УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Милан Љ. Новаковић

АНАЛИЗА АНТИМИКРОБНЕ АКТИВНОСТИ ЕКСТРАКТА БЕЛОГ ЛУКА *(Allium sativum L.)*

Докторска дисертација

Крагујевац, 2013. година

Српска пословица

Благо ономе ко зна да не зна, а хоће да зна.

Ова докторска дисертација плод је оригиналног ауторског рада који превасходно има за циљ да укаже на антимикробну активност воденог екстракта белог лука и активне принципе који су одговорни за ту активност.

Велику захвалност дугујем свом ментору, професору Слободану Јанковићу, на указаном поверењу, разумевању, стрпљењу, добронамерним саветима и несебичној помоћи у успешном савладавању недоумица и проблема током израде тезе.

Захваљујем се др Милораду Милошеву, доц. др Срђану Стефановићу и Милошу Стојановићу на значајној техничкој помоћи у изради ове дисертације као и колегиницама Марији Зечевић и Јованки Качаник.

Истраживања у оквиру ове докторске дисертације су финансирана захваљујући средствима са пројеката Министарства за науку и технолошки развој Републике Србије под називом "Фармаколошка анализа ефеката биолошки активних супстанци на изоловане глатке мишиће гастроинтестиналног и урогениталног тракта" бр. 175007 чији је руководилац проф. др Слободан Јанковића и "Јуниор" пројекта Факултета медицинских наука у Крагујевцу под називом "Ефекти микроталасног зрачења мобилних телефона на раст грам-негативних бактерија in vitro" бр. 10/10. Једним делом истраживања су финансирана и са ФП7 пројекта Европске уније под називом "Centre for pre-clinical testing of active substances".

Велику захвалност дугујем породици.

САДРЖАЈ

Скраћенице

CLSI **-** Clinical and Laboratory Standards Institute

BSAC **-** British Society for Antimicrobial Chemotherapy

MX **-** Mueller Hinton

МИК **-** Минимална инхибиторна концентрација

ATTC **-** American Type Culture Collection

Xs - средња вредност површине и пречника зоне инхибиције

SD – стандардна девијација

NAC – N-ацетил-L-цистеин

P – Површина зоне инхибиције

R – Пречник зоне инхибиције

γ-Glu– гама глутамил

cfu – Colony Forming Unit (јединица која формира колонију бактерија)

УВОД

1. Лековите биљке у исхрани и лечењу

Употреба биљака и зачина у исхрани и лечењу досеже у далеку прошлост и стара је колико и сам људски род. Користећи биљке у свакодневној исхрани, човек је постепено временом уочавао њихова лековита својства. С обзиром да тада није имао велика сазнања о узрочницима болести и о томе која би биљка могла и на који начин да се употреби за лечење, све се заснивало на искуству које се стицало вековима кроз историју. Практично, биљке су биле најприступачнији и најјефтинији лек од када је човек уочио њихова лековита својства. Временом су откривани разлози специфичне употребе лековитих биљака за одређене болести, тако да је примена лекова постепено излазила из емпиријског оквира и заснивала се на објашњивим чињеницама[1]. Све до појаве јатрохемије у 16. веку, биљке су представљале основ лечења и превенције.

Биљке које садрже фармаколошки активне супстанце и као такве се користе као терапијско средство су лековите биљке. Фармаколошко лечење болести коришћењем лековитог биља и њихових екстраката је јако дуго присутно у историји скоро свих култура, при чему методе народног лечења широм света најчешће користе биљке као део њихове традиције[2]. Вештина лечења биљем развијала се код свих народа и сачувала се као народна или традиционална медицина све до данашњих дана и повезана је са животом и обичајима људи у прошлости. Са учешћем савремене науке многе биљке које су се вековима употребљавале у традиционалном лечењу прихваћене су и у званичној медицини на основу искуства које се вековима стицало, чувало и преносило на млађе генерације[3]. Лековите биљке представљају важне лековите сировине у савременој фармакогнозији[4] и као такве, уколико су доступне, представљају најстарији и најјефтинији лек[5]. Употреба лековитих биљака као терапијског и профилактичког средства и у нашем народу има дугу традицију. Најбоље сведочанство о томе представљају књиге писане још у XIV и XV веку (Ходошки кодекс и Хиландарски медицински кодекс) у којима се између осталог наводи употреба домаћих и страних биљних дрога у медицинске сврхе[6].

Употреба биљака у медицини и фармацији уместо синтетичких лекова значајно је порасла током последњих година. Фитотерапија је данас најзаступљенија у најразвијеним земљама, па се тако процењује да се између 60% и 80% укупне светске популације ослања на употребу лековитог биља, због чега оно представља веома значајан извор лекова и лековитих сировина[7]. Све више се истражује лековито деловање биљака коришћених у традиционалној медицини, посебно оних које су према предању имале добар ефекат у лечењу инфекција[8]. Ако се узму у обзир сви лекови који се у свету данас користе за лечење заразних болести, чак 65% има биљно порекло[9]. У неким афричким и азијским земљама чак и данас 80 % становништва зависи од традиционалне медицине и употребе лековитих биљака у примарној здравственој заштити[10].

У данашње време се лековито, ароматично и друго корисно биље захваљујући савременим методама и савременој лабораторијској техници све детаљније проучава са свих аспеката у трагању за новим и бољим лековима и лековитим средствима. Још увек постоје недовољно или сасвим неиспитане биљне врсте што упућује на неисцрпне могућности модификовања природних супстанци полисинтезом у циљу добијања једињења бољих физиолошких и фармаколошких особина. Очекује се да ће истраживачки рад на овом пољу донети још већу афирмацију лековитих и биљака које користимо у свакодневној исхрани као храну или зачин[5]. У развоју оваквих лековитих препарата, једна од најзначајнијих фаза је испитивање антимикробног ефекта *in vitro*.

1.1. Биљка *Alium sativum L.*

Бели лук (*Alium sativum L.)* је вишегодишња биљка висине 25-90 cm. Спада у царство *Plantae*, разред *Magnoliophyta*, ред *Asparagales* фамилија *Alliaceae*, род *Allium*. Подземни изданак-луковица (*bulb*) је овалног облика или округла. Луковица је дужине 2,5-4 cm и може бити проста или сложена. Просте имају један чен а сложене од 7 до 30 ситнијих луковица (чена) који су обавијени омотачем туником, која може бити опнаста, беличаста или зеленкаста. Сви ченови су обавијени са 3-8 овојних листова беле, црвенкасте или љубичасте боје и они чине заједнички омотач који се зове туника.

Цветно стабло белог лука је усправно и до половине лиснато. Листови су широко линеарни, равни и расту из меснате основе или чешња. Лиска је дужине око 5 cm, ширине до 12 mm, на лицу жљебовита, са наличја ребраста и зашиљена. Спата је једноделна, при основи проширена, врхом извучена у дугучак шиљак, отпада цела.

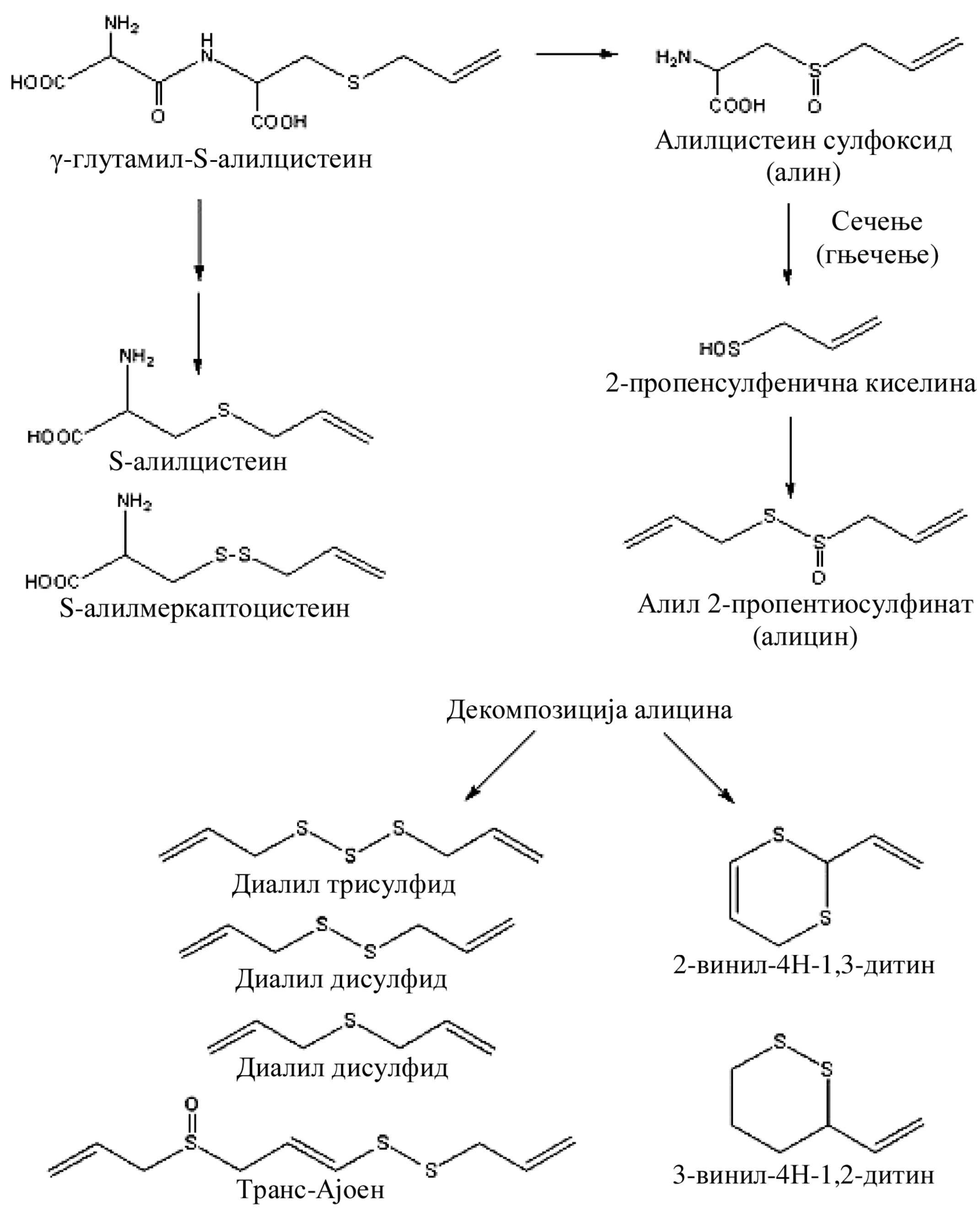
Слика 1. Alium sativum L. bulb

Цваст је сачињена од малог броја цветова са многобројним расплодним луковицама величине до 1 cm. Цветови су на дугачким дршкама, актиноморфни, са шест прашника 3+3. Листићи перигона су црвенкасто беле боје или зеленкасти дугачки 3 mm. Прашници су краћи од листића перигона. Унутрашњи прашници су при основи проширени, са стране са по једним зубићем[11,12,13].

