

Potencijal pčelinjeg otrova (*Apis mellifera* L.) u inhibiciji rasta multirezistentnih sojeva *Klebsiella pneumoniae*

Benc, Anja

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:204:797569>

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

**POTENCIJAL PČELINJEG OTROVA (*APIS MELLIFERA L.*)
U INHIBICIJI RASTA MULTIREZISTENTNIH SOJEVA
KLEBSIELLA PNEUMONIAE
DIPLOMSKI RAD**

Anja Benc

Zagreb, rujan, 2022.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:

Mikrobna biotehnologija u poljoprivredi

**POTENCIJAL PČELINJEG OTROVA (*APIS MELLIFERA* L.)
U INHIBICIJI RASTA MULTIREZISTENTNIH SOJEVA
*KLEBSIELLA PNEUMONIAE***

DIPLOMSKI RAD

Anja Benc

Mentor:
Prof. dr. sc. Mirna Mrkonjić Fuka

Zagreb, rujan, 2022.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, **Anja Benc**, JMBAG 0178110386, rođen/a 10.03.1997. u Zaboku, izjavljujem da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom:

**POTENCIJAL PČELINJEG OTROVA (*APIS MELLIFERA L.*) U INHIBICIJI RASTA
MULTIREZISTENTNIH SOJEVA *KLEBSIELLA PNEUMONIAE***

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 studenta / studentice

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE
O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice **Anje Benc**, JMBAG 0178110386, naslova

**POTENCIJAL PČELINJEG OTROVA (*APIS MELLIFERA L.*) U INHIBICIJI RASTA
MULTIREZISTENTNIH SOJEVA *KLEBSIELLA PNEUMONIAE***

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

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

potpisi:

Zahvala

Najprije zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Mirni Mrkonjić Fuki za mogućnost pisanja ovog diplomskog rada, kao i za veliku količinu razumijevanja i strpljenja tijekom izrade te pisanja samog rada.

Zahvaljujem i mag. ing. agr. Irini Tanuwidjaja na pomoći kroz provedbu laboratorijskog istraživanja te na još većoj pomoći tijekom pisanja rada, a posebno se moram zahvaliti na iznimnom strpljenju.

Zahvaljujem Agenciji za plaćanje u poljoprivredi, ribarstvu i ruralnom razvoju, na ustupanju sredstava za ovo istraživanje u sklopu projekta „Detaljna analitička karakterizacija i antimikrobno djelovanje odabranih pčelinjih proizvoda na multirezistentne patogene bakterije“ (akronim: miCRObee).

Na kraju, najviše želim zahvaliti svojoj obitelji za neizmjernu podršku tijekom cijelog školovanja, te svom dečku Domagoju koji me bodrio kada je najviše trebalo.

Sadržaj

1.	Uvod	1
1.1.	Cilj i hipoteza rada	2
2.	Pregled literature	3
2.1.	Pčelinji otrov	3
2.1.1.	Karakteristike pčelinjeg otrova	3
2.1.2.	Sastav i antimikrobna svojstva pčelinjeg otrova	3
2.2.	Opće karakteristike <i>Klebsiella pneumoniae</i>	4
2.2.1.	Morfološke i fiziološke karakteristike <i>Klebsiella</i> spp.	4
2.2.2.	Rezistencija na antibiotike kod <i>K. pneumoniae</i>	5
2.3.	Metode za genotipizaciju bakterija	6
2.3.1.	Rep-PCR	6
2.4.	Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK)	7
2.5.	Minimalna baktericidna koncentracija (MBK)	8
3.	Materijali i metode	9
3.1.	Materijali	9
3.1.1.	Laboratorijski pribor i instrumenti	9
3.1.2.	Osnovne kemikalije	9
3.1.3.	Otopine	9
3.1.4.	Hranjive podloge	10
3.1.5.	Komplet za izolaciju genomske DNA	10
3.1.6.	Molekularni reagensi, enzimi, markeri i početnice	10
3.1.7.	Antimikrobne tvari	10
3.1.8.	Bakterijske kulture	10
3.2.	Metode	12

3.2.1.	Izolacija genomske DNA <i>K. pneumoniae</i>	12
3.2.2.	Genotipizacija izolata <i>K. pneumoniae</i> rep-PCR metodom	13
3.2.3.	Određivanje minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije pčelinjeg otrova.....	14
4.	Rezultati.....	17
4.1.	Grupiranje izolata rep-PCR metodom.....	17
4.2.	Minimalne inhibitorne i baktericidne koncentracije pčelinjeg otrova.....	19
5.	Rasprava	21
6.	Zaključak.....	23
7.	Popis literature	24
8.	Prilog.....	27
8.1.	Popis kratica	27
	Životopis	28

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Anje Benc**, naslova

POTENCIJAL PČELINJEG OTROVA (*APIS MELLIFERA L.*) U INHIBICIJI RASTA MULTIREZISTENTNIH SOJEVA *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

Rastuća prevalencija *Klebsiella pneumoniae* otpornih na karbapeneme i kolistin postaje sve veći problem na globalnoj razini, s obzirom da se navedeni antibiotici koriste kao lijekovi zadnje linije obrane u liječenju infekcija uzrokovanih ovim bakterijama. Kationski antimikrobni peptidi (CAP) prirodni su spojevi s dokazanom antimikrobnom aktivnošću, a jedan od značajnih izvora CAP-a je pčelinji otrov (apitoksin) kojeg proizvode medonosne pčele (*Apis mellifera L.*). Cilj ovog rada jest odrediti utjecaj pčelinjeg otrova na karbapenem rezistentne sojeve *K. pneumoniae* izolirane iz otpadnih voda. Analizom obrazaca dobivenih rep-PCR metodom selektirani su reprezentativni sojevi *K. pneumoniae*. Određene su minimalne inhibitorne (MIK) i minimalne baktericidne (MBK) koncentracije metodom serijske mikrodilucije na Mueller-Hinton podlozi. MIK vrijednost kretala se u rasponu od 25-100 µg/mL dok je MBK bila u rasponu od 25-200 µg/mL. Najčešće su MIK vrijednosti bile jednake MBK vrijednostima .

Ključne riječi: pčelinji otrov, *Klebsiella pneumoniae*, rep- PCR, minimalna inhibitorna koncentracija (MIK), minimalna baktericidna koncentracija (MBK)

Summary

Of the master's thesis – student **Anja Benc**, entitled

POTENTIAL OF BEE VENOM (*APIS MELLIFERA L.*) IN GROWTH INHIBITION OF MULTIRESISTANT STRAINS OF *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

The growing prevalence of *Klebsiella pneumoniae* resistant to carbapenems and colistin is becoming a growing problem at the global level, considering that these antibiotics are used as the last line of defense in the treatment of infections caused by these bacteria. For this reason, the demand for alternative antimicrobial compounds that will effectively inhibit the growth of these enterobacteria is growing. Cationic antimicrobial peptides (CAP) are natural compounds with proven antimicrobial activity, and one of the significant sources of CAP is a bee venom (apitoxin) produced by the honey bees (*Apis mellifera L.*). The aim of this study is to determine the influence of bee venom on carbapenem resistant strains of *Klebsiella pneumoniae* isolated from wastewater. By analyzing the fingerprints obtained by the rep-PCR method, representative strains of *K. pneumoniae* were selected. Minimal inhibitory (MIK) and minimal bactericidal (MBK) concentrations were determined by the method of serial microdilution on the Mueller-Hinton substrate. The MIC value was in the range of 25-100 µg/mL, while the MBK was in the range of 25-200 µg/mL. Most often, MIK values were equal to MBK values.

Keywords: bee venom, *Klebsiella pneumoniae*, rep-PCR, minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC)

1. Uvod

Pčelinji otrov ili apitoksin proizvodi se u otrovnoj žlijezdi medonosne pčele (*Apis mellifera* L.). To je složena mješavina tvari s uočenom biološkom aktivnošću (Sobral i sur., 2016). Od prvih istraživanja početkom 20. stoljeća, razvijene su višestruke terapijske primjene s pčelinjim otrovom, pa se tako ovaj tradicionalni lijek koristi u borbi protiv raka, raznih kožnih bolesti, u liječenju Parkinsonove bolesti, reumatoidnog artritisa, multiple skleroze i slično (Moreno i Giralt, 2015).

Multirezistentna *Klebsiella pneumoniae* je poznata kao patogena bakterija koja je otporna na više klasa antibiotika (*eng. multi drug resistant bacteria* (MDRB)) te je glavni izvor bolničkih infekcija popraćenih visokom smrtnošću zbog otežane mogućnosti liječenja. Zbog razvitka rezistencije na antibiotike, između ostalog i na karbapeneme te kolistin, *K. pneumoniae* predstavlja veliku prijetnju i rizik za zdravlje ljudi na globalnoj razini (Giani i sur., 2017). Ova bakterija može se lako proširiti u bolničkoj sredini te izazvati različite infekcije, pogotovo kod ljudi s oslabljenim imunitetom. Neki pacijenti mogu postati asimptomatske kliconoše (Soldić, 2019). *K. pneumoniae* se također nalazi na ESKAPE listi patogenih bakterija Svjetske zdravstvene organizacije, u koju spadaju i *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterobacter* spp. Ove bakterije su rezistentne na gotovo sve konvencionalne antibiotike te je za inhibiciju njihovog rasta nužno hitno pronaći nove antimikrobne lijekove.

