

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

Monika Kosec, Valentina Odorčić

**DJELOVANJE MEDLJKOVCA NA KARBAPENEM
REZISTENTNE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* I
VANKOMICIN REZISTENTNE *ENTEROCOCCUS
FAECIUM* SOJEVE**

Zagreb, 2022.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za mikrobiologiju namirnica Zavoda za mikrobiologiju, Sveučilišta u Zagrebu Agronomski fakultet pod mentorstvom prof. dr. sc. Mirne Mrkonjić Fuka i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2021./2022.

POPIS KRATICA

%	postotak
% w/w	maseni postotak (engl. <i>weight for weight</i>)
°C	stupanj celzijusa
µl	mikrolitar
a _w	aktivitet vode
BHI	Brain Heart Infusion Agar
BMK	bakterije mliječne kiseline
c	množinska koncentracija
Ca	kalcij
CFU	jedinice koje formiraju kolonije (engl. <i>Colony-forming unit</i>)
CLSI	Institut za kliničko-laboratorijske standarde (engl. <i>Clinical and Laboratory Standard Institute</i>)
Cu	bakar
DNA	deoksiribonukleinska kiselina, (engl. <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
ESBL	β-laktamaza proširenog spektra (engl. <i>Extended spectrum β-lactamase</i>)
Fe	željezo
g	gram
h	sat
H ₂ O ₂	vodikov peroksid
IHC	Međunarodna komisija za med (engl. <i>International Honey Commission</i>)
K	kalij
kg	kilogram
LAB	bakterije mliječne kiseline (engl. <i>Lactic acid bacteria</i>)
LPS	lipopolisaharidi
MBC	minimalna baktericidna koncentracija (engl. <i>Minimal bactericidal concentration</i>)
MBK	minimalna baktericidna koncentracija
MDR	višestruko otporne bakterije (engl. <i>multi drug resistant bacteria</i>)
Mg	magnezij
mg	miligram
MH	Mueller-Hinton agar
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija (engl. <i>Minimal inhibitory concentration</i>)
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
min	minuta
ml	mililitar

mm	milimetar
Mn	mangan
n	brojnost jedinki
Na	natrij
NaCl	natrijev klorid
NN	Narodne Novine
P	fosfor
pH	negativni logaritam množinske koncentracije vodikovih iona u otopini
SEM	skenirajući elektronski mikroskop
spp.	vrste
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (engl. <i>World Health Organisation</i>)
Zn	cink

Sadržaj

1.	Uvod.....	1
1.1.	Opći i specifični cilj rada	2
2.	Pregled literature	3
2.1.	Glavne karakteristike vrsta rodova <i>Enterococcus</i> i <i>Klebsiella</i>	3
2.2.	Antibiotička rezistencija bakterija.....	5
2.2.1.	Antibiotička rezistencija <i>Enterococcus</i> spp.....	5
2.2.2.	Antibiotička rezistencija <i>Klebsiella</i> spp.	7
2.3.	Medljikovac	8
2.3.1.	Sastav i karakteristike medljikovca	8
2.3.2.	Antimikrobno djelovanje medljikovca.....	10
2.4.	Metode utvrđivanja antimikrobnog djelovanja.....	11
3.	Materijali i metode.....	13
3.1.	Puferi i hranjive podloge	13
3.2.	Uređaji.....	13
3.3.	Uzorci medljikovca	14
3.4.	Bakterijski sojevi.....	14
3.5.	Određivanje fizikalno-kemijskih karakteristika medljikovca	15
3.5.1.	Određivanje pH vrijednosti medljikovca.....	15
3.5.2.	Određivanje udjela vode i ukupnih šećera medljikovca.....	15
3.6.	Određivanje antibakterijske aktivnosti medljikovca	16
3.6.1.	Probir antimikrobne aktivnosti medljikovca	17
3.6.2.	Određivanje minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije medljikovca.....	17
3.6.2.1.	Određivanje MIK vrijednosti.....	17
3.6.2.2.	Kontrola biomase	19

3.6.2.3. Provjera minimalne inhibitorne (MIK) i određivanje minimalne baktericidne (MBK) koncentracije	20
3.7. Statistička obrada podataka	20
4. Rezultati	21
4.1. Fizikalno - kemijske karakteristike medljikovaca.....	21
4.2. Inhibitorna aktivnost medljikovca na odabrane sojeve	22
4.3. Minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije medljikovaca	26
5. Rasprava.....	32
6. Zaključci	35
7. Zahvala.....	36
8. Popis literature.....	37
9. Sažetak	46
10. Summary	47
11. Prilozi.....	48

1. Uvod

Nekontrolirano širenje antibiotske rezistencije kod bakterija predstavlja ozbiljnu prijetnju ljudskom zdravlju na globalnoj razini. Također, postoji opravdana zabrinutost zbog povećanog broja bolničkih infekcija uzrokovanih ESKAPE patogenima. Akronim ESKAPE uključuje šest vrsta patogenih bakterija (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterobacter* spp.), koje karakterizira virulentnost i otpornost na tri i više klasa antibiotika čime spadaju u skupinu višestruko otpornih bakterija (engl. *multi drug resistant bacteria* (MDR)) (Mulani i sur., 2019). Povećanje broja višestruko otpornih bakterija je posljedica nekoliko faktora od kojih su najvažniji kontaminacija okoliša antibioticima koji se otpuštaju u okoliš iz proizvodnih pogona (Milaković i sur., 2020), prekomjerna upotreba antibiotika u stočarstvu te zlouporaba i proizvoljno propisivanje antibiotika za liječenje ljudi (López Romo i Quirós, 2019). Zbog svega navedenog pojačan je interes za pronalaženjem alternativnih rješenja za kontrolu i inhibiciju rasta patogenih bakterija, a naročito karbapenem rezistentnih *K. pneumoniae* i vankomicin rezistentnih *E. faecium*, budući da karbapenemi i vankomicin predstavljaju zadnju liniju obrane u tretiranju infekcija uzrokovanih ovim višestruko otpornim bakterijama.

Medljikovac je tip meda koji potječe iz biljnih izlučevina ili izlučevina kukaca te predstavlja mješavinu floemskog soka i izlučevine kukaca iz roda polukrilaca (*Hemiptera*) koje ih sišu (Muresan i sur., 2022). Veći sadržaj proteina, minerala i fenolnih spojeva u medljikovcu, u usporedbi s nektarskim vrstama meda, značajno pridonose snažnim biološkim svojstvima koja uključuju antibakterijsko, antioksidativno i protuupalno djelovanje te sprečavanje stvaranja mikrobnih biofilmova i ubrzavanje zacjeljivanja rana. Antimikrobna svojstva medljikovca vezana su uz njegovo fizikalno-kemijske karakteristike te pojedine spojeve, koji mogu biti prisutni u varijabilnim količinama. Glavnim čimbenicima se smatraju vodikov peroksid (H_2O_2), polifenoli, različiti antimikrobni peptidi, osmotski učinak te pH, a svi oni uvelike ovise o botaničkom podrijetlu medljikovca. Budući da dosadašnja istraživanja nisu uključivala djelovanje medljikovca na karbapenem rezistentne *K. pneumoniae* i vankomicin rezistentne *E. faecium*, cilj ovog istraživanja je analizirati djelovanje medljikovca različitog botaničkog podrijetla (n=8) na karbapenem rezistentne *K. pneumoniae* i vankomicin rezistentne *E. faecium* (n=24) izolirane iz otpadnih voda. Za potrebe određivanja antibakterijskog djelovanja medljikovca, provedena je metoda probira te je djelovanje medljikovca detaljno kvantificirano uz pomoć mikrodilucijske metode pri čemu su određene minimalne inhibitorne (MIK) i minimalne baktericidne (MBK) koncentracije.

1.1. Opći i specifični cilj rada

Opći cilj ovog rada je istražiti antimikrobno djelovanje uzoraka medljikovca različitog botaničkog podrijetla, prikupljenih na području Republike Hrvatske, prema karbapenem rezistentnim *Klebsiella pneumoniae* i vankomicin rezistentnim *Enterococcus faecium* sojevima koji spadaju u skupinu višestruko otpornih bakterija, a izolirani su iz otpadnih voda, te procijeniti potencijal medljikovca za kontrolu bakterijskog rasta i suzbijanje uzročnika bolničkih infekcija.

Hipoteze ovog rada su:

1. Antimikrobno djelovanje medljikovca ovisi o kemijsko-fizikalnim parametrima medljikovca (pH, udio vode i ukupni šećeri) i njegovom botaničkom podrijetlu (bjelogorični te medljikovac od jele i maklena).
2. S obzirom na morfološke razlike između Gram negativnih i Gram pozitivnih bakterija, medljikovac će djelovati inhibitorno i baktericidno na Gram pozitivne vrste pri nižim koncentracijama nego na Gram negativne.

Specifični ciljevi ovog rada:

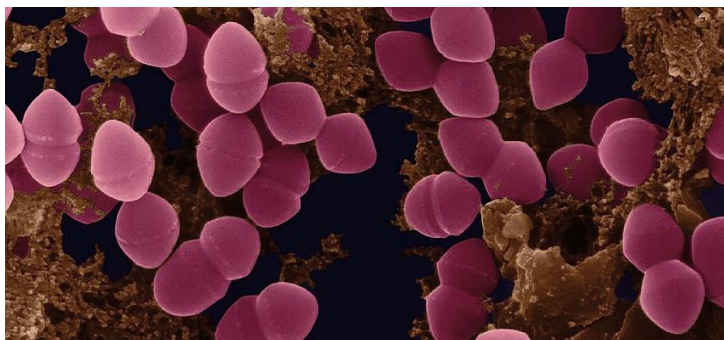
1. Analizirati fizikalno-kemijske parametre (pH, udio vode i ukupne šećere) medljikovca.
2. Kvalitativno utvrditi pokazuju li prikupljeni medljikovci inhibitorno djelovanje prema karbapenem rezistentnim *K. pneumoniae* i vankomicin rezistentnim *E. faecium*.
3. Odrediti minimalne inhibitorne (MIK) i minimalne baktericidne koncentracije (MBK) različitih medljikovaca u rasponu koncentracija 19,6% - 95,0% za sojeve *E. faecium* i *K. pneumoniae*.

2. Pregled literature

2.1. Glavne karakteristike vrsta rodova *Enterococcus* i *Klebsiella*

Enterococcus spp. su Gram pozitivni kokoidni ubikvisti koji mogu biti sastavni dio mikrobiote biljaka, ljudi, životinja ili obitavati u okolišu. Unatoč tome, glavno stanište im je gastrointestinalni sustav životinja i ljudi kod kojih su dominantni *Enterococcus faecium* (Slika 1) i *Enterococcus faecalis* (Giraffa, 2014). Nepokretni su te su također katalaza-negativni. Uz to, na krvnom agaru neki sojevi pokazuju svojstvo hemolize (Holland i sur., 2020). Nesporogeni su fakultativni anaerobi koji mogu biti u jednostaničnoj formi ili u formi lanca. Mogu rasti na širokom rasponu temperatura, od 5 do 50 °C no optimalno im je za rast potrebno 42,7 °C. Također je značajno da *E. faecium* i *E. faecalis* mogu preživjeti na temperaturama od 60 °C do 30 minuta. I pH uvjeti pri kojima mogu rasti su varijabilni, od 4,6 do 9,9 pH uz optimum na 7,5 (Van den Berghe i sur., 2006; Foulque Moreno i sur., 2006).

Enterokoki se ubrajaju u BMK odnosno bakterije mliječne kiseline (engl. *Lactic acid bacteria*, LAB) koje stvaraju bakteriocine (Ike, 2017) no također su smatrani i indikatorima loše higijene hrane i vode jer potječu iz gastrointestinalnog sustava. *E. faecium* i *E. faecalis* pokazuju antibiotsku rezistenciju na većinu komercijalno dostupnih antibiotika te stoga predstavljaju veliki izazov za liječenje ukoliko izazovu infekciju. Problem je to veći što su sastavni dio namirnica uključenih u ljudsku prehranu poput polutvrdih i tvrdih sireva ili fermentiranih kobasica (Giraffa, 2014).

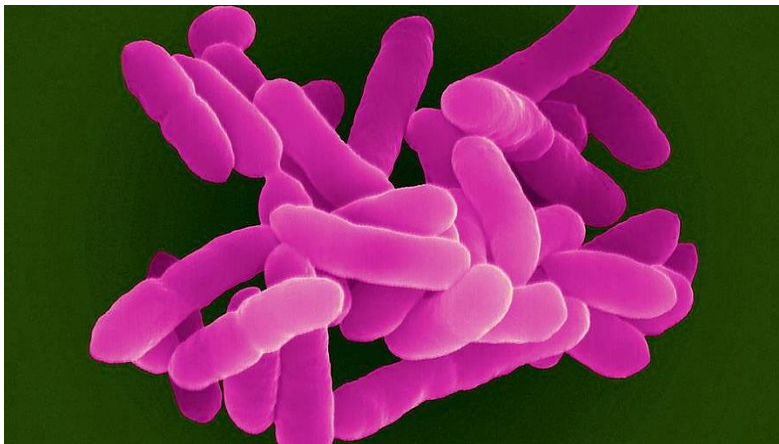


Slika 1. Izgled stanica *Enterococcus faecium* dobivenih skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM)

Izvor: <https://fineartamerica.com/featured/6-enterococcus-faecium-dennis-kunkel-microscopyscience-photo-library.html>

Vrste roda *Klebsiella* su nepokretne Gram negativne bakterije koje su prekrivene sluzavim polisaharidnim omotačem, odnosno kapsulom, koja je jedan od bitnih faktora virulentnosti uz lipopolisaharide koji oblažu vanjsku stranu stanice (Paczosa i Meccas, 2016). Polisaharidna kapsula razlikuje vrste roda *Klebsiella* od ostalih rodova porodice *Enterobacteriaceae*. Kapsula mehanički štiti stanicu od nepovoljnih uvjeta te omogućava kolonizaciju. Upravo zbog kapsule, u stanju su preživjeti nepovoljne uvjete iako ne stvaraju endospore. *Klebsiella* vrste su fakultativni anaerobi koji posjeduju respiracijski i fermentacijski metabolizam. Budući da su kemoorganotrofi, energiju dobivaju oksidacijsko-redukcijskim reakcijama kojima je donor elektrona organski spoj. Oksidaza-negativni i katalaza-pozitivni su, većina sojeva fermentacijom šećera proizvodi kiseline i plin (Garrity i sur., 2005). *Klebsiella pneumoniae* (Slika 2) može preživjeti na temperaturama od 5 do 45 °C te pH od 7 do 10 što ukazuje na toleranost alkalne sredine, ali ne i kisele (Ajayasree i Borkar, 2018).

Vrste roda *Klebsiella* su ubikvisti. Prirodna staništa ovog roda su raznolika, od tla i vode, do ljudskog i životinjskog organizma gdje koloniziraju ždrijelo i gastrointestinalni trakt. Uzrokuju velik broj životinjskih i ljudskih infekcija, poput upale pluća, sepse, infekcije mokraćnog sustava, bakterijemije i meningitisa (Paczosa i Meccas, 2016).



Slika 2. Izgled stanica *Klebsiella pneumoniae* dobivenih skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM).

Izvor: <https://fineartamerica.com/featured/1-klebsiella-pneumoniae-dennis-kunkel-microscopy-science-photo-library.html>

2.2. Antibiotička rezistencija bakterija

Antibiotička rezistencija bakterija rezultat je dviju osnovnih rezistencija, intrinzične i stečene. Intrinzična rezistencija uključuje vertikalni prijenos gena od roditelja na potomstvo te se definira kao osobina koja je univerzalno zajednička unutar bakterijske vrste. Neovisna je o prethodnoj izloženosti antibioticima i nije povezana s horizontalnim prijenosom gena (Martinez, 2014). Najčešći bakterijski mehanizmi uključeni u intrinzičnu rezistenciju su smanjena propusnost vanjske membrane, odnosno lipopolisaharidnog dijela u Gram negativnih bakterija i prirodna aktivnost efluks pumpi (Cox i Wright, 2013). Stečena rezistencija, koja je većim dijelom zaslužna za stjecanje rezistentnosti određenih sojeva, podrazumijeva horizontalni prijenos gena između različitih organizama te mutacije (Kristich i sur., 2014). Najvažniji mehanizmi u horizontalnom prijenosu gena kod bakterija uključuju transformaciju, transdukciju i konjugaciju (Yutin, 2013). Transformacija podrazumijeva unos slobodne DNA iz okoline kroz staničnu membranu u bakteriju, transdukcija se provodi pomoću bakteriofaga koji unosi stranu DNA u bakterijsku stanicu dok konjugacija podrazumijeva prijenos genetskih elemenata pomoću pili struktura između dvije susjedno locirane bakterije. Mutacije i horizontalni prijenos gena kontinuirano dovode do novih bakterijskih genotipova (Thomas i Nielsen, 2005), stoga česta upotreba antibiotika, naročito širokog spektra, utječe na pojavu višestruko otpornih bakterija, naročito u bolnicama.

2.2.1. Antibiotička rezistencija *Enterococcus* spp.

Među bolestima koje vrste roda *Enterococcus* mogu uzrokovati su: infekcija mokraćnog sustava, celulitis, prostatitis, intraabdominalne infekcije, infekcija rana, endokarditis i bakterijemija (Bush i Vazquez-Pertejo, 2021). *E. faecium* i *E. faecalis*, koji su najčešći uzročnici infekcija, imaju urođene razlike osjetljivosti na antibiotike kao što su klindamicin, cefalosporin te kombinacija sulfametoksazola i trimetoprima na koje su urođeno rezistentni, te na penicilin, ampicilin i aminoglikozide na koje posjeduju nizak stupanj rezistentnosti (Kristich i sur., 2014). Urođene rezistencije su prisutne u gotovo svim ili svim sojevima vrste (Šeol i sur., 2010) budući da su geni urođene rezistencije smješteni na kromosomu (Pintarić i Šeol Martinec, 2018).

Česti uzročnik bakterijskih infekcija su tako postali enterokoki koji su rezistentni na vankomicin (Pintarić i Šeol Martinec, 2018). VRE, odnosno vankomicin rezistentni enterokoki su jedni od najpoznatijih organizama koji su višestruko otporni na antibiotike (Makovec i sur., 2014). Djelovanje glikopeptidnih antibiotika poput vankomicina se temelji na inhibiciji sinteze peptidoglikana (Šeol i sur., 2010). Rezistencija na vankomicin je naročito prisutna kod *E. faecium* (Kristich i sur., 2014). Mehanizam rezistencije se temelji na promjeni mjesta vezanja vankomicina. Za sad je opisano ukupno devet skupina gena odgovornih za rezistenciju na

vankomicin kod enterokoka (Miller i sur., 2014). Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) je stavila *E. faecium* visoko na listu bakterija za koje je potrebno razviti nove antibiotike (Pintarić i Šeol Martinec, 2018) upravo zbog velike učestalosti pojave rezistencije na vankomicin, ali i ostale antibiotike.

Beta-laktamski antibiotici (penicilin, cefalosporin) inhibiraju sintezu stanične stijenke vezanjem na enzime koji sintetiziraju peptidoglikan čime zaustavljaju njihovo djelovanje. Enterokoki sintetiziraju molekule niskog afiniteta za navedene antibiotike te stoga mogu svejedno sintetizirati staničnu stijenku. Stoga je u liječenju potrebna veća doza antibiotika (Miller i sur., 2014; Murray, 1990). Enterokoki su rezistentni na djelovanje polusintetskih beta-laktamskih antibiotika (Kristich i sur., 2014).

Rezistencija na daptomicin je posljedica mutacije gena koji se nalaze na kromosomu koje su rezultirale promjenama strukture stanične membrane te njezinim polaritetom (Palmer i sur., 2011). Mehanizam djelovanja daptomicina se bazira na ugrađivanju u staničnu membranu u kojoj stvara pore uzrokujući depolarizaciju i smrt stanice uslijed gubitka kalijevih iona (Bedenić, 2009).

Aminoglikozidi inhibiraju sintezu proteina nakon ulaska u bakterijsku stanicu (Šeol i sur., 2010). Budući da aminoglikozidi djeluju isključivo u aerobnim uvjetima, niski stupanj urođene rezistencije enterokoka je rezultat njihovog fakultativno anaerobnog metabolizma. Uz to, *E. faecium* posjeduje gene odgovorne za sintezu određenih enzima koji mogu inaktivirati antibiotike poput tobramicina, kanamicina, sisomicina i netilmicina (Costa i sur., 1993; Galimand i sur., 2011)

Linkozamidi, makrolidi i streptogramini također inhibiraju sintezu proteina (Šeol i sur., 2010). *E. faecalis* je urođeno rezistentna na djelovanje streptogramina i linkozamida zahvaljujući genima koji kodiraju transportni protein (Lsa) pomoću kojeg efluks pumpa izbacuje antibiotike iz stanice (Singh i sur., 2002) dok *E. faecium* nema navedeni gen te je stoga osjetljiva. No smanjene je osjetljivosti na makrolide zahvaljujući genu *msrC* koji također djeluje na efluks pumpu (Portillo i sur., 2000). Zabilježen je i porast stečene rezistencije enterokoka na streptogramine ne samo kod bolničkih infekcija nego i u otpadnim vodama u blizini farmi te u životinja s farmi kao posljedica uporabe streptogramina A kao promotora rasta (McDonald i sur., 2001).