1.2. Активни принципи белог лука

Сматра се да су сумпорна једињења одговорна за лековита својства белог лука и да су деривати цистеина активни принципи и деривати односно једињења која настају из њих. γ-Glu-цистеин и цистеин сулфоксиди су две класе органосумпорних једињења се налазе присутне у белом луку. Алил цистеин сулфоксид (алин) чини око 80% цистеин сулфоксида који су присутни у белом луку[1]. Када дође до жвакања, сецкања или дробљења ченова белог лука долази до ослобађања ензима алиназе, који катализује формирање сулфеничне киселине из цистеин сулфоксида.

Сулфеничне киселине спонтано реагују једна са другом и настају нестабилна једињења позната као тиосулфинати. У случају алина долази до формирања тиосулфината познатог као алицин, чије је време полураспада је 2,5 дана на температури од 23 °C. Време њиховог настанка је јако брзо и за потпуну реакцију је потребно максимално 60 секунди. Декомпозицијом алицина настају различита липосолубилна једињења, као што су ди алил-трисуфид, ди-алил дисуфид и ди-алил сулфид, или у присуству уља или органских растварача када настају ајоени и винилдитини. (слика 1.)



Слика 1. Босинтеза сумпорних деривата у *Alium sativum L.*

Само млевење или сечење белог лука не мења γ-глутамински садржај. Растворљива у води сумпорна једињења као што су L-алил цистеин настају од γ-глутамил цистеина током инкубације здробљеног белог лука у воденим растворима као и код старијих екстраката који су дуже одстојали.

1.3. Употреба белог лука у исхрани и његова примена у народној медицини

Употреба белог лука (*Alium sativum L.)* као прехрамбене намирнице, зачина и лековитог средства против многих болести стара је колико и историја људског рода. Он је вековима један од најчешће коришћених природних лекова. Археолошка открића говоре да се ова биљка налазила на списку гастрономских и терапеутских рецептура Вавилонаца, Кинеза, Египћана, Феничана, Викинга, Јевреја, Римљана, Индуса и многих других народа. Медицински значај белог лука (*Alium sativum L.)* је такође познат јако дуго у историји што записи из Египатских пирамида и храмова старих Грка то и потврђују[14,15,16]. Проглашаван је "светом биљком", у коју су се веровали египатски лекари и апотекари, а плодови белог лука су стављани у гробнице краљева и фараона. Спада у групу једне од најстаријих гајених и коришћених биљних култура од стране човека[17]. У пролеће и за време дуготрајних постова бели лук се обавезно морао узимати уз сваки оброк као заштитно средство. За време епидемија тифуса, колере, куге, дизентерије и грипа, увек је препоручиван и свакодневно употребљаван као превентивно и куративно средство против ових заразних болести.

Бели лук се у традиционалној медицини користи за лечење обољења срца и крвних судова употребом у свакодневној исхрани или потапањем у алкохол; осим тога, користи се и за лечење болести дисајних органа, несвестице, главобоље, болести органа за варење, цревних паразитарних обољења, кожних болести и др[6,18,19]. Он је универзални народни зачин и један од најважнијих природних превентивних лековитих средстава[6,18,19]. Бели лук се и данас у неким сеоским домаћинствима у Србији употребљава не само као превентивно већ и као магијско заштитно средство против "злих духова" и других "невидљивих сила"[20]. Веровање у његове лековите и заштитне моћи је јако дубоко укорењен у српском народу.

1.4. Антибактеријски ефекат белог лука

Научни интерес за лековитост белог лука датира од друге половине XIX века (1858. године), када је Луј Пастер (1822-1895), утврдио да ова биљка спречава раст и размножавање одређених бактеријских сојева. Антимикробно деловање ове биљке од тада се испитује непрестано[17,21]. Данас се сматра да су различита сумпорна једињења присутна у етарском уљу белог лука одговорна за његово снажно антимикробно деловање[22,23,24,25,25,26]. О антимикробној активности *in vitro* етарског уља белог лука постоји релативно доста података који је описују [27,28,29,30,31,32]. Такође, о алицину најачем и главном активном принципу, ајоенима и осталим испарљивим сумпорним једињењима диалил (моно, ди, три и тетра) сулфида који су присутни у етарском уљу белог лука, постоје бројни докази о њиховим антибактеријским односно, бактериостатским и бактерицидним својствима.[1,27,33].

1.5. Употреба белог лука у званичној медицини

За луковицу белог лука (*Allium sativum* L. *bulb*) и његове активне биомолекуле је у последње време утврђено и неколико других веома важних фармаколошких активности[34]. Показано је да употреба белог лука смањује ризик од кардиоваскуларних обољења услед утицаја на смањење повишеног крвног притиска[35], повољних метаболичких ефеката који се огледају у снижењу нивоа масноћа у крви и хипогликемијском дејству[36,37,38,39,40] и инхибиције агрегације тромбоцита, односно повећања степена фибринолизе[25,41,42]. Такође, одређени активни принципи бели лука инхибирају карциногенезу, чиме смањују ризик од настанка карцинома[25,43,44]. Евидентно је и његово имуностимулаторно деловање преко активације макрофага и индукције пролиферације Т лимфоцита[45,46,47,48,49] као и да његова употреба повећава одбрамбене моћи организма изложеног зрачењу[50,51]. Значајно је и антиоксидантно деловање белог лука на различитим нивоима неутрализације реактивних кисеоничних облика и других слободних радикала[51,52,53,54] које се може повезати са потенцијалним ефектима против старења и превенцијом секундарних патолошких процеса повезаних са старењем[55,56,57,58,59].

Лековитост луковице белог лука (*Allium sativum* L. *bulbs*) потврђена у складу са принципима званичне медицине[60,61] омогућила је да терапијска примена наведене дроге буде одобрена од стране различитих националних комисија за регистрацију биљних препарата[8,62,63]. Тако се данас свеж бели лук и фитопрепарати израђени на бази ове дроге (*Allium sativum bulbs*) користе као додатак исхрани, у превенцији и допунској терапији код поремећаја циркулације, повишеног крвног притиска и хиперлипидемија[8,16,61,64,65,66]. Захваљујући великој популарности у традиционалној народној медицини и доказаним повољним фармаколошким деловањима, на тржишту се налази и велики број готових фармацеутских препарата на бази белог лука. Њихова производња је у сталном порасту јер се употребљавају као помоћна превентивна и лековита средства. Иако неки произвођачи праве рекламу са аргументом да су њихови прооизводи без мириса и нису непријатни, то се не може прихватити као апсолутно тачно[67] с обзиром да се фармаколошка активност белог лука директно повезује са сумпорним једињењима која су уједно и одговорна за непријатан мирис ове дроге. Међутим, и поред широке употребе белог лука и препарата на његовој бази, званични подаци о нежељеним дејствима ове дроге су веома оскудни. Познато је једино да се сумпорна једињења присутна у луковици излучују преко коже и слузница, доводећи до непријатног мириса коже и даха. У ретким случајевима примена препарата на бази *Allium sativum bulbs* може изазвати контактни алергијски дерматитис[8,68]. Такође, у последње време забележене су и значајне интеракције белог лука са појединим групама лекова[69,70,71]. С обзиром на велики број препарата на бази белог лука који се на тржишту налазе у слободној продаји, могућност неправилне употребе (дозирање, начин примене, истовремена примена са одређеним лековима, употреба фитопрепарата непровереног састава и порекла – тзв. "дијететских додатака храни") намеће потребу детаљних испитивања њиховог деловања. Пре свега то је испитивање утицаја на функције јетре и других паренхиматозних органа, као и могуће интеракције са одређеним лековима[72,73]. Посматрајући метаболизам лекова, укључујући и фитопрепарате, неопходно је узети у обзир и утицај цревне микрофлоре на те процесе, нарочито код оралне примене, и то поготово оних који подлежу ентерохепатичкој рециркулацији[37.74,75].

2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

Овај рад и истраживање имали су следеће циљеве:

1. Утврдити да ли и у ком обиму водени екстракт белог лука, N-ацетил-L-цистеин, S-метил-L-цистеин, S-етил-L-цистеин, S-пропил-L-цистеин, γ-Glu-L-цистеин и цистеин (потенцијално активни принципи) имају антимикробни ефекат на следећим грам-негативним бактеријама: *Eserihia coli* ATCC 10536*, Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 и грам-позитивним бактеријама: *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 и *Bacillus subtilis* ATCC 11774 *in vitro*.

2. На основу разлика у јачини антимикробног ефекта воденог екстракта белог лука, N-ацетил-L-цистеина, S-метил-L-цистеина, S-етил-L-цистеина, S-пропил-L-

цистеина, γ-Glu-L-цистеина и цистеина остварити увид у допринос појединих активних принципа укупном антимикробном ефекту белог лука;

3. Испитати постојање дозне зависности антимикробног ефекта појединих активних принципа белог лука.

3. ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА

1. Водени екстракт белог лука инхибира раст микроорганизама *Eserihia coli* ATCC 10536*, Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027*, Staphylococcus aureus* ATCC 43300 и *Bacillus subtilis* ATCC 11774 *in vitro*.

2. Активни принцип белог лука алицин инхибира раст микроорганизама *Eserihia coli* ATCC 10536*, Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027*, Staphylococcus aureus* ATCC 43300 и *Bacillus subtilis* ATCC 11774 *in vitro*.

3. Активни принцип белог лука N-ацетил-L-цистеин инхибира раст микроорганизама *Eserihia coli* ATCC 10536*, Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027*, Staphylococcus aureus* ATCC 43300 и *Bacillus subtilis* ATCC 11774 *in vitro*.

4. Активни принцип белог лука S-метил-L-цистеин инхибира раст микроорганизама *Eserihia coli* ATCC 10536*, Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027*, Staphylococcus aureus* ATCC 43300 и *Bacillus subtilis* ATCC 11774 *in vitro*.

5. Активни принцип белог лука S-етил-L-цистеин инхибира раст микроорганизама *Eserihia coli* ATCC 10536*, Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027*, Staphylococcus aureus* ATCC 43300 и *Bacillus subtilis* ATCC 11774 *in vitro.*

6. Активни принцип белог лука S-пропил-L-цистеин инхибира раст микроорганизама *Eserihia coli* ATCC 10536*, Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027*, Staphylococcus aureus* ATCC 43300 и *Bacillus subtilis* ATCC 11774 *in vitro*.

7. Активни принцип белог лука γ-Glu-L-цистеин инхибира раст микроорганизама *Eserihia coli* ATCC 10536*, Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027*, Staphylococcus aureus* ATCC 43300 и *Bacillus subtilis* ATCC 11774 *in vitro.*

8. Активни принцип белог лука цистеин инхибира раст микроорганизама *Eserihia coli* ATCC 10536*, Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027*, Staphylococcus aureus* ATCC 43300 и *Bacillus subtilis* ATCC 11774 *in vitro*.

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДОЛОГИЈА

4.1. Материјал

4.1.1. Порекло биљног материјала

Бели лук који је коришћен у овом истраживању је набављен на локалној прехрамбеној пијаци у Крагујевцу у улици Светозара Марковића у Крагујевцу ("Мала пијаца") од произвођача Стефана Живадиновића који има пољопривредно домаћинство са локалитета села Драча на територији Шумадије у месецу јулу 2011. године. Врста *Alium Sativum L.* (форма озимог типа) је била у зрелом облику односно у стању у којем се иначе користи у исхрани или у неке друге сврхе. Бели лук је био домаће сорте и није био из увоза односно као такав се износи и продаје на прехрамбеној пијаци или користи у исхрани мештана свакодневно.

