

# Mikrobiološka analiza i određivanje antimikrobne aktivnosti različitih vrsta meda

---

**Hrupački, Matea**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2023**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:359507>

*Rights / Prava:* [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-10-15**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Sveučilišni prijediplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Matea Hrupački  
0058218219**

**MIKROBIOLOŠKA ANALIZA I ODREĐIVANJE  
ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI RAZLIČITIH VRSTA  
MEDA**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Mikrobiologija

**Mentor:** dr. sc. Željko Jakopović

**Zagreb, 2023.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Sveučilišni prijediplomski studij Prehrambena tehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

### Mikrobiološka analiza i određivanje antimikrobne aktivnosti različitih vrsta meda

Matea Hrupački, 0058218219

#### Sažetak:

Med je prirodna slatka tvar koju proizvode pčele medarice iz cvjetnog nektara. Od davnina je zastupljen u ljudskoj prehrani kao zaslađivač te u liječenju raznih bolesti zahvaljujući svojim antiseptičkim i antimikrobnim svojstvima. U sklopu ovog rada ispitana je mikrobiološka ispravnost 5 vrsta medova, antimikrobna aktivnost njihovih vodenih otopina prema *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* i *Saccharomyces cerevisiae* te minimalna inhibitorna koncentracija. Dobiveni rezultati su pokazali kako su svi uzorci meda, osim lipinog, mikrobiološki ispravni i odgovaraju zahtjevima Pravilnika. Svi su medovi u 100 %-tnoj koncentraciji pokazali antimikrobno djelovanje prema ispitanim bakterijama, dok je ova aktivnost izostala prema kvascima. Minimalne inhibitorne koncentracije cvjetnog meda prema *S. aureus* i *E. coli* postignute su primjenom 90 %-tne, odnosno 80 %-tne vodene otopine, dok su 10 %-tne vodene otopine medljikovca i meda od suncokreta inhibitorno djelovali prema *S. aureus*. S druge strane, vodene otopine meda od kestena i lipe nisu pokazale inhibicijski učinak prema testiranim mikroorganizmima.

**Ključne riječi:** med, mikrobiološka analiza, antimikrobna aktivnost, MIK

**Rad sadrži:** 31 stranica, 9 slika, 3 tablice, 28 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

**Mentor:** dr. sc. Željko Jakopović

**Datum obrane:** 14. srpanj, 2023.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
University undergraduate study Food Technology

Department of Biochemical Engineering  
Laboratory for General Microbiology and Food Microbiology

Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Food Technology

Microbiological analysis and determination of antimicrobial properties of different types of  
honey

Matea Hrupački, 0058218219

**Abstract:**

Honey is a natural sweet substance produced by honeybees from flower nectar. It has a long history in human nutrition as the sweetener and in the treatment of various diseases with its antiseptic and antimicrobial properties. As part of this research, the microbiological quality of five types of honey according to the prescribed regulations for foodstuffs, the antimicrobial activity of their solutions against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* and the minimum inhibitory concentration were examined. The obtained results showed that all samples of honey, except linden honey, are microbiologically acceptable and comply with the requirements of the prescribed regulations for foodstuffs. All honeys in 100 % concentration show antimicrobial activity against tested microorganisms, although it was not detected against yeasts. The minimum inhibitory concentrations of flower honey against *S. aureus* and *E. coli* are 90 % and 80 % aqueous solutions, respectively, while 10 % aqueous solutions of honeydew and sunflower honey are inhibitory against *S. aureus*. On the other hand, aqueous solutions of chestnut and linden honey did not show inhibitory effects on the tested microorganisms.

**Keywords:** honey, microbiological analysis, antimicrobial activity, MIC

**Thesis contains:** 31 pages, 9 figures, 3 tables, 28 references

**Original in:** Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

**Mentor:** Željko Jakopović, PhD

**Thesis defended:** July, 2023

## Sadržaj

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. UVOD.....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>2. TEORIJSKI DIO.....</b>   | <b>2</b>  |
| 2.1. MED.....  | 2         |
| 2.1.1. PODJELA MEDA.....   | 3         |
| 2.1.2. FIZIKALNO-KEMIJSKA SVOJSTVA MEDA .....                                    | 5         |
| 2.1.3. PATVORENJE MEDA.....  | 7         |
| 2.2. MIKROBIOLOŠKI KRITERIJI MEDA .....  | 8         |
| 2.3. ANTIMIKROBNA SVOJSTVA MEDA.....   | 9         |
| <b>3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>  | <b>11</b> |
| 3.1. MATERIJALI .....  | 11        |
| 3.1.1. UZORCI MEDA .....   | 11        |
| 3.1.2. MIKROORGANIZMI.....   | 11        |
| 3.1.3. HRANJIVE PODLOGE ZA ODREĐIVANJE BROJA MIKROORGANIZAMA .....               | 12        |
| 3.1.4. PRIBOR I APARATURA.....   | 13        |
| 3.2. METODE.....   | 14        |
| 3.2.1. ODREĐIVANJE MIKROBIOLOŠKE KVALITETE MEDA .....                            | 14        |
| 3.2.2. ODREĐIVANJE ANTIMIKROBNOG DJELOVANJA MEDA METODOM JAŽICAMA U PODLOZI..... | 14        |
| 3.2.3. ODREĐIVANJE MINIMALNE INHIBITORNE KONCENTRACIJE MEDA .....                | 16        |
| <b>4. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>  | <b>17</b> |
| 4.1. REZULTATI .....   | 17        |
| 4.1.1. REZULTATI ODREĐIVANJA MIKROBIOLOŠKE KVALITETE MEDA .....                  | 17        |
| 4.1.2. REZULTATI ODREĐIVANJA ANTIMIKROBNOG DJELOVANJA MEDA .....                 | 18        |
| 4.1.3. REZULTATI ODREĐIVANJA MINIMALNE INHIBITORNE KONCENTRACIJE MEDA .....      | 22        |
| 4.2. RASPRAVA.....   | 25        |
| <b>5. ZAKLJUČCI.....</b>   | <b>28</b> |
| <b>6. POPIS LITERATURE.....</b>  | <b>29</b> |

## 1. UVOD

Med je prirodni pčelinji proizvod široko prihvaćen kao hrana i lijek od strane svih generacija, tradicija i civilizacija, kako starih, tako i modernih. Najmanje 2700 godina ljudi koriste med za liječenje raznih bolesti lokalnom primjenom, ali tek su nedavno otkrivena antiseptička i antimikrobna svojstva meda.

Velik broj *in vitro* i klinički provedenih studija tijekom 19. stoljeća potvrdio je antimikrobno (antibakterijsko, antifungalno i antivirusno) djelovanje meda širokog spektra što može biti zbog kiselosti (niski pH), osmotskog učinka, visoke koncentracije šećera, prisutnost bakteriostatskih i bakteriocidnih komponenti i mnogih drugih imunomodulirajućih i protuupalnih svojstava meda (Israili, 2014). Iako med posjeduje karakteristična svojstva koja onemogućuju rast i razmnožavanje većine mikroorganizama, postoje mikroorganizmi koji mogu preživjeti u medu i time utjecati na stabilnost i kvalitetu proizvoda. Tijekom proizvodnje meda može doći do onečišćenja iz dva izvora. Primarno onečišćenje povezano je uz probavni sustav pčele, prašinu, tlo, pelud, nektar i zrak. Mikrofloru koja je povezana uz pčele i njihovu hranu (šećerno-medna pogača, pelud) čine pleomorfne bakterije (prisutne u više oblika – koki, bacili i spirili), plijesni (iz rodova *Penicillium*, *Mucor* i *Aspergillus*), bakterije iz porodice *Enterobacteriaceae*, sporogene bakterije (većinom *Bacillus* spp.) i kvasci (Gilliam, 1997). Međutim, antimikrobna aktivnost jako varira i ovisi o cvjetnom izvoru (čiji kemijski spojevi mogu povećati ili smanjiti aktivnost) i konačnoj obradi meda. Osim navedenog, godišnje doba i lokalizacija biljaka također mogu utjecati na antimikrobnu aktivnost meda (Grabowski, 2015).

Stoga je cilj ovog rada bio ispitati mikrobiološku kvalitetu različitih uzoraka meda te odrediti njihovu antimikrobnu aktivnost.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Med

Med je prirodna slatka tvar koju proizvode pčele medarice iz cvjetnog nektara. Med ima dugu povijest primjene u ljudskoj prehrani kao zaslađivač i zdrava hrana. Još 5500 godina prije Krista med se spominje u spisima Egipta, Indije i Kine. Med se od davnina koristi za liječenje inficiranih rana, a i danas su poznate njegove brojne koristi u liječenju mnogih ljudskih bolesti uključujući alergije, astmu, bronhitis, običnu prehladu, gripu, peludnu groznicu, začepljenost nosa, upalu sinusa, upalu grla, kašalj, anemiju te razne posjekotine, opekline, rane i slično (Israili, 2014).

Pčele medarice skupljaju med sisanjem cvjetnog nektara, prerađuju ga dodatkom vlastitih specifičnih tvari i enzima, talože, dehidriraju, pohranjuju i ostavljaju u saću da dozrijeva i sazrijeva (Rybak-Chmielewska, 2004). Saće grade pčele od voska koji izlučuju, a čija proizvodnja zahtjeva oko 8-10 puta težine meda (White, 1978).

*Apis mellifera*, odnosno pčele medarice ili medonosne pčele, društveni su insekti koji žive u višegodišnjim kolonijama koje se sastoje od matice koja polaže jaja, trutova čija je jedina poznata uloga parenje s maticom, i radilicama koje tijekom života imaju više različitih uloga. Nektar ili med je izvor ugljikohidrata za odrasle pčele i neophodan je za lučenje voska kod radilica starih 12 - 18 dana kao i za let sakupljačima hrane. Za razliku od toga, matična mliječ je primarni sastojak prehrane matice tijekom cijelog njenog života (Gilliam, 1997).

Med je najboljeg okusa i boje odmah nakon vrcanja. Međutim, za veliko tržište takav med nije prikladan. Većina proizvođača veći dio svog meda prodaje prerađivačima koji ga pripremaju i pakiraju za tržište. Dok se ekstrahira, „sirovi“ med sadrži strane tvari kao što su pelud, komadići voska, kristali hidrata dekstroze, ali i različiti kvasci otporni na visoke koncentracije šećera zbog čega je med sklon fermentaciji. S vremenom većina meda kristalizira, ali provedu li se određeni postupci, spriječit će se pojava kristalizacije. Prerada meda stoga uključuje kontrolirano zagrijavanje s ciljem uništavanja kvasaca i otapanja kristala dekstroze, u kombinaciji s finim cijeđenjem i tlačnim filtriranjem (White, 1978).

