

58. srečanje mladih raziskovalcev Slovenije 2024

PROTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST RAZLIČNIH VRST MEDU

Raziskovalna naloga

Raziskovalno področje Biologija

Avtorici: Lara Jernej Mladenič

Andreja Lovrec

Mentor: Dr. Jure Škraban, prof.

Somentorica: Dr. Sandra Janežič



II. GIMNAZIJA MARIBOR

Maribor, april 2024

KAZALO VSEBINE

Povzetek	VI
Zahvala	VII
Uvod	1
1.1 Hipoteze naloge	1
1.2 Metodologija dela	2
1.2.1 Pregled objav	2
1.2.1.1 Med v preteklosti	2
1.2.1.1.1 Zgodovina človeške uporabe medu	2
1.2.1.1.2 Med v prazgodovini	2
1.2.1.1.3 Med v starem Egiptu	3
1.2.1.1.4 Med v antični Grčiji	3
1.2.1.1.5 Med v času Rimljanov	4
1.2.1.1.6 Med v času Slovanov	5
1.2.1.1.7 Med v Indiji (ayuverda)	5
1.2.1.2 Med danes	6
1.2.1.3 Nastanek/pridelava medu	7
1.2.1.4 Sestava medu	7
1.2.1.4.1 Vsebnost vode	8
1.2.1.4.2 Ogljikovi hidrati	8
1.2.1.4.2.1 Monosaharidi	8
1.2.1.4.2.2 DISAHARIDI	8
1.2.1.4.2.3 OLIGOSAHARIDI	9
1.2.1.4.2.4 POLISAHARIDI	9
1.2.1.4.3 Kisline v medu	9
1.2.1.4.4 Encimi	10

1.2.1.4.4.1	DIATAZA	10
1.2.1.4.4.2	INVERTAZA	10
1.2.1.4.4.3	GLUKOZA-OKSIDAZA.....	11
1.2.1.4.4.4	KATALAZA	11
1.2.1.5	Antimikrobne snovi v medu	11
1.2.1.5.1	PEROKSIDNI SISTEM INHIBINOV	12
1.2.1.5.2	NEPEROKSIDNI SISTEM INHIBINOV	12
1.2.1.6	Vrste medu.....	13
1.2.1.6.1	Med iz nektarja.....	13
1.2.1.6.2	Med iz mane	13
1.2.1.6.2.1	Kostanjev med	14
1.2.1.6.2.2	Medicinski kostanjev med.....	14
1.2.1.7	Industrijska pridelava medu.....	14
1.2.2	MATERIAL IN METODE	15
1.2.2.1	Aseptično delo	15
1.2.2.2	Materiali	16
1.2.2.3	Metode.....	16
1.2.2.3.1	Priprava umetnega medu.....	16
1.2.2.3.2	Priprava medenih razredčin.....	17
1.2.2.3.3	Cepitev bakterij na agarjevo ploščo.....	18
1.2.2.3.4	Izdolbitev luknjic v agarjevo ploščo	19
1.2.2.3.5	Nanos medu v luknjice.....	19
1.2.2.3.6	Merjenje pH.....	20
1.2.2.3.7	Inkubacija bakterij	20
1.2.2.3.8	Merjenje inhibicijskih con	21
2	Teoretični del	23
2.1	REZULTATI.....	23

2.1.1	Delovanje medu v odvisnosti od vrste	23
2.1.2	Delovanje medu v odvisnosti od razredčitve	24
2.1.3	Primerjava inhibicijskih con posameznih vrst medu	28
2.2	Razprava.....	30
3.	družbena odgovornost	35
4.	zaključek in sklepi.....	36
5.	viri in literatura.....	39
5.1	Spletni viri.....	39
5.2	Knjižni viri	42
6.	Priloge.....	1
	Priloga 1 (intervju s čebelarjem).....	1

KAZALO SLIK

Slika 1:Jamska poslikava “Človek iz Bicipa”(University of Bristol, 2015)	3
Slika 2:Čebelnjak iz časa Rimljanov (Cerati, 2020)	4
Slika 3:Freska, ki prikazuje nabiranje medu (Trodden, 2018)	5

KAZALO TABEL

Tabela 1:Delovanje medu v odvisnosti od vrste – izolat 8504.....	23
Tabela 2:Delovanje medu v odvisnosti od vrste – izolat 8498.....	23
Tabela 3:Inhibicijske cone vseh vrst medu in njihovih redčin za izolat 8504.....	24
Tabela 4:Inhibicijske cone vseh vrst medu in njihovih redčin za izolat 8498.....	25
Tabela 5:Povprečne inhibicijske cone vseh vrst medu v odvisnosti od redčitve za izolat 8504	26
Tabela 6:Povprečne inhibicijske cone vseh vrst medu v odvisnosti od redčitve za izolat 8498	27

KAZALO GRAFIKONOV

Grafikon 1:Primerjava inhibicijskih con originalov in redčin – izolat 8504.....	25
Grafikon 2:Primerjava inhibicijskih con originalov in redčin – izolat 8504.....	26
Grafikon 3:Primerjava povprečne inhibicijske cone originalov in redčin za oba izolata	27
Grafikon 4:Primerjava inhibicijskih con industrijskega cvetličnega medu in domačega cvetličnega medu – izolat 8504.	28
Grafikon 5:Primerjava inhibicijskih con industrijskega cvetličnega medu in domačega cvetličnega medu – izolat 8498.	28
Grafikon 6:Primerjava inhibicijskih con domačega kostanjevega medu in medicinskega kostanjevega medu – izolat 8504.....	29
Grafikon 7:Primerjava inhibicijskih con domačega kostanjevega medu in medicinskega kostanjevega medu – izolat 8498.....	29

POVZETEK

Med človeka spremlja že tisočletja, zaradi česar je predmet mnogih raziskav. Z raziskovalnim delom sva s pomočjo virov, od prvih spoznanj do najsodobnejših rezultatov raziskav, spoznavali lastnosti in uporabo medu. Posebej so naju zanimala protimikrobne sposobnosti medu, ki pripomorejo k inhibiciji bakterij.

V raziskovalni nalogi sva predstavili rezultate o inhibicijskih sposobnostih različnih vrst medu in njihovih redčin. Rezultate sva pridobili s cepljenjem dveh izolatov bakterije *Staphylococcus aureus* na agarjeva gojišča, ki so bila na petih mestih izpostavljena določeni vesti medu ali njegovi redčini.

Ugotovili sva, da na inhibicijsko sposobnost medu vpliva vrsta kot tudi redčenje ter da glede na način pridelave medu vsaka vrsta medu bakterij ne inhibira.

Zaradi različnega izvora se vrste medu razlikujejo po sestavi npr. vsebnosti sladkorjev, encimov po viskoznosti itd. Prav te razlike so razlog za razlike v inhibicijskih sposobnostih različnih vrst medu.

Ključne besede:

- Protibakterijske lastnosti
- Različne vrste medu
- Redčenje
- Encimi v medu
- Viskoznost
- *Staphylococcus aureus*

ZAHVALA

Raziskovalna naloga je nastala z željo, da bi dobljeni rezultati pomagali drugim. Vendar nama raziskovalne naloge ne bi uspela izvesti brez strokovne in moralne podpore večih oseb. Zato bi se radi zahvalili vsem tistim, ki so nama pomagali, ko je to bilo še kako potrebno.

Iz srca se zahvaljujema mentorju, za vso njegovo znanje, podporo, kritike in pohvale.

Zahvaljujema se tudi smentorici za vso strokovno pomoč pri izvedbi eksperimentalnega dela naloge.

Gospodu čebelarju Čagran se zahvaljujema za priskrbljene vzorce medu, brez katerih naloge ne bi bilo mogoče izvesti.

Hvala tudi najinima družinama za vso finančno, še posebej pa moralno podporo. Hvala, ker naju spodbujate v vsem, kar počneva.

Zahvalili bi se tudi vsem, ki so kakorkoli pripomogli k nastanku te naloge in jih nisva posebej imenovali.

UVOD

Odkar obstaja človek, obstajajo tudi bolezni in vprašanje kako jih zdraviti. Z eksponentnim napredkom v medicini smo skozi zgodovino postajali vse uspešnejši, kljub temu pa ne smemo zanemariti nekaterih naravnih načinov, kako se ozdraviti. Pomembno mesto med temi in mnogimi drugimi darovi narave zaseda prav med. Za človeško telo predstavlja vir energije. Je kakovosten nadomestek za beli sladkor in takojšnja hrana za srce in mišice. Z encimi, vitamini, mineralnimi snovmi in drugimi telesu nujno potrebnimi snovmi, ki so v medu zastopani v sledovih, krepi naš imunski sistem. Vsebuje pa tudi elemente, ki delujejo antibakterijsko. Torej, med lahko uporabljamo kot sladilo, živilo ali zdravilo. Namen najine raziskovalne naloge je s pomočjo literature preučiti zgodovino medu, njegovo današnjo vsestransko uporabo, njegov nastanek in predstaviti različne vrste le-tega. Ključni del najinega raziskovalnega dela pa je seveda laboratorijsko eksperimentiranje, s katerim želiva raziskati in dokazati antibakterijske lastnosti petih vrst medu. Zanima naju predvsem antibakterijska aktivnost slovenskega medu v odvisnosti od vrste in razredčevanja, saj točno teh podatkov nisva še nikjer zasledili. Iskreno upava, da bo raziskovalna naloga prinesla veliko uporabnih rezultatov, ki bodo pripomogli k nadaljnjim raziskavam. Posebno pozornost posvečava ozaveščenju o primerni izbiri medu, če želimo doseči njegove zdravilne učinke. Meniva, da je široko razširjena nevednost med potrošniki, ki pogosto posegajo po industrijsko pridelanem medu, ne da bi vedeli, da morda ne bo imel pričakovanih učinkov, velik problem današnjega časa.

Hipoteze naloge

S predhodnim prebiranjem literature sva oblikovali naslednje hipoteze:

1. Medicinski med bo najbolj inhibiral bakterije.
2. Laboratorijsko pripravljen med ne bo inhibiral bakterij.
3. Domači med ima boljše protibakterijske lastnosti kot industrijski.
4. Redčenje medu vpliva na njegove protibakterijske lastnosti (bolj kot je med razredčen, slabše so njegove inhibicijske sposobnosti).

1.1 Metodologija dela

1.1.1 Pregled objav

1.1.1.1 Med v preteklosti

1.1.1.1.1 Zgodovina človeške uporabe medu

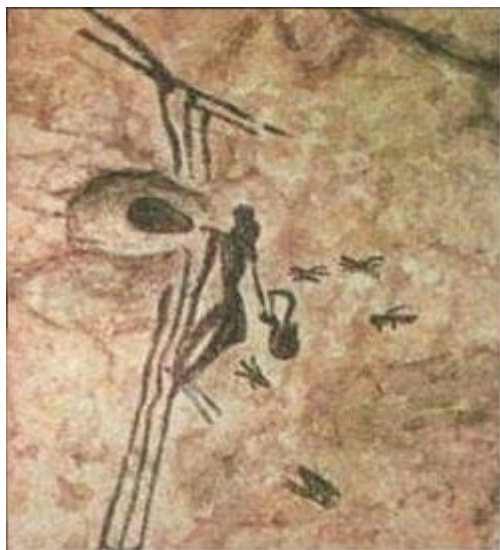
Človek in med se prepletata že več kot 8000 let, kot to prikazujejo jamske poslikave. Uporaba medu je zaznamovala človeško zgodovino skozi stoletja, ne le kot sladilo ter zdravilno sredstvo, temveč tudi kot simbol, pomemben pri verskih in kulturnih obredih. Dejstvo je, da se je način uporabe medu skozi čas in prostor razlikoval, vseskozi pa je bil smatran kot dragocenost. Hipokrat, oče medicine, ga je priporočal kot antiseptik, med tem ko so egipčani (zraven uporabe za medicinske namene) z njim častili bogove in embalmirali mrtve. V nadaljevanju je povzetih nekaj primerov civilizacij in njihove uporabe medu v svojem času.