Tetraciklini su antibiotici širokog spektra djelovanja na Gram negativne i Gram pozitivne bakterije. Antibiotičko djelovanje tetraciklina se bazira na inhibiciji sinteze bjelančevina (Makovec i sur., 2014). Do stečene rezistencije tetraciklinom, koja se prenosi horizontalno, dolazi na dva načina. Jedan mehanizam rezistencije je efluks pumpa koja izbacuje antibiotik iz stanice, a drugi mehanizam mijenja mjesto vezanja antibiotika (Miller i sur., 2014). Rezistentnost enterokoka na tetracikline su potvrdili i Ahmadpoor i sur. (2021).

Jedna od sposobnosti koju posjeduju enterokoki je preuzimanje folne kiseline iz svoje okoline. Na taj način mogu spriječiti djelovanje trimetoprim-sulfametoksazola, antibiotika koji djeluju na način da zaustavljaju sintezu folne kiseline inhibirajući na taj način sintezu nukleinskih kiselina (Hollenbeck i Rice, 2012).

Fluorokinoloni se uglavnom ne koriste u liječenju infekcija uzrokovanih enterokokima zbog slabog djelovanja (Weese, 2015), vjerojatno zbog urođene rezistencije koju enterokoki posjeduju zahvaljujući djelovanju *qnr* gena koji je dokazan kod *E. faecalis* (Arsène i Leclercq, 2007).

2.2.2. Antibiotička rezistencija *Klebsiella* spp.

Infekcije izazvane *Klebsiella* spp. se prvenstveno događaju u bolnicama gdje je broj zaraza u stalnom porastu. Pretpostavlja se da je uzrok tome činjenica da *Klebsiella* spp. koloniziraju kožu, ždrijelo i gastrointestinalni trakt. Najznačajniji uzročnici infekcija u bolnicama su *Klebsiella pneumoniae* i *Klebsiella oxytoca*. U bolnicama uglavnom uzrokuju simptome i bolesti poput upale pluća, dijareju, upalu gornjih dišnih putova, infekciju mokraćnog sustava, infekcije rana, meningitis i bakterijemiju (Ristuccia i Cunha, 1984; Zheng i sur., 2018).

Vrste pokazuju rezistentnost na mnoge antibiotike, među kojima su penicilin, ampicilin, antipseudomonasni penicilini, eritromicin, klindamicin, vankomicin te sulfonamidi. Najbolje djelovanje na *Klebsiella* vrste su pokazivali aminoglikozidi i cefalosporini 3. generacije, odnosno cefalosporini proširenog spektra (Ristuccia i Cunha, 1984) na koje su također počele pokazivati rezistenciju zahvaljujući enzimu ESBL (engl. *extended spectrum β -lactamase*) koji hidrolizira cefalosporine širokog i proširenog spektra djelovanja, peniciline i monobaktame (Tambić Andrašević i sur., 2012). I za aminoglikozide su na plazmidima pronađeni geni poput *aac*, *aph* i *ant* koji uzrokuju rezistentnost. Uz navedene gene, mehanizam otpornosti koji koriste je i efluks pumpa (Wang i sur., 2020).

Sve je češća pojava sojeva rezistentnih na karbapeneme koji su antibiotici širokog spektra djelovanja, korišteni kod infekcija uzrokovanih velikim brojem bakterija porodice *Enterobacteriaceae* (Andrašević i sur., 2009; Bubonja-Šonje i Abram, 2014). Njihovo korištenje se povećalo upravo zbog sve raširenije rezistentnosti na cefalosporine 3. generacije (Tambić Andrašević i sur., 2012). Mehanizam rezistencije se bazira na produkciji enzima karbapenemaza, smanjenoj propusnosti vanjske membrane zbog promjene porina, pojačanim efluksom ili kombinacijom navedenih mehanizama (Andrašević i sur., 2009).

Kod *Klebsiella* spp. rezistencija na ampicilin je urođena. Mehanizam otpornosti se bazira na bakterijskoj proizvodnji malih količina enzima β -laktamaze koji razara ampicilin i cefalosporin 1. generacije (Andrašević i sur., 2009). Posjeduju i stečenu rezistenciju na

kinoline zahvaljujući *Qnr* genu na plazmidu koji smanjuje maksimalnu učinkovitost kinolina čime dolazi do razvoja efikasnijih mehanizama rezistencije (Tambić Andrašević i sur., 2012). Rezistentnost na kinolon, koji djeluje na način da inhibira replikaciju DNA, je stečena mutacijom, efluks pumpom i modifikacijom enzima. Na beta-laktamske antibiotike poput penicilina i cefalosporina djeluje producirani enzim β -laktamaza. Polimiksini uzrokuju lizu stanica prekidajući membranu Gram negativnih organizama. Rezistencija na polimiksine koju posjeduju *Klebsiella* vrste potječe od ciljane kromosomalne LPS (lipopolisaharidi) modifikacije. Tigeciklin koji je prva generacija glicilciklina se i dalje koristi za liječenje infekcija *K. pneumoniae* iako je iz bolnica izoliran soj koji pokazuje visoku tolerantnost. Analizama je utvrđeno da rezistencija proizlazi iz modifikacija na kromosomu, iz modifikacija permeabilnosti stanice te aktivnosti efluks pumpe (Wang i sur., 2020).

2.3. Medljikovac

Medljikovac ili medna rosa je prema Direktivi 2014/63/EU i Direktivi 2001/110/EC specifičan tip meda koji potječe iz biljnih izlučevina ili izlučevina kukaca te predstavlja mješavinu floemskog soka i izlučevine kukaca iz roda polukrilaca (*Hemiptera*) koje ih sišu (Muresan i sur., 2022). Osim štitastih i lisnih uši, medljikovac izlučuju i štitasti moljci, cvrčci, lisne buhe i vunaste uši (Bubalo i sur., 2021). Najčešći izvori za nastanak medljikovca su crnogorica i bjelogorica, ali može nastati i iz ukrasnog bilja, korova i slično (Laktić i Šukelja, 2008). Medljikovci proizvedeni od crnogorice prvenstveno su podrijetlom od jele (*Abies* spp.), smreke (*Picea* spp.) i borova (*Pinus* spp.), dok su od bjelogorice podrijetlom iz hrasta (*Quercus* spp.), kestena (*Castanea* spp.), breze (*Betula* spp.), vrbe (*Salix* spp.) i lipe (*Tilia* spp.) (Primorac i sur., 2009). Pita-Calvo i Vázquez (2017) ističu razlike između fizikalno-kemijskih i biokemijskih svojstava medljikovca i cvjetnog meda, koje pridonose većem antimikrobnom i antioksidativnom djelovanju medljikovca u odnosu na cvjetni med. Veće količine ukupnih fenolnih spojeva, veća antioksidativna aktivnost i količine minerala proporcionalne su s intenzitetom boje medljikovca.

2.3.1. Sastav i karakteristike medljikovca

Medljikovac je prema kemijskom sastavu koncentrirana vodena otopina šećera. Najvažniji monosaharidi u medljikovcu su fruktoza i glukoza s rasponom između 28,2 do 48,3 g/100 g za fruktozu i 21,7 do 37,7 g/100 g za glukozu (Tischer Seraglio i sur., 2019). Navedeni se šećeri zajedno s disaharidom sukrozom koriste za određivanje zrelosti medljikovca. Medljikovce različitog botaničkog podrijetla karakterizira viši sadržaj oligosaharida kojih u cvjetnom medu ima ili vrlo malo ili ih uopće nema.

Udio vode u medljikovcu značajno varira što prikazuju i provedena istraživanja. Tischer Seraglio i sur. (2019) su u istraživanju otkrili da je sadržaj vode u medljikovcu iz Grčke varirao od 10,5 do 20,5 g/100 g dok je u medljikovcu iz Španjolske bilo male varijacije (16,4 do 16,5 g/100 g). Kao što su Escuredo i sur. (2014) potvrdili u svom istraživanju, sadržaj vode u medljikovcu ovisi o botaničkom i zemljopisnom podrijetlu, klimatskim uvjetima, godišnjem dobu, uvjetima obrade i skladištenja te stupnju zrelosti samog medljikovca. Sadržaj vode, odnosno aktivitet vode (a_w) je važan čimbenik enzimske aktivnosti i rasta mikroorganizama (Abramović i sur., 2008). Istraživanje koje su proveli Abramović i sur. (2008) na različitim uzorcima medljikovaca, pokazuju a_w u rasponu od 0,48 – 0,59 čime su medljikovci osigurani od fermentacije jer se smatra da a_w ispod 0,60 inhibira rast osmofilnih kvasaca (Zamora i Chirife, 2006).

Alifatske organske kiseline pridonose senzorskim svojstvima te fizikalno-kemijskim svojstvima medljikovca poput boje, kiselosti, pH i električne vodljivosti. Podrijetlo alifatskih organskih kiselina u medljikovcu je nepoznato iako je većina njih međuprodukt metabolizma mikroorganizama, Krebsovog ciklusa ili enzimatskih reakcija. Glukonska kiselina i glukonolakton su najzastupljenije kiseline u medljikovcu. Limunska kiselina koja je isto sastavni dio medljikovca, može se koristiti za razlikovanje meda prema botaničkom i/ili zemljopisnom podrijetlu i važan je spoj za razlikovanje cvjetnog meda koji ima nižu količinu limunske kiseline, od medljikovca koji ima veću količinu limunske kiselina (Mato i sur., 1998; Haroun i sur., 2012).

Reakcija meda (pH) je također važan čimbenik koji pridonosi stabilnosti meda inhibirajući rast mikroorganizama, a ovisi o organskim kiselinama, anorganskim ionima, ioniziranim mineralima i njegovom botaničkom izvoru, odnosno potječe li od nektara ili medljike. Istraživanje koje su proveli Nayik i Nanda (2015) pokazuju da medljikovci imaju viši pH u odnosu na cvjetni med te samim time i višu električnu vodljivost.

Sadržaj pepela u medljikovcu iznosi manje od 1,2 g/100 g, a najzastupljeniji mineral je kalij (K). Od ostalih minerala sadrži Ca, Mg, Na, i P u koncentracijama višima od 1%. Pisani i sur. (2008) su utvrdili da uvjeti okoliša i svojstva tla direktno utječu na mineralni sastav medljikovca. Cu, Mn, Fe i Zn su najčešće prisutni u koncentraciji nižoj od 1% (Tischer Seraglio i sur., 2019).

Sadržaj proteina u medljikovcu kreće se u rasponu od 0,04 g do 1,16 g/100 g. Escuredo i sur. (2013) utvrdili su 1 g/100 g proteina u medljikovcu s područja Španjolske, a Nisbet i sur. (2009) 1,16 g/100 g u medljikovcu na području Turske. Niski sadržaj proteina zabilježen je na području Brazila (Azevedo i sur., 2017) i Slovačke čije su srednje vrijednosti iznosile 0,04 g/100 g (Horniackova i sur., 2017). Flanjak i sur. (2016) zabilježili su sadržaj proteina od 0,03 do 1,0 g na 100 g u medljikovcima s područja Hrvatske. Azevedo i sur. (2017) su proveli dvodimenzionalnu elektroforezu proteina medljikovca vrste *Mimosa*

scabrella Bentham te cvjetnog meda istoimene vrste. Količina ukupno topljivih proteina je bila veća u medljikovcu (0,042 g/100 g) nego u cvjetnom medu (0,016 g/100 g). Također je otkriveno 160 proteinskih markera u medljikovcu i 84 u cvjetnom medu čime se potvrđuje da je analiza proteoma korisna u razlikovanju meda i medljikovca.

Sadržaj slobodnih aminokiselina u medljikovcu istraživan je u nekoliko studija. On se kreće od 398,4 mg/kg zabilježenih u medljikovcima s područja Poljske (Janiszewska i sur., 2012) do 1243 mg/kg u medljikovcima s područja Italije (Carratu i sur., 2011). Najniži sadržaj slobodnih aminokiselina zabilježen je u istraživanju Chua i Adnana (2014) u Maleziji s rasponom od 5,9 mg do 23,3 mg/kg. Najzastupljenija aminokiselina u dosad istraživanim uzorcima medljikovaca je prolin s 90% od ukupnog sadržaja slobodnih aminokiselina (Tischer Seraglio i sur., 2019) uz nekoliko različitih istraživanja koja su zabilježila povećane koncentracije fenilalanina u medljikovcima s područja Turske (Kivrak, 2015) i glutaminske kiseline u vrsti *M. scabrella* Bentham (Azevedo i sur., 2017). Također u već spomenutom istraživanju Chua i Adnana (2014) medljikovac s područje Malezije nije sadržavao prolin. Profil i količina slobodnih aminokiselina u medljikovcu podosta varira i ovisi o njegovom geografskom i botaničkom podrijetlu (Tischer Seraglio i sur., 2019).

Vitamini pronađeni u medljikovcu su vitamini B kompleksa (B1, B2, B3N, B3H, B5, B6) i vitamin C (Leon-Ruiz i sur., 2013). Fenolni spojevi su biološki aktivni spojevi medljikovca i koriste se kao markeri za analize autentičnosti podrijetla. Ferulinska kiselina, kofeinska kiselina, p-kumarin i galna kiselina su neki od najčešćih fenolnih spojeva pronađeni u medljikovcima različitog podrijetla dok su poneki fenolni spojevi zabilježeni samo u ponekim vrstama, poput siringaldehida, pinobanksina i hesperidina u *M. scabrella* Bentham (Seraglio i sur., 2016).

Antioksidativno djelovanje medljikovca je prvenstveno rezultat sadržaja i količine fenolnih spojeva. Sastojci medljikovca koji su također odgovorni za antioksidativno djelovanje, a ovise o botaničkom i geografskom podrijetlu, su visok sadržaj minerala, proteina, organskih kiselina, enzima i aminokiselina (Tischer Seraglio i sur., 2019).

2.3.2. Antimikrobno djelovanje medljikovca

Antimikrobna svojstva medljikovca su rezultat njegovog pH, osmolalnosti, prisutnosti vodikovog peroksida, polifenola te antimikrobnih peptida. Vodikov peroksid u medljikovcu je rezultat djelovanja enzima glukoza oksidaze koji proizvodi glukonsku kiselinu iz glukoze. Vodikov peroksid aktivira transkripcijske faktore koji aktiviraju gene odgovorne za reakciju na upalne procese izazvane bakterijom (Brudzynski, 2006; Vandamme i sur., 2013).

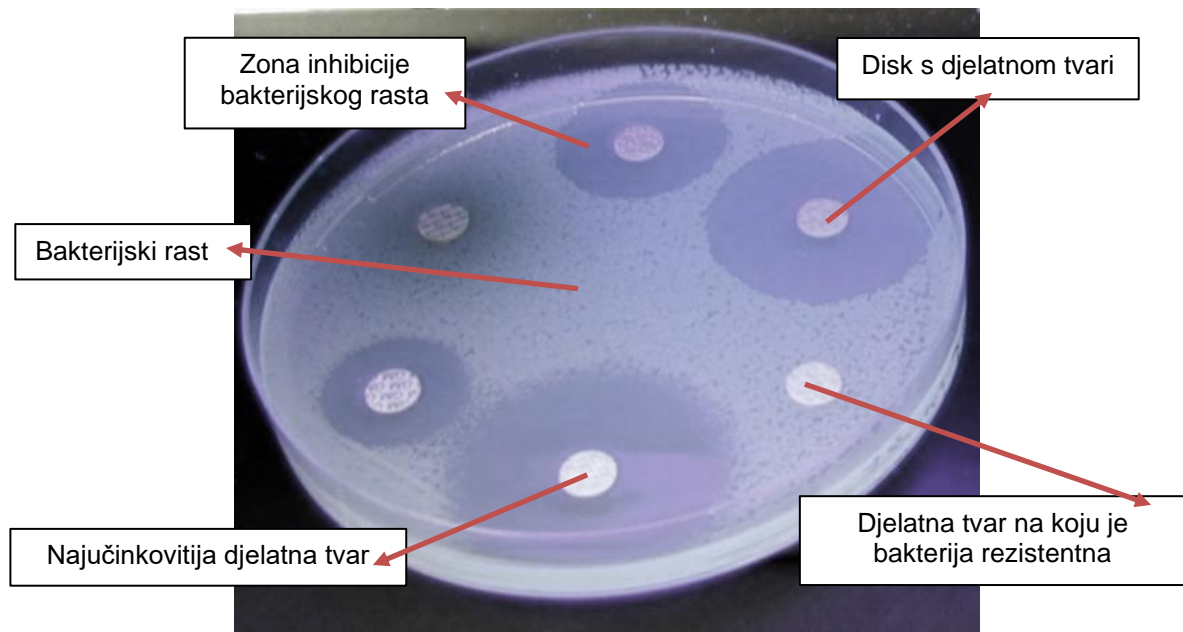
Uz vodikov peroksid, važni agensi antimikrobnog djelovanja meda su i antimikrobni peptid, pčelinji defensin-1 (Gobin i sur., 2014) te osmotski učinak koji proizlazi iz visokog sadržaja šećera i niskog udjela vode (Khan i sur., 2007; Albaridi, 2019).

Lukasiewicz i sur. (2015) su proveli istraživanje s različitim medljikovcima od kojih su oni s najnižom aktivnošću glukoza oksidaze pokazali najbolje antimikrobno djelovanje. Stoga jačina antimikrobnog djelovanja medljikovca ne ovisi samo o aktivnosti glukoze oksidaze, već ovisi i o kemijskom profilu medljikovca, posebice fenolnih spojeva koji su uz vodikov peroksid ključni čimbenici oštećenja bakterijske DNA (Brudzynski i sur., 2012).

Poli i sur. (2018) su istraživali minimalnu inhibitornu koncentraciju (MIK) meda i medljikovaca na *Pseudomonas aeruginosa*. Vrijednosti MIK-a medljikovaca su varirale između 7 i 8%, što pokazuje snažno antimikrobno djelovanje. Broznić i sur. (2018) su ispitivali MIK i MBK medljikovca s područja Gorskog kotara na *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* i *Acinetobacter baumannii*. MIK vrijednosti medljikovca za sojeve *Staphylococcus* kretale su se od 0,0125 do 0,025 g/ml, dok su za MBK bile potrebne dvostruko veće koncentracije. Koncentracije od 0,025 do 0,05 g/ml su inhibirale rast sojeva *Acinetobacter*, dok su MBK koncentracije iznosile od 0,05 do 0,1 g/ml.

2.4. Metode utvrđivanja antimikrobnog djelovanja

Jedan od načina provođenja probira (engl. *Screening*) je Kirby-Bauerov postupak, odnosno metoda disk difuzije (Slika 3) kojom se dokazuje inhibitorni učinak neke djelatne tvari. Na Mueller-Hinton agar se inokulira bakterijska kultura pomoću sterilnog vatenog štapića, a zatim se na površinu agara postavljaju diskovi impregnirani antimikrobnom tvari. Djelatna tvar difundira iz celuloznog diska u hranjivu podlogu i ako je mikroorganizam osjetljiv, nakon inkubacije od 18 – 24 h, pojavljuje se zona inhibicije oko diska čiji se promjer očitava. Rezultati se izražavaju prema kriterijima koji su određeni od strane CLSI-a (engl. *Clinical and Laboratory Standard Institute*) (CLSI, 2012a).



Slika 3. Metoda disk difuzije prema Kirby-Bauer postupku

Izvor: <https://www.medical-actu.com/en/antibiogram/>

Modificirana inačica metode disk difuzije ne uključuje korištenje diskova već se umjesto njih izbuše bunari u agaru koji se potom ispune antimikrobnom tvari čije se djelovanje ispituje (Valgas i sur., 2007).

Za kvantifikaciju antimikrobnog učinka potrebno je odrediti minimalne inhibitorne (MIK) i minimalne baktericidne (MBK) koncentracije. MIK se definira kao najniža koncentracija antimikrobne tvari koja će inhibirati vidljivi rast bakterija, dok je MBK najniža koncentracija antimikrobne tvari potrebna za ubijanje određene bakterije (CLSI, 1999). Za njihovo određivanje može se provesti makrodilucijska i mikrodilucijska metoda. Makrodilucijska metoda se provodi u testnim tubicama, a mikrodilucijska u mikrotitarskim pločama. Obje metode podrazumijevaju tretiranje poznate biomase mikroorganizma s odabranim koncentracijama djelatne tvari koja se serijski razrijedi u tekućem hranjivom mediju. Faktor razrjeđenja ovisi o rasponu koncentracija koje se žele ispitati. Nakon 24 h inkubacije, očitava se rast ili izostanak rasta kultura te se razrjeđenja iz mikrotitarskih pločica prenose na krute hranjive podloge i inkubiraju kroz 24 h. MIK se određuje kao najmanja koncentracija pri kojoj je gustoća bakterija na krutoj hranjivoj podlozi upola smanjena s obzirom na kontrolu dok se MBK određuje kao najmanja koncentracija pri kojoj nije bilo porasta bakterija na krutoj hranjivoj podlozi (CLSI 2012b).

3. Materijali i metode

3.1. Pufferi i hranjive podloge

- Fiziološka otopina

Za pripremu fiziološke otopine korišten je natrij klorid (NaCl; VWR Chemicals, Belgija). Fiziološka otopina je pripremljena otapanjem 8,5 g NaCl u 1000 ml destilirane vode te je zatim sterilizirana na temperaturi od 121 °C u trajanju od 15 minuta. Sterilna fiziološka otopina korištena je za pripremu i kontrolu biomase ispitivanih sojeva.