Узорци биљке и плодова белог лука су одређени су на нивоу врсте, подврсте и варијитета помоћу дихотомних кључева за детерминацију у зависности од таксона[13]. Називи таксона усклађени су са таксономском поделом датом у Бечком коду[13] и депоновани су у Департману за биологију и екологију Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу. Детерминацију биљке је обавио проф. др Аца Марковић за уже научне области екологије и географије биљака, Института за ботанику ПМФ-а Крагујевцу. Називи таксона усклађени су са таксономском поделом датом у Флори Европе[76], односно најновијом литературом која се бави систематиком рода *Alium*[77,78]. Сви узорци биљног материјала (цела биљка и плодови) су чувани у двоструким папирним џаковима на тамном и сувом месту до идентификације саме биљке да не би дошло до губитка испарљивих једињења до момента екстракције.Тај период није био дужи од 30 дана што је уобичајено са добром праксом при депоновању и припреми биљног материјала за детерминацију и екстракцију.

4.1.2. Добијање воденог екстракта *Allium sativum* L. *bulb*

Непосредно пред уситњавање и припреме за екстракцију плодови биљке белог лука су стављени, на промајно место, заштићено од светлости, уз неколико окретања плодова луковице да би се просушили и елиминисано евентуално присуство влаге.

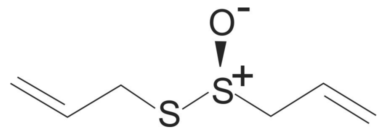
Након тога су очишћни од заштитних љуски које их обавијају и очишћени са водом. Затим су остављени да се просуше у трајању од 72 сата. Затим је за потребе испитивања одмерено је на аналитичкој ваги (*Ohaus Adventurer, USA*) која мери са прецизношћу од 0,001 g маса од 20 g свеже очишћене луковице белог лука. Потом је благо уситњен у фармацеутском млину (*Ика A11 BASIC,Germany*) подземни изданак-луковица која се иначе користи у исхрани је преливен са 400 ml пречишћене дестиловане воде која је добијена у дестилатору (*GFL 2008, Germany*) и која испуњава стандарде фармакопеје која су прописанана за фармацеутска истраживања. Лабораторијска чаша са воденим екстрактом је прекривена сахатним стаклом и након 24 сата уз повремено и константно мешање у једнаким временским интервалима од 2 сата је приступљено филтрацији и цеђењу са стандардним филтер папиром који је био постављен на левку за цеђење. (*Munktel grade 1602N 70g/m², Germany*).

Узорак екстракта смо добили након упаравања на ротационом вакум упаривачу (*Ика RV 10D, Germany*) на температури од 40°C и са подпритиском вакум пумпе од 350 mbar. Само упаравање је трајало 4 сата уз регулацију подпритиска у ратационом вакум упаривачу. Након тога је добијени водени екстракт је пренет у сушницу (*Binder E28, Germany*) на температуру од 37C° ради сушења до константне масе и тамо се сушио 12 сати. Екстракт је затим пренет у стаклени вакум ексикатор који смо оставили на собној температури, на тамном месту и одатле вршили мерење узорка. Добијени екстракт смо измерили на ваги и добили 10,19 g сувог екстракта. Прорачуном смо добили принос суве масе воденог екстракта који је износио 50,95 % у односу на почетну тежину узорка односно биљног материјала. Водени екстракт белог лука добијен на овај начин смо користили за даља микробиолошка испитивања и након тога је био пренет и депонован на температуру од 4 °C до тренутка апликације на дискове и даљи експериментални микробиолошки рад.

4.1.3. Супстанце испитиване у студији

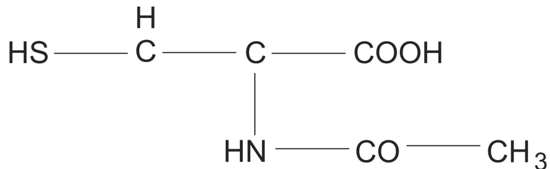
Супстанце које су конституенси биљке *Alium Sativum L.* чији се антибактеријски ефекат одређивао у овом истраживању су:

Алицин



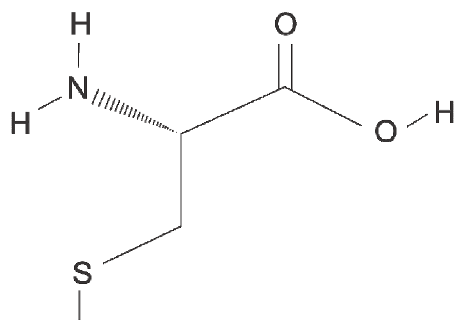
Молекулска формула $C_6H_{10}OS_2$, Молекулска тежина 162,27 g/mol

N-ацетил-L-цистеин



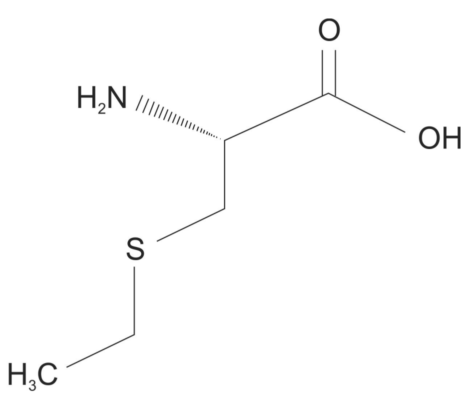
Молекулска формула $C_5H_9NO_3S$, Молекулска тежина 163,19 g/mol

S-метил-L-цистеин



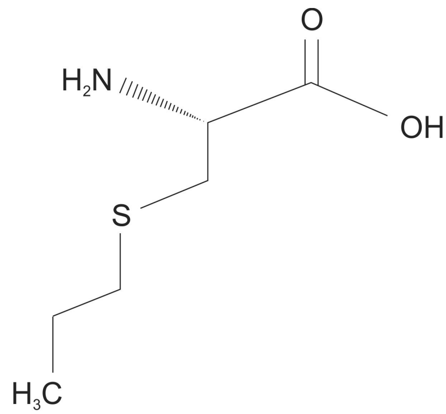
Молекулска формула $C_4H_9NO_2S$; Молекулска тежина 135,185 g/mol

S-етил-L-цистеин



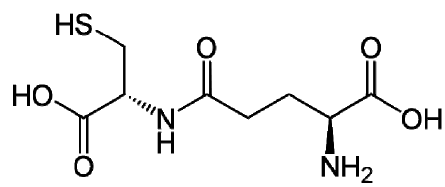
Молекулска формула $C_5H_{11}NO_2S$; Молекулска тежина 149,21 g/mol

S-пропил-L-цистеин



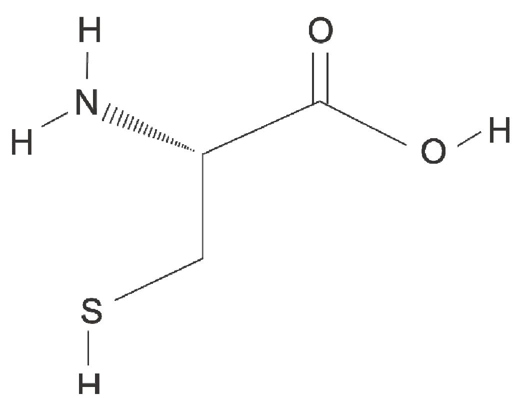
Молекулска формула $C_6H_{13}NO_2S$, Молекулска тежина 163,2379 g/mol

Гама-глутамил-L-цистеин



Молекулска формула $C_8H_{14}N_2O_5S$, Молекулска тежина 250,27 g/mol

L-цистеин



Молекулска формула $C_3H_7NO_2S$, Молекулска тежина 121,16 g/mol

Све претходно наведене чисте супстанце чији се антимикробни ефекат испитивао су биле чистоће ≥99% по произвођачкој спецификацији.

Контрола сензитивности је била комерцијални бактерицидни антибиотик гентамицин широког спектра деловања.

Супстанце високе чистоће које се користе у испитивањима су набављене од специјализованог светског произвођача са добром произвођачком праксом - *Sigma-Aldrich*, (добављач: *Uni-Chem*, Страхињића бана 44, 11000 Београд)] док је антибиотик гентамицин произвођача Галеника АД, Србија у ампулама од 80 mg/ 2 ml купљен у локалној апотеци.

4.1.4. Бактеријски сојеви коришћени у студији

У овом истраживању су биле укључене следеће ATCC [American Type Culture Collection, компанија MicroBioLogics, Meryland, USA. (добављач: ПроМедиа д.о.о. Пословни центар Кикинда, Краља Петра 1/114, 23300 Кикинда)] грам-негативне и грам-позитивне бактерије:

- *Escherichia coli* ATCC 10536, Kwik stik duopak
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, Kwik stik duopak
- *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, Kwik stik duopak
- *Bacillus subtilis* ATCC 11774, Kwik stik duopak

а) Основне особине бактерија *Escherichia coli*

Escherichia coli спада у групу грам-негативних, покретних и факултативно анаеробних бацила. То су прави штапићи, пречника 1-1,5 μм, дужине 2-4 μм. Распоређени су појединачно, у паровима и неправилним скупинама. Иако је она део нормалне флоре дигестивног тракта човека, ова бактерија се често изолује као етиолошки агенс различитих патогених инфекција – сепсе, менингитиса новорођенчади, инфекције уринарног тракта или тешких интрахоспиталних инфекција. Узрокује често ентероколитис, односно дијарејно обољење, нарочито у земљама у развоју. Пут преноса ове бактерије је фекално-орални, нарочито међу децом у болницама, путем хране, воде и прљавих руку. Патогеност за човека се испољава у способности ове бактерије да изазове следеће клиничке синдроме или две групе инфекција: екстраинтестиналне инфекције и цревне инфекције (нпр. ентероколитис).

Најчешће су инфекције уринарног тракта, сепса и менингитис новорођенчади. Она може да изазове и инфекције жучне кесе, апендицитис, перитонитис и др[79].

б) Основне особине бактерија *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa је откривена 1872. године. Обично код особа са ослабљеним имунитетом узрочник је инфекција (уринарних, инфекција опекотина, инфекција рана, сепсе) и веома је отпорна. Припада групи грам-негативних бацила. Нема капсулу и не ствара спору. Поседује фимбрије и покретна су захваљујући монополарној флагели. На основу микроскопског препарата се тешко препознаје. Расте на обичним подлогама на температурама од 37-42°C. Бактерија ствара продоран мирис који подсећа на цвет липе. Припада неферментујућим бацилима и не разлаже лактозу. Продукција два пигмента је карактеришу: пијоцијанин (плавозелене боје) и флуоресцин (зеленожуте боје). Живи у слободној природи у земљи, површинским водама, биљкама, животињама и представља део нормалне флоре црева и коже код око 10% људи. Потребе ових бактерија за хранљивим материјама су минималне па се зато налазе на местима где других врста микроорганизама има мање. Изузетно је отпорна према факторима спољашне средине, антимикробним средстима и дезинфицијенсима. Брзо се размножава и месецима може да живи у води. У болничким условим за ширење инфекције *Pseudomonasa* значајну улогу има нерационална употреба антибиотика. Најефикаснија заштита је добра асепса, стерилизација инструмената и хигијена здравстених просторија. Резистентан је на већину антибактеријских лекова осим на аминогликозиде и нове бета лактаме[79].