1.1.1.1.2 Med v prazgodovini

V prazgodovini je med igral pomembno vlogo kot ena najzgodnejših pridobitev človeštva. Skozi arheološke najdbe lahko vidimo, kako so ljudje tistega časa že v zgodnjih obdobjih razvoja človeške civilizacije zbirali med ter čebelji vosek ter kako se je ta praksa širila po svetu. (Stokstad, 2015)

V raziskavah so analizirali več tisoč lončenih posod iz neolitika in v njih našli sledi čebeljega voska. Tedanji kmetje so to lončenino po vsej verjetnosti uporabljali za izločanje medu iz oropane satja. Vosek so verjetno tudi uporabljali kot gorivo za svetilke. (Fessenden, 2015)

Najstarejši dokazi o uporabi medu oz. voska segajo 9000 let nazaj, na območje Turčije. (University of Bristol, 2015)



Slika 1: Jamska poslikava "Človek iz Bicorpa"(University of Bristol, 2015)

Najstarejše znane omembe zbiranja medu izvirajo iz okoli 8000 let starih jamskih poslikav v jami Araña v Španiji. Slika, ki se imenuje "Človek iz Bicorpa", prikazuje osebo, katera se povzpenja po pleteni lestvi do satja, s košaro v roki. Iz tega lahko razberemo predvsem to, da so jim čebelji proizvodi že takrat bili karseda pomembni, bodisi za prehrano ali zdravila, saj so se, da so med pridobili zelo potrudili. (University of Bristol, 2015)

1.1.1.1.3 Med v starem Egiptu

V času starega Egipta je bil med eno izmed, če ne najbolj uporabljano zdravilo. Omenja se ga v kar 500 od 900 zdravilnih pripravkov. Zraven tega so ga uporabljali za embalmiranje svojih mrtvih, kar dobro nakazuje njegove antibakterijske lastnosti (več o tem kasneje) - te so koristne za celjenje ran, prav tako pa tudi za ohranjanje tkiva. (Local Hive, 2019)

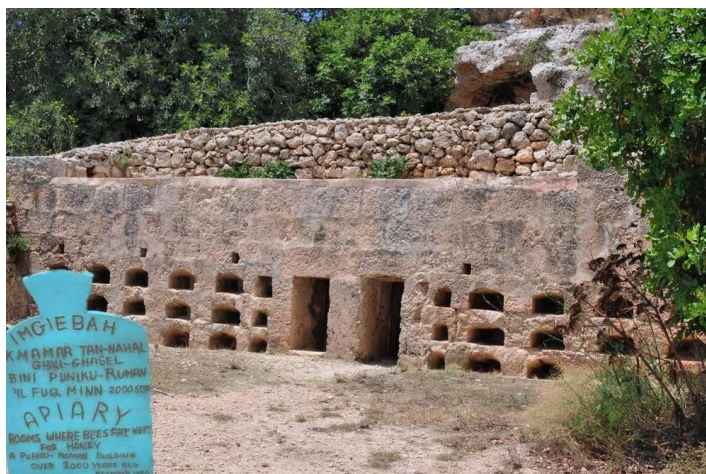
1.1.1.1.4 Med v antični Grčiji

Učinkovitost medu kot zdravila je bila v antični Grčiji dobro poznana; bil je uporabljen za mnoge zdravilne sirupe, tablete in marmelade, prav tako tudi elektuarije. Hipokrat, veliki grški znanstvenik in oče medicine je priporočal preprosto prehrano, ki je vključevala med kot oksimel (kis in med) za bolečine, hidromel (voda in med) za žejo, oenomel (med in nefermentiran grozdni sok, ki je sicer pijača) za putiko in določene živčne motnje ter mešanico vode in drugih različnih zdravilnih snovi za vročine. Prav tako bi naj med uporabljal za plešavost, kontracepcijo, celjenje ran, odvajalni učinek, kašelj in vneto grlo, bolezni oči, topično

antiseptiko ter preprečevanje in zdravljenje brazgotin. (The olive table, b.d. in Healthy with honey, 2019).

1.1.1.1.5 Med v času Rimljanov

Rimljan Plinij starejši, ki je vso znanje o takratnem svetu zapisal v zbirki knjig "Naravoslovje", je o medu napisal, da pomaga pri težavah v ustih, pljučnici ter kačjem piku. (Ritaroberts's Blog, 2013)



Slika 2: Čebelnjak iz časa Rimljanov (Cerati, 2020)

Med je bil stalnica v prehrani Rimljanov. Apikultura je bila splošno znana in spoštovana umetnost, čebelnjaki pa so bili razkošni, obsežni ter številni. (Cerati, 2020)

1.1.1.1.6 Med v času Slovanov

Začetek pridobivanja medu v Slovanski kulturi se v zgodovinskih virih razlikuje, enoten podatek je le to, da so divja plemena, ki so živela v 4.-7. stoletju pr. n. št. že poskušala pridobiti med. Njegove zdravilne lastnosti so bile znane; uporabljal se je kot sestavina zdravil in mazil ter kot del tradicionalne medicine. Z njim so zdravili različne bolezni in težave, verjeli so v njegovo sposobnost zdravljenja in pomiritve. (Trodden, 2018)



Slika 3: Freska, ki prikazuje nabiranje medu (Trodden, 2018)

1.1.1.1.7 Med v Indiji (ayuverda)

Ayuverda je beseda sestavljena iz “ayus” ki pomeni življenje ter “verda” ki se nanaša na sistem znanja. Tako se Ayuverda lahko grobo prevede kot “znanje o življenju”. Starodavna verdska civilizacija je med smatrala kot eno izmed najbolj cenjenih daril narave. Tradicionalno, po besedilih Ayuverde, je med blagoslov za tiste z oslabljenim prebavnim sistemom. Poudarek je tudi na tem, da je uporaba medu zelo koristna, pri zdravljenju kašlja in drugih bolezni, povezanih z grlom, usti (naj bi ohranjal zobe in dlesni), ipd. Že stoletja se uporablja za zdravljenje nespečnosti, priporoča se ga za kožne bolezni (rane in opekline), bolečine, palpitacije srca, bolezni pljuč in anemije. Med ima v Ayuverdi dolgo zgodovino uporabe pri različnih težavah z očmi (tudi preprečevanje sive mreže). Če se vsakodnevno nanese na oči izboljša vid. (Basic, 2013)

1.1.1.2 Med danes

Med je čudež narave, ki ga delajo čebele in njegova uporaba sega globoko v človeško zgodovino, kot je predstavljeno v predhodnem poglavju. Danes ima med številne vloge v našem vsakdanjem življenju, od kulinarike do zdravstva in lepote industrije.

Kulinarična uporaba medu je raznolika in bogata. Kot naravno sladilo se pogosto dodaja čaju in pekovskim izdelkom. Vendar pa med ni le sladek dodatek; njegov kompleksen okus in tekstura ga naredita nepogrešljivega v številnih receptih. Uporablja se v omakah, marinadah, prelivih in tradicionalnih jedeh po vsem svetu.

Poleg svoje vloge v kuhinji ima med tudi številne koristi za zdravje. Je naravni vir energije in vsebuje številne hranilne snovi vključno z vitamini, minerali in antioksidanti. Zaradi svojih antibakterijskih lastnosti se v ljudski medicini uporablja za lajšanje kašlja in zdravljenje opeklin. Lahko pa pomaga celo pri preprečevanju bolezni srca (znižuje krvni tlak, izboljšuje raven maščob v krvi, uravnava srčni utrip in preprečuje smrt zdravih celic). Številni ljudje prisegajo na vsakodnevni vnos medu kot del zdrave prehrane. (Shoemaker, 2018)

V lepotni industriji med cenijo predvsem zaradi njegovih vlažilnih lastnosti. Uporablja se v številnih kozmetičnih izdelkih, kot so kreme, maske in balzami za ustnice. Koncentracija medu v teh izdelkih se giblje med 1 in 10 odstotkov. Deluje pa kot indukcija citokinov in izražanja matrične metaloproteinaze ter epitelno-mezenhimski prehod v poškodovani povrhnjici. (Burlando in Cornara, 2013)

Pridelava medu igra ključno vlogo tudi v ohranjanju okolja. Čebele so pomembne za opraševanje rastlin, kar neposredno vpliva na pridelavo hrane. S trajnostno pridelavo medu skrbimo ne le za čebele, ampak tudi za ekosisteme, ki so odvisni od njihove dejavnosti. (UNEP, 2022)

Da povzamemo vlogo medu v današnjem času; med ni le sladilo, ampak pravo naravno bogastvo z mnogimi koristmi za človeka. Njegova vloga seže onstran kulinarike, kjer je po uporabi najbolj znan med ljudmi. Prav tako dopolnjuje zdravstveno, lepotno in celo pivovarsko industrijo. Zatorej sta varstvo čebel in trajnostna pridelava medu ključna za ohranjanje te dragocene dobrine za prihodnje generacije ter za vzdrževanje ekosistemskega ravnovesja.

1.1.1.3 Nastanek/pridelava medu

Nastajanje medu je proces pri katerem sodelujejo čebele raznolikih vlog in traja približno 45 dni. Začne se z vsaj 21 dni starimi pašnimi čebelami, ki nabirajo nektar (medičino) in mano (Maes honey, 2021) Nektar ali medičina je sladek sok, izloček cvetov večine cvetnic, ki jih oprahujejo žuželke. Sestavljen je pretežno iz vode in sladkorjev. Mana je sladek, lepljiv sok, ki ga izločajo žuželke, kot so listne uši, kaparji in medeči škržat, ki se hranijo s floemskimi sokovi dreves. V njihovem prebavnem traku pride do pretvorbe ogljikovih hidratov in beljakovin s pomočjo encimov, vendar njihov organizem vsrka le majhen delež novonastalih snovi. Presežek žuželke izločijo v obliki kapljic, ki jih imenujemo mana.

(Čebelarska zveza Slovenije, b.d. in Kandolf Borovšak, 2019). Pridelava medu se glede na izvor ne razlikuje (*priloga 1*). Obe snovi pašne čebele shranijo v medeni želodček. V njem čebele iz žlez izločajo encime in s tem pričnejo proces pretvorbe nektarja ali mane v med. Vsebino mednega želodčka pašne čebele oddajo mlajšim panskim čebelam, ki nadaljujejo pridelavo medu. Sladki sok v mednem želodčku ima v tej fazi še preveliko vsebnost vode, zato panjske čebele vsakih 5 do 10 sekund s posebnimi gibi iztiskajo vsebino svojega mednega želodčka, tako da se kot kapljica prikaže na koncu njihovega rilčka, kjer se pred vrnitvijo v medni želodček par sekund suši. Po 15 do 20 minut se izloči približno 50% vode, koncentracija sladkorja pa se poveča za 10 do 25%. (Kandolf Borovšak, 2019) Nadaljna odstranitev odvečne vode in zorenje medu se nadaljuje v celicah satja, kamor čebele plapolajo s krili, da preprečijo nabiranje dodatne vlage. (Maes Honey, 2021) V do treh dneh se med zaradi encimov zgosti, med zorenjem se spremeni tudi njegova sestava, saj se saharoza razkraja v fruktozo in glukozo hkrati pa nastajajo tudi višji sladkorji. Kot vzporedni produkt nastaja tudi vodikov peroksid, ki preprečuje rast mikroorganizmov. (Kandolf Borovšak, 2019) Zrel med vsebuje manj kot 20% vode, vendar je priporočljivo, da vsebuje manj kot 17% vode, kar je ponavadi takrat, ko sta pokriti dve tretjini sata. (Čebelarska zveza Slovenije, b.d.) Zrel med je v satje zaprt z voščenimi pokrovcami ter shranjen kot zaloga hrane.

1.1.1.4 Sestava medu

Med je živilo sestavljeno iz mnogih različnih kemičnih spojin. Največji delež predstavljajo različni sladkorji in voda, manjši delež pa razne organske kisline, vitamini, encimi,

aminokisline... Na sestavo medu vplivajo predvsem botanični izvor, geografski izvor in razni geografski dejavniki, kot so temperatura, podnebje ter količina padavin. (Čebelarska zveza Slovenije, b.d.)

1.1.1.4.1 Vsebnost vode

Kot je bilo že omenjeno zreli med vsebuje 20% vode ali manj, delež vode pa vpliva viskoznost medu in posledično tudi na njegovo kakovost. Večja viskoznost, torej manjša vsebnost vode medu, onemogoči delovanje ozmofilnih kvasovk, kar prepreči fermentacijo in med naredi bolj kakovostem in obstojen. (Čebelarska zveza Slovenije, b.d.)

