu osjetljivost na testirane antibiotike.

6. LITERATURA

1. Aamer AA., Abdul-Hafeez M., Sayed S. (2014): Minimum Inhibitory and Bactericidal Concentrations (MIC and MBC) of Honey and Bee Propolis against Multi-Drug Resistant (MDR) *Staphylococcus* sp. Isolated from Bovine Clinical Mastitis. *Altern Integ Med*, 3:4.
2. Adams CJ., Manley-Harris M., Molan P.C. (2009):. The origin of methylglyoxalin New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. *Carbohydr Res*; 344:1050–3.
3. Adeyemo O. R., Torimiro N., Akinola S. A., Lawal S. K., Adewoye W. O. (2017): Study on antibacterial efficacy of different honey types in South Western Nigeria against wound associated bacteria. *Journal of Apitherapy*. Vol 2, 15-19.
4. Agbaje E., Ogunsanya T., Aiwerioba O. I. R. (2006): Conventional Use of Honey as Antibacterial Agent. *Annals of African Medicine* Vol. 5, No. 2; 78 – 81.
5. Ambler R. P. (1980): The structure of beta-lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*.
6. Andrašević A. (2005): Rezistencija bakterija na antibiotike – vodeći problem medicine na početku 21. stoljeća. *Medicina*; 43:715.
7. Andrews J. M. (2001): Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*; 5-16
8. Batinić K., Palinić D. (2014): Priručnik o medu. Mostar: Federalni agromediteranski zavod; 54-55.
9. Belčić J., Katalinić J., Loc D., Lončarević S., Peradin L., Šimunić F., Tomašec I. (1979): *Pčelarstvo*. Zagreb: Nakladni zavod Znanje.
10. Bogdanov S., Jurendić T., Sieber R., Gallman P. (2008): Honey for Nutrition and Health. *Review: Coll Nutr*;27: 677–89.
11. Chia JH., Chu C., Su LH., Chiu CH., Kuo AJ. (2005): Sun CF. Development of a Multiplex PCR and SHV Melting-Curve Mutation Detection System for Detection of SHV and CTX-M β -Lactamases of *Escherchia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Enterobacter cloacae* in Taiwan. *Clin Microbiol*;43(9):4486-91.

12. Chin C. Y., Gregg K. A., Napier B. A., Ernst R. K., Weiss D. S. (2015): A PmrB-regulated deacetylase required for lipid A modification and polymyxin resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 59(12):7911-4.
13. Cooper R. A., Molan P. (2002): The sensitivity to honey of Gram-positive cocci of clinical significance isolated from wounds. *J. Appl. Microbiol.* 93, 857 – 863.
14. Cooper RA, Jenkins L, Henriques AFM, Duggan RS. (2010): Absence of bacterial resistance to medical-grade manuka honey. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*;29:1237–41.
15. El Hadidy M. R., Abd-El Aal A. M. El-Mashad N.B., El-Sebaie A. H. (2007): Antimicrobial Effect of Bee Honey in Comparison to Antibiotics on Organisms Isolated From Infected Burns. *Ann Burns Fire Disasters* 20(2): 83-88.
16. Faria CA, Wäckers FL, Turlings TCJ. (2008) The nutritional value of aphid honeydew for non-aphid parasitoids. *Basic Appl Ecol*;9:286–97.
17. Gil, M. I., F. Ferreres, A. Ortiz i sur. (1995): Plant phenolic metabolites and floral origin of rosemary honey. *J. Agric. Food Chem.* 43, 2833–2838.
18. Gobin I., Crnković G., Magdalenić M., Begić G., Babić A., Lušić D. (2018): Antibacterial potential of Croatian honey against antibiotic resistant pathogenic bacteria, *Med Glas Zenica*; 15(2):139-144.
19. Gobin I, Vučković D, Lušić D (2014): Antibakterijska svojstva meda, *Medicina fluminensis*, Vol. 50, No. 2, p. 150-157
20. Gužvinec M., Butić I., Jelić M., Bukovski S., Lucić S., (2012): Rezistencija na antibiotike u bakterije *Pseudomonas aeruginosa*. *Infektološki glasnik* 32:2, 71–80.
21. Hrenović J., Dekić S. (2018): Preživljavanje *Acinetobacter baumannii* u različitim tipovima voda, *Hrvatske vode* 26; 35-38.
22. Israili H. Zafar, (2014): Antimicrobial Properties of Honey. *American Journal of Therapeutics* 21, 304–323.
23. Jaidane N., Naas T., Mansour W., Radhia B. Ben S., Boujaafar N. (2017): Genomic analysis of in vivo acquired resistance to colistin and rifampin

Acinetobacter baumannii. International Journal of Antimicrobial Agents; 51; 266-269.