Med se uglavnom sastoji od različitih šećera, pretežno D-fruktoze i D-glukoze, kao i drugih spojeva i tvari poput organskih kiselina, enzima i čvrstih čestica koje pčele sakupljaju (Rybak-Chmielewska, 2004). Sastav, fizikalno-kemijska svojstva i okus meda variraju ovisno o cvjetnom izvoru koji koriste pčele, kao i o regionalnom i klimatskom okruženju (kao što su temperatura, padaline itd.) te uvjetima skladištenja (Israili, 2014). Boja meda varira od gotovo

bezbojnog do tamno smeđeg. Može biti tekući, viskoznan ili čvrst, a sorte meda prepoznajemo po boji, okusu, aromi i načinu kristalizacije (Rybak-Chmielewska, 2004).

U današnje vrijeme med ima široku primjenu u prehrambenim i neprehrambenim proizvodima. U prehrambene svrhe većina meda koristi se izravno kao zaslađivač ili namaz, dok je najznačajnija neizravna upotreba meda u pekarstvu, proizvodima od žitarica i slastičarstvu. U neprehrambene svrhe med se koristi u raznim kozmetičkim i farmaceutskim proizvodima kao što su šamponi, kreme, balzami i masti bez vode (White 1978).

### 2.1.1. Podjela meda

Prema podrijetlu med se može podijeliti na cvjetni ili nektarni med (med dobiven od nektara biljaka) te na medljikovac ili medun, dobiven od izlučevina kukaca (*Hemiptera*) koji žive na dijelovima biljaka ili od sekreta živih dijelova biljaka (Pravilnik o medu, 2015).

Prema načinu proizvodnje i/ili prezentiranja med se dijeli na:

- med u saću: med kojeg skladište pčele u stanicama svježe izgrađenog saća bez legla ili u satnim osnovama izgrađenim isključivo od pčelinjeg voska, koji se prodaje u poklopljenom saću ili u sekcijama takvog saća;
- med sa saćem ili med s dijelovima saća
- cijedeni med: med koji se dobiva ocjeđivanjem otklopljenog saća bez legla;
- vrcani med: med dobiven vrcanjem (centrifugiranjem) otklopljenog saća bez legla;
- prešani med: med dobiven prešanjem saća bez legla, sa ili bez korištenja umjerene temperature koja ne smije prijeći 45°C;
- filtrirani med: med dobiven na način koji tijekom uklanjanja stranih anorganskih ili organskih tvari dovodi do značajnog uklanjanja peludi (Pravilnik o medu, 2015).

Neke od najrasprostranjenijih i najznačajnijih vrsti meda u Republici Hrvatskoj dobivaju se od niže navedenih biljaka:

**Bagrem** (*Robinia pseudoacacia* L.) – bagremov med je vrlo svijetao, staklasto proziran, gotovo bezbojan, slabog mirisa, vrlo blag i ugodan. Zreo bagremov med je gust, a na niskoj



temperaturi je i ljepljiv. Sadrži više voćnog nego groždanog šećera pa se dugo drži u tekućem stanju bez da se kristalizira. Često se u bagremov med dodaju primjese drugih vrsta, najčešće voćnih. Šume bagrema u Republici Hrvatskoj su najrasprostranjenije u područjima Baranje, Podravine te Moslavačke gore, a bagrem cvate u razdoblju od sredine svibnja do početka lipnja (Šimić, 1980).

**Kadulja** (*Salvia officinalis* L.) – boja kaduljinog meda je od svijetlo-žute do blago zelenkaste, ali može prilično varirati zbog prisutnosti peluda iz vinove loze, koja istodobno cvijeta krajem travnja i početkom svibnja. Okus je fin i gorkast, a miris izrazit po cvijetu biljke. Ostaje dugo u tekućem stanju, a kristalizira nakon tri-četiri mjeseca u srednje krupne kristale. Pomaže u liječenju bolesti dišnih organa zbog čega je vrlo cijenjeni proizvod. Kadulja je u Republici Hrvatskoj rasprostranjena na području Istre te primorsko područje Dalmacije (Šimić, 1980).

**Kesten** (*Castanea sativa* Mill.) – med od kestena je tamnožute boje, vrlo jakog i oštrog mirisa po samoj biljci, slatkog trpkog-gorkog okusa. Otprilike mjesec dana ostane tekuć, a nakon toga kristalizira u srednje krupne kristale. Kesten cvijeta od sredine do kraja lipnja, a šume kestena su najrasprostranjenije u područjima Petrinje, Hrvatske Kostajnice, Dvora na Uni, na području Istre te u okolici Zagreba (Šimić, 1980).

**Kupina** (*Rubus fruticosus* L.) – s obzirom da u isto vrijeme cvjetaju i livade, rijetko kad se dobije čista vrsta meda od kupine, ali u tom slučaju karakterizira ga vrlo ugodan miris i okus, svijetložute boje i bistar (Šimić, 1980).

**Lavanda** (*Lavandula officinalis* L.) – med od lavande je svijetložute boje, proziran je i bistar. Vrlo je oštrog okusa i mirisa po biljci zbog čega ga potrošači ne prihvaćaju dobro. Lavanda cvijeta od početka lipnja do kraja srpnja, a u Republici Hrvatskoj je najviše rasprostranjena na otoku Hvaru (Šimić, 1980).

**Lipa** (*Tilia* L.) – lipin med je svijetložute do blago zelenkaste boje. Slatkog je okusa uz malu dozu gorčine i ugodnog blagog mirisa po lipinom cvijetu. Nakon dva do tri mjeseca počinje kristalizirati u srednje čvrste kristale te je u krutom stanju žute boje uz blagu sivkastu nijansu. Ovisno o vrsti, cvatnja započinje krajem lipnja ili kasnije. U Republici Hrvatskoj je najrasprostranjenija na području Bilogore (Šimić, 1980).

**Livada** – livadnim medom zovemo sav onaj koji pčele sakupe s različitog cvijeća, poput raznih vrsta djetelina, dunjice, smiljke, graholike i mnogih drugih biljaka, a osim toga može

sadržavati u manjim ili većim količinama medljiku, lipu i ostale biljke koje cvjetaju u isto vrijeme. Boja livadnog meda varira od svijetle do tamnožute, a s obzirom od kojih biljaka je sakupljen, kristalizira brže ili sporije. Zbog raznovrsnosti biljnih vrsta koje sadrži, u sebi nosi sve osobine dobrog i vrijednog meda. Na tržištu se prodaje kao cvjetni med (Šimić, 1980).

**Medljikovac ili medun** – med od medljike često se još naziva i šumskim (crnim) medom. Razlikujemo nekoliko vrsta meda od medljike, od kojih su za Republiku Hrvatsku najčešće hrastova i jelova medljika. Od hrastove medljike razlikujemo dvije vrste meda, jedna koja nastaje u svibnju, a druga u lipnju. Od medljike koja nastaje u svibnju med je tamno crvenkaste boje, bez mirisa, ali uzrokuje osjećaj peckanja u grlu pa ga zato mnogi potrošači ne preferiraju. Med s hrastove medljike koja nastaje u lipnju također je tamno crvenkaste boje, ali nešto rjeđe teksture i blažeg okusa te duže ostaje u tekućem stanju. Med od jelove medljike ima tamno zelenkastu nijansu i karakterističan miris po smoli od crnogorice. U usporedbi s cvjetnim medom, medljikovac sadrži više mineralnih tvari (Šimić, 1980).

**Suncokret** (*Helianthus annuus* L.) – suncokretov med je vrlo karakterističan po svojoj jantarno-žutoj boji, slabog je mirisa po biljci te slatko-trpkog okusa. Gotovo odmah nakon vrcanja kristalizira u čvrste kristale, a dužim stajanjem u kristaliziranom stanju je tvrdi od većine drugog meda, zbog čega nailazi na teškoće u prodaji. Suncokret cvijeta početkom srpnja, a u Republici Hrvatskoj je najrasprostranjeniji na području Slavonije (Vahčić i Matković, 2009).

### 2.1.2. Fizikalno-kemijska svojstva meda

Svježi med je gusta, viskozna tekućina te u određenoj mjeri ovisi o biljnom porijeklu. Razlike u viskoznosti ovisne o vrsti meda smanjuju se s porastom temperature. Viskoznost ne ovisi samo o koncentraciji šećera (sadržaju vode) i temperaturi, već i o sadržaju dekstrina, trisaharida i proteina. Trajnost tekuće faze u medu ovisi o mnogim vanjskim i unutarnjim čimbenicima poput sadržaja vode, omjera D-fruktoze i D-glukoze te omjera D-fruktoze i nešećernih spojeva te sadržaja dekstrina. Visoki udjeli ukupnog šećera i D-glukoze te nizak udio sadržaja dekstrina pridonose kristalizaciji. Temperatura skladištenja ne utječe samo na tekuću fazu, već i na tijek kristalizacije. Primjerice, u medu uljane repice kristali su već formirani i kristalizacija se odvija velikom brzinom, skrućuje se pri nižim temperaturama u čvrstu, sitno-kristalnu krutinu, dok se pri višim temperaturama (14 do 18 °C) pretvara u masu

konzistencije nalik svinjskoj masti. Med s manje kristalnih jezgri kristalizira sporije, stvaraju se veći kristali koji imaju tendenciju pada na dno spremnika (heljdin i medljikov med) rezultirajući slojevitom strukturom.

Sastav šećera u medu ovisi o sadržaju saharida u nektaru ili medljici (medna rosa). Kvantitativni sastav šećera i analiza peluda prikladni su indikatori porijekla meda. Sadržaj saharoze u medu nasumično premašuje 1 % ukupnog sadržaja saharida dok je udio maltoze često tri puta veći od udjela saharoze. Rafinoza i melocitoza potječu iz nektara ili medljike, dok D-glukoza i D-fruktoza potječu iz nektara ili medljike te enzimatske hidrolize saharoze i ostalih šećera koji se nalaze u medu. Ostali disaharidi i trisaharidi nastaju enzimskim reakcijama u medu. Med također sadrži i određenu količinu dekstrina (3 do 10 %).