1.1.1.4.2 Ogljikovi hidrati

Prevladujoča sestavina medu so sladkorji, ki spadajo med ogljikove hidrate. Ogljikovi hidrati so organske spojine iz ogljika, vodika in kisika s splošno formulo $(CH_2O)_n$. Količina in razmerje posameznih oblik sladkorja v medu je odvisna predvsem botaničnega porekla, encimov, sestave nektarja ter klimatskih razmer. Fruktaza in glukoza skupaj predstavljata največji delež vseh sladkorjev v medu in sicer med 85 in 95%, ostali delež pa predstavljajo razni disaharidi in oligosaharidi. (Kozlar, 2007)

1.1.1.4.2.1 Monosaharidi

Monosaharidi so organske spojine iz 2 do 6 ogljikovih atomov ter več kot eno hidroksilno skupino (-OH) in eno karbonilno skupino (C=O). (Britannica, 2023) Prav monosaharidi predstavljajo največjo količino sladkorjev v medu in sicer med 85 in 95 %. Monosaharida glukoza in fruktoza skupaj tvorita mešanico imenovano invertni ali reducirajoči sladkor. Medovi iz mane načeloma vsebujejo manj invertnega sladkorja od medov in nektarja. Običajno velja, da med vsebuje več fruktoze kot glukoze, njuno razmerje pa je močno odvisno od botaničnega izvora medu. (Kozlar, 2007)

1.1.1.4.2.2 DISAHARIDI

Disaharidi so ogljikovi hidrati sestavljeni iz natanko dveh monosaharidov povezanih z glikozidno vezjo. (Britannica, b.d.) V medu je več disaharidov od katerih sta najpomembnejša in najbolj zastopana saharoza in maltoza. (Kozlar, 2007) Saharoza je v vodi dobro topen disaharid, sestavljen iz fruktoze in glukoze. (Britannica, b.d.) Vsebnost saharoze v medu je

načeloma majhna in sicer povprečno 5g/100g, saj se v pod vplivom vode in čebeljega encima saharaze razgradi na glukozo in fruktozo. (Kozlar, 2007) 10. Člen slovenskega pravilnika o medu dovoljuje vsebnost največ 5% saharoze. Izjeme so gozdni med, čist ali v mešanici s cvetličnim medom, akacijev in sivkin med, kjer je dovoljena vsebnost saharoze največ 10%. (Uradni list, 1999)

Vsebnost drugega najbolj zastopanega disaharida v medu, torej maltoze je odvisna od geografskega porekla in se lahko med medovi različnih držav izjemno spreminja. (Kozlar, 2007)

1.1.1.4.2.3 OLIGOSAHARIDI

V medu se najdejo tudi različni oligosaharidi. To so kovalentno vezane verige treh do devetih monosaharidnih enot. Večina oligosaharidov v medu se nahaja v obliki trisaharidov, vendar je njihova vsebnost v primerjavi z monosaharidi in disaharidi precej manjša.

1.1.1.4.2.4 POLISAHARIDI

So ogljikovi hidrati iz več kot devet monosaharidnih enot, ki jih v naravnem medu ne najdemo. Z njihovo pomočjo se lahko odkrije, če je bil med ponarejen.

1.1.1.4.3 Kisline v medu

Med je kislo živilo z nizko pH vrednostjo, ki znaša med 3,2 in 6,5. Iz kislosti medu lahko sklepamo tudi o njegovi pristnosti, saj bo pri dodatku neinvertirane saharoze manj kisel, pri dodatku industrijsko invertirane saharoze pa bolj kisel kot ponavadi, saj pri razpadu saharoze lahko nastanejo še nekatere kisline.

Med vsebuje tako anorganske kisline od katerih je najpomembnejša fosforjeva kislina, kot tudi precej organskih kislin, kot so očetna, citronska, mravljična, mlečna, glukonska itn. Večinoma izvirajo iz čebeljih žlez, lahko so vmesni členi bioloških procesov ali pa izvirajo iz nektarja in mane. Kisline dajejo medu ne samo značilen okus vendar prispevajo tudi k njegovi

obstoynosti, proti mikroorganizmom, povečajo število kemijskih reakcij ter antibakterijsko in antioksidativno aktivnost. V medu je prevladujoča glukonska kislina. (Kozlar, 2007)

1.1.1.4.4 Encimi

Encimi so beljakovine, ki katalizirajo biokemijske reakcije. Vplivajo na naravo in značilnost medu ter ga ločijo od ostalih vrst sladil. Pri procesu nastajanja medu imajo ti pomembno vlogo predvsem pri pretvorbi mane in nektarja v med. Encimi v medu izvirajo iz nabranega nektarja in mane ter kot izločki različnih čebeljih žlez. Najpomembnejši encimi v medu so:

- Diastaza
- Invertaza
- Glukoza-oksidaža
- Katalaza
- Kislá fosfataza

Zaradi toplotne občutljivosti se ti encimi uporabljajo tudi kot kriterij za določanje kakovosti medu. (Ovček, 2007)

1.1.1.4.4.1 DIASTAZA

Diastazo ali amilazo med dobi deloma iz nektarja ter cvetnega prahu, večinoma pa iz izločkov žlez v čebelji golši. Ločimo dva encima in sicer α -amilazo, ki povzroči naključno hidrolizo molekul škroba in β -amilazo, ki odceplja enote maltoze na koncih verig škroba. Pomembna lastnost diastaze je, da je zelo toplotno občutljiva, saj se njena aktivnost sorazmerno s temperaturo zmanjšuje. α -amilaza preneha delovati pri 60°C, β -amilaza pa pri 50°C. Na podlagi aktivnosti encima, ki se izraža z diastaznim številom je možno določiti kakovost medu. (Huber in Jocić, 2011)

1.1.1.4.4.2 INVERTAZA

Je encim, ki katalizira reakcijo pretvorbe saharoze v invertni sladkor. Večinoma izvira iz čebeljih krmilnih žlez, deloma pa lahko tudi iz nektarja in mane. Ker mana vsebuje še invertazo iz črevesja in sline insektov, imajo medovi iz mane na splošno večjo vsebnost encima. Invertaza je na segrevanje in skladiščenje še bolj občutljiva od diastaze. Aktivnost encima se lahko izraža z invertaznim številom, ki se načeloma giblje med 10 in 25. (Ovček, 2007)

1.1.1.4.4.3 GLUKOZA-OKSIDAZA

Glukoza-oksidaža je encim, ki v medu katalizira oksidacijo glukoze v glukonsko kislino in vodikov peroksid. V medu prevladujoča glukonska kislina je v veliki meri odgovorna za njegov nizek pH. Skupaj z vodikovim peroksidom pa medu med zorenjem prispevata antibakterijski učinek. Encim se k medu primeša med zorenjem iz izločkov krmilnih žlez čebel, za oksidacijo in posledično delovanje encima pa je nujno potrebna voda. Prav zato se z zorenjem in izgubo vode v medu aktivnost encima zmanjšuje. V dozorelem medu se njegova aktivnost ustavi, vendar se encim ponovno aktivira, če med razredčimo z vodo. Posledica je lahko sprememba pH vrednosti medu na vrednost primerno za delovanje encima. (Ovček, 2007)

1.1.1.4.4.4 KATALAZA

Je encim, ki v medu razgrajuje nastali vodikov peroksid v vodo in kisik.. Katalaza izvira pretežno iz medicinske in cvetnega prahu. Katalazna aktivnost je odvisna od cvetnega prahu, njegove količine in porekla. Nižja kot je katalazna aktivnost manj vodikovega peroksida se razgradi, kar posledično poveča antibakterijski učinek medu. (Ovček, 2007)

1.1.1.5 Antimikrobne snovi v medu

V medu se najdejo razne protibakterijske snovi imenovane baktericidi in inhibini, ki mikroorganizme uničijo ali pa inhibirajo njihovo rast.

Vzrokov za antimikrobno delovanje medu je več, eden katerih je visoka vsebnost sladkorjev. Največji delež sestave medu predstavljajo sladkorji, ki v njem ustvarijo visok osmotski pritisk in visoko viskoznost. Posledično, večji kot je delež sladkorjev, manjši je delež vode, kar še dodatno zavira rast mikroorganizmov, ki za rast potrebujejo večji delež vode.

K antimikrobnemu delovanju pripomoreta tudi nizek pH, ki preprečuje rast ne-acidofilnih organizmov, torej organizmov, ki na višjo koncentracijo kislin niso prilagojeni. Poleg kislin ima zaviralno vlogo tudi vsebnost dušika. Dušik je nujno potreben za tvorbo celic, njegova manjša vsebnost lahko tako zavira celično delitev.

Glede na delovanje poznamo dva inhibicijska sistema:

- toplotno in svetlobno labilni peroksidni sistem inhibinov
- toplotno in svetlobno stabilni neperoksidni sistem inhibinov

(Ferjančič idr., 2022)

1.1.1.5.1 PEROKSIDNI SISTEM INHIBINOV

Peroksidni sistem inhibinov predstavlja v medu nastal vodikov peroksid, skupaj z encimom glukozo-oksidazo, odgovorno za nastanek vodikovega peroksida, in encimom katalazo, odgovorno za njegovo razgradnjo. Zaradi različne vsebnosti prej omenjenih encimov se količina vodikovega peroksida med medovi različnega izvora razlikuje. velja tudi, da vodikov peroksid zaradi majhne koncentracije vode v zrelem medu ne nastaja več. (Ferjančič idr., 2022)

Vodikov peroksid je sam po sebi povezan z ireverzibilnimi oksidativnimi poškodbami membran, beljakovin encimov in DNA v bakterijah. Znana je tudi korelacija med vsebnostjo vodikovega peroksida in inhibicijo rasti bakterij v medu. v medovih z večjo koncentracijo vodikovega peroksida je tako zaznana tudi večja protibakterijska aktivnost. Kljub korelaciji se pojavi problem, saj je med sestavljen iz več kot 100 različnih spojin, ki lahko reagirajo z vodikovim peroksidom in vplivajo na oksidativno aktivnost medu. Posledica tega je lahko večja ali manjša antimikrobna aktivnost medu. Raziskava (Brudzynski idr., 2011) narejena z bakterijama *E. coli* in *B. subtilis* je pokazala, da ima vodikov peroksid v medu antimikrobno aktivnost in razgrajuje DNA v bakterijskih celicah. Kljub temu, je na učinek vodikovega peroksida močno vplivala občutljivost bakterij in njihova strategija preživetja ter prisotnost drugih spojin v medu. (Brudzynski idr., 2011)

1.1.1.5.2 NEPEROKSIDNI SISTEM INHIBINOV

Raziskave neperoksidnih snovi z antimikrobnim delovanjem v medu so pokazale, da so to hlapne, toplotno stabilne snovi neznanega porekla in lizocim. V propolisu smolnatih snovi, ki jih čebele uporabijo, da prevlečejo satje in preprečijo rast mikroorganizmov so prisotne snovi, ki spadajo v skupino flavonoidov, prisotnost katerih je posledično tudi v medu. Ti lahko v med pridejo s sekundarno difuzijo iz celic satja ali pa jih čebele primešajo v med s smolnimi snovmi. (Ferjančič idr., 2022)

1.1.1.6 Vrste medu

Med lahko čebele proizvedejo iz nektarja ali mane. Tako poznamo veliko različnih vrst medu, ki se med seboj razlikujejo ne samo po izvoru, temveč tudi po barvi, vonju, okusu in sestavi. Med je poimenovan po rastlini iz katere čebele pridobijo večji del nektarja ali mane. V Sloveniji je največ mešanega medu, torej cvetličnega ali gozdnega. (Kozlar, 2007)

1.1.1.6.1 Med iz nektarja

Cvetlični med, med katerega uvrščamo akacijev, ajdov, cvetlični, regratov, repičin, sončnični in deloma lipov in kostanjev med, je med, pridobljen iz cvetličnega nektarja ali medičine. (Čebelarska zveza Slovenije, b.d.) Nektar je sestavljen pretežno iz sladkorjev in vode. Odstotek sladkorja se spreminja in znaša med 3 in 72%, odstotek vode pa tako znaša med 28 in 97%. Nektar v manjših količinah vsebuje še razne druge snovi kot so rudninske snovi, dušikove spojine, organske kisline, vitamini itn. (Kozlar, 2007)

Za cvetlični med je značilna svetlejša barva in izrazito sladek okus ter vonj in aroma cvetlice iz katere med izvira. (Čebelarska zveza Slovenije, b.d.) Cvetlični medovi spadajo med najbolj pogoste ter po sestavi zelo raznolike medove. Pester izbor cvetlic iz katerih je nabran nektar še dodatno vpliva na prej omenjeno svetlo obarvanost medu. (Esenko 2018, str 143-144)

1.1.1.6.2 Med iz mane

Med iz mane, med katerega uvrščamo smrekov, hojev, gozdni, lipov in kostanjev med je pridobljen iz izločkov insektov na živih delih rastlin ali izločkov živih delov rastlin, ki jih imenujemo mana. (Čebelarska zveza Slovenije, b.d.) Mana sestavljajo pretežno sladkorji, v njej pa najdemo še razne dušikove spojine, vitamine, organske kisline, sterole itn. Mana je za razliko od nektarja precej bogata z rudninskimi snovmi, predvsem spojinami kalija, magnezija in fosforja. (Kozlar, 2007)

Med iz mane je tako temnejši, bolj moten in adheziven od medu iz nektarja. Ima tudi višjo pH vrednost ter vsebuje več mineralnih snovi, različnih sladkorjev, aminokislin in encimov. (Čebelarska zveza Slovenije, b.d.)