Brojna istraživanja su dokazala antimikrobno djelovanje pčelinjeg otrova na Gram-negativne i Gram-pozitivne bakterije (Zolfagharian i sur., 2016). Učinak ovisi o koncentraciji pčelinjeg otrova, kao i vrsti bakterije, a najčešće i o samom soju. Međutim, literaturni navodi su nedostadni kada se radi o karbapenem rezistentnoj *K. pneumoniae*. S obzirom da je pčelinji otrov prepoznat kao snažno antimikrobno sredstvo, pretpostavka je da će njegova primjena inhibirati rast multirezistentnih sojeva *K. pneumoniae*. Njegovo djelovanje ovisiti će o koncentraciji pčelinjeg otrova te soju *K. pneumoniae*.

1.1. Cilj i hipoteza rada

Cilj ovog rada je odrediti utjecaj pčelinjeg otrova na karbapenem rezistentne sojeve *Klebsiella pneumoniae*.

Hipoteza ovog istraživanja je da će pčelinji otrov inhibirati rast odabranih multirezistentnih sojeva *K. pneumoniae*, a učinak će ovisiti o koncentraciji pčelinjeg otrova te soju *K. pneumoniae*.

Specifični ciljevi ovog rada:

- 1) genotipizirati multirezistentne sojeve *K. pneumoniae* izolirane iz otpadnih voda rep-PCR metodom
- 2) odrediti minimalnu inhibitornu (MIK) i minimalnu baktericidnu (MBK) koncentraciju pčelinjeg otrova primjenom metode mikrodilucije

2. Pregled literature

2.1. Pčelinji otrov

2.1.1. Karakteristike pčelinjeg otrova

Pčelinji otrov, poznat i kao apitoksin, proizvodi se u otrovnoj žlijezdi pčela radilica, te ga one koriste za obranu zajednice. Pčelinji otrov je u obliku tekućine svijetložute boje. Karakterizira ga gorak okus, opor miris, a pH vrijednost kreće mu se od pH 4,5 do 5,5 (Pascoal i sur., 2019).

Istraživanja su pokazala da 88 % apitoksina čini voda, no njegov sastav varira ovisno o vrsti pčele, te godišnjem dobu (Moreno i sur., 2015). Bjelančevine u pčelinjem otrovu su, uz bioaktivne komponente, jedne od glavnih uzročnika alergijskih reakcija nakon uboda te manifestacije boli (Mujić, 2014).

Uz razvoj apiterapije (upotrebe pčelinjih proizvoda za dobrobit čovjeka), uočena je i dobrobit pčelinjeg otrova za zdravlje ljudi. Koristi se za mnoge zdravstvene probleme, kao što su ekcemi, laringitis, mastitis, reumatološki problemi, kao i za kardiovaskularne, plućne i ortopedske probleme. Također, koristi se i kao pomoć u inhibiciji raka jajnika, multiple skleroze, te općenito ima antibiotski učinak (Modanesi i sur., 2014).

2.1.2. Sastav i antimikrobna svojstva pčelinjeg otrova

Aktivni spojevi pčelinjeg otrova su peptidi (melitin, apamin, adolapin, sekapin, prokamin, inhibitor proteaze, terciapin, vitelogenin i drugi mali peptidi), enzimi (fosfolipaza A2, hijaluronidaza, kiselna fosfomonoesteraza, lizofosfolipaza i α -glukozidaza), kao i nepeptidne komponente, poput biogenih amina (histamin, dopamin i noradrenalin), aminokiseline (aminomaslačna kiselina i α -aminokiseline), šećeri (glukoza, fruktoza), fosfolipidi i hlapljivi spojevi. Kao glavne komponente, izdvajaju se fosfolipaza A2, melitin, histamin, kateholamin, poliamini (Sobral i sur., 2016).

Najviše istraživana komponenta je fosfolipaza A2. Ona predstavlja enzim koji katalizira hidrolizu veze sn-2 masnih kiselina sa sn-3 fosfogliceridima, oslobađajući tako slobodne masne kiseline i lizofosfolipide. Fosfolipaze A2 pripadaju velikoj obitelji proteina koji se nalaze u različitim tkivima sisavaca, člankonožaca, u otrovima zmija, škorpiona, te pčela. Ovaj enzim ima antibakterijsko te antikoagulirajuće djelovanje, te ima aktivnu ulogu u stvaranju kemijskih posrednika, između ostalog i u protuupalnim procesima (Leandro i sur., 2014)

Melitin predstavlja najzastupljeniju komponentu apitoksina. Melitin se sastoji od 26 aminokiselinskih ostataka s amfipatskim karakteristikama (ima polarne i nepolarne završetke).

Ovi završetci melitinu omogućuju interakciju sa lipidnim u membranama, te uzrokuju povećanje propusnosti staničnih membrana. Melitinu se pripisuje nekoliko bioloških aktivnosti, kao što su antibakterijsko, antivirusno i protuupalno djelovanje. Ima inhibirajuće djelovanje na rast različitih stanica raka (Leandro i sur., 2014).

Antimikrobni učinak pčelinjeg otrova istražen je na velikom broju mikroorganizama, pa tako i na Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama (Arteaga i sur., 2019.; Hegazi i sur., 2016.; Leandro i sur., 2013). Rezultati ukazuju da je pčelinji otrov učinkovitiji kada su u pitanju Gram-pozitivne bakterije, no njegov učinak na Gram-negativne bakterije nikako nije zanemariv (Hegazi i sur., 2014). Za antimikrobni učinak najzaslužniji je melitin. Njegov glavni mehanizam djelovanja jest sposobnost da poremeti funkciju bioloških membrana. Melitin se veže na anionske lipidne membrane svojim hidrofobnim dijelom i pozitivnim nabojem. Kao posljedica nastaju prohodne pore u membranama. Kombinacija velikog broja pora može urušiti fosfolipidni dvosloj te uzrokovati lizu stanice.

Fosfolipaza A2 također posjeduje antimikrobna svojstva, kao i druge komponente sastava pčelinjeg otrova. Na primjer, vitelogenin djeluje kao antimikrobni peptid inducirajući oštećenja staničnih membrana bakterija (Carpena i sur., 2020).

2.2. Opće karakteristike *Klebsiella pneumoniae*

2.2.1. Morfološke i fiziološke karakteristike *Klebsiella* spp.

Klebsiella spp. su u obliku ravnih štapića, poredani pojedinačno, u parovima ili u kratkim lancima, te su često okruženi kapsulom. Pripadaju porodici *Enterobacteriaceae* te su Gram-negativne. Nepokretne su, oksidaza negativni, fakultativni anaerobi, koji imaju respiratorni i fermentacijski tip metabolizma (Grimont i sur., 2015). *Klebsiella* spp. su po prirodi ubikvisti. Također nastanjuju površine sluznica sisavaca, kao što su ljudi, konji ili i svinje. Kod ljudi, *K. pneumoniae* prisutna je kao saprofit u nazofarinksu i u crijevnom traktu (Podschunn i Ullmann, 1998).

K. pneumoniae od svih pripadnika roda *Klebsiella* najčešće inficira ljude. Kao primarni patogen, može uzrokovati infekcije mokraćnog sustava te, kod osoba s oslabljenim imunitetom, nekrotizirajuću pneumoniju. Pri uvjetima oslabljenog imuniteta, kod ljudi također može uzrokovati niz drugih infekcija poput infekcije mokraćnog sustava, sepsu i meningitis. Sepsu i meningitis često uzrokuje kod novorođenčadi koja prve dane života provode u jedinici intenzivnog liječenja. Te infekcije uglavnom su povezane sa zdravstvenom skrbi (Kalenić i sur., 2013).

2.2.2. Rezistencija na antibiotike kod *K. pneumoniae*

Pojam otpornosti, odnosno rezistencije na antibiotike odnosi se na sposobnost organizma da preživi učinak antibiotika. Razina rezistencije izražena je u vrijednostima minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) (*eng. minimal inhibitory concentration; MIC*), odnosno u vrijednostima minimalne koncentracije antibiotika koja zaustavlja rast bakterije (Soldić, 2019).

K. pneumoniae pripada skupini ESKAPE patogena, zajedno s *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterobacter* spp. Ove patogene karakterizira povećana razina rezistencije prema više klasa antibiotika (Denissen i sur., 2022).

K. pneumoniae prirodno je rezistentna na ampicilin. Bolnički sojevi stekli su rezistenciju na razne antibiotike i aminoglikozide. Stoga se, kada se liječi infekcija uzrokovana *K. pneumoniae*, mora napraviti test osjetljivosti na antibiotike. 2011. godine u Hrvatskoj je oko 40 % sojeva bilo otporno na sve β -laktamske antibiotike, osim na karbapenem (ESBL-sojevi), 35 % sojeva bilo je rezistentno na gentamicin, a samo 5 % na amikacin. Oko 35 % sojeva bilo je rezistentno na fluorokinolone, a 40 % na sulfametoksazol + trimetoprim. Kroz godine, počeli su se pojavljivati pojedinačni slučajevi otpornosti na karbapeneme (Kalenić i sur., 2013). Geni koji kodiraju ESBL se nalaze na plazmidima koji sadržavaju i gene rezistencije na aminoglikozide, tetracikline, sulfametoksazol + trimetoprim i kloramfenikol. Stoga su ESBL-pozitivni sojevi multirezistentni na antibiotike iz različitih skupina, te predstavljaju veliki terapijski problem u bolnicama (Kalenić i sur., 2013).

