

# Utjecaj matične mliječi na višestruko rezistentne patogene Gram pozitivne bakterije

---

**Odorčić, Valentina**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2022**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:635409>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-11**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET

**UTJECAJ MATIČNE MLIJEČI NA VIŠESTRUKO  
REZISTENTNE PATOGENE GRAM POZITIVNE  
BAKTERIJE**

DIPLOMSKI RAD

Valentina Odorčić

Zagreb, rujan, 2022.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET**

Diplomski studij:

Agroekologija - Mikrobna biotehnologija u poljoprivredi

**UTJECAJ MATIČNE MLIJEČI NA VIŠESTRUKO  
REZISTENTNE PATOGENE GRAM POZITIVNE  
BAKTERIJE**

DIPLOMSKI RAD

Valentina Odorčić

Mentor:

Prof. dr. sc. Mirna Mrkonjić Fuka

Zagreb, rujan, 2022.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZJAVA STUDENTA  
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, **Valentina Odorčić**, JMBAG 0068220759, rođena 25.08.1994. u Gospiću, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

**UTJECAJ MATIČNE MLIJEČI NA VIŠESTRUKO REZISTENTNE PATOGENE  
GRAM POZITIVNE BAKTERIJE**

Svojim potpisom jamčim:

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

U Zagrebu, dana \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
*Potpis studentice*

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZVJEŠĆE  
O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA**

Diplomski rad studentice **Valentine Odorčić**, JMBAG 0068220759, naslova

**UTJECAJ MATIČNE MLIJEČI NA VIŠESTRUKO REZISTENTNE PATOGENE  
GRAM POZITIVNE BAKTERIJE**

obranjen je i ocijenjen ocjenom \_\_\_\_\_, dana

\_\_\_\_\_.

Povjerenstvo:

potpisi:

- |                                       |              |
|---------------------------------------|--------------|
| 1. Prof. dr. sc. Mirna Mrkonjić Fuka  | mentor _____ |
| 2. Izv. prof. dr. sc. Lidija Svečnjak | član _____   |
| 3. Prof. dr. sc. Marko Vinceković     | član _____   |

## Zahvala

Prvenstveno, veliko hvala mentorici, prof. dr. sc. Mimi Mrkonjić Fuka na ukazanome povjerenju i pruženoj prilici za stjecanje iskustva, te na ukazanom vremenu i korisnim savjetima.

Posebno hvala i djelatnicima Zavoda za mikrobiologiju, Sandri Matijević, bacc. sanit. ing. koja je bila na raspolaganju kod pripreme reagensa potrebnih za istraživanje, te naročito Irini Tanuwidjaja, mag. ing agr., na vodstvu u laboratoriju i predivnoj radnoj atmosferi, te na pomoći sa statističkom obradom podataka. Također, hvala i Zavodu za opće stočarstvo na ustupljenim laboratorijskim uređajima.

Zahvaljujem se i dr. sc. Nikolini Udiković Kolić i prof. dr. sc. Arjani Tambić Andrašević na ustupljenim izolatima bez kojih izrada ovoga rada ne bi bila moguća.

Također, hvala 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).

Za kraj, najveće hvala mojoj obitelji i prijateljima na bezuvjetnoj podršci.

## Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Hipoteza i ciljevi istraživanja .....	2
2. Pregled literature.....	3
2.1. Opće karakteristike <i>Enterococcus</i> spp. i <i>Staphylococcus</i> spp. ....	3
2.1.1. Opće karakteristike <i>Enterococcus</i> spp. ....	3
2.1.2. Opće karakteristike <i>Staphylococcus</i> spp. ....	4
2.2. Antibiotička rezistencija bakterija .....	5
2.2.1. Antibiotička rezistencija <i>Enterococcus faecium</i> .....	5
2.2.2. Antibiotička rezistencija <i>Staphylococcus aureus</i> .....	6
2.3. Matična mliječ.....	7
2.3.1. Fizikalne i kemijske karakteristike matične mliječi.....	8
2.3.2. Antimikrobno djelovanje matične mliječi .....	9
2.4. Metode određivanja antimikrobnog djelovanja.....	11
2.4.1. Metoda disk difuzije.....	11
2.4.2. Dilucijske metode.....	12
3. Materijali i metode .....	14
3.1. Kemikalije.....	14
3.2. Laboratorijski uređaji .....	14
3.3. Molekulami reagensi, enzimi, markeri i početnice.....	14
3.4. Komplet za izolaciju genomske DNA.....	15
3.5. Puferi, indikatorske otopine i hranjive podloge .....	15
3.5.1. Fiziološka otopina.....	15
3.5.2. Indikatorska otopina resazurina.....	15
3.5.3. Tekuća BHI podloga (engl. <i>Brain Heart Infusion</i> ) .....	15
3.5.4. Kruta BHI podloga (engl. <i>Brain Heart Infusion Agar</i> ).....	15

3.5.5. Kruta Mueller-Hinton podloga.....	16
3.5.6. Tekuća Mueller-Hinton podloga.....	16
3.6. Antimikrobne tvari .....	16
3.7. Bakterijske kulture .....	17
3.8. Odabir reprezentativnih izolata.....	18
3.8.1. Izolacija genomske DNA <i>S. aureus</i> .....	18
3.8.2. Genotipizacija izolata <i>S. aureus</i> rep-PCR metodom.....	19
3.9. Probir antimikrobnog djelovanja matičnih mliječi.....	20
3.10. Određivanje minimalnih inhibitornih (MIK) i minimalnih baktericidnih (MBK) koncentracija matičnih mliječi .....	21
3.10.1. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije .....	21
3.10.2. Provjera biomase .....	22
3.10.3. Provjera minimalne inhibitorne (MIK) i određivanje minimalne baktericidne (MBK) koncentracije subkultivacijom .....	23
3.11. Statistička obrada podataka .....	23
4. Rezultati.....	24
4.1. Reprezentativni sojevi <i>S. aureus</i> .....	24
4.2. Antibakterijsko djelovanje ispitivanih matičnih mliječi .....	25
4.3. Ispitivanje minimalne inhibitorne i baktericidne koncentracije .....	30
5. Rasprava.....	36
6. Zaključci.....	38
7. Popis literature .....	39
Životopis.....	45



## Sažetak

Diplomskog rada studentice **Valentine Odorčić**, naslova

### **UTJECAJ MATIČNE MLIJEČI NA VIŠESTRUKO REZISTENTNE PATOGENE GRAM POZITIVNE BAKTERIJE**

Cilj ovog rada je ispitati antibakterijsko djelovanje uzoraka matične mliječi sakupljenih na području Republike Hrvatske (RH) prema višestruko rezistentnim, Gram pozitivnim patogenim bakterijama izoliranim iz otpadnih voda. Djelovanje matične mliječi je ispitano kvalitativno, metodom difuzije bunara u agaru prema vankomicin rezistentnim *Enterococcus faecium* te meticilin rezistentnim *Staphylococcus aureus* sojevima, te je kvantificirano mikrodilucijskom metodom. Zone inhibicije rasta pokazuju da su sojevi *S. aureus* značajno osjetljiviji na djelovanje matične mliječi od *E. faecium* sojeva (*S. aureus* 16,8 mm ± 6,1 mm; *E. faecium* 13,7 mm ± 1,8 mm; ANOVA, Bonferroni test,  $p < 0,001$ ). Također, više su koncentracije matične mliječi potrebne za inhibiciju *E. faecium* sojeva (MIK 115,00 mg/mL ± 61,00 mg/mL; MBK 141,25 mg/mL ± 68,18 mg/mL) nego za inhibiciju *S. aureus* sojeva (MIK 34,65 mg/mL ± 18,22 mg/mL; MBK 36,01 mg/mL ± 17,27 mg/mL).

**Ključne riječi:** matična mliječ, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, minimalna inhibitorna koncentracija (MIK), minimalna baktericidna koncentracija (MBK)

## Summary

Of the master's thesis – student **Valentina Odorčić**, entitled

### **THE INFLUENCE OF ROYAL JELLY ON MULTIRESTANT GRAM POSITIVE PATHOGENIC BACTERIA**

The work aim is to examine the antibacterial activity of royal jelly samples collected in the Republic of Croatia against multiresistant, Gram-positive pathogenic bacteria isolated from wastewater. The antibacterial activity of royal jelly was tested qualitatively by the agar well diffusion method against vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains, and was quantified by the microdilution method. Growth inhibition zones show that *S. aureus* strains are significantly more sensitive to royal jelly than *E. faecium* strains (*S. aureus* 16,8 mm  $\pm$  6,1 mm; *E. faecium* 13,7 mm  $\pm$  1,8 mm; ANOVA, Bonferroni test,  $p < 0,001$ ). Also, higher concentrations of royal jelly are required for the inhibition of *E. faecium* strains (MIC 115,00 mg/mL  $\pm$  61,00 mg/mL; MBC 141,25 mg/mL  $\pm$  68,18 mg/mL) than for the inhibition of *S. aureus* strains (MIC 34,65 mg/mL  $\pm$  18,22 mg/mL; MBC 36,01 mg/mL  $\pm$  17,27 mg/mL).

**Keywords:** royal jelly, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, minimal inhibitory concentration (MIC), minimal bactericidal concentration (MBC)

# 1. Uvod

Višestruka rezistentnost (engl. *Multi-drug resistance*) nije strogo definirana, već podrazumijeva rezistenciju na minimalno jedan antibiotik iz tri različite klase antibiotika, među kojima su aminoglikozidi, beta-laktami, glikopeptidi, lipopeptidi, makrolidi, oksazolidinoni, kinoloni i tetraciklini (Sweeney i sur. 2018; Bush 2012). Infekcije uzrokovane patogenima višestruko rezistentnima na primjenjive antibiotike predstavljaju prijetnju globalnom zdravlju. Posebnu zabrinutost uzrokuju infekcije ESKAPE patogenima (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterobacter* spp.) koje karakterizira iznimno visoka razina virulentnosti i višestruka otpornost (Mulani i sur. 2019) te upravo oni predstavljaju prioritet za pronalazak novih načina inhibicije rasta.

Do povećanja broja višestruko rezistentnih patogena, kontinuirano dolazi zbog više faktora, prvenstveno zbog zagađenja okoliša visokim koncentracijama antibiotika, no također i zbog prekomjerne primjene i zlouporabe antibiotika u poljoprivredi i veterini te u medicini (Milaković i sur. 2020; López Romo i Quirós 2019). Do pojave višestruke rezistentnosti dolazi razvijanjem mehanizama rezistencije na mehanizme djelovanja antibiotika. Antibiotici na patogene djeluju pomoću sljedećih mehanizama: inhibicijom sinteze i ometanjem funkcije stanične stijenke, inhibicijom sinteze proteina i nukleinskih kiselina te inhibicijom ključnih enzima (Park i sur. 2016). Višestruko rezistentni patogeni koriste više mehanizama rezistentnosti istovremeno. Mehanizmi koje uglavnom posjeduju su proizvodnja enzima koji ometa mehanizam djelovanja antibiotika, smanjenje propusnosti stanične membrane, aktivno izbacivanje antibiotika iz stanice efluks pumpom, formacija biofilmova te ciljana izmjena i zaobilazanje antibiotika. Gene odgovorne za rezistenciju bakterije mogu stjecati vertikalnim prijenosom ili horizontalnim transferom gena putem plazmida ili transpozona (Wright 2016).

Porast rezistencije na antibiotike dovodi do povećanja broja istraživanja alternativnih načina inhibicije rasta višestruko rezistentnih patogena. Matična mliječ se istražuje kao agens za suzbijanje rasta patogenih mikroorganizama te je dokazano njezino djelovanje prema Gram pozitivnim i Gram negativnim bakterijama. Antibakterijsko djelovanje matične mliječi se pripisuje proteinu rojalizinu, *trans*-10-hidroksi-2-dekanskoj kiselini, Jelleine peptidima te glavnim proteinima matične mliječi (MRJP; engl. *Major Royal Jelly Proteins*) kao i njihovom simultanom djelovanju (Oršolić 2013; Nader i sur. 2021). Unatoč tome, neznatan je broj istraživanja proveden o antibakterijskom djelovanju matične mliječi na metilicilin rezistentne *Staphylococcus aureus* i vankomicin rezistentne *Enterococcus faecium*, a dosadašnja istraživanja ne uključuju antibakterijska svojstva matične mliječi s područja Republike Hrvatske. Stoga je u ovome radu provedeno istraživanje antibakterijskog djelovanja matičnih mliječi sakupljenih na području Republike Hrvatske prema višestruko rezistentnim sojevima *S. aureus* i *E. faecium* izoliranim iz otpadnih voda.

## 1.1. Hipoteza i ciljevi istraživanja

Opći cilj ovog istraživanja je ispitati djelovanje matičnih mliječi (MM; n=5) na višestruko rezistentne sojeve *Enterococcus faecium* (n=5) i *Staphylococcus aureus* (n=5) izolirane iz otpadnih voda te procijeniti potencijal matične mliječi za kontrolu rasta i suzbijanje uzročnika infekcija. Uzorci matične mliječi korišteni u ovom istraživanju su prikupljene na području Republike Hrvatske. Lokacije uzorkovanja analiziranih matičnih mliječi su: Konšćica, Zagrebačka županija (MM1 i MM2); Petrovsko, Krapinsko-zagorska županija (MM3) te Obrovac Sinjski, Splitsko-dalmatinska županija (MM4 i MM5).

Hipoteza ovog istraživanja je:

1. Uzorci matične mliječi će djelovati inhibitorno i baktericidno na sojeve patogenih Gram pozitivnih meticilin rezistentnih *Staphylococcus aureus* i vankomicin rezistentnih *Enterococcus faecium* te će kao takve predstavljati alternativno rješenje za inhibiciju njihova rasta.

Specifični ciljevi ovog istraživanja su:

1. Selekcija sojeva *Staphylococcus aureus* nakon izolacije DNA te određivanje unutarvrstne varijabilnosti rep-PCR metodom.
2. Kvalitativno ustanoviti djelovanje prikupljenih uzoraka matičnih mliječi na sojeve *E. faecium* i *S. aureus* metodom difuzije bunara u agaru.
3. Kvantitativno odrediti minimalne inhibitorne (MIK) i minimalne baktericidne (MBK) koncentracije matičnih mliječi mikrodilucijskom metodom.

## 2. Pregled literature

### 2.1. Opće karakteristike *Enterococcus* spp. i *Staphylococcus* spp.

#### 2.1.1. Opće karakteristike *Enterococcus* spp.

Enterokoki su ubikvisti, te stoga mogu biti sastavni dio mikrobiote čovjeka, životinja, biljaka te također mogu preživljavati u okolišu. Glavno stanište *Enterococcus* vrsta je gastrointestinalni (GI) trakt životinja i ljudi kod kojih su dominantne *Enterococcus* vrste *E. faecium* (slika 2.1.1.1) i *E. faecalis* (Giraffa 2014).



Slika 2.1.1.1. Izgled stanica *Enterococcus faecium* dobivenih skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM).

Izvor: <https://fineartamerica.com/featured/3-enterococcus-faecium-sem-scimat.html>

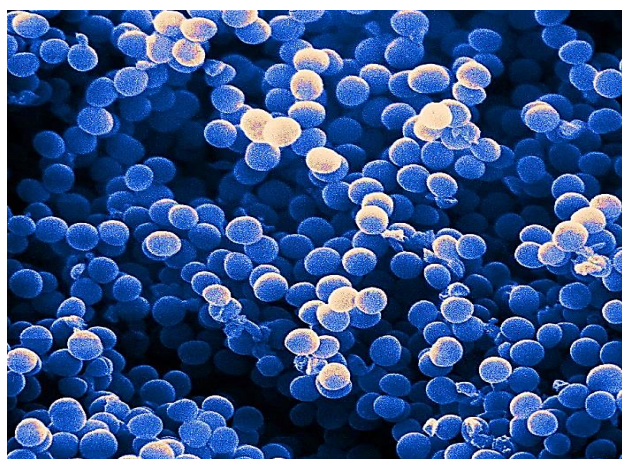
Enterokoki su pretežito nepokretne kokoidne Gram pozitivne bakterije koje ne stvaraju spore (Giraffa 2014). Slažu se u formu lanca ili su jednostanični. Prema potrebi za kisikom su fakultativni anaerobi. Sposobni su rasti pri širokom rasponu temperature, od 5 do 50 °C, iako im je optimalni rast pri temperaturi od 42,7 °C te je značajna karakteristika vrste *E. faecium* njezina sposobnost preživljavanja na temperaturama od 60 °C u trajanju od 30 minuta. Optimalan pH za rast enterokoka je 7,5 iako mogu rasti u rasponu od 4,6 do 9,9 pH. Enterokoki su katalaza i oksidaza negativni, na krvnom agaru pokazuju svojstva hemolize (Van den Berghe i sur. 2006; Foulque Moreno i sur. 2006) te mogu podnijeti do 6,5% NaCl (Giraffa 2014). Vrste roda *Enterococcus* se ubrajaju u bakterije mliječne kiseline (BMK; engl. *Lactic acid bacteria*, LAC) (Ike 2017) koje karakterizira proizvodnja mliječne kiseline (König i Fröhlich 2017).

Dominantni enterokoki u ljudskom GI traktu, *E. faecium* i *E. faecalis*, su ujedno i glavni uzročnici infekcija kod ljudi, te pokazuju značajnu rezistenciju na veliki broj komercijalno dostupnih antibiotika. Njihova rezistencija na antibiotike predstavlja značajan problem ako uzrokuju infekciju jer su sastavni dio namirnica poput tvrdih i polutvrdih sireva te fermentiranih kobasica (Giraffa 2014; Bush i Vazquez-Pertejo

2021). *E. faecium* može uzrokovati više vrsta bolesti, među kojima su endokarditis, bakterijemija, prostatitis, celulitis te infekcije mokraćnog sustava, rana i abdomena (Bush i Vazquez-Pertejo 2021).