U 100 g cvjetnog meda se u prosjeku nalazi 175 mg slobodnih aminokiselina (od 27 do 875 mg). U različitim sortama medljikovog meda prosječni udio slobodnih aminokiselina iznosi 178 mg (od 54 do 269 mg). Najveći udio (između 49 i 59 %) slobodnih aminokiselina čini prolin u cvjetnom i medljikovom medu.

Med sadrži i određen broj specifičnih enzima poput invertaze,  $\alpha$ - i  $\beta$ -amilaze, glukoza-oksidade, maltaze, katalaze i fosfataze. Invertaze i maltaze nastaju u pčelinjem organizmu kao enzimi ždrijelne žlijezde i enzimi srednjeg crijeva. Aktivnost  $\alpha$ - i  $\beta$ -amilaze smanjuje se tijekom skladištenja meda i zagrijavanja što prati dekrizalizaciju, a tijekom jednogodišnjeg skladištenja meda pri 20 °C, aktivnosti  $\alpha$ -amilaze i invertaze se smanjuju za 30-50 %, odnosno za 10 %. Samim time, mijenja se i sastav šećera te se povećava kiselost meda.

Organske kiseline bitno doprinose karakterističnim okusima meda. One obogaćuju i doprinose raznolikosti u okusima sorti meda. Dvije glavne kiseline u medu su limunska i glukonska, a osim njih med sadrži i maslačnu, octenu, mravlju, mliječnu, jantarnu, folnu i jabučnu. Glukonska kiselina je produkt reakcije specifične katalitičke oksidacije D-glukopiranoze i glukoza-oksidade, flavoproteinskog enzima meda. Glukolakton, koji nastaje iz oksidacijom, odmah hidrolizira u glukonsku kiselinu, a u ovoj reakciji nastaje vodikov peroksid koji doprinosi snažnim antibakterijskim svojstvima meda.

Utvrđeno je da je kalij glavni element u medu, a slijede ga magnezij, natrij, kalcij, fosfor, željezo, mangan, kobalt, bakar i drugi. Mineralne soli, organske kiseline i aminokiseline u medu disociraju čineći ga elektrolitom. S druge strane, med je siromašan vitaminima pa tako samo neke sorte poput meda od vrijeska i medljikovca sadrže tragove vitamina A, B2, B6 i C.

Oko 80 aromatskih tvari je pronađeno u medu, uključujući karboksilne kiseline, aldehide, ketone, alkohole, ugljikohidrate i fenole, a oni utječu na organoleptičke karakteristike meda

(Rybak-Chmielewska, 2004) dok boje meda potječu od karotenoida, flavona i antocijanina.

### 2.1.3. Patvorenje meda

Patvorenje prehrambenih proizvoda je svako namjerno mijenjanje svojstava i sastava namirnica protiv zakonskih odredbi, zbog čega namirnica izgleda vrjednije nego što jest, ali je njezina prehrambena vrijednost smanjena, neprikladna ili čak opasna za zdravlje čime se može nanijeti šteta potrošačima (Hrvatska enciklopedija, 2021). Uz maslinovo ulje, mlijeko, šafran, sok od naranče, sok od jabuke i kavu, med se ubraja među najčešće patvorene namirnice (Jaafar i sur., 2020).

Sve veće zagađenje okoliša i širenje bolesti doveli su do smanjenja globalne populacije medonosnih pčela. Uslijed sve veće potražnje med postaje slabo dostupna roba, a samim time je i patvorenje u porastu (Zábrodská i Vorlová, 2014). Prirodni pčelinji med ima visoke nutritivne vrijednosti i jedinstvene karakteristike okusa, zbog čega je njegova cijena puno veća od cijene bilo kojeg drugog zaslađivača te je radi ekonomske dobiti često meta patvorenja (Morales i sur., 2008).

Med se lako može patvoriti dodatkom vode, saharoze, invertnog i šećernog sirupa. Problem autentičnosti meda može naškoditi potrošačima, narušava prednosti proizvođača i remeti tržište. Krivotvoritelji jednostavno patvore med dodajući mu jeftine zaslađivače poput šećera ili sirupa, kako bi oponašali prirodni okus i posljedično promijenili prirodni profil ugljikohidrata (Liu i sur., 2019). Patvorenje meda dodavanjem različitih šećernih sirupa je često popraćeno procesom zagrijavanja zbog postizanja boljeg otapanja i homogenosti, što rezultira nastajanjem hidroksimetilfurfurala (HMF) u medu, čije su povišene vrijednosti izravan pokazatelj patvorenja (Morales i sur., 2008).

Patvorenje meda može biti izravno i neizravno. Izravno patvorenje je dodavanje stranih tvari direktno u med, a neizravno patvorenje meda postiže se hranjenjem pčela industrijskim šećerima te je takvo patvorenje iznimno teško otkriti. Tradicionalne analize kemijskog sastava i fizičkih svojstava meda obično se koriste za otkrivanje izravne patvorine, a osim toga patvorenje meda također se može otkriti korištenjem nekoliko modernih metoda kao što je mjerenje stabilnih omjera ugljika i izotopa, NMR (nuklearna magnetska rezonancija) ili diferencijalna kalorimetrija. Zanimljivo je da iskusni kušači meda mogu prepoznati patvorenje s dodanom primjesom od samo 20 % invertirane pčelinje saharoze (Zábrodská i Vorlová, 2014).

## 2.2. Mikrobiološki kriteriji meda

Prema Vodiču za mikrobiološke kriterije za hranu (2009) potrebno je provesti mikrobiološku analizu uzoraka meda i odrediti prisutnost aerobnih mezofilnih bakterija, bakterija obitelji *Enterobacteriaceae*, sulfitereducirajućih klostridija, kvasaca i plijesni. Vrijednosti koje se smatraju zakonski zadovoljavajućim za navedene mikroorganizme u medu, ali i drugim pčelinjim proizvodima na bazi meda prikazane su u Tablici 1.

**Tablica 1.** Mikrobiološki kriteriji za med i druge pčelinje proizvode i proizvode na bazi meda (med s dodacima i slični proizvodi) (Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu, 2009)

| Hrana   | Preporučeni parametri           | Plan uzorkovanja |   | Kriteriji  |
|---|---------------------------------|------------------|---|--|
|   |                                 | n                | c |  |
| Med   | Aerobne mezofilne bakterije     | 5                | 2 | m=10 <sup>3</sup> cfu/g<br>M=10 <sup>4</sup> cfu/g |
|   | <i>Enterobacteriaceae</i>       | 5                | 1 | m=10cfu/g<br>M=10 <sup>2</sup> cfu/g               |
|   | Sulfitereducirajuće klostridije | 5                | 0 | M=10cfu/g  |
|   | Kvasci i plijesni               | 5                | 1 | m=10cfu/g<br>M=10 <sup>2</sup> cfu/g               |
| Drugi pčelinji proizvodi i proizvodi na bazi meda (med s dodacima i slični proizvodi) | Aerobne mezofilne bakterije     | 5                | 2 | m=10 <sup>4</sup> cfu/g<br>M=10 <sup>5</sup> cfu/g |
|   | <i>Enterobacteriaceae</i>       | 5                | 1 | m=10 <sup>2</sup> cfu/g<br>M=10 <sup>3</sup> cfu/g |
|   | Sulfitereducirajuće klostridije | 5                | 1 | m=10cfu/g<br>M=10 <sup>2</sup> cfu/g               |
|   | Kvasci                          | 5                | 1 | m=10 <sup>2</sup> cfu/g<br>M=10 <sup>3</sup> cfu/g |
|   | Plijesni                        | 5                | 1 | m=10 <sup>3</sup> cfu/g<br>M=10 <sup>4</sup> cfu/g |

Obzirom da med sadrži različite mikroorganizme koji mogu utjecati na kvalitetu i sigurnost, važno je poznavati mikrobiološki sastav meda i njegove karakteristike. Mikroorganizmi prisutni u medu koji predstavljaju opasnost su plijesni, kvasci i sporegene bakterije.

Plijesni i kvasci su odgovorni za fermentaciju meda i to kada je udio vode u medu viši od 21 %. Plijesni koje se obično nalaze u medu su iz rodova *Mucor* i *Penicillium*. Nadalje, prisutnost plijesni *Bettsya alvei*, *Acosphaera apis* i *Ascosphaera major* može biti pokazatelj lošeg rukovanja pčelinjim leglom. S druge strane, među kvascima prevladavaju rodovi *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* i *Torula*. Mikroorganizam koji može biti prisutan u medu je i bakterija *Clostridium botulinum* koja lučenjem neurotoksina botulina može uzorkovati botulizam, bolest posebno opasnu za dojenčad (Kačániová i sur., 2009). Spore bakterije *C. botulinum* mogu preživjeti u medu, ali ne mogu proizvoditi toksine. Zbog opasnosti pojave botulizma, djeci mlađoj od godine dana, med se ne smije davati (Róžańska i Osek, 2012).

### 2.3. Antimikrobna svojstva meda

Postoje intrinzična svojstva hrane koja utječu na rast mikroba. To uključuje pH, sadržaj vlage, oksidacijsko-redukcijski potencijal, sadržaj hranjivih tvari i antimikrobne sastojke. Kao što je gore spomenuto, med ima niz inherentnih svojstava koja ga čine bakteriostatskim ili baktericidnim proizvodom. Ekstrinzični čimbenici koji imaju najveći utjecaj na određivanje prisutnosti organizama koji se prenose hranom uključuju temperaturu skladištenja, relativnu vlažnost okoliša te prisutnost i koncentraciju plinova u okolišu. Zbog prirodnih svojstava meda i mjera kontrole u medarstvu, med je proizvod s minimalnim vrstama i razinama mikroba (Snowdon, 1996).

Postoji veliki broj posrednih i neposrednih čimbenika koji utječu na mikrobiološku raznolikost. Izloženost meda mikrobima prije vrcanja se kontrolira gotovo rijetko. Kvaliteta zraka, prašine, zemlje i cvijeća ili materijala koje pčele nose utječe na kvalitetu meda ali nije praktična za provjeru. Postupci koji održavaju pčele zdravima kao i uvjeti u samoj košnici također će utjecati na vrstu i broj mikroba kojima je med izložen. Primjerice, pljesnivo saće moglo bi biti izvor spora plijesni u medu (Snowdon, 1996).