24. Jerković-Mujkić A. (2008): Praktikum iz opće mikrobiologije, Univerzitet u Sarajevu: 49-53.
25. Jerković-Mujkić A., (2014): Biologija bakterija. Univerzitet u Sarajevu: 17-23.
26. Kalenić S., (2000): The resistance of bacteria to antibiotics. Medicuss 9; 149–153.
27. Kalenić, S., (2013): Pseudomonas, acinetobakteri i srodne bakterije. Medicinska mikrobiologija. Medicinska naklada, Zagreb, 222-225.
28. Kelly MT, Brenner DJ, Farmer JJ, Balows A, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yolkow RH, Murray PR, (1995): Manual of clinical microbiology. Washington D.C.: ASM Press: 236-77.
29. Klaudiny J, Albert S, Bachanova K, Kopernicky J, Simuth J. (2005): Two structurally different defensin genes, one of them encoding a novel defensin isoform, are expressed in honeybee Apismellifera. Insect Biochem Mol Biol; 35: 1–22.
30. Kong K. F., Schnepfer L., Mathee K. (2010): Beta-lactam antibiotics: From antibiotic resistance to bacteriology. APMIS; 118: 1–36
31. Kwakman PHS, Te Velde AA, de Boer L, Speijer D, Vandenbroucke-Grauls C (2010): How honey kills bacteria. FASEB; 24: 2576–82.
32. Kwakman PHH, Te Velde AA, de Boer L, Vandenbroucke-Grauls C. (2011): Two major medicinal honeys have different mechanisms of bactericidal activity.
33. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, Rossolini GM. (1999): Cloning and characterization of blaVIM a new integron borne metallo-β-lactamase from a Pseudomonas aeruginosa clinical isolate. Antimicrob Agents Chemother; 43:1584-90
34. Lee HJ, Churey JJ, Worobo RW (2008): Antimicrobial activity of bacterial isolates from different floral sources of honey. Int J Food Microbiol;126:240-4.
35. Li H, Luo YF, Williams BJ, Blackwell TS, Xie CM (2012): Structure and function of OprD protein in Pseudomonas aeruginosa: from antibiotic resistance to novel therapies. Int J Med Microbiol; 302: 63–8.

36. Lusby PE, Coombes AL, Wilkinson JM. (2005): Bactericidal activity of different honeys against pathogenic bacteria. *Arch Med Res*;36:464–7.
37. Lušić D. (2011): Specifična obilježja meda kadulje (*Salvia officinalis L*). Zagreb: Prehrambeno biotehnološki fakultet, PhD thesis.
38. Malacalza NH, Caccavari MA, Fagúndez G, Lupano CE. (2005): Unifloral honeys of the province of Buenos Aires, Argentina. *Journal of the Science of Food and Agriculture*; 85:1389–96.
39. Mavric E, Wittmann S, Barth G, Henle T. (2008): Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of Manuka (*Leptospermum scoparium*) honeys from New Zealand. *Mol NutrFood Res*; 52:483–9.
40. Molan PC. (1992): The antibacterial activity of honey I: The nature of the antibacterial activity. *Bee World*;73;5 28.
41. Molan PC. (2009): Honey: antimicrobial actions and role in disease management, in *New Strategies Combating Bacterial Infection*. Weinheim: Wiley VCH;229–53.
42. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twelfth informational supplement (2002). NCCLS document M100-S12. NCCLS, Wayne, USA.
43. Olaitan A. O., Morand S., Rolain, J. M. (2014). Mechanisms of polymyxin resistance: Acquired and intrinsic resistance in bacteria.
44. Persano L, Piro R, Bruneau E, Guyot-Declercq CIT, Piškulova J, Flamini C et al. (2004): Main European unifloral honeys: descriptive sheets. *Apidologie*; 35:38–81.
45. Poirel L, Bonnin R. A., Nordmann P. (2011): Genetic basis of antibiotic resistance in pathogenic *Acinetobacter* species. *IUBMB Life*, 63(12): 1061–1067.
46. Poirel L, Nordmann P., (2002): Acquired carbapenem-hydrolyzing β -lactamases and the ir genetic support. *Curr Pharm Biotechnol*;3(2):117-27.
47. Pravilnik o medu (NN 93/09). Narodne novine (2009): Zagreb.
48. Sabatini A, Marcazzan G, Colombo R, Carpana E, Serra G. (2001): Determinazione analitica del glucosio nel miele. *Industria Alimentare*; 40:623–7