1.1.1.6.2.1 Kostanjev med

Kostanjev med je temno rdeče barve, grenkega okusa in značilnega vonja po kostanjevem cvetu. Grenčina in vonj medu sta posledica njegove velike vsebnosti cvetnega prahu. (Esenko 2018, str 145)

1.1.1.6.2.2 Medicinski kostanjev med

Medicinski med se uporablja kot mazilo za oskrbo kroničnih in akutnih ran, opeklin, površinskih ran, ognojkov in tujkov. (Lekarnar.com,) Celjenje ran bi naj pospeševala visoka osmotska aktivnost, ki je posledica visoke vsebnosti sladkorjev in nizke vsebnosti vode. Prav tako medicinski kostanjev med omogoča vlažno celjenje, deluje protimikrobno, antioksidativno in protivnetno. (Sanolabor)

1.1.1.7 Industrijska pridelava medu

Za industrijsko predelavo sveže nabrani med najprej precedijo in prefiltrirajo ter s tem odstranijo odvečne materiale kot so cvetni prah, propolis in vosek. Filtraciji sledi segrevanje medu, ki nima standardnih smernic za najugodnejšo temperaturo in čas segrevanja. Temperature segrevanja lahko znašajo od 30 do 140°C, čas segrevanja pa od par sekund do tudi več ur. Optimalni pogoji segrevanja so odvisni predvsem od botaničnega in geografskega izvora medu.

Segrevanje medu služi lažjemu stekleničenju, saj medu zmanjša viskoznost. Segrevanje prav tako zmanjša vsebnost vode v medu in uniči nekatere mikroorganizme, kar posledično podaljša obstojnost medu ter zmanjša možnost fermentacije. Čeprav je segrevanje ključen postopek pridelave industrijskega medu, zmanjšuje njegovo kakovost. Razlog za to je, da segrevanje razkraja vitamine v medu in uničuje njegove encime, ki se pogosto uporabljajo prav za klasifikacijo kakovosti medu. Pasterizacija npr. uniči encim invertazo, ki katalizira pretvorbo saharoze v invertni sladkor. (Madrige Journal of Food Technology, 2019)

1.1.2 MATERIAL IN METODE

1.1.2.1 Aseptično delo

Za delo v mikrobiološkem laboratoriju je nujno potrebna aseptična tehnika, da preprečimo kontaminacijo vzorca, ki bi lahko privedla do napačnih rezultatov ter da preprečimo infekcijo sebe in drugih. Kontaminacijo vzorca preprečimo tako, da onemogočimo dostop nezaželenim mikroorganizmom. Infekcijo sebe ter drugih preprečimo tako, da mikroorganizmov ne razširjamo po prostoru. (Habulin in Primožič, 2008)

Sami sva za to poskrbeli tako, da sva metode, kjer so bile prisotne bakterije izvajali v digestoriju. S tem sva preprečili širjenje mikroorganizmov po prostoru in posledično možnost okužbe. Ker ima digestorij svoje prezračevanje, je bila tudi kontaminacija vzorca z mikroorganizmi iz okolja preprečena.

Pri aseptičnem delu moramo poskrbeti tudi, da uporabljamo sterilno steklovino, pripomočke ter sterilna gojišča za gojenje mikroorganizmov. Le tako zagotovimo, da bodo rezultati eksperimenta pravilni. (Habulin in Primožič, 2008)

Tudi sami sva pazili na uporabo sterilnih pripomočkov ter gojišč. Pri uporabljenih pipetah sva za vsak vzorec medu uporabili svojo konico. Za vsak vzorec sva uporabil tudi svežo, sterilno kapalko. Prav tako sva pazili na uporabo sterilnih vatiranih palčk za vsako agarjevo ploščo pri postopku cepitve bakterij, kot tudi na uporabo sterilnih plastičnih palčk ter pipet pri Izdolbitvi luknjic v agarjeve plošče.

Vse uporabljene pripomočke kot so kapalke, konice pipet vatirane ter plastične palčke sva po uporabi odvrgli med posebne odpadke namenjene kontaminiranim pripomočkom.

1.1.2.2 Materiali

- zaščitna halja
- zaščitne rokavice
- Kuhinjski lonec
- Lesena kuhalnica
- Merilni valj
- Steklena posoda za shranjevanje
- Merilna žlička velikosti ¼ čajne žličke
- Saharoza
- Soda bikarbona
- Citronska kislina
- žlička
- 5 vrst medu (umetni, poceni cvetlični med, domač cvetlični med, domač kostanjev med in medicinski kostanjev med)
- 2 različna izolata bakterij *Staphylococcus aureus*
- fiziološka raztopina
- električna tehcnica
- plastične epruvete
- alkoholni flomaster
- vortex mešalnik
- agarjeve plošče
- vatirane palčke
- pipete
- plastične palčke
- kapalke
- pH lističi s spektrom med 4 in 6
- inkubator
- ravnilo

1.1.2.3 Metode

1.1.2.3.1 Priprava umetnega medu

- 70 g saharoze
- ¼ čajne žličke sode bikarbne
- ¼ čajne žličke citronske kisline
- 30 ml vode
- Kuhinjski lonec
- Lesena kuhalnica
- Električna tehcnica

- Merilni valj
- Steklена posoda za shranjevanje
- Merilna žlička velikosti ¼ čajne žličke

Najino delo sva pričeli s pripravo umetnega medu, ki sva ga uporabili kot kontrolo. S kontrolo sva tako preverili ali so inhibicijske lastnosti samo posledica višje viskoznosti ter nižjega pH ali posledica sestavin (npr. encimov), ki jih najdemo samo v čebeljem medu.

Prvi korak priprave umetnega medu je bila priprava saharoze in vode. Z električno tehtnico sva najprej natehtali 70 g saharoze ter z merilnim valjem izmerili 30 ml vode. Vodo sva nato zavreli v kuhinjskem loncu, lonec odstranili iz ognja ter vodi primešali natehtano saharozo. Z leseno kuhalnico sva nato mešanico vode in saharoze premešali in jo ponovno postavili na ogenj. Mešanico sva nato segrevali dokler ni dosegla približno 80 °C. Po doseženih 80 °C sva v kuhinjski lonec z mešanico dodali še ¼ čajne žličke citronske kisline, ki pospeši postopek nastanka umetnega medu. Novonastalo mešanico sva nato dalje segrevali na 80 °C za približno 2 uri. Nastajajoči umetni med je bilo potrebno neprestano mešati, da se niso naredile grudice. Na koncu sva dodali še ¼ čajne žličke sode bikarbone, ki je zaradi svojih bazičnih lastnosti mešanico nekoliko nevtralizirala. Za konec sva nastali umetni med prelili v stekleno posodo za shranjevanje, kjer sva ga pustili ohlajati. (land.decoratepro.com, b.d.)

1.1.2.3.2 Priprava medenih razredčin

material:

- 5 vrst medu
- fiziološka raztopina
- merilni valj
- električna tehtnica
- žlička
- plastične epruvete
- alkoholni flomaster
- vortex mešalnik

Nadaljevali sva s pripravo medenih razredčin z razmerjem medu in fiziološke raztopine 1:1, katerih vpliv na inhibicijo bakterij sva kasneje tako kot vpliv čistega medu tudi preizkusili. Najprej sva plastične epruvete z alkoholnim flomastrom označili, da sva kasneje vedeli razredčina katerega medu se nahaja v kateri epruveti. Nato sva v vsako epruveto na električni tehtnici natehtali 10 g medu. Medicinski med sva v epruveto kar izstisnili, pri tehtanju ostalih

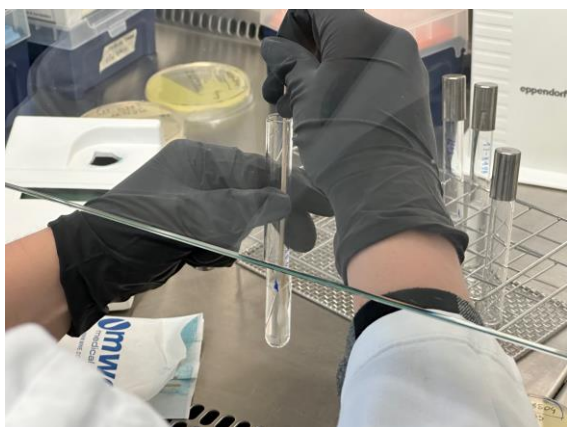
vrst medu pa sva si zaradi njihove viskoznosti pomagali z žličko. V vsako epruveto sva z merilnim valjem odmerili tudi 10 ml fiziološke raztopine, ki sva jo uporabili kot razredčilo. Razmerje med medom in fiziološko raztopino je tako bilo 1:1. V zadnjem koraku priprave medenih razredčin sva vsebino vseh petih epruvet premešali z vortex mešalnikom, do točke, v kateri se je med v fiziološki raztopini popolnoma razgradil.

1.1.2.3.3 Cepitev bakterij na agarjevo ploščo

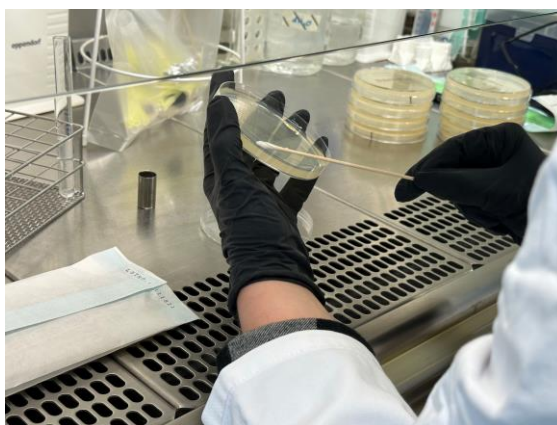
materiali:

- 2 različna izolata bakterij *Staphylococcus aureus*
- agarjeve plošče
- vatirane palčke

Cepitev bakterij sva izvajali v digestoriju in s tem zavarovali sebe pred okužbo z bakterijami ter kontaminacijo gojišč z nezaželenimi snovmi. Suspenzijo bakterij sva pripravili tako, da sva 2-3 bakterijske kolonije iz agarске plošče prenesli v 3 ml fiziološke raztopine. Postopek sva nadaljevali tako, da sva vatirano palčko namočili v suspenzijo bakterij. Z brisom sva nato premazali celotno površino agarjeve plošče. Pri tem sva pazili da sva agarjeve plošče premazali iz treh različnih smeri in tako zagotovili, da so se bakterije razmnožile po celotnem gojišču ter da so neinhibirani predeli posledica inhibicijskih lastnosti medu. Postopek sva ponovili dokler nisva imeli 10 trdnih gojišč bakterij izolata 8498 *Staphylococcus aureus* - izolat 8498 in 10 trdnih gojišč bakterij *Staphylococcus aureus* izolat 8504 . Vse skupaj sva tako imeli 20 trdnih gojišč.



Fotografija 1: Cepitev bakterij na agarjevo ploščo



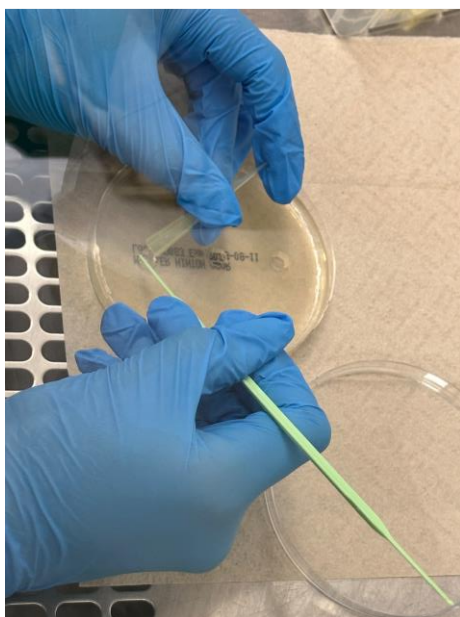
Fotografija 2: Cepitev bakterij na agarjevo ploščo 2

1.1.2.3.4 Izdolbitev luknjic v agarjevo ploščo

materiali:

- pripravljena trdna gojišča bakterij
- pipete
- plastične palčke

Delo je še vedno potekalo v digestoriju, kjer sva s v vsako agarjevo ploščo izdoblili 5 luknjic v katere sva kasneje nanесли med. Tukaj se nama je pojavil problem, kako to sploh izvesti, vendar sva našli inovativno rešitev ter luknjice izdoblili s širšo stranjo konice za pipetiranje. Prav tako sva si pomagali s plastičnimi paličicami, da sva del agarjeve plošče, ki je predhodno zapolnjeval luknjo odstranili. Vsaka luknja je predstavljala eno ponovitev eksperimenta, z več ponovitvami sva si zagotovili bolj natančne rezultate.