Med sadrži kompleks ugljikohidrata, organskih kiselina, proteina, minerala, vitamina i lipida koji mogu potjecati iz cvjetnog izvora koje pčele koriste (Donkersley i sur., 2017). U

medu se nalazi nekoliko skupina kemijskih spojeva, minerala, makro- i mikroelemenata poput kalija, magnezija, kalcija, natrija, mangana, bakra, barija i srebra (Da Silva i sur., 2016). Medni šećer (osobito glukoza i fruktoza) izvrstan je izvor energije i ima antimikrobno djelovanje. Antimikrobna svojstva meda mogu biti posljedica visoke osmolalnosti, kiselosti, vodikovog peroksida ( $H_2O_2$ ) i neperoksidnih komponenti poput metilglioksala (Manda i Mandal, 2011). Glukoza oksidaza iz hipofaringealnih žlijezdi pčela radilica i od bakterija roda *Gluconobacter* je odgovorna za glukonsku kiselinu, glavnu kiselinu u medu, te za oslobađanje i nakupljanje vodikovog peroksida (Gilliam, 1997).

## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Uzorci meda

Za izradu ovog rada korištena su 3 različite vrste meda: lipa (L), medljikovac (M) (šumski crni med) i suncokret (S) iz vlastite domaće proizvodnje s obiteljskog gospodarstva iz područja Slavonske regije; cvjetni med (C) iz vlastite domaće proizvodnje s obiteljskog gospodarstva iz područja Međimurske regije te med od kestena (K) kupljen na lokalnoj tržnici (Zagreb), svi iz sezone 2022.

Svi uzorci meda dostavljeni su u Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u staklenoj ambalaži od 100 g.

#### 3.1.2. Mikroorganizmi

Standardni sojevi patogenih mikroorganizama dio su Zbirke Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu i korišteni su za određivanje antimikrobne aktivnosti i minimalne inhibitorne koncentracije različitih vrsta meda.

Za određivanje antimikrobne aktivnosti medova, odabrane su 2 bakterije i 2 kvasca:

- *Escherichia coli* (ATCC 25922)
- *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)
- *Candida albicans* (ATCC 10231)
- *Saccharomyces cerevisiae* 5



### 3.1.3. Hranjive podloge za određivanje broja mikroorganizama

Za određivanje broja aerobnih mezofilnih bakterija u uzorcima meda korišten je hranjivi agar (Biolife, Italija) sastava:

|                                |         |
|--------------------------------|---------|
| mesni ekstrakt                 | 3 g/L   |
| NaCl                           | 5 g/L   |
| K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> | 0,3 g/L |
| pepton                         | 15 g/L  |
| agar                           | 18 g/L  |
| dH <sub>2</sub> O do 1 L       |         |

pH vrijednost podloge je 7,3, a sterilizacija je provedena pri 121 °C tijekom 15 minuta.

Za određivanje broja bakterija iz obitelji *Enterobacteriaceae* u uzorcima meda, korišten je ljubičasto crveni žučni agar (LJCŽA) (Biolife, Italija) sastava:

|                          |           |
|--------------------------|-----------|
| kristal violet           | 0,002 g/L |
| neutralna crvena         | 0,03 g/L  |
| pepton                   | 7 g/L     |
| NaCl                     | 5 g/L     |
| kvašćev ekstrakt         | 3 g/L     |
| dekstroza                | 10 g/L    |
| žučne soli               | 1,5 g/L   |
| agar                     | 13 g/L    |
| dH <sub>2</sub> O do 1 L |           |

pH vrijednost podloge je 7,4, a sterilizacija je provedena pri 121 °C tijekom 15 minuta.

Za određivanje broja sulfitereducirajućih klostridija u uzorcima meda, korišten je sulfitni agar (Biolife, Italija) sastava:

|                    |          |
|--------------------|----------|
| mesni pepton jetre | 30,0 g/L |
| glukoza            | 1,0 g/L  |
| natrijev sulfit    | 0,5 g/L  |
| Fe-amonijev citrat | 0,5 g/L  |
| škrob              | 1,0 g/L  |
| agar               | 8,5 g/L  |

dH<sub>2</sub>O do 1 L

pH vrijednost podloge je 7,4, a sterilizacija je provedena pri 121 °C tijekom 15 minuta.

Za određivanje broja plijesni i kvasaca u uzorcima meda, korišten je sladni agar (Biolife, Italija) sastava:

|                          |          |
|--------------------------|----------|
| maltoza                  | 12,5 g/L |
| dekstrin                 | 2,5 g/L  |
| glicerol                 | 1,0 g/L  |
| peptokompleks            | 2,6 g/L  |
| agar                     | 17 g/L   |
| dH <sub>2</sub> O do 1 L |          |

pH vrijednost podloge iznosi 4,6, a sterilizacija je provedena pri 121 °C tijekom 15 minuta.

#### 3.1.4. Pribor i aparatura

Prilikom eksperimentalnog rada u laboratoriju korišteni su sljedeći pribor i aparatura:

- Mikrobiološke epruvete (16 x 160 mm)
- Laboratorijske čaše
- Petrijeve zdjelice (φ 10 cm)
- Mikrotitarske pločice (96 jažica)
- Pinceta
- Žlica
- Štapići po Drigalskom
- Eppendorf tubice (2 mL)
- Štapić za bušenje rupa u agaru
- Automatske pipete (10-1000 μL) (Eppendorf, Njemačka)
- Tehnička vaga (Sartorius, Njemačka)
- Vibracijska mješalica V-1 plus (Biosan, Latvija)
- Vodena kupelj (Inkolab, Hrvatska)
- Čitač mikrotitarskih pločica (Tecan, Švicarska)
- Autoklav (Sutjeska, Srbija)

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Određivanje mikrobiološke kvalitete meda

Kako bi se utvrdilo zadovoljavaju li ispitivani uzorci meda zadane kriterije postavljene Pravilnikom, potrebno je odrediti broj živih aerobnih mezofilnih bakterija, bakterija roda *Enterobacteriaceae*, sulfitereducirajućih klostridija te plijesni i kvasaca.

1 gram svake vrste meda dodan je u 9 mL sterilne vode čime je dobiveno prvo od ukupna 4 razrijeđenja. Zadnja tri ( $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-2}$ ) nacijepljena su na odgovarajuće hranjive podloge kako bi se neizravnom metodom odredio broj živih stanica bakterija, kvasca odnosno plijesni. Tako nacijepljene podloge su inkubirane tijekom 24 sata na odgovarajućim temperaturama: za određivanje broja živih bakterija, uzorci su inkubirani na 37 °C odnosno na 28 °C za određivanje broja živih stanica kvasca. Kako bi se odredio broj kolonija plijesni, odnosno njihov rast, nacijepljene Petrijeve zdjelice inkubirane su na 25 °C tijekom 5 dana. Kolonije porasle na čvrstoj podlozi predstavljaju broj živih stanica, koji se računa prema jednadžbi (1) i izražava kao CFU/mL.

$$\text{CFU} = \frac{\text{broj kolonija}}{\text{upotrijebljen volumen uzorka (mL)}} \times \text{recipročna vrijednost decimalnog razrjeđenja} \quad [1]$$

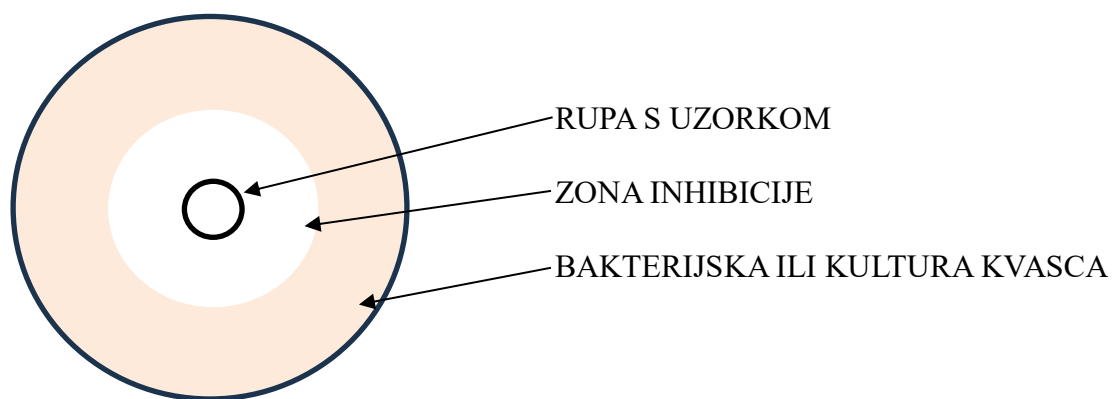
Za određivanje sulfito-reducirajućih klostridija potrebni su anaerobni uvjeti koji se postižu uzgojem u dubokom sloju čvrste podloge. 1 mL prvog decimalnog razrjeđenja svakog uzorka meda otpipetiran je u sterilnu epruvetu, a svaka epruveta je potom tretirana u vodenoj kupelji na 80 °C/10 minuta kako bi se uništile vegetativne stanice. Nakon tretmana u vodenoj kupelji, uzorci su preliveni s otopljenim sulfitnim agarom, homogenizirani, ohlađeni pod mlazom hladne vode te stavljeni na inkubaciju na 37 °C tijekom 24 sata. Pojava crno obojenih kolonija u epruvetama s dubokim agarom znak je prisutnosti ove vrste sporogenih bakterija.

### 3.2.2. Određivanje antimikrobne aktivnosti meda metodom rupa u agaru

Kako bi se odredila antimikrobna svojstva uzoraka meda, ispitao se njihov inhibicijski utjecan na gram-negativnu (*E. coli*) i gram-pozitivnu (*S. aureus*) bakteriju te na kulture kvasaca *S. cerevisiae* i *C. albicans*. Antimikrobna svojstva ispitana su metodom bušenja jažica u čvrstom agaru.

Na hranjive podloge nacijepljeno je po 0,1 mL navedenih bakterijskih (hranjivi agar) i

kvašćevih suspenzija (sladni agar) koje su ravnomjerno razmazane po cijeloj površini štapićem po Drigalskom. Zatim su su pomoću bušača za rupe u agaru izbušene po četiri rupe za četiri različite koncentracije vodenih otopina meda. Vodene otopine meda pripremljene su u koncentracijama od 10, 30, 50 % na način da je odvagano 0,1, 0,3 odnosno 0,5 grama uzorka meda u 1 mL sterilne vode te se dobro homogenizira vibro mikserom. 60  $\mu$ L pripremljenih otopina prenešeno je u odgovarajuće označene izbušene rupe u agaru. Petrijeve zdjelice su inkubirane tijekom 24 sata na 37 °C i 28 °C za bakterijske, odnosno kvašćeve kulture. Osim vodenih otopina meda, za određivanje antimikrobne aktivnosti, korišteni su i 100 %-tni uzorci (čisti med). Veličina inhibicijskih (prozirnih) zona proporcionalna je osjetljivosti mikroorganizama prema ispitivanom uzorku, što znači da je mikroorganizam osjetljiviji što je veća zona inhibicije. Svi pokusi su napravljeni u duplikatu, a zone inhibicije su izmjerene pomoću ravnala, mjerenjem promjera nastale zone.