K. pneumoniae poznati je sakupljač plazmida koji nose gene koji kodiraju otpornost na više lijekova poput aminoglikozida i β -laktamaze proširenog spektra (ESBL). Stjecanje ovih plazmida i pojava kromosomskih mutacija koje donose otpornost na fluorokinolone, čini da je liječenje infekcija uzrokovanih *K. pneumoniae* često je ograničeno na korištenje karbapenema kao antibiotika posljednje linije obrane. No od početka 21. stoljeća, multirezistentni sojevi *K. pneumoniae* počeli su proizvoditi „karbapenemaze“ kodirane prijenosnim plazmidima, te su se vrlo brzo proširile u bolničkom okruženju, a i među porodicom *Enterobacteriaceae* (Vuotto i sur., 2014).

β -laktamski antibiotici su daleko najkorišteniji antibiotici u svijetu za liječenje infekcija kod ljudi, a i kod životinja. Značajna prijetnja njihovoj uporabi je brza evolucija β -laktamaza, uglavnom među Gram-negativnim bakterijama, što svaki novi lijek čini zastarjelim u vrlo kratkom periodu. Među β -laktamima, antibiotici na bazi karbapenema smatraju se antibioticima posljednje linije obrane za liječenje bakterijskih infekcija uzrokovanih β -laktamazama proširenog spektra (ESBL-producirajuće bakterije). Brzo širenje rezistencije na karbapenem, obično uzrokovano širenjem karbapenemaze, predstavlja sve veći problem javnog zdravstva u cijelom svijetu. Karbapenemaze imaju sposobnost hidrolizirati peniciline, cefalosporine i karbapeneme, čime su mogućnosti liječenja ograničene (Zhang, 2020).

Rezistencija *K. pneumoniae* na kolistin najčešće je posredovana kromosomskim genima, iako je u zadnje vrijeme sve češće zabilježena i rezistencija posredovana plazmidnim genima. Soj *K. pneumoniae* definira se kao kolistin-rezistentan kada je MIK vrijednost kolistina veća od 2 µg/mL (Poirel i sur., 2017).

2.3. Metode za genotipizaciju bakterija

Genotipizacija bakterijskih sojeva, odnosno identifikacija bakterija na razini soja, posebno je važna za dijagnostiku, liječenje i epidemiološko praćenje bakterijskih infekcija. Osobito je važna za bakterije s izraženim razinama otpornosti na antibiotike, ili sa izraženom virulentnošću, kao i u pandemijskim razdobljima uzrokovanih bakterijama ili virusima. Tipizacija sojeva također ima primjenu u proučavanju dinamike bakterijskih populacija. Unazad dvadeset godina, molekularne metode progresivnu su zamijenile fenotipske testove za tipiziranje bakterijskih sojeva. Najčešće korištene metode su RFLP (eng. *Restriction Fragment Length Polymorphism*), RAPD-PCR (eng. *Random Amplified Polymorphic DNA PCR*) i rep-PCR (eng. *Repetitive Element Palindromic PCR*), dok su uz njih još razvijene i DGGE (eng. *Temperature Gradient Gel Electrophoresis*), SSCP (eng. *Single-strand Conformation Polymorphism*), TRFLP (eng. *Terminal Restriction Fragment Length*) i ap-PCR (eng. *Arbitrarily Primed PCR*) (Li i sur., 2009).

Polimorfizam duljine restrikcijskih fragmenata (RFLP) jedna je od prvih tehnika koja se široko koristi za otkrivanje varijacija u sekvenci DNA (Todd i sur., 2001). Kao što samo ime govori, RFLP metoda mjeri veličinu restrikcijskih fragmenata odvojenih konvencionalnom elektroforezom u agaroznom gelu. Ipak, RFLP analiza zahtijeva velike količine visoko kvalitetne DNA, što može ograničiti mogućnost primjene te metode (Li i sur., 2009).

Proizvoljno prijanjući PCR (ap-PCR) varijacija je klasičnog PCR-a za nasumično umnažanje nepoznatih genomskih regija korištenjem proizvoljnih početnica. Stoga se također naziva nasumičnim umnažanjem polimorfne DNA (RAPD). Korištenjem kratkih pojedinačnih početnica (obično <10 pb), kombiniranih sa nižim temperaturama žarenja, ap-PCR omogućuje umnažanje genomske DNA na više lokusa, što stvara amplikone različitih veličina. Za razliku od tradicionalne PCR, ap-PCR ne zahtijeva prethodno poznavanje ciljne DNA (Li i sur., 2009). Ima široku primjenu, pa tako i za proučavanje genetske varijabilnosti mnogih bakterijskih vrsta, uključujući važne ljudske patogene (Jin i sur., 2001).

2.3.1. Rep-PCR

Niz prirodno ponavljajućih sekvenci DNA raspršene su u više kopija po bakterijskom genomu. Iako funkcije ovih isprepletenih ponavljajućih elemenata DNA nisu poznate, njihova je prisutnost korisna za metodu otiska prsta (eng. *fingerprinting*). Pri rep-PCR (eng. *repetitive*

extragenic palindromic-polymerase chain reaction), početnice komplementarne ispresijecanim ponavljajućim sekvencama koriste se za umnažanje fragmenata DNA između ponavljajućih elemenata. Tri su skupine ponavljajućih sekvenci: 35-40 pb repetitivni ekstrageni palindrom (REP) sekvence, 124-127 pb enterobakterijski repetitivni intergenski konsenzus (ERIC) sekvence, te BOX sekvence od 154 pb. Detekcija DNA fragmenata postiže se pomoću elektroforeze u agaroznom gelu, ili kapilarnom elektroforezom (Li i sur., 2009). Optimizacija uvjeta elektroforeze (elektrokinetičko ubrizgavanje i primjena napona) može značajno povećati razlučivost umnoženih fragmenata i do 1000 pb (Sciacchitano, 1998).

Zbog niske cijene materijala i brzine samog postupka, jednostavnosti upotrebe i niskog intenziteta rada, rep-PCR može biti dragocjena metoda za tipizaciju bakterijskih sojeva. Za razliku od ap-PCR, rep-PCR je pouzdanija jer se za amplifikaciju koriste specifične početnice. Rep-PCR pokazao se korisnim za tipizaciju prokariotiskih i eukariotskih mikroorganizama, uključujući i bakterije od epidemiološkog značaja (Li i sur., 2009).

2.4. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK)

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) definirana je kao najniža koncentracija antimikrobne tvari koja će inhibirati vidljivi rast mikroorganizma. MIK koriste dijagnostički laboratoriji, uglavnom za potvrđivanje rezistencije, ali najčešće kao istraživački alat za određivanje *in vitro* aktivnosti različitih antimikrobnih spojeva. MIK se smatra „zlatnim standardom“ za određivanje osjetljivosti organizama na antimikrobna sredstva. Stoga se koristi za procjenu učinkovitosti svih drugih metoda za testiranja osjetljivosti na antimikrobna sredstva (Andrews, 2001).

MIK se najčešće određuje metodom serijske mikrodilucije, koja predstavlja standardnu metodu koja se koristi u većini referentnih laboratorija diljem svijeta. Obično se testiraju dvostruka razrjeđenja antimikrobnih sredstava u mikrotitarskoj ploči s 96 jažica. Kao testni medij najčešće se koristi Mueller-Hinton tekuća otopina. Suspenzija organizma koji se ispituje najčešće se priprema u fiziološkoj otopini do turbiditeta McFarland standarda 0,5. Suspenzija se razrjeđuje sa fiziološkom otopinom, najčešće u omjeru 1:20 te se 1-5 µL suspenzije prenese u sve osim jedne jažice koja predstavlja kontrolu bakterijskog rasta. Obično se testira 8-12 antimikrobnih sredstava (Tenover, 2019). Nakon miješanja, mikrotitarska ploča se inkubira na odgovarajućoj temperaturi. Rast bakterija određuje se vizualno, ili automatiziranim sustavom kako bi se odredile MIK vrijednosti (Marroki i Boushmana-Marokki, 2022).

2.5. Minimalna baktericidna koncentracija (MBK)

Minimalna baktericidna koncentracija (MBK) je najniža koncentracija antimikrobne tvari, koja pod definiranim *in vitro* uvjetima smanjuje broj živih organizama za 99,9 %, u mediju koji sadrži definirani bakterijski inokulum, u određenom vremenskom razdoblju. Redukcija se obično izražava kao udio inokuluma koji je onesposobljen za daljnju reprodukciju u tom razdoblju (EUCAST, 1998).