### 2.1.2. Opće karakteristike *Staphylococcus* spp.

*Staphylococcus* spp. su kokoidne Gram pozitivne bakterije koje se grupiraju u nakupine. Nepokretne su te ne stvaraju endospore. Fakultativni su anaerobi te u DNA imaju 33 - 40% G+C. Također mogu biti koagulaza pozitivni što je karakteristika patogenih *Staphylococcus* vrsta uključujući i *S. aureus* (slika 2.1.2.1), ali mogu biti i koagulaza negativni (Foster 2002; Götz i sur. 2006). Komezali su sa sisavcima kod kojih nastanjuju kožu i područje nosa, ali su i oportunistički patogeni. *S. aureus* nastanjuje 20 - 30% ukupne ljudske populacije (Haag i sur. 2019). Kod nekih skupina ljudi, poput zdravstvenih radnika, imunokompromitiranih pacijenata i bolničkih pacijenata može nastanjivati i do 80% populacije (Taylor i Unakal 2022). *S. aureus* može rasti u mediju s do 10% NaCl tvoreći zlatno-žute kolonije. Temperature pogodne za opstanak ove vrste su između 18 - 40 °C dok je raspon pH u kojem mogu preživjeti 4 - 9,8, uz optimalan pH 6 - 7 (Taylor i Unakal 2022; Medvedová i Valík 2012).



Slika 2.1.2.1. Izgled stanica *Staphylococcus aureus* dobivenih skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM).

Izvor: <https://fineartamerica.com/featured/4-staphylococcus-aureus-sem-david-m-phillips.html>

*S. aureus* se može prenijeti direktnim ili posrednim dodirrom. Bolesti koje mogu uzrokovati su bakterijemija, endokarditis, infekcije kože, upale dišnog sustava, gastroenteritis, upale mokraćnog sustava itd. Budući da luči i toksine, bolesti mogu biti ne samo invazivne, nego i uzrokovane toksinima (Taylor i Unakal 2022). *S. aureus* tvore i biofilmove što je dodatni mehanizam njihove virulencije te stvara veliki problem u mljekarskoj i mesnoj industriji gdje uzrokuje mastitis (Cheung i sur. 2021).

## 2.2. Antibiotička rezistencija bakterija

Dva su osnovna tipa antibiotske rezistencije, intrinzična i stečena rezistencija. Pod intrinzičnom se rezistencijom podrazumijeva prijenos gena s roditelja na potomstvo, odnosno vertikalni prijenos gena (Martinez 2014). Mehanizmi rezistencije koji su zaslužni za intrinzičnu rezistenciju su aktivnost efluks pumpe i smanjena propusnost vanjske membrane (Cox i Wright 2013). Stečena rezistencija, koja je zaslužna za stjecanje otpornosti, podrazumijeva mutacije i horizontalni transfer gena (Kristich i sur. 2014). Načini horizontalnog transfera gena su konjugacija, transdukcija i transformacija (Yutin 2013). Konjugacija je prijenos genetskih elemenata dviju susjednih stanica preko pili struktura, transdukciju provode bakteriofazi unošenjem strane DNA u bakterijsku stanicu, a transformacija je ulazak slobodne DNA u bakterijsku stanicu iz okoline. Zbog navedenih mehanizama, česta uporaba antibiotika, naročito antibiotika širokog spektra djelovanja, dovodi do povećanja broja višestruko rezistentnih bakterija (Thomas i Nielsen 2005).

### 2.2.1. Antibiotička rezistencija *Enterococcus faecium*

Enterokoki posjeduju urođene mehanizme rezistentnosti koje kodiraju geni smješteni na kromosomima, no njihova urođena rezistencija varira na primjenjive antibiotike, od potpune rezistencije do niskog stupnja rezistentnosti (Kristich i sur. 2014; Pintarić i Šeol Martinec 2018). Osim urođene, rezistentnost može biti i rezultat mutacija ili horizontalnog transfera gena zahvaljujući izrazitoj prirodnoj sposobnosti enterokoka za stjecanje rezistencije (Kristich i sur. 2014). Značajan problem predstavljaju rezistencije *E. faecium* na vankomicin, beta-laktamske antibiotike, daptomicin, tetraciklin i aminoglikozide (Zhou i sur. 2020; Miller i sur. 2014; Zeng i sur. 2022). Svjetska zdravstvena organizacija (WHO; engl. *World Health Organisation*) je stoga stavila *E. faecium* visoko na popis prioriteta bakterija za pronalazak novih metoda liječenja (Pintarić i Šeol Martinec 2018).

Enterokoki rezistentni na vankomicin (VRE; engl. *Vancomycin resistant enterococci*) uzrokuju značajan broj infekcija u bolničkom okruženju te je upravo otpornost na glikopeptid vankomicin jedna od najznačajnijih rezistencija *E. faecium* (Zhou i sur. 2020). Mehanizam djelovanja vankomicina je inhibicija sinteze peptidoglikana (Šeol i sur. 2010) te se mehanizam rezistentnosti *E. faecium* temelji na promijeni mjesta vezanja vankomicina. Do sada je kod enterokoka opisano devet skupina gena zaslužnih za rezistenciju na vankomicin (Miller i sur. 2014). Upravo zbog otpornosti na vankomicin, Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) je stavila *E. faecium* visoko na listu bakterija koje su prioritet za razvoj novih antibiotika (Pintarić i Šeol Martinec 2018).

Beta-laktamski antibiotici poput penicilina i cefalosporina, također inhibiraju sintezu peptidoglikana vezivanjem na enzime koji ih sintetiziraju, samim time inhibirajući i sintezu stanične stijenke. Enzimi na koje se vežu su poznati kao proteini koji vežu peniciline (PBP; engl. *Penicillin Binding Proteins*). Mehanizam rezistencije enterokoka

na beta-laktame se temelji na sintezi PBP5, molekule niskog afiniteta koji slabije vežu beta-laktamske antibiotike (Miller i sur. 2014).

Daptomicin je ciklički lipopeptid koji stvara pore u staničnoj membrani čime dovodi do depolarizacije i smrti stanice uslijed gubitka kalijevih iona (Bedenić 2009). Mehanizam rezistencije enterokoka na daptomicin je promjena strukture stanične membrane i njezinog polariteta, a posljedica je mutacije gena (Palmer i sur. 2011). Rezistencija na daptomicin predstavlja značajan problem zbog činjenice da se daptomicin koristi kao zadnja linija obrane protiv infekcija uzrokovanih *E. faecium* (Zeng i sur. 2022).

Aminoglikozidi djeluju na ribosome inhibirajući sintezu proteina nakon ulaska u stanicu (Šeol i sur. 2010). Mehanizam otpornosti enterokoka na aminoglikozide se bazira na posjedovanju gena koji kodiraju za enzime koji imaju sposobnost inaktivacije antibiotika. Budući da su fakultativni anaerobi, od enterokoka se očekuje određeni niski stupanj urođene otpornosti na aminoglikozide koji djeluju isključivo u aerobnim uvjetima (Costa i sur. 1993; Galimand i sur. 2011). Isti mehanizam djelovanja imaju i makrolidi i streptogramini (Šeol i sur. 2010). *E. faecium* je zahvaljujući *msrC* genu koji djeluje na efluks pumpu rezistentan na makrolide (Portillo i sur. 2000). Porast stečene rezistencije enterokoka na streptogramine je izražen u bolničkim infekcijama, otpadnim vodama i farmama zbog korištenja streptogramina A kao promotora rasta (McDonald i sur. 2001).

Tetraciklini kao antibiotici širokog spektra djelovanja, utječu i na Gram pozitivne i na Gram negativne bakterije inhibirajući sintezu bjelančevina (Makovec i sur. 2014). Rezistencija na tetraciklin kod enterokoka je stečena i prenosi se horizontalnim transferom gena. Temelji se na izbacivanju antibiotika iz stanice pomoću efluks pumpe ili promjenom mjesta vezivanja antibiotika (Miller i sur. 2014).

### 2.2.2. Antibiotička rezistencija *Staphylococcus aureus*

*S. aureus* posjeduje tri urođena mehanizma rezistencije: smanjenje propusnosti stanične membrane, efluks sustav kodiran genima te proizvodnja beta-laktamaze. Do stečene rezistencije *S. aureus* na antibiotike dolazi mutacijama (npr. rezistencija na klindamicin), horizontalnim transferom gena, tvorbom biofilmova te perzistentnim stanicama (engl. *Persister cells*) (Guo i sur. 2020).

Rezistencija *S. aureus* može biti specifična i nespecifična do koje dolazi formiranjem biofilmova (Cheung i sur. 2021). Najznačajnije rezistencije *S. aureus* su rezistencija na meticilin uzrokovana transferom *mecA* gena pokretnim genetičkim elementom, te rezistencija na vankomicin uzrokovana horizontalnim transferom *vanA* gena iz rezistentnih vrsta roda *Enterococcus* (Hiramatsu i sur. 2014). Uz rezistencije na meticilin i vankomicin, značajne su i rezistencije na tetracikline i na beta-laktamske antibiotike (Rayner i Munckhof 2005).

Na temelju osjetljivosti prema antibioticima, *Staphylococcus aureus* se dijeli u dvije skupine: MSSA (*Staphylococcus aureus* osjetljiv na meticilin; engl. *Methicillin-sensitive Staphylococcus aureus*) i MRSA (*Staphylococcus aureus* rezistentan na meticilin;



engl. *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) koji uzrokuje sve više infekcija na globalnoj razini zbog prekomjerne uporabe antibiotika i evolucije bakterija (Guo i sur. 2020). MRSA nastaje prilikom horizontalnog prijenosa *mecA* gena u MSSA (Hiramatsu i sur. 2013).

Vankomicin je i dalje antibiotik koji se najčešće koristi za liječenje infekcija uzrokovanih MRSA-om iako je došlo do pojave VRSA sojeva (*S. aureus* otporan na vankomicin; engl. *Vancomycin resistant S. aureus*) koji nisu toliko rasprostranjeni. Uporaba vankomicina je dovela i do pojave takozvanih VISA sojeva (sojevi srednje otpornosti na vankomicin; engl. *Vancomycin intermediate-resistant S. aureus*) (Cheung i sur. 2021).

*S. aureus* rezistentan na penicilin stvara enzim beta-laktamazu koji razgrađuje beta-laktamski prsten. Cefalosporini prve generacije su otporni na beta-laktamazu ali imaju slaba baktericidna svojstva prema *S. aureus*. Makrolidi koji inhibiraju sintezu proteina osjetljivih bakterija, također nemaju učinka na višestruko rezistentne MRSA sojeve no pokazuju učinke na MSSA i na MRSA koje nisu višestruko rezistentne. Linkozamidi poput linkomicina i njegovog sintetskog derivata klindamicina šireg spektra djelovanja koji inhibira sintezu proteina, pokazuju učinak na MSSA i MRSA koji nisu višestruko rezistentni, no ne i na višestruko rezistentne MRSA. Ko-trimoksazol, koji je kombinacija trimetoprima i sulfametoksazola inhibira sintezu bakterijskih folata no također ne pokazuje utjecaj na višestruko rezistentne MRSA iako pokazuje na MRSA koji nisu višestruko rezistentni te na MSSA. *S. aureus* je također otporan na tetracikline koji se više ne koriste u liječenju jer su MRSA i MSSA sojevi rezistentni na tetracikline. Većina višestruko rezistentnih MRSA sojeva je rezistentna i na gentamicin koji ima antibakterijski utjecaj na MSSA i MRSA sojeve koji nisu višestruko rezistentni iako gentamicin primarno utječe na Gram negativne bakterije (Rayner i Munckhof 2005).

### **2.3. Matična mliječ**

Hrana s potencijalnim zdravstvenim dobrobitima, takozvana funkcionalna hrana, svojim biološki aktivnim svojstvima pridonosi održavanju ljudskoga zdravlja. U funkcionalnu hranu se ubrajaju i proizvodi medonosnih pčela (*Apis mellifera* L.) poput meda, propolisa, pčelinje peludi, pčelinjeg kruha i matične mliječi. Matičnu mliječ izlučuju podždrijelne (hipofaringealne) i prednjočeljusne (mandibularne) žlijezde pčela radilica te je pčele koriste za prehranu ličinki i matice (slika 2.3.1) (Oršolić 2013). Pčela radilica živi u prosjeku 45 dana dok matica, koja se prehranjuje matičnom mliječi, živi do pet godina (Fratini i sur. 2016).



Slika 2.3.1. Ličinke u matičnoj mliječi u stanicama saća.

Izvor: <https://www.beeopic-beekeeping.com/non-classe/royal-jelly-makes-queen-bee/>

### 2.3.1. Fizikalne i kemijske karakteristike matične mliječi

Matična mliječ je viskozna, bijelo-žute boje, specifična mirisa i kiselo-trpkog okusa (pH 3,4 – 4,5) (Sabatini i sur. 2009), osjetljiva je na svjetlost i toplinu te u doticaju sa zrakom oksidira. Uz antimikrobna, sadrži i anti-upalna, anti-tumorna i imunostimulativna svojstva (Fratini i sur. 2016; Ratajczak i sur. 2021). Bogata je pantotenskom kiselinom, biopterinom i neobiopterinom kojih sadrži čak 10 puta više od radiličke i trutovske mliječi. Sadrži i protein rojalaktin koji povećava veličinu tijela i skraćuje razvojno razdoblje ličinke čime je zaslužan za diferencijaciju ličinke u maticu (Oršolić 2013). Značajna sastavnica jedinstvena za matičnu mliječ je *trans*-10-hidroksi-2-dekanska kiselina (10-HDA). Osim što joj se pripisuju antimikrobna svojstva, u dio 10-HDA u matičnoj mliječi je ujedno i pokazatelj kakvoće i autentičnosti matične mliječi (Zhou i sur. 2007; Bogdanov 2016).

Kemijska svojstva matične mliječi, kao i svih ostalih pčelinjih proizvoda, variraju ovisno o više čimbenika: biljnoj vrsti koju pčele koriste, godišnjem dobu, geografskoj lokaciji, vanjskim čimbenicima poput klime te samoj vrsti pčela (Sabatini i sur. 2009). Prosječni kemijski sastav matične mliječi je prikazan u tablici 2.3.1.1 (Oršolić 2013; Sabatini i sur. 2009). Uz navedeno u tablici, matična mliječ sadrži i enzime, neuroprijenosnike i spolne hormone (Oršolić 2013).

Tablica 2.3.1.1. Prosječni kemijski sastav svježe matične mliječi.

60 – 70%	<b>voda</b>
9 – 18%	<b>proteini</b>
7 – 18%	<b>šećeri</b>
3 – 8%	<b>lipidi</b>
> 1,4%	<b>10-HDA</b>
0,8 – 3%	<b>anorganske tvari</b>
336 – 351 mg/g	<b>vitamini</b>
3,4 – 4,5	<b>pH</b>

Izvor: Oršolić 2013; Sabatini i sur. 2009.

### 2.3.2. Antimikrobno djelovanje matične mliječi

Glavni izvor stvaranja antibiotika su dugo bile plijesni i bakterije, no zbog sve raširenije antibiotske rezistencije i potencijala širenja antibiotske rezistencije, istraživači razmatraju alternativna rješenja među kojima su i produkti kukaca u koje spada i matična mliječ. Razlog zbog kojeg su proizvodi kukaca razmatrani kao alternativni izvor antibiotika, je njihova sposobnost odstranjivanja bakterija i stjecanja prijenosne imunosti, što je pokazatelj prisutnosti jakih antimikrobnih tvari u kukcima (Oršolić 2013). Istraživanja provedena o minimalnim inhibitornim koncentracijama pčelinjih proizvoda su pokazala da je najučinkovitiji pčelinji otrov, dok matična mliječ pokazuje najmanje učinkovita antibakterijska svojstva (Ratajczak i sur. 2021). Sinergističko djelovanje antimikrobnih tvari matične mliječi, rojalizina, *trans*-10-hidroksi-2-dekanske kiseline, Jelleine-I-IV i glavnih proteina matične mliječi je zaslužno za obećavajući antimikrobni potencijal matične mliječi (Nader i sur. 2021).

Za inhibitorno djelovanje matične mliječi na Gram pozitivne i Gram negativne bakterije su po dosadašnjim spoznajama, prvenstveno zaslužni protein rojalizin i *trans*-10-hidroksi-2-dekanska kiselina (10-HDA) (Oršolić 2013). Rojalizin je protein koji sprječava kontaminaciju matične mliječi Gram pozitivnim bakterijama. Pripisuju mu se antimikrobna svojstva jer je dokazano njegovo antimikrobno djelovanje na Gram pozitivne iako ne i na Gram negativne bakterije (Fontana i sur. 2004).