- Mueller-Hinton (MH) tekuća hranjiva podloga

Za pripremu ove tekuće hranjive podloge korištena je gotova, komercijalno dostupna, dehidrirana hranjiva podloga (Mueller-Hinton broth, Biolife, Italija). Podloga je pripremljena na način da je 22 g dehidrirane podloge otopljeno u 1000 ml destilirane vode te je sterilizirana na temperaturi od 121 °C u trajanju od 15 minuta. Ova podloga je korištena za određivanje minimalne inhibitorne (MIK) i minimalne baktericidne (MBK) koncentracije medljikovaca mikrodilucijskom metodom.

- Brain Heart Infusion (BHI) agar

Za pripremu ove podloge korištena je komercijalno dostupna dehidrirana hranjiva podloga (Brain Heart Infusion Agar, Biolife, Italija). Podloga je pripremljena otapanjem 52 g podloge u 1000 ml destilirane vode nakon čega je sterilizirana na 121 °C u trajanju od 15 minuta. Nakon sterilizacije podloga je ohlađena na 45 do 50 °C. Potom je u Petrijeve zdjelice otpipetirano po 20 ml BHI agara te su podloge ostavljene da polimeriziraju na sobnoj temperaturi. Ova podloga je korištena za iscrpljivanje ispitivanih sojeva, ispitivanje antibakterijskog djelovanja medljikovaca metodom difuzije iz bunara i provjeru biomase te MIK i MBK vrijednosti medljikovaca subkultivacijom.

3.2. Uređaji

U nastavku su navedeni laboratorijski uređaji korišteni u ovom istraživanju:

- Brojač kolonija, Colony star (Funke Gerber, Njemačka)
- Denzitometar, DEN-1 Densitometer (Biosan, Latvija)
- Inkubator, Sanyo incubator (Sanyo Electronic CO. Ltd., Japan)
- Laboratorijska vaga (Santarius AG, Hrvatska)
- Orbitalna treskalica/inkubator, Orbital shaker – Incubator ES-20 (Biosan, Latvija)
- pH-metar, MP 220 (Mettler Toledo, Njemačka)
- Refraktometar, Refracto 30 PX (Mettler Toledo, Njemačka)
- Vorteks mješalica, Vorteks V-1-plus (Biosan, Latvija)

3.3. Uzorci medljikovca

Svi ispitivani medljikovci su prikupljeni na području Republike Hrvatske (RH) tijekom 2019. i 2021. godine. U tablici 1 su navedeni medljikovci korišteni u ovom istraživanju, njihove oznake, botaničko i zemljopisno podrijetlo te godina prikupljanja.

Tablica 1. Medljikovci korišteni u ovom istraživanju, njihove oznake, botaničko i zemljopisno podrijetlo i godina prikupljanja.

Medljikovac	Botaničko podrijetlo	Zemljopisno podrijetlo	Godina prikupljanja
M5	Bjelogorica	Topusko	2019.
M6	Bjelogorica	Novska	2019.
M7	Bjelogorica	Novska	2019.
M8	Maklen	Jakša Pivac	2019.
M9	Maklen	Jakša Pivac	2019.
M13	Jela	Gospić	2021.
M14	Jela	Ogulin	2021.
M15	Jela	Ogulin	2021.

3.4. Bakterijski sojevi

U ovom istraživanju su korišteni bakterijski sojevi višestruko otporni na antibiotike, uključujući karbapenem rezistentne sojeve *Klebsiella pneumoniae* (n=12) i vankomicin rezistentne sojeve *Enterococcus faecium* (n=12). Sojevi *K. pneumoniae* i *E. faecium* su izolirani iz otpadnih voda s pročišćivača grada Zagreba i bolnica te su ustupljeni od strane Instituta „Ruđer Bošković“ i od strane Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“. Svi korišteni sojevi su detaljno molekularno okarakterizirani i genotipizirani u prijašnjim istraživanjima (Andrašević, 2021; Repinec, 2021).

3.5. Određivanje fizikalno-kemijskih karakteristika medljikovca

Fizikalno-kemijske analize ispitivanih uzoraka medljikovaca su provedene prema metodama propisanim Pravilnikom o medu (NN 53/15) i standardiziranim metodama koje je propisala Međunarodna komisija za med (International Honey Commission - IHC, 2009) te u skladu s europskom legislativom (EU Council directive 2001/110/EC, 2002; Codex Standards 12-1981, 2001). Na uzorcima meda provedene su sljedeće fizikalno-kemijske analize: određivanje pH vrijednosti, udjela vode i ukupnih šećera.

3.5.1. Određivanje pH vrijednosti medljikovca

Određivanje pH vrijednosti uzoraka meda provedeno je standardnom potenciometrijskom metodom pomoću digitalnog pH-metra MP 220 (Mettler Toledo; Njemačka). Ukupno 10 g uzorka meda otopljeno je u 75 ml destilirane vode, a nakon stabilizacije mjerne otopine meda i destilirane vode, u istu je uronjena potenciometrijska elektroda te je očitana pH vrijednost na zaslonu pH-metra.

3.5.2. Određivanje udjela vode i ukupnih šećera medljikovca

Određivanje udjela vode (% w/w) u uzorcima meda provedeno je standardnom refraktometrijskom metodom pomoću digitalnog refraktometra Refracto 30 PX (Mettler Toledo, Njemačka; mjerno područje indeksa refrakcije: 1320 - 1500) na kojem je očitana vrijednost indeksa refrakcije analiziranih uzoraka nakon nanošenja uzorka izravno na prizmu refraktometra. Udio vode je izmjeren pri 20 °C i određen iz tablice propisane od strane IHC (Tablica 2) na temelju dobivenih vrijednosti refrakcijskog indeksa.

Tablica 2. Indeks refrakcije i udio vode u medu pri 20 °C (IHC, 2009)

Indeks refrakcije (20 °C)	Udio vode (g/100g)	Indeks refrakcije (20 °C)	Udio vode (g/100g)	Indeks refrakcije (20 °C)	Udio vode (g/100g)
1,5044	13,0	1,4935	17,2	1,4830	21,4
1,5038	13,2	1,4930	17,4	1,4825	21,6
1,5033	13,4	1,4925	17,6	1,4820	21,8
1,5028	13,6	1,4920	17,8	1,4815	22,0
1,5023	13,8	1,4915	18,0	1,4810	22,2

Nastavak tablice 2. Indeks refrakcije i udio vode u medu pri 20 °C (IHC, 2009)

Indeks refrakcije (20 °C)	Udio vode (g/100g)	Indeks refrakcije (20 °C)	Udio vode (g/100g)	Indeks refrakcije (20 °C)	Udio vode (g/100g)
1,5018	14,0	1,4910	18,2	1,4805	22,4
1,5012	14,2	1,4905	18,4	1,4800	22,6
1,5007	14,4	1,4900	18,6	1,4795	22,8
1,5002	14,6	1,4895	18,8	1,4790	23,0
1,4997	14,8	1,4890	19,0	1,4785	23,2
1,4992	15,0	1,4885	19,2	1,4780	23,4
1,4987	15,2	1,4880	19,4	1,4775	23,6
1,4982	15,4	1,4875	19,6	1,4770	23,8
1,4976	15,6	1,4870	19,8	1,4765	24,0
1,4971	15,8	1,4865	20,0	1,4760	24,2
1,4966	16,0	1,4860	20,2	1,4755	24,4
1,4961	16,2	1,4855	20,4	1,4750	24,6
1,4956	16,4	1,4850	20,6	1,4745	24,8
1,4951	16,6	1,4845	20,8	1,4740	25,0
1,4946	16,8	1,4840			
1,4940	17,0	1,4835			

Udio ukupnih šećera (% w/w) u uzorcima meda određen je standardnom refraktometrijskom metodom pomoću istog digitalnog refraktometra koji je korišten i za određivanje udjela vode. Postotni udio šećera je očitao izravno sa zaslona instrumenta.

3.6. Određivanje antibakterijske aktivnosti medljikovca

Kako bi se ispitalo imaju li medljikovci inhibitorno djelovanje na višestruko otporne sojeve *K. pneumoniae* i *E. faecium*, prvo je napravljen probir (engl. *screening*) antibakterijske aktivnosti pri čemu je korištena metoda difuzije bunara u agaru. Potom su za sve medljikovce koji su pokazali antibakterijsko djelovanje određene minimalne inhibitorne (MIK) i minimalne baktericidne (MBK) koncentracije pomoću metode mikrodilucije u Mueller-Hinton bujonu.

3.6.1. Probir antimikrobne aktivnosti medljikovca

Za probir je korištena metoda difuzije bunara u agaru, točnije modificirana Kirby-Bauerova disk difuzijska metoda (Bauer i sur., 1959). Sama analiza je provedena u nekoliko koraka: uzgoj prekonoćne kulture, priprema odgovarajuće biomase, inokulacija sojeva na krute BHI hranjive podloge, bušenje bunara i aplikacija medljikovca u bunare.

Ispitivani sojevi su iscrpljeni do monokulture na krutim BHI podlogama i inkubirani pri 37 °C preko noći. Zatim je za svaki ispitivani soj pripremljena točno određena biomasa dodavanjem pojedinačnih kolonija u sterilnu fiziološku otopinu do postizanja turbiditeta McFarland standarda 0,5 što odgovara bakterijskoj koncentraciji $1,5 \times 10^8$ CFU/ml. Turbiditet je izmjeren pomoću denzitometra (DEN-1 densitometer, Biosan, Latvija).

Ovako pripremljena bakterijska suspenzija je inokulirana na krute BHI podloge pomoću sterilnog vatenog štapića. Svaki soj je inokuliran tri puta pri čemu je BHI ploča između svake inokulacije rotirana za 60°. Potom su pomoću šireg kraja (promjer = 9 mm) sterilnog nastavka za mikropipete volumena 1 ml izbušeni bunari u BHI agaru. U svaki bunar je aplicirano po 0,1 g odgovarajućeg medljikovca. Antimikrobno djelovanje svakog medljikovca je ispitano u duplikatima. Ovako pripremljene ploče su inkubirane pri 37 °C tijekom 24 h. Nakon inkubacije je izmjerena zona inhibicije rasta, odnosno zona oko bunara gdje je izostao vidljivi rast ispitivanih sojeva. U zonu inhibicije rasta je uključen i promjer bunara.

3.6.2. Određivanje minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije medljikovca

Minimalne inhibitorne (MIK) i minimalne baktericidne (MBK) koncentracije su određene mikrodilucijskom metodom prema CLSI (2012b). U ovom istraživanju, uz određivanje MIK i MBK vrijednosti, dodatno je provjerena korištena biomasa svakog ispitivanog soja metodom serijskog razrjeđenja te su provjerene MIK i MBK vrijednosti subkultivacijom na BHI agaru.

3.6.2.1. Određivanje MIK vrijednosti

Analiza se sastojala od sljedećih koraka: uzgoj prekonoćne kulture, priprema odgovarajuće biomase, priprema radne otopine medljikovca, priprema koncentracijskog gradijenta medljikovca i aplikacija ispitivanih sojeva.

Za pripremu biomase, ispitivani sojevi su iscrpljeni do monokulture na krutim BHI hranjivim podlogama i inkubirani preko noći pri 37 °C. Nakon inkubacije, pojedinačne su

kolonije dodavane u sterilnu fiziološku otopinu do postizanja turbiditeta koji odgovara McFarland standardu 0,5. Ovako pripremljena bakterijska suspenzija koncentracije $1,5 \times 10^8$ CFU/ml je potom razrijeđena u sterilnoj fiziološkoj otopini u omjeru 1:10 do dobivanja radne biomase koncentracije $1,5 \times 10^6$ CFU/ml potrebne za određivanje MIK i MBK vrijednosti.

Radna 95,0%-tna otopina svakog medljikovca je pripremljena otapanjem 5,7 g medljikovca u 6 ml sterilne tekuće MH podloge. Otapanje i homogenizacija radne otopine potpomognute su miješanjem na vorteks miješalici (Vorteks V-1-plus, Biosan, Latvija).

MIK i MBK vrijednosti medljikovca su određene u mikrotitarskim pločama s 96 jažica. Antibakterijsko djelovanje medljikovca je ispitano u rasponu koncentracija od 19,6 do 95%. Koncentracijski gradijent u mikrotitarskoj ploči je postignut serijskim razrjeđenjem medljikovca u tekućoj MH podlozi u omjeru 1:0,3 (Slika 4). Ukratko, u jažice u redu A dodano je 280 μ l 95%-tne otopine medljikovca, a u jažice u redovima B do H po 65 μ L tekuće MH podloge. Multikanalnom pipetom je sterilno prebačeno po 215 μ l sadržaja jažica u redu A u jažice u redu B i homogenizirano pipetiranjem. Potom je 215 μ l iz jažica u redu B prebačeno u jažice u redu C. Isti postupak je ponovljen do jažica u redu G. Na kraju, iz jažica u redu G je uklonjeno suvišnih 215 μ l, tako da je na kraju u svim jažicama ukupan volumen sadržaja iznosio 65 μ l. Jažice u redu H sadržavale su samo 65 μ l tekuće MH podloge i služile su za kontrolu rasta ispitivanih sojeva.

C (%)		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
95,0	A												
72,9	B												
56,1	C												
43,2	D												
33,2	E												
25,5	F												
19,6	G												
0,0 (kontrola)	H												

Slika 4. Shematski prikaz eksperimentalnog dizajna za određivanje minimalne inhibitorne (MIK) i minimalne baktericidne (MBK) koncentracije medljikovca u mikrotitarskoj ploči (1-12 = različiti sojevi analiziranih bakterija, c= koncentracija)

Konačno, u sve je jažice dodano po 15 μ l odgovarajućeg soja biomase $1,5 \times 10^6$ CFU/ml čime je u mikrotitarskim pločama postignuta konačna bakterijska koncentracija $1,5 \times 10^5$ CFU/ml. Mikrotitarske ploče su zatim inkubirane na temperaturi od 37 °C tijekom 24 h, uz stalno miješanje pri 90 okretaja/min (Orbital shaker-Incubator ES-20, Biosan, Latvija). Nakon

24 h, rast se detektirao vizualno. Zamućenje podloge se smatra indikatorom rasta. Najmanja koncentracija medljikovca pri kojoj nema vidljivog rasta se smatra minimalnom inhibitornom koncentracijom (CLSI 2012b).

3.6.2.2. Kontrola biomase

U ovom istraživanju je dodatno provjerena biomasa svakog ispitivanog soja korištenog za određivanje MIK i MBK vrijednosti pomoću metode serijske mikrodilucije u mikrotitarskim pločama. Bakterijske suspenzije sojeva koncentracije $1,5 \times 10^6$ CFU/ml (Poglavlje 3.6.2.1) su serijski razrijeđene u sterilnoj fiziološkoj otopini u omjeru 1:10. Ukratko, odgovarajućim jažicama u redu A je dodano 200 μ l bakterijske suspenzije biomase $1,5 \times 10^6$ CFU/ml. Jažicama u redovima B do H dodano je 180 μ l sterilne fiziološke otopine. Multikanalnom pipetom je iz jažica u redu A preneseno po 20 μ l u jažice u redu B, a sadržaj jažice je homogeniziran pipetiranjem. Ovaj postupak je ponovljen do reda H (Slika 5).

Faktor razrjeđenja		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	A												
10^{-1}	B												
10^{-2}	C												
10^{-3}	D												
10^{-4}	E												
10^{-5}	F												
10^{-6}	G												
10^{-7}	H												

Slika 5. Shematski prikaz kontrole biomase pomoću metode serijske mikrodilucije u mikrotitarskoj ploči (1-12 = različiti sojevi analiziranih bakterija)

Potom je multikanalnom pipetom po 5 μ l sadržaja jažica iz svakog stupca inokulirano na krute BHI podloge u četiri ponavljanja. Ploče su zatim inkubirane na 37 °C kroz 24 h. Nakon inkubacije izbrojane su porasle kolonije i izračunat je broj bakterija korišten za određivanje MIK i MBK vrijednosti prema formuli (1). Rezultati su izraženi kao jedinice koje formiraju kolonije/ml (engl. *colony forming units*, CFU/ml).

$$\text{Broj bakterija} \left[\frac{\text{CFU}}{\text{ml}} \right] = \frac{\text{Broj kolonija}}{V(\text{nacjepljeni uzorak})[\text{ml}]} \times \text{recipročno razrjeđenje uzorka} \quad (1)$$

3.6.2.3. Provjera minimalne inhibitorne (MIK) i određivanje minimalne baktericidne (MBK) koncentracije

Nakon 24 h inkubacije i vizualnog određivanja MIK vrijednosti, MIK i MBK vrijednosti su dodatno provjerene subkultivacijom na BHI agaru. Na BHI krute podloge je pomoću multikanalne pipete inokulirano po 5 µl sadržaja svih jažica (Poglavlje 3.6.2.1) u duplikatima. Inokulirane ploče su zatim inkubirane na 37 °C u trajanju od 24 h. Nakon inkubacije, prebrojene su izrasle kolonije te je izračunat broj bakterijskih stanica nakon tretmana medljikovcem prema formuli (1) (Poglavlje 3.6.2.2). Broj preživjelih bakterija izražen je kao CFU/ml.

Konačno, postotak umrlih bakterijskih stanica nakon tretmana medljikovcem je izračunat prema formuli (2).

$$\text{Umrle bakterijske stanice [\%]} = \left(1 - \frac{CFU2}{CFU1}\right) \times 100 \quad (2)$$

gdje je:

CFU1 – broj bakterija korišten za određivanje MIK vrijednosti

CFU2 – broj preživjelih bakterija nakon tretmana medljikovcem

Koncentracija medljikovca kod koje je postotak umrlih bakterija veći od 99,5% smatra se minimalnom inhibitornom, a postotak veći od 99,9% minimalnom baktericidnom koncentracijom (MBK).

3.7. Statistička obrada podataka

U ovom su istraživanju svi rezultati (pH vrijednosti, udio vode i ukupnih šećera, zone inhibicije rasta, MIK i MBK vrijednosti medljikovaca) prikazani kao srednje vrijednosti s pripadajućim standardnim devijacijama. Značajne razlike određene su jednosmjernom analizom varijance ANOVA (engl. *one-way ANOVA*), a srednje vrijednosti su međusobno višestruko uspoređene *post-hoc* Bonferroni testom. Razlike se smatraju statistički značajnima ako je $p < 0,05$. Rezultati su analizirani u računalnom programu Microsoft Excel 2016 pomoću dodatka Analysis ToolPak.

4. Rezultati

4.1. Fizikalno - kemijske karakteristike medljikovaca

U ovom istraživanju, pH medljikovca je određen standardnom potenciometrijskom metodom, a udjeli vode i ukupni šećeri standardnom refraktometrijskom metodom. Dobivene pH vrijednosti, udjeli vode i ukupni šećeri ispitivanih medljikovaca su prikazani u Tablici 3.

Tablica 3. Fizikalno-kemijske karakteristike ispitivanih medljikovaca. Uz apsolutne vrijednosti fizikalno-kemijskih parametara, prikazane su i srednje vrijednosti medljikovaca prema botaničkom podrijetlu s pripadajućim standardnim devijacijama.

Podrijetlo	Medljikovac	pH vrijednost	Udio vode (%)	Ukupni šećeri (%)
Bjelogorica	M5	4,54	15,6	83,8
	M6	4,46	16,8	81,7
	M7	4,52	17,2	81,0
prosječna vrijednost ± standardna devijacija		4,50 ± 0,04 ^a	16,5 ± 0,8 ^a	82,2 ± 1,5 ^a
Maklen	M8	5,12	15,6	82,8
	M9	5,31	13,2	85,3
	prosječna vrijednosti ± standardna devijacija		5,21 ± 0,13 ^b	14,4 ± 1,7 ^a
Jela	M13	4,96	17,7	81,0
	M14	4,89	16,0	83,8
	M15	4,84	16,9	81,6
prosječna vrijednosti ± standardna devijacija		4,89 ± 0,06 ^c	16,9 ± 0,9 ^a	82,1 ± 1,5 ^a

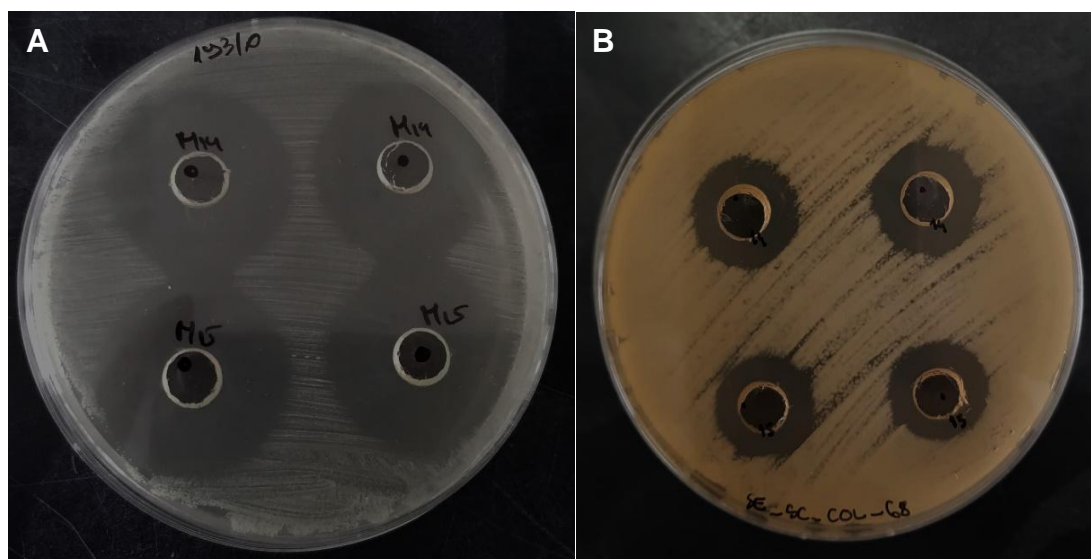
^{a-c} fizikalno - kemijski parametri unutar istog stupca označeni s različitim slovima predstavljaju statistički značajne razlike ($p < 0,05$).

pH vrijednosti ispitivanih medljikovaca su se kretale u rasponu od 4,46 do 5,31. Najniže pH vrijednosti detektirane su kod medljikovca od bjelogoričnog drveća ($4,50 \pm 0,04$), a najviše kod medljikovca od maklena ($5,21 \pm 0,13$). pH vrijednosti značajno ovise o botaničkom podrijetlu medljikovca (Tablica 3; ANOVA, $p < 0,001$; Tablice P3-P4).