MBK se određuje subkultivacijom na agar pločama. Svaki uzorak bakterija iz odgovarajućih bunara mikrotitarske ploče sterilno se razmazuje na agar ploče, te se inkubiraju pri odgovarajućoj temperaturi 24-48 h. MBK je najniže razrjeđenje antimikrobnog sredstva koje sprječava rast organizma. Izostanak rasta organizma implicira da nema preživjelih organizama (Sykes i Rankin, 2014).

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

3.1.1. Laboratorijski pribor i instrumenti

- brojač kolonija, Colony star (Funke Gerber, Njemačka)
- centrifuga 54145R (Eppendorf, AG, Njemačka)
- denzitometar DEN-1 Densitometer (Biosan, Latvija)
- epruvete za denzitometar
- inkubator, Sanyo Incubator MIR-153 (Sanyo Electronics Co. Ltd., Japan)
- kadica za izradu gela za elektroforezu (Thermo Scientific, SAD)
- laboratorijska vaga, TE3102S (Sartorius, AG, Njemačka)
- membranski filter promjera pora 0,22 μm (VWR International, Belgija)
- menzura 250 mL (Normax, Portugal)
- mikrotitarske ploče s 96 bunara (Sigma Aldrich, SAD)
- mikrotubice 2.0 mL
- multikanalna mikropipeta s osam kanala, Pipetman M (Gilson, Francuska)
- orbitalna treskalica/inkubator, Orbital shaker-incubator ES-20 (Biosan, Latvija)
- Petrijeve zdjelice (Anicrin, Italija)
- sustav za horizontalnu elektroforezu, Owl A1 (Thermo Scientific, SAD)
- uređaj za PCR, ProFlex PCR System (Applied Biosystem, 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)
- vodene kupelji, WB7 (Memmert, Njemačka) i NB9 (Nüve, Turska)
- vorteks mješalica, Vortex V-1 plus (Biosan, Latvija)
- žličica

3.1.2. Osnovne kemikalije

- agarozna SeaKem® LE (Lonza, SAD)
- etanol (96%, Gram mol, Hrvatska)
- natrij klorid (Merck, Njemačka)
- propanol (VWR Chemicals, Belgija)

3.1.3. Otopine

- fiziološka otopina (0,85% NaCl)
Fiziološka otopina pripremljena je otapanjem 0,85 g natrijeva klorida u 1 L destilirane vode i sterilizirana autoklaviranjem pri 121 °C kroz 15 min.

3.1.4. Hranjive podloge

- tekuća BHI podloga
Tekuća BHI (eng. *Brain Heart Infusion Agar*, Biolife, Italija) je pripravljena otapanjem 37,0 g dehidrirane podloge u 1000 mL destilirane vode. Podloga je zatim sterilizirana autoklaviranjem pri 121 °C tijekom 15 min.
- kruta BHI podloga
Kruta BHI podloga pripravljena je kao i tekuća BHI podloga (opisano iznad) uz dodatak 15,0 g tehničkog agara (Biolife, Italija). Nakon sterilizacije podloga je ohlađena na 45 – 50 °C i sterilno izlivena u sterilne Petrijeve zdjelice te ostavljena da polimerizira na sobnoj temperaturi.
- tekuća Mueller- Hinton podloga
Tekuća Mueller- Hinton (MH, Biolife, Italija) podloga pripravljena je otapanjem 22,0 g dehidrirane podloge u 1000 mL destilirane vode. Podloga je zatim sterilizirana autoklaviranjem pri 121 °C kroz 15 min.

3.1.5. Komplet za izolaciju genomske DNA

- Wizard® Genomic DNA Purification Kit Promega, SAD

3.1.6. 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)
- molekularni biljeg, Gene Ruler, 1kb (Thermo Scientific, SAD)
- početnica GTG₅ (Metabion, International AG, Njemačka)
- polimeraza, DreamTaq polimerase, 5U/μL (Thermo Scientific, SAD)

3.1.7. Antimikrobne tvari

Pčelinji otrov korišten u ovom istraživanju prikupljen je na obiteljskom poljoprivrednom gospodarstvu na području Bjelovarsko- bilogorske županije tijekom 2018. godine (Tanuwidjaja i sur., 2021.)

3.1.8. Bakterijske kulture

Bakterijski izolati *K. pneumoniae* (n=48) korišteni u ovom istraživanju (tablica 3.1) su izolirani iz otpadnih voda i ustupljeni od strane Instituta „Ruđer Bošković“. Svi izolati su multirezistentni te otporni na karapaneme.

Tablica 3.1. Izolati *Klebsiella pneumoniae* izolirani iz otpadnih voda i korišteni u ovom istraživanju.

Izolat	Vrsta
SE_SC_COL_46	<i>K. pneumoniae</i>
SE_SC_COL_47	<i>K. pneumoniae</i>
SE_SC_COL_54	<i>K. pneumoniae</i>
SE_SC_COL_67	<i>K. pneumoniae</i>
SE_SC_COL_82	<i>K. pneumoniae</i>
SE_SC_COL_84	<i>K. pneumoniae</i>
SE_SC_COL_86	<i>K. pneumoniae</i>
SE_SC_COL_87	<i>K. pneumoniae</i>
SE_SC_COL_95	<i>K. pneumoniae</i>
SE_SC_COL_96	<i>K. pneumoniae</i>
SE_SC_COL_97	<i>K. pneumoniae</i>
SE_SC_COL_99	<i>K. pneumoniae</i>
SE_SC_COL_101	<i>K. pneumoniae</i>
SE_SC_COL_102	<i>K. pneumoniae</i>
SE_SC_COL_182	<i>K. pneumoniae</i>
SE_SC_COL_204	<i>K. pneumoniae</i>
H2_SC_COL_60	<i>K. pneumoniae</i>
SE_SC_COL_21	<i>K. pneumoniae</i>
SE_SC_COL_30	<i>K. pneumoniae</i>
SE_SC_COL_51	<i>K. pneumoniae</i>
SE_SC_COL_52	<i>K. pneumoniae</i>
SE_SC_COL_59	<i>K. pneumoniae</i>
SE_SC_COL_61	<i>K. pneumoniae</i>
SE_SC_COL_68	<i>K. pneumoniae</i>
SE_SC_COL_69	<i>K. pneumoniae</i>
SE_SC_COL_71	<i>K. pneumoniae</i>
SE_SC_COL_72	<i>K. pneumoniae</i>
SE_SC_COL_78	<i>K. pneumoniae</i>
SE_SC_COL_118	<i>K. pneumoniae</i>
SE_SC_COL_137	<i>K. pneumoniae</i>
SE_SC_COL_148	<i>K. pneumoniae</i>
SE_SC_COL_152	<i>K. pneumoniae</i>
SE_SC_COL_164	<i>K. pneumoniae</i>
SE_SC_COL_173	<i>K. pneumoniae</i>
SE_SC_COL_189	<i>K. pneumoniae</i>
SE_SC_COL_190	<i>K. pneumoniae</i>

H1_SC_COL_35	<i>K. pneumoniae</i>
H1_SC_COL_44	<i>K. pneumoniae</i>
H1_SC_COL_63	<i>K. pneumoniae</i>
H1_SC_COL_65	<i>K. pneumoniae</i>
H2_SC_COL_47	<i>K. pneumoniae</i>
H2_SC_COL_48	<i>K. pneumoniae</i>
H2_SC_COL_49	<i>K. pneumoniae</i>
H2_SC_COL_57	<i>K. pneumoniae</i>
H2_SC_COL_59	<i>K. pneumoniae</i>
H2_SC_COL_64	<i>K. pneumoniae</i>
H2_COL_79	<i>K. pneumoniae</i>
H2_SC_COL_118	<i>K. pneumoniae</i>

3.2. Metode

3.2.1. Izolacija genomske DNA *K. pneumoniae*

Genomska DNA izolirana je iz izolata *K. pneumoniae* (n=48) pomoću kompleta Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, SAD) prema uputama proizvođača.

Svi izolati korišteni u ovom istraživanju, prvo su pročišćeni do monokultura na krutim BHI podlogama te inkubirani pri 37 °C preko noći. Nakon inkubacije po jedna kolonija svakog izolata sterilno je inokulirana u zasebnu mikrotubicu s 1,5 mL tekuće BHI podloge i inkubirana pri 37 °C preko noći. Bakterijske stanice su zatim odvojene od tekuće podloge centrifugiranjem (16000 ×g/3 min).

Ovako pripremljenim staničnim peletima e dodano 600 µL pufera za lizu (eng. *Nuclei Lysis Solution*) i potpuno su resuspendirani laganim pipetiranjem. Zatim je stanična suspenzija inkubirana na 80 °C/5 min čime je postignuta potpuna liza stanica. Nakon toga uzorci su ohlađeni na sobnu temperaturu. Uzorcima je dodano 3 µL otopine RNaze (eng. *Rnase Solution*), nakon čega su promiješani laganim okretanjem tubice 2-5 puta i inkubirani pri 37 °C/45 min. Pod djelovanjem enzima RNaze u uzorcima je razgrađena RNA. Nakon što su uzorci ohlađeni na sobnu temperaturu, dodano im je 200 µL otopine za precipitaciju proteina (eng. *Protein Precipitation Solution*). Smjesa je homogenizirana kratkim vorteksiranjem u trajanju od 20 s, te inkubirana na ledu 5 min. DNA je odvojena od staničnih proteina centrifugiranjem na 16000 ×g tijekom 3 min. Supernatant s DNA prenijet je u čiste mikrotubice sa 600 µL etanola (70 %) sobne temperature, te odvojen od genomske DNA centrifugiranjem na 16000 ×g/2 minute. Zatim je etanol pažljivo otpipetiran, višak je uklonjen filter papirom i sušenjem na zraku 15 min. Genomska DNA rehidrirana je u 50 µL pufera za rehidrataciju (eng. *DNA Rehydration Solution*) pri 65 °C 1h.