**Slika 1.** Shematski prikaz metode rupe u agaru (*prema* Hossain i sur., 2022).

### 3.2.3. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije meda

Za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) medova, korištena je metoda mikro-razrjeđenja budući da njena primjena omogućuje ispitivanje velikog raspona koncentracija određenog sredstva prema odabranim mikroorganizmima na agaru ili u bujonu. Određena vrijednost MIK definirana je kao najniža koncentracija ispitivanog antimikrobnog sredstva koja inhibira rast testiranog mikroorganizama te se najčešće izražava u  $\mu\text{g/mL}$  ili  $\text{mg/L}$ .

S obzirom na dobivene rezultate antimikrobnog djelovanja ispitivanih medova, određivanje MIK suncokretovog meda i medljikovca provelo se za 5%, 2,5%, 1,25% i 0,625 %-tne otopine, dok se MIK otopina cvjetnog meda te kestenovog i lipinog meda provelo za 90%, 80%, 70% i 60 %-tne otopine. Također, budući da svi testirani uzorci medova nisu pokazali antimikrobnost prema obje ispitane kulture kvasca (*C. albicans* i *S. cerevisiae*), MIK nije određena za njihov rast.

Otopine suncokretovog meda i medljikovca pripravljene su jednostrukim serijskim razrjeđenjima (1mL:1mL) kako bi se postigle željene koncentracije otopina medova. Nakon pripreme svih otopina, po 200  $\mu\text{L}$  otopine svakog uzorka meda je ispušteno u jažice mikrotitarske pločice, nakon čega je dodano 60  $\mu\text{L}$  prekonoćnih bakterijskih kultura (*E. coli* i *S. aureus*). Kontrolni uzorak je bio hranjivi bujon u koji je dodana pojedina bakterijska kultura.

Otopine cvjetnog meda te medova od kestena i lipe pripravljene su odvagom po 0,9, 0,8, 0,7 i 0,6 g uzoraka u 1 mL hranjivog bujona. Nakon homogeniziranja uzoraka, na isti način kao i za uzorke suncokretovog meda i medljikovca su nacijepljene bakterijske kulture za određivanje MIK.

Svi pokusi su napravljeni u duplikatu, a pomoću čitača mikrotitarskih pločica u nultom satu te nakon 24 sata uzgoja na 37 °C, očitane su prividne apsorbancije pri OD 620 nm, kako bi se odredile MIK ispitivanih otopina meda.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. REZULTATI

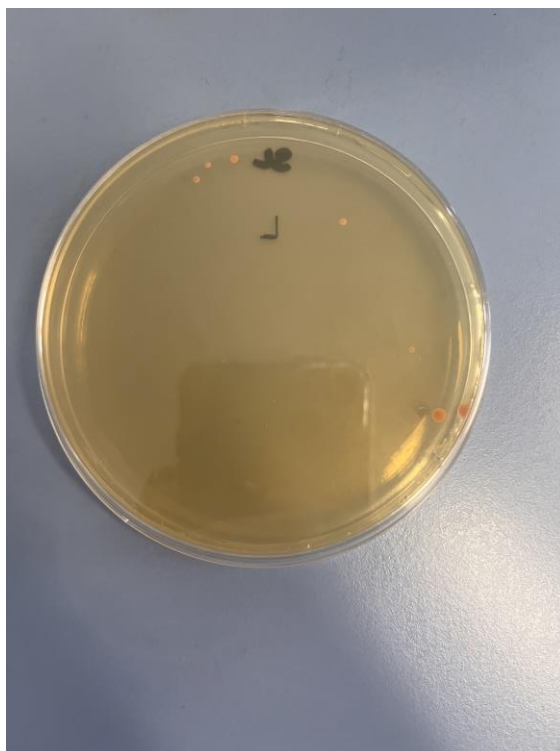
U ovom radu određivala se mikrobiološka ispravnost 5 vrsta medova (lipin med, šumski crni med (medljikovac), suncokretov med, cvjetni med te kestenov med) s različitih područja Republike Hrvatske iz sezone 2022. S obzirom na iznimna korisna svojstva meda kao prehrambene namirnice, ispitana je antimikrobna aktivnost, a određena je i minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) svih 5 uzoraka meda.

#### 4.1.1. Rezultati određivanja mikrobiološke kvalitete meda

Rezultati određivanja mikrobiološke ispravnosti 5 različitih vrsta meda prikazani su u tablici 2 te na slikama 2 i 3.

**Tablica 2.** Rezultati mikrobiološke analize 5 različitih medova (kestenov med – K, lipin med – L, cvjetni med – C, medljikovac – M, suncokretov med – S)

|     |                                 | Broj živih stanica (cfu/g) |                     |             |                     |                     |
|-----|---------------------------------|----------------------------|---------------------|-------------|---------------------|---------------------|
|     | Preporučeni parametri           | Kestenov med               | Lipin med           | Cvjetni med | Medljikovac         | Suncokretov med     |
| Med | Aerobne mezofilne bakterije     | /                          | 1,1*10 <sup>3</sup> | /           | 0,1*10 <sup>3</sup> | 0,1*10 <sup>3</sup> |
|     | <i>Enterobacteriaceae</i>       | /                          | /                   | /           | /                   | /                   |
|     | Sulfitereducirajuće klostridije | /                          | /                   | /           | /                   | /                   |
|     | Kvasci i plijesni               | /                          | 0,7*10 <sup>3</sup> | /           | /                   | /                   |



**Slika 2.** Porasle kolonije kvasca na sladmom agaru u uzorku lipinog meda (vlastita fotografija)

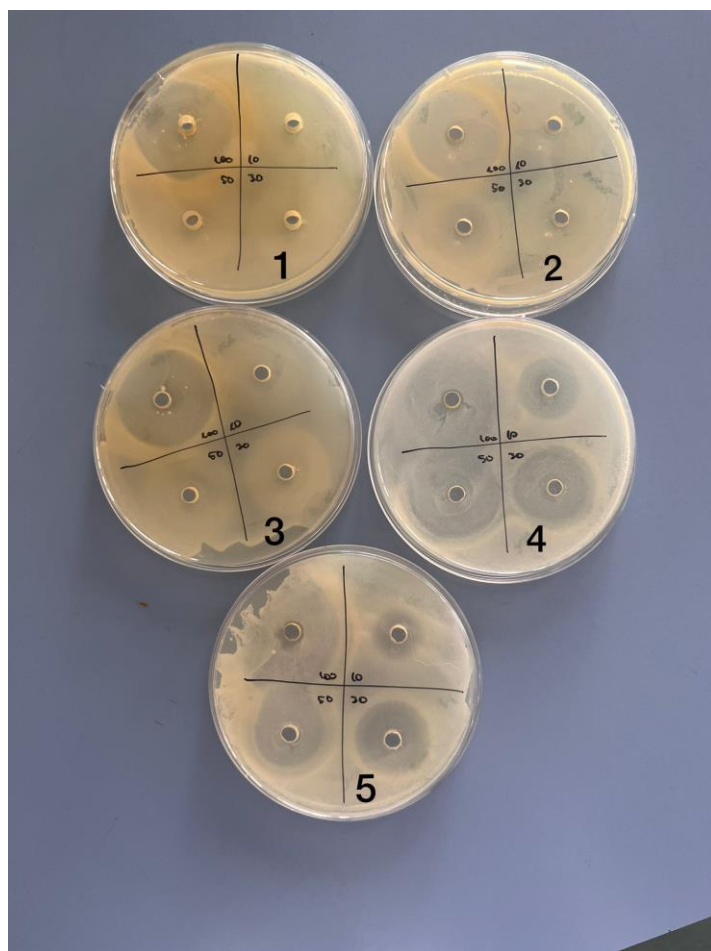
#### **4.1.2.** Rezultati određivanja antimikrobnog djelovanja meda

Rezultati određivanja antimikrobnog djelovanja 5 različitih vrsta meda prikazani su u tablici 3 te na slikama 4 i 5.

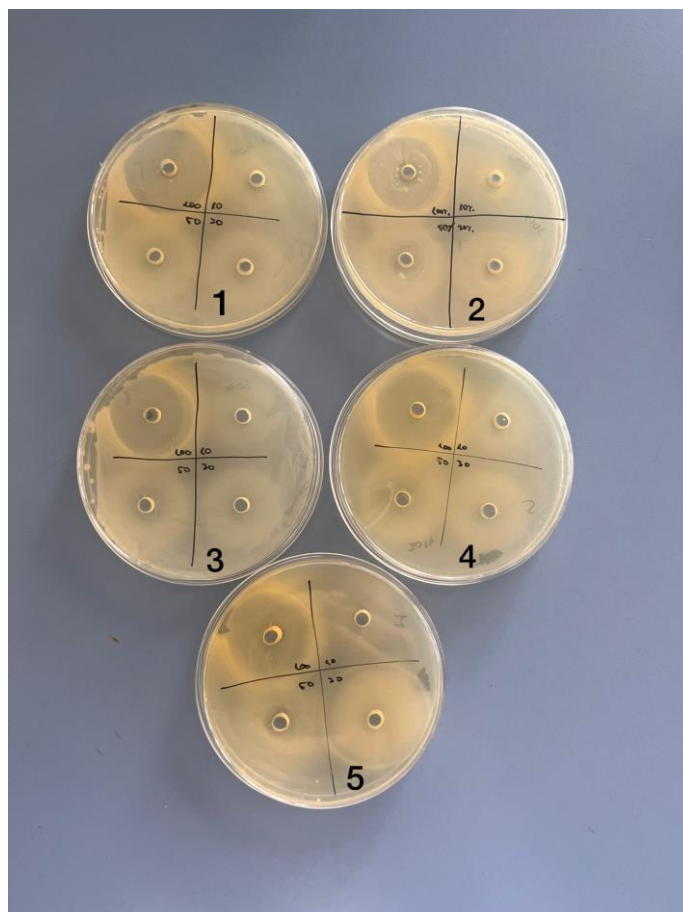
**Tablica 3.** Promjeri zona inhibicije rasta patogenih mikroorganizama, primjenom različitih uzoraka meda u izabranom rasponu koncentracija