Fotografija 3: Izdolbitev luknjic v agarjevo ploščo

1.1.2.3.5 Nanos medu v luknjice

Materiali:

- 5 vrst medu
- 5 razredčin medu
- pripravljena trdna gojišča bakterij z izdobljenimi luknjicami
- kapalke

V vsako izdobljeno luknjico sva v digestoriju nanesli med ali razredčino medu. Vsaka agarjeva plošča prekrita s posamezno suspenzijo bakterij je bila namenjena eni vrsti medu oz. njegovi razredčini. Zaradi visoke viskoznosti medu sva naleteli na problem s pipetiranjem in tako raje uporabili kapalke, da sva med in prav tako razredčine nanesli v luknjice. Za vsako vrsto medu in razredčine sva uporabili svežo kapalko in tako preprečili kontaminacijo s preostalimi vrstami medu in razredčin.



Fotografija 4: Nanos medu v luknjice

1.1.2.3.6 Merjenje pH

metriali:

- pH lističi s spektrom med 4 in 6
- 5 vrst medu
- 5 razredčin medu

V tem postopku sva originalom medu izmerili pH vrednost. Ker je med kislo živilo s pH vrednostjo med 3,2 in 6,5 sva za merjenje uporabili pH lističi s spektrom med 4 in 6. Dobljene podatke sva vnesli v naprej pripravljene tabele. V tem postopku sva preverili, da imajo vse vrste medu nizek pH približno enake vrednosti, saj bi ta lahko vplival na njihove inhibicijske sposobnosti.

1.1.2.3.7 Inkubacija bakterij

- pripravljena trdna gojišča bakterij z nanešenim medom ali medeno razredčino
- inkubator

Vsa gojišča bakterij sva nato postavili v inkubator s 37°C, temperaturo najbolj ugodno za bakterijsko rast. Gojišča sva v inkubatorju pustili 24 ur, da so se bakterije hitro razrasle.

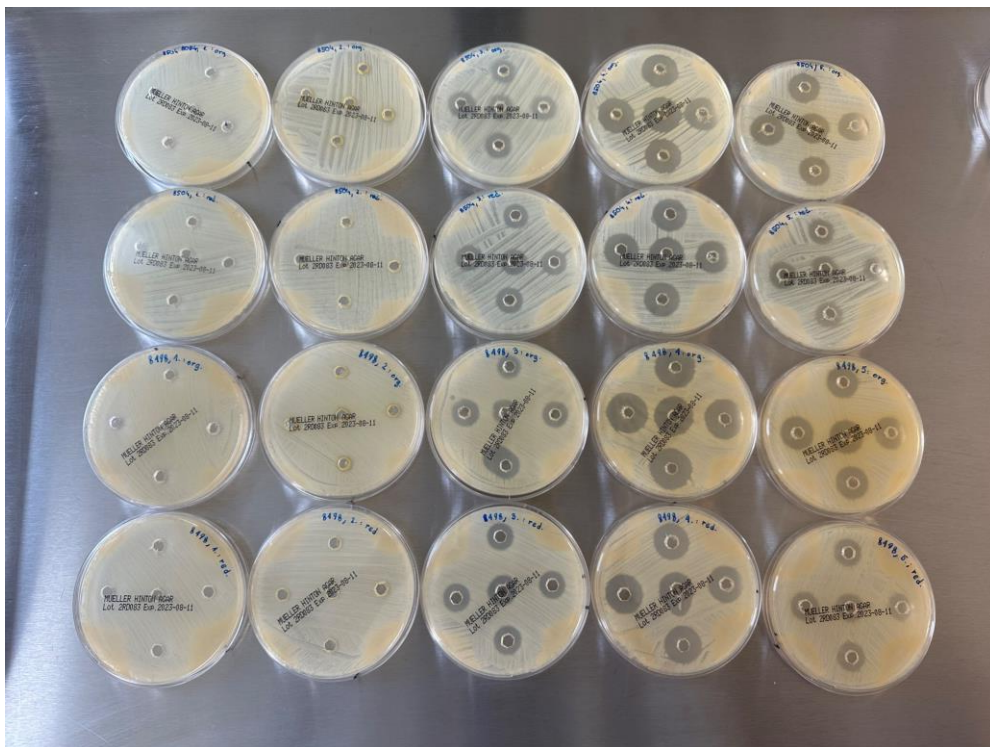


Fotografija 5: Agarjeve plošče v inkubatorju

1.1.2.3.8 Merjenje inhibicijskih con

- Gojišča z medom in razmnoženimi bakterijami
- ravnilo

Po 24 urah sva gojišča razraslih se bakterij vzeli iz inkubatorja. Nato sva za vsako luknjo na posamezni agarjevi plošči izmerili inhibicijsko cono bakterij oz. premer dela gojišča okoli medu na katerem se bakterije niso razmnožile. Postopek sva ponovili za vsako izmed 20 gojišč in vse podatke vnesli v naprej pripravljene tabele.



Fotografija 6: Agarjeve plošče po inkubaciji

2 TEORETIČNI DEL

2.1 REZULTATI

2.1.1 Delovanje medu v odvisnosti od vrste

Tabela 1: Delovanje medu v odvisnosti od vrste – izolat 8504

Vrsta medu	Delovanje medu
Umetni med	1
Poceni cvetlični med	1
Cvetlični med	2
Kostanjev med	4
Medicinski med	3

Tabela 2: Delovanje medu v odvisnosti od vrste – izolat 8498

Vrsta medu	Delovanje medu
Umetni med	1
Poceni cvetlični med	1
Cvetlični med	2
Kostanjev med	4
Medicinski med	3

Legenda:

1 - ne inhibira (inhibicijska cona je 0 mm)

2 - malo inhibira (inhibicijska cona je 10 - 15 mm)

3 - dobro inhibira (inhibicijska cona je 15 - 20 mm)

4 - zelo dobro inhibira (inhibicijska cona je več kot 20 mm)

2.1.2 Delovanje medu v odvisnosti od razredčitve

Tabela 3: Inhibicijske cone vseh vrst medu in njihovih redčin za izolat 8504

Inhibicijske cone (mm)						
Vzorec	1	2	3	4	5	povprečje (mm)
1. org .	0	0	0	0	0	0.0
2. org .	0	0	0	0	0	0.0
3. org .	14	15	15	14	14	14.4
4. org .	22	21	21	20	23	21.4
5. org .	18	19	20	18	19	18.8
1. red .	0	0	0	0	0	0.0
2. red .	0	0	0	0	0	0.0
3. red .	14	15	15	16	14	14.8
4. red .	19	18	20	20	20	19.4

5. red	15	13	15	14	14	14.2
--------	----	----	----	----	----	------

Grafikon 1: Primerjava inhibicijskih con originalov in redčin – izolat 8504

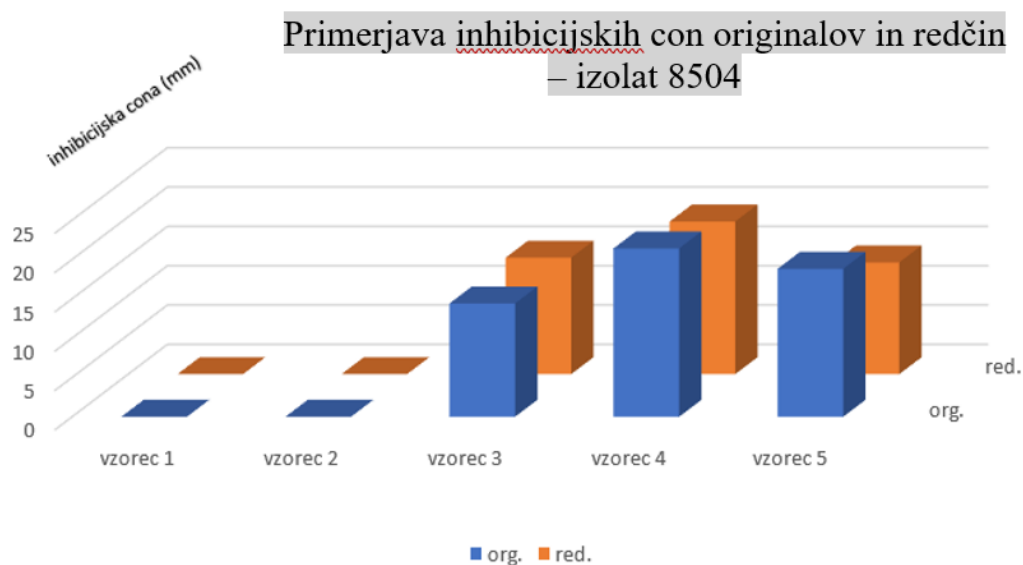


Tabela 4: Inhibicijske cone vseh vrst medu in njihovih redčin za izolat 8498

Inhibicijske cone (mm)						
Vzorec	1	2	3	4	5	povprečje (mm)
1. org	0	0	0	0	0	0.0
2. org	0	0	0	0	0	0.0
3. org	15	14	13	13	15	14
4. org	20	22	20	22	23	21.4
5. org	17	18	17	18	17	17.4

.						
1. red.	0	0	0	0	0	0.0
2. red.	0	0	0	0	0	0.0
3. red.	14	14	13	15	14	14
4. red.	19	18	18	20	20	19
5. red.	14	15	14	15	14	14.4

Grafikon 2: Primerjava inhibicijskih con originalov in redčin – izolat 8498

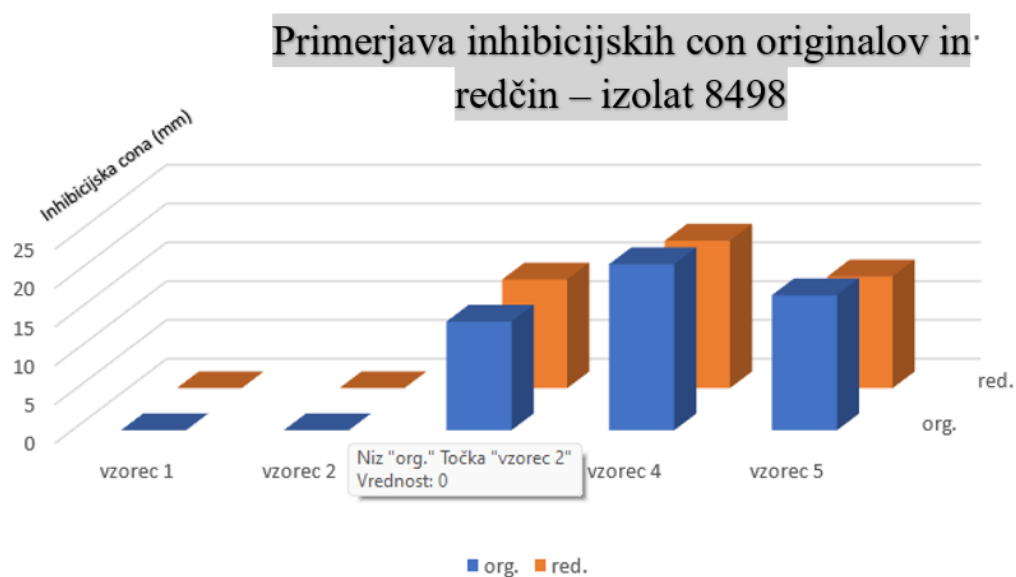


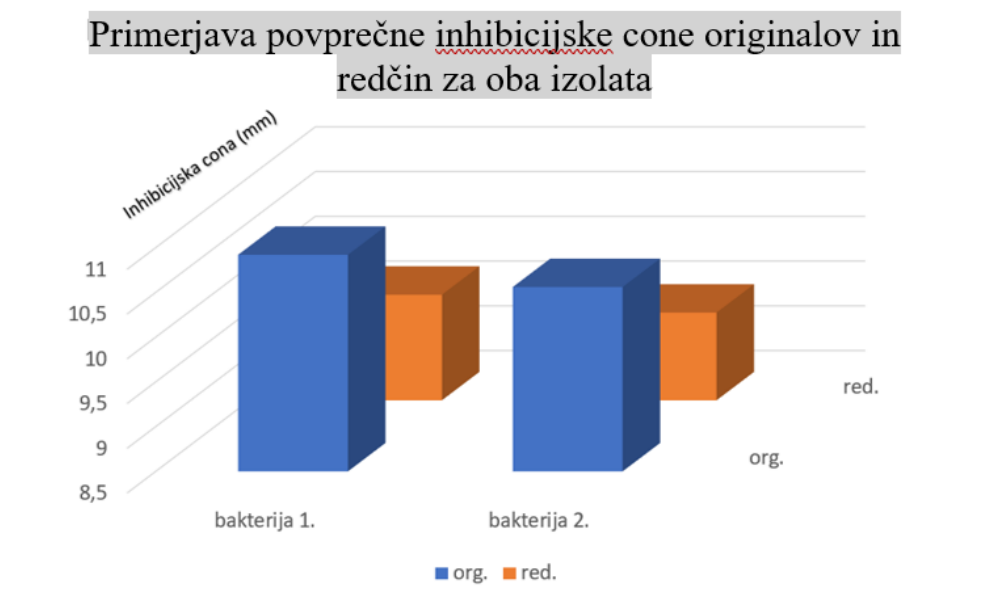
Tabela 5: Povprečne inhibicijske cone vseh vrst medu v odvisnosti od redčitve za izolat 8504

	povprečna inhibicijska cona vseh vrst medu (mm)
originalni vzorec medu	10.92
redčen vzorec medu	9.68