в) Основне особине бактерија *Staphylococcus aureus*

Стафилококе су грам-позитивне бактерије лоптастог облика најчешће распоређене у облику лоптастих формација по чему су и добиле име по грчкој речи *staphylos* – грозд. Спадају у анаеробне бактерије. Назив потиче од карактеристичног пигмента златножуте боје који колонијама *Staphylococcus aureusa* одређује боју. Поседује велики број структуралних и солубилних фактора који им омогућавају велику продорност, уништавање ткивних елемената, изазивање запаљенских реакција, интоксикацију организма домаћина и избегавање дејству механизама имуности. Може да продукује бета лактамазе и поседује друге механизме резистенције што га чини једним од најважнијих бактеријских агенаса у хуманој медицини. Поседује велики број структурних и солубилних фактора вируленције и сматра се стрикно патогеном врстом. Утврђено је да 10% до 30% здравих особа може бити транзиторно колонизовано овом врстом бактерија. Колонизација се најчешће остварује на назалој слузокожи, у периеналној регији и другим деловима коже што представља добар извор и резервоар инфективног ланца за настанак болничких и ванболничких епидемија. *Staphylococcus aureus* може да изазове оштећења у готово свим органима и ткивима човека захваљујући синтези великог броја егзопродуката и поседовања структурних елемената који могу директно или индиректно повећати вируленцију. Обољења које ова врста бактерија изазива се могу поделити на токсемична и супуративна. У токсемична се убрајају стафилококно тровање храном, синдром опарене коже и токсични шок синдром. У супуративну групу спадају обољења код којих су стафилококе дирекно присутне у некој регији: кожне инфекције, инфекције респираторних путева, инфекције урогениталног тракта, синузитис, септични артритис, ендокардитис и друга[79].

г) Основне особине бактерија *Bacillus subtilis*

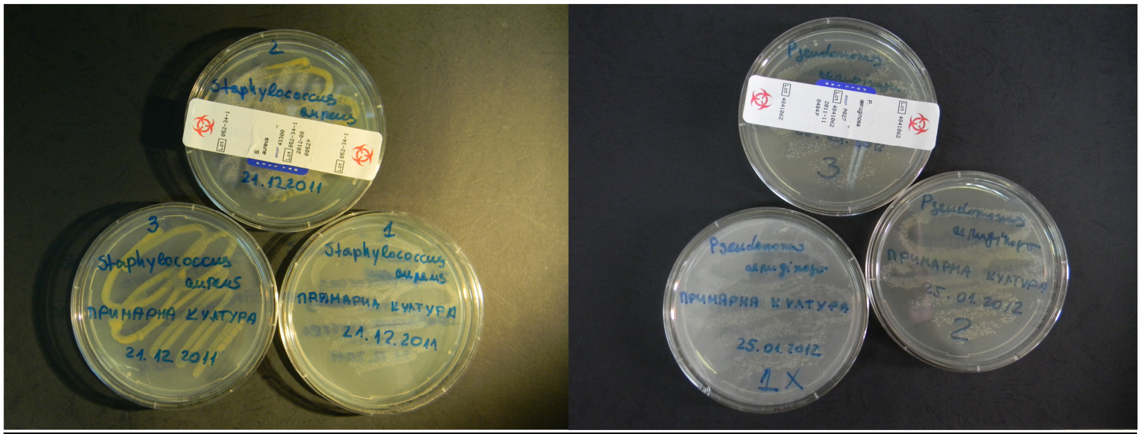
Припадају групи грам позитивних бактерија са спором која је положена централно или суптерминално. Спорама ове бактеријске врсте се врши контрола стерилизације врелим ваздухом у сувом стерилизатору и контролу стерилизације етилен оксидом. *Bacillus subtilis* расте на већини хранљивих подлога. Његове споре су убиквитарне, налазе се у слободној природи, поврћу, млеку, кобасицама и оне су део нормалне микрофлоре човека. Ова бактерија може бити патогена и може изазвати опортунистичке инфекције: сепсу код имунокомпромитованих болесника и коњуктивитис код особа које већ имају лезије. Она је чест контаминат бактериолошких подлога[79].

4.1.5. Референтне културе бактерија

За рад у микробиолошкој лабораторији је била неопходна је употреба референтних култура. У нашим истраживањима смо користили KWIK-STIK™ паковања, са лиофилизованим облицима бактерија. Манипулисање са референтним културама обављено је по упутству компаније *MicroBioLogics*. *KWIK-STIK*™ паковања су припремљена према методи *Yamaia* и групе аутора, а укључује употребу суспендујућег медијума који се састоји из желатина, обраног млека, аскорбинске киселине, декстрозе и угља. Желатин је носач за микроорганизме. Обрано млеко, аскорбинска киселина и декстроза штите интегритет ћелијског зида микроорганизама током процеса лиофилизације и чувања. Угаљ неутралише токсине који се могу формирати током лиофилизације. Свака *KWIK-STIK*™ јединица садржи лиофилизовану пелету једног соја микроорганизма, резервоар са флуидом за хидратацију и брис за инокулацију. Комплет се налази у фолији која садржи и десикант да би се спречило накупљање влаге. Лиофилизовани облик микроорганизма има слабије изражене или исте карактеристике у односу на пасаже референтне културе. Ове бактерије намењене су за *in vitro* употребу. Лиофилизати и раст који се добија након њиховог засејавања сматрају се биохазардним материјалом. Ови производи садрже вијабилне микроорганизме који могу, под одређеним условима, изазвати обољења. Због тога треба користити одговарајуће технике како би се избегло излагање и контакт са микроорганизмима. *KWIK-STIK*™ треба да се чува на температури од 2 - 8 ^{o}C у оригиналној, затвореној бочици/фолији са десикантом. Ако се чувају према упутству, лиофилизовани микроорганизми задржавају до истека рока трајања који је означен на амбалажи своје особине у оквиру прописаних граница.

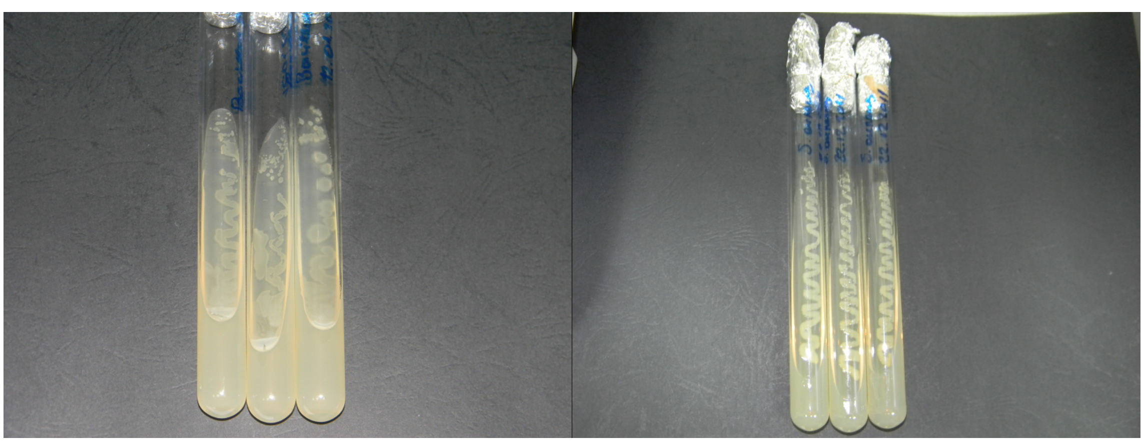
4.1.6. Добијање примарне културе бактерија

KWIK-STIK™ брис-систем се извади из фрижидера (чува се на температури од 2 - 8 ^{o}C) и неотворен се остави да достигне собну температуру. Затим се асептичном техником отвори фолија и скине налепница. Налепница се може залепити на Петри посуду са примарном подлогом за идентификацију или се може искористити за документацију о контроли квалитета. *KWIK-STIK*™ брис-систем треба држати усправно, тако да резервоар са средством за хидратацију буде у горњем положају а пелета у доњем делу брис-система. Затим се ослободи средство за хидратацију ломљењем ампуле помоћу два прста и тако остави да оно дође до дна брис-система у коме се налази желатинозни диск. Брис-систем се држи усправно, са чепом окренутим на горе, и лагано прстом лупати дно система да би се поспешило спуштање течности у доњи део. Стиском два прста поломи се пелета у доњем делу система и мућка све док се не постигне униформна величина честица и док суспензија не постане хомогена. Затим се одмах засити брис-систем средством за хидратацију и бактерија пренесе на адекватни, неселективни, хранљиви или обогаћени агар. Уз примену притиска, брис се затим ротира и инокулише кружна површина подлоге (пречника 90 mm). Истим брисом се настави такво засејавање на преосталом делу подлоге. Инокулисана подлога се затим инкубира на одговарајућој температури и при условима који одговарају датом микроорганизму. На тај начин смо добили примарну културу, која нам даље служи за добијање субкултура, које смо користили у нашем истраживању.



Слика 2. Примарне културе *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 бактеријских врста коришћених у раду

Када се добије примарна култура, помоћу езе и у стерилним условима се изврши њено пресејавање на коси агар (*Miller Hinton* агар). Затим је култура инкубирана на температури од 37 °C у сушници (*E28; BINDER, Germany*) у току 24 сата. У току истраживања као хранљиву подлогу за бактерије на косом агару користи се *Miller Hinton* агар M173 [добављач: ПроМедиа д.о.о. Пословни центар Кикинда, Краља Петра 1/114, 23300 Кикинда (произвођач: *HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. 23, Vadhani Ind. Est., LBS Marg, Mumbai – 400 086, India*)].



Слика 3. Културе на косом MX агару *Bacillus subtilis* ATCC 11774 и *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 бактеријских врста коришћених у раду

4.1.7. Спремање суспензије бактеријских култура

На већ засејаном косом агару, где је култура стара најмање 24 сата, помоћу стерилне езе и у стерилним условима узимамо узорак културе. У ампули где се налази вода добијена из дестилатора, уронимо врх езе да би се скинуле бактерије са омче и промућка се да би се равномерно распоредиле у води запремине 10 ml. Након тога одпипетира се 2 ml супспензије у епрувету пречника 16 mm и стављамо је у дензитометар (*DEN-1B Biosan, Latvia*) којим се врши одређивање концетрације бактеријске суспензије у Мекфарланд јединицама. Очитана вредност за сва мерења је била приближно 5 Мекфарланд јединица према одговарајућим нумеричким вредностима концентрација бактеријских суспензија и њихове оптичке густине на 550 nm што прерачунато на бактериолошку концетрацију суспензије износи $1{,}5 \cdot 10^8$ ћелија/ml (cfu/ml). Затим смо одпипетирали инсулинским шприцем 100 μl суспензије из епрувете коју смо разблажили са 0,9 ml воде што даје укупну запремину од 1 ml и бактериолошку концетрацију суспензије која износи $1{,}5 \cdot 10^7$ ћелија/ml (cfu/ml).. На централном делу Петри кутије са плочастим МХ агаром, додајемо 1 ml укупно суспензије микроорганизма, затим благим кружним покретима у правцу казаљке на сату померамо Петри кутију, да бисмо равномерно распоредили микроорганизме по површини хранљиве подлоге[80]. Петри кутије су пречника 90 mm, са већ разливеним чврстим *Miller Hinton* агаром и дебљине су 4 mm. (Наведене подлоге су производ фирме *Liofolchem Italy*, (добављач: *Uni-Chem*, Страхињића бана 44, 11000 Београд). Ове готове подлоге испуњавају све стандарде за микробиолошка испитивања. Раст бактеријских култура које су испитиване чији се антибактеријски односно инхибиторни ефекат испитивао се одвијао на површини МХ агар подлога тј. засејавање бактерија је било површинско.