Najzastupljenija komponenta lipida matične mliječi je 10-HDA koja zauzima 80% ukupne lipidne frakcije te je prisutna samo u matičnoj mliječi (Zhou i sur. 2007). Yang i sur. (2018) su dokazali jaku antimikrobnu aktivnost 10-HDA prema Gram pozitivnim bakterijama uključujući i *S. aureus*, te prema Gram negativnim bakterijama. Moselhy i sur. (2013) su proveli istraživanje u kojem su antimikrobno djelovanje masnih kiselina topivih u eteru, koje su se prvenstveno sastojale od 10-HDA, usporedili s frakcijom netopivom u eteru, rojalizinom. Njihov utjecaj je određen na sojevima vrsta poput

*Staphylococcus aureus* te *Escherichia coli*. Rezultati su pokazali da frakcije topive u eteru reduciraju rast analiziranih mikroorganizama pri koncentraciji od 30 mg/mL dok frakcije netopive u eteru nisu pokazale gotovo nikakvo antimikrobno djelovanje. Yousefi i sur. (2012) su analizirali utjecaj 10-HDA te su dokazali da inhibira ekspresiju gena nužnih za kolonizaciju i patogenost *Streptococcus mutans*. Također je provedeno i istraživanje o utjecaju 10-HDA na *S. aureus* biofilmove u kojem je zaključeno da i koncentracije manje od minimalne inhibitorne koncentracije uspješno inhibiraju formaciju biofilмова te da uništavaju formirane biofilmove. Također je uočeno da 10-HDA inhibira i produkciju hemolizina. Razlog takvom učinku 10-HDA na biofilmove *S. aureus* je zaustavljanje transkripcije odgovornih gena (Gao i sur. 2022).

Također su izolirana i četiri antibakterijska peptida, Jelleine-I-IV, koji ne pokazuju sličnosti drugim antibakterijskim peptidima. Kratki su te su izgrađeni od osam do devet aminokiselina. Provedeno je istraživanje o antimikrobnom djelovanju Jelleine-I-IV na Gram negativne *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* i *Pseudomonas aeruginosa* te na Gram pozitivne *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus* i *Bacillus subtilis* te je utvrđeno da Jelleine-I i Jelleine-II imaju širok spektar djelovanja, to jest djeluju antimikrobno i na Gram pozitivne i na Gram negativne bakterije. Jelleine-III također ima širok spektar djelovanja, no slabijeg je učinka, dok Jelleine-IV ne pokazuje antimikrobno djelovanje ni na jednu analiziranu bakterijsku vrstu (Fontana i sur. 2004). Istraživanju koje su proveli Jia i sur. (2020) je cilj bio identificirati mehanizam antimikrobnog djelovanja Jelleine-I na Gram pozitivne i Gram negativne bakterije. Analize su proveli *in vivo* te su utvrdili da peptid Jelleine-I ometa pravilnu funkciju stanične membrane. Peptidi antibakterijskog djelovanja su pozitivno nabijeni što im omogućava interakciju s negativno nabijenima fosfolipidima stanične membrane (Splith i Neundorf 2011), stoga na bakterijske stanice djeluju preko dva mehanizma: mehanizmom tvorbe transmembranskih kanala na staničnoj stijenci, te razaranjem stanične stijenske peptidima koji djeluju poput deterdženta (Oršolić 2013).

Većinski dio, i do 90% ukupnog postotka proteina matične mliječi medonosnih pčela, zauzima devet glavnih proteina matične mliječi (MRJP; engl. *Major Royal Jelly Proteins*) od kojih se za MRJP 1 – 7 pretpostavlja da imaju antimikrobno djelovanje. Stoga su Park i sur. (2019) proveli istraživanje o utjecaju MRJP 1 – 7 na Gram negativnu *Escherichia coli* te su dokazali da MRJP 2 – 5 i MRJP 7 doprinose antimikrobnim svojstvima matične mliječi, dok MRJP 1 i 6 ne pokazuju značajna antimikrobna svojstva. Kim i sur. (2019) su dokazali antimikrobna djelovanja MRJP 4 matične mliječi azijske medonosne pčele (*Apis cerana*) na bakterije, gljive i plijesni.

García i sur. (2010) su u istraživanju usporedili antimikrobno djelovanje dvaju uzoraka matične mliječi iz Argentine (A i B) na Gram negativne i Gram pozitivne bakterije uključujući *S. aureus* i *E. faecalis*. Oba uzorka matične mliječi su pokazala antimikrobno djelovanje na sve analizirane bakterije s iznimkom *Klebsiella pneumoniae* (Gram negativna) na koju ni jedan uzorak nije djelovao antimikrobno, te *Streptococcus uberis* (Gram pozitivna) na koju nije djelovao uzorak A. Zaključeno je, između ostaloga, i da su razlike u djelovanju uzoraka matične mliječi posljedica različitih geografskih lokacija i kolonija pčela koje su je proizvele. Istraživanje koje su

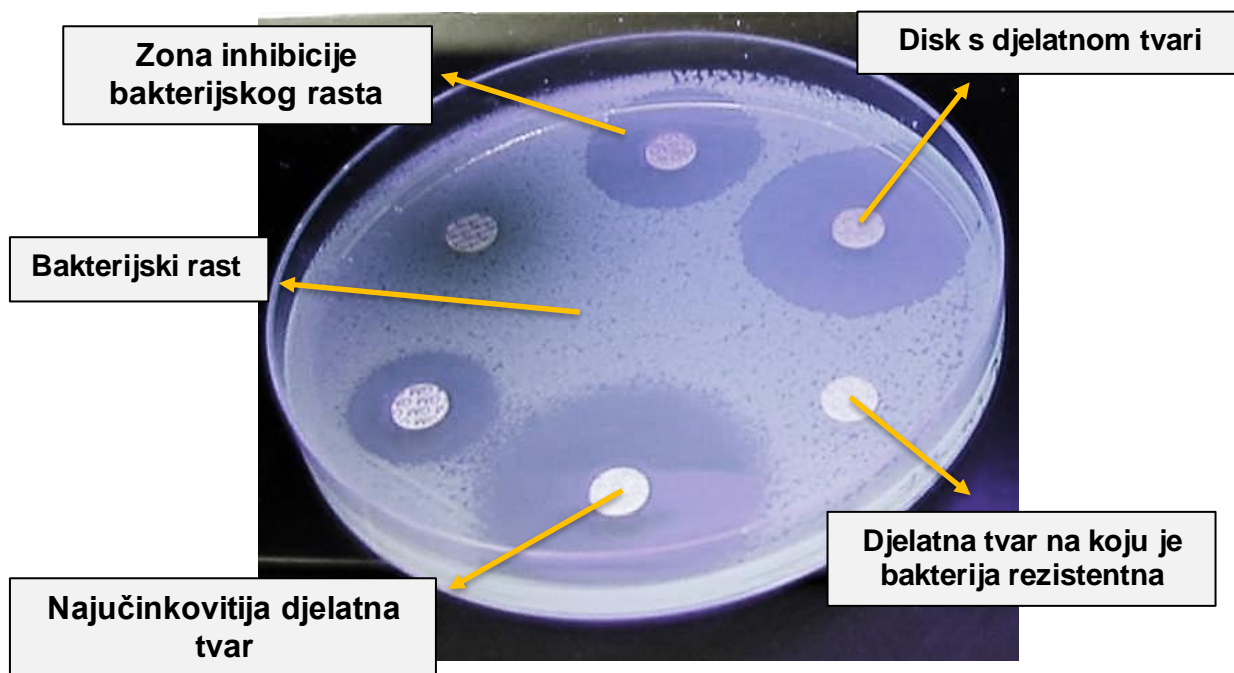
proveli Ratanavalachai i Wongchai (2002) je pokazalo da matična mliječ djeluje baktericidno i bakteriostatično na ispitivane Gram pozitivne i Gram negativne bakterije. Također su proučili i utjecaj duljine skladištenja na antibiotsku aktivnost te su zaključili da su najizraženija antibiotska svojstva tijekom 24 sata nakon zamrzavanja. Također je zabilježen postupan pad antibiotske aktivnosti do stacionarne razine tijekom skladištenja.

## **2.4. Metode određivanja antimikrobnog djelovanja**

### **2.4.1. Metoda disk difuzije**

Jedan od mogućih načina provedbe probira (engl. *Screening*), kojim se ispituje inhibitoran učinak antimikrobnih tvari, je Kirby-Bauerov postupak, odnosno metoda disk difuzije (slika 2.4.1.1). Provodi se tako da se analizirana bakterijska kultura inokulira na pripremljeni Mueller-Hinton (MH) agar pomoću sterilnog vatenog štapića. Na tako pripremljenu površinu agara se postavje celulozni diskovi impregnirani antimikrobnom tvari poznatih koncentracija. Tijekom inkubacije, koja traje od 18 do 24 h, analizirana antimikrobna tvar difundira iz celuloznog diska u hranjivu podlogu. U slučaju da je mikroorganizam osjetljiv na analiziranu antimikrobnu tvar, pojavljuje se zona inhibicije. Promjer nastale zone se mjeri i izražava u milimetrima (mm) te se rezultati izražavaju prema kriterijima koje određuje CLSI (engl. *Clinical and Laboratory Standard Institute*) (CLSI 2012a).

Bakterije su ovisno o zoni inhibicije klasificirane kao rezistentne (engl. *resistant*), između (engl. *intermediate*) i osjetljive (engl. *sensitive*) prema antibioticima ili antimikrobnoj tvari. Vrijednosti nisu univerzalne, te variraju ovisno o antibiotiku i antimikrobnoj tvari. Tako za npr. vankomicin, promjer zone inhibicije manji od 9 mm pokazuje rezistentnost bakterije, 10 - 11 mm između, te promjer veći od 12 mm osjetljivost, dok za meticilin zona inhibicije manja od 9 mm pokazuje rezistentnost, 10 - 13 mm između, te veća od 14 mm osjetljivost bakterije (Bauer i sur. 1966).



Slika 2.4.1.1. Metoda disk difuzije prema Kirby-Bauer postupku.

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

Modificirana inačica opisane metode podrazumijeva bušenje bunara u agaru koji se zatim ispunjavaju analiziranom djelatnom tvari (Valgas i sur. 2007). Postupak provedbe metode je sličan postupku Kirby-Bauer metode. Površina agara se inokulira pripremljenom bakterijskom kulturom pomoću sterilnog vatenog štapića, te se zatim u agaru sterilno izbuše bunari koji se zatim pune analiziranom djelatnom tvari. Ploče se zatim inkubiraju u uvjetima koji odgovaraju analiziranoj bakterijskoj kulturi. Tijekom inkubacije, analizirana djelatna tvar difundira u agar te ako inhibitorno djeluje na analiziranu bakterijsku kulturu, nastaje zona inhibicije čiji se promjer mjeri i izražava u mm (Balouiri i sur. 2016).

## 2.4.2. Dilucijske metode

Za kvantitativno mjerenje aktivnosti antimikrobne tvari se mogu koristiti makrodilucijska i mikrodilucijska metoda na tekućoj podlozi te agar dilucija na krutoj podlozi. U sva tri slučaja se analizirana antimikrobna tvar serijski razrjeđuje te se zatim inkorporira u hranjivu podlogu koja se zatim inokulira ispitivanim sojevima (CLSI 2012b).

Glavna razlika između mikrodilucijske i makrodilucijske metode je volumen uzorka. Mikrodilucijska metoda se provodi u pločama s 96 bunara dok se za provedbu makrodilucijske metode koriste tubice volumena do 2 mL. Faktor razrjeđenja ovisi o rasponu ispitivanih koncentracija. Odabranim koncentracijama djelatne tvari se tretira poznata biomasa mikroorganizama. Rast kultura se očitava nakon 24-satne inkubacije te se najmanja vrijednost pri kojoj izostaje vidljiv rast naziva minimalna inhibitorna koncentracija, MIK (engl. MIC, *Minimal inhibitory concentration*) (CLSI 2012b). MBK,

odnosno minimalna baktericidna koncentracija (engl. MBC, *Minimal bactericidal concentration*) je najniža koncentracija antimikrobne tvari koja ubija određene bakterije (CLSI 1999).

Agar dilucija podrazumijeva pripremu odgovarajućih razrjeđenja ispitivane antimikrobne tvari koja se miješaju s agarom. Na tako pripremljeni agar se zatim inokulira ispitivani mikroorganizam, bakterije ili gljive. Ova metoda je poznata kao zlatni standard ako se ispituje osjetljivost na antimikrobne lijekove, no budući da zahtjeva značajnu educiranu radnu snagu, značajno je kompleksnija od ostalih dostupnih metoda (Varela i sur. 2008).

## 3. Materijali i metode

### 3.1. Kemikalije

- Agaroz, SeaKem® (Lonza, SAD)
- Dimetilsulfoksid (10%; DMSO; Sigma-Aldrich, SAD)
- Etanol (96%; Gram mol, Hrvatska)
- Etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA; Sigma-Aldrich, USA)
- Natrij hidroksid (NaOH; VWR Chemicals, Belgija)
- Natrij klorid (NaCl; VWR Chemicals, Belgija)
- 2-propanol (VWR Chemicals, Belgija)
- Resazurin natrijeva sol (Santa Cruz Biotechnology, SAD)

### 3.2. Laboratorijski uređaji

U nastavku su navedeni laboratorijski uređaji koji su korišteni u istraživanju:

- Brojač kolonija „Colony star“ (Funke Gerber, Njemačka)
- Centrifuga 5415R (Eppendorf AG, Njemačka)
- Densitometar „DEN-1 Densitometer“ (Biosan, Latvija)
- Inkubator „Sanyo incubator MIR-153“ (Sanyo Electronic CO. Ltd., Japan)
- Kadica za izradu gela (Thermo Scientific, SAD)
- Laboratorijska vaga, TE3102S (Santarius AG, Njemačka)
- Orbitalna treskalica/inkubator „Orbital shaker – Incubator ES-20“ (Biosan, Latvija)
- Sustav za horizontalnu elektroforezu „Owl A1“ (Thermo Scientific, SAD)
- Uređaj za PCR „ProFlex PCR System“ (Applied Biosystems, Life Technologies, SAD)
- Uređaj za spektrofotometrijsko mjerenje DNA koncentracije i čistoće „NanoPhotometer P300“ (Implen, Njemačka)
- Uređaj za vizualizaciju agaroznih gelova „UVIDOC HD6“ (Uvitec, Velika Britanija)
- Vodena kupelj WB7 (Memmert, Njemačka)
- Vorteks uređaj „Vorteks V-1-plus“ (Biosan, Latvija)

### 3.3. Molekularni reagensi, enzimi, markeri i početnice

- Boja za elektroforezu (6x LD; Thermo Scientific, SAD)
- Deoksinukleozid trifosfati, dNTP (10 mM; Thermo Scientific, SAD)
- Etidij bromid otopina (Promega, SAD)
- Lizozim (Sigma-Aldrich, SAD)
- Liofilizirana početnica GTG5 (Metabion, International AG, Njemačka)



- Molekularni biljeg, GeneRuler 1 kb (Thermo Scientific, SAD)
- Polimeraza, DreamTaq polymerase (5 U/ $\mu$ L; Thermo Scientific, SAD)
- Pufer za polimerazu, DreamTaq Buffer (10x + 20 mM MgCl<sub>2</sub>, Thermo Scientific, SAD)

### 3.4. Komplet za izolaciju genomske DNA

- Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification Kit (Promega, SAD)

### 3.5. Puferi, indikatorske otopine i hranjive podloge

#### 3.5.1. Fiziološka otopina

Za potrebe analiza je pripravljena fiziološka otopina (0,85%). Za pripremu je korišteno 8,5 g NaCl koji je otopljen u 1000 mL destilirane vode. Tako pripravljena otopina je zatim sterilizirana 15 minuta na temperaturi od 121 °C. Sterilna fiziološka otopina je korištena za pripremu biomase ispitivanih sojeva potrebne za određivanje minimalne inhibitorne (MIK) i minimalne baktericidne (MBK) koncentracije te za kontrolu biomase.

#### 3.5.2. Indikatorska otopina resazurina

Indikatorska otopina resazurina (0,02%) je pripravljena otapanjem 0,02 g resazurina natrijeve soli (Santa Cruz Biotechnology, SAD) u 100 mL sterilne destilirane vode. Otopina je zatim sterilno filtrirana kroz membranski filter promjera pora 0,22  $\mu$ m (VWR International, Belgija) te je korištena kao indikator bakterijskog rasta pri određivanju MIK vrijednosti.

#### 3.5.3. Tekuća BHI podloga (engl. *Brain Heart Infusion*)

Tekuća BHI podloga je pripravljena otapanjem 37 g komercijalno dostupne dehidrirane BHI podloge (Biolife, Italija) u 1000 mL destilirane vode. Tako pripravljena podloga je zatim sterilizirana u trajanju od 15 minuta na 121 °C. Ovako pripravljena podloga je korištena za uzgoj biomase izolata *Staphylococcus aureus* potrebne za izolaciju genomske DNA.

#### 3.5.4. Kruta BHI podloga (engl. *Brain Heart Infusion Agar*)

BHI agar je pripremljen kao što je opisano u poglavlju 3.5.3., s time da je dehidriranoj BHI podlozi (Biolife, Italija) dodano 15 g komercijalno dostupnog tehničkog agara (Biolife, Italija). Tako pripravljena podloga je sterilizirana u trajanju od 15 minuta

na 121 °C. Nakon što je podloga ohlađena na 45 do 50 °C, sterilno je izlivena u Petrijeve zdjelice i ostavljena da polimerizira na sobnoj temperaturi. Kruta BHI podloga je korištena za iscrpljivanje ispitivanih sojeva te za provjeru MIK i MBK vrijednosti subkultivacijom.