Koncentracija i čistoća genomske DNA određena je spektrofotometrijski pomoću uređaja NanoPhotometer P300 (Implen, Njemačka). Genomska DNA svih izolata *K. pneumoniae* razrijeđena je na koncentraciju od 20 ng/μL u puferu za rehidraciju (Promega, SAD) te je korištena za genotipizaciju.

3.2.2. Genotipizacija izolata *K. pneumoniae* rep-PCR metodom

Prikupljeni izolati su grupirani pomoću rep-PCR metode (Domig i sur., 2014) kako bi se smanjio broj izolata *K. pneumoniae* za daljnje analize. Pri tom je korištena početnica GTG5 nukleotidnog slijeda 5' GTG GTG GTG GTG GTG 3' (Švec i sur., 2003). U tu svrhu, za svaki izolat pripremljena je reakcijska smjesa ukupnog volumena 25 μL (tablica 3.2).

Tablica 3.2. Sastav reakcijske smjese za rep-PCR.

Reagens	Početna koncentracija	Završna koncentracija	V (μL)
H ₂ O	/	/	19,6
DreamTaq pufer s MgCl ₂	10x pufer / 20 mM MgCl ₂	1x pufer / 2 mM MgCl ₂	2,5
dNTP	10 mM	0,4 mM	1,0
GTG5	100 pmol/μL	2 pmol/μL	0,5
DreamTaq polimeraza	5 U/μL	0,08 U/μL	0,4
DNA	20 ng/μL	0,8 ng/μL	1,0
Ukupan volumen			25,0

Reakcija je provedena u uređaju za PCR ProFlex PCR System (Applied biosystems, SAD). U tablici 3.3 navedeni su rep-PCR koraci, njihovo trajanje i temperature pri kojima su se odvijali.

Tablica 3.3. Uvjeti rep-PCR reakcije.

Dio PCR reakcije	Temperatura/vrijeme	Ciklus
Denaturacija	95 °C/7 min	x1
Denaturacija	90 °C/30 s	x30
Sparivanje početnica	40 °C/ 1 min	
Sinteza komplementarnih lanaca	65 °C/ 8 min	
Produljivanje lanca	65 °C/ 16 min	x1

Agaroznom gelu (2 %) dodano je 5 μL rep-PCR produkta pomiješanog sa 1μL 6x LD boje (Thermo Scientific, SAD). Također, u gel je dodano i 5 μL molekularnog biljega, Gene Ruler 1 kb (Thermo Scientific, SAD). Rep-PCR produkti su razdvojeni horizontalnom elektrofozozom

na 90 V/110 minuta. Nakon elektroforeze gel je bojan 30 min u otopini etidij bromida (0,2 %) i 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 *K. pneumoniae* je određena pomoću Dice koeficijenta. Izolati su zatim grupirani pomoću UPGMA (eng. *Unweight Paired Group Arithmetic Average*) algoritma. Za konstrukciju dendrograma korištena je razina tolerancije od 1 % i optimizacija 0,5 %. U daljnjim analizama korišteni su reprezentativni predstavnici odabranih grupa (n=12).

3.2.3. Određivanje minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije pčelinjeg otrova

Minimalna inhibitorna (MIK) i minimalna baktericidna (MBK) koncentracija pčelinjeg otrova određena je metodom serijske mikrodilucije (CLSI, 2012), a sastojala se od sljedećih koraka: priprema i provjera aplicirane bakterijske biomase, priprema koncentracijskog gradijenta pčelinjeg otrova u mikrotitarskoj ploči s 96 bunara, inokulacija ispitivanih sojeva i provjera MIK i MBK subkultivacijom na krutim BHI pločama.

Za pripremu bakterijske biomase, iscrpljeni su reprezentativni sojevi do monokultura na krutoj BHI podlozi, nakon čega su podloge inkubirane pri 37 °C/24 h. Za svaki soj pripremljena je stanična suspenzija, čiji turbiditet odgovara turbiditetu McFarland standarda 0,5 ($1,5 \times 10^8$ CFU/mL), dodavanjem pojedinačnih kolonija u 5 mL sterilne fiziološke otopine. Turbiditet staničnih suspenzija izmjeren je denzitometrom DEN-1 (Biosan, Latvija). Zatim su bakterijske suspenzije serijski razrijeđene u sterilnoj fiziološkoj otopini u omjeru 1:10 do koncentracije $1,5 \times 10^6$ CFU/mL tako što su dvije mikrotubice napunjene s 900 µL sterilne fiziološke otopine. U prvu mikrotubicu dodano je 100 µL bakterijske suspenzije čiji turbiditet odgovara turbiditetu McFarland standarda 0,5 te je vorteksirana. Nakon toga otpipetirano je 100 µL u drugu mikrotubicu te je smjesa vorteksirana. Koncentracija suspenzije u ovoj mikrotubici iznosila je $1,5 \times 10^6$ CFU/mL te se koristila za određivanje MIK.

Za pripremu koncentracijskog gradijenta pčelinjeg otrova, prvo je pripremljena radna otopina pčelinjeg otrova koncentracije 1200 µg/mL otapanjem 4,8 mg pčelinjeg otrova u 4 mL sterilne fiziološke otopine. Ovako pripremljena otopina pčelinjeg otrova je sterilno filtrirana kroz membranski filter promjera pora 0,22 µm (VWR International, Belgija).

Antibakterijski učinak pčelinjeg otrova prema *K. pneumoniae* je ispitan za raspon koncentracija od 12,5 do 800 µg/mL. Navedeni koncentracijski gradijent pripremljen je u mikrotitarskoj ploči s 96 bunara serijskim razrjeđenjem pčelinjeg otrova u tekućoj MH podlozi u omjeru 1:2. Prvo je u sve bunare u redu A dodano 90 µL tekuće MH podloge i 180 µL pčelinjeg otrova koncentracije 1200 µg/mL, pa je koncentracija pčelinjeg otrova u svim bunarima u redu A iznosila 800 µg/mL. Zatim je u svim bunarima u redovima B do H dodano 135 µL tekuće MH

podloge Multikanalnom pipetom je iz bunara u redu A prebačeno po 135 μ L u bunare u redu B. Potom je po 135 μ L iz bunara u redu B prebačeno u bunare u redu C. Postupak je ponovljen do reda G odakle je uklonjeno suvišnih 135 μ L. Bunari u redu H su sadržavali samo 135 μ L tekuće MH podloge i služili su za kontrolu bakterijskog rasta.

Svim bunarima u redovima A do H dodano je 15 μ L bakterijske suspenzije koncentracije $1,5 \times 10^6$ CFU/mL, nakon čega je koncentracija bakterijskih sojeva u mikrotitarskoj ploči iznosila $1,5 \times 10^5$ CFU/mL (slika 3.1).

		SE_SC_COL_46	SE_SC_COL_54	SE_SC_COL_61	SE_SC_COL_68	SE_SC_COL_86	SE_SC_COL_87	SE_SC_COL_96	SE_SC_COL_102	SE_SC_COL_173	SE_SC_COL_182	H2_SC_COL_118	H1_SC_COL_44
c(Ap) [μ g/ml]		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
800,0	A												
400,0	B												
200,0	C												
100,0	D												
50,0	E												
25,0	F												
12,5	G												
Kontrola	H												

Slika 3.1. Shematski prikaz mikrotitarske ploče za određivanje MIK i MBK pčelinjeg otrova. Ap – pčelinji otrov ili apitoksin. Sadržaj bunara prije inkubacije: redovi A do G – tekuća MH podloga + Ap + bakterijska suspenzija; red H – tekuća MH podloga + bakterijska suspenzija

Mikrotitarska ploča inkubirana je pri 37 °C/24 h uz stalno miješanje pri 90 okretaja/min (Orbital shaker-incubator ES-20, Biosan, Latvija). Nakon inkubacije vizualno su određene MIK vrijednosti za svaki soj *K. pneumoniae*. Najniža koncentracija kod koje je izostao bakterijski rast gdje zamućenje podloge predstavlja bakterijski rast, smatra se minimalnom inhibitornom koncentracijom.