4.1.8. Припрема и разливање *Miller Hinton* (МХ) агара

За припремање и разливање Милер Хинтон агара, одмери се 38,0 g МХА и суспендује у 1000 ml, хладне дестиловане воде. Затим се подлога остави да стоји 15 минута на собној температури уз стално мешање, да би се равномерно растворила. Подлога се затим пажљиво загрева до фазе кључања да се потпуно раствори. После тога се разлије у епрувете или боце и стерилише у аутоклаву 15 минута, на 121°C.

После стерилизације подлога у епруветама се охлади у укошеном положају а подлога у боцама се охлади на 60 °C и стерилно разлије у петри кутије.

На 1 l МХА иде: 300,00 g говеђег серумског албумина, 17,50 g хидролизата казеинске киселине, 1,50 g скроба и 17,00 g агара. Коначни pH, на температури од 25 °C износи 7,3±0,2.

4.2. МЕТОДОЛОГИЈА

4.2.1. Одређивање антибактеријског ефекта

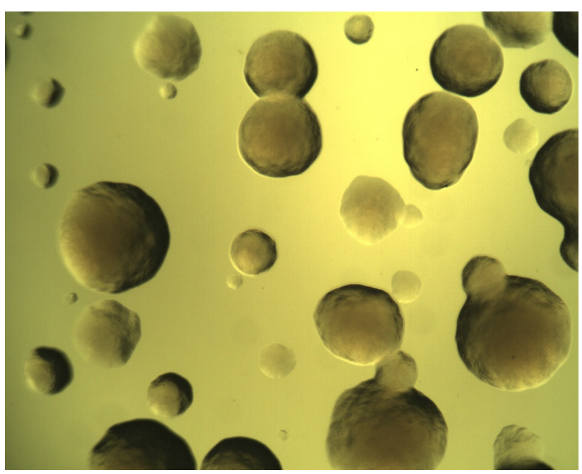
Осетљивост сојева бактерија на испитиване супстанце и антибиотик гентамицин као контролу је одређиван коришћењем стандардне диск дифузионе методе уз примену софтвера *Motic Images Plus 2.0 ML* који је коришћен за мерења површина и пречника зоне инхибиције испитиваних супстанци и екстракта. Поступак је познат и као Кирбу-Бауеров тест који су развили стандардизовану процедуру у којој је *Mueller Hinton* (MH) агар изабран као подлога за тестирање[81]. Метода је рађена према упуствима и стандардима *CLSI* и *BSAC*[82].

У испитивањима смо користили дискове који су од филтер папира (произвођач *Wathman, Usa*) димензија пречника 10 mm и дебљине 0,5 mm на којима је извршен нанос прецизно одређених количина екстракта, испитиваних супстанци или антибиотика гентамицина. Димензије дискова су имале минимална одступања које смо узели у обзир коришћењем софтвера *Motic Images Plus 2.0 ML*. Супстанце и екстракт су испитивани за количине Q од 30 mg, 10 mg, 3 mg, 1 mg, 300 µg, 100 µg по диску док је дејство алицина испитивано у количинама супстанце Q од 600 µg, 500 µg, 400 µg, 300 µg, 200 µg, 100 µg по диску. Гентамицин као контрола је наношен у количинама Q од 8 µg, 4 µg, 0,4 µg, 0,1 µg, 0,04 µg, 0,01 µg по диску. Наведене количине су припремљене након серије разблажења за све испитиване супстанце и екстракт и оне су биле спремљене за апликацију на дискове у укупној запремини од 1 ml раствора. Апликација на дискове испитиваних супстанци, екстракта и антибиотика гентамицина је вршена са микролитарским шприцем (*Hamilton 1001 LTN-USA*), са увек идентичним запреминама при чему се водило рачуна о томе да се раствори са активним принципима комплетно адсорбују унутар запремине дискова да не би дошло до губитака испитиваних супстанци, екстракта или антибиотика гентамицина. Сушење раствора приликом наноса поменутих количина се одвијало на собној температури и мањим делом у сушници (*E28; BINDER, Germany*) на температури од 37 °C и у стерилним условима.

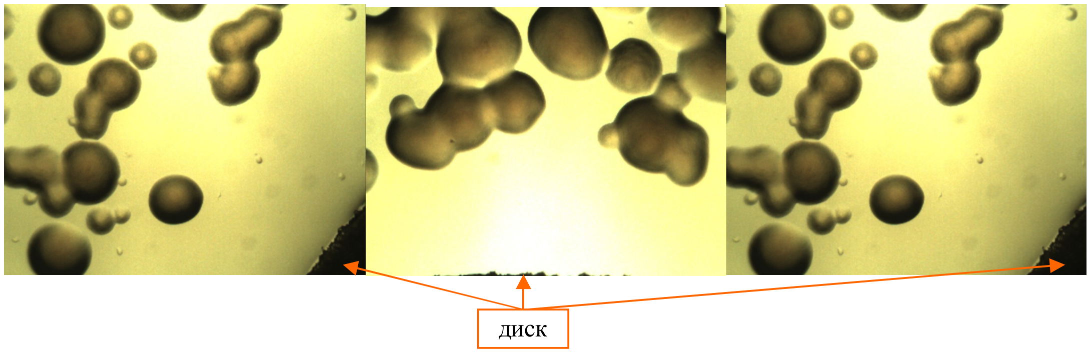
Као слепу пробу употребљавали смо диск са растварачем водом која је нанешена на дискове у истој запремини као и испитиване супстанце, антибиотик или екстракт.

Инкубација бактеријских култура које смо испитивали је трајала 24 сата такође на температури од 37 ^{o}C и увек је поштована идентична процедура произвођача. Након апликације на дискове испитиваних количина супстанци или воденог екстракта белог лука и њиховог аплицирања на површину Милер Хинтон агарне плоче на коју је претходно нането укупно 1 ml раствора (100 μl суспензије и 900 μl воде), сачека се петнестак минута да расртварач испари и делимично инкорпорира у подлогу да би дошло до дифузије из дискова на МХ агар хранљиве подлоге која се налазила разливена у Петријевој шољи. Способност раста и размножавања одређених сојева батерија засејаних на МХ агар плочи зависи од његове осетљивости, тако да се око диска гради бистра провидна зона кружног облика у којој нема раста бактерија, уколико антибактеријски ефекат постоји. Кружно око диска настаје опадајући градијент концентрације, који зависи од коефицијента дифузије, растојања од диска као и од укупне количине супстанце у диску. Величина зоне инхибиције је сразмерна осетљивости микроорганизма на испитиване супстанце и ектракт. Сви услови су били стандардизовани: густина инокулима која је увек примењивана на површину МХ агарне плоче у количини од 100 μl суспензије и концентрацијом бактерија од $1{,}5 \cdot 10^{7}$ ћелија/ml, састав и дебљина подлоге која је износила 4 mm (увек од истог произвођача - *Liofolchem, Italy)*, pH подлоге од 7,3±0,2 и времена инкубације које је било 24 часа, након чега су вршена снимања испитиваних узорака према стандардима *CLSI* и *BSAC*[82]. Пречник зоне инхибиције и површина зоне инхибиције су изражени у mm и mm² и пропорционални су количини антибактеријске супстанце или екстракта[79]. Код неосетљивих сојева бактерија зоне инхибиције су биле мале или их уопште није било, тако да су испитиване бактеријске културе расле непосредно поред дискова у којима су се налазиле одређене количине супстанци или воденог екстракта белог лука.

Преглед резултата испитивања и очитавање површина колонија и полупречника зоне инхибиције се обављао светлосним микроскопом SFC 28 са интегрисаном камером *Moticam 1000, 1.3MP Live Resolution* (произвођач *Motic, Canada* дистрибутер Superlab, Београд) и фотоапаратом марке *Nikon Coolpix L110* (који има објектив величине 16 x 20 инча, 15 X оптички зум и 12,1 мегапиксела). У току испитивања, снимљена је свака Петри кутија са инокулираном бактеријском културом са испитиваном супстанцом или екстрактом које су биле тестиране. Сва мерења су се обављала у четири понављања за сваку испитивану количину а затим су очитавани пречници и површине евентуалних зона инхибиције тестираних супстанци, екстракта или антибиотика гентамицина. Користећи софтвер *Motic Images Plus 2.0 ML* који подржава камеру микроскопа *Motic SFC-28*, одредили смо површину и пречник зоне инхибиције.Томе је претходило снимање сваког узорка појединачно. Сви снимци су били у резолуцији димензија пиксела 3000 висине и 4000 ширине, док је за прецизно одређивање површине зоне инхибиције и пречника коришћена фунције софтвера *line*, *circle* и *elipse* који је претходно калибрисан са кружним узорцима тачно одређених димензија произвођача камере *Motic SFC-28* и поменутог рачунарског програма. Поменуте функције апликативног софтвера су омогућиле врло прецизно одређивање површина и пречника зона инхибиција својим опцијама да означена површина може бити и благо неправилног облика тј. не мора бити апсолутни круг или бар приближно. Из површине круга добијене на тај начин из софтверског извештаја добијамо пречник зоне инхибиције који прецизно описује означену површину и елиминишемо мерења са стандардним мерним инструментима и грешке које су саставни део сваког експерименталног рада[83]. На слици 7. је пример означене површине и израчунатог пречника зоне инхибиције за поменуте концетрације за узорак и методологија која је поновљана и код свих осталих мерења и испитивања. У извештају који смо добили и који се налази на слици се налазе израчуната површина, пречник и дужина кружнице означене површине зоне инхибиције испитиване супстанце. Такође, са камером микроскопа се може јасно уочити докле се простире зона инхибиције (слика 6.)