Udio vode se kretao u rasponu od 13,2 do 17,7%, a ukupni šećeri od 81,0 do 85,3%. Najniži udio vode je detektiran kod medljikovca od maklena (14,4% \pm 1,7%), a najviši kod medljikovca od jele (16,9% \pm 0,09%). Sukladno udjelu vode, najviši ukupni šećeri su detektirani kod medljikovca od maklena (84,1% \pm 1,8%), a najniži kod medljikovca od jele (82,1% \pm 1,5%). Suprotno pH vrijednostima, udjeli vode i ukupni šećeri se nisu značajno razlikovali ovisno o podrijetlu medljikovca (Tablica 3; udio vode: ANOVA, $p=0,11$, Tablice P1-P2; ukupni šećeri: ANOVA, $p=0,39$, Tablice P5-P6).

4.2. Inhibitorna aktivnost medljikovca na odabrane sojeve

Probir antimikrobne aktivnosti medljikovca prema vrstama *K. pneumoniae* i *E. faecium* je ispitan metodom difuzije iz bunara. Antimikrobno djelovanje očituje se kao prozirna zona oko bunara gdje izostaje bakterijski rast (Slika 6). Što je veća zona inhibicije rasta, soj je osjetljiviji na djelovanje medljikovca.



Slika 6. Antibakterijska aktivnost na primjeru medljikovca M14 i M15 prema soju a) 193/0 (*E. faecium*) i b) SE_SC_COL_68 (*K. pneumoniae*).

Svi su ispitani medljikovci djelovali inhibitorno na sve sojeve *K. pneumoniae* i *E. faecium*. Detektirane su razlike u osjetljivosti na razini vrste i soja te razlike u antimikrobnom djelovanju samih medljikovaca s obzirom na njihovo botaničko podrijetlo (Tablica 4).

Osjetljivost ispitivanih bakterija na medljikovce značajno se razlikuje s obzirom na vrstu, odnosno građu stanične stijenke (ANOVA, Bonferroni test, $p<0,001$). Općenito, vrsta *E. faecium* (20,95 mm \pm 4,40 mm) je značajno osjetljivija na djelovanje medljikovca od vrste *K. pneumoniae* (15,68 mm \pm 2,75 mm) (Tablica P7-P8) bez obzira na botaničko podrijetlo.

Razlika u osjetljivosti na medljikovce zapažena je i na razini soja. Sojevi vrste *K. pneumoniae* se međusobno značajno razlikuju u osjetljivosti na medljikovce (ANOVA, $p < 0,001$, Tablica P9-P10). Soj SE_SC_COL_182 (18,44 mm \pm 5,5 mm) je najosjetljiviji, a soj H2_COL_79 najotporniji (12,87 mm \pm 2,48 mm). Kod sojeva vrste *E. faecium*, soj 182/0 (22,06 mm \pm 4,64 mm) je najosjetljiviji, a soj SE_SC_COL_40 (19,56 mm \pm 4,00 mm) najotporniji. Međutim, razlike u osjetljivosti sojeva *E. faecium* na medljikovce nisu značajne (ANOVA, $p = 0,49$, Tablica P11-P12).

Tablica 4. Antimikrobno djelovanje medljikovca od bjelogorice (M5-M7), maklena (M8-M9) i jele (M13-M15) prema sojevima *K. pneumoniae* i *E. faecium*. Za svaki soj (n=2) prikazane su srednje vrijednosti zona inhibicije rasta (mm) s pripadajućim standardnim devijacijama.

Vrsta	Soj	Zona inhibicije rasta [mm]								
		M5	M6	M7	M8	M9	M13	M14	M15	$\bar{x} \pm sd$ (soj)
<i>K. pneumoniae</i>	SE_SC_COL_46	14,00 ± 0,00	16,00 ± 0,00	13,50 ± 0,71	12,50 ± 0,71	14,00 ± 0,00	17,50 ± 0,71	12,50 ± 0,71	11,50 ± 0,71	13,94 ± 1,95
	SE_SC_COL_54	14,00 ± 0,00	13,00 ± 0,00	14,00 ± 0,00	13,00 ± 0,00	13,00 ± 0,00	17,75 ± 0,35	14,25 ± 0,35	13,00 ± 0,00	14,00 ± 1,56
	SE_SC_COL_61	14,50 ± 0,71	16,00 ± 0,00	16,00 ± 0,00	15,50 ± 0,71	15,50 ± 0,71	17,00 ± 0,00	11,25 ± 1,77	13,50 ± 0,71	14,91 ± 1,85
	SE_SC_COL_68	19,50 ± 0,71	18,00 ± 0,00	16,00 ± 0,00	17,00 ± 0,00	19,50 ± 0,71	17,50 ± 0,00	19,00 ± 0,00	18,00 ± 0,00	18,06 ± 1,22
	SE_SC_COL_87	14,00 ± 0,00	15,00 ± 0,00	14,00 ± 0,00	14,00 ± 0,00	15,00 ± 0,00	16,75 ± 0,35	17,50 ± 0,71	15,50 ± 0,71	15,22 ± 1,30
	SE_SC_COL_96	15,50 ± 0,71	14,00 ± 0,00	15,00 ± 0,00	13,50 ± 0,71	15,00 ± 0,00	17,00 ± 0,00	14,50 ± 0,71	15,00 ± 1,41	14,94 ± 1,12
	SE_SC_COL_102	14,00 ± 0,00	14,00 ± 0,00	15,00 ± 0,00	15,00 ± 0,00	15,00 ± 0,00	17,75 ± 0,35	17,50 ± 0,71	16,50 ± 0,71	15,59 ± 1,45
	SE_SC_COL_173	15,00 ± 0,00	16,50 ± 0,71	15,00 ± 0,00	18,00 ± 0,00	15,50 ± 0,71	16,25 ± 0,35	17,50 ± 0,71	14,50 ± 0,71	16,03 ± 1,27
	SE_SC_COL_182	13,50 ± 0,71	13,00 ± 0,00	16,00 ± 0,00	16,00 ± 0,00	17,50 ± 0,71	17,00 ± 0,00	28,50 ± 0,71	26,00 ± 0,00	18,44 ± 5,51
	H1_SC_COL_44	14,75 ± 0,35	15,50 ± 0,71	17,50 ± 0,71	19,00 ± 0,00	19,00 ± 0,00	16,25 ± 0,35	14,00 ± 1,41	13,50 ± 0,71	16,31 ± 2,18
	H2_SC_COL_47	17,00 ± 0,00	17,50 ± 0,71	17,50 ± 0,71	16,50 ± 0,71	19,50 ± 0,71	17,00 ± 0,00	18,50 ± 0,71	19,00 ± 0,00	17,81 ± 1,11
H2_COL_79	12,25 ± 0,35	11,25 ± 0,35	11,00 ± 1,41	11,00 ± 0,00	12,00 ± 0,00	18,50 ± 0,71	13,00 ± 0,00	14,00 ± 1,41	12,87 ± 2,48	
$\bar{x} \pm sd$ (<i>K. pneumoniae</i>)										15,68 ± 2,75
<i>E. faecium</i>	SE_SC_COL_40	17,50 ± 0,71	18,00 ± 0,00	15,00 ± 1,41	16,50 ± 0,71	19,50 ± 0,71	18,50 ± 0,71	27,00 ± 0,00	24,50 ± 0,71	19,56 ± 4,00
	SE_SC_COL_73	20,00 ± 0,00	19,50 ± 0,71	19,00 ± 0,00	18,00 ± 0,00	21,50 ± 0,71	17,75 ± 1,06	27,50 ± 0,71	27,00 ± 0,00	21,28 ± 3,76
	SE_SC_COL_119	19,50 ± 0,71	21,00 ± 0,00	20,00 ± 0,00	20,00 ± 0,00	22,50 ± 0,71	18,00 ± 0,00	28,00 ± 1,41	26,50 ± 0,71	21,81 ± 3,21
	182/0	20,00 ± 0,00	19,50 ± 0,71	18,50 ± 0,71	18,50 ± 0,71	22,50 ± 0,71	18,50 ± 0,00	29,50 ± 0,71	29,50 ± 0,71	22,06 ± 4,64

Nastavak tablice 4. Antimikrobno djelovanje medljikovca od bjelogorice (M5-M7), maklena (M8-M9) i jela (M13-M15) prema sojevima *K. pneumoniae* i *E. faecium*. Za svaki soj (n=2) prikazane su srednje vrijednosti zona inhibicije rasta (mm) s pripadajućim standardnim devijacijama

189/0	17,00 ± 0,00	16,50 ± 0,71	18,00 ± 0,00	18,50 ± 0,71	21,00 ± 0,00	19,00 ± 0,00	27,00 ± 0,00	26,50 ± 0,71	20,44 ± 4,00
191/0	17,50 ± 0,71	16,50 ± 0,71	17,50 ± 0,71	17,50 ± 0,71	20,00 ± 0,00	18,50 ± 0,71	25,50 ± 2,12	25,00 ± 1,41	19,75 ± 3,51
192/0	18,50 ± 0,71	16,50 ± 0,71	17,00 ± 0,00	17,50 ± 0,71	21,00 ± 1,41	16,50 ± 0,71	30,00 ± 0,00	28,50 ± 0,71	20,69 ± 5,34
193/0	21,50 ± 0,71	22,00 ± 0,00	18,50 ± 0,71	19,00 ± 0,00	24,00 ± 1,41	18,75 ± 0,35	30,00 ± 0,00	30,00 ± 0,00	22,97 ± 4,59
206/0	20,50 ± 0,71	20,00 ± 1,41	17,00 ± 0,00	18,00 ± 0,00	20,50 ± 0,71	17,75 ± 0,35	30,00 ± 0,00	28,50 ± 0,71	21,53 ± 4,82
330	16,00 ± 1,41	18,00 ± 0,00	15,50 ± 0,71	17,00 ± 1,41	19,00 ± 1,41	17,00 ± 0,00	28,50 ± 0,71	27,50 ± 0,71	19,81 ± 5,05
560/2	18,50 ± 0,71	17,00 ± 0,00	16,50 ± 0,71	16,50 ± 0,71	20,00 ± 0,00	17,00 ± 0,00	27,00 ± 0,00	27,50 ± 0,71	20,00 ± 4,49
605	19,00 ± 1,41	18,00 ± 0,00	19,00 ± 0,00	20,00 ± 1,41	20,00 ± 0,00	17,75 ± 1,06	30,00 ± 0,00	29,00 ± 1,41	21,53 ± 4,89
$\bar{x} \pm sd$ (<i>E. faecium</i>)									20,95 ± 4,40
$\bar{x} \pm sd$ (medljikovac - <i>K. pneumoniae</i>)	14,83 ± 1,85	14,98 ± 1,97	15,04 ± 1,81	15,08 ± 2,34	15,88 ± 0,66	17,27 ± 0,66	16,50 ± 4,50	15,83 ± 3,80	
$\bar{x} \pm sd$ (medljikovac - <i>E. faecium</i>)	18,79 ± 1,67	18,50 ± 1,89	17,63 ± 1,53	18,08 ± 1,28	20,96 ± 1,55	17,92 ± 0,87	28,25 ± 1,65	27,50 ± 1,77	
$\bar{x} \pm sd$ (medljikovac)	16,81 ± 2,65	16,74 ± 2,61	16,33 ± 2,11	16,58 ± 2,40	18,42 ± 3,27	17,59 ± 0,83	22,37 ± 6,82	21,67 ± 6,58	
Medljikovac - botaničko podrijetlo	Bjelogorica		Maklen			Jela			
$\bar{x} \pm sd$ (medljikovac)	16,63 ± 2,46 ^a		17,50 ± 3,00 ^a			20,55 ± 5,85 ^b			
$\bar{x} \pm sd$ (medljikovac - <i>K. pneumoniae</i>)	14,95 ± 1,85 ^a		15,48 ± 2,41 ^{ab}			16,53 ± 3,42 ^b			
$\bar{x} \pm sd$ (medljikovac - <i>E. faecium</i>)	18,31 ± 1,75 ^a		19,52 ± 2,02 ^a			24,56 ± 4,96 ^b			

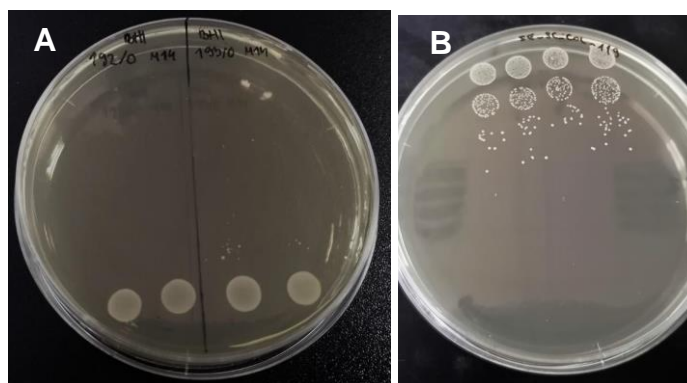
\bar{x} - srednja vrijednost zone inhibicije rasta; sd - standardna devijacija zone inhibicije rasta

^{a-b}srednje vrijednosti zone inhibicije rasta unutar istog reda označeni s različitim slovima predstavljaju statistički značajne razlike ($p < 0,05$)

Općenito, najjače antimikrobno djelovanje, bez obzira na vrstu, pokazali su medljikovci od jele, među kojima se ističu M14 (22,37 mm ± 6,82 mm) i M15 (21,67 mm ± 6,58 mm), a najslabije od bjelogorice, tj. M7 (16,33 mm ± 2,11 mm). S obzirom na vrstu, najjače antimikrobno djelovanje prema vrsti *K. pneumoniae* detektirano je kod medljikovca od jele (16,53 mm ± 3,42 mm) i njegovo djelovanje se značajno razlikuje samo od djelovanja medljikovca od bjelogorice (ANOVA, $p=0,002$, Tablica P13-P14). S druge strane, najslabije antimikrobno djelovanje prema vrsti *K. pneumoniae* je pokazao medljikovac od maklena (15,48 mm ± 2,41 mm). Iako je njegovo antimikrobno djelovanje jače od djelovanja medljikovca od bjelogorice, razlike nisu značajne. Sličan trend je detektiran i kod antimikrobnog djelovanja medljikovca prema vrsti *E. faecium*, gdje medljikovac od jele, također, pokazuje najjače antimikrobno djelovanje (24,56 mm ± 4,96 mm; ANOVA $p<0,001$, Tablica P15-P16) koje se značajno razlikuje od djelovanja i bjelogorice i maklena. Međutim, za razliku od djelovanja prema vrsti *K. pneumoniae*, najslabije antimikrobno djelovanje prema vrsti *E. faecium* je pokazao medljikovac od bjelogorice (18,31 mm ± 1,75 mm).

4.3. Minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije medljikovaca

Minimalna inhibitorna (MIK) i minimalna baktericidna (MBK) koncentracija određene su metodom mikrodilucije za sve sojeve čiji rast je inhibiran tijekom probira antimikrobnog djelovanja medljikovca. Kod vizualnog određivanja MIK vrijednosti, najniža koncentracija kod koje je izostao bakterijski rast (vidljivo kao zamućenje MH podloge) smatra se MIK vrijednošću. MIK i MBK vrijednosti su potom dodatno provjerene subkultivacijom na krutim BHI podlogama te su izračunate kao omjer umrlih bakterija i inokulirane biomase (Slika 7).



Slika 7. Provjera MIK i MBK vrijednosti medljikovca M14 na primjeru soja SE_SC_COL_119 vrste *E. faecium*. A) MIK/MBK subkultivacija na krutoj BHI hranjivoj podlozi, B) kontrola aplicirane biomase za određivanje MIK vrijednosti.

U pravilu, MIK vrijednosti ispitanih medljikovaca su jednake MBK vrijednostima, uz nekoliko iznimaka, gdje je MBK vrijednost uvijek veća za jedan red veličine (Tablica 5).

Nadalje, antimikrobna aktivnost okarakterizirana MIK i MBK vrijednostima se djelomično poklapa s rezultatima probira antimikrobne aktivnosti medljikovca (Poglavlje 4.2) tj. slično probiru, minimalne inhibitorne i baktericidne koncentracije se značajno razlikuju s obzirom na vrstu i djelomično ovise o botaničkom podrijetlu. Međutim, nisu detektirane značajne razlike u inhibitornom i baktericidnom djelovanju na razini soja.

Značajno niže koncentracije medljikovca (ANOVA, Bonferroni test $p < 0,001$, Tablice P17-P18, P27-P28) su inhibirale rast odnosno djelovale baktericidno na vrstu *E. faecium* ($20,9\% \pm 3,1\%$) u odnosu na vrstu *K. pneumoniae* ($25,2\% \pm 7,1\%$).

Općenito, više koncentracije medljikovca su djelovale inhibitorno i baktericidno na sojeve *K. pneumoniae*, u usporedbi sa sojevima *E. faecium* kod kojih su inhibicija i baktericidni učinak postignuti pri nižim koncentracijama medljikovca (Tablica 5). Kod sojeva *K. pneumoniae*, soj SE_SC_COL_173 se pokazao kao najosjetljiviji (MIK=MBK: $21,1\% \pm 2,7\%$), a soj SE_SC_COL_54 kao najotporniji (MIK: $28,1\% \pm 12,2\%$; MBK: $28,8\% \pm 11,8\%$), a kod sojeva *E. faecium*, sojevi 189/0 i SE_SC_COL_119 kao najosjetljiviji (MIK=MBK: $19,6\% \pm 0,0\%$) i soj SE_SC_COL_40 kao najotporniji (MIK: $22,0\% \pm 5,0\%$; MBK: $22,8\% \pm 5,0\%$) na djelovanje medljikovca. Međutim, detektirane razlike u MIK i MBK vrijednostima između sojeva nisu značajne (Tablice P19-P22, P29-P32).

Tablica 5. Minimalne inhibitorne (MIK) i minimalne baktericidne (MBK) koncentracije medljikovca od bjelogorice (M5-M7), maklena (M8-M9) i jele (M13-M15) prema sojevima *K. pneumoniae* i *E. faecium*. MIK i MBK vrijednosti su prikazane u postocima (%).

Vrsta	Soj	MIK(MBK) (%)								
		M5	M6	M7	M8	M9	M13	M14	M15	\bar{x} (soj)
<i>K. pneumoniae</i>	SE_SC_COL_46	33,2	19,6	19,6	19,6	33,2	19,6	33,2	19,6	24,7 ± 7,0
	SE_SC_COL_54	19,6 (25,5)	25,5	25,5	25,5	33,2	19,6	56,1	19,6	28,1 ± 12,2 (28,8 ± 11,8)
	SE_SC_COL_61	19,6	43,2	25,5	19,6	25,5	19,6	43,2	19,6	27,0 ± 10,3
	SE_SC_COL_68	33,2	33,2	19,6	19,6	25,5	19,6	43,2 (56,1)	19,6	26,7 ± 8,9 (28,3 ± 12,7)
	SE_SC_COL_87	19,6	25,5	25,5	19,6	33,2	19,6	33,2	19,6	24,5 ± 6,0
	SE_SC_COL_96	25,5	25,5	25,5	33,2	33,2	19,6	33,2	19,6	26,9 ± 5,8
	SE_SC_COL_102	25,5	25,5	33,2	19,6	25,5	19,6	33,2	25,5 (33,2)	26,0 ± 5,2 (26,9 ± 5,8)
	SE_SC_COL_173	19,6	25,5	19,6	19,6	19,6	19,6	25,5	19,6	21,1 ± 2,7
	SE_SC_COL_182	25,5	33,2	25,5	25,5	25,5	19,6	19,6	19,6	24,3 ± 4,6
	H1_SC_COL_44	19,6	25,5	25,5 (33,2)	25,5	19,6	19,6	19,6	25,5	22,6 ± 3,2 (23,5 ± 4,9)
	H2_SC_COL_47	19,6	19,6	25,5 (33,2)	25,5	19,6	19,6	33,2	25,5	23,5 ± 4,9 (24,5 ± 6,0)
	H2_COL_79	33,2	25,5	33,2	25,5	43,2	19,6	19,6	19,6	27,4 ± 8,5
$\bar{x} \pm sd$ (<i>K. pneumoniae</i>)										25,2 ± 7,1 (25,7 ± 7,6)
<i>E. faecium</i>	SE_SC_COL_40	33,2	25,5	19,6	19,6	19,6	19,6	19,6	19,6 (25,5)	22,0 ± 5,0 (22,8 ± 5,0)

Nastavak tablice 5. Minimalne inhibitorne (MIK) i minimalne baktericidne (MBK) koncentracije medljikovca od bjelogorice (M5-M7), maklena (M8-M9) i jele (M13-M15) prema sojevima *K. pneumoniae* i *E. faecium*. MIK i MBK vrijednosti su prikazane u postocima (%).