Dodatno, provjerena je stvarna biomasa korištena za određivanje MIK i MBK vrijednosti metodom serijskog razrjeđenja. U tu svrhu, aplicirana biomasa ($1,5 \times 10^8$ CFU/mL)

je razrijeđena u sterilnoj fiziološkoj otopini u omjeru 1:10. U sve bunare u redovima B do H nove sterilne mikrotitarske ploče dodano je 180 µL sterilne fiziološke otopine, a u bunare u redu A po 200 µL bakterijske suspenzije odgovarajućeg soja *K. pneumoniae*. Zatim je pomoću multikanalne pipete prebačeno 20 µL iz bunara u redu A u bunare u redu B. Isti postupak je ponovljen do reda H. Za svaki soj po 5 µL svih razrjeđenja sterilno naciepljeno na krutu BHI podlogu u četiri ponavljanja. BHI ploče su zatim inkubirane su pri 37 °C/24 h. Nakon inkubacije prebrojane su narasle kolonije, te je izračunat broj bakterija prema formuli:

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

Nakon vizualnog očitavanja MIK pčelinjeg otrova, subkultivacijom na krutim BHI podlogama dodatno su provjerene MIK te su određene MBK vrijednosti pčelinjeg otrova. Po 5 µL svakog soja iz odgovarajućih bunara mikrotitarske ploče za određivanje MIK je sterilno naciepljeno na krute BHI podloge u četiri ponavljanja. BHI ploče inkubirane su pri 37 °C/24 h. Nakon inkubacije su prebrojane narasle kolonije te je izračunat broj umrlih bakterija prema formuli:

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

CFU1 – broj bakterija korišten za određivanje MIK pčelinjeg otrova

CFU2 – broj preživjelih bakterija nakon tretmana pčelinjim otrovom

MIK predstavlja najnižu koncentraciju kod kojih je postotak umrlih bakterija > 99,5 %, dok MBK predstavlja najnižu koncentraciju kod kojih je postotak umrlih bakterija > 99,9 %.

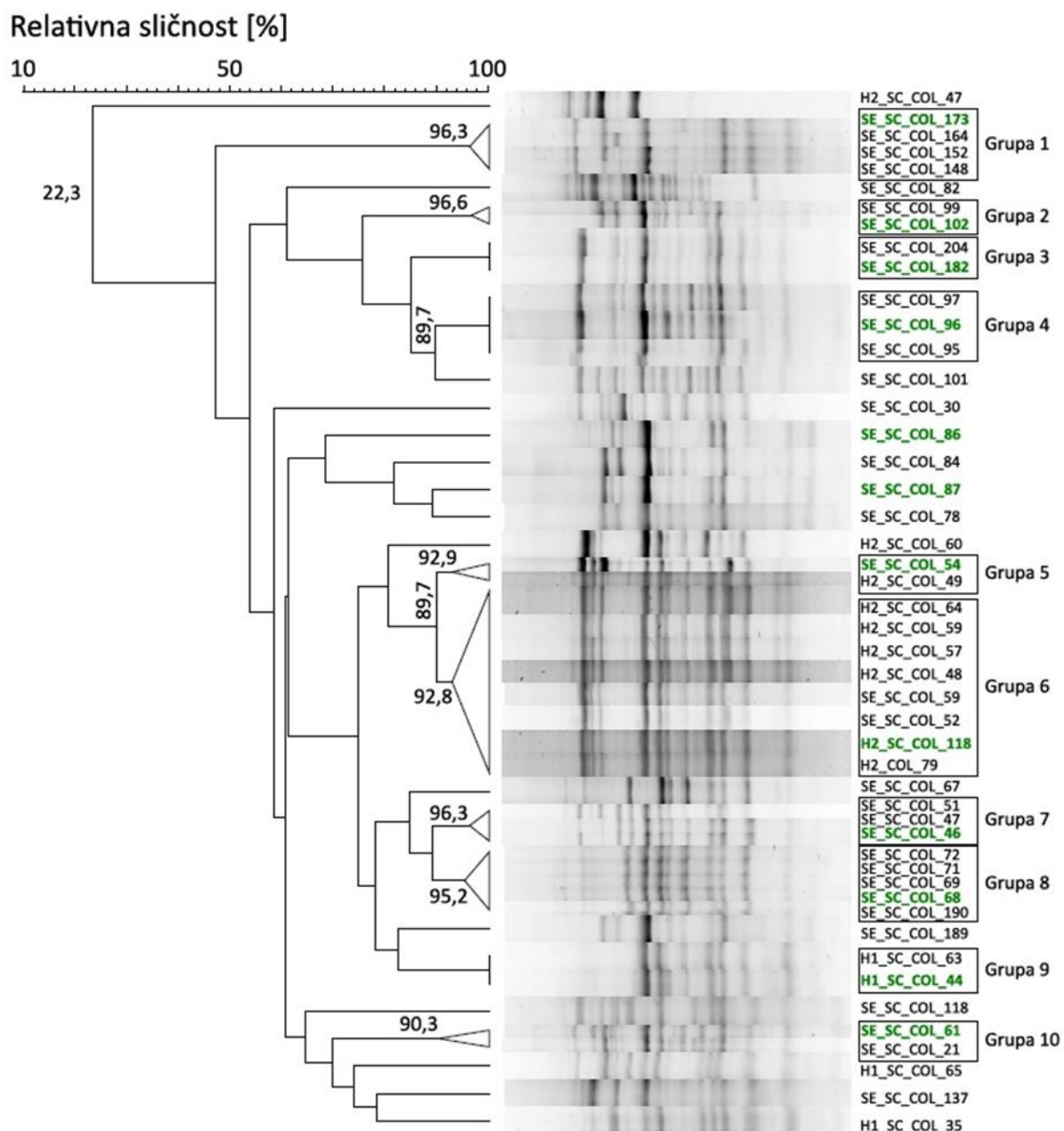
4. Rezultati

4.1. Grupiranje izolata rep-PCR metodom

U ovom istraživanju, korišteni sojevi *K. pneumoniae* grupirani su na temelju rep-PCR profila dobivenih amplifikacijom s GTG5 početnicom. Na temelju 90 % sličnosti, ispitivani sojevi grupirani su u 25 grupa. Tek 10 grupa sadrži više od jednog predstavnika, dok je u 15 grupa svrstan samo jedan predstavnik, što ukazuje na veliku varijabilnost sojeva unutar vrste *K. pneumoniae*.

Po dva soja *K. pneumoniae* svrstana su u 5 grupa: grupa 2 (96,6 % sličnosti), grupe 3 i 9 (100 % sličnosti), grupa 5 (92,9 % sličnosti) i grupa 10 (90,3 % sličnosti). Dvije grupe sadrže 3 soja: grupa 4 (100 % sličnosti) i grupa 7 (96,3 % sličnosti). Više od 3 soja sadrže grupa 1 (4 soja 96,3 % sličnosti), grupa 8 (5 soja 95,2 % sličnosti) i grupa 6 (8 soja 92,8% sličnosti). Između ostalih grupa sličnost varira od 22,3 do 89,7 % (slika 4.1).

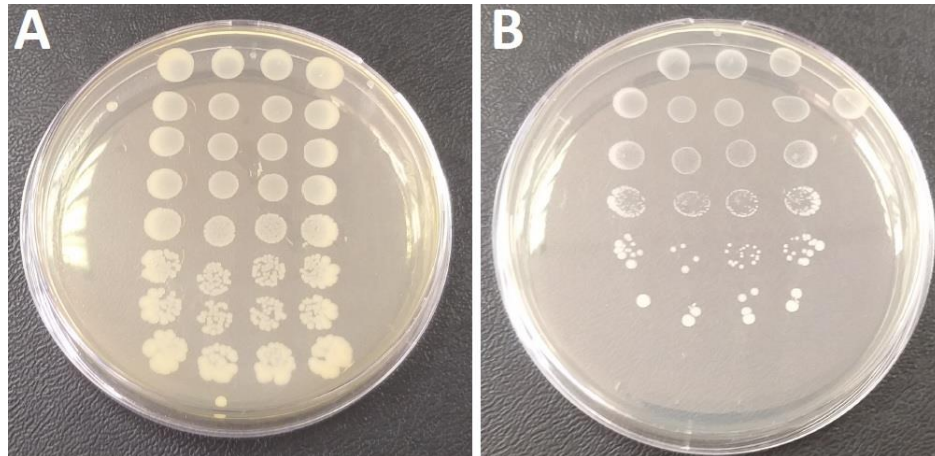
Kako bi se ispitao antibakterijski učinak pčelinjeg otrova na ovako izrazito varijabilne sojeve *K. pneumoniae*, za daljnje analize odabrani su reprezentativni predstavnici za svaku veliku grupu, tj. grupe s dva i više soja dva soja (n=10) i odabrane male grupe koje sadrže samo jedan soj (n=2).



Slika 4.1. Dendrogram sojeva *K. pneumoniae* konstruiran na temelju rep-PCR profila dobivenih amplifikacijom s početnicom GTG5. Grupe dobivene na temelju 90% sličnosti su uokvirene i označene 1-10, a reprezentativni sojevi korišteni u daljnjim analizama su deblje otisnuti i označeni zeleno.

4.2. Minimalne inhibitorne i baktericidne koncentracije pčelinjeg otrova

Minimalne baktericidne koncentracije za sve ispitane sojeve *K. pneumoniae* prvo su određene vizualno. Nakon vizualnog očitavanja, MIK i MBK vrijednosti dodatno su provjerene tj. određene subkultivacijom na krutim BHI podlogama (slika 4.2).



Slika 4.2. Određivanje MIK i MBK vrijednosti pčelinjeg otrova. A) kontrola biomase soja SE_SC_COL_96; B) subkultivacija soja SE_SC_COL_96 na krutoj BHI podlozi.