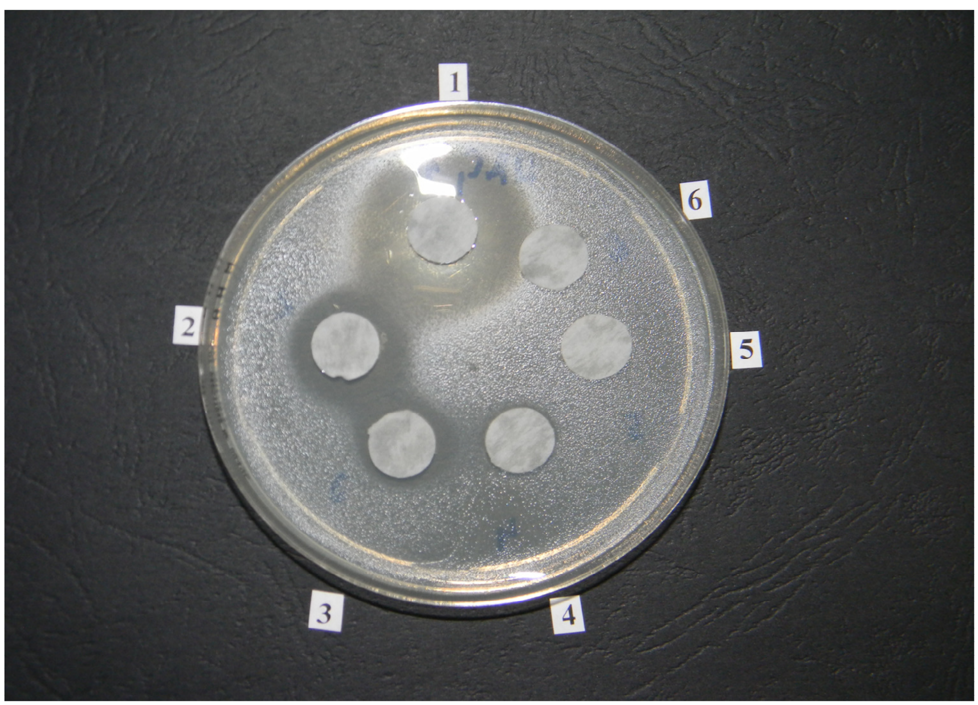


Слика 4. Снимак микроскопа SFC 28 и камере *Moticam 1000* (1,3 MP Live Resolution, Digital Microscopy) за бактеријску врсту *Escherichia coli* ATCC 10536 након 24 сата и увећањем 4 X ван зоне дејства

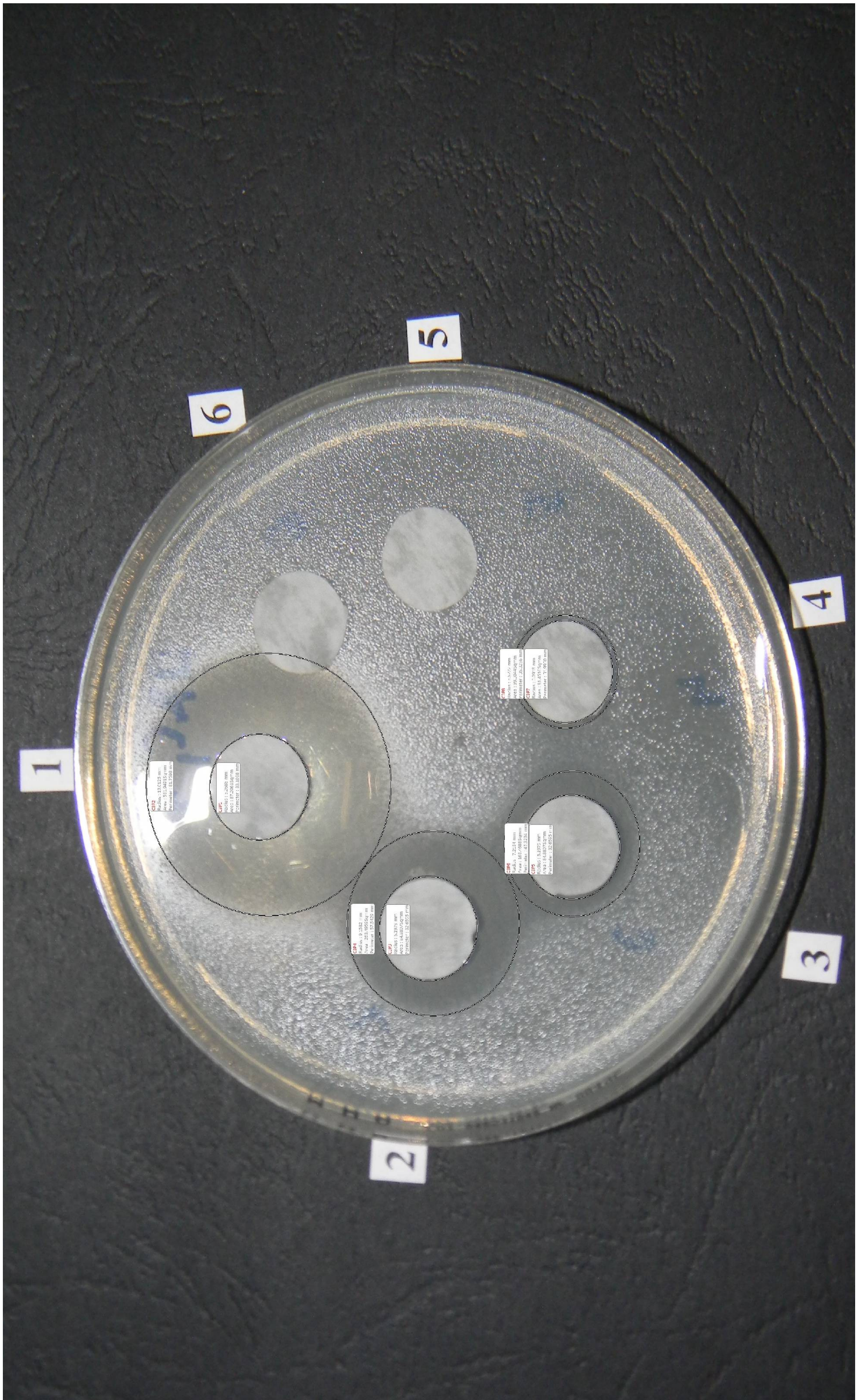


Слика 5. Снимци микроскопа са камером *Moticam 1000* (1,3 MP Live Resolution, Digital Microscopy) за бактеријску врсту *Escherichia coli* ATCC 10536 након 36 сати и увећањем 4 X за супстанцу NAC у зони дејства од 1 mg по диску

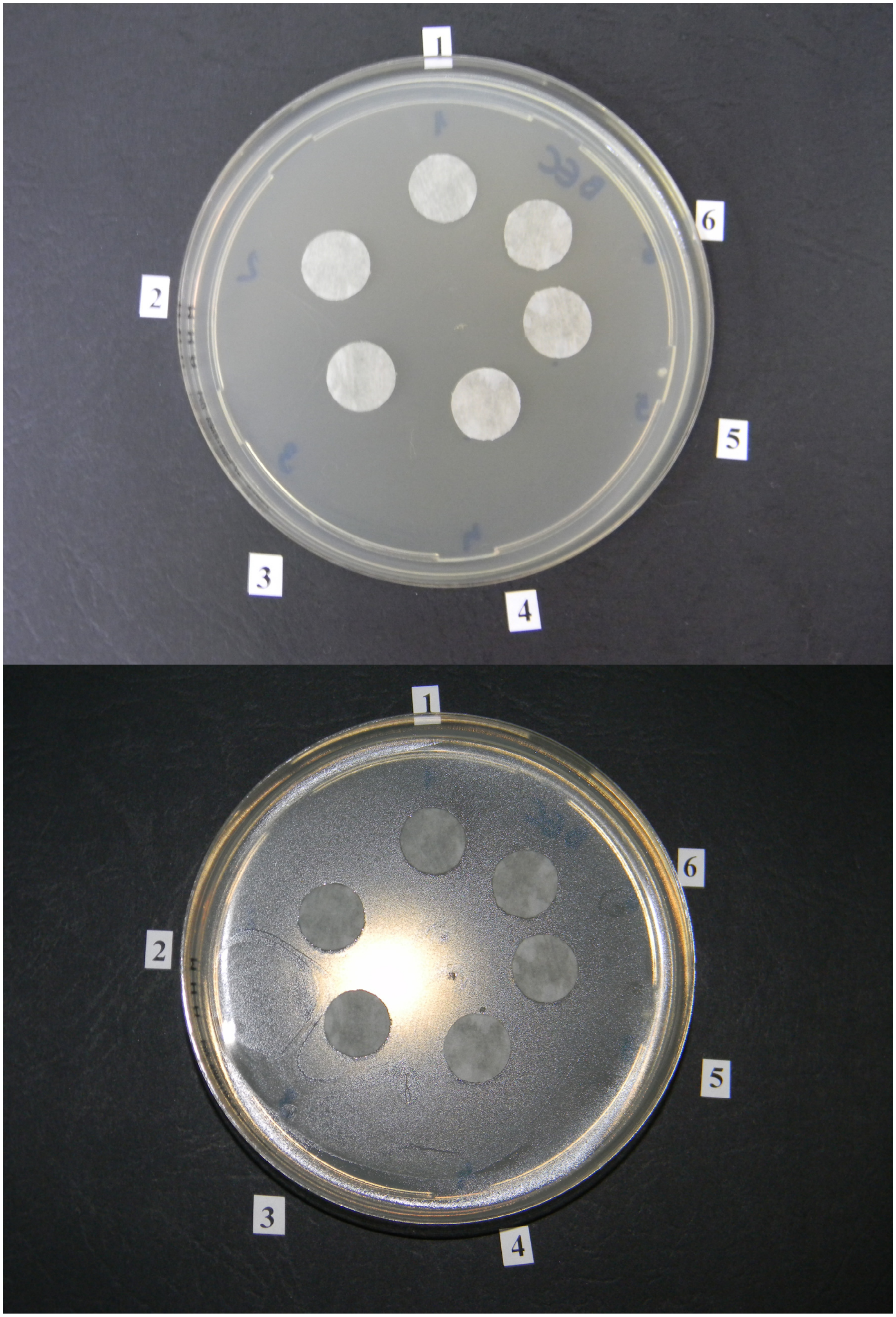
Код супстанци које су показале ефекат рађена су додатна испитивања са еквимоларним количинама манитола и натријум хлорида у односу на количине које су коришћене у експериментима по диску да би се искључио евентуални хипотонични ефекат и да би смо могли да потврдимо да је у питању антибактеријски ефекат. Количине су прерачунаване за алицин и NAC. Ни у једном од мерења није потврђен антибактеријски ефекат примењених хипотоничних раствора што је такође снимљено, документовано и сачувано[83].



Слика 6. Узорак супстанце NAC на бактеријској врсти *Escherichia coli* ATCC 10536 за количине Q 30 mg, 10 mg, 3 mg, 1 mg, 300 μg и 100 μg по диску



Слика 7а. Означена површина и пречници зона инхибиције за узорак NAC на бактеријској врсти *Escherichia coli* ATCC 10536 у mm² и mm



Слика 7б. Узорак S-етил-L-цистеина на бактеријској врсти *Staphylococus aureus* (нема зоне инхибиције) за количине Q од 30 mg, 10 mg, 3 mg, 1 mg, 300 μg и 300 μg

4.2.2. Одређивање минималне инхибиторне концетрације воденог екстракта белог лука, алицина и N-ацетил-L-цистеина

Минимална инхибиторна концентрација (МИК) се одређивала екстраполацијом регресионе линије логаритма количина активне супстанце и пречника зоне инхибиције раста микроорганизама методом најмањих квадрата.