### 3.5.5. Kruta Mueller-Hinton podloga

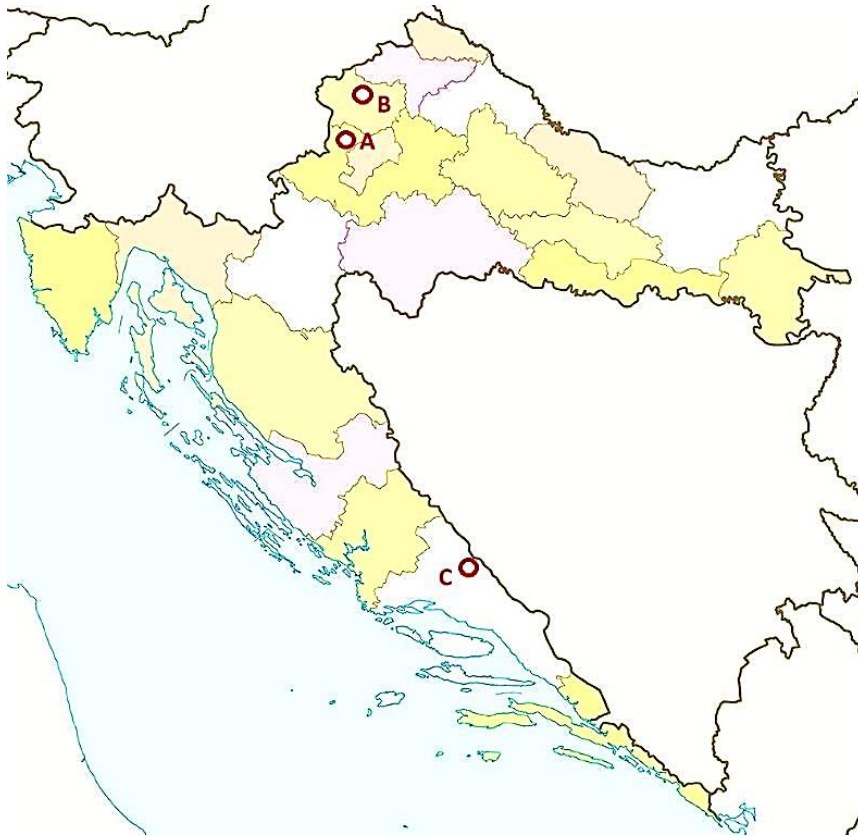
Kruta MH (Mueller Hinton Agar II, Biolife, Italija) podloga je pripravljena otapanjem 38 g komercijalno dostupne dehidrirane hranjive podloge u 1000 mL destilirane vode. Tako pripravljena otopina je zatim sterilizirana u trajanju od 15 minuta pri 121 °C i zatim ohlađena na 45 – 50 °C. Potom je po 20 mL podloge sterilno otpipetirano u Petrijeve zdjelice nakon čega je podloga ostavljena da polimerizira na sobnoj temperaturi. Podloga je korištena za probir, odnosno za ispitivanje antibakterijskog djelovanja matične mliječi metodom difuzije bunara u agaru.

### 3.5.6. Tekuća Mueller-Hinton podloga

Za pripremu tekuće MH podloge je korištena gotova, komercijalno dostupna dehidrirana hranjiva podloga (Mueller-Hinton broth, Biolife, Italija). Tekući MH je pripremljen otapanjem 22 g podloge u 1000 mL destilirane vode. Tako pripravljena podloga je zatim sterilizirana na 121 °C u trajanju od 15 minuta. Podloga je korištena za određivanje minimalne inhibitorne (MIK) i minimalne baktericidne (MBK) koncentracije matičnih mliječi mikrodilucijskom metodom.

## 3.6. Antimikrobne tvari

U ovom je radu istraženo antibakterijsko djelovanja pet uzoraka matične mliječi (MM1-MM5) sakupljenih na obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima na području Republike Hrvatske (RH) tijekom 2022. godine (slika 3.6.1).



Slika 3.6.1. Lokacije obiteljskih poljoprivrednih gospodarstava gdje su prikupljeni uzorci matičnih mliječi: (A) Konšćica, Zagrebačka županija (MM1 i MM2); (B) Petrovsko, Krapinsko-zagorska županija (MM3); (C) Obrovac Sinjski, Splitsko-dalmatinska županija (MM4 i MM5).

Za potrebe analiza je pripravljena radna otopina koncentracije 1 g/mL za svaku od analiziranih matičnih mliječi (n=5) otapanjem 6 g matične mliječi u 6 mL sterilne Mueller-Hinton tekuće podloge u plastičnim epruvetama s čepom. Plastične epruvete su omotane aluminijskom folijom zbog osjetljivosti matične mliječi na svjetlost. Otapanje matične mliječi je bilo potpomognuto miješanjem na vorteks miješalici (Vorteks V-1-plus, Biosan, Latvija).

### 3.7. Bakterijske kulture

U istraživanju su korišteni višestruko rezistentni bakterijski sojevi *Enterococcus faecium* i *Staphylococcus aureus* (n=10) koji su prikupljeni iz otpadnih voda na području RH. Ispitivani su sojevi ustupljeni od strane Instituta „Ruđer Bošković“ i Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“. U tablici 3.7.1. su navedeni sojevi korišteni u ovom istraživanju.

Tablica 3.7.1. Sojevi *E. faecium* i *S. aureus* korišteni u istraživanju.

Sojevi	Vrste
SE_SC_COL_40 <sup>a</sup>	<i>E. faecium</i>
SE_SC_COL_73 <sup>a</sup>	<i>E. faecium</i>
SE_SC_COL_119 <sup>a</sup>	<i>E. faecium</i>
193/0 <sup>b</sup>	<i>E. faecium</i>
560/2 <sup>b</sup>	<i>E. faecium</i>
SA_6 <sup>b</sup>	<i>S. aureus</i>
SA_7 <sup>b</sup>	<i>S. aureus</i>
SA_8 <sup>b</sup>	<i>S. aureus</i>
SA_9 <sup>b</sup>	<i>S. aureus</i>
SA_14 <sup>b</sup>	<i>S. aureus</i>

<sup>a</sup>sojevi ustupljeni od strane Instituta „Ruđer Bošković“.

<sup>b</sup>sojevi ustupljeni od strane Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“.

Sojevi *E. faecium* su detaljno molekularno okarakterizirani i genotipizirani u prijašnjim istraživanjima (Andrašević 2021), a izolati *S. aureus* su genotipizirani u ovom istraživanju (poglavlje 3.8).

### 3.8. Odabir reprezentativnih izolata

Kako bi se smanjio broj izolata, izolati *S. aureus* (n=15) su genotipizirani i grupirani na temelju rep-PCR metode te su odabrani reprezentativni sojevi za daljnje analize.

#### 3.8.1. Izolacija genomske DNA *S. aureus*

Genomska DNA iz izolata *S. aureus* je izolirana pomoću komercijalno dostupnog kompleta Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, SAD) prema uputama proizvođača.

Izolati *S. aureus* su prvo iscrpljeni do monokultura na krutim BHI podlogama i inkubirani na 37 °C preko noći. Za svaki izolat, pojedinačna je kolonija sterilno inokulirana u 1,5 mL tekuće BHI podloge i inkubirana na 37 °C preko noći. Nakon inkubacije, bakterijske stanice su odvojene od hranjivog medija centrifugiranjem (centrifuga 5415R, Eppendorf AG, Njemačka) pri 16 000 xg/3 min. Stanični pelet je resuspendiran pipetiranjem u 480 µL EDTA (50 mM). Suspenziji je dodano 120 µL otopine lizozima (1 mg/mL, Sigma-Aldrich, SAD) i uzorci su inkubirani na 27 °C/60 min. U ovom koraku dolazi do lize bakterijske stanične stijenke. Nakon inkubacije, uzorci su centrifugirani pri 16 000 xg/2 min i uklonjen je supernatant.

Zaostali pelet je u potpunosti resuspendiran laganim pipetiranjem u 600 µL pufera za lizu (engl. *Nuclei Lysis Solution*) i inkubiran u vodenoj kupelji WB7 (Memmert, Njemačka) na 80 °C/5 min, čime se postiže potpuna liza bakterijskih stanica.

Nakon što su uzorci ohlađeni na sobnu temperaturu, dodano im je 3  $\mu\text{L}$  otopine RNaze (engl. *RNase Solution*) te su pažljivo promiješani preokretanjem mikrotubica dva do pet puta i inkubirani na 37 °C/45 min. Pomoću RNaze, u uzorcima je razgrađena RNA.

Uzorci su zatim ohlađeni do sobne temperature, nakon čega im je dodano 200  $\mu\text{L}$  otopine za precipitaciju proteina (engl. *Protein Precipitation Solution*). Taloženje proteina pod djelovanjem otopine za precipitaciju proteina je bilo potpomognuto kratkim vorteksiranjem i inkubacijom na ledu kroz 5 min. Istaloženi stanični proteini su odvojeni centrifugiranjem pri 16 000  $\times g$ /3 min.

Supernatant s DNA je prebačen u čistu mikrotubicu sa 600  $\mu\text{L}$  2-propanola (VWR Chemicals, Belgija) sobne temperature. Uzorci su promiješani preokretanjem mikrotubica do stvaranja vidljivih niti DNA. 2-propanol je uklonjen centrifugiranjem na 16000  $\times g$ /2 min, a preostali talog je ispran sa 600  $\mu\text{L}$  etanola (70%; Gram mol, Hrvatska) sobne temperature. Etanol je uklonjen centrifugiranjem na 16000  $\times g$ /2 min i izlijevanjem iz mikrotubica, a zaostali etanol je uklonjen sušenjem na zraku kroz 10 - 15 min. Ispiranjem u alkoholima odvajaju se zaostale nečistoće od DNA.

Dobivena genomska DNA je rehidrirana u puferu za rehidrataciju (engl. *DNA Rehydration Solution*) na sobnoj temperaturi preko noći.

Koncentracija i čistoća genomske DNA su određene spektrofotometrijski pomoću uređaja NanoPhotometer P300 (Implen, Njemačka). Sva genomska DNA *S. aureus* je razrijeđena na koncentraciju od 20 ng/ $\mu\text{L}$  u puferu za rehidrataciju (10 mM Tris-HCl, pH 7,4/1 mM EDTA, pH 8,0; Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega, USA) i korištena je za genotipizaciju pomoću rep-PCR metode.

### 3.8.2. Genotipizacija izolata *S. aureus* rep-PCR metodom

Izolati *S. aureus* (n=15) su genotipizirani pomoću rep-PCR metode (Domig i sur. 2014) i početnice GTG5 (5' GTG GTG GTG GTG GTG 3') (Švec i sur. 2005).

Prvo je pripremljena reakcijska smjesa za rep-PCR ukupnog volumena 25  $\mu\text{L}$  koja je sadržavala: 2,5  $\mu\text{L}$  10x *DreamTaq* pufera s 20 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1,0  $\mu\text{L}$  10 mM dNTP, 0,5  $\mu\text{L}$  100 pmol/ $\mu\text{L}$  početnice GTG5, 19,6  $\mu\text{L}$  vode, 0,4  $\mu\text{L}$  *DreamTaq* polimeraze i 20 ng genomske DNA.

Amplifikacija je provedena u PCR uređaju ProFlex PCR System (Applied Biosystems, Life Technologies, SAD). Uvjeti pod kojima se odvijala amplifikacija su prikazani u tablici 3.8.2.1.

Tablica 3.8.2.1. Uvjeti amplifikacije.

PCR korak	Temperatura/vrijeme	Broj ciklusa
Početna denaturacija	95 °C/7 min	1
Denaturacija	90 °C/30 s	30
Sparivanje početnica	40 °C/1 min	
Produljivanje lanaca	65 °C/8 min	
Završno produljivanje lanaca	65 °C/16 min	1

Nakon amplifikacije, 5 µL rep-PCR produkata je pomiješano s 2 µL 6x LD boje. Uzorci su uneseni u agarozni gel (2%), zajedno s 5 µL molekularnog biljega *GeneRuler* 1 kb (Thermo Scientific, SAD) i razdvojeni su horizontalnom gel elektroforezom (Owl A1, Thermo Scientific, SAD) na 90 V kroz 110 min. Gel je zatim bojan 30 min u otopini etidij bromida (0,2%) te vizualiziran i fotografiran pomoću uređaja UVIDOC HD6 (Uvitec, Velika Britanija).

Rep-PCR profili su analizirani pomoću programa BioNumerics verzija 7.6.1 (Applied Maths, Belgija). Sličnost između izolata *S. aureus* je izračunata na temelju Dice koeficijenta, a grupirani su pomoću UPGMA (engl. *Unweighted Pair Group Arithmetic Average*) algoritma. Pri konstrukciji dendrograma je korištena razina tolerancije od 1% i optimizacija od 0,5%.

Na temelju grupiranja su odabrani reprezentativni sojevi koji su zatim korišteni za ispitivanje njihove osjetljivosti na matičnu mliječ.

### 3.9. Probir antimikrobnog djelovanja matičnih mliječi

Probir, odnosno ispitivanje djeluju li matične mliječi (n=5; MM1 - MM5) inhibitorno na višestruko rezistentne sojeve *E. faecium* i *S. aureus*, je bio prvi korak u istraživanju antibakterijskog djelovanja matične mliječi.

Korištena je metoda difuzije bunara u agaru, odnosno modificirana Kirby-Bauerova disk difuzijska metoda (Baueri sur. 1959). Ova analiza se sastojala od nekoliko koraka: uzgoj prekonocnih kultura, priprema odgovarajuće biomase, inokulacija sojeva na krute MH podloge, bušenje bunara i aplikacija matične mliječi u probušene bunare.

Sojevi su prvo iscrpljeni do monokulture na prethodno pripremljenim krutim BHI podlogama te inkubirani na 37 °C preko noći. Od tako pripremljenih kultura, za svaki ispitivani soj je pripremljena bakterijska suspenzija dodavanjem kolonije po kolonije u 5 mL sterilne fiziološke otopine (0,85%) do postizanja turbiditeta koji odgovara turbiditetu 0,5 McFarland standarda, odnosno, sadrži otprilike  $1,5 \times 10^8$  stanica/mL. Za mjerenje turbiditeta je korišten denzitometar DEN-1 (Biosan, Latvija).

Tako pripremljena suspenzija svakog soja je zatim sterilnim štapićima inokulirana na krute MH podloge tri puta. Između svake inokulacije, ploča je zarotirana za 60 °. Zatim su širim krajem sterilnog nastavka za mikropipete volumena 1 mL, promjera 9 mm, izbušeni bunari u podlozi. Za svaki soj su korištene tri MH podloge budući da je svaka matična mliječ ispitana u duplikatima te je također korištena i negativna kontrola. Kao negativna kontrola je korišten dimetilsulfoksid (DMSO), budući da ne utječe na

bakterijski rast u koncentracijama < 1%. U bunare je dodano po 0,2 mL otopina matičnih mliječi (1 g/mL; poglavlje 3.6) i kontrole (0,5% DMSO).

Ovako pripremljene ploče su inkubirane pri 37 °C tijekom 24 sata. Nakon inkubacije, izmjerena je zona inhibicije rasta u koju je uključen i promjer bunara. Zone inhibicije rasta su prikazane kao srednje vrijednosti s pripadajućim standardnim devijacijama u milimetrima (mm).

### **3.10. Određivanje minimalnih inhibitornih (MIK) i minimalnih baktericidnih (MBK) koncentracija matičnih mliječi**

#### **3.10.1. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije**

Minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) su određene metodom serijske mikrodilucije uz dodatak resazurina (engl. *resazurin microplate assay*, REMA; CLSI 2012b; Coban 2012). Metoda serijske mikrodilucije se temelji na serijskom razrjeđenju analizirane antimikrobne tvari u tekućoj hranjivoj podlozi, u ovom slučaju razrjeđenju matičnih mliječi u tekućoj MH podlozi. Sama analiza se sastojala od nekoliko koraka: uzgoj prekonoćnih kultura i priprema biomase ispitivanih sojeva, serijsko razrjeđenje matičnih mliječi u mikrotitarskoj ploči, inokulacija sojeva i dodatak resazurina.

Prekonoćne kulture i biomase ispitivanih sojeva su pripremljene kao što je opisano u poglavlju 3.9. Ovako pripremljena biomasa (oko  $1,5 \times 10^8$  CFU/mL) je zatim razrijeđena u omjeru 1:10 u sterilnoj fiziološkoj otopini do postizanja koncentracije od  $1,5 \times 10^6$  CFU/mL.

Matična mliječ je serijski razrijeđena u tekućoj MH podlozi u omjeru 1:2 u mikrotitarskoj ploči s 96 bunara. Prvo je u sve bunare u redovima A do H dodano 140  $\mu$ L tekuće MH podloge. U bunare u redu A je dodano 140  $\mu$ L matične mliječi (1 g/mL) čime je dobivena koncentracija od 500 mg/mL. Zatim je 140  $\mu$ L iz bunara u redu A prebačeno multikanalnom pipetom u bunare u redu B. Postupak je ponovljen do bunara u redu G. Iz bunara u redu G je uklonjeno suvišnih 140  $\mu$ L, pa je konačan volumen u svim bunarima iznosio 140  $\mu$ L. Na ovaj je način pripremljen raspon koncentracija matične mliječi 7,81 – 500 mg/mL. Bunari u redu H su sadržavali samo 140  $\mu$ L tekuće MH podloge i korišteni su za kontrolu bakterijskog rasta (slika 3.10.1.1).

C (MM) [mg/mL]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A 500,00												
B 250,00												
C 125,00												
D 62,50												
E 31,25												
F 15,63												
G 7,81												
H kontrola												

Slika 3.10.1.1. Shematski prikaz mikrotitarske ploče.

U svaki bunar je zatim dodano po 10  $\mu\text{L}$  pripremljenih bakterijskih suspenzija koncentracije  $1,5 \times 10^6$  CFU/mL i 15  $\mu\text{L}$  indikatora resazurina (0,02% otopina). Konačna bakterijska koncentracija u mikrotitarskoj ploči je iznosila  $1,5 \times 10^5$  CFU/mL. Ovako pripremljene ploče su zatim inkubirane na 37 °C u trajanju od 24 sata uz kontinuirano miješanje pri 90 okretaja/min (Orbital shaker-Incubator ES-20, Biosan, Latvija).