Tabela 6: Povprečne inhibicijske cone vseh vrst medu v odvisnosti od redčitve za izolat 8498

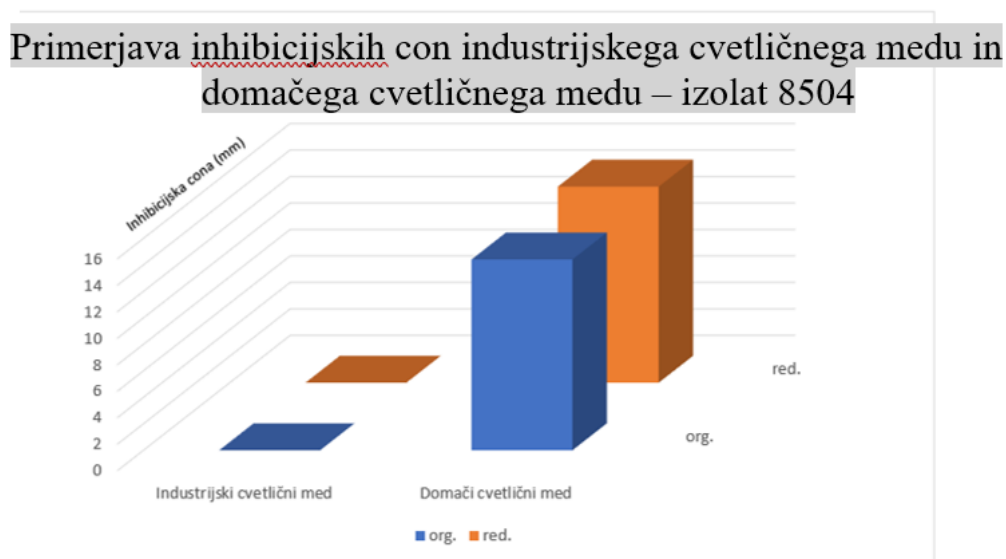
	povprečna inhibicijska cona vseh vrst medu (mm)
originalni vzorec medu	10.56
redčen vzorec medu	9.48

Grafikon 3: Primerjava povprečne inhibicijske cone originalov in redčin za oba izolata

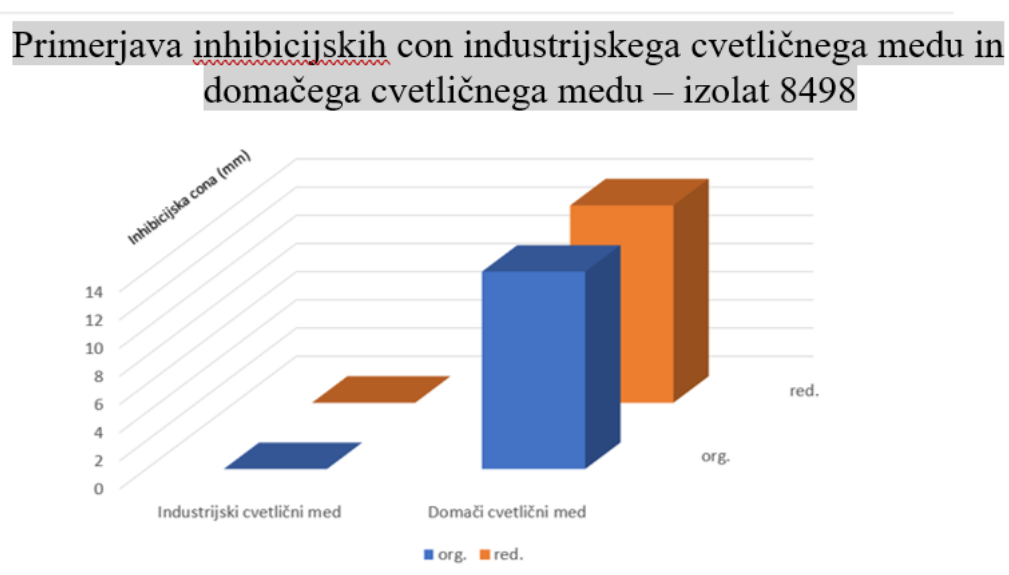


2.1.3 Primerjava inhibicijskih con posameznih vrst medu

Grafikon 4: Primerjava inhibicijskih con industrijskega cvetličnega medu in domačega cvetličnega medu – izolat 8504

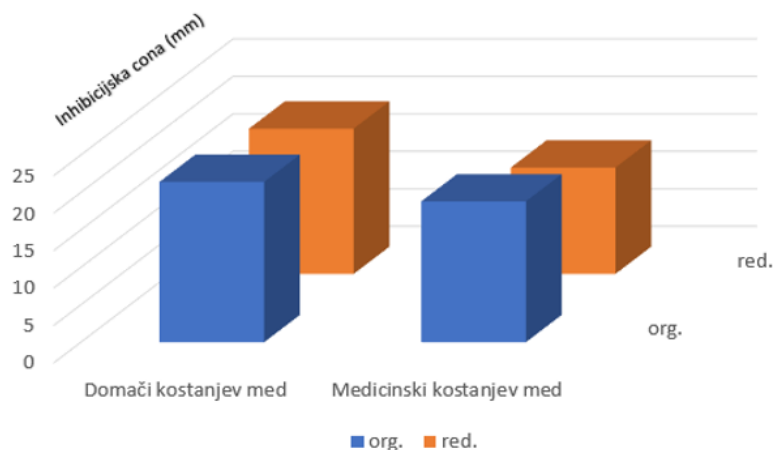


Grafikon 5: Primerjava inhibicijskih con industrijskega cvetličnega medu in domačega cvetličnega medu – izolat 8498



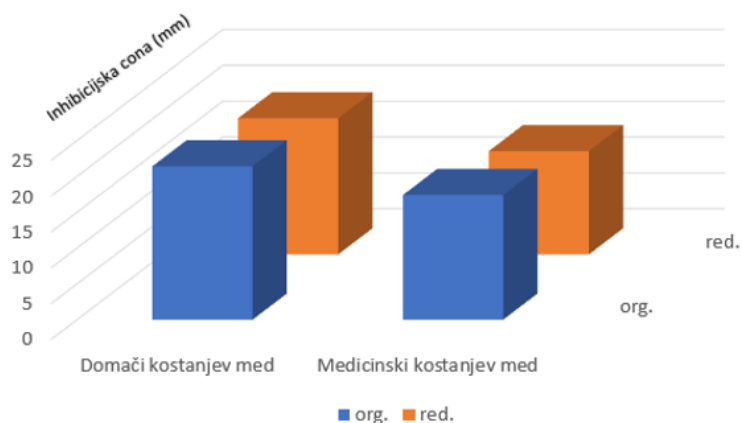
Grafikon 6: Primerjava inhibicijskih con domačega kostanjevega medu in medicinskega kostanjevega medu – izolat 8504

Primerjava inhibicijskih con domačega kostanjevega medu in medicinskega kostanjevega medu – izolat 8504



Grafikon 7: Primerjava inhibicijskih con domačega kostanjevega medu in medicinskega kostanjevega medu – izolat 8498

Primerjava inhibicijskih con domačega kostanjevega medu in medicinskega kostanjevega medu – izolat 8498



2.2 Razprava

Med je že vrsto let poznan kot zdravilo, sladilo in hranilo. Pri vpogledu v človeško zgodovino, ugotovimo, da se ta pojavlja v skoraj vseh obdobjih. V raziskovalni nalogi sva želeli proučiti antibakterijske lastnosti različnih vrst medu v odvisnosti od razredčitve. Raziskave protibakterijskih lastnosti medu so bile že izvedene, za vrste medu, ki izvirajo iz različnih držav, a ne iz Slovenije. Prav zato sva se osredotočili predvsem na slovenske vrste medu, da bi preverili ali tudi ti inhibirajo rast bakterij. Za izvedbo naloge sva tako uporabili pet vrst medu. Odločili sva se za slovenske vrste, ki so si med seboj najbolj različne po izvoru, saj sva mnenja, da tako najlažje in najučinkoviteje primerjava dobljene rezultate. Te vrste so: laboratorijsko pripravljen med, industrijski cvetlični med, domači cvetlični med, domači kostanjev med ter medicinski med. Uporabljen laboratorijski med sva uporabili kot kontrolo, da sva preverili, če je antibakterijsko delovanje samo posledica visoke viskoznosti in nizkega pH alo tudi katerih drugih sestavin medu. Zanimajo naju je predvsem ali so v sestavi medu sestavine, ki pripomorejo k bakterijski inhibiciji in ne samo njegove splošne lastnosti kot sta visoka viskoznost in nizka pH vrednost.

Med je sladka in gosta tekočina. Proizvedena je v medenih mešičkih različnih čebel iz nektarja iz cvetov ali iz mane različnih insektov. Okus ter barva sta odvisna od cvetov, iz katerih je nektar nabran ali drevesa na katerem so čebele nabrale mano. Med dozori v med z inverzijo večine saharoze v fruktozo in glukozo. Pri tem procesu se odstrani tudi odvečna vlaga.

Glavni del naloge (ugotavljanje antibakterijskih lastnosti) sva opravili v laboratoriju Medicinske fakultete Maribor, kjer imajo ves potreben material za izbrane metode. Antibakterijsko delovanje sva preverjali na dveh izolatih bakterij *Staphylococcus aureus*, ki sta bila izolirana iz dveh različnih bolnikov. Prav to vrsto bakterije sva izbrali, saj je ena izmed bakterij, ki jih najpogosteje najdemo na človeških ranah. Na obeh izolatih sva testirali vse izbrane vrste medu. Najbolje med vsemi vrstami je deloval domač kostanjev med. Prav tako sva opazili dobre inhibicijske lastnosti tudi drugega kostanjevega medu, torej medicinskega kostanjevega medu.

Morda je eden izmed razlogov za najboljše inhibicijske lastnosti kostanjevega medu njegova manjša vsebnost encima katalaze, ki bi biokatalizirala razgradnjo vodikovega peroksida, ki je zaradi tega v tej vrsti medu prisoten v večjih količinah kot pri ostalih. Ker ima vodikov peroksid razkuževalni učinek ter je tudi glavni del peroksidnega sistema inhibinov v medu, je večja inhibicijska cona ob večji prisotnosti tega, pričakovana. V najinem sklepu pa se pojavi problem, saj manjša koncentracija encima le upočasni reakcijo ter je ne ustavi. To pomeni, da je morda kljub nižji koncentraciji katalaze količina razgrajenega vodikovega peroksida enaka kot v vrstah medu z večjo vsebnostjo tega encima. Kljub temu bi počasnejša hitrost reakcije lahko bila razlog za večjo vsebnost vodikovega peroksida. Povezava bi lahko bila tudi z večjo vsebnost encima glukoze-oksidade, ki katalizira nastanek vodikovega peroksida in glukonske kisline. Vendar ker je encim v dozorelem medu nedelujoč se nama tudi ta utemeljitev boljših inhibicijskih lastnosti kostanjevega medu ni zdela najbolj prepričljiva. Vseeno bi bilo fascinantno raziskati tudi, zakaj je ravno v kostanjevem medu manj katalaze. Encimi so v medu, zaradi prehoda skozi čebelje žleze slinavke ali goltne žleze in glede na to, da je nastanek medu enak ne glede na sorto, bi to pomenilo, da razlika v encimih in njihovih količinah nastane že prej. Kostanjev med je med iz mane, za katere je značilno, da imajo večjo vsebnost snovi kot so vitamini, minerali, razne organske spojine itd., ki v med pridejo iz izločkov žlez različnih insektov v mani iz katere je med pridelan. Prav zato meniva, da je vzrok za najboljšo inhibicijo bakterij v sami kemični sestavi kostanjevega medu. Morda se ravno zaradi mane iz katere je kostanjev med v njem najde večja vsebnost flavonoidov (vrsta inhibinov, ki jih najdemo v medu), vendar večina teh pride med, iz čebeljih žlez, ko satje prevlečejo z voskom, na kar izvor medu nima učinka. Tako sklepava da so za večje inhibicijske lastnosti kostanjevega medu odgovorne kakšne druge snovi, ki spadajo med neperoksidni sistem inhibinov v medu. To bi lahko bile npr. grenčine, saj jih ravni kostanjev med vsebuje največ (kar lahko zaznamo že zgolj z okusom). Sklepava, da je na najboljšo bakterijsko inhibicijo domačega kostanjevega medu vplivala tudi njegova visoka viskoznost, saj je bil od vseh petih vrst medu najbolj viskozen. To sklepanje podpira tudi dejstvo, da so se ob redčitvi domačemu kostanjevemu medu, inhibicijske lastnosti vidno zmanjšale.