| UZORAK             | KONCENTRACIJA<br>OTOPINE | PROMJER ZONE INHIBICIJE      |                         |
|--------------------|--------------------------|------------------------------|-------------------------|
|                    |                          | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| Kestenov<br>med    | 100 %                    | 34,7 mm                      | 31,3 mm                 |
|                    | 50 %                     | /                            | /                       |
|                    | 30 %                     | /                            | /                       |
|                    | 10 %                     | /                            | /                       |
| Lipin med          | 100 %                    | 34 mm                        | 30,3 mm                 |
|                    | 50 %                     | /                            | /                       |
|                    | 30 %                     | /                            | /                       |
|                    | 10 %                     | /                            | /                       |
| Cvjetni med        | 100 %                    | 31 mm                        | 30 mm                   |
|                    | 50 %                     | /                            | /                       |
|                    | 30 %                     | /                            | /                       |
|                    | 10 %                     | /                            | /                       |
| Medljikovac        | 100 %                    | 30 mm                        | 31 mm                   |
|                    | 50 %                     | 20 mm                        | 10 mm                   |
|                    | 30 %                     | 18 mm                        | /                       |
|                    | 10 %                     | 12,7 mm                      | /                       |
| Suncokretov<br>med | 100 %                    | 31,3 mm                      | 31 mm                   |
|                    | 50 %                     | 30,3 mm                      | /                       |
|                    | 30 %                     | 24 mm                        | /                       |
|                    | 10 %                     | 20,3 mm                      | /                       |





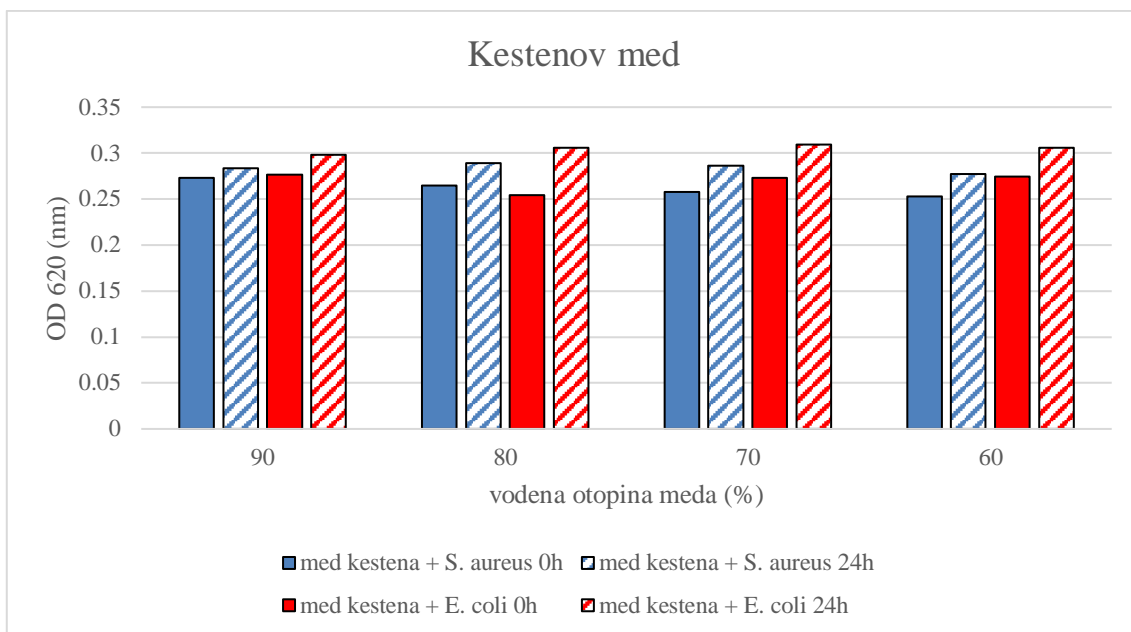
**Slika 3.** Inhibicija rasta bakterije *S. aureus* primjenom različitih koncentracija (10, 30, 50 i 100 %) uzoraka meda: 1 – kestenov med, 2 – cvjetni med, 3 – lipin med, 4 – suncokretov med, 5 - medljikovac (vlastita fotografija)



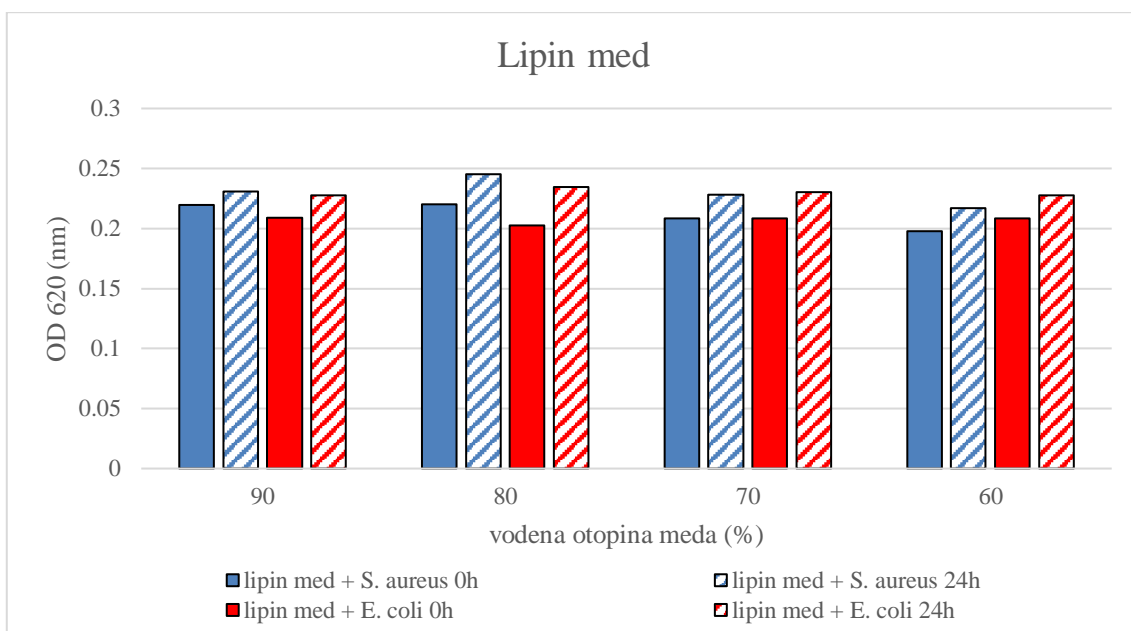
**Slika 4.** Inhibicija rasta bakterije *E. coli* primjenom različitih koncentracija (10, 30, 50 i 100 %) uzoraka meda: 1 – kestenov med, 2 – cvjetni med, 3 – lipin med, 4 – suncokretov med, 5 - medljikovac (vlastita fotografija)

#### 4.1.3. Rezultati određivanja minimalne inhibitorne koncentracije meda

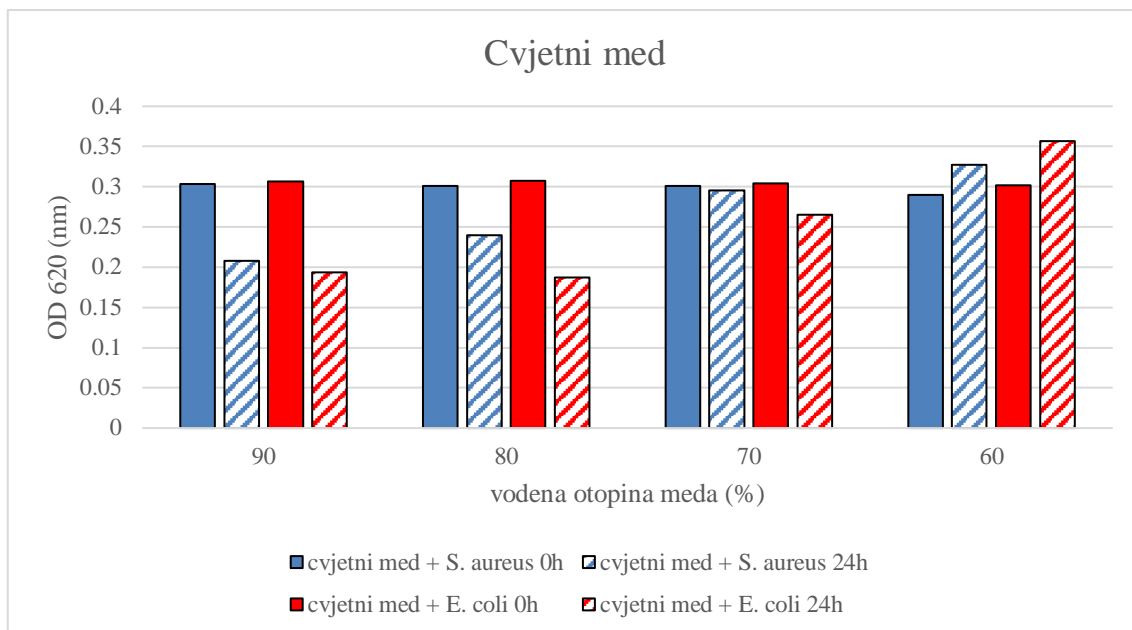
Rezultati određivanja minimalne inhibitorne koncentracije 5 različitih vrsta medova prikazni su na slikama 5-9.