Vrsta	Soj	M5	M6	M7	M8	M9	M13	M14	M15	\bar{x} (soj)
	SE_SC_COL_73	25,5	25,5	19,6	19,6	19,6	19,6	19,6	19,6	21,1 ± 2,7
	SE_SC_COL_119	19,6	19,6	19,6	19,6	19,6	19,6	19,6	19,6	19,6 ± 0,0
	182/0	19,6	19,6	19,6	19,6	19,6	19,6	19,6	25,5	20,3 ± 2,1
	189/0	19,6	19,6	19,6	19,6	19,6	19,6	19,6	19,6	19,6 ± 0,0
	191/0	25,5	19,6	19,6	19,6	19,6	19,6	19,6	25,5 (33,2)	20,3 ± 2,1 (21,1 ± 2,7)
	192/0	33,2	19,6	25,5	19,6	19,6	19,6	19,6	19,6	22,0 ± 5,0
	193/0	19,6	19,6	19,6	19,6	19,6	19,6	19,6 (25,5)	25,5 (33,2)	20,3 ± 3,1 (22,0 ± 5,0)
	206/0	19,6	19,6	25,5	19,6	25,5	19,6	19,6	25,5	21,8 ± 3,1
	330	19,6	19,6	25,5	19,6	19,6	19,6	19,6	19,6	20,3 ± 2,1
	560/2	25,5	19,6	25,5	19,6	19,6	19,6	19,6	25,5	21,8 ± 3,1
	605	25,5	19,6	19,6	19,6	19,6	19,6	19,6	25,5	21,1 ± 2,7
$\bar{x} \pm sd$ (<i>E. faecium</i>)										20,9 ± 3,1 (21,1 ± 3,2)

MIK(MBK) (%)

	M5	M6	M7	M8	M9	M13	M14	M15
$\bar{x} \pm sd$ (medljikovac - <i>K. pneumoniae</i>)	24,5 ± 5,8 (25,0 ± 5,6)	27,3 ± 6,5	25,3 ± 4,5 (26,6 ± 5,5)	23,2 ± 4,3	28,1 ± 7,2	19,6 ± 0,0	32,7 ± 11,0 (33,8 ± 12,6)	21,1 ± 2,7 (21,7 ± 4,3)
$\bar{x} \pm sd$ (medljikovac - <i>E. faecium</i>)	23,8 ± 5,2	20,6 ± 2,3	21,6 ± 2,9	19,6 ± 0,0	20,1 ± 1,7	19,6 ± 0,0	19,6 ± 0,0 (20,1 ± 1,7)	22,1 ± 3,0 (23,7 ± 4,2)
$\bar{x} \pm sd$ (medljikovac)	24,2 ± 5,4 (24,4 ± 5,3)	23,9 ± 5,9	23,4 ± 4,2 (24,1 ± 5,0)	21,4 ± 3,5	24,1 ± 6,6	19,6 ± 0,0	26,2 ± 10,2 (20,7 ± 11,3)	21,6 ± 2,8 (22,7 ± 4,3)

Nastavak tablice 5. Minimalne inhibitorne (MIK) i minimalne baktericidne (MBK) koncentracije medljikovca od bjelogorice (M5-M7), maklena (M8-M9) i jele (M13-M15) prema sojevima *K. pneumoniae* i *E. faecium*. MIK i MBK vrijednosti su prikazane u postocima (%).

Medljikovac - botaničko podrijetlo	Bjelgorica	Maklen	Jela
$\bar{x} \pm sd$ (medljikovac)	23,8 ± 5,1 ^a (24,1 ± 5,3 ^a)	22,7 ± 5,4 ^a	22,5 ± 6,6 ^a (23,0 ± 6,9 ^a)
$\bar{x} \pm sd$ (medljikovac - <i>K. pneumoniae</i>)	25,7 ± 5,6 ^a (26,3 ± 5,8 ^a)	25,6 ± 6,3 ^a	24,5 ± 8,7 ^a (25,0 ± 9,8 ^a)
$\bar{x} \pm sd$ (medljikovac - <i>E. faecium</i>)	22,0 ± 3,8 ^a	19,8 ± 1,2 ^b	20,4 ± 2,1 ^{ab} (21,1 ± 3,1 ^{ab})

Ukoliko se MIK i MBK poklapaju, napisana je samo jedna koncentracija, ukoliko se MIK i MBK vrijednosti razlikuju, MBK je naveden u zagradi.

\bar{x} - srednja vrijednost zone inhibicije rasta; sd - standardna devijacija zone inhibicije rasta

^{a-b}srednje vrijednosti zone inhibicije rasta unutar istog reda označeni s različitim slovima predstavljaju statistički značajne razlike ($p < 0,05$)

Općenito, inhibitorno (bjelogorica: 23,8% ± 5,1%; maklen: 22,7% ± 5,4%; jela: 22,5% ± 6,6%) odnosno baktericidno (bjelogorica: 24,1% ± 5,3%; maklen: 22,7% ± 5,4%; jela: 23,0% ± 6,9%) djelovanje medljikovca postignuto je pri sličnim koncentracijama bez obzira na botaničko podrijetlo. Unatoč tome, među svim medljikovcima posebno se ističe medljikovac od jele M13 koji je inhibirao rast, odnosno djelovao baktericidno na sve sojeve pri koncentraciji od 19,6% ± 0,0%, dok je najslabije antimikrobno djelovanje pokazao medljikovac od bjelogorice, M5 (MIK: 24,2% ± 5,4%; MBK: 24,4% ± 5,3%) (Tablica 5).

Iako je medljikovac od jele inhibirao rast (24,5% ± 8,7%) i djelovao baktericidno (25,0% ± 9,8%) na sojeve *K. pneumoniae* pri nižim koncentracijama od medljikovca od bjelogorice (MIK: 25,7% ± 5,6%; MBK: 26,3% ± 5,8%) i maklena (MIK: 25,6% ± 6,3%; MBK: 25,6% ± 6,3%), detektirane razlike nisu značajne (Tablica P23-P24, Tablica P33-P34).

Za razliku od sojeva *K. pneumoniae*, medljikovac od maklena je pri najnižim koncentracijama inhibirao rast i djelovao baktericidno (MIK=MBK: 19,8% ± 1,2%) na sojeve *E. faecium*, dok su najviše MIK i MBK vrijednosti detektirane za medljikovac od bjelogorice (MIK=MBK: 22,0% ± 3,8%). Medljikovac od maklena pokazuje značajno jače inhibitorno i baktericidno djelovanje od bjelogoričnog medljikovca (ANOVA, $p=0,035$; Tablica P25-P26, P35-P36).

5. Rasprava

U ovom su istraživanju ispitane fizikalno-kemijske karakteristike i djelovanje medljikovca na višestruko otporne vrste *K. pneumoniae* i *E. faecium*, vodeće uzročnike infekcija u bolničkom okruženju. Različita istraživanja su pokazala da medljikovac djeluje inhibitorno i baktericidno na širok spektar Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija (Broznić i sur., 2018; Poli i sur., 2018; Mračević i sur., 2020; Ng i sur., 2020). Antimikrobno djelovanje medljikovca se pripisuje različitim faktorima, kao što su pH vrijednost, osmolalnost i stvaranje vodikovog peroksida koji nastaje tijekom transformacije glukoze u glukonsku kiselinu pod djelovanjem enzima glukoza oksidaze kao i zbog prisutnih polifenola i antimikrobnih peptida (Brudzynski, 2006; Vandamme i sur., 2013).

Medljikovci analizirani u ovom istraživanju se značajno razlikuju, prvenstveno u pH vrijednosti. Najniže pH vrijednosti su detektirane kod medljikovaca bjelogoričnog podrijetla ($4,50 \pm 0,04$), a najviše pH vrijednosti kod medljikovaca podrijetlom od maklena ($5,21 \pm 0,13$). Ostale fizikalno-kemijske karakteristike, tj. udio vode i ukupni šećeri medljikovaca nisu se međusobno razlikovali. Kemijsko-fizikalne karakteristike naših medljikovaca su u skladu s pH vrijednostima, udjelom vode i ukupnim šećerima drugih medova i medljikovaca s područja Europe (Rybak-Chmielewska i sur., 2013; Karabagias i sur., 2018; Matović i sur., 2018; Seraglio i sur., 2019).

Također, naše istraživanje je pokazalo da botaničko podrijetlo utječe na antibakterijsko djelovanje medljikovca, gdje medljikovac podrijetlom od jele (pH $4,89 \pm 0,06$) pokazuje najsnažnije antibakterijsko djelovanje. Isto su potvrdili i Gobin i sur. (2018) u istraživanju antibakterijske aktivnosti hrvatskih medova i medljikovaca na četiri višestruko otporna patogena pri čemu je medljikovac podrijetlom od jele pokazao najjači antibakterijski učinak. Nadalje, dosadašnja istraživanja su pokazala da pH nije jedini faktor koji utječe na antibakterijska svojstva medljikovca, već je antibakterijsko djelovanje rezultat više čimbenika među kojima je i botaničko podrijetlo medljikovca (Brown i sur., 2020), što je potvrđeno i u našem istraživanju budući da je antibakterijsko djelovanje naših medljikovaca ovisilo o pH i botaničkom podrijetlu.

Također, medljikovci podrijetlom od jele, M14 i M15, su se pokazali kao najefikasniji u inhibiciji rasta i vrste *K. pneumoniae* i *E. faecium* tijekom probira, te su se značajno razlikovali od efikasnosti ostalih medljikovaca, uključujući i medljikovca M13, također podrijetlom od jele. S obzirom da je medljikovac M13 sadržavao najveći udio vode, pretpostavlja se da je njegovo slabije antibakterijsko djelovanje uzrokovano upravo višim udjelom vode, budući da nizak aktivitet vode poboljšava antibakterijsko djelovanje (Khan i sur., 2007; Albaridi, 2019). S druge strane, medljikovac M13 je prilikom određivanja MIK i

MBK, djelovao inhibitorno i baktericidno pri nižim koncentracijama u odnosu na M14 i M15. Navedene razlike mogle bi se pripisati metodološkim razlikama. Poznato je da disk difuzijske metode i njihove modifikacije primarno ovise o uniformnoj difuziji tvari čije antimikrobno djelovanje ispitujemo, što često nije slučaj kod prirodnih spojeva (Klančnik i sur., 2010) te ne postoji linearna ili logaritamska ovisnost između koncentracije antimikrobnog spoja i zone inhibicije rasta (King i sur., 2008). Unatoč tim razlikama, obje su metode za procjenu antimikrobnog djelovanja identificirale medljikovce od jele kao najefikasnije u kontroli i suzbijanju bakterijskog rasta.

Iako i koncentracija šećera utječe na antibakterijska svojstva medljikovca (Khan i sur., 2007) u ovom istraživanju nije zapažen značajan utjecaj ukupnih šećera na antibakterijsku aktivnost medljikovca obzirom da u ispitanim medljikovcima nisu zapažene značajne razlike u ukupnim šećerima.

U ovom istraživanju, dokazali smo da medljikovci djeluju intenzivnije na vrstu *E. faecium* nego na *K. pneumoniae*. Prosječna vrijednost zone inhibicije rasta za *E. faecium* je iznosila 20,95 mm ± 4,40 mm, a za *K. pneumoniae* iznosi 15,68 mm ± 2,75 mm tijekom probira. Sukladno tome, svi sojevi *E. faecium* su se pokazali osjetljivijima na djelovanje medljikovca od sojeva *K. pneumoniae*. Budući da se metodom difuzije bunara u agaru moglo samo utvrditi djeluju li medljikovci antimikrobno ili ne, njihovo antimikrobno djelovanje je dodatno kvantificirano određivanjem minimalnih inhibitornih (MIK) i baktericidnih (MBK) koncentracija. MIK i MBK vrijednosti su također potvrdile veću osjetljivost vrste *E. faecium* na djelovanje medljikovca od vrste *K. pneumoniae*. Nadalje, širok raspon MIK i MBK vrijednosti od 19,6% do 56,1% za sojeve *K. pneumoniae* i 19,6% do 33,2% za sojeve *E. faecium* ukazuju na razlike u osjetljivosti ne samo na razini vrste, već i na razini soja. MIK i MBK vrijednosti naročito variraju za sojeve *K. pneumoniae* što bi se moglo objasniti sposobnošću nekih sojeva *K. pneumoniae* da formiraju biofilmove i stvaraju kapsule. Naime, Perumal i sur. (2014) su dokazali da su sojevi *K. pneumoniae* koji mogu formirati biofilmove manje osjetljivi na djelovanje vodikovog peroksida.

Uzorci medljikovca korišteni u ovom istraživanju su pokazali snažnije djelovanje prema *E. faecium*, nego prema *K. pneumoniae* što je u skladu s istraživanjem Broznića i sur. (2018) koje je pokazalo da su potrebne veće koncentracije medljikovca za inhibiciju Gram negativnih vrsta kao što su *K. pneumoniae* i *Acinetobacter baumannii* nego za Gram pozitivne vrste roda *Staphylococcus*. Povećana otpornost na spojeve s antimikrobnom aktivnošću mogla bi se objasniti prisutnošću kapsule kod vrsta *K. pneumoniae*. Negativno nabijene kapsule mogu vezati antimikrobne peptide te na taj način smanjiti količinu antimikrobne tvari koja dopire do bakterijske stanice (Llobet i sur., 2008).

U konačnici, rezultati našeg istraživanja ukazuju na mogućnost primjene medljikovca za kontrolu rasta višestruko otpornih bakterija *E. faecium* i *K. pneumoniae* te potencijalno i drugih patogenih bakterija. Međutim, kako bi se u potpunosti stekao uvid u antimikrobni potencijal medljikovca, potrebno je ispitati osjetljivost drugih značajnih patogena te identificirati i kvantificirati kemijske spojeve koji doprinose antimikrobnom djelovanju medljikovca.

6. Zaključci

1. Svi analizirani medljikovci (n=8) pokazuju inhibitorno djelovanje prema vankomicin rezistentnim *Enterococcus faecium* (n=12) i karbapenem rezistentnim *Klebsiella pneumoniae* (n=12).
2. *E. faecium* je značajno osjetljiviji na djelovanje medljikovca u usporedbi s vrstom *K. pneumoniae* (*E. faecium*: 20,95 mm ± 4,40 mm; *K. pneumoniae*: 15,68 mm ± 2,75 mm; ANOVA, Bonferroni test, $p < 0,001$), a isti obrazac je uočen i na razini soja.
3. Botaničko podrijetlo (bjelogorica, jela, maklen, ANOVA $p < 0,001$) i pH (ANOVA, $p < 0,001$), za razliku od udjela vode i šećera, značajno utječu na antibakterijska svojstva medljikovca.
4. Najučinkovitije antibakterijsko djelovanje pokazuju medljikovci od jele, a najslabije antibakterijsko djelovanje pokazuju bjelogorični medljikovci (jela: pH 4,89 ± 0,06; bjelogorica: pH 4,50 ± 0,04; ANOVA, $p < 0,001$).
5. Minimalna inhibitorna i minimalna baktericidna koncentracija medljikovaca kreće se u rasponu od 19,6% do 33,2% za *Enterococcus faecium*.
6. Minimalna inhibitorna i minimalna baktericidna koncentracija medljikovaca za *Klebsiella pneumoniae* iznosi od 19,6% do 56,1%.

7. Zahvala

Veliko hvala prof. dr. sc. Mirni Mrkonjić Fuka na ukazanom povjerenju, mentorstvu i vremenu te što nam je pružila priliku za stjecanjem iskustva kroz rad u laboratoriju.

Posebno hvala djelatnicama Zavoda za mikrobiologiju, naročito Irini Tanuwidjaja, mag. ing agr., koja nas je vodila kroz laboratorijski dio istraživanja i pomogla sa statističkom obradom podataka, kao i Sandri Matijević, bacc. sanit. ing. koja nam je bila na raspolaganju kod pripreme svih reagensa potrebnih za istraživanje.

Zahvaljujemo se izv. prof. dr. Lidiji Svečnjak na fizikalno-kemijskoj analizi medljikovca i što nam je nesebično ustupila podatke kao i dr. sc. Nikolini Udiković Kolić i prof. dr. sc. Arjani Tambić Andrašević koje su nam ustupile izolate bez kojih izrada ovog rada ne bi bila moguća.

Također, zahvaljujemo se i Agenciji za plaćanje u poljoprivredi, ribarstvu i ruralnom razvoju koja je omogućila sredstva za ovo istraživanje u sklopu projekta „Detaljna analitička karakterizacija i antimikrobno djelovanje odabranih pčelinjih proizvoda na multirezistentne patogene bakterije“ (akronim: miCRObee).

8. Popis literature

- Abramovič H., Jamnik M., Burkan L., Kac M. (2008). Water activity and water content in Slovenian honeys. *Food Control*. 19: 1086–1090.
- Ahmadpoor N., Ahmadrajabi R., Esfahani S., Hojabri Z., Moshafi M. H., Saffari F. (2021). High-Level Resistance to Erythromycin and Tetracycline and Dissemination of Resistance Determinants among Clinical Enterococci in Iran. *Med Princ Pract* 2021. 30: 272-276.
- Ajayasree T. S., Borkar S. G. (2018). Survival of *Klebsiella pneumoniae* strain borkar in pomegranate orchard soil and its tolerance to temperature and pH. *Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering*. 5(5): 299-301.
- Albaridi N. A. (2019). Antibacterial Potency of Honey. *International journal of microbiology*. 1: 1-10.
- Andrašević I. (2021). Inhibicija višestruko rezistentnih sojeva *Enterococcus faecium* primjenom pčelinjeg otrova. Završni rad. Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Zagreb.
- Andrašević Š., Vranić-Ladavac M., Tambić-Andrašević A. (2009). Osjetljivost enterobakterija na antibiotike. *Infektološki glasnik*. 654: 171-176.
- Arséne S., Leclercq R. (2007). Role of a *qnr*- Like Gene in the intrinsic resistance of *Enterococcus faecalis* to fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 51: 3254-3258
- Azevedo M. S., Valentim-Neto P. A., Seraglio S. K. T., da Luz C. F. P., Arisi A. C. M., Costa A. C. O. (2017). Proteome comparison for discrimination between honeydew and floral honeys from botanical species *Mimosa scabrella* Benthham by principal componet analysis. *Journal of The Science of Food and Agriculture*. 97(13): 4515-4519.
- Bauer A. W., Perry D. M. i Kirby W. M. M. (1959). Single disc antibiotic sensitivity testing of Staphylococci. *A.M.A. Arch. Intern. Med.* 104:208–216.
- Bedenić B. (2009). Antibakterijski lijekovi. U: *Medicinska mikrobiologija*. Štamparija Fojnica, Zenica. 221-252.
- Brown E., O'Brien M., Georges K., Suepaul S. (2020). Physical characteristics and antimicrobial properties of *Apis mellifera*, *Frieseomelitta nigra* and *Melipona favosa* bee honeys from apiaries in Trinidad and Tobago. *BMC Complement. Altern. Med.* 20: 1–97.

- Broznić D., Ratkaj I., Malenica Staver M., Kraljević Pavelić S., Žurga P., Dragan Bubalo D., Gobin I. (2018). Evaluation of the Antioxidant Capacity, Antimicrobial and Antiproliferative Potential of Fir (*Abies alba* Mill.) Honeydew Honey Collected from Gorski kotar (Croatia).
- Brudzynski K. (2006). Effect of hydrogen peroxide on antibacterial activities of Canadian honeys. *Can. J. Microbiol.* 52: 1228–1237.
- Brudzynski K., Abubaker K., Miotto D. (2012). Unraveling a mechanism of honey antibacterial action: Polyphenol/H₂O₂-induced oxidative effect on bacterial cell growth and on DNA degradation. *Food Chem.* 133: 329–336.
- Bubalo D., Houra M., Prđun S. (2021). Pojavnost medne rose na maklenu. *Hrvatska pčela.* 140(5): 166-168.
- Bubonja-Šonje M., Abram M. (2014). Globalno širenje bakterija koje proizvode karbapenemaze. *Medicina fluminensis.* 50: 128-149.
- Bush L. M., Vazquez-Pertejo, M. T. (2021). Enterococcal Infections. *MSD Manual Profesional Version* <<https://www.msmanuals.com/professional/infectious-diseases/gram-positive-cocci/enterococcal-infections>>
- Carratu B., Ciarrocchi M., Mosca M., Sanzini E. (2011). Free amino acids, oxalate and sulphate for honey characterization. *J ApiProduct ApiMedical Sci.* 3(2): 81-88.
- Chua L.S., Adnan N.A., (2014). Biochemical and nutritional components of selected honey samples. *Acta Sci.Pol. Technol. Aliment.* 13(2): 169-179.
- CLSI (1999). Method for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline. CLSI document M26-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standard Institute.
- CLSI (2012a). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eleventh Edition. CLSI document M02-A11. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- CLSI (2012b). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Codex Alimentarius Commission, Codex Standards 12-1981 (2001). Revised codex standard for honey. *Standard Methods.* 12: 1-7.