Nakon inkubacije, rast je prvo detektiran vizualno. S obzirom na to da žive stanice reduciraju plavo obojeni resazurin u ružičasto obojeni resorufin, promjena boje indikatora iz plave u ružičastu je indicacija bakterijskog rasta. Stoga, najniža koncentracija kod koje nije zabilježena promjena boje se smatra minimalnom inhibitornom koncentracijom.

### 3.10.2. Provjera biomase

Provjera biomase je nužan korak kako bi se nakon određivanja MIK vrijednosti serijskom mikrodilucijskom metodom, MIK i MBK vrijednosti mogle dodatno validirati.

Biomasa korištena za određivanje MIK vrijednosti (poglavlje 3.10.1) je kvantificirana metodom serijskog razrjeđenja u mikrotitarskoj ploči. Svi bunari u redovima od B do H u novoj, sterilnoj mikrotitarskoj ploči, su ispunjeni sa 180  $\mu\text{L}$  sterilne fiziološke otopine. U red A je otpipetirano po 180  $\mu\text{L}$  odgovarajuće bakterijske suspenzije ( $1,5 \times 10^6$  CFU/mL). Nakon toga, bakterijske suspenzije su razrijeđene u omjeru 1:10. Po 20  $\mu\text{L}$  iz bunara u redu A je prebačeno u bunare u redu B. Postupak je ponavljan do reda H.

Zatim je multikanalnom pipetom inokulirano po 5  $\mu\text{L}$  sadržaja bunara iz svakog stupca u četiri ponavljanja na krute BHI hranjive podloge. Tako pripremljene podloge su zatim inkubirane na 37 °C u trajanju od 24 sata. Nakon inkubacije su prebrojene izrasle kolonije te je izračunat broj bakterija prema formuli:

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

Broj bakterija je izražen kao jedinice koje formiraju kolonije/mL (CFU/mL).



### 3.10.3. Provjera minimalne inhibitorne (MIK) i određivanje minimalne baktericidne (MBK) koncentracije subkultivacijom

Nakon vizualnog očitavanja rezultata metode serijske mikrodilucije, iz originalne mikrotitarske ploče je na krute BHI podloge precijepljeno po 5  $\mu$ L iz svih bunara u četiri ponavljanja. Nakon upijanja sadržaja bunara u podlogu, podloge su inkubirane na 37 °C tijekom 24 sata. Nakon inkubacije, prebrojene su izrasle kolonije te je izračunat broj preživjelih bakterijskih stanica prema formuli navedenoj u poglavlju 3.10.2 i izražen je kao CFU/mL. Postotak umrlih bakterijskih stanica je zatim izračunat prema formuli:

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

gdje je:

CFU1 – broj bakterija korišten za određivanje MIK vrijednosti matične mliječi

CFU2 – broj preživjelih bakterija nakon tretmana matičnom mliječi

Koncentracija kod koje je postotak umrlih bakterija > 99,5%, smatra se minimalnom inhibitornom koncentracijom (MIK), a koncentracija kod koje je postotak umrlih bakterija > 99,9% minimalnom baktericidnom koncentracijom (MBK).

### 3.11. Statistička obrada podataka

Svi rezultati ovog istraživanja su prikazani kao srednje vrijednosti s pripadajućim standardnim devijacijama te su statistički značajne razlike određene jednosmjernom analizom varijance ANOVA (engl. *one-way ANOVA*), a srednje vrijednosti višestruko uspoređene *post-hoc* Bonferroni testom. Statistički značajnima se smatraju one razlike kod kojih je  $p < 0,05$ . Sve statističke analize rezultata su provedene u računalnom programu Microsoft Excel 2016 pomoću dodatka Analiza podataka (engl. *Analysis ToolPak*).

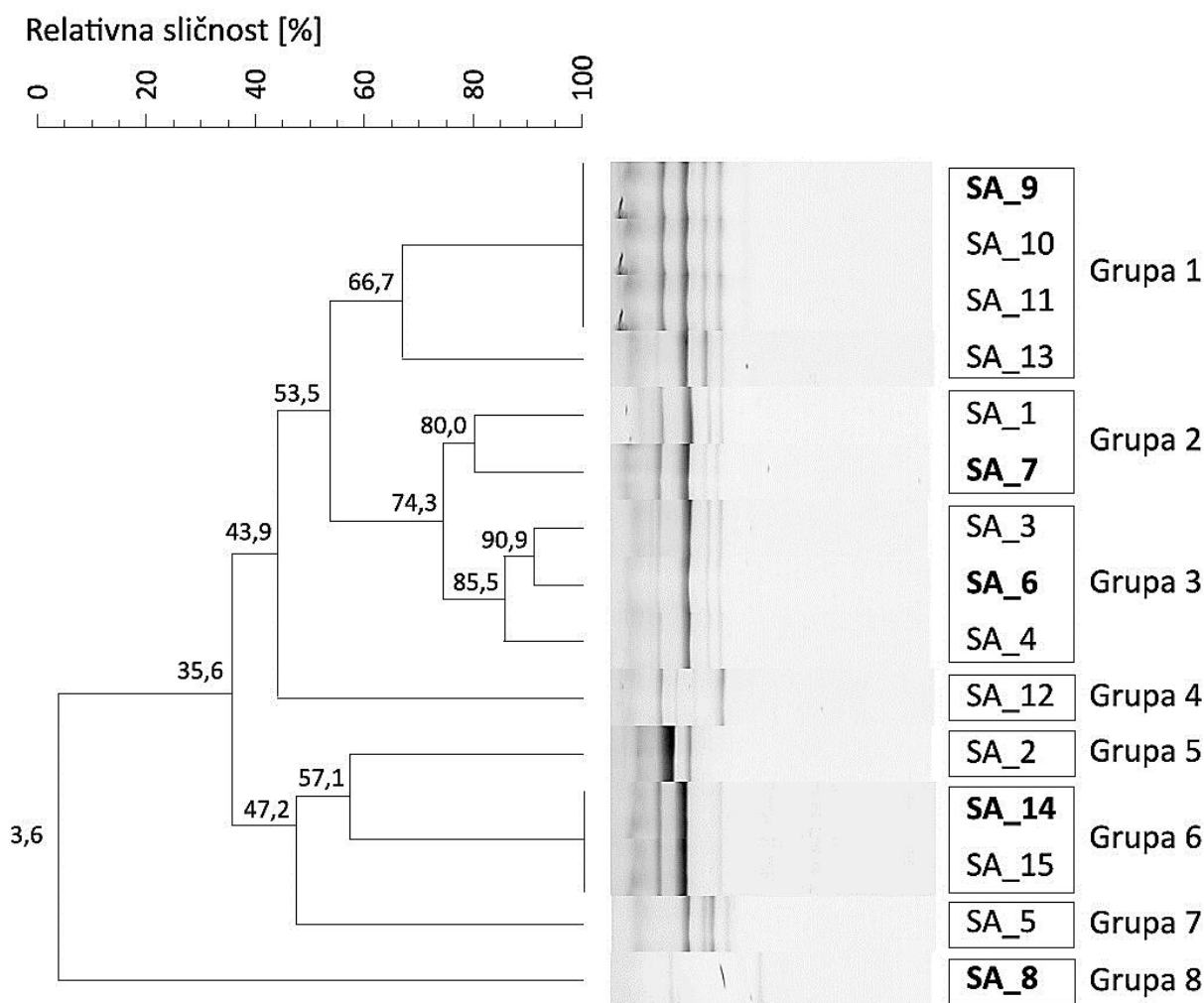
## 4. Rezultati

### 4.1. Reprezentativni sojevi *S. aureus*

U ovom istraživanju, izolati *S. aureus* su genotipizirani rep-PCR metodom uz pomoć početnice GTG5.

Na temelju dobivenih rep-PCR obrazaca, izolati su grupirani u osam grupa. Detektirane su samo četiri velike grupe, grupa 3 s tri soja (85,5% sličnosti), grupa 1 s četiri soja (100% sličnosti) i dvije grupe s dva soja (grupa 2 – 80% sličnosti; grupa 6 – 100% sličnosti). U ostale grupe (grupe 4, 5, 7 i 8) je svrstan samo jedan soj.

Općenito sličnost sojeva varira od 3,6 do 100%, što ukazuje na izrazito veliku varijabilnost sojeva unutar vrste *S. aureus*. (slika 4.1.1).

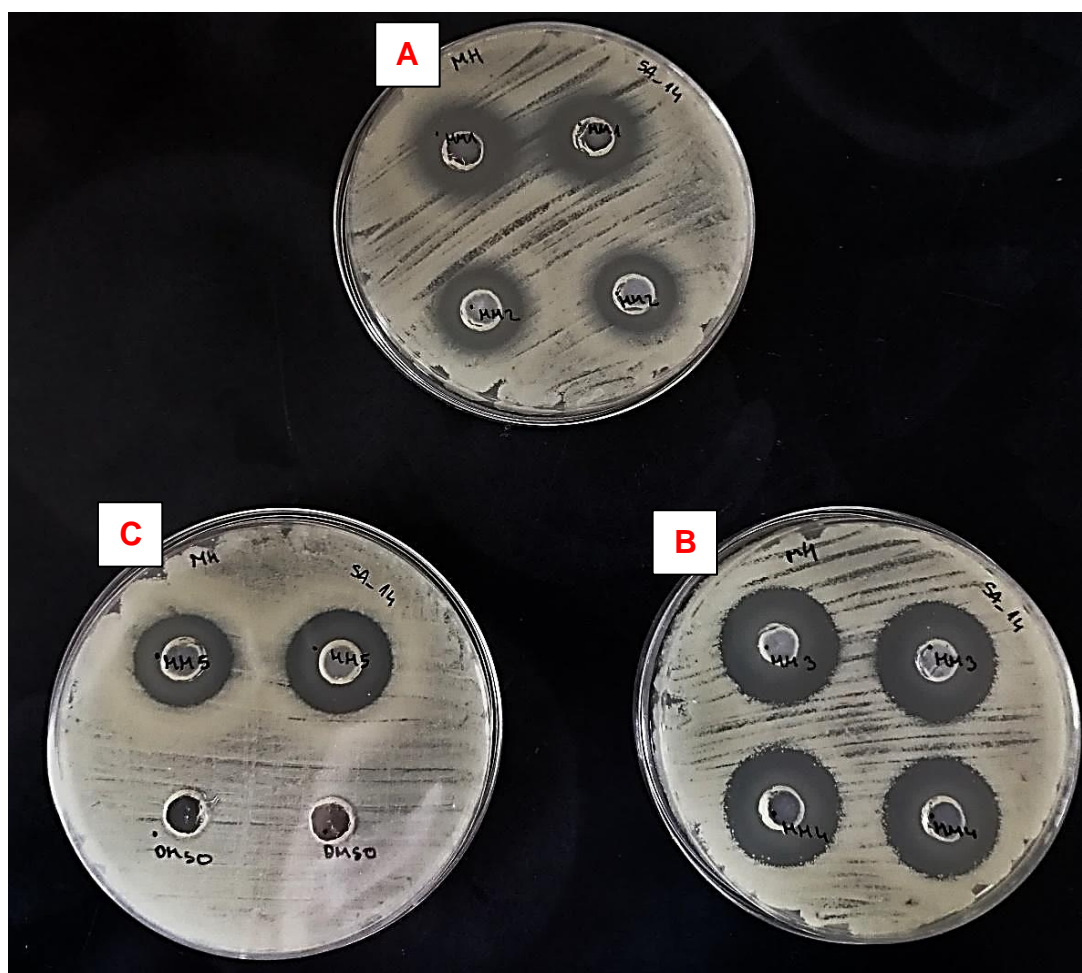


Slika 4.1.1. Dendrogram sojeva *S. aureus* grupiranih na temelju rep-PCR obrazaca dobivenih amplifikacijom s početnicom GTG5. Reprezentativni sojevi odabrani za daljnje analize su deblje otisnuti.

Za daljnje analize je odabrano pet sojeva *S. aureus*, po jedan soj za svaku veliku grupu (s dva i više soja) i jedan soj iz male grupe koji je pokazao najmanju sličnost u usporedbi s ostalim sojevima.

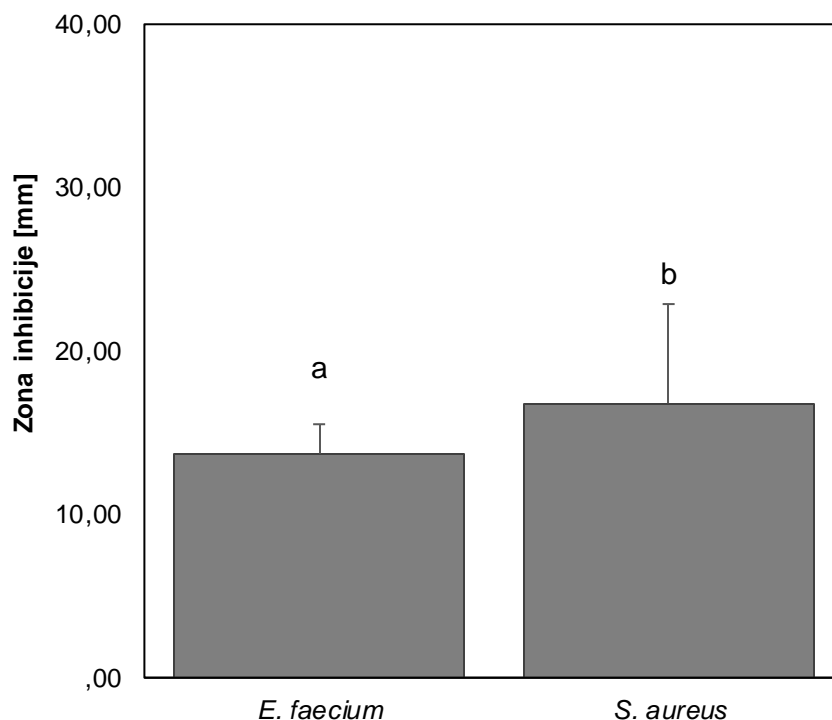
## 4.2. Antibakterijsko djelovanje ispitivanih matičnih mliječi

Po završetku inkubacije ploča, očitani su rezultati probira mjerenjem zona inhibicije rasta za svaku analiziranu matičnu mliječ na svaki ispitivani soj *E. faecium* i *S. aureus*. Što je zona inhibicije veća, matična mliječ pokazuje jače antibakterijsko djelovanje (slika 4.2.1). U tablici 4.2.1. su prikazani rezultati probira.



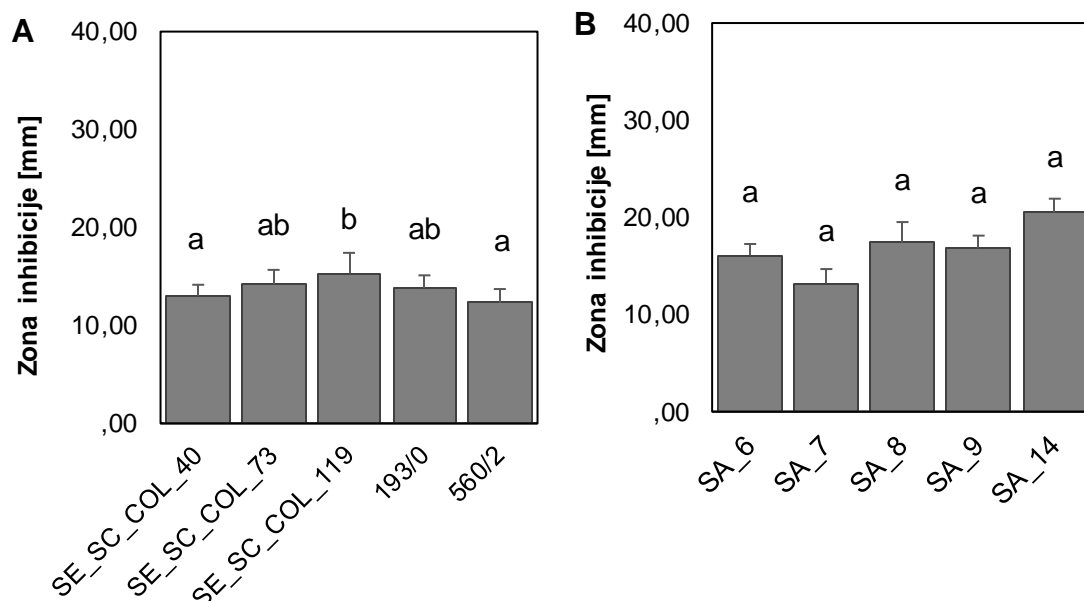
Slika 4.2.1. Antibakterijsko djelovanje ispitivanih matičnih mliječi na soj SA\_14 (*S. aureus*). A) MM1 i MM2; B) MM3 i MM4; C) MM5 i negativna kontrola (DMSO).

Vrsta *S. aureus* ( $16,8 \text{ mm} \pm 6,1 \text{ mm}$ ) je značajno osjetljivija na djelovanje matične mliječi od vrsta *E. faecium* ( $13,7 \text{ mm} \pm 1,8 \text{ mm}$ ; ANOVA, Bonferroni test,  $p < 0,001$ ) (graf 4.2.1).