Математички модел који је формиран у компјутерском програму ексел је садржао вредности дифузионе константе антибиотика (D), време за које је формирана инхибиторна зона коришћеног антибиотика гентамицина (T), дистанцу између диска и краја зоне инхибиције (X), количину антибиотика по диску (m). Ова математичка релација је приказана у следећој формули:

$$\ln m' = \ln m - (X^2 / 4DT) \quad (1)$$

где је m' концентрација при којој више не постоји инхибиција раста бактерија.

У лабораторијама које рутински изводе тестирање антибиотика на микроорганизме долазимо до података да су неколико параматара релативно константни[84] па претходну математичку формулу можемо приказати користећи две нове константе к и К као:

$$\log MIC = \log Q - (Z^2 / k) - K \quad (2)$$

или

$$Z^2 = A \log Q - A \log MIC + B \quad (3)$$

У релацији (3) је укључена директна корелација између количине антибиотика по диску m'' и минималне инхибиторне концетрације (МИК). Зона инхибиције (Z) је изражена као квадрат пречника зоне инхибиције где се добија најбоља линеарност функције. Константе A и B варирају у зависности која се врста подлога користи, инкубационих процедура, густине инокулума бактеријских култура и минималних одступања које су каректеристичне за индивидуалне лабораторије које врше тестирање и одређивање зона инхибиција антибиотика на микроорганизме.

Ако је

$$y = Z^2, x = \log Q, C = -A \log MIC + B$$

онда је

$$y = Ax + C \quad (4)$$

и

$$A = \frac{N\sum xy - \sum x \sum y}{N\sum x^2 - (\sum x)^2} \quad (5)$$

Рачунање методом најмањих квадрата укључујући формуле 4 и 5 нам даје константу А. Константа В је израчуната из формуле 3 са средњим вредностима y и x. Антибиотик који је коришћен као контрола је гентамицин. Вредности које су рачунате за МИК екстракта или супстанци су биле увек у односу на антибиотик гентамицин као контролу који је коришћен у овом истраживању[85].

4.2.3. Статистичка обрада података

Количине супстанци Q и екстракта белог лука у испитивањима су логаритамски трансформисане за основу 10, а затим је испитивана линеарна регресија за трансформисане количине и пречнике инхибиције раста микоорганизама методом најмањих квадрата. Значајност линеарне регесије је проверавана анализом варијансе, а потом је израчунат коефицијент корелације. Графичком методом је израчуната количина која изазива 50 % максималне инхибиције (EQ_{50}) са интервалом поверења 1.96 *стандардна грешка. Вероватноћа нулте хипотезе која представља граничну вредност за њено одбацивање је $\leq$ 0,05.

4.2.4. Снага студије

Пошто је раду тражена корелација између количина активне супстанце и величине зоне инхибиције раста микроорганизама, величина групе је одређена на основу коефицијента корелације. Минимална вредност коефицијента корелације која има значај у овим истраживањима је R = 0,4; Жељена снага студије је 80%, а вероватноћа грешке типа 1 алфа = 0,05; према одговарајућим таблицама за израчунавање величине узорка, на основу ових параметара потребно је било обезбедити минимум 22 пара количина/ефекат, што се постигло комбиновањем броја количина екстракта или чистих супстанци односно понављања експеримената[86].

5. РЕЗУЛТАТИ

5.1. Анализа инхибиторне активности воденог екстракта белог лука и сумпорних конституенаса белог лука за бактеријску културу *Escherichia coli* ATCC 10536

5.1.1. Линеарна регресија између логаритма количине воденог екстракта белог лука и површине/пречника зоне инхибиције раста бактерије *Escherichia coli* ATCC 10536

У овој анализи испитивана је линеарна регресија између логаритамски трансформисаних количина за основу 10 (log Q) испитиваног воденог екстракта белог лука и површина зона инхибиције (P) изражених у mm², односно пречника зоне (R) инхибиције изражених у mm. Одређивано је да ли између вредности логаритма количина Q од 30 mg, 10 mg и 3 mg воденог екстракта белог лука апликованих на диск и површина, односно пречника зоне инхибиције постоји линеарна зависност и какве је јачине таква веза (Табела 1, График 1,2,3 и 4). Тестирање значајности линеарне регресије је одређивано за количине екстракта које су имале антибактеријски ефекат на бактерију *Escherichia coli* ATCC 10536. Резултати показују да између испитиваних обележја постоји статистички високо значајна линеарна повезаност и јака позитивна корелација.

Табела 1. Линеарна регресија логаритама количина Q од 30 mg, 10 mg и 3 mg воденог екстракта белог лука по диску и површина/пречника зоне инхибиције на колонијама бактерије *Escherichia coli* ATCC 10536

Екстракт Бели лук	**Површине зоне инхибиције P (mm²)**	**Пречник зоне инхибиције R (mm)**	**Тестирање линеарне регресије**
30 mg	299,22	19,52	АНОВА тест logQ/P
по диску	277,15	18,79	
	280,71	18,91	F=**58,219**; **p<0,001,**
	293,84	19,38	**r=0,924;** $\mathbf{r^2=0,839}$
Xs+SD	287,73±10,50	19,15±0,35	
10 mg	172,74	14,83	АНОВА тест logQ/R
по диску	149,28	13,79	
	158,73	14,22	F=**68,904**; **p<0,001,**
	161,65	14,35	**r=0,934;** $\mathbf{r^2=0,873}$
Xs+SD	160,60±9,66	14,30±0,43	
3 mg	141,38	13,42	Спирманов тест logQ/P
по диску	132,05	12,97	и logQ/R
	121,87	12,46	
	131,44	12,94	**ρ=0,946; p<0,001**
Xs+SD	131,68±7,80	12,95±0,39	

Xs- средња вредност површине и пречника зоне инхибиције
SD – стандардна девијација

1. Log Q и P: АНОВА тест: **F=58,219**; **p<0,001**; Пирсонов коефицијент корелације: **r=0,924**, кориговани коефицијент детерминације **r^2=0,839; p<0,001; Табела 1**). Спирманов коефицијент корелације ρ**=0,946; p<0,001**

2. Log Q и R: АНОВА тест: **F=68,904**; **p<0,001**; Пирсонов коефицијент корелције: **r=0,934**, кориговани коефицијент детерминације **r^2=0,873, p<0,001; Табела 1**). Спирманов коефицијент корелације ρ**=0,946; p<0,001**

График 1. Зависност логаритма количине екстракта белог лука Q од 30 mg, 10 mg и 3 mg по диску и површине зоне инхибиције на колонијама бактерије *Escherichia coli* ATCC 10536

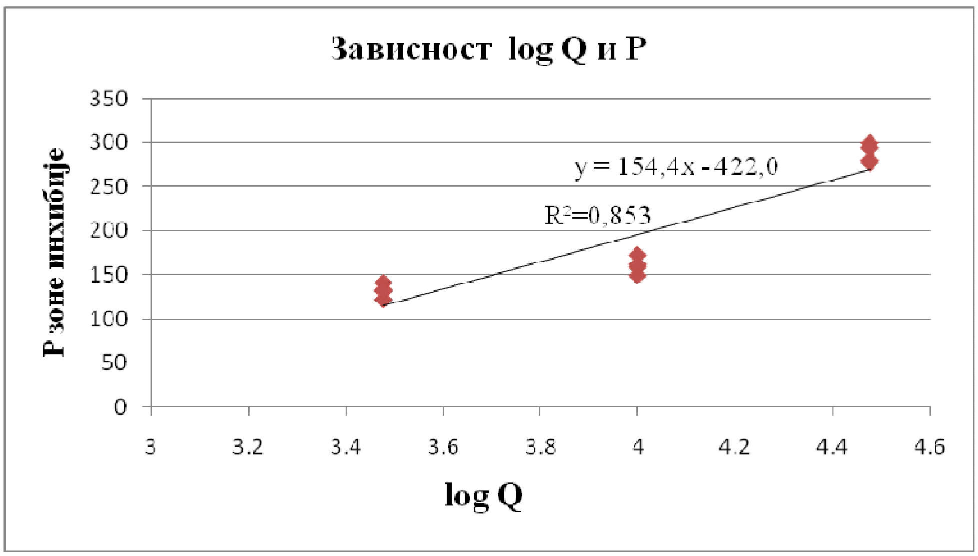
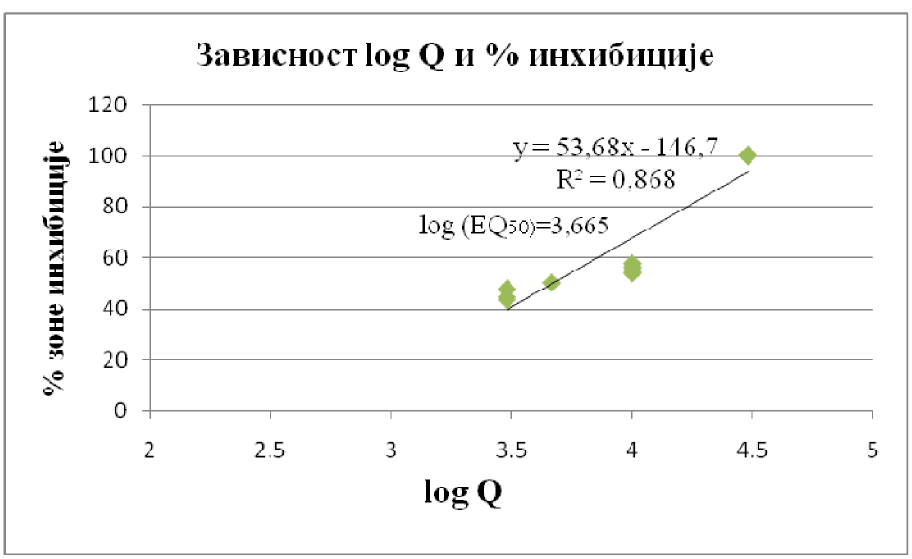


График 2. Зависност логаритма количине екстракта белог лука Q и % инхибиције на колонијама бактерије *Escherichia coli* ATCC 10536



За испитиване вредности воденог екстракта белог лука у количинама Q од 30 mg, 10 mg и 3 mg по диску логаримована количина супстанце која изазива 50% максималног ефеката (EQ_{50}) је 3,665 што антилогаритмовано износи 4623,81 μg односно изражено у милиграмима 4,62 (mg) за бактеријску културу *Escherichia coli* ATCC 10536. Добијене вредности се односе на прорачун добијен из вредности са графика logQ и % инхибиције које су измерене дејством испитиваног екстракта мерењем површина зона инхибиције. Вредности логаритма количина екстракта су прерачунате за микрограмске вредности.