- Costa Y., Galimand M., Leclercq R., Duval J., Courvalin P. (1993). Characterization of the chromosomal *aac(6')-II* gene specific for *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 37: 1896-1903.
- Cox G., Wright, G. D. (2013). Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. *International Journal of Medical Microbiology.* 303(6-7): 287-292.
- Escuredo O., Dobre I., Fernandez-Gonzalez M., Seijo M. C. (2014). Contribution of botanical origin and sugar composition of honeys on the crystallization phenomenon. *Food Chemistry.* 149: 84–90.
- Escuredo O., Miguez M., Fernandez-Gonzalez M., Seijo M. C. (2013). Nutritional value and antioxidant activity of honeys produced in a European Atlantic area. *Food Chemistry.* 138(2–3): 851–856.
- EU Council directive 2001/110/EC relating to honey (2002). *Official Journal of the European Communities*, L10: 47-52.
- EU Council directive 2014/63/EU relating to honey (2014). *Official Journal of the European Union*, L164: 1-5.
- Flanjak I., Strelec I., Kenjeric D., Primorac L. (2016). Croatian produced unifloral honeys characterized according to the protein and proline content and enzyme activities. *Journal of Apicultural Science.* 60(1): 39–48.
- Foulquie Moreno M. R., Sarantinopoulos P., Tsakalidou E., De Vuyst L. (2006). The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology.* 106: 1–24.
- Galimand M., Schmitt E., Panvert M., Desmolaize B., Douthwaite S., Mechulum Y., Courvalin P. (2011). Intrinsic resistance to aminoglycosides in *Enterococcus faecium* is conferred by the 16S rRNA m5C1404-specific methyltransferase EfmM. *RNA.* 17: 251-262.
- Garrity G. M., Brenner D. J., Krieg N. R., Staley J.T. (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Second edition. Springer. Njemačka.
- Giraffa G. (2014). *Enterococcus*. *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)* ed. Batt C.A., Tortorello M.L. 674-679.
- Gobin I., Vučković D., Lušić D. (2014). Antibakterijska svojstva meda. *Medicina fluminensis.* 50(2): 150-157.

- Gobin, I., Crnković, G., Magdalenić, M., Begić, G., Babić, A., Lušić, D. i Vučković, D. (2018). Antibacterial potential of Croatian honey against antibiotic resistant pathogenic bacteria. *Medicinski Glasnik*. 15(2): 139-144.
- Haroun, M. I., Konar N., Poyrazoğlu E. S., Hospolat I. (2012). Organic Acid Profiles and Contents of Turkish Honeydew and Floral Honeys.
- Holland T. L., Bayer A. S., Fowler V. G. (2020). Endocarditis and Intravascular Infections. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 80: 1068-1108.e12.
- Hollenbeck B. L., Rice L. B. (2012). Intrinsic and acquired resistance mechanisms in *Enterococcus*. *Virulence*. 3: 421-433.
- Horniackova M., Bucekova M., Valachova I., Majtan J. (2017). Effect of gamma radiation on the antibacterial and antibiofilm activity of honeydew honey. *European Food Research and Technology*. 243(1): 81–88.
- IHC. International Honey Commission (2009). Harmonised methods of the InternationalHoneyCommission: <https://www.ihc-platform.net/ihcmethods2009.pdf>
- Ike Y. (2017). Pathogenicity of Enterococci. *Nihon saikingaku zasshi*. Japanese journal of bacteriology. 72(2): 189–211.
- Janiszewska K., Aniołowska M., Nowakowski P. (2012). Free Amino Acids Content of Honeys from Poland. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 62(2): 85-89.
- Karabagias V. K., Karabagias I. K., Gatzias I. (2018). The impact of different heating temperatures on physicochemical, color attributes, and antioxidant activity parameters of Greek honeys. *Journal of Food Process Engineering*. 41(3): e12668.
- Khan F. R., Abadin Z. U. I., Rauf N. (2007). Honey: nutritional and medicinal value. *International journal of clinical practice*. 61(10): 1705–1707.
- King T., Dykes G., Kristianti R. (2008). Comparative evaluation of methods commonly used to determine antimicrobial susceptibility to plant extracts and phenolic compounds. *Journal of AOAC International*. 91(6): 1423-1429.
- Kivrak I. (2015). Free amino acid profiles of 17 Turkish unifloral honeys. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 38 (8): 855-862.
- Klančnik A., Piskernik S., Jeršek B., Možina S. S. (2010). Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of microbiological methods*. 81(2): 121-126.

- Kristich C. J., Rice L. B., Arias C. A. (2014). Enterococcal infection - Treatment and antibiotic resistance. U: Gilmore, M. S., Clewell D. B., Ike Y., Shankar N.: Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary.
- Laktić Z., Šukelja D. (2008). Suvremeno pčelarstvo, Nakladni zavod Globus, Zagreb.
- Leon-Ruiz V., Vera S., Gonzalez-Porto A. V., San Andres M. P. (2013). Analysis of water-soluble vitamins in honey by isocratic RP-HPLC. Food Analytical Methods. 6(2): 488–496.
- Llobet E., Tomás J. M. i Bengoechea J. A. (2008). Capsule polysaccharide is a bacterial decoy for antimicrobial peptides. Microbiology (Reading, England). 154(Pt 12): 3877–3886.
- López Romo A., Quirós R. (2019). Appropriate use of antibiotics: an unmet need. Therapeutic Advances in Urology. 11: 9-17.
- Lukasiewicz M., Kowalski S., Makarewicz M. (2015). Antimicrobial and antioxidant activity of selected Polish herbhoney. LWT - Food Science and Technology. 64(2): 547-553.
- Makovec S., Kos B., Šušković J., Bilandžić N. (2014). Tetraciklinski antibiotici i određivanje njihovih rezidua u hrani. Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam. 9(1-2): 7-16.
- Martinez J. L. (2014). General principles of antibiotic resistance in bacteria. Drug Discovery Today: Technologies. 11: 33-39.
- Mato I., Huidobro J. F., Cendon V., Muniategui S., Fernandez-Muino M. A., Sancho M. T. (1998). Enzymatic determination of citric acid in honey by using polyvinylpyrrolidone clarification. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 46(1).
- Matović K., Ćirić J., Kaljević V., Nedić N., Jevtić G., Vasković N., Baltić M. Ž. (2018). Physicochemical parameters and microbiological status of honey produced in an urban environment in Serbia. Environmental Science and Pollution Research. 25(14): 14148-14157.
- McDonald L. C., Rossiter S., Mackinson C., Wang Y. Y., Johnson S., Sullivan M., Sokolow R., Debess E., Gilbert L., Benson J. A., Hill B., Angulo F. J. (2001). Quinupristin-dalfopristin-resistant *Enterococcus faecium* on chicken and in human stool specimens. N. Engl. J. Med. 345: 1155-1160.
- Milaković M., Križanović S., Petrić I., Šimatović A., González-Plaza Juan J., Gužvinec M., Andrašević Tambić A., Pole L., Mrkonjić Fuka M., Udiković-Kolić N.

- (2020). Characterization of macrolide resistance in bacteria isolated from macrolide-polluted and unpolluted river sediments and clinical sources in Croatia. *Science of the Total Environment*. 749.
- Miller W. R., Munita J. M., Arias C. A. (2014). Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert review of anti-infective therapy*. 12(10): 1221-1236.
- Mračević S. Đ., Krstić M., Lolić A., Ražić S. (2020). Comparative study of the chemical composition and biological potential of honey from different regions of Serbia. *Microchemical Journal*. 152:104420.
- Mulani M. S., Kamble E. E., Kumkar S. N., Tawre M. S., Pardesi K. R. (2019). Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. *Front. Microbiol.* 10: 539.
- Muresan C. I., Cipcigan M. C., Suharoschi R., Eler S., Margaoan R. (2022). Honey botanical origin and honey-specific protein pattern: Characterization of some European honeys. *LWT*. 154: 112883.
- Murray E. (1990). The life and times of the *Enterococcus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 3: 46-65.
- Nayik G. A., Nanda V. (2015). Physico-chemical, enzymatic, mineral and colour characterization of three different varieties of honeys from Kashmir Valley of India with a multivariate approach. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 65(2): 101–108.
- Ng W. J., Sit N. W., Ooi P. A. C., Ee K. Y., Lim T. M. (2020). The antibacterial potential of honeydew honey produced by stingless bee (*Heterotrigona itama*) against antibiotic resistant bacteria. *Antibiotics*. 9(12): 871.
- Nisbet C., Guler A., Ciftci G., Yarim G. F. (2009). The investigation of protein profile of different botanic origin honey and density saccharose- adulterated honey by SDS-PAGE method. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 15(3): 443–446.
- Paczosa M. K., Meccas J. (2016). *Klebsiella pneumoniae*: Going on the offense with a strong defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 80: 629-661.
- Palmer K. L., Daniel C., Hardy C., Silverman J., Gilmore M. S. (2011). Genetic basis for daptomycin resistance in enterococci. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 55: 3345-3356.
- Perumal P. K., Wand M. E., Sutton J. M., Bock L. J. (2014). Evaluation of the effectiveness of hydrogen-peroxide-based disinfectants on biofilms formed by Gram-negative pathogens. *Journal of Hospital Infection*. 87(4): 227-233.

- Pintarić S., Šeol Martinec B. (2018). Rezistencija enterokoka na antibiotike i preporuke za liječenje. *Veterinarska stanica*. 49(2): 105-116.
- Pisani A., Protano G., Riccobono F. (2008). Minor and trace elements in different honey types produced in Siena County (Italy). *Food Chemistry*. 107(4): 1553–1560.
- Pita-Calvo C., Vázquez M. (2017). Differences between honeydew and blossom honeys: A review. *Trends in Food Science & Technology*. 59: 79-87.
- Poli J. P., Guinoiseau E., Luciani A., Yang Y., Battesti M. J., Paolini J., Costa J., Quilichini Y., Berti L., Lorenzi V. (2018). Key role of hydrogen peroxide in antimicrobial activity of spring, Honeydew maquis and chestnut grove Corsican honeys on *Pseudomonas aeruginosa* DNA. *Letters in Applied Microbiology*. Wiley. 66(5): 427-433.
- Portillo A., Ruiz-Larrea F., Zarazaga M., Alonso A., Martinez J. L., Torres C. (2000). Macrolide resistance gene *sin* *Enterococcus* spp. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 44: 967-971.
- Pravilnik o medu (2015). Ministarstvo poljoprivrede RH. Narodne Novine br. 53/15.
- Primorac Lj., Angelkov B., Mandić M., Kenjerić D., Nedeljko M., Flanjak I., Pirički A., Arapceska M. (2009). Comparison of the Croatian and Macedonian honeydew honey. *Journal of Central European Agriculture*. 10: 263-270.
- Repinec D. (2021). Utjecaj ozona na vrste *Klebsiella pneumoniae* rezistentne na karbapenem i kolistin. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, citirano: 31.05.2022.
- Ristuccia P., Cunha B. (1984). *Klebsiella*. *Infection Control*, 5(7): 343-347.
- Rybak-Chmielewska H., Szczęśna T., Waś E., Jaśkiewicz K., Teper D. (2013). Characteristics of Polish unifloral honeys IV. Honeydew honey, mainly *Abies alba* L. *Journal of Apicultural Science*. 57(1): 51-59.
- Seraglio S. K. T., Silva B., Bergamo G., Brugnerotto P., Gonzaga L. V., Fett R., Costa A. C. O. (2019). An overview of physicochemical characteristics and health-promoting properties of honeydew honey. *Food Research International*. 119: 44-66.
- Seraglio S. K. T., Valse A. C., Daguer H., Bergamo G., Azevedo M. S., Gonzaga L. V., Costa A. C. O. (2016). Development and validation of a LC-ESI-MS/MS method for the determination of phenolic compounds in honeydew honeys with the diluted and shoot approach. *Food Research International*. 87: 60–67.

- Singh K. V., Weinstock G. M., Murray B. E. (2002). An *Enterococcus faecalis* ABC homologue (Lsa) is required for the resistance of this species to clindamycin and quinupristin-dalfopristin. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 46: 1845-1850.
- Šeol B., Matanović K., Terzić S. (2010). *Antimikrobna terapija u veterinarskoj medicini*. Medicinska naklada. Zagreb.
- Tambić Andrašević A., Jelić M., Gužvinec M., Butić I., Bukovski S. (2012). Rezistentne enterobakterije u Hrvatskoj – uloga praćenja rezistencije na antibiotike na nacionalnoj razini. *Infektološki glasnik.* 32(2): 45-52.
- Thomas C., Nielsen K. (2005). Mechanisms of, and Barriers to, Horizontal Gene Transfer between Bacteria. *Nat Rev Microbiol.* 3: 711–721.
- Tischer Seraglio S. K., Silva B., Bergamo G., Brugnerotto P., Gonzaga L. V., Fett R., Costa A. C. O. (2019). An overview of physicochemical characteristics and health-promoting properties of honeydew honey. *Food Research International.* 119: 44-66.
- Valgas C., Souza S. M. D., Smania E. F., Smania Jr. A. (2007). Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian journal of microbiology.* 38: 369-380.
- Van den Berghe E., De Winter T., De Vuyst L. (2006). Enterocin A production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 406 is characterized by a temperature- and pH-dependent switch-off mechanism when growth is limited due to nutrient depletion. *Int J Food Microbiol.* 107: 159–170.
- Vandamme L., Heyneman A., Hoeksema H., Verbelen J., Monstrey S. (2013). Honey in modern wound care: A systematic review. *Burns.* 39(8): 1514–1525.
- Wang G., Zhao G., Chao X., Xie L., Wang H. (2020). The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae*. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 17(17): 6278.
- Weese J. S. (2015). Multidrug-resistant enterococcal infections. *Clinician's Brief.* March 2015. 35-38.
- Yutin N. (2013). Horizontal Gene Transfer. Editor(s): Stanley Maloy, Kelly Hughes, Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition). Academic Press. 530-532.
- Zamora M. C., Chirife J. (2006). Determination of water activity change due to crystallization in honeys from Argentina. *Food Control.* 17(1): 59–64.

Zheng J. X., Lin Z. W., Chen C., Chen Z., Lin F. J., Wu Y., Yang S. Y., Sun X., Yao W. M., Li D. Y., Yu Z. J., Jin J. L., Qu D., Deng Q. W. (2018). Biofilm Formation in *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia Strains Was Found to be Associated with CC23 and the Presence of wcaG. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 8: 21.

9. Sažetak

DJELOVANJE MEDLJKOVCA NA KARBAPENEM REZISTENTNE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* I VANKOMICIN REZISTENTNE *ENTEROCOCCUS FAECIUM* SOJEVE

Monika Kosec, Valentina Odorčić

Zbog sve učestalijih infekcija uzrokovanih antibiotički rezistentnim bakterijama, povećava se interes za pronalaženjem alternativnih rješenja za kontrolu njihovog rasta. Medljikovac je tip meda koji potječe iz biljnih izlučevina ili izlučevina kukaca, s dokazanim antimikrobnim djelovanjem. Međutim, podaci o utjecaju medljikovca na ESKAPE patogene u koje spadaju karbapenem rezistentne *Klebsiella pneumoniae* i vankomicin rezistentni *Enterococcus faecium*, su nedostadni. Budući da su ove višestruko otporne bakterije na listi Svjetske zdravstvene organizacije kao najznačajniji patogeni koji predstavljaju prijetnju ljudskom zdravlju, postoji velik interes za pronalaženje alternativnih mogućnosti kontrole njihovog rasta. Cilj ovog rada je ispitati djelovanje uzoraka medljikovaca prikupljenih na području Republike Hrvatske prema karbapenem rezistentnim sojevima *K. pneumoniae* i vankomicin rezistentnim *E. faecium* izoliranim iz otpadnih voda. Antibakterijska aktivnost ispitana je kvalitativno, metodom difuzije bunara u agaru te kvantificirana određivanjem minimalnih inhibitornih (MIK) i minimalnih baktericidnih (MBK) koncentracija pomoću mikrodilucijske metode. Također, istražena su i fizikalno-kemijska svojstva medljikovca uključujući pH, udio vode i ukupni šećeri. Svi analizirani medljikovci (bjelogorični, jela i maklen) djeluju bakteriostatično i baktericidno na sve ispitane višestruko otporne sojeve *K. pneumoniae* i *E. faecium*. Inhibitorno djelovanje medljikovca primarno ovisi o pH vrijednosti i botaničkom podrijetlu, pa tako najjače djelovanje pokazuju medljikovci od jele, a najslabije bjelogorični medljikovci (jela: pH $4,89 \pm 0,06$; bjelogorica: pH $4,50 \pm 0,04$; ANOVA, $p < 0,001$). Udio vode i ukupni šećeri ne utječu na antimikrobno djelovanje medljikovca. Zone inhibicije rasta pokazuju da su Gram negativni sojevi *K. pneumoniae* otporniji na djelovanje medljikovca od Gram pozitivnih *E. faecium* (*K. pneumoniae*: $15,68 \text{ mm} \pm 2,75 \text{ mm}$; *E. faecium*: $20,95 \text{ mm} \pm 4,40 \text{ mm}$; ANOVA, Bonferroni test, $p < 0,001$). Nadalje, osjetljivost sojeva *K. pneumoniae* kreće se u širem rasponu (MIK/MBK: 19,6% - 56,1%) od osjetljivosti sojeva *E. faecium* (MIK/MBK: 19,6% - 33,2%) što se može objasniti sposobnošću nekih sojeva *K. pneumoniae* da formiraju kapsule i stvaraju biofilmove.

Ključne riječi: medljikovac, višestruko otporne bakterije, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecium*, minimalna inhibitorna (MIK) i minimalna baktericidna koncentracija (MBK)

10. Summary

EFFECT OF HONEYDEW ON CARBAPENEM RESISTANT *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* AND VANCOMYCIN RESISTANT *ENTEROCOCCUS FAECIUM* STRAINS

Monika Kosec, Valentina Odorčić

Due to the increasing frequency of infections caused by antibiotic-resistant bacteria, there is a growing interest in finding alternative solutions to control their growth. Honeydew is a type of honey originating from plant or insect secretions, with proven antimicrobial activity. However, data on the effect of honeydew on ESKAPE pathogens which include carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* are insufficient. Since these multi-resistant bacteria are listed by the World Health Organization as the most significant pathogens that pose a threat to human health, there is great interest in finding alternative ways to control their growth. The aim of this study was to examine the effect of honeydew samples collected in the Republic of Croatia against carbapenem-resistant strains of *K. pneumoniae* and vancomycin-resistant *E. faecium* isolated from wastewater. Antibacterial activity was tested qualitatively, by the method of diffusion from wells and quantified by determining the minimum inhibitory (MIC) and minimum bactericidal (MBC) concentrations using the microdilution method. Also, the physicochemical properties of honeydew including pH, water content and total sugars were investigated. All analyzed honeydew (deciduous, fir and maclen) have a bacteriostatic and bactericidal effect on all tested multi-resistant strains of *K. pneumoniae* and *E. faecium*. The inhibitory action of honeydew primarily depends on the pH value and botanical origin, so the strongest antibacterial properties are shown by fir honeydew, and the weakest by deciduous honeydew (fir: pH $4,89 \pm 0,06$; deciduous: pH $4,50 \pm 0,04$; ANOVA, $p < 0,001$). The water content and total sugars do not affect the antimicrobial action of honeydew. Growth inhibition zones show that Gram negative strains of *K. pneumoniae* are more resistant to honeydew than Gram positive *E. faecium* (*K. pneumoniae*: $15,68 \text{ mm} \pm 2,75 \text{ mm}$; *E. faecium*: $20,95 \text{ mm} \pm 4,40 \text{ mm}$; ANOVA, Bonferroni test, $p < 0,001$). Furthermore, the susceptibility of *K. pneumoniae* strains ranges more widely (MIC/MBK: 19,6% - 56,1%) than the susceptibility of *E. faecium* strains (MIC/MBK: 19,6% - 33,2%) which may be explained by the ability of some strains of *K. pneumoniae* to form capsules and form biofilms.

Key words: honeydew, multi-resistant bacteria, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecium*, minimal inhibitory (MIC) and minimal bactericidal (MBC) concentration

11. Prilozi

Tablica P1. Razlike u udjelu vode (%) medljikovca različitog botaničkog podrijetla - jednosmjerna analiza varijance (*one-way ANOVA*).

Izvor varijabilnosti	Suma kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost sume kvadrata	Test statistika F	p vrijednost
Udio vode	8,102	2	4,051	3,545	0,110
Ostatak	5,713	5	1,143		

Tablica P2. Udio vode u medljikovcima - *post-hoc* Bonferroni test.

Usporedba	Razlika srednjih vrijednosti	Standardna greška	t vrijednost	p vrijednost
Bjelogorica - jela	-0,333	0,873	-0,382	1,000
Bjelogorica - maklen	2,133	0,976	2,186	0,241
Jela - maklen	2,467	0,976	2,528	0,158

Tablica P3. Razlike u pH vrijednosti medljikovca različitog botaničkog podrijetla - jednosmjerna analiza varijance (*one-way ANOVA*).

Izvor varijabilnosti	Suma kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost sume kvadrata	Test statistika F	p vrijednost
pH vrijednost	0,623	2	0,312	54,147	<0,001
Ostatak	0,029	5	0,006		

Tablica P4. pH vrijednost vode u medljikovcima - *post-hoc* Bonferroni test.

Usporedba	Razlika srednjih vrijednosti	Standardna greška	t vrijednost	p vrijednost
Bjelogorica - jela	-0,390	0,062	-6,295	0,004
Bjelogorica - maklen	-0,708	0,069	-10,227	<0,001
Jela - maklen	-0,318	0,069	-4,596	0,018

Tablica P5. Razlike u ukupnim šećerima medljikovca različitog botaničkog podrijetla - jednosmjerna analiza varijance (*one-way ANOVA*).