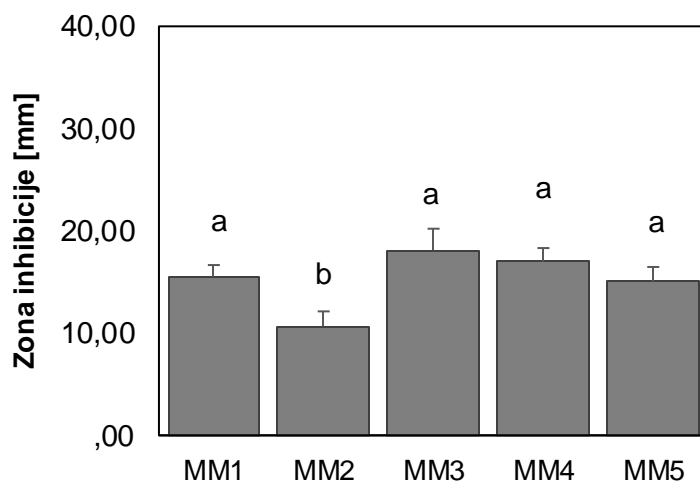
Graf 4.2.1. Osjetljivost vrsta *E. faecium* i *S. aureus* na matičnu mliječ. Prikazane su srednje vrijednosti zona inhibicije rasta s pripadajućim standardnim devijacijama. <sup>ab</sup>označavaju statistički značajne razlike.

Na razini soja, sojevi *S. aureus* (SA\_6 i SA\_7) su u potpunosti otporni na djelovanje matične mliječi MM2 (tablica 4.2.1). Među sojevima *E. faecium*, sojevi SE\_SC\_COL\_40 (13,0 mm ± 1,2 mm) i 560/2 (12,3 mm ± 1,4 mm) su se pokazali kao najotporniji, a soj SE\_SC\_COL\_119 (15,3 mm ± 2,1 mm) kao najosjetljiviji na djelovanje matične mliječi (graf 4.2.2.A). Iako su sojevi *S. aureus* pokazali sličnu osjetljivost na matične mliječi, soj SA\_7 (13,2 mm ± 7,0 mm) se pokazao kao najotporniji, a soj SA\_14 (20,5 mm ± 3,2 mm) kao najosjetljiviji. Međutim, detektirane razlike nisu bile značajne (graf 4.2.2.B).



Graf 4.2.2. Osjetljivost sojeva vrsta A) *E. faecium* i B) *S. aureus* na matičnu mliječ. Prikazane su srednje vrijednosti zona inhibicije rasta s pripadajućim standardnim devijacijama.

Najslabije antibakterijsko djelovanje na ispitane sojeve *E. faecium* i *S. aureus* pokazuje matična mliječ MM2 (10,7 mm ± 5,7 mm; ANOVA,  $p < 0,001$ ), dok matične mliječi MM3 (18,1 mm ± 4,3 mm) i MM4 (17,0 mm ± 4,4 mm) pokazuju najsnažnije antibakterijsko djelovanje (graf 4.2.3).



Graf 4.2.3. Antibakterijska aktivnost matičnih mliječi (MM1 – MM5). Prikazane su srednje vrijednosti zona inhibicije rasta s pripadajućim standardnim devijacijama. Slovom a-b su označene statistički značajne razlike (ANOVA, Bonferroni test,  $p < 0,05$ ).

Antibakterijsko djelovanje matičnih mliječi na sojeve *E. faecium* pokazuje nešto drugačiji trend, tj. MM2 najslabije inhibira, a MM1 i MM3 najjače inhibiraju rast sojeva *E. faecium*, dok djelovanje matičnih mliječi na sojeve *S. aureus* slijedi isti općeniti trend (tablica 4.2.1).

Tablica 4.2.1. Antibakterijsko djelovanje matičnih mliječi (MM1-MM5) na ispitane sojeve *E. faecium* i *S. aureus*. Antibakterijsko djelovanje se očituje kao zona inhibicije rasta. Zone inhibicije rasta su prikazane kao srednje vrijednosti s pripadajućim standardnim devijacijama.

Soj	Vrsta	MM1 [mm]	MM2 [mm]	MM3 [mm]	MM4 [mm]	MM5 [mm]
SE_SC_COL_40	<i>E. faecium</i>	14,00 ± 0,00	11,50 ± 0,71	14,00 ± 0,00	13,50 ± 0,71	12,00 ± 0,00
SE_SC_COL_73	<i>E. faecium</i>	15,00 ± 0,00	11,50 ± 0,71	14,50 ± 0,71	15,00 ± 0,00	15,00 ± 0,00
SE_SC_COL_119	<i>E. faecium</i>	16,50 ± 0,71	14,50 ± 0,71	18,50 ± 0,71	13,50 ± 0,71	13,50 ± 0,71
193/0	<i>E. faecium</i>	14,00 ± 0,00	11,50 ± 0,71	15,00 ± 0,00	14,50 ± 0,71	14,00 ± 0,00
560/2	<i>E. faecium</i>	12,00 ± 0,00	10,00 ± 0,00	13,00 ± 0,00	13,50 ± 0,71	13,00 ± 1,41
$\bar{x} \pm sd$ (MM)		14,30 ± 1,57 <sup>a</sup>	11,80 ± 1,62 <sup>b</sup>	15,00 ± 2,00 <sup>a</sup>	14,00 ± 0,82 <sup>a</sup>	13,50 ± 1,18 <sup>ab</sup>
SA_6	<i>S. aureus</i>	15,50 ± 0,71	0,00 ± 0,00	26,00 ± 0,00	26,00 ± 0,00	13,00 ± 1,41
SA_7	<i>S. aureus</i>	16,50 ± 0,71	0,00 ± 0,00	17,00 ± 1,41	15,50 ± 0,71	17,00 ± 0,00
SA_8	<i>S. aureus</i>	16,00 ± 0,00	15,00 ± 0,00	18,50 ± 0,71	20,00 ± 1,41	17,50 ± 0,71
SA_9	<i>S. aureus</i>	16,00 ± 1,41	16,50 ± 0,71	20,00 ± 1,41	15,50 ± 0,71	16,00 ± 0,00
SA_14	<i>S. aureus</i>	19,50 ± 0,71	16,00 ± 0,00	24,50 ± 0,71	23,00 ± 0,00	19,50 ± 0,71
$\bar{x} \pm sd$ (MM)		16,70 ± 1,64 <sup>a</sup>	9,50 ± 8,20 <sup>b</sup>	21,20 ± 3,74 <sup>a</sup>	20,00 ± 4,40 <sup>a</sup>	16,60 ± 2,32 <sup>a</sup>

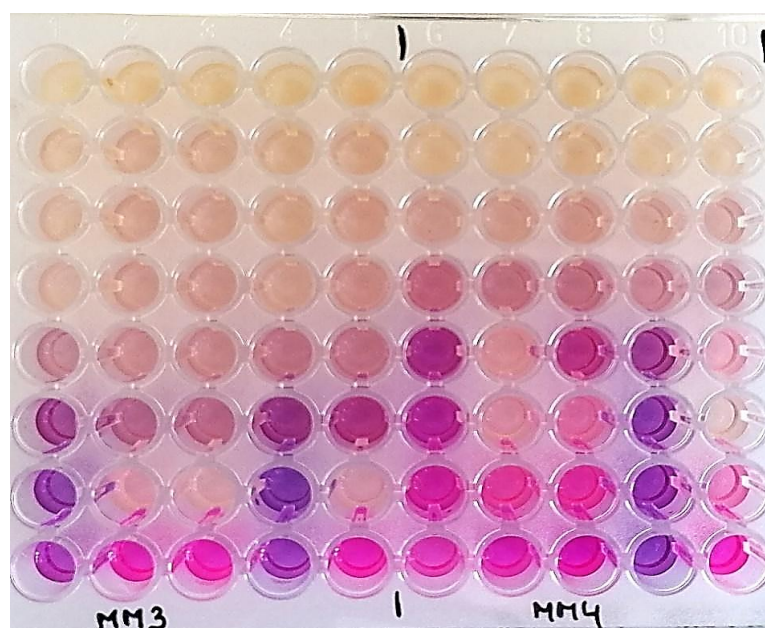
$\bar{x} \pm sd$  (MM) - srednja vrijednost zone inhibicije rasta izračunata na temelju izostanka rasta svih sojeva iste vrste uzrokovanog antibakterijskim djelovanjem jedne matične mliječi s pripadajućom standardnom devijacijom.

<sup>a-b</sup>srednje vrijednosti zone inhibicije rasta unutar istog reda označene s različitim slovima predstavljaju statistički značajne razlike (ANOVA, Bonferroni test,  $p < 0,05$ ).

Svih pet matičnih mliječi pokazuju antibakterijsko djelovanje na ispitivane sojeve, s izuzetkom MM2 na sojeve *S. aureus* (SA\_6 i SA\_7). Stoga, MIK i MBK nisu analizirane za navedene izuzetke.

### 4.3. Ispitivanje minimalne inhibitorne i baktericidne koncentracije

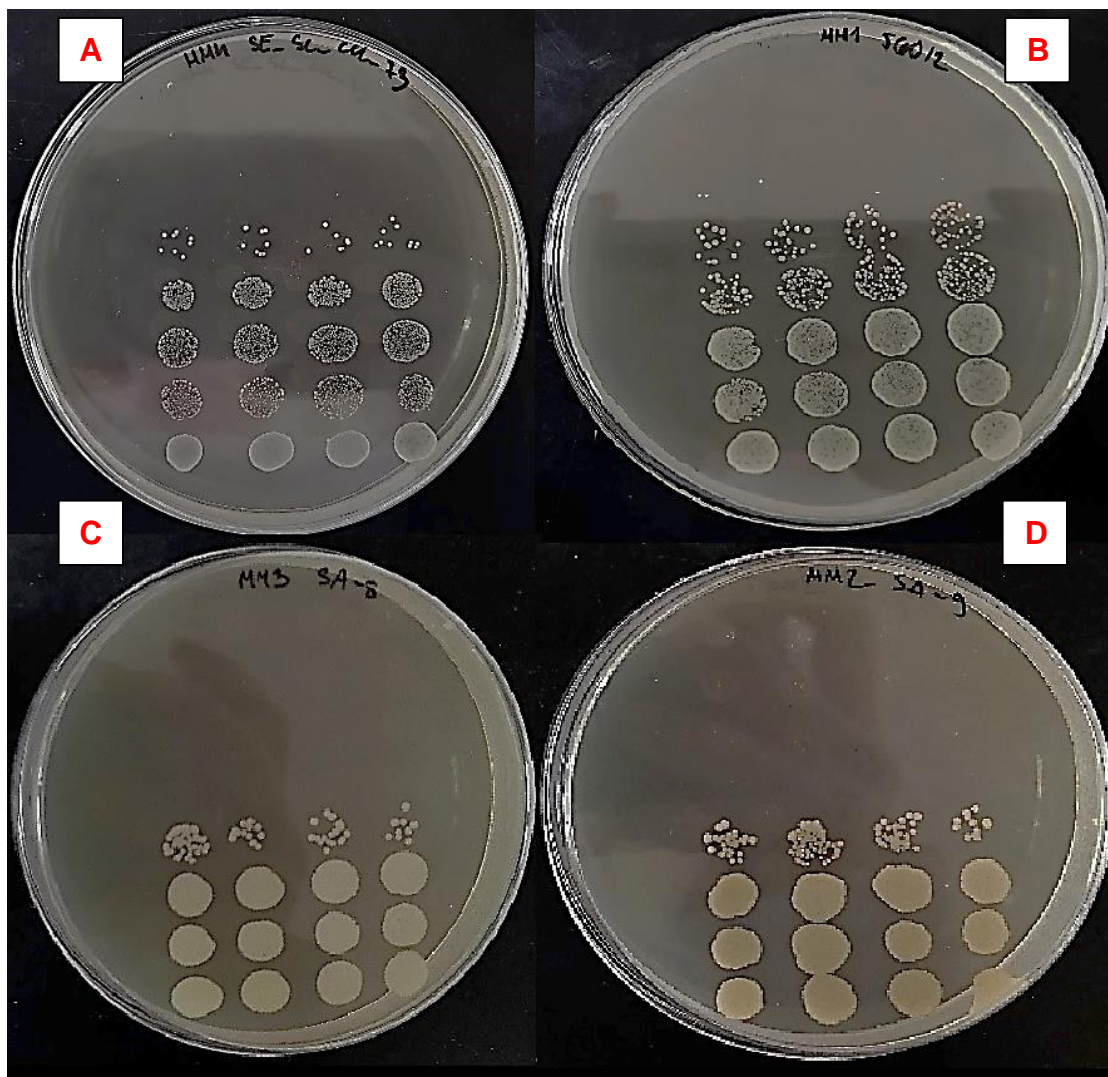
MIK vrijednosti su vizualno očitane nakon inkubacije, no nije bilo moguće vizualno sa sigurnošću odrediti MIK zbog reakcije resazurina s matičnom mliječi, tj. u pojedinim slučajevima nije bila jasno vidljiva promjena plave boje u ružičastu (slika 4.3.1.).



Slika 4.3.1. Prikaz inkubirane mikrotitarske ploče za određivanje MIK vrijednosti mikrodilucijskom metodom uz dodatak resazurina na primjeru matičnih mliječi MM3 i MM4 na sojeve *E. faecium*. Stupci 1-5 - MM3; stupci 6-10 - MM4. Koncentracije matičnih mliječi smanjuju su iz reda u red dva puta. Koncentracija matične mliječi u jažicama u redu A iznosi 500 mg/mL, a u jažicama u redu G 7,81 mg/mL. Jažicama u redu H nije dodana matična mliječ i služile su za kontrolu bakterijskog raste. U svaki stupac je inokuliran jedan soj, stupci 1 i 6 – soj SE\_SC\_COL\_40; stupci 2 i 7 – soj SE\_SC\_COL\_73; stupci 3 i 8 – soj SE\_SC\_COL\_119; stupci 4 i 9 – soj 193/0; stupci 5 i 10 – soj 560/2.

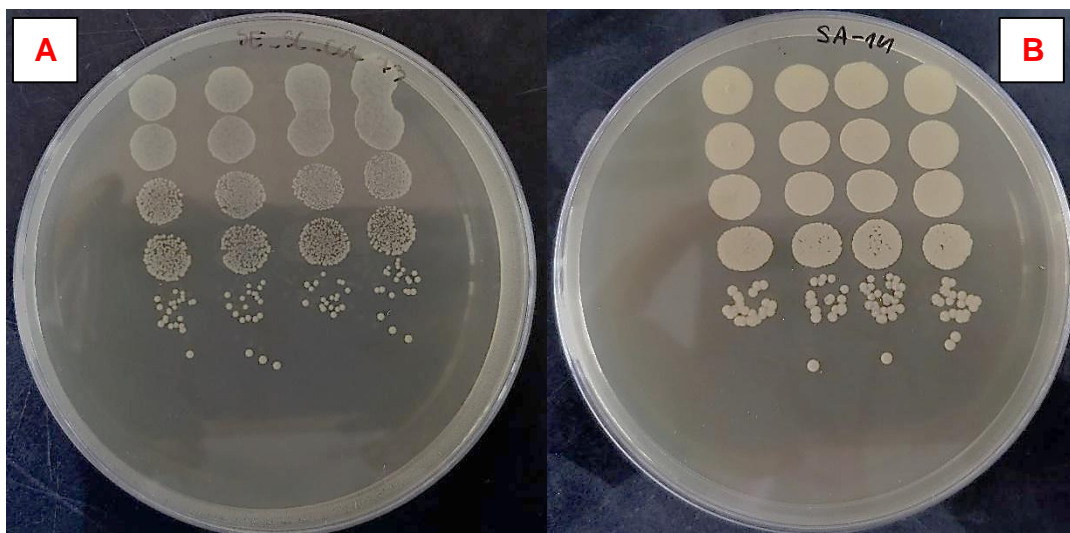
Stoga, MIK su dodatno provjerene izravnom subkultivacijom na krutim BHI podlogama. Nakon 24-satne inkubacije je prebrojan broj izraslih kolonija (slika 4.3.2. A-D) te je izračunat CFU/mL za svaki analizirani soj prema formuli navedenoj u poglavlju 3.10.2).





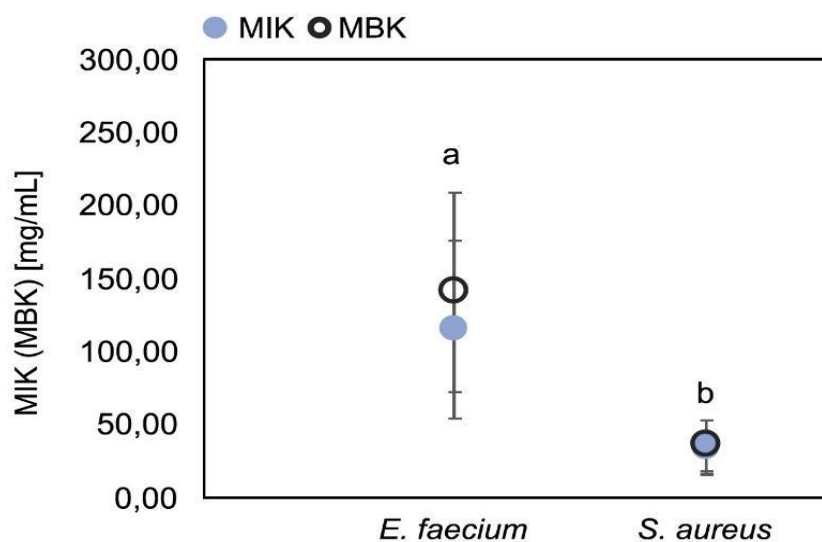
Slika 4.3.2. Provjera MIK subkultivacijom na krutim BHI podlogama na primjeru različitih matičnih mliječi : A) Utjecaj MM4 na soj *E. faecium* SE\_SC\_COL\_73; B) Utjecaj MM1 na soj *E. faecium* 560/2; C) Utjecaj MM3 na izolat *S. aureus* SA\_8; D) Utjecaj MM2 na izolat *S. aureus* SA\_9.