График 3. Зависност логаритма количине екстракта белог лука Q од 30 mg, 10 mg и 3 mg по диску и пречника зоне инхибиције на колонијама бактерије *Escherichia coli* ATCC 10536

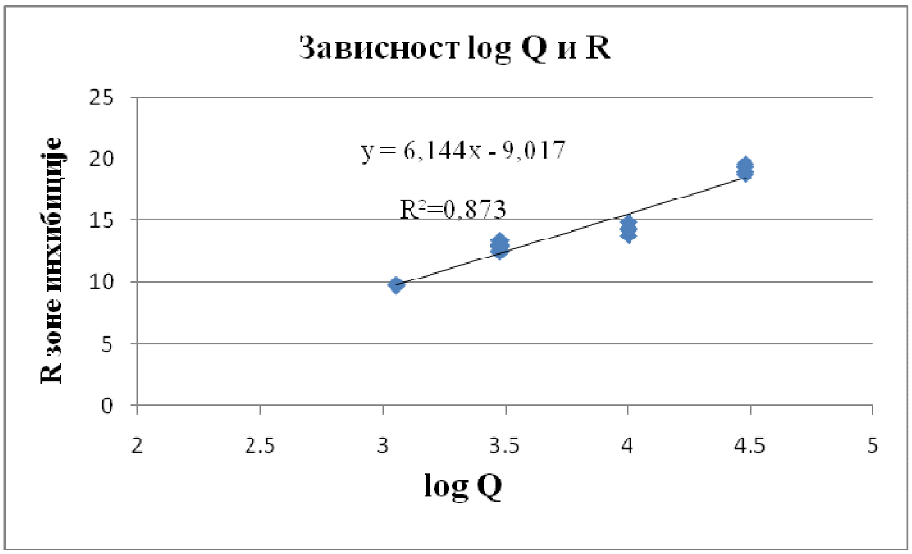
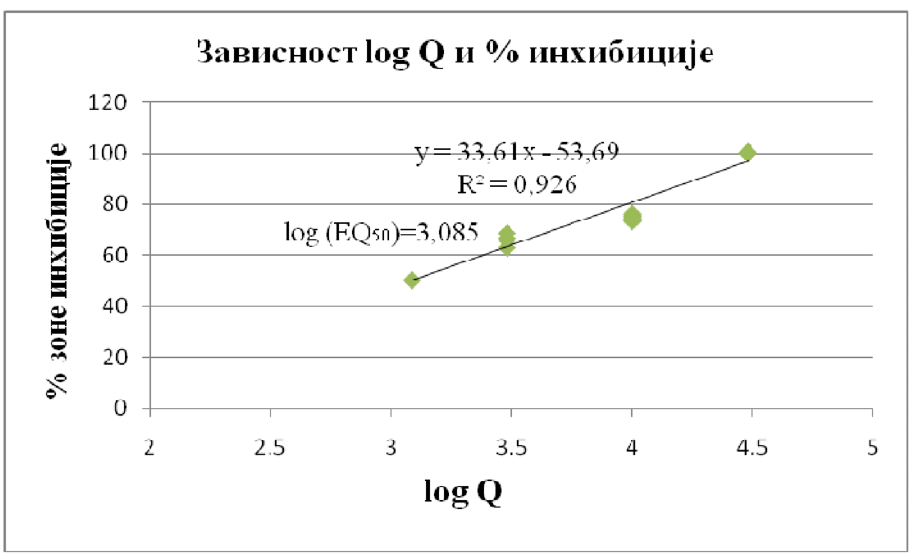


График 4. Зависност логаритма количине екстракта белог лука Q и % инхибиције на колонијама бактерије *Escherichia coli* ATCC 10536



За испитиване вредности воденог екстракта белог лука у количинама Q од 30 mg, 10 mg и 3 mg по диску логаритмована количина супстанце која изазива 50% максималног ефеката (EQ_{50}) је 3,085 што антилогаритмовано износи 1216,19 µg односно изражено у милиграмима 1,22 (mg) за бактеријску културу *Escherichia coli* ATCC 10536. Добијене вредности се односе на прорачун добијен из вредности са графика logQ и % инхибиције које су измерене дејством испитиваног екстракта мерењем пречника зона инхибиције. Вредности логаритма количина екстракта су прерачунате за микрограмске вредности.

5.1.2. Линеарна регресија између логаритма количина NAC и површина/пречника зоне инхибиције на бактерију *Escherichia coli* ATCC 10536

У овој анализи испитивана је линеарна регресија између логаритамски трансформисаних количина за основу 10 (log Q) испитиване супстанце NAC (N-ацетил-L-цистеина), молекулске формуле $C_5H_9NO_3S$ и површина зона инхибиције (P) изражених у mm², односно пречника зона (R) инхибиције изражених у mm. Одређивано је да ли између вредности логаритма количине Q од 30 mg, 10 mg, 3 mg и 1 mg супстанце апликованих на диск и површина, односно пречника зоне инхибиције постоји линеарна зависност и какве је јачине таква веза (Табела 2, График 5, 6, 7 и 8). Тестирање значајности линеарне регресије је одређивано за количине супстанце које су имале антибактеријски ефекат на бактерију *Escherichia coli ATCC 10536*. Резултати показују да између испитиваних обележја постоји статистички високо значајна линеарна повезаност и јака позитивна корелација:

1. Log Q и P: АНОВА тест: **F=98,176**; **p<0,001**; Пирсонов коефицијент корелције: **r=0,936**; кориговани коефицијент детерминације **r^2=0,875; p<0,001; Табела 2**). Спирманов коефицијент корелације ρ**=0,958; p<0,001**

2. Log Q и R: АНОВА тест: **F=155,316**; **p<0,001**; Пирсонов коефицијент корелције: **r=0,958**, кориговани коефицијент детерминације **r^2=0,917, p<0,001; Табела 2**). Спирманов коефицијент корелације ρ**=0.958, p<0,001**

Табела 2. Линеарна регресија логаритама количина Q супстанце NAC од 30 mg, 10 mg, 3 mg, 1 mg по диску и површина/пречника зона инхибиције на колонијама бактерије *Escherichia coli ATCC 10536*

Супстанца NAC	**Површина зоне инхибиције (mm²)**	**Пречник зоне инхибиције (mm)**	**Тестирање линеарне регресије**
30 mg по диску	673,20 531,95 619,09 599,23	29,28 26,12 28,08 27,62	АНОВА тест logQ/P **F=98,176; p<0,001; r=0,936; r^2=0,875**
Xs+Sd	605,88±58,36	27,77±1,31	
10 mg по диску	393,96 263,5 312,37 343,1	22,38 18,32 19,94 20,90	АНОВА тест logQ/R **F=155,316; p<0.001, r=0,958; r^2=0,917**
Xs+Sd	328,23±54,72	20,38±1,70	
3 mg по диску	239,49 163,47 247,47 217,56	17,46 14,42 17,74 16,64	Спирманов тест logQ/P **ρ=0,958; p<0,001**
Xs+Sd	217,00±37,86	16,56±1,50	
1 mg по диску	165,89 99,3 113,52 135,03	14,54 11,24 12,02 13,12	Спирманов тест logQ/R **ρ=0,958; p<0,001**
Xs+Sd	128,43±28,97	12,73±1,43	

Xs- средња вредност површине и пречника зоне инхибиције
SD – стандардна девијација

График 5. Зависност логаритма количина Q супстанце NAC од 30 mg, 10 mg, 3 mg, 1 mg по диску и површина зона инхибиције на колонијама бактерије *Escherichia coli ATCC* 10536

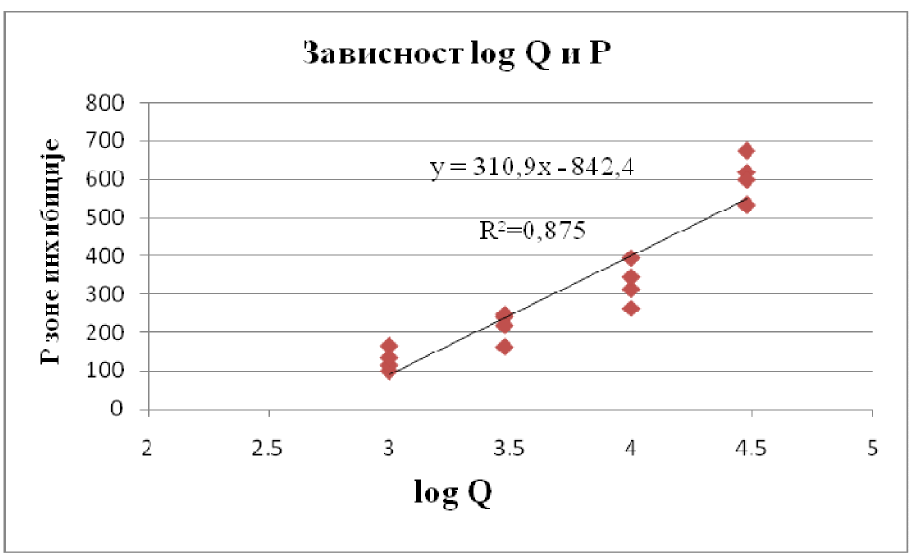
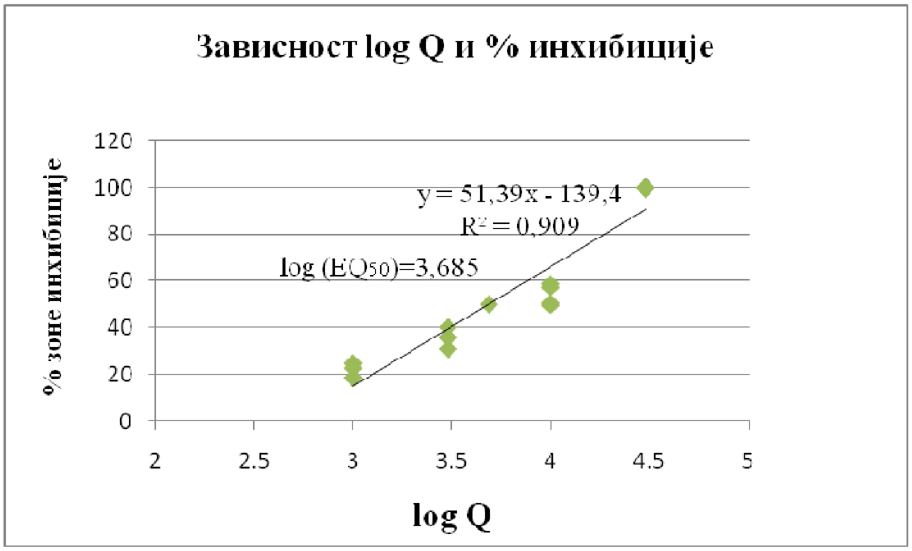


График 6. Зависност логаритма количина Q супстанце NAC и % зоне инхибиције на колонијама бактерије *Escherichia coli* ATCC 10536



За испитиване вредности супстанце NAC у количинама Q од 30 mg, 10 mg и 3 mg и 1 mg по диску логаритмована количина супстанце која изазива 50% максималног ефеката (EQ_{50}) је 3,685 што антилогаритмовано износи 4841,72 µg односно изражено у милиграмима 4,84 (mg) за бактеријску културу *Escherichia coli* ATCC 10536. Добијене вредности се односе на прорачун добијен из вредности са графика log Q и % инхибиције које су измерене дејством испитиване супстанце мерењем површина зона инхибиције. Вредности логаритма количина супстанце N-ацетил-L-цистеина су прерачунати за микрограмске вредности.

График 7. Зависност логаритма количина Q супстанце NAC од 30 mg, 10 mg, 3 mg, 1 mg по диску и пречника зоне инхибиције на колонијама бактерије *Escherichia coli* ATCC 10536