Tablica 4.1 Rezultati MIK i MBK vrijednosti

Soj	Vrsta	MIK ($\mu\text{g/mL}$)	MBK ($\mu\text{g/mL}$)
SE_SC_COL_46	<i>K. pneumoniae</i>	100	200
SE_SC_COL_54	<i>K. pneumoniae</i>	100	100
SE_SC_COL_61	<i>K. pneumoniae</i>	50	100
SE_SC_COL_68	<i>K. pneumoniae</i>	50	50
SE_SC_COL_86	<i>K. pneumoniae</i>	25	25
SE_SC_COL_87	<i>K. pneumoniae</i>	25	25
SE_SC_COL_96	<i>K. pneumoniae</i>	25	25
SE_SC_COL_102	<i>K. pneumoniae</i>	25	50
SE_SC_COL_173	<i>K. pneumoniae</i>	25	50
SE_SC_COL_182	<i>K. pneumoniae</i>	25	25
H2_SC_COL_118	<i>K. pneumoniae</i>	25	25
H1_SC_COL_44	<i>K. pneumoniae</i>	25	25

Pčelinji otrov djeluje inhibitorno i baktericidno na sojeve *K. pneumoniae* pri niskim koncentracijama. Također, njegovo antibakterijsko djelovanje se očituje unutar relativno uskog raspona koncentracija, pa tako pčelinji otrov inhibira rast *K. pneumoniae* u rasponu od 25-100 $\mu\text{g/mL}$, dok u rasponu od 25-200 $\mu\text{g/mL}$ ima baktericidni učinak (tablica 4.1).

U većini slučajeva MIK vrijednosti pčelinjeg otrova su jednake MBK vrijednostima. Iznimno, MBK vrijednosti su dvostruko veće od MIK vrijednosti.

Kao najotporniji sojevi pokazali su se SE_SC_COL_46 (MIK=100 µg/mL, MBK=200 µg/mL), te SE_SC_COL_54 (MIK=MBK=100 µg/mL) i SE_SC_COL_61 (MIK=50 µg/mL, MBK=100 µg/mL).

Najosjetljiviji sojevi su SE_SC_COL_86, SE_SC_COL_87, SE_SC_COL_96, SE_SC_COL_182, H2_SC_COL_118 te H1_SC_COL_44 na koje pčelinji otrov djeluje inhibitorno i baktericidno pri istim koncentracijama (MIK=MBK=25 µg/mL).

5. Rasprava

U velikom broju istraživanja dokazano je da pčelinji otrov uspješno inhibira rast različitih patogenih mikroorganizama. Ova spoznaja predstavlja dobru podlogu za razvoj novih strategija u borbi protiv bakterija otpornih na više klasa antibiotika (multirezistentnih bakterija), a koje imaju značajan utjecaj na ljudsko zdravlje.

U ovom istraživanju ispitan je učinak pčelinjeg otrova na karbapenem rezistentne sojeve *K. pneumoniae* metodom mikrodilucije na mikrotitarskim pločicama. Karbapenem rezistentni izolati *K. pneumoniae* (n=48) uspješno su izolirani iz otpadnih voda, a rep-PCR metodom određena je unutarvrсна raznolikost među ovom značajnom skupinom patogena te je reduciran broj sojeva za daljnju analizu. Rep-PCR metoda pokazala se kao izrazito korisna metoda. Na temelju analize rep-PCR obrazaca uočena je velika varijabilnost među sojevima *K. pneumoniae* te su uspješno selektirani reprezentativni sojevi (n=12) za daljnje analize.

Kako bi se utvrdio inhibicijski učinak pčelinjeg otrova određene su minimalna inhibitorna (MIK) i minimalna baktericidna (MBK) koncentracija. Rezultati su pokazali da pčelinji otrov ima inhibitorni i baktericidni učinak na odabrane sojeve *K. pneumoniae*. MIK vrijednost kretala se u rasponu od 25-100 µg/mL dok je MBK bila u rasponu od 25-200 µg/mL. Najčešće su MIK vrijednosti bile jednake MBK vrijednostima (SE_SC_COL_68 MIK=MBK= 50 µg/mL). U iznimnim slučajevima MBK vrijednost bila je jednaka dvostrukoj MIK vrijednosti (SE_SC_COL_61 MIK= 50 µg/mL, MBK= 100 µg/mL). Na čak polovinu tretiranih sojeva, SE_SC_COL_86, SE_SC_COL_87, SE_SC_COL_96, SE_SC_COL_182, H2_SC_COL_118 te H1_SC_COL_44, pčelinji otrov djelovao je inhibitorno i baktericidno pri koncentraciji od 25 µg/mL. Ovi sojevi pokazali su se najosjetljivijima na pčelinji otrov.

I ostale studije dokazale su antimikrobni učinak pčelinjeg otrova na mikroorganizme. Leandro i sur. (2013) istražili su učinak pčelinjeg otrova na *Streptococcus salivarius*, *S. sobrinus*, *S. mutans*, *S. sanguinis*, *Lactobacillus casei* i *Enterococcus faecalis*, koje se nalaze u usnoj šupljini te uzrokuju pojavu karijesa. MIK vrijednosti bile su u rasponu od 20-40 µg/mL, a melitin se pokazao kao najaktivnija komponenta pčelinjeg otrova s MIK vrijednostima od 4 do 40 µg/mL. Također, Picoli i sur. (2017) izolirali su *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa* iz goveđeg mlijeka, te ih tretirali melitinom. Rezultati su potvrdili antimikrobni učinak na sve vrste i sojeve, a *S. aureus* pokazao se kao najosjetljiviji s MIK=6-7 µg/mL i MBK=32-64 µg/mL.

Shabeeb i sur. (2020) izuzeli su po 60 uzoraka bivoljeg, te po 60 uzoraka kravljeg mlijeka, iz kojih su izolirali sojeve *S. aureus* te ih, između ostalog, tretirali pčelinjim otrovom i mjerili MIK i MBK vrijednosti. Pčelinji otrov pokazao je zadovoljavajuću antimikrobnu aktivnost, a boljim se pokazao kod sojeva izoliranih iz kravljeg mlijeka, s MIK vrijednostima 0,70-3,10 µg/mL, i MBK vrijednostima 0,12-0,101 µg/mL.

Općenito, u svim ovim istraživanjima raspon koncentracija pčelinjeg otrova bio je puno manji nego u ovom radu. Uzrok tome jest najvjerojatnije to što je većina istraživanih bakterija bila Gram-pozitivna, za razliku od *K. pneumoniae*, što je sukladno literaturnim navodima da je pčelinji otrov nešto učinkovitiji kod Gram-pozitivnih bakterija (Hegazi i sur., 2016).

Utjecaj pčelinjeg otrova na 16 sojeva *Salmonella enterica* izoliranih iz mesa peradi istražili su Arteaga i sur. (2019). MIK vrijednosti varirale su između 1,024-256 µg/mL, a primjena pčelinjeg otrova značajno je reducirala i formiranje biofilma. Očekivano, rezultati ovog istraživanja slični su rezultatima primjene pčelinjeg otrova na *K. pneumoniae*.

Mnogobrojna istraživanja vezana uz pčelinji otrov potvrdila su njegov antimikrobni učinak, a u ovom istraživanju dokazano je djelovanje na karbapenem rezistentne *K. pneumoniae*. Pčelinji otrov inhibirao je, ili u potpunosti zaustavio rast, reprezentativnih sojeva *K. pneumoniae*. S obzirom na rezultate ovog rada, evidentno je da pčelinji otrov predstavlja potencijal za razvoj antimikrobnih terapija u tretiranju multirezistentnih *K. pneumoniae*.

6. Zaključak

- Zbog rastuće prevalencije *K. pneumoniae* otpornih na karbapeneme i kolistin, raste potražnja za alternativnim antimikrobnim spojevima koji će efikasno inhibirati rast ove bakterije.
- Temeljem analize obrazaca dobivenih rep-PCR-om utvrđena je značajna varijabilnost unutar karbapenem rezistentnih izolata *K. pneumoniae* izoliranih iz otpadnih voda te su selektirani reprezentativni sojevi za daljnju analizu.
- Minimalna inhibitorna (MIK) i minimalna baktericidna (MBK) koncentracija pčelinjeg otrova određena je metodom serijske mikrodilucije.
- Utvrđeno je da pčelinji otrov djeluje inhibitorno i baktericidno na sojeve *K. pneumoniae* unutar relativno uskog raspona koncentracija od 25-100 µg/mL, dok u rasponu od 25-200 µg/mL ima baktericidni učinak.
- Učinak pčelinjeg otrova ovisi o njegovoj koncentraciji i soju *K. pneumoniae*
- Kao naosjetljivijim sojevima pokazali su se SE_SC_COL_86, SE_SC_COL_87, SE_SC_COL_96, SE_SC_COL_182, H2_SC_COL_118 te H1_SC_COL_44 na koje pčelinji otrov ima inhibitorni i baktericidni učinak pri koncentraciji od 25 µg/mL.