49. Saladin M, Cao VT, Lambert T, Donay JL, Herrmann JL, Ould-Hocine Z, Verdet C, Delisle F, Philippon A and Arlet G. (2002): Diversity of CTX-M beta-lactamases and their promoter regions from *Enterobacteriaceae* isolated in three Parisian hospitals. *FEMS Microbiol. Lett*;209:161-68
50. Stanimirović Z., Soldatović B., Vucinić M. (2000): Medonosna pčela, Medicinske komunikacije Beograd, 167-172.
51. Šoljan D., Muratović E., Abadžić S. (2009): Biljke planina Bosne i Hercegovine. TKD Šahinpašić Sarajevo 208-210.
52. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Break point tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 5.0, 2015. <http://www.eucast.org>
53. Tripković V., Rebrović B., Kakenić S., (1997): ESBL producing *Escherichia coli* in neonatal intensive care patients. 8th ESCMID Abstracts. *CMI*;3:303.
54. Umeljić V. (2004): Atlas medonosnog bilja. U svijetu cvijeća i pčela. 1. dio. Split; 3–15.
55. Uzunović-Kamberović S. (2009): Medicinska mikrobiologija, Zenica, 386-412
56. Wayne PA (2010): Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standarst for Antimicrobial Susceptibility Testin, Twentieth Informational Supplement, CLSI Document M100-S20.
57. Wasihun A. Gebereyesus, Kasa G. (2016): Evaluation of antibacterial activity of honey against multidrug resistant bacteria in Ayder Referraland Teaching Hospital Northern Ethiopia. *SpringerPlus* 5:842.
58. White, J. W., M. H. Subers A. I. Shepartz (1963): The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose-oxidase system. *Biochem. Biophys. Acta* 73, 57–70.
59. Woodford N, Ellington M, Coelho J, Turton J, Ward M, Brown S, Amyes S, Livermore D. (2006): Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemasesin *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Ag*;27(4):351-3.
60. Zeng, X., & Lin, J. (2013). Beta-lactamase inductionand cell wall metabolism in Gram-negative bacteria.

ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Neurnbergu, Njemačka. Osnovnu i srednju školu završila sam u Žepču, Bosna i Hercegovina.

Nakon završetka opće gimnazije, u Katoličkom Školskom Centru „Don Bosco“ , upisala sam studij jednopredmetne biologije na Fakultetu Prirodoslovno-matematičkih i odgojnih znanosti Sveučilišta u Mostaru.

Diplomirala sam 2017. godine i stekla titulu prvostupnice jednopredmetne biologije. Završetkom preddiplomskog studija, upisala sam diplomski studij eksperimentalne biologije, modul fiziologija i imunobiologija pri Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu.

Tijekom studija sudjelovala sam na različitim aktivnostima poput Dani otvorenih vrata, Noć biologije, Simpozij studenata bioloških usmjerenja itd.

Usporedno sa studiranjem, obavila sam stručnu laboratorijsku praksu na biološkom odsjeku PMF-a u Zagrebu, pod mentorstvom dr. sc. Domagoja Đikić, a mjesec dana sam radila praksu i na Institutu za zdravlje i sigurnost hrane, pod menstorstvom dr. sc. Amira Ibrahimagić.