Prav tako sva ugotovili, da laboratorijsko pripravljen med najslabše oz. sploh ne inhibira bakterij. Ker ne izvira iz mane ali nektarja ter pri njegovem pridobivanju ne sodelujejo čebele, ta ne vsebuje encimov, npr. glukoze-oksidade, ki proizvaja vodikov peroksid, glukonsko kislino ter flavonoide, ki so nosilci antibakterijskih lastnosti in še mnogih drugih vitaminov, mineralov,

in organskih snovi, ki jih zasledimo v čebeljem. Zaradi tega ne vsebuje peroksidnega sistema inhibinov in prav tako ne neperoksidnega sistema inhibinov. S to ugotovitvijo lahko potrdiva, da je sestava medu zagotovo pomemben faktor pri njegovih inhibicijskih lastnostih. Drugi razlog, ki zagotovo vsaj slabša inhibicijsko sposobnost umetnega medu je njegova viskoznost, saj je med testiranimi vrstami medu bil najmanj viskozen. Ta podatek implicira višji odstotek vlažnosti, ki bakterijam bolj ustreza za razmnoževanje.

Najina tretja hipoteza pravi, da ima domači med boljše protimikrobne lastnosti kot industrijski, kar sva ugotavljali na podlagi primerjave industrijskega cvetličnega medu in domačega prav tako cvetličnega medu. Rezultati so pokazali, da industrijski cvetlični med ne inhibira bakterij, medtem ko domači (org.) cvetlični med dosega povprečno inhibicijsko cono 14.4 mm pri izolat 8504 (1. bakterija) in 14.0 mm pri izolat 8498. Ta razlika med industrijskim medom in domačim se pojavlja, zaradi samega postopka pridelave medu. Največja razlika pri medu za komercialno rabo je, da tega segrevajo na visoke temperature, npr. za pasterizacijo na 70-78 °C, pri čemer se uničijo encimi, ki sintetizirajo nadaljne spojine, ki so ključne za antibakterijske lastnosti (vodikov peroksid, glukonska kislina in flavonoidi). To počnejo, saj je tako segret med tudi lažje nadalje filtrirati ter stekleničiti. Medtem čebelarji, ki doma pridelujejo med, ne uporabljajo postopka segrevanja, saj prisegajo na višjo kakovost, ki se z visokimi temperaturami dokazano izgublja.

V primerjavi domačega in industrijskega cvetličnega medu vidimo tudi, da visoka viskoznost sama po sebi ni vpliv inhibicije bakterij. To lahko trdimo, saj sta obe vrsti medu imeli približno enako stopnjo viskoznosti, a je domači cvetlični med vseeno veliko bolj inhibiral rast bakterij od industrijskega medu, v katerem protibakterijske lastnosti sploh niso bile zaznane.

Raziskovali sva tudi kako redčenje medu s fiziološko raztopino vpliva na inhibicijske sposobnosti le-tega. Med sva redčili v razmerju 1:1, torej na eno enoto medu (približno 10g), sva dodali dve enoti fiziološke raztopine (približno 10 ml). Ugotovili sva, da redčenje medu splošno zmanjšuje njegove inhibicijske sposobnosti, saj je povprečna inhibicijska cona vseh redčenih vrst medu za izolat 8504 za 1.24 mm manjša od povprečne inhibicijske cone vseh neredčenih vrst medu. Za izolat 8498 velja enako, torej, da je povprečna inhibicijska cona vseh redčenih vrst medu manjša od povprečne inhibicijske cone vseh neredčenih vrst medu, vendar za 1.08 mm. Slabše inhibicijske lastnosti zagotovo opazimo pri obeh vrstah kostanjevega medu,

za kar predvidevava, da je razlog predvsem nižja viskoznost in posledično večja vsebnost vlage, ki bakteriji *Staphylococcus aureus* ustreza.

Iste ugotovitve pa nisva mogli trditi tudi za domač kostanjev med, saj se je njegova inhibicijska cona v povprečju celo povečala. Ker je bila razlika izredno majhna ter se večina celokupnih rezultatov inhibicijskih con ni toliko razlikovala (kot pri kostanjevih medih), ne moreva dokončno potrditi, da redčenje domačega cvetličnega medu poveča njegove protibakterijske lastnosti. Za potrditev bi bilo potrebno izvesti še nadaljnje raziskave ter morda primerjati več razredčin različnih koncentracij. Če bi to ugotovitev potrdili, bi lahko sklepali, da je vzrok za boljše protibakterijske lastnosti morda ponovno delovanje encima glukoza-oksidadaza. Ta je v dozorjenem medu nedelujoč, a lahko prične ponovno delovati ob večji vsebnosti vlage.

V najini raziskovalni nalogi sva tako ugotovili, da je sestava medu, ki se je z umetno pridelavo ne da nadomestiti, ključnega pomena za njegove protibakterijske lastnosti. Iz najinih ugotovitev prav tako meniva, da bi bilo potrebno ljudi bolj ozavešiti o kupovanju domačih medov pri lokalnih čebelarjih, na kar prisega tudi čebelar s katerim sva izvedli intervju (priloga 1). Višja kakovost domačega medu je v najini raziskovalni nalogi vidna prav iz ugotovitve, da ima industrijsko pridelan med slabše protibakterijske lastnosti od domačih medov. Kakovost je tako bolj pomembna od same pridelave, kot od lokalnosti medu, saj so bile vse uporabljene vrste medu slovenske.

Prav tako sva ugotovili, da je za v medicinske namene najbolj primeren kostanjev med, kar razloži tudi, zakaj je medicinski med, namenjen prav protibakterijskim učinkom, kostanje. Ugotovili sva tudi da medicinski med res deluje ter je učinkovito mazilo proti okužbam ran.

Kljub uspešnosti najine raziskovalne naloge bi se lahko določene dele še izboljšalo in podrobneje raziskalo.

Pričeli bi lahko z izboljšavo težave na katero sva naleteli pri primerjavi originala in razredčine domačega cvetličnega medu. Kot sva že omenili bi lahko eksperiment ponovili z različnimi koncentracijami medu. Lahko bi izvedli tudi več ponovitev koncentracije, ki sva jo v najini raziskovalni nalogi že preizkusili ter tako dokončno potrdili ali ovrgli najino 4. hipotezo. Nadaljnjo bi lahko primerjali tudi razredčine domačih cvetličnih medov različnih čebelarje.

Prav tako bi lahko primerjali tudi domač kostanjev med različnih čebelarjev. Raziskavo bi lahko razširili še s primerjavo protibakterijskih lastnosti ostalih slovenskih vrst medu ter tako primerjali splošne razlike in podobnosti med medu iz nektarja ter medu iz mane. Za še bolj

temeljito raziskavo bi lahko primerjali tudi slovenske vrste medu pridelane v različnih regijah, ter preiskali vpliv okolja iz katerega med izvira.

Če bi imeli primerne pripomočke ter postopek bi lahko raziskali tudi vpliv posameznih sestavin medu kot je npr. vodikov peroksid ali flavonoidi, na njegove protibakterijske lastnosti ter s tem še boljše utemeljili najine ugotovitve.

Na koncu bi lahko izvedli še nadaljnjo raziskavo vpliva medu na različne vrste bakterij, predvsem še ostale bakterije, ki se pogosto najdejo na človeških ranah in lahko privedejo do okužb.

3. DRUŽBENA ODGOVORNOST

Zavedava se, da smo mladi ključni za dobro in svetlo prihodnost. Svoja znanja moramo širiti, se medsebojno podpirati in spodbujati. Najina raziskovalna naloga ne le preučuje bioloških lastnosti medu, ampak odpira vrata k potencialni medicinski uporabi, ki bi imela pozitivni učinek za množico ljudi. Antibakterijske lastnosti medu lahko prispevajo k razvoju novih zdravil za zdravljenje bakterijskih okužb, izboljšujejo kakovost življenja posameznikov in s tem koristijo širši skupnosti. V ospredju nadaljnjih raziskav se med drugim pričakuje tudi skrb za varnost in trajnostno rabo medu v medicinske namene. Pomembno je identificirati morebitne neželene učinke in omejitve, zagotoviti varno uporabo tega naravnega izdelka ter hkrati ohraniti ekosistem in čebelje populacije. Trajnostna uporaba čebeljih pridelkov igra pomembno vlogo, saj mora vsaka (kot tudi najina) raziskava ponuditi smernice za pridobivanje medu, ki ohranjajo naravno ravnovesje. Kot nam je razkril tudi čebelar (priloga 1), je za naravno ravnovesje in ohranjanje populacij čebel pomemben prav vsak posameznik in na to ozaveščanje iskreno upava, da bo imela najina raziskovalna naloga želen doprinos. Nazadnje pa osveščanje o možnostih naravnih zdravil, ki jih prinaša raziskava, prispeva k širši družbeni ozaveščenosti o uporabi naravnih virov za pomoč pri poškodbah in boleznih. Celostno gledano, raziskava ne le širi znanstvena spoznanja, ampak pozitivno vpliva na družbo z osredotočenostjo na zdravje, varnost in trajnost.

4. ZAKLJUČEK IN SKLEPI

V raziskovalni nalogi sva preučevali inhibicijske lastnosti medu. Za dosego rezultatov sva si postavili 4 hipoteze, in sicer:

1. domače pridelan med je boljši inhibitor bakterij kot industrijsko proizveden med,
2. laboratorijsko pripravljen, torej umetni med, ne bo inhibiral bakterij,
3. medicinski med bo najbolj inhibiral bakterije,
4. bolj kot je med razredčen, slabše so njegove inhibicijske sposobnosti.

Hipoteze sva preverjali tako da sva gojišča bakterij izpostavili različnim vrstam medu ter 1:1 razredčinam teh medov. Gojišča bakterij z medom sva nato 24 ur pustili v inkubatorju, da so se bakterije razmnožile. Po 24 urah sva gojišča vzeli iz inkubatorja ter primerjali velikosti inhibicijskih con, ki so nastale okoli delov gojišč izpostavljenih medu. Za primerjavo velikosti inhibicijskih con sva uporabili dolžine njihovih premerov.

Pričeli sva s primerjavo inhibicijskih con na gojišču izpostavljenemu domače pridelanemu cvetličnemu medu z inhibicijskimi conami na gojišču izpostavljenemu industrijsko pridelanemu cvetličnemu medu. Z izbiro enake vrste medu, torej cvetličnega medu iz nektarje, sva zagotovili, da sta bili najina primerjava ter preverjanje hipoteze zares osredotočeni na postopek pridelave medu in ne na njegovo naravno poreklo. Primerjavo sva izvedli tako, da sva inhibicijskim conam najprej izmerili premer, nato izračunali povprečje vseh petih premerov za gojišče z industrijskim ter posebej z domače pridelanim medom. Povprečje velikosti premerov inhibicijskih con industrijsko pridelanega neredčenega medu je bilo 0 mm, prav tako kot tudi velikosti premerov inhibicijskih con razredčine industrijsko pridelanega medu. Medtem ko industrijsko pridelan med ni kazal znakov inhibicije, je imelo gojišče z domače pridelanim neredčenim medom povprečje premerov inhibicijsko con 14,4 mm pri izolatu 8504 (1. bakterija) in 14,0 mm pri izolatu 8498 (2. bakterija). Inhibicija je bila prav tako vidna pri razredčinah domače pridelanega cvetličnega medu in sicer s povprečjem premerov inhibicijsko con 14,8 mm pri izolatu 8504 in 14,0 mm pri izolatu 8498. Prvo hipotezo, torej, da je domače proizveden med boljši inhibitor bakterij kot industrijsko proizveden med, sva tako potrdili.

Nadalje ali sva s preverjanjem ali umetno narejen med sploh inhibira bakterije. Prav tako kot gojišča vseh ostalih vrst medu sva tudi gojišče z umetno narejenim medom pustili za 24 ur v inkubatorju. Tako kot sva predvidevali, sta se po inkubaciji oba izolata bakterij na gojiščih razmnožili vse do lukenj v katere sva vbrizgali umetni med. Povprečja premerov inhibicijskih

con so tako za oba izolata bakterij kot tudi za originale in razredčine medu znašala 0 mm, kar posledično pomeni, da med ni inhibiral bakterij. S tem sva potrdili najino drugo hipotezo.