Kako bi se odredile MIK i MBK vrijednosti, na temelju broja bakterijskih stanica koje su preživjele tretman matičnom mliječi i biomase korištene za određivanje MIK-a (slika 4.3.3), izračunat je postotak umrlih stanica (poglavlje 3.10.3).



Slika 4.3.3. Kontrola biomase za: a) soj *E. faecium* SE\_SC\_COL\_73; B) soj *S. aureus* SA\_14.

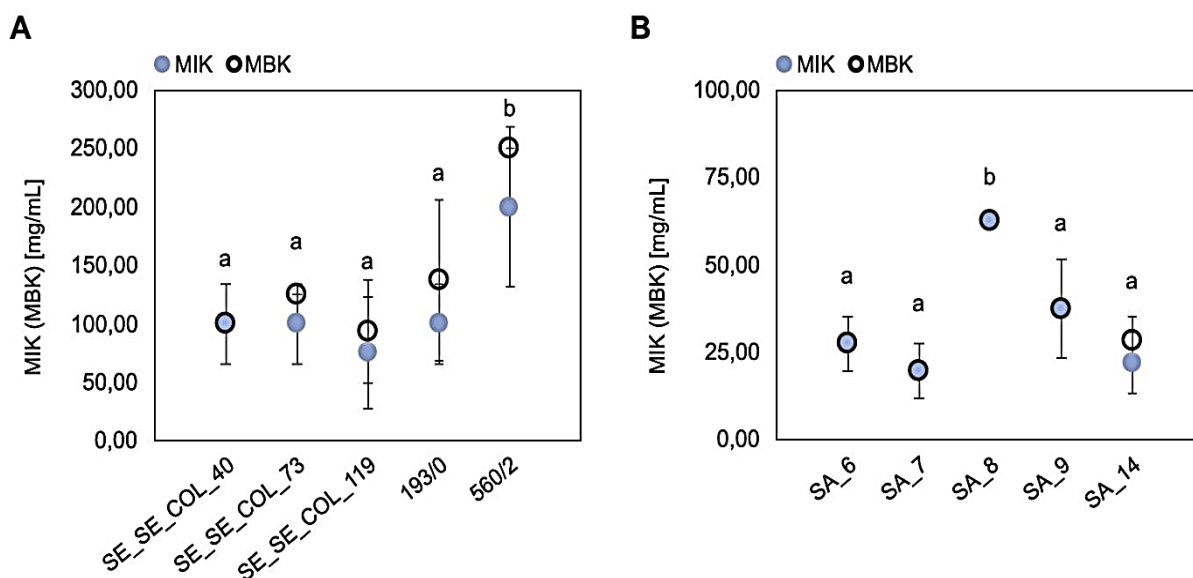
Rezultati za sve ispitivane sojeve i matične mliječi su objedinjeni u tablici 4.3.1. Uz nekoliko izuzetaka, MIK vrijednosti su jednake MBK vrijednostima (tablica 4.3.1). Općenito, značajno (ANOVA, Bonferroni test,  $p < 0,001$ ) više koncentracije djeluju inhibitory i baktericidno na *E. faecium* (MIK: 115,00 mg/mL  $\pm$  61,00 mg/mL; MBK: 141,25 mg/mL  $\pm$  68,18 mg/mL) nego na *S. aureus* (MIK: 34,65 mg/mL  $\pm$  18,22 mg/mL; MBK: 36,01 mg/mL  $\pm$  17,27 mg/mL) što potvrđuje rezultate probira (graf 4.3.1).



Graf 4.3.1. MIK i MBK vrijednosti matične mliječi prema vrstama *E. faecium* i *S. aureus*. Prikazane su srednje vrijednosti zona inhibicije rasta s pripadajućim standardnim devijacijama. Slovim a-b su označene statistički značajne razlike (ANOVA, Bonferroni test,  $p < 0,05$ ).

Raspon koncentracija u kojem matične mliječi djeluju inhibitorno na sojeve *E. faecium* varira od 75,00 mg/mL  $\pm$  47,39 mg/mL do 200,00 mg/mL  $\pm$  68,47 mg/mL, a baktericidno od 93,75 mg/mL  $\pm$  44,19 mg/mL do 250,00 mg/mL  $\pm$  0,00 mg/mL (graf 4.3.2.A). U usporedbi, inhibicija i baktericidan učinak na sojeve *S. aureus* je postignut pri nižim koncentracijama (19,54 mg/mL  $\pm$  7,81 mg/mL do 62,50 mg/mL  $\pm$  0,00 mg/mL; graf 4.3.2.B).

Na temelju MIK i MBK vrijednosti, među sojevima *E. faecium*, SE\_SC\_COL\_119 se pokazao kao najosjetljiviji (MIK: 75,00 mg/mL  $\pm$  47,39 mg/mL; MBK: 93,75 mg/mL  $\pm$  44,19 mg/mL), a soj 560/2 (MIK: 200 mg/mL  $\pm$  68,47 mg/mL; MBK: 250 mg/mL  $\pm$  0,00 mg/mL) kao najotporniji (graf 4.3.2.A), a među sojevima *S. aureus*, SA\_7 (MIK=MBK: 19,54 mg/mL  $\pm$  7,81 mg/mL) kao najosjetljiviji i SA\_8 (MIK=MBK: 62,50 mg/mL  $\pm$  0,00 mg/mL) kao najotporniji, pri čemu se osjetljivost soja SA\_8 značajno razlikuje u usporedbi s ostalim sojevima *S. aureus* (graf 4.3.2.B).

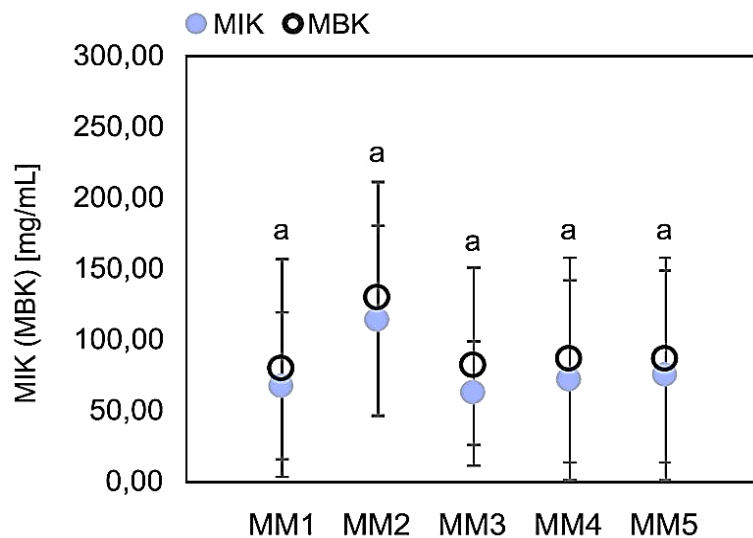


Graf 4.3.2. MIK i MBK vrijednosti matične mliječi prema sojevima *E. faecium* (A) i *S. aureus* (B) na matičnu mliječ. Prikazane su srednje vrijednosti zona inhibicije rasta s pripadajućim standardnim devijacijama. Slovicima a-b su označene statistički značajne razlike (ANOVA, Bonferroni test,  $p < 0,05$ ).

Općenito, slične koncentracije matične mliječi inhibiraju i djeluju baktericidno na sve ispitivane sojeve. Iako MM3 pokazuje najjače inhibitorno (62,50 mg/mL  $\pm$  36,08 mg/mL) i baktericidno (81,25 mg/mL  $\pm$  68,47 mg/mL) djelovanje, a MM2 najslabije (MIK: 113,28 mg/mL  $\pm$  66,69 mg/mL; MBK: 128,91 mg/mL  $\pm$  82,57 mg/mL), detektirane razlike nisu statistički značajne (graf 4.3.3).

Raspon koncentracija u kojem matične mliječi djeluju inhibitorno na sojeve *E. faecium* varira od 87,50 mg/mL  $\pm$  34,23 mg/mL do 150,00 mg/mL  $\pm$  55,90 mg/mL, a baktericidno od 125,00 mg/mL  $\pm$  76,55 mg/mL do 175,00 mg/mL  $\pm$  68,47 mg/mL. U

usporedbi, inhibicija i baktericidan učinak na sojeve *S. aureus* je postignut pri nižim koncentracijama (28,13 mg/mL ± 20,37 mg/mL do 52,08 mg/mL ± 18,04; tablica 4.3.1.).



Graf 4.3.3. MIK/MBK vrijednosti matične mliječi. Prikazane su srednje vrijednosti zona inhibicije rasta s pripadajućim standardnim devijacijama.

Tablica 4.3.1. MIK i MBK matičnih mliječi (MM1-MM5) za analizirane sojeve *E. faecium* i *S. aureus*.

Sojevi	Vrsta	MM1 [mg/mL]	MM2 [mg/mL]	MM3 [mg/mL]	MM4 [mg/mL]	MM5 [mg/mL]
SE_SC_COL_4 0	<i>E. faecium</i>	125	125	62,5	62,5	125
SE_SC_COL_7 3	<i>E. faecium</i>	125	125	125	62,5 (125)*	62,5 (125)*
SE_SC_COL_1 19	<i>E. faecium</i>	31,25	125	62,5 (125)*	125	31,25 (62,5)*
193/0	<i>E. faecium</i>	125	125 (250)*	62,5	62,5 (125)*	125
560/2	<i>E. faecium</i>	125 (250)*	250	125 (250)*	250	250
$\bar{x} \pm sd$ (MM)		106,25 ± 41,93 <sup>a</sup> (131,25 ± 77,81) <sup>a*</sup>	150,00 ± 55,90 <sup>a</sup> (175,00 ± 68,47) <sup>a*</sup>	87,50 ± 34,23 <sup>a</sup> 125,00 ± 76,55 <sup>a*</sup>	112,50 ± 81,49 <sup>a</sup> (137,50 ± 68,47) <sup>a*</sup>	118,75 ± 83,85 <sup>a</sup> 137,50 ± 68,47) <sup>a*</sup>
SA_6	<i>S. aureus</i>	15,63	n.a.**	31,25	31,25	31,25
SA_7	<i>S. aureus</i>	15,63	n.a.**	31,25	15,63	15,63
SA_8	<i>S. aureus</i>	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5
SA_9	<i>S. aureus</i>	31,25	62,5	31,25	31,25	31,25
SA_14	<i>S. aureus</i>	15,63	31,25	31,25	15,63 (31,25)*	15,63 (31,25)*
$\bar{x} \pm sd$ (MM)		28,13 ± 20,37 <sup>a</sup>	52,08 ± 18,04 <sup>a</sup>	37,50 ± 13,98 <sup>a</sup>	31,25 ± 19,14 <sup>a</sup> (34,38 ± 17,12) <sup>a*</sup>	31,25 ± 19,14 <sup>a</sup> (34,38 ± 17,12) <sup>a*</sup>

\*ukoliko se MIK i MBK razlikuju, MBK je prikazan u zagradi.

\*\*n.a. – nije analizirano; ukoliko matična mliječ tijekom probira nije pokazala antibakterijski učinak na ispitivani soj, nisu određene MIK i MBK za taj soj.

<sup>a</sup>MIK i MBK unutar istog reda označene s različitim slovima predstavljaju statistički značajne razlike (ANOVA, Bonferroni test,  $p < 0,05$ ), međutim ako su MIK i MBK vrijednosti označene istim slovom detektirane razlike nisu statistički značajne.

## 5. Rasprava

U ovom je radu ispitano djelovanje matičnih mliječi (n=5; MM1-MM5) uzorkovanih na tri različite lokacije na području Republike Hrvatske na višestruko rezistentne patogene sojeve *Enterococcus faecium* (n=5) i *Staphylococcus aureus* (n=5). Svi uzorci matične mliječi su tijekom probira djelovali intenzivnije na meticilin rezistentne sojeve *S. aureus* (promjer zone inhibicije: 16,8 mm ± 6,1 mm) u usporedbi s vankomicin rezistentnim *E. faecium* sojevima (promjer zone inhibicije: 13,7 mm ± 1,8 mm). Iako su dva soja *S. aureus* (SA\_6 i SA\_7) tijekom probira pokazala potpunu otpornost na uzorak MM2, unutar vrste *S. aureus* nema značajne razlike na djelovanje matičnih mliječi. Općenito, najslabije antibakterijsko djelovanje je pokazao uzorak MM2 (promjer zone inhibicije: 10,7 mm ± 5,7 mm) koja se također značajno razlikuje od ostalih uzoraka matične mliječi, dok su najsnažnije djelovanje pokazali uzorci MM3 (promjer zone inhibicije: 18,1 mm ± 4,3 mm) i MM4 (promjer zone inhibicije: 17,0 mm ± 4,4 mm). Zanimljivo je za napomenuti da iako uzorak MM2 pokazuje najslabije inhibitorno djelovanje, uzorkovan je iz istog područja kao i uzorak MM1, koja uz MM3 najsnažnije djeluje na *E. faecium* sojeve. Razlika u djelovanju matičnih mliječi uzorkovanih iz iste geografske lokacije, vjerojatno potječe od različitih kolonija pčela koje su proizvele matičnu mliječ (García i sur. 2010).

Budući da se metodom difuzije bunara u agaru može samo utvrditi imaju li matične mliječi antibakterijsko djelovanje na ispitivane sojeve, provedena je mikrodilucijska metoda u koncentracijama matične mliječi od 7,81 do 500,00 mg/mL kako bi se odredila minimalna inhibitorna (MIK) i minimalna baktericidna (MBK) koncentracija. Mikrodilucijska metoda je također potvrdila rezultate probira, odnosno potvrdila je veću osjetljivost vrste *S. aureus* čiji raspon MIK i MBK vrijednosti iznosi od 15,63 do 62,50 mg/mL s prosjekom MIK: 34,65 mg/mL ± 18,22 mg/mL i MBK: 36,01 mg/mL ± 17,27 mg/mL. Raspon MIK i MBK vrijednosti kod *E. faecium* je znatno veći, od 31,25 do 250 mg/mL s prosjekom MIK: 115,00 mg/mL ± 61,00 mg/mL i MBK: 141,25 mg/mL ± 68,18 mg/mL. Rasponi MIK i MBK vrijednosti ukazuju i na značajne razlike unutar vrste. Kao najotporniji se ističu *E. faecium* soj 560/2 te *S. aureus* soj SA\_8. Zanimljivo je za napomenuti da je upravo SA\_8 pokazao najmanje sličnosti s ostalim sojevima *S. aureus* tijekom genotipizacije.

Antimikrobna svojstva matične mliječi se prvenstveno pripisuju proteinu rojalizinu i *trans*-10-hidroksi-2-dekanskoj kiselini, no dokazani utjecaj imaju i Jelleine-I-IV peptidi te MRJP 1-7. Upravo je njihovo interaktivno djelovanje zaslužno za antimikrobni potencijal matične mliječi (Oršolić 2013; Nader i sur. 2021). Različita su istraživanja dokazala djelovanje navedenih antimikrobnih tvari matične mliječi na Gram pozitivne bakterijske vrste (Yang i sur. 2018; Fontana i sur. 2004; Gao i sur. 2022). Što se tiče antibakterijskog utjecaja matične mliječi na *S. aureus* i *E. faecium*, proveden je izrazito malen broj istraživanja. García i sur. (2010) su ispitali dva uzorka argentinske matične mliječi na Gram negativne i Gram pozitivne bakterije uključujući i sojeve *S. aureus*, koji su se pokazali kao najosjetljiviji tijekom istraživanja. MIK su odredili razrjeđenjem u

tekućoj MH hranjivoj podlozi u rasponu razrjeđenja od 10 - 100% w/v. Rezultati su pokazali MIK raspon od 3,4 do 14,5 mg/mL te MBK od 125 do 250 mg/mL. Moselhy i sur. (2013) su u istraživanju koristili tri uzorka matične mliječi u koncentracijama od 5, 10 i 15 mg/mL. Dva uzorka su prikupljena u Egiptu (kamforovac, citrus) dok je treći uzorak iz Kine. MIK je određen u tekućoj hranjivoj podlozi te je rast mikroorganizama očitavan prema promjeni turbiditeta. Matična mliječ kamforovca i matična mliječ iz Kine su inhibirali rast *S. aureus* pri koncentraciji od 500 µg/ml, dok je matična mliječ citrusa inhibirala pri 15,63 µg/ml, no nema podataka o MBK. García i sur. (2013) su istražili antibakterijsko djelovanje četiri uzorka argentinske matične mliječi na bakterije koje inficiraju rane, uključujući po dva MSSA i MRSA soja te jedan soj *E. faecium*. Koristeći različite koncentracije matičnih mliječi i metodu difuzije bunara u agaru, odredili su da je MIK za MSSA sojeve 20 - 80% w/w dok je za MRSA sojeve 30 - 70% w/w. Također je utvrđeno da je MIK za *E. faecium* 50 - 70% w/w, što potvrđuje rezultate ovog istraživanja o većoj osjetljivosti *S. aureus* u odnosu na *E. faecium*. Zbog različite primijenjene metodologije i zbog izostanka podataka o MBK kao i o rezistentnosti primijenjenih sojeva, nemoguće je u potpunosti usporediti navedena istraživanja s ovim istraživanjem, no ona svakako potvrđuju osjetljivost *S. aureus* i *E. faecium* na matičnu mliječ te veću osjetljivost *S. aureus* u odnosu na *E. faecium*. Zanimljive su razlike u inhibitornim koncentracijama, koje osim što variraju ovisno o geografskoj lokaciji, ovise i o biljnoj vrsti koju su pčele koristile te samim kolonijama pčela (Moselhy i sur. 2013).