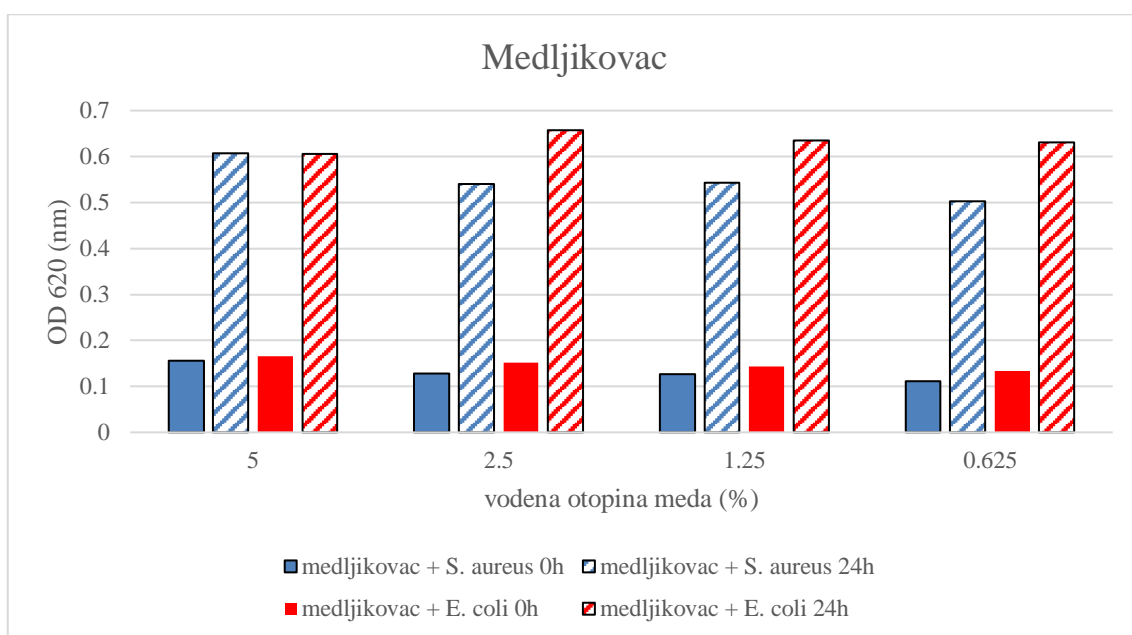
**Slika 5.** Minimalna inhibitorna koncentracija kestenovog meda prema bakterijama *S. aureus* i *E. coli*



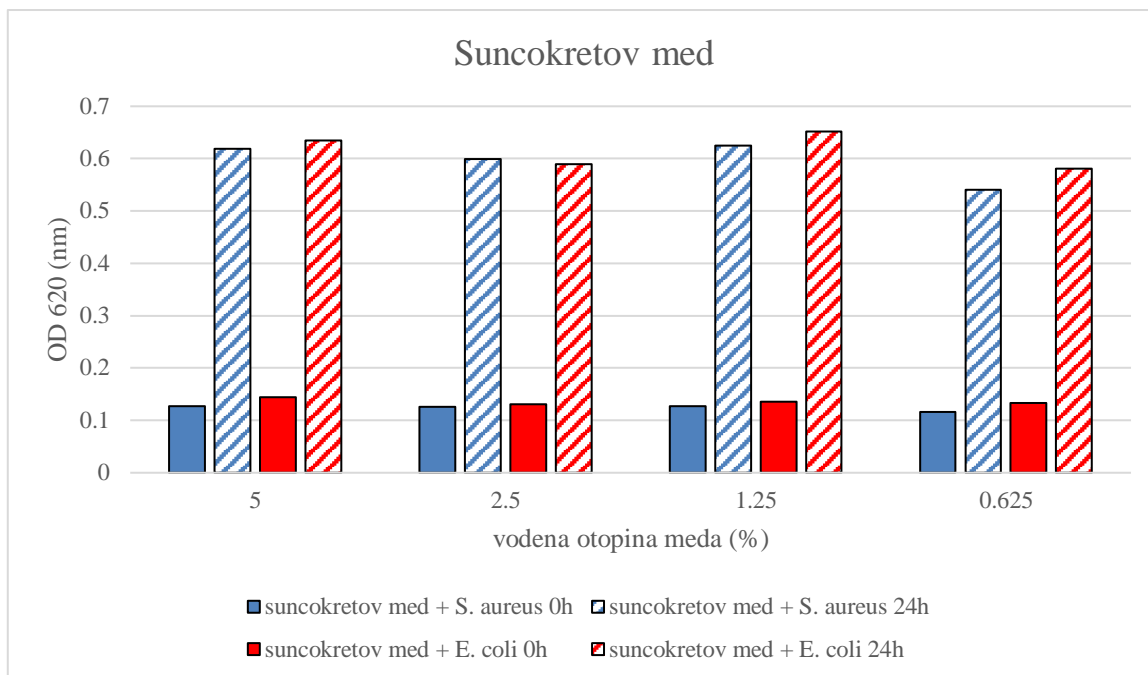
**Slika 6.** Minimalna inhibitorna koncentracija lipinog meda prema bakterijama *S. aureus* i *E. coli*



**Slika 7.** Minimalna inhibitorna koncentracija cvjetnog meda prema bakterijama *S. aureus* i *E. coli*



**Slika 8.** Minimalna inhibitorna koncentracija medljikovca prema bakterijama *S. aureus* i *E. coli*



**Slika 9.** Minimalna inhibitorna koncentracija suncokretovog meda prema bakterijama *S. aureus* i *E. coli*

## 4.2. RASPRAVA

Med je jedinstven u usporedbi s drugim prirodnim proizvodima s obzirom na fizikalno-kemijska svojstva i dobrobiti za zdravlje.

Dobiveni rezultati ispitivanja mikrobiološke ispravnosti meda u skladu su s kriterijima određenima Pravilnikom. Obzirom da su svi uzorci meda iz vlastite domaće proizvodnje i provjerene kvalitete uz dugogodišnje korištenje, bilo je i za očekivati da će zadovoljavati kriterije definirane zakonom. Također, bakterije iz obitelji *Enterobacteriaceae* nisu detektirane ni u jednom uzorku meda, dok su aerobne mezofilne bakterije detektirane u uzorcima lipinog i suncokretovog meda te medljikovca, ali u količinama manjim u odnosu na one dopuštene Pravilnikom. Nadalje, u niti jednom uzorku meda nije uočena prisutnost sulfitereducirajućih klostridija. S obzirom na propisane mikrobiološke kriterije, jedini izuzetak je bio uzorak lipinog meda budući da je broj kvasaca bio veći od onog propisanog Pravilnikom, ali postoji i mogućnost da je prilikom izvođenja pokusa došlo do pogreške i vanjske kontaminacije (tablica 2). Uran i sur. (2017) su u svom istraživanju kemijske i mikrobiološke kvalitete meda u Istanbulu također detektirali prisutnost aerobnih mezofilnih bakterija te plijesni i kvasaca, a njihov je broj odgovarao Turskom prehrambenom kodeksom o medu, dok *Enterobacteriaceae* nisu bile prisutne u istraživanim uzorcima.

Antimikrobna aktivnost jedna je od dominantnih bioaktivnosti meda koja je temeljito istražena. Razina antimikrobne aktivnosti varira od meda do meda i snažno je povezana s njegovim floralnim izvorom, geografskim podrijetlom i tehnikama prerade (Hossain i sur., 2022). Ispitivanje antimikrobne aktivnosti metodom bušenja rupa u agaru temelji se na određivanju promjera zone inhibicije koja se pojavljuje oko rupe u agaru u koju je stavljen ispitivani spoj/otopina, na kojem je prethodno inokuliran test mikroorganizam (Balouiri i sur., 2016). U ovom slučaju to su bile *S. aureus*, koja uzrokuje teške infekcije kože, bakterijemiju ili sepsu, upalu pluća, endokarditis, osteomijelitis te *E. coli* koja se može pronaći u okolišu i probavnom traktu ljudi i životinja te uzrokuje proljev, infekcije mokraćnog i dišnog trakta, upalu pluća i druge bolesti (Vicá i sur., 2021). Prema dobivenim rezultatima, uočeno je kako je u usporedbi s *E. coli*, bakterija *S. aureus* osjetljivija na djelovanje medova obzirom na veličinu promjera zona inhibicija, a osjetljivost je ovisila i o vrsti korištenog meda. Tako su medovi od kestena i lipe pokazali najbolje antimikrobno djelovanje prema *S. aureus*, budući da su zone inhibicije iznosile 34 mm ili više (tablica 3), dok su preostale tri ispitivane vrste medova

pokazale slabiju antimikrobnu aktivnost. S druge strane, svih pet ispitivanih medova, pokazalo je prilično sličnu antimikrobnu aktivnost prema bakteriji *E. coli*, budući da su promjeri zona inhibicija iznosili 30 – 31 mm. Također, važno je napomenuti kako su svih pet vrsta medova inhibitorno djelovali prema *S. aureus* i *E. coli* u 100 %-tnoj koncentraciji, dok su vodene otopine medljikovca i meda od suncokreta razrijeđene do 50%, 30% i 10 % djelovale inhibirajuće prema *S. aureus*, a samo je medljikovac razrijeđen do 50 % djelovao na rast *E. coli* (tablica 3). Iako su zone inhibicija manje kako se smanjuje koncentracija meda u otopini, ovi podatci ipak upućuju na bolja antimikrobna svojstva medljikovca i suncokretovog meda, jer i manje koncentracije zaustavljaju rast *S. aureus*. Vică i sur. (2021) u svom su istraživanju ispitivali antimikrobnu aktivnost meda i propolisa sakupljenog s različitih regija Rumunjske i dobiveni rezultati su također pokazali veću osjetljivost *S. aureus* prema ispitivanim uzorcima u odnosu na *E. coli*. Osim toga dokazali su i da su *S. aureus* i *P. aeruginosa* bile najosjetljivije na baktericidno djelovanje uzoraka meda, dok su sojevi *E. coli*, *B. cereus* i *C. albicans* pokazali manju otpornost i to samo kod nekih uzoraka. Jedan od čimbenika kojim se može objasniti različito antimikrobno djelovanje meda prema bakterijama je i veća složenost dvostruke membrane koja obavija gram-negativne bakterije, koja u usporedbi s jednim, iako debljim, slojem glikoproteina/heihoične kiseline, očito ne pruža dovoljnu zaštitu svim gram-pozitivnim stanicama. Zanimljivo je kako su tijekom izrade ovog rada, *C. albicans* i *S. cerevisiae* pokazali izuzetnu otpornost prema ispitivanim medovima, obzirom da niti jedan uzorak meda nije inhibirao niti jedan od navedenih kvasca. Dobiveni rezultati u skladu su s istraživanjem Suntiparapop i sur. (2012) koji su pokazali kako med koji proizvode Tajlandske pčele (*Tetragonula leaviceps*) također ne inhibira rast kvasca iz rodova *Candida* i *Saccharomyces*. Koji je točan uzrok velike otpornosti kvasaca prema medu, nije poznato, ali je dokazano kako kvasci mogu podnijeti visoke koncentracije kiselina i šećera te predstavljaju latentnu mikrobiološku kulturu meda (Salgado Silva i sur., 2017).