Predvidevali sva tudi, da bo medicinski med najboljše inhibiral bakterije, saj je prav temu namenjen. To sva preverjali tako, da sva povprečja premerov inhibicijskih con za oba izolata bakterij kot tudi za originale in razredčine medicinskega medu primerjali z dolžinami povprečij premerov inhibicijskih con ostalih vrst medu. Ker umetno kot tudi industrijsko pridelan med nista inhibirala bakterij sva z lahkoto trdili, da je medicinski med boljši inhibitor bakterij. Prav tako sta bili dolžini povprečij premerov nerazredčenega medicinskega medu pri obeh bakterijah večji kot pri domačem cvetličnem medu. Tudi povprečna dolžina premera redčenega medicinskega medu za izolat 8504 je bila večja pri medicinskem kot pri domačem cvetličnem medu. Izjema se je pokazala pri izolatu 8498, kjer je bilo izmerjeno povprečje za 0,6 mm večje pri razredčeni domačega cvetličnega medu kot pri razredčini medicinskega medu. Pri tej izjemi sva pogledali še posamezne meritve in ugotovili, da so tri od petih meritev enake, kar pomeni da bi bilo potrebnih več meritev, da bi zares lahko trdili, da je razredčina domačega cvetličnega medu za izolat 8498 boljši inhibitor od razredčine medicinskega medu. Enako velja tudi za primerjavo razredčin pri izolatu 8504. Ker sva se pri preverjanju tretje hipoteze bolj osredotočili na neredčene vrste medu lahko trdimo, da je tudi v primerjavi z domačim cvetličnim medom medicinski med boljši inhibitor. Zadnja primerjava dolžin inhibicijskih con naju je presenetila, saj je so povprečne meritve premerov inhibicijskih con domačega kostanjevega medu v vseh primerih, tako pri uporabi neredčenega kot tudi redčenega medu, večje. Z zadnjo primerjavo sva ovrgli tretjo hipotezo, saj se je za najboljšega inhibitorja izkazal domač kostanjev med.

Na zadnje sva primerjali še razlike med povprečnimi dolžinami premerov neredčenih medov in njihovih razredčin. Pri tej primerjavi sva meritve umetnega ter industrijsko pridelanega medu ovrgli, saj se je za oba izkazalo, da nista inhibitorja bakterij. Pri primerjavi originalov in redčin domačega kot tudi medicinskega kostanjevega medu je bil pri obeh izolatih bakterij razviden padec povprečne dolžine premerov inhibicijskih con pri gojiščih izpostavljenim redčinam. Največja razlika je bila razvidna pri medicinskem medu, saj se je pri izolatu 8504 povprečna dolžina inhibicijskih con zmanjšala za kar 4,6 mm, pri izolatu 8498 pa za 3,0 mm. Tako sva četrto hipotezo pri uporabi kostanjevega medu potrdili. Obratno kot pri kostanjevem medu se je izkazalo za domač cvetlični med. Pri tem je bila za izolat 8504 povprečna dolžina premerov inhibicijskih con redčine večja od premerov inhibicijskih con originalov, pri izolatu 8498 pa se

povprečna dolžina premerov inhibicijskih con ni spremenila. Ker so pri natančnejšem pregledu vseh izmerjenih dolžin premerov redčin in originalov ponekod dolžine originalov pri gojiščih obeh izolatov enake ali večje, četrte hipoteze v primeru domačega cvetličnega medu nisva ovrgli.

5. VIRI IN LITERATURA

5.1 Spletni viri

1. *About artificial honey: How to make at home, how to cook from cherry plum.* (b. d.). Decorex. Pridobljeno 4. februar 2024, s <https://land.decorexpro.com/en/prochee/iskusstvennyj-med.html#i>
2. *Beekeeping is... Horticulture of the ancient Slavs.* (b. d.). Pridobljeno 4. februar 2024, s <https://tostpost.com/education/1417-beekeeping-is-horticulture-of-the-ancient-slavs.html>
3. Bristol, U. of. (b. d.). *November: Honeybees and the Neolithic | News and features | University of Bristol.* University of Bristol. Pridobljeno 4. februar 2024, s <https://www.bristol.ac.uk/news/2015/november/honeybees-and-neolithic-farmers.html>
4. Brudzynski, K., Abubaker, K., Laurent, M., & Castle, A. (2011). Re-Examining the Role of Hydrogen Peroxide in Bacteriostatic and Bactericidal Activities of Honey. *Frontiers in Microbiology*, 2. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00213>
5. Burlando, B., & Cornara, L. (2013). Honey in dermatology and skin care: A review. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 12(4), 306–313. <https://doi.org/10.1111/jocd.12058>
6. *Disaccharide | Definition, Examples, & Facts.* (2024, februar 3). <https://www.britannica.com/science/disaccharide>
7. Eteraf-Oskouei, T., & Najafi, M. (2013). Traditional and Modern Uses of Natural Honey in Human Diseases: A Review. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 16(6), 731–742.

8. Eshete, Y., & Eshete, T. (2019). A Review on the Effect of Processing Temperature and Time duration on Commercial Honey Quality. *Madridge Journal of Food Technology*, 4(1), 158–162. <https://doi.org/10.18689/mjft-1000124>
9. *Greek Honey | About Greek Honey | Honey from Greece*. (b. d.). Extra Virgin Olive Oil | The Olive Table | Greek Olive Oil. Pridobljeno 4. februar 2024, s <https://theolivetable.com/about-greek-honey/>
10. *Historical Honey: Ancient Egypt*. (2019, julij 8). Local Hive Honey. <https://localhivehoney.com/blogs/blog/historical-honey-ancient-egypt>
11. *Honey: A bit of history*. (2020, september 4). Miel Factory. <https://www.miel-factory.com/en/blogs/blog/miel-histoire>
12. *HONEY: Antiquity – Mythology*. (2021, maj 25). <https://www.virginiaoliveoil.com/honey-antiquity-mythology/>
13. Honey, M. (2021, februar 8). The process of making honey. *MAES HONEY*. <https://maeshoney.com/proceso-de-elaboracion-miel/>
14. Honey. (2017, april 7). *Greek Gastronomy Guide*. <https://www.greekgastronomyguide.gr/en/meli-ethniko-proion/>
15. Kandolf Borovšak, A. (b. d.). *Nastanek medu*. Pridobljeno 4. februar 2024, s <https://urbanicebelar.si/nastanek-medu>
16. Kozlar, S. (2007). *VPLIV LETNIKA NA VSEBNOST SLADKORJEV IN KISLIN V MEDU*.
17. Laura. (2015, februar 5). *Honey in history: Ancient Greece*. <https://healthywithhoney.com/honey-in-history-ancient-greece/>
18. Magazine, S., & Fessenden, M. (b. d.). *Our Ancient Ancestors Probably Loved Honey Too*. Smithsonian Magazine. Pridobljeno 4. februar 2024, s

<https://www.smithsonianmag.com/smart-news/relationship-between-humans-and-honeybees-goes-back-9000-years-180957245/>

19. *Med.* (b. d.). Čebelarska zveza Slovenije. Pridobljeno 4. februar 2024, s
https://www.czs.si/content/C21?sif_co=C21
20. *Medicinski med Vivamel.* (b. d.). Lekarnar. Pridobljeno 4. februar 2024, s
<https://www.lekarnar.com/izdelki/vivamel-sterilni-medicinski-med#productTabs>
21. *Monosaccharide | Carbohydrate, Sugar, Glucose | Britannica.* (2023, december 19).
Britannica. <https://www.britannica.com/science/monosaccharide>
22. Poklukar, J. (b. d.). *Čebelarska zveza Slovenije.* Pridobljeno 4. februar 2024, s
<https://www.czs.si/content/A2>
23. Some Thoughts on Food in Roman Times. (2013, marec 12). *Ritaroberts's Blog.*
<https://ritaroberts.wordpress.com/2013/03/12/some-thoughts-on-food-in-roman-times/>
24. Stokstad, E. (2015). Humans have been using bees for at least 9000 years. *Science.*
<https://doi.org/10.1126/science.aad7421>
25. *Sucrose | Definition, Characteristics, & Natural Sources.* (2024, januar 17).
Britannica. <https://www.britannica.com/science/sucrose>
26. *Tears of Re: Beekeeping in Ancient Egypt.* (2016, januar 23).
<https://www.apicultural.co.uk/tears-of-re-beekeeping-in-ancient-egypt>
27. *Vivamel medicinski med v tubi.* (b. d.). Sanolabor. Pridobljeno 4. februar 2024, s
<https://www.sanolabor.si/artikel/vivamel-medicinski-med-v-tubi-50-g>
28. *Why bees are essential to people and planet.* (2019, maj 20). UNEP.
<http://www.unep.org/news-and-stories/story/why-bees-are-essential-people-and-planet>
29. *7 Unique Health Benefits of Honey.* (2018, september 5). Healthline.
<https://www.healthline.com/nutrition/benefits-of-honey>

30. 1466. *Pravilnik o medu, stran 3460.* (b. d.). Vsebina Uradnega lista | Uradni list.

Pridobljeno 4. februar 2024, s <https://www.uradni-list.si/glasilo-uradni-list-rs/vsebina>

5.2 Knjižni viri

31. Ferjančič, L., Loboda Skočir, Z., & Kovač, B. (2022). Študija fizikalno kemijskih parametrov in lastnosti različnih vrst medu z eksperimenti: teoretično – raziskovalna naloga. Biotehniški izobraževalni center (BIC) Ljubljana, Gimnazija in Veterinarska šola; Univerza v Ljubljani, Pedagoška fakulteta.
https://kemikum.si/files/2022/07/Ferjancic_Loboda-Skocir_Kovac_Studija-fizikalno-kemijskih-parametrov-in-lastnosti-razlicnih-vrst-medu-z-eksperimenti.pdf
32. Huber, K., & Jocić, G. (2021). Encimi v medu in vpliv povišane temperature na antibakterijske dejavnike v medu: raziskovalna naloga: živilska tehnologija (str. 41 f.). Gimnazija Franca Miklošiča.
33. Kozlar, S. (2007). Vpliv letnika na vsebnost sladkorjev in kislin v medu: diplomsko delo, univerzitetni študij = The effect of vintage on the content of sugar and acids in honey [[S. Kozlar]]. http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/dn_kozlar_sandra.pdf
34. Ovčec, S. (2007). Encimska aktivnost medu: diplomsko delo, univerzitetni študij = Enzyme activity of honey [[S. Ovčec]]. http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/dn_ovcek_simona.pdf

6. PRILOGE

Priloga 1 (intervju s čebelarjem)

1. Na kratko opišite pridelavo domačega medu.

Pašne čebele delavke nektar prinašajo v panj v mednem želodčku, kjer se mu primeša encim invertaza. Ta pripomore, da se sladkorna raztopina iz nektarja preoblikuje v grozdni in sadni sladkor. Zrelo medicino se skladišči v voščenih celicah satja, kjer se z ventilacijo zniža delež vlage do okrog 20 %. Ko je med v satju zrel, ga čebele delavke pokrijejo z voščenimi pokrovc. Ko je sat pokrit najmanj 1/3 površine je med dozorel in ga čebelar odvzame in ga vstavi v točilo (centrifugo) ga iztoči in skladišči v inox posode.

2. Ali je kakšna razlika v pridelovanju različnih vrst medu.

Pridobivanje različnih vrst medu je enako. Razlika je samo v tem, kje, na kateri lokaciji in v kakšnem obdobju ga nabirajo. Vrste medu so dobile ime po rastlinah, na katerih čebele nabirajo medicino oziroma mano. V Sloveniji so predvsem akacija, lipa, smreka, kostanj, ajda, regrat. Od tod tudi toliko različnih vrst medu.

3. Vaše mnenje o industrijskem medu.

Slovenski čebelarji prisegamo na naravni med in to med, ki ga pridelamo v Sloveniji in ga dobite pri lokalnih čebelarjih in ne v trgovinah (Lidl, Hofer, Tuš, Jager itd.).

4. Kakšne zdravilne učinke in ostalo uporabo medu poznate kot čebelar

Če dodamo med v toplo mleko nam napitek pomaga zaspati. Med, cvetni prah, propolis in matični mleček so zdravi čebelji pridelki, ki se že stoletja

uporabljajo kot simbol zdravja in dobrega počutja.

5. Kateri so tisti načini, s katerimi lahko pomagamo ohranjati čebele?

Katerih se poslužujete vi sami?

Za ohranjanje čebel lahko ogromno naredi vsak posameznik s tem, da poseje ali posadi medonosne rastline, odvisno od možnosti. Jaz največkrat posadim medonosna drevesa kot so: divja češnja, javor, robide, smreka in podobno, saj Imam srečo, da mi to lokacija dovoljuje.