7. Popis literature

1. Andrews, J. M. (2001) Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48, 5-16.
2. Arteaga, V., Lamas, A., Regal, P., Miranda, J. M., Cepeda, A., Franco, C. M. (2019) Antimicrobial activity of apitoxin from *Apis mellifera* in *Salmonella enterica* strains isolated from poultry and its effects on motility, biofilm formation and gene expression. *Microbial Pathogenesis*, 137, 103771.
3. Boutrin, M. C. F., Foster, H. A., Pentreath, V. W. (2008) The effect of bee (*Apis mellifera*) venom phospholipase A2 on *Trypanosoma brucei brucei* and enterobacteria. *Experimental Parasitology*, 119, 246-251.
4. Carpena, M., Nunez-Estevez, B., Soria-Lopez, A., Simal-Gandara, J. (2020) Bee Venom: An Updating Review of Its Bioactive Molecules and Its Health Applications. *Nutrients*, 12, 3360.
5. Denissen, J., Reyneke, B., Waso-Reyneke, M., Havenga, B., Barnard, T., Khan, S., Khan, W. (2022) Prevalence of ESKAPE pathogens in the environment: Antibiotic resistance status, community-acquired infection and risk to human health. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 244, 114006.
6. 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.
7. EUCAST (1998) Definitive Document. Methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. Terminology. *Clinical Microbiology and Infection*, 4, 291-296.
8. Giani, T., Antonelli, A., Caltagirone, M., Mauri, C., Nicchi, J., Arena, F., Nucleo, E., Bracco, S., Pantosti, A., AMCLI-CoSA survey participants, Luzzaro, F., Pagani, L., Rossolini, G. M. (2017) Evolving beta-lactamase epidemiology in *Enterobacteriaceae* from Italian nationwide surveillance, October 2013: KPC-carbapenemase spreading among outpatients. *Euro Surveillance*, 22(31), 30583.
9. Hegazi, A., Abdou, A., El-Moez, S. I. A. (2014) Evaluation of the Antibacterial Activity of Bee Venom from Different Sources. *World Applied Sciences Journal*, 30(3), 266-270.
10. Jin, J. D., Lee, D. S., Shin, E. K., Kim, S. J., Jung, R., Hahn, T. W. (2006) Molecular typing by random amplification of polymorphic DNA (RAPD) and detection of virulence genes of *Salmonella enterica* subspecies enterica serovar Galliarum biovar gallinarum. *Journal of Veterinary Medical Science*, 68, 1321-1326.
11. Kalenić, S. (2013) *Medicinska mikrobiologija*. Medicinska naklada, Zagreb.
12. Kashefieh, M., Hosainzadegan, H., Baghbanijavid, S., Ghotaslou, R. (2021) The Molecular Epidemiology of Resistance to Antibiotics among *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Azerbaijan, Iran. *Journal of Tropical Medicine*, 9 pages.

13. Leandro, L. F., Mendes, C. A., Casemiro, L. A., Vinholis, A. H. C., Cunha, W. R., De Almeida, R., Martin, C. H. G. (2014) Antimicrobial activity of apitoxin, melittin and phospholipase A2 of honey bee (*Apis mellifera*) venom against oral pathogens. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 87(1), 147-155.
14. Li, W., Raoult, D., Fournier, P. E. (2009) Bacterial strain typing in the genomic era. *FEMS Microbiology Review*, 892-916.
15. Marroki, A., Bousmaha-Marokki, L. (2022) Antibiotic Resistance Diagnostic Methods for Pathogenic Bacteria. *Encyclopedia of Infection and Immunity*, Volume 4, 320-341.
16. Modanesi, M. S., Kadri, S. M., Ribolla, P. E. M., Alonso, D. P., Orsi, R. O (2014) Period and Time of Harvest Affects the Apitoxin Production in *Apis mellifera* Lineu (Hymenoptera: Apidae) Bees and Expression of Defensin Stress Related Gene. *Sociobiology*, 62(1), 52-55.
17. Moreno, M., Giralt, E. (2015) Three Valuable Peptides from Bee and Wasp Venoms for Therapeutic and Biotechnological Use: Melittin, Apamin and Mastoparan. *Toxins*, 7, 1126-1150.
18. Mujić, I., Alibabić, V., Travljanin, D. (2014) Prerada meda i drugih pčelinjih proizvoda. *Veleučilište u Rijeci, Rijeka*, 325.
19. Pascoal, A., Estevinho, M. M., Choupina, A. B., Sousa-Pimenta, M., Estevinho, L. M. (2019) An overview of the bioactive compounds, therapeutic properties and toxic effects of apitoxin. *Food and Chemical Toxicology*, 134, 110864
20. Picoli, T., Mendes Peter, C., Zani, J. L., Bressan Waller, S., Gomes Lopes, M., Neutzling Boesche, K., D'Avila Vargas, G., de Oliveira Huebner, S., Fischer, G., (2017) Melittin and its potential in the destruction and inhibition of the biofilm formation by *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from bovine milk. *Microbial pathogenesis*, 112, 57-62.
21. Poirel, L., Jayol, A., Nordmann, P. (2017) Polymyxins: Antibacterial activity, susceptibility, testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. *Clinical Microbiology Reviews*, 30, 557-596.
22. Podschun, R., Ullman, U. (1998) *Klebsiella spp.* as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods and Pathogenicity Factors. *Clinical Microbiology Reviews*, p. 589-603.
23. Sciacchitano, C. J. (1998) DNA fingerprinting of *Listeria monocytogenes* using enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) motifs-polymerase chain reaction/capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 19, 66-70.
24. Sheeb, A. K., Ghanim, A. F., Awayid, H. S. (2020) Antibacterial Activity Of Bee Venom Against Multidrug Resistance *Staphylococcus aureus* From Milk Of Cow And Buffaloes. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, 11, 2177-2182.
25. Sobral, F., Sampaio, A., Falcao, S., Queiroz, M. J. R. P., Calhelha, R. C., Vilas-Boas, M., Ferreira, I. C. F. R. (2016) Chemical characterization, antioxidant, anti-

- inflammatory and cytotoxic properties of bee venom collected in Northeast Portugal. Food and chemical toxicology, pp. 172-177.
26. Soldić, A. (2019) Određivanje udjela melitina u pčelinjem otrovu metodom tekućinske kromatografije. Diplomski rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet Osijek, Osijek.
 27. Sykes, J. E., Rankin, S. C. (2014) Chapter 3- Isolation and Identification od Aerobic and Anaerobic Bacteria. Canine and Feline Infectious Diseases, 17-28.
 28. 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.
 29. Tanuwidjaja, I., Svečnjak, L., Gugić, D., Levanić, M., Jurić, S., Vinceković, M., Mrkonjić Fuka, M. (2021) Chemical Profiling and Antimicrobial Properties of Honey Bee (*Apis mellifera L.*) Venom. Molecules, 26, 3049.
 30. Tenover, F. C. (2019) Antimicrobial Susceptibility Testing. Encyclopedia of Microbiology (Fourth Edition), 166-175.
 31. Todd, R., Donoff, R. B., Kim, Y., Wong, D. T. (2001) From the chromosome to DNA: restriction fragment length polymorphism analysis and its clinical application. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 59, 660-667.
 32. Vuotto, C., Longo, F., Balice, M. P., Donelli, G., Varaldo, P. E. (2014) Antibiotic Resistance Related to Biofilm Formation in *Klebsiella pneumoniae*. Pathogens, 3, 743-758.
 33. Zhang, L., Ma, X., Luo, L., Hu, N., Duan, J., Tang, Z., Zhong, R., Li, Y. (2020) The Prevalence and Characterization of Extended-Spectrum β -lactamase- and Carbapenemase-Producing Bacteria from Hospital Sewage, Treated Effluents and Receiving River. International Journal of Environmental Research and Public Health, 17, 1183.
 34. Zolfagharian, H., Mohajeri, M., Babaie, M. (2016) Bee venom (*Apis mellifera*) an effective potential alternative to gentamicin for specific bacteria strains- Bee venom an effective potential for bacteria. Journal of Pharmacopuncture, 19, 225-230.

8. Prilog

8.1. Popis kratica

°C	stupanj celzijus
ng	nanogram
µg	mikrogram
g	gram
µL	mikrolitar
mL	mililitar
µm	mikrometar
mM	milimol
pmol	pikomol
min	minuta
h	sat

Životopis

Anja Benc rođena je 10. ožujka 1997. godine u Zaboku. Djetinjstvo je provela u Pregradi, gdje je pohađala Osnovnu školu Janka Leskovara. Po završetku osnovnoškolskog obrazovanja 2012. godine, upisala je smjer Opće gimnazije u Srednjoj školi Krapina. 2016. godine upisuje preddiplomski studij Biljne znanosti na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. U sklopu studija, odradila je stručnu praksu na Zavodu za specijalnu proizvodnju bilja. Završni rad obranila je u rujnu 2019. godine, na temu „Utjecaj teksture i organske tvari na adsorpcijski kompleks tla“, te time stekla titulu Sveučilišne prvostupnice inženjerke biljnih znanosti. Iste godine, upisuje diplomski studij Agroekologije- Mikrobna biotehnologija u poljoprivredi. U sklopu diplomskog studija, također je odradila stručnu praksu, u laboratoriju Zavoda za mikrobiologiju.