Izvor varijabilnosti	Suma kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost sume kvadrata	Test statistika F	p vrijednost
Ukupni šećeri	5,417	2	2,708	1,156	0,387
Ostatak	11,718	5	2,344		

Tablica P6. Ukupni šećeri u medljikovcima - *post-hoc* Bonferroni test.

Usporedba	Razlika srednjih vrijednosti	Standardna greška	t vrijednost	p vrijednost
Bjelogorica - jela	0,033	1,250	0,027	1,000
Bjelogorica - maklen	-1,883	1,398	-1,348	0,707
Jela - maklen	-1,917	1,398	-1,371	0,686

Tablica P7. Razlike u osjetljivosti vrste *K. pneumoniae* i *E. faecium* na medljikovac detektirane probirom antimikrobne aktivnosti medljikovca - jednosmjerna analiza varijance (*one-way ANOVA*).

Izvor varijabilnosti	Suma kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost sume kvadrata	Test statistika F	p vrijednost
Vrsta	2672,315	1	2672,315	198,911	<0,001
Ostatak	5132,057	382	13,435		

Tablica P8. Osjetljivost vrste *K. pneumoniae* i *E. faecium* na medljikovac detektirane probirom antimikrobne aktivnosti medljikovca – *post-hoc* Bonferroni test.

Usporedba	Razlika srednjih vrijednosti	Standardna greška	t vrijednost	p vrijednost
<i>K. pneumoniae</i> – <i>E. faecium</i>	5,276	0,374	14,104	<0,001

Tablica P9. Razlike u osjetljivosti sojeva vrste *K. pneumoniae* na medljikovac detektirane probirom antimikrobne aktivnosti medljikovca – jednosmjerna analiza varijance (*one-way ANOVA*).

Izvor varijabilnosti	Suma kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost sume kvadrata	Test statistika F	p vrijednost
Soj	535,167	11	48,652	9,679	<0,001
Ostatak	904,813	180	5,027		

Tablica P10. Osjetljivost sojeva vrste *K. pneumoniae* na medljikovac detektirane probirom antimikrobne aktivnosti medljikovca – *post-hoc* Bonferroni test.

Usporedba		Razlika srednjih vrijednosti	Standardna greška	t vrijednost	p vrijednost
H1_SC_COL_44	H2_COL_79	3,437	0,793	4,337	0,002
	H2_SC_COL_47	-1,500	0,793	-1,892	1,000
	SE_SC_COL_102	0,719	0,793	0,907	1,000
	SE_SC_COL_173	0,281	0,793	0,355	1,000
	SE_SC_COL_182	-2,125	0,793	-2,681	0,530
	SE_SC_COL_46	2,375	0,793	2,996	0,206
	SE_SC_COL_54	2,312	0,793	2,917	0,263
	SE_SC_COL_61	1,406	0,793	1,774	1,000
	SE_SC_COL_68	-1,750	0,793	-2,208	1,000
	SE_SC_COL_87	1,094	0,793	1,380	1,000
	SE_SC_COL_96	1,375	0,793	1,735	1,000
H2_COL_79	H2_SC_COL_47	-4,938	0,793	-6,229	<0,001
	SE_SC_COL_102	-2,719	0,793	-3,430	0,049
	SE_SC_COL_173	-3,156	0,793	-3,982	0,007
	SE_SC_COL_182	-5,562	0,793	-7,017	<0,001
	SE_SC_COL_46	-1,063	0,793	-1,340	1,000
	SE_SC_COL_54	-1,125	0,793	-1,419	1,000
	SE_SC_COL_61	-2,031	0,793	-2,563	0,740

Nastavak tablice P10. Osjetljivost sojeva vrste *K. pneumoniae* na medljikovac detektirane probirom

antimikrobne aktivnosti medljikovca - *post-hoc* Bonferroni test.

Usporedba		Razlika srednjih vrijednosti	Standardna greška	t vrijednost	p vrijednost
	SE_SC_COL_68	-5,187	0,793	-6,544	<0,001
	SE_SC_COL_87	-2,344	0,793	-2,957	0,233
	SE_SC_COL_96	-2,062	0,793	-2,602	0,663
H2_SC_COL_47	SE_SC_COL_102	2,219	0,793	2,799	0,375
	SE_SC_COL_173	1,781	0,793	2,247	1,000
	SE_SC_COL_182	-0,625	0,793	-0,788	1,000
	SE_SC_COL_46	3,875	0,793	4,888	<0,001
	SE_SC_COL_54	3,812	0,793	4,810	<0,001
	SE_SC_COL_61	2,906	0,793	3,666	0,021
	SE_SC_COL_68	-0,250	0,793	-0,315	1,000
	SE_SC_COL_87	2,594	0,793	3,272	0,084
	SE_SC_COL_96	2,875	0,793	3,627	0,025
SE_SC_COL_102	SE_SC_COL_173	-0,437	0,793	-0,552	1,000
	SE_SC_COL_182	-2,844	0,793	-3,588	0,028
	SE_SC_COL_46	1,656	0,793	2,089	1,000
	SE_SC_COL_54	1,594	0,793	2,011	1,000
	SE_SC_COL_61	0,688	0,793	0,867	1,000
	SE_SC_COL_68	-2,469	0,793	-3,114	0,142
	SE_SC_COL_87	0,375	0,793	0,473	1,000
	SE_SC_COL_96	0,656	0,793	0,828	1,000
SE_SC_COL_173	SE_SC_COL_182	-2,406	0,793	-3,036	0,182
	SE_SC_COL_46	2,094	0,793	2,641	0,593
	SE_SC_COL_54	2,031	0,793	2,563	0,740

Nastavak tablice P10. Osjetljivost sojeva vrste *K. pneumoniae* na medljikovac detektirane probirom

antimikrobne aktivnosti medljikovca - *post-hoc* Bonferroni test.

Usporedba		Razlika srednjih vrijednosti	Standardna greška	t vrijednost	p vrijednost
	SE_SC_COL_61	1,125	0,793	1,419	1,000
	SE_SC_COL_68	-2,031	0,793	-2,563	0,740
	SE_SC_COL_87	0,812	0,793	1,025	1,000
	SE_SC_COL_96	1,094	0,793	1,380	1,000
SE_SC_COL_182	SE_SC_COL_46	4,500	0,793	5,677	<0,001
	SE_SC_COL_54	4,437	0,793	5,598	<0,001
	SE_SC_COL_61	3,531	0,793	4,455	<0,001
	SE_SC_COL_68	0,375	0,793	0,473	1,000
	SE_SC_COL_87	3,219	0,793	4,061	0,005
	SE_SC_COL_96	3,500	0,793	4,415	0,001
SE_SC_COL_46	SE_SC_COL_54	-0,063	0,793	-0,079	1,000
	SE_SC_COL_61	-0,969	0,793	-1,222	1,000
	SE_SC_COL_68	-4,125	0,793	-5,204	<0,001
	SE_SC_COL_87	-1,281	0,793	-1,616	1,000
SE_SC_COL_46	SE_SC_COL_96	-1,000	0,793	-1,262	1,000
SE_SC_COL_54	SE_SC_COL_61	-0,906	0,793	-1,143	1,000
	SE_SC_COL_68	-4,062	0,793	-5,125	<0,001
	SE_SC_COL_87	-1,219	0,793	-1,538	1,000
	SE_SC_COL_96	-0,937	0,793	-1,183	1,000
SE_SC_COL_61	SE_SC_COL_68	-3,156	0,793	-3,982	0,007
	SE_SC_COL_87	-0,313	0,793	-0,394	1,000
	SE_SC_COL_96	-0,031	0,793	-0,039	1,000
SE_SC_COL_68	SE_SC_COL_87	2,844	0,793	3,588	0,028
	SE_SC_COL_96	3,125	0,793	3,942	0,008
SE_SC_COL_87	SE_SC_COL_96	0,281	0,793	0,355	1,000

Tablica P11. Razlike u osjetljivosti sojeva vrste *E. faecium* na medljikovac detektirane probirom antimikrobne aktivnosti medljikovca - jednosmjerna analiza varijance (*one-way ANOVA*).

Izvor varijabilnosti	Suma kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost sume kvadrata	Test statistika F	p vrijednost
Soj	203,766	11	18,524	0,956	0,489
Ostatak	3488,312	180	19,380		

Tablica P12. Osjetljivost sojeva vrste *E. faecium* na medljikovac detektirane probirom antimikrobne aktivnosti medljikovca – *post-hoc* Bonferroni test.

Usporedba	Razlika srednjih vrijednosti	Standardna greška	t vrijednost	p vrijednost	
182/0	189/0	1,625	1,556	1,044	1,000
	191/0	2,312	1,556	1,486	1,000
	192/0	1,375	1,556	0,883	1,000
	193/0	-0,906	1,556	-0,582	1,000
	206/0	0,531	1,556	0,341	1,000
	330	2,250	1,556	1,446	1,000
	560/2	2,062	1,556	1,325	1,000
	605	0,531	1,556	0,341	1,000
	SE_SC_COL_119	0,250	1,556	0,161	1,000
	SE_SC_COL_40	2,500	1,556	1,606	1,000
	SE_SC_COL_73	0,781	1,556	0,502	1,000
189/0	191/0	0,687	1,556	0,442	1,000
	192/0	-0,250	1,556	-0,161	1,000
	193/0	-2,531	1,556	-1,626	1,000
	206/0	-1,094	1,556	-0,703	1,000
	330	0,625	1,556	0,402	1,000
	560/2	0,437	1,556	0,281	1,000
	605	-1,094	1,556	-0,703	1,000

Nastavak tablice P12. Osjetljivost sojeva vrste *E. faecium* na medljikovac detektirane probirom

antimikrobne aktivnosti medljikovca – *post-hoc* Bonferroni test.

	Usporedba	Razlika srednjih vrijednosti	Standardna greška	t vrijednost	p vrijednost	
189/0	SE_SC_COL_119	-1,375	1,556	-0,883	1,000	
	SE_SC_COL_40	0,875	1,556	0,562	1,000	
	SE_SC_COL_73	-0,844	1,556	-0,542	1,000	
191/0	192/0	-0,937	1,556	-0,602	1,000	
	193/0	-3,219	1,556	-2,068	1,000	
	206/0	-1,781	1,556	-1,144	1,000	
	330	-0,062	1,556	-0,040	1,000	
	560/2	-0,250	1,556	-0,161	1,000	
	605	-1,781	1,556	-1,144	1,000	
	SE_SC_COL_119	-2,062	1,556	-1,325	1,000	
	SE_SC_COL_40	0,187	1,556	0,120	1,000	
	SE_SC_COL_73	-1,531	1,556	-0,984	1,000	
	192/0	193/0	-2,281	1,556	-1,466	1,000
		206/0	-0,844	1,556	-0,542	1,000
330		0,875	1,556	0,562	1,000	
560/2		0,687	1,556	0,442	1,000	
605		-0,844	1,556	-0,542	1,000	
SE_SC_COL_119		-1,125	1,556	-0,723	1,000	
SE_SC_COL_40		1,125	1,556	0,723	1,000	
SE_SC_COL_73		-0,594	1,556	-0,381	1,000	
193/0		206/0	1,438	1,556	0,924	1,000
	330	3,156	1,556	2,028	1,000	
	560/2	2,969	1,556	1,907	1,000	

Nastavak tablice P12. Osjetljivost sojeva vrste *E. faecium* na medljikovac detektirane probirom antimikrobne aktivnosti medljikovca – *post-hoc* Bonferroni test.

Usporedba	Razlika srednjih vrijednosti	Standardna greška	t vrijednost	p vrijednost	
	605	1,438	1,556	0,924	1,000
	SE_SC_COL_119	1,156	1,556	0,743	1,000
	SE_SC_COL_40	3,406	1,556	2,189	1,000
	SE_SC_COL_73	1,688	1,556	1,084	1,000
206/0	330	1,719	1,556	1,104	1,000
	560/2	1,531	1,556	0,984	1,000
	605	-0,0625	1,556	-0,040	1,000
	SE_SC_COL_119	-0,281	1,556	-0,181	1,000
	SE_SC_COL_40	1,969	1,556	1,265	1,000
	SE_SC_COL_73	0,250	1,556	0,161	1,000
330	560/2	-0,188	1,556	-0,120	1,000
	605	-1,719	1,556	-1,104	1,000
	SE_SC_COL_119	-2,000	1,556	-1,285	1,000
	SE_SC_COL_40	0,250	1,556	0,161	1,000
	SE_SC_COL_73	-1,469	1,556	-0,944	1,000
560/2	605	-1,531	1,556	-0,984	1,000
	SE_SC_COL_119	-1,812	1,556	-1,165	1,000
	SE_SC_COL_40	0,437	1,556	0,281	1,000
	SE_SC_COL_73	-1,281	1,556	-0,823	1,000
605	SE_SC_COL_119	-0,281	1,556	-0,181	1,000
	SE_SC_COL_40	1,969	1,556	1,265	1,000
605	SE_SC_COL_73	0,250	1,556	0,161	1,000
SE_SC_COL_119	SE_SC_COL_40	2,250	1,556	1,446	1,000
	SE_SC_COL_73	0,531	1,556	0,341	1,000
SE_SC_COL_40	SE_SC_COL_73	-1,719	1,556	-1,104	1,000

Tablica P13. Probir antimikrobne aktivnosti medljikovca različitog botaničkog podrijetla prema vrsti *K. pneumoniae* - jednosmjerna analiza varijance (*one-way ANOVA*).

Izvor Varijabilnosti	Suma kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost sume kvadrata	Test statistika F	p vrijednost
Podrijetlo	92,757	2	46;378	6,506	0,002
Ostatak	1347,222	189	7,128		

Tablica P14. Probir antimikrobne aktivnosti medljikovca različitog botaničkog podrijetla prema vrsti *K. pneumoniae* - *post-hoc* Bonferroni test.

Usporedba	Razlika srednjih vrijednosti	Standardna greška	t vrijednost	p vrijednost
Bjelogorica - jela	-1,583	0,445	-3,558	0,001
Bjelogorica - maklen	-0,528	0,497	-1,061	0,870
Jela - maklen	1,056	0,497	2,122	0,105

Tablica P15. Probir antimikrobne aktivnosti medljikovca različitog botaničkog podrijetla prema vrsti *E. faecium* - jednosmjerna analiza varijance (*one-way ANOVA*).

Izvor Varijabilnosti	Suma kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost sume kvadrata	Test statistika F	p vrijednost
Podrijetlo	1537,543	2	768,772	67,438	<0,001
Ostatak	2154,535	189	11,400		

Tablica P16. Probir antimikrobne aktivnosti medljikovca različitog botaničkog podrijetla prema vrsti *E. faecium* - *post-hoc* Bonferroni test.

Usporedba	Razlika srednjih vrijednosti	Standardna greška	t vrijednost	p vrijednost
Bjelogorica - jela	-6,250	0,563	-11,107	<0,001
Bjelogorica - maklen	-1,215	0,629	-1,932	0,165
Jela - maklen	5,035	0,629	8,003	<0,001

Tablica P17. Razlike u MIK vrijednostima medljikovca prema vrstama *K. pneumoniae* i *E. faecium* - jednosmjerna analiza varijance (*one-way ANOVA*).

Izvor varijabilnosti	Suma kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost sume kvadrata	Test statistika F	p vrijednost
Vrsta	847,667	1	874,667	29,548	<0,001
Ostatak	5624,206	190	29,601		

Tablica P18. Razlike u MIK vrijednostima medljikovca prema vrstama *K. pneumoniae* i *E. faecium* - *post-hoc* Bonferroni test.

Usporedba	Razlika srednjih vrijednosti	Standardna greška	t vrijednost	p vrijednost
<i>K. pneumoniae</i> - <i>E. faecium</i>	-4,269	0,785	-5,436	<0,001

Tablica P19. Razlike u MIK vrijednostima medljikovca prema sojevima *K. pneumoniae* - jednosmjerna analiza varijance (*one-way ANOVA*).

Izvor varijabilnosti	Suma kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost sume kvadrata	Test statistika F	p vrijednost
Soj	405,085	11	36,826	0,717	0,719
Ostatak	4316,241	84	51,384		

Tablica P20. Razlike u MIK vrijednostima medljikovca prema sojevima *K. pneumoniae* - *post-hoc* Bonferroni test.

Usporedba	Razlika srednjih vrijednosti	Standardna greška	t vrijednost	p vrijednost	
H1_SC_COL_44	H2_COL_79	-4,875	3,584	-1,360	1,000
	H2_SC_COL_47	-0,962	3,584	-0,269	1,000
	SE_SC_COL_102	-3,400	3,584	-0,949	1,000
	SE_SC_COL_173	1,475	3,584	0,412	1,000
	SE_SC_COL_182	-1,700	3,584	-0,474	1,000
	SE_SC_COL_46	-2,150	3,584	-0,600	1,000
	SE_SC_COL_54	-5,525	3,584	-1,542	1,000

Nastavak tablice P20. Razlike u MIK vrijednostima medljikovca prema sojevima *K. pneumoniae* - *post-hoc* Bonferroni test.

Usporedba		Razlika srednjih vrijednosti	Standardna greška	t vrijednost	p vrijednost
	SE_SC_COL_61	-4,425	3,584	-1,235	1,000
	SE_SC_COL_68	-4,138	3,584	-1,154	1,000
	SE_SC_COL_87	-1,925	3,584	-0,537	1,000
	SE_SC_COL_96	-4,363	3,584	-1,217	1,000
H2_COL_79	H2_SC_COL_47	3,913	3,584	1,092	1,000
	SE_SC_COL_102	1,475	3,584	0,412	1,000
	SE_SC_COL_173	6,350	3,584	1,772	1,000
	SE_SC_COL_182	3,175	3,584	0,886	1,000
	SE_SC_COL_46	2,725	3,584	0,760	1,000
	SE_SC_COL_54	-0,650	3,584	-0,181	1,000
	SE_SC_COL_61	0,450	3,584	0,126	1,000
	SE_SC_COL_68	0,737	3,584	0,206	1,000
	SE_SC_COL_87	2,950	3,584	0,823	1,000
	SE_SC_COL_96	0,513	3,584	0,143	1,000
H2_SC_COL_47	SE_SC_COL_102	-2,438	3,584	-0,680	1,000
	SE_SC_COL_173	2,438	3,584	0,680	1,000
	SE_SC_COL_182	-0,738	3,584	-0,206	1,000
	SE_SC_COL_46	-1,188	3,584	-0,331	1, 000
	SE_SC_COL_54	-4,563	3,584	-1,273	1, 000
	SE_SC_COL_61	-3,463	3,584	-0,966	1,000
	SE_SC_COL_68	-3,175	3,584	-0,886	1,000
	SE_SC_COL_87	-0,963	3,584	-0,269	1,000
	SE_SC_COL_96	-0,963	3,584	-0,949	1,000
SE_SC_COL_102	SE_SC_COL_173	4,875	3,584	1,360	1,000

Nastavak tablice P20. Razlike u MIK vrijednostima medljikovca prema sojevima *K. pneumoniae* - *post-hoc* Bonferroni test.

Usporedba	Razlika srednjih vrijednosti	Standardna greška	t vrijednost	p vrijednost
SE_SC_COL_182	1,700	3,584	0,474	1,000
SE_SC_COL_46	1,250	3,584	0,349	1,000
SE_SC_COL_54	-2,125	3,584	-0,593	1,000
SE_SC_COL_61	-1,025	3,584	-0,286	1,000
SE_SC_COL_68	-0,737	3,584	-0,206	1,100
SE_SC_COL_87	1,475	3,584	0,412	1,000
SE_SC_COL_96	-0,962	3,584	-0,269	1,000
SE_SC_COL_173 SE_SC_COL_182	-3,175	3,584	-0,886	1,000
SE_SC_COL_46	-3,625	3,584	-1,011	1,000
SE_SC_COL_54	-7,000	3,584	-1,953	1,000
SE_SC_COL_61	-5,900	3,584	-1,646	1,000
SE_SC_COL_68	-5,613	3,584	-1,566	1,000
SE_SC_COL_87	-3,400	3,584	-0,949	1,000
SE_SC_COL_96	-5,838	3,584	-1,629	1,000
SE_SC_COL_182 SE_SC_COL_46	-0,450	3,584	-0,126	1,000
SE_SC_COL_54	-3,825	3,584	-1,067	1,000
SE_SC_COL_61	-2,725	3,584	-0,760	1,000
SE_SC_COL_68	-2,438	3,584	-0,680	1,000
SE_SC_COL_87	-0,225	3,584	-0,063	1,000
SE_SC_COL_96	-2,663	3,584	-0,743	1,000
SE_SC_COL_46 SE_SC_COL_54	-3,375	3,584	-0,942	1,000
SE_SC_COL_61	-2,275	3,584	-0,635	1,000
SE_SC_COL_68	-1,987	3,584	-0,555	1,000
SE_SC_COL_87	0,225	3,584	0,063	1,000

Nastavak tablice P20. Razlike u MIK vrijednostima medljikovca prema sojevima *K. pneumoniae* - *post-*

hoc Bonferroni test.