S obzirom da su kod uzoraka medljikovca i suncokretovog meda prilikom određivanja antimikrobne aktivnosti zone inhibicije vidljive i kod 10 %-tnih vodenih otopina, za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije pripremljena su dodatna razrjeđenja odnosno 5 %, 2,5 %, 1,25 % i 0,625 %-tne vodene otopine medova. Kod ostalih uzoraka medova (kesten, lipa, cvjetni) minimalna inhibitorna koncentracija određivana je u rasponu 60 % do 90 %-tnih vodenih otopina. Dobiveni rezultati određivanja minimalne inhibitorne koncentracije se razlikuju ovisno o uzorku meda, što je i očekivano. Tako je na slikama 5 i 6 vidljivo kako nakon 24 h uzgoja, vodene otopine medova od kestena i lipe u koncentracijama 60 %-90 % ne

inhibiraju rast testiranih bakterija, što potvrđuje rezultate antimikrobnog djelovanja (tablica 3) koji su pokazali kako navedeni čisti (100 %-tni) medovi ipak imaju najbolja antimikrobna svojstva, a ujedno kao takvi predstavljaju i minimalnu inhibitornu koncentraciju. S druge strane, vodene otopine cvjetnog meda pokazale su bolja inhibicijska svojstva. Tako je 90 %-tna vodena otopina u najvećoj mjeri inhibirala rast bakterije *S. aureus*, dok je inhibicija *E. coli* najuspješnija s 80 %-tnom vodenom otopinom cvjetnog meda (slika 7). Rezultati ispitivanja minimalne inhibitorne koncentracije medljikovca i meda od suncokreta prikazani su na slikama 8 i 9, a obzirom da je zabilježen dobar rast bakterija pri navedenim koncentracijama, može se zaključiti kako su minimalne inhibitorne koncentracije vodenih otopina navedenih medova veće od ispitivanih. Međutim, na osnovu rezultata prikazanih u tablici 3, može se zaključiti kako su vodene otopine medljikovca i meda od suncokreta djelotvorne prema gram-pozitivnoj bakteriji *S. aureus* i u manjim koncentracijama (10 %). Gulfraz i sur. (2011) su u svom istraživanju prilikom određivanja antimikrobne aktivnosti različitih uzoraka meda s područja Pakistana dobili rezultate MIK kod *S. aureus* u vrijednosti od 0,068 mg/mL te kod *E. coli* u vrijednosti od 0,072 mg/mL. Time su dokazali da vrlo male koncentracije medova djeluju inhibitorno prema testiranim patogenim bakterijama što potvrđuje da je med antimikrobno sredstvo širokog spektra zbog čega se od davnina koristi u narodnoj medicini. Slično istraživanje proveli su i Syed Yaacob i sur. (2020), koji su u svojem radu dokazali kako prosječna MIK četiri ispitivane otopine meda iznosi 3,91 % i 5,47 % za gram-pozitivne (*B. subtilis* i *S. aureus*) odnosno gram-negativne bakterije (*P. aeruginosa* i *E. coli*). Takvi rezultati dodatno potvrđuju kako su gram-negativne bakterije otpornije na antimikrobna svojstva ispitivanih medova.



## 5. ZAKLJUČCI

1. Ispitivani uzorci medova su mikrobiološki ispravni, a jedino je u uzroku lipinog meda detektiran povećan broj kvasca.
2. Svi uzorci medova u 100 %-tnoj koncentraciji pokazuju antimikrobno djelovanje prema *S. aureus* i *E. coli*, prilikom čega se *S. aureus* pokazao osjetljivijim.
3. Suncokretov med i medljikovac pokazali su bolje antimikrobno djelovanje u usporedbi s ostalim ispitivanim uzrocima meda.
4. Minimalne inhibitorne koncentracije cvjetnog meda prema *S. aureus* i *E. coli* su postignute primjenom 90 %, odnosno 80 %-tne vodene otopine.
5. Vodene otopine meda od kestena i meda od lipe nisu pokazale inhibitorni učinak prema testiranim mikroorganizmima u niti jednoj od koncentracija.
6. Vodene otopine medljikovca i meda od suncokreta pokazale su inhibitorno djelovanje u koncentracijama od 10 % prema *S. aureus*.

## 6. POPIS LITERATURE

Balouiri M, Sadiki M, Ibnsouda SK (2016) Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal* **6**, 71–79. <https://doi:10.1016/j.jpha.2015.11.005>

da Silva PM, Gauche C, Gonzaga LV, Costa ACO, Fett, R (2016) Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chem* **196**, 309–323. <https://doi:10.1016/j.foodchem.2015.09.051>

Donkersley P, Rhodes G, Pickup RW, Jones KC, Power EF, Wright GA, Wilson K (2017) Nutritional composition of honey bee food stores vary with floral composition. *Oecologia* **185**, 749–761. <https://doi:10.1007/s00442-017-3968-3>

Gilliam M (1997) Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. *FEMS Microbiol Lett* **155**, 1–10. <https://doi:10.1111/j.1574-6968.1997.tb12678.x>

Grabowski NT, Klein G (2015) Microbiology and Food-borne Pathogens in Honey. *Crit Rev Food Sci Nutr* **57(9)**, 1852-1862. <https://doi:10.1080/10408398.2015.1029041>

Gulfraz M, Iftikhar F, Imran M, Zeenat A, Asif S, Shah I (2011) Compositional analysis and antimicrobial activity of various honey types of Pakistan. *Int J Food Sci Technol* **46**, 263–267. <https://doi:10.1111/j.1365-2621.2010.02488.x>

Hossain ML, Lim LY, Hammer K, Hettiarachchi D, Locher C (2022) A review of commonly used methodologies for assessing the antibacterial activity of honey and honey products. *Antibiotics* **11**, 975. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11070975>

Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje (2021) Patvorine. *Leksikografski zavod Miroslav Krleža*. <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=47046>. Pristupljeno 4. lipnja 2023.

Israili ZH (2014) Antimicrobial Properties of Honey. *Am J Ther* **21**, 304–323. <https://doi.org/10.1097/mjt.0b013e318293b09b>

Jaafar M, Othman M, Yaacob M, Talip B, Ilyas M, Ngajikin N, Fauzi N (2020) A Review on Honey Adulteration and the Available Detection Approaches. *Int J Integr Eng* **12**, 125–131.

Kačániová M, Pavličová S, Haščík P, Kociubinski G, Kňazovická V, Sudzina M, i sur. (2009). Microbial communities in bees, pollen and honey from Slovakia. *Acta Microbiol Immunol Hungar* **56**, 285–295. <https://doi:10.1556/amicr.56.2009.3.7>

Liu W, Zhang Y, Li M, Han D, Liu W (2019). Determination of Invert Syrup Adulterated in

Acacia Honey by Terahertz Spectroscopy with Different Spectral Features. *J Sci Food Agr* **100**, 1913-1921. <https://doi:10.1002/jsfa.10202>

Mandal MD, Mandal S (2011) Honey: its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pac J Trop Biomed* **1**, 154–160. [https://doi:10.1016/s2221-1691\(11\)60016-6](https://doi:10.1016/s2221-1691(11)60016-6)

Morales V, Corzo N, Sanz ML (2008) HPAEC-PAD oligosaccharide analysis to detect adulterations of honey with sugar syrups. *Food Chem* **107**, 922–928. <https://doi:10.1016/j.foodchem.2007.08.050>

Pravilnik (2015) Pravilnik o medu. Narodne novine 53, Zagreb. [https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2015\\_05\\_53\\_1029.html](https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2015_05_53_1029.html) Pristupljeno 1. lipnja 2023.

Róžańska H, Osek J (2012) Effect of Storage on Microbiological Quality of Honey. *Bull Vet Inst Pulawy* **56**, 161–163. <https://doi:10.2478/v10213-012-0029-x>

Rybak-Chmielewska (2004) Chemical and Functional Properties of Food Saccharides, Taylor & Francis, London, str. 73-78.

Salgado Silva M, Rabadzhiev Y, Eenon Eller M, Iliev I, Ivanova I, Santana WC (2017) Microorganisms in honey. U: Toledo VAA (uder.) Honey analysis, 1. izd., InTech, Rijeka, Hrvatska, str. 233-258. <https://doi:10.5772/67262>

Snowdon JA, Cliver DO (1996) Microorganisms in honey. *I J Food Microbiol* **31**, 1–26. [https://doi:10.1016/0168-1605\(96\)00970-1](https://doi:10.1016/0168-1605(96)00970-1)

Suntiparapop K, Prapaipong P, Chantawannakul P (2012) Chemical and biological properties of honey from Thai stingless bee (*Tetragonula leviceps*). *J Apic Res* **51(1)**, 45-52. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.51.1.06>

Syed Yaacob SN, Abdul Wahab R, Huyop F, Nizam Lani M, Zin NM (2020) Morphological alterations in gram-positive and gram-negative bacteria exposed to minimal inhibitory and bactericidal concentration of raw Malaysian stingless bee honey. *Biotechnol Biotechnol Equip* **34**, 575-586. <https://doi.org/10.1080/13102818.2020.1788421>

Šimić F (1980) Naše medonosno bilje, Znanje, Zagreb.

Uran H, Aksu F, Dülger Altiner D (2017) A research on the chemical and microbiological qualities of honeys sold in Istanbul. *Food Sci Technol* **37**, 30–33. <https://doi:10.1590/1678-457x.32016>

Vahčić N, Matković D (2009) Kemijske, fizikalne i senzorske značajke meda. <https://www.pcelinjak.hr>. Pristupljeno 3. lipnja 2023.

Vică ML, Glevitzky M, Tit DM, Behl T, Heghedúş-Mîndru RC, Zaha DC, i sur. (2021) The antimicrobial activity of honey and propolis extracts from the central region of Romania. *Food Biosci* **41**, 101014. <https://doi:10.1016/j.fbio.2021.101014>

Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu (2009). Narodne novine 74/08, 156/08, Zagreb. <https://cdn.agroklub.com/upload/documents/vodic-za-mikrobioloske-kriterije-za-hranu.pdf>. Pristupljeno 4. lipnja 2023.

White JW (1978) Honey. *Adv Food Res* **24**, 287–374. [https://doi:10.1016/s0065-2628\(08\)60160-3](https://doi:10.1016/s0065-2628(08)60160-3)

Zábrodská B, Vorlová L (2014) Adulteration of honey and available methods for detection – a review. *Acta Vet Brno* **83**, 85–102. <https://doi:10.2754/avb201483s10s85>