Kako bi se u potpunosti stekao uvid u antibakterijski potencijal matične mliječi, potrebne su daljnje analize, naročito na ESKAPE patogenima. No u konačnici, rezultati ovog istraživanja ukazuju na mogućnost korištenja matične mliječi s područja RH kao alternativne supstance za inhibiciju rasta vankomicin rezistentnih *E. faecium* i meticilin rezistentnih *S. aureus* budući da su matične mliječi korištene u ovom istraživanju pokazale ne samo bakteriostatično nego i baktericidno djelovanje na ispitivane sojeve Gram pozitivnih ESKAPE patogena.

## 6. Zaključci

1. Rep-PCR je odgovarajuća metoda za određivanje unutarvrzne varijabilnosti *S. aureus* te pouzdana metoda za probir sojeva.
2. Analizirani uzorci matične mliječi (n=5) pokazuju antibakterijsko djelovanje na vankomicin rezistentne *E. faecium* te meticilin rezistentne *S. aureus* sojeve.
3. Značajno veću osjetljivost na djelovanje matične mliječi pokazuju sojevi *S. aureus* (*S. aureus*: 16,8 mm ± 6,1 mm; *E. faecium*: 13,7 mm ± 1,8 mm; ANOVA, Bonferroni test,  $p < 0,001$ ).
4. Najučinkovitije inhibitorno i baktericidno djelovanje pokazuje uzorak matične mliječi MM3 (MIK: 62,50 mg/mL ± 36,08 mg/mL; MBK: 81,25 mg/mL ± 68,47 mg/mL), a najslabije MM2 (MIK: 113,28 mg/mL ± 66,69 mg/mL; MBK: 128,91 mg/mL ± 82,57 mg/mL).
5. Minimalna inhibitorna i minimalna baktericidna koncentracija matične mliječi na *E. faecium* iznosi 31,25 mg/mL dok je maksimalna 250 mg/mL.
6. Minimalna inhibitorna i minimalna baktericidna koncentracija matične mliječi na *S. aureus* iznosi 15,63 mg/mL dok je maksimalna 62,5 mg/mL.



## 7. Popis literature

1. Andrašević I. (2021). Inhibicija višestruko rezistentnih sojeva *Enterococcus faecium* primjenom pčelinjeg otrova. Završni rad. Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet. Zagreb.
2. Balouiri M., Sadiki M., Ibnsouda S. K. (2016). Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 6(2): 71-79.
3. Bauer A. W., Perry D. M., Kirby W. M. M. (1959). Single disc antibiotic sensitivity testing of Staphylococci. *A.M.A. Archives of Internal Medicine*. 104: 208–216.
4. Bauer A. W., Kirby W. M. M., Sherris J. C., Turck M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *The Journal of Clinical Pathology*. 45(4): 493-496.
5. Bedenić B. (2009). Antibakterijski lijekovi. U: *Medicinska mikrobiologija* (Ur. Uzunović-Kamberović S.). Štamparija Fojnica. Zenica. 221-252.
6. Bogdanov S. (2016). Royal Jelly and Bee Brood: Harvest, Composition, Quality. U: *The Royal Jelly Book*. Mühlethurnen. Switzerland. <https://www.researchgate.net/publication/304012318> - pristup 05.09.2022.
7. Bush K. (2012). Improving known classes of antibiotics: an optimistic approach for the future. *Current Opinion in Pharmacology*. 12(5): 527-534.
8. Bush L. M., Vazquez-Pertejo M. T. (2021). Enterococcal Infections. *MSD Manual Professional Version* <https://www.msdmanuals.com/professional/infectious-diseases/Gram-positive-cocci/enterococcal-infections> - pristup 01.04.2022.
9. Cheung G. Y. C., Bae J. S., Otto M. (2021). Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*. 12(1): 547-569.
10. CLSI (1999). Method for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline. CLSI document M26-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standard Institute.
11. CLSI (2012a). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eleventh Edition. CLSI document M02-A11. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
12. 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.
13. Coban A. Y. (2012). Rapid determination of methicillin resistance among *Staphylococcus aureus* clinical isolates by colorimetric methods. *Journal of clinical microbiology*. 50(7): 2191-2193.

14. Costa Y., Galimand M., Leclercq R., Duval J., Courvalin P. (1993). Characterization of the chromosomal *aac(6')-II* gene specific for *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 37: 1896-1903.
15. Cox G., Wright G. D. (2013). Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. *International Journal of Medical Microbiology*. 303(6-7): 287-292.
16. Domig K. J., Kiss H., Petricevic L., Viernstein H., Unger F., Kneifel W. (2014). Strategies for the evaluation and selection of potential vaginal probiotics from human sources: an exemplary study. *Beneficial microbes*. 5(3): 263-272.
17. Fontana R., Mendes M. A., De Souza B. M., Konno K., César L. M., Malaspina O., Palma M. S. (2004). Jelleines: a family of antimicrobial peptides from the Royal Jelly of honeybees (*Apis mellifera*). *Peptides*. 25(6): 919-928.
18. Foster T. J. (2002). *Staphylococcus aureus*. U: *Molecular Medical Microbiology Volume 2* (Ur. Sussman M.). Academic Press. 839-888.
19. 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.
20. Fratini F., Cilia G., Mancini S., Felicioli A. (2016). Royal Jelly: An ancient remedy with remarkable antibacterial properties. *Microbiological Research*. 192: 130-141.
21. 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(2): 251-262.
22. Gao K., Su B., Dai J., Li P., Wang R., Yang X. (2022). Anti-Biofilm and Anti-Hemolysis Activities of 10-Hydroxy-2-decenoic Acid against *Staphylococcus aureus*. *Molecules*. 27(5): 1485. <https://doi.org/10.3390%2Fmolecules27051485> – pristup 03.04.2022.
23. García M. C., Finola M. S., Marioli J. M. (2010). Antibacterial activity of Royal Jelly against bacteria capable of infecting cutaneous wounds. *Journal of ApiProduct and ApiMedicine Science*. 2(3): 93-99.
24. García M. C., Finola M. S., Marioli J. M. (2013). Bioassay Directed Identification of Royal Jelly's Active Compounds against Growth of Bacteria Capable of Infecting Cutaneous Wounds. *Advances in Microbiology*. 3(2): 138:144.
25. Giraffa G. (2014). *Enterococcus*. U: *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)* (Ur. Batt C. A., Tortorello M. L.). Academic Press. 674-679.
26. Götz F., Bannerman T., Schleifer K.H. (2006) The Genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*. U: *The Prokaryotes* (Ur. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K. H., Stackebrandt E.). New York. 5-75. [https://doi.org/10.1007/0-387-30744-3\\_1](https://doi.org/10.1007/0-387-30744-3_1) - pristup 2.4.2022.

27. Guo Y., Song G., Sun M., Wang J., Wang Y. (2020). Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 10: 107. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00107> - pristup 03.04.2022.
28. Haag A. F., Fitzgerald J. R., Penadés J. R. (2019). *Staphylococcus aureus* in animals. *Microbiology Spectrum*. 7(3): 1-19.
29. Hiramatsu K., Ito T., Tsubakishita S., Sasaki T., Takeuchi F., Morimoto Y., Katayama Y., Matsuo M., Kuwahara-Arai K., Hishinuma T., Baba T. (2013). Genomic basis for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Infection & Chemotherapy*. 45(2): 117-136.
30. Hiramatsu K., Katayama Y., Matsuo M., Sasaki T., Morimoto Y., Sekiguchi A., Baba T. (2014). Multi-drug-resistant *Staphylococcus aureus* and future chemotherapy. *Journal of infection and chemotherapy: official journal of the Japan Society of Chemotherapy*. 20(10): 593–601.
31. Ike Y. (2017). Pathogenicity of Enterococci. *Nihon saikingaku zasshi. Japanese journal of bacteriology*. 72(2): 189–211.
32. Jia F., Wang J., Zhang L., Zhou J., He Y., Lu Y., Liu K., Yan W., Wang K. (2020). Multiple action mechanism and *in vivo* antimicrobial efficacy of antimicrobial peptide Jelleine-I. *Journal of Peptide Science*. 27. <https://doi.org/10.1002/psc.3294> - pristup 03.04.2022.
33. Kim B. Y., Lee K. S., Jung B., Choi Y. S., Kim H. K., Yoon H. J., Gui Z.-Z., Lee J., Jin B. R. (2019). Honeybee (*Apis cerana*) major royal jelly protein 4 exhibits antimicrobial activity. *Journal of Asia-Pacific Entomology*. 22(1): 175-182.
34. König H., Fröhlich J. (2017). Lactic Acid Bacteria. U: *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine* (Ur. König H., Uden G., Fröhlich J.). Springer, Cham. 3-41. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-60021-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-60021-5_1) - pristup 27.07. 2022.
35. Kristich C. J., Rice L. B., Arias C. A. (2014). Enterococcal infection - Treatment and antibiotic resistance. U: *Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection* (Ur. Gilmore, M. S., Clewell D. B., Ike Y., Shankar N.). Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190420/> – pristup 01.04.2022.
36. López Romo A., Quirós R. (2019). Appropriate use of antibiotics: an unmet need. *Therapeutic Advances in Urology*. 11: 9-17.
37. 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.
38. Martinez J. L. (2014). General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discovery Today: Technologies*. 11: 33-39.

39. 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. *The New England Journal of Medicine*. 345: 1155-1160.
40. Medvedová A., Valík L. (2012). *Staphylococcus aureus*: Characterisation and Quantitative Growth Description in Milk and Artisanal Raw Milk Cheese Production. U: *Structure and Function of Food Engineering* (Ur. Eissa A. A.). IntechOpen, London. 71-102. <https://www.intechopen.com/chapters/38356> – pristup 01.04.2022.
41. 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. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142357> - pristup 03.04.2022.
42. 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.
43. Moselhy W. A., Fawzy A. M., Kamel A. A. (2013). An evaluation of the potent antimicrobial effects and unsaponifiable matter analysis of the royal jelly. *Life Science Journal*. 10(2): 290–296. [http://www.lifesciencesite.com/lj/life1002/046\\_17060life1002\\_290\\_296.pdf](http://www.lifesciencesite.com/lj/life1002/046_17060life1002_290_296.pdf) - pristup 04.04.2022.
44. 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. *Frontiers in Microbiology*. 10: 539. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00539> - pristup 01.04.2022.
45. Nader R. A., Mackieh R., Wehbe R., El Obeid D., Sabatier J. M., Fajloun Z. (2021). Beehive Products as Antibacterial Agents: A Review. *Antibiotics*. 10(6): 717. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10060717> - pristup 02.04.2022.
46. Oršolić N. (2013). Royal jelly: component efficiency, analysis, and standardisation. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*. 64(3): 445-461.
47. Palmer K. L., Daniel C., Hardy C., Silverman J., Gilmore M. S. (2011). Genetic basis for daptomycin resistance in enterococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 55: 3345-3356.
48. Park A. J., Krieger J. R., Khursigara C. M. (2016). Survival proteomes: the emerging proteotype of antimicrobial resistance. *FEMS Microbiology Reviews*. 40(3): 323–342.
49. Park H. G., Kim B. Y., Park M. J., Deng Y., Choi Y. S., Lee K. S., Jin B. R. (2019). Antibacterial activity of major royal jelly proteins of the honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly. *Journal of Asia-Pacific Entomology*. 22(3): 737-741.

50. Pintarić S., Šeol Martinec B. (2018). Rezistencija enterokoka na antibiotike i preporuke za liječenje. *Veterinarska stanica*. 49(2): 105-116.
51. Portillo A., Ruiz-Larrea F., Zarazaga M., Alonso A., Martinez J. L., Torres C. (2000). Macrolide resistance gene sin *Enterococcus* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 44: 967-971.
52. Ratajczak M., Kaminska D., Matuszewska E., Hołderna-Kedzia E., Rogacki J., Matysiak J. (2021). Promising Antimicrobial Properties of Bioactive Compounds from Different Honeybee Products. *Molecules*. 26(13): 4007. <https://doi.org/10.3390/molecules26134007> - pristup 01.04.2022.
53. Ratanavalachai T., Wongchai V. (2002). Antibacterial Activity of Intact Royal Jelly, Its Lipid Extract and Its Defatted Extract. *Thammasat International Journal of Science and Technology*. 7: 5-12.
54. Rayner C., Munckhof W. J. (2005). Antibiotics currently used in the treatment of infections caused by *Staphylococcus aureus*. *Internal Medicine Journal*. 35(2): 3-16.
55. Sabatini A. G., Marcazzan G. L., Caboni M. F., Bogdanov S., Bicudo De Almeida-Muradian L. (2009). Quality and standardisation of royal jelly. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*. 1: 16-21.
56. Splith K., Neundorf I. (2011). Antimicrobial peptides with cell-penetrating peptide properties and vice versa. *European Biophysics Journal*. 40: 387-397.
57. Sweeney M. T., Lubbers B. V., Schwarz S., Watts J. L. (2018). Applying definitions for multidrug resistance, extensive drug resistance and pandrug resistance to clinically significant livestock and companion animal bacterial pathogens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 73(6): 1460–1463.
58. Šeol B., Matanović K., Terzić S. (2010). Antimikrobna terapija u veterinarskoj medicini. *Medicinska naklada*. Zagreb.
59. Švec P., Vancanneyt M., Seman M., Snauwaert C., Lefebvre K., Sedláček I., Swings J. (2005). Evaluation of (GTG) 5-PCR for identification of *Enterococcus* spp. *FEMS Microbiology Letters*. 247(1): 59-63.
60. Taylor T. A., Unakal C. G. (2022). *Staphylococcus Aureus*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441868/> - pristup 02.04.2022.
61. Thomas C., Nielsen K. (2005). Mechanisms of, and Barriers to, Horizontal Gene Transfer between Bacteria. *Nature Reviews. Microbiology*. 3(9): 711-721.
62. 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.
63. Van den Berghe E., De Winter T., De Vuyst L. (2006). Enterocin A production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 406 is characterised by a temperature- and pH-

dependent switch-off mechanism when growth is limited due to nutrient depletion. *International Journal of Food Microbiology*. 107: 159–170.

64. Varela N. P., Friendship R., Dewey C., Valdivieso A. (2008). Comparison of Agar Dilution and E-test for antimicrobial susceptibility testing of *Campylobacter coli* isolates recovered from 80 Ontario swine farms. *The Canadian Journal of Veterinary Research*. 72(2): 168–174.

65. Wright G. D. (2016). Antibiotic adjuvants: rescuing antibiotics from resistance. *Trends in Microbiology*. 24(11): 862–871.

66. Yang Y. C., Chou W. M., Widowati D. A., Lin I. P., Peng C. C. (2018). 10-Hydroxy-2-Decenoic Acid of Royal Jelly Exhibits Bactericide and Anti-Inflammatory Activity in Human Colon Cancer Cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 18: 202. <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2267-9> - pristup 03.04.2022.

67. Yousefi B., Ghaderi S., Rezapoor-Lactoyi A., Amiri N., Verdi J., Shoaehassani A. (2012). Hydroxy decenoic acid down regulates gtfB and gtfC expression and prevents *Streptococcus mutans* adherence to the cell surfaces. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 11: 21. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-11-21> - pristup 03.04.2022.

68. Yutin N. (2013). Horizontal Gene Transfer. U: *Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)* (Ur. Maloy S., Hughes K.). Academic Press. 530-532.

69. Zeng W., Feng L., Qian C., Chen T., Wang S., Zhang Y., Zheng X., Wang L., Liu S., Zhou T., Sun Y. (2022). Acquisition of Daptomycin Resistance by *Enterococcus faecium* Confers Collateral Sensitivity to Glycopeptides. *Frontiers in Microbiology*. 13: 1-14.

70. Zhou J., Xue X., Li Y., Zhang J., Zhao J. (2007). Optimized Determination Method for *trans*-10-Hydroxy-2-Decenoic Acid Content in Royal Jelly by High-Performance Liquid Chromatography with an Internal Standard. *Journal of AOAC International*. 90(1): 244-249.

71. Zhou X., Willems R. J. L., Friedrich A. W., Rossen J. W. A., Bathoorn E. (2020). *Enterococcus faecium*: from microbiological insights to practical recommendations for infection control and diagnostics. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*. 9(1): 130.

## Životopis

Valentina Odorčić je rođena 25. kolovoza 1994. godine u Gospiću. Osnovnu školu je pohađala u Osnovnoj školi Zrinskih i Frankopana u Otočcu od 2001. godine do 2009. godine nakon čega upisuje Opću gimnaziju u Srednjoj školi Otočac. Tijekom osnovnog i srednjoškolskog obrazovanja je stekla stupanj A2 razine njemačkog jezika te C1 razine engleskog jezika. Bila je član vokalnog zbora i dramske grupe. Tijekom srednjoškolskog obrazovanja je bila dio volonterske udruge. Sudjelovala je na državnom natjecanju iz Lidrana 2012. godine. U slobodno vrijeme je u privatnom okruženju naučila svirati akustičnu gitaru, bas gitaru i bubnjeve. Posjeduje vještine rada na računalu i korištenja programskih alata. 2017. godine upisuje preddiplomski sveučilišni studij Agroekologija na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu kojeg završava 2020. godine nakon čega upisuje diplomski studij Mikrobne biotehnologije u poljoprivredi na istom sveučilištu. Dobitnica je rektorove nagrade u akademskoj godini 2021./2022. zbog rada na temu „Djelovanje medljikovca na karbapenem rezistentne *Klebsiella pneumoniae* i vankomicin rezistentne *Enterococcus faecium* sojeve“.