Usporedba		Razlika srednjih vrijednosti	Standardna greška	t vrijednost	p vrijednost
	SE_SC_COL_96	-2,212	3,584	-0,617	1,000
SE_SC_COL_54	SE_SC_COL_61	1,100	3,584	0,307	1,000
	SE_SC_COL_68	1,387	3,584	0,387	1,000
	SE_SC_COL_87	3,600	3,584	1,004	1,000
	SE_SC_COL_96	1,163	3,584	0,324	1,000
SE_SC_COL_61	SE_SC_COL_68	0,288	3,584	0,080	1,000
	SE_SC_COL_87	2,500	3,584	0,698	1,000
	SE_SC_COL_96	0,063	3,584	0,017	1,000
SE_SC_COL_68	SE_SC_COL_87	2,213	3,584	0,617	1,000
	SE_SC_COL_96	-0,225	3,584	-0,063	1,000
SE_SC_COL_87	SE_SC_COL_96	-2,437	3,584	-0,680	1,000

Tablica P21. Razlike u MIK vrijednostima medljikovca prema sojevima *E. faecium* - jednosmjerna analiza varijance (one-way ANOVA).

Izvor varijabilnosti	Suma kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost sume kvadrata	Test statistika F	p vrijednost
Soj	70,218	11	6,383	0,644	0,786
Ostatak	832,661	84	9,913		

Tablica P22. Razlike u MIK vrijednostima medljikovca prema sojevima *E. faecium* - post-hoc Bonferroni test.

Usporedba		Razlika srednjih vrijednosti	Standardna greška	t vrijednost	p vrijednost	
182/0	189/0	0,738	1,113	0,663	1,000	
	191/0	0,000	1,113	0,000	0,998	
	192/0	-1,700	1,113	-1,527	0,691	
	193/0	-0,962	1,113	-0,865	0,918	
	206/0	-1,475	1,113	-1,325	0,776	
	330	0,000	1,113	0,000	0,998	
	560/2	-1,475	1,113	-1,325	0,776	
	605	-0,738	1,113	-0,663	0,955	
	SE_SC_COL_119	0,738	1,113	0,663	1,000	
	SE_SC_COL_40	-1,700	1,113	-1,527	0,691	
	SE_SC_COL_73	-0,737	1,113	-0,663	0,955	
	189/0	191/0	-0,738	1,113	-0,663	1,000
		192/0	-2,438	1,113	-2,190	0,958
		193/0	-1,700	1,113	-1,527	0,998
206/0		-2,213	1,113	-1,988	0,979	
330		-0,738	1,113	-0,663	1,000	
560/2		-2,213	1,113	-1,988	0,979	
605		-1,475	1,113	-1,325	0,999	
SE_SC_COL_119		0,000	1,113	0,000	1,000	
SE_SC_COL_40		-2,438	1,113	-2,190	0,958	
SE_SC_COL_73		-1,475	1,113	-1,325	0,999	
191/0	192/0	-1,700	1,113	-1,527	0,998	
	193/0	-0,962	1,113	-0,865	1,000	
	206/0	-1,475	1,113	-1,325	0,999	

Nastavak tablice P22. Razlike u MIK vrijednostima medljikovca prema sojevima *E. faecium* - *post-hoc* Bonferroni test.

Usporedba	Razlika srednjih	Standardna	t vrijednost	p vrijednost
-----------	------------------	------------	--------------	--------------

		vrijednosti	greška		
	330	0,000	1,113	0,000	1,000
	560/2	-1,475	1,113	-1,325	0,999
	605	-0,738	1,113	-0,663	1,000
	SE_SC_COL_119	0,738	1,113	0,663	1,000
191/0	SE_SC_COL_40	-1,700	1,113	-1,527	0,998
	SE_SC_COL_73	-0,737	1,113	-0,663	1,000
192/0	193/0	0,738	1,113	0,663	1,000
	206/0	0,225	1,113	0,202	1,000
	330	1,700	1,113	1,527	0,998
	560/2	0,225	1,113	0,202	1,000
	605	0,962	1,113	0,865	1,000
	SE_SC_COL_119	2,438	1,113	2,190	0,958
	SE_SC_COL_40	0,000	1,113	0,000	1,000
	SE_SC_COL_73	0,963	1,113	0,865	1,000
193/0	206/0	-0,513	1,113	-0,460	1,000
	330	0,962	1,113	0,865	1,000
	560/2	-0,512	1,113	-0,460	1,000
	605	0,225	1,113	0,202	1,000
	SE_SC_COL_119	1,700	1,113	1,527	0,998
	SE_SC_COL_40	-0,738	1,113	-0,663	1,000
	SE_SC_COL_73	0,225	1,113	0,202	1,000
206/0	330	1,475	1,113	1,325	0,999
	560/2	0,000	1,113	0,000	1,000
	605	0,738	1,113	0,663	1,000

Nastavak tablice P22. Razlike u MIK vrijednostima medljikovca prema sojevima *E. faecium* - *post-hoc* Bonferroni test.

Usporedba	Razlika srednjih vrijednosti	Standardna greška	t vrijednost	p vrijednost
------------------	-------------------------------------	--------------------------	---------------------	---------------------

	SE_SC_COL_119	2,213	1,113	1,988	0,979
	SE_SC_COL_40	-0,225	1,113	-0,202	1,000
	SE_SC_COL_73	0,738	1,113	0,663	1,000
330	560/2	-1,475	1,113	-1,325	0,999
	605	-0,738	1,113	-0,663	1,000
	SE_SC_COL_119	0,738	1,113	0,663	1,000
	SE_SC_COL_40	-1,700	1,113	-1,527	0,998
	SE_SC_COL_73	-0,737	1,113	-0,663	1,000
560/2	605	0,737	1,113	0,663	1,000
	SE_SC_COL_119	2,213	1,113	1,988	0,979
	SE_SC_COL_40	-0,225	1,113	-0,202	1,000
	SE_SC_COL_73	0,738	1,113	0,663	1,000
605	SE_SC_COL_119	1,475	1,113	1,325	0,999
	SE_SC_COL_40	-0,962	1,113	-0,865	1,000
	SE_SC_COL_73	0,000	1,113	0,000	1,000
SE_SC_COL_119	SE_SC_COL_40	-2,438	1,113	-2,190	0,958
	SE_SC_COL_73	-1,475	1,113	-1,325	0,999
SE_SC_COL_40	SE_SC_COL_73	0,953	1,113	0,865	1,000

Tablica P23. MIK vrijednosti medljikovca različitog botaničkog podrijetla prema vrsti *K. pneumoniae* - jednosmjerna analiza varijance (*one-way ANOVA*).

Izvor Varijabilnosti	Suma kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost sume kvadrata	Test statistika F	p vrijednost
Podrijetlo	32,118	2	16,059	0,318	0,728
Ostatak	4689,209	93	50,422		

Tablica P24. MIK vrijednosti medljikovca različitog botaničkog podrijetla prema vrsti *K. pneumoniae* - *post-hoc* Bonferroni test.

Usporedba	Razlika srednjih vrijednosti	Standardna greška	t vrijednost	p vrijednost
Bjelogorica - jela	1,217	1,674	0,727	1,000
Bjelogorica - maklen	0,057	1,871	0,030	1,000
Jela - maklen	-1,160	1,871	-0,620	1,000

Tablica P25. MIK vrijednosti medljikovca različitog botaničkog podrijetla prema vrsti *E. faecium* - jednosmjerna analiza varijance (*one-way ANOVA*).

Izvor Varijabilnosti	Suma kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost sume kvadrata	Test statistika F	p vrijednost
Podrijetlo	72,141	2	36,070	4,038	0,021
Ostatak	830,738	93	8,933		

Tablica P26. MIK vrijednosti medljikovca različitog botaničkog podrijetla prema vrsti *E. faecium* - *post-hoc* Bonferroni test.

Usporedba	Razlika srednjih vrijednosti	Standardna greška	t vrijednost	p vrijednost
Bjelogorica - jela	1,361	0,704	1,932	0,169
Bjelogorica - maklen	2,149	0,788	2,728	0,023
Jela - maklen	0,787	0,788	1,000	0,960

Tablica P27. Razlike u MBK vrijednostima medljikovca prema vrstama *K. pneumoniae* i *E. faecium* - jednosmjerna analiza varijance (*one-way* ANOVA).

Izvor varijabilnosti	Suma kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost sume kvadrata	Test statistika F	p vrijednost
Vrsta	981,021	1	981,021	28,901	<0,001
Ostatak	6449,366	190	33,944		

Tablica P28. Razlike u MBK vrijednostima medljikovca prema vrstama *K. pneumoniae* i *E. faecium* - *post-hoc* Bonferroni test.

Usporedba	Razlika srednjih vrijednosti	Standardna greška	t vrijednost	p vrijednost
<i>K. pneumoniae</i> - <i>E. faecium</i>	-4,521	0,841	-5,376	<0,001

Tablica P29. Razlike u MBK vrijednostima medljikovca prema sojevima *K. pneumoniae* - jednosmjerna analiza varijance (*one-way* ANOVA).

Izvor varijabilnosti	Suma kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost sume kvadrata	Test statistika F	p vrijednost
Soj	449,930	11	40,903	0,681	0,752
Ostatak	5043,070	84	60,037		

Tablica P30. Razlike u MBK vrijednostima medljikovca prema sojevima *K. pneumoniae* - *post-hoc* Bonferroni test.

Usporedba	Razlika srednjih vrijednosti	Standardna greška	t vrijednost	p vrijednost
H1_SC_COL_44 H2_COL_79	-3,913	3,874	-1,010	1,000
H2_SC_COL_47	-0,963	3,874	-0,248	1,000
SE_SC_COL_102	-3,400	3,874	-0,878	1,000
SE_SC_COL_173	2,438	3,874	0,629	1,000
SE_SC_COL_182	-0,738	3,874	-0,190	1,000
SE_SC_COL_46	-1,188	3,874	-0,307	1,000
SE_SC_COL_54	-5,300	3,874	-1,368	1,000

Nastavak tablice P30. Razlike u MBK vrijednostima medljikovca prema sojevima *K. pneumoniae* - *post-hoc* Bonferroni test.

Usporedba		Razlika srednjih vrijednosti	Standardna greška	t vrijednost	p vrijednost
	SE_SC_COL_61	-3,463	3,874	-0,894	1,000
	SE_SC_COL_68	-4,788	3,874	-1,236	1,000
	SE_SC_COL_87	-0,963	3,874	-0,248	1,000
	SE_SC_COL_96	-3,400	3,874	-0,878	1,000
H2_COL_79	H2_SC_COL_47	2,950	3,874	0,761	1,000
	SE_SC_COL_102	0,512	3,874	0,132	1,000
	SE_SC_COL_173	6,350	3,874	1,639	1,000
	SE_SC_COL_182	3,175	3,874	0,820	1,000
	SE_SC_COL_46	2,725	3,874	0,703	1,000
	SE_SC_COL_54	-1,388	3,874	-0,358	1,000
	SE_SC_COL_61	0,450	3,874	0,116	1,000
	SE_SC_COL_68	-0,875	3,874	-0,226	1,000
	SE_SC_COL_87	2,950	3,874	0,761	1,000
	SE_SC_COL_96	0,512	3,874	0,132	1,000
H2_SC_COL_47	SE_SC_COL_102	-2,438	3,874	-0,629	1,000
	SE_SC_COL_173	3,400	3,874	0,878	1,000
	SE_SC_COL_182	0,225	3,874	0,058	1,000
	SE_SC_COL_46	-0,225	3,874	-0,058	1,000
	SE_SC_COL_54	-4,338	3,874	-1,120	1,000
	SE_SC_COL_61	-2,500	3,874	-0,645	1,000
	SE_SC_COL_68	-3,825	3,874	-0,987	1,000
	SE_SC_COL_87	-1,110	3,874	-0,287	1,000
	SE_SC_COL_96	-2,438	3,874	-0,629	1,000
SE_SC_COL_102	SE_SC_COL_173	5,838	3,874	1,507	1,000

Nastavak tablice P30. Razlike u MBK vrijednostima medljikovca prema sojevima *K. pneumoniae* - *post-hoc* Bonferroni test.

Usporedba	Razlika srednjih vrijednosti	Standardna greška	t vrijednost	p vrijednost	
	SE_SC_COL_182	2,662	3,874	0,687	1,000
	SE_SC_COL_46	2,212	3,874	0,571	1,000
SE_SC_COL_102	SE_SC_COL_54	-1,900	3,874	-0,490	1,000
	SE_SC_COL_61	-0,063	3,874	-0,016	1,000
	SE_SC_COL_68	-1,387	3,874	-0,358	1,000
	SE_SC_COL_87	2,437	3,874	0,629	1,000
	SE_SC_COL_96	-2,220	3,874	-0,573	1,000
SE_SC_COL_173	SE_SC_COL_182	-3,175	3,874	-0,820	1,000
	SE_SC_COL_46	-3,625	3,874	-0,936	1,000
	SE_SC_COL_54	-7,738	3,874	-1,997	1,000
	SE_SC_COL_61	-5,900	3,874	-1,523	1,000
	SE_SC_COL_68	-7,225	3,874	-1,865	1,000
	SE_SC_COL_87	-3,400	3,874	-0,878	1,000
	SE_SC_COL_96	-5,838	3,874	-1,507	1,000
SE_SC_COL_182	SE_SC_COL_46	-0,450	3,874	-0,116	1,000
	SE_SC_COL_54	-4,562	3,874	-1,178	1,000
	SE_SC_COL_61	-2,725	3,874	-0,703	1,000
	SE_SC_COL_68	-4,050	3,874	-1,045	1,000
	SE_SC_COL_87	-0,225	3,874	-0,058	1,000
	SE_SC_COL_96	-2,662	3,874	-0,687	1,000
SE_SC_COL_46	SE_SC_COL_54	-4,112	3,874	-1,062	1,000
	SE_SC_COL_61	-2,275	3,874	-0,587	1,000
	SE_SC_COL_68	-3,600	3,874	-0,929	1,000
	SE_SC_COL_87	0,225	3,874	0,058	1,000

Nastavak tablice P30. Razlike u MBK vrijednostima medljikovca prema sojevima *K. pneumoniae* - *post-hoc* Bonferroni test.

Usporedba		Razlika srednjih vrijednosti	Standardna greška	t vrijednost	p vrijednost
	SE_SC_COL_96	-2,212	3,874	-0,571	1,000
SE_SC_COL_54	SE_SC_COL_61	1,837	3,874	0,474	1,000
	SE_SC_COL_68	0,512	3,874	0,132	1,000
	SE_SC_COL_87	4,337	3,874	1,120	1,000
	SE_SC_COL_96	1,900	3,874	0,490	1,000
SE_SC_COL_61	SE_SC_COL_68	-1,325	3,874	-0,342	1,000
	SE_SC_COL_87	2,500	3,874	0,645	1,000
	SE_SC_COL_96	0,062	3,874	0,016	1,000
SE_SC_COL_68	SE_SC_COL_87	3,825	3,874	0,987	1,000
	SE_SC_COL_96	1,387	3,874	0,358	1,000
SE_SC_COL_87	SE_SC_COL_96	-2,437	3,874	-0,629	1,000

Tablica P31. Razlike u MBK vrijednostima medljikovca prema sojevima *E. faecium* - jednosmjerna analiza varijance (*one-way* ANOVA).

Izvor varijabilnosti	Suma kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost sume kvadrata	Test statistika F	p vrijednost
Soj	70,218	11	6,383	0,644	0,786
Ostatak	832,661	84	9,913		

Tablica P32. Razlike u MBK vrijednostima medljikovca prema sojevima *E. faecium* - *post-hoc* Bonferroni test.

Usporedba		Razlika srednjih vrijednosti	Standardna greška	t vrijednost	p vrijednost	
182/0	189/0	0,738	1,113	0,663	1,000	
	191/0	0,000	1,113	0,000	1,000	
	192/0	-1,700	1,113	-1,527	0,995	
	193/0	-0,962	1,113	-0,865	1,000	
	206/0	-1,475	1,113	-1,325	0,999	
	330	0,000	1,113	0,000	1,000	
	560/2	-1,475	1,113	-1,325	0,999	
	605	-0,738	1,113	-0,663	1,000	
	SE_SC_COL_119	0,738	1,113	0,663	1,000	
	SE_SC_COL_40	-1,700	1,113	-1,527	0,995	
	SE_SC_COL_73	-0,737	1,113	-0,663	1,000	
	189/0	191/0	-0,738	1,113	-0,663	1,000
		192/0	-2,438	1,113	-2,190	0,922
193/0		-1,700	1,113	-1,527	0,995	
206/0		-2,213	1,113	-1,988	0,959	
330		-0,738	1,113	-0,663	1,000	
560/2		-2,213	1,113	-1,988	0,959	
605		-1,475	1,113	-1,325	0,999	
SE_SC_COL_119		0,000	1,113	0,000	1,000	
SE_SC_COL_40		-2,438	1,113	-2,190	0,922	
SE_SC_COL_73		-1,475	1,113	-1,325	0,999	
191/0	192/0	-1,700	1,113	-1,527	0,995	
	193/0	-0,962	1,113	-0,865	1,000	
	206/0	-1,475	1,113	-1,325	0,999	

Nastavak tablice P32. Razlike u MBK vrijednostima medljikovca prema sojevima *E. faecium* - *post-*

hoc Bonferroni test.

Usporedba	Razlika srednjih vrijednosti	Standardna greška	t vrijednost	p vrijednost	
	330	0,000	1,113	0,000	1,000
	560/2	-1,457	1,113	-1,325	0,999
	605	-0,738	1,113	-0,663	1,000
	SE_SC_COL_119	0,738	1,113	0,663	1,000
	SE_SC_COL_40	-1,700	1,113	-1,527	0,995
	SE_SC_COL_73	-0,737	1,113	-0,663	1,000
192/0	193/0	0,738	1,113	0,663	1,000
	206/0	0,225	1,113	0,202	1,000
	330	1,700	1,113	1,527	0,995
	560/2	0,225	1,113	0,202	1,000
	605	0,962	1,113	0,865	1,000
	SE_SC_COL_119	2,438	1,113	2,190	0,922
	SE_SC_COL_40	0,000	1,113	0,000	1,000
	SE_SC_COL_73	0,963	1,113	0,865	1,000
193/0	206/0	-0,513	1,113	-0,460	1,000
	330	0,962	1,113	0,865	1,000
	560/2	-0,512	1,113	-0,460	1,000
	605	0,225	1,113	0,202	1,000
	SE_SC_COL_119	1,700	1,113	1,527	0,995
	SE_SC_COL_40	-0,738	1,113	-0,663	1,000
	SE_SC_COL_73	0,225	1,113	0,202	1,000
206/0	330	1,475	1,113	1,325	0,999
	560/2	0,000	1,113	0,000	1,000

Nastavak tablice P32. Razlike u MBK vrijednostima medljikovca prema sojevima *E. faecium* - post-hoc Bonferroni test.

Usporedba		Razlika srednjih vrijednosti	Standardna greška	t vrijednost	p vrijednost
	605	0,738	1,113	0,663	1,000
	SE_SC_COL_119	2,213	1,113	1,988	0,959
	SE_SC_COL_40	-0,225	1,113	-0,202	1,000
	SE_SC_COL_73	0,738	1,113	0,663	1,000
330	560/2	-1,475	1,113	-1,325	0,999
	605	-0,738	1,113	-0,663	1,000
	SE_SC_COL_119	0,738	1,113	0,663	1,000
	SE_SC_COL_40	-1,700	1,113	-1,527	0,995
	SE_SC_COL_73	-0,737	1,113	-0,663	1,000
560/2	605	0,737	1,113	0,663	1,000
	SE_SC_COL_119	2,213	1,113	1,988	0,959
	SE_SC_COL_40	-0,225	1,113	-0,202	1,000
	SE_SC_COL_73	0,738	1,113	0,663	1,000
605	SE_SC_COL_119	1,475	1,113	1,325	0,999
	SE_SC_COL_40	-0,962	1,113	-0,865	1,000
	SE_SC_COL_73	0,000	1,113	0,000	1,000
SE_SC_COL_119	SE_SC_COL_40	-2,438	1,113	-2,190	0,922
	SE_SC_COL_73	-1,475	1,113	-1,325	0,999
SE_SC_COL_40	SE_SC_COL_73	0,963	1,113	0,865	1,000

Tablica P33. MBK vrijednosti medljikovca različitog botaničkog podrijetla prema vrsti *K. pneumoniae* - jednosmjerna analiza varijance (*one-way ANOVA*).

Izvor Varijabilnosti	Suma kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost sume kvadrata	Test statistika F	p vrijednost
Podrijetlo	27,520	2	13,760	0,234	0,792
Ostatak	5465,479	93	58,769		

Tablica P34. MBK vrijednosti medljikovca različitog botaničkog podrijetla prema vrsti *K. pneumoniae* - *post-hoc* Bonferroni test.

Usporedba	Razlika srednjih vrijednosti	Standardna greška	t vrijednost	p vrijednost
Bjelogorica - jela	1,236	1,807	0,684	1,000
Bjelogorica - maklen	0,649	2,020	0,321	1,000
Jela - maklen	-0,588	2,020	-0,291	1,000

Tablica P35. MBK vrijednosti medljikovca različitog botaničkog podrijetla prema vrsti *E. faecium* - jednosmjerna analiza varijance (*one-way ANOVA*).

Izvor Varijabilnosti	Suma kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost sume kvadrata	Test statistika F	p vrijednost
Podrijetlo	66,480	2	33,240	3,474	0,035
Ostatak	889,886	93	9,569		

Tablica P36. MBK vrijednosti medljikovca različitog botaničkog podrijetla prema vrsti *E. faecium* - *post-hoc* Bonferroni test.

Usporedba	Razlika srednjih vrijednosti	Standardna greška	t vrijednost	p vrijednost
Bjelogorica - jela	0,869	0,729	1,192	0,708
Bjelogorica - maklen	2,149	0,815	2,636	0,030
Jela - maklen	1,279	0,815	1,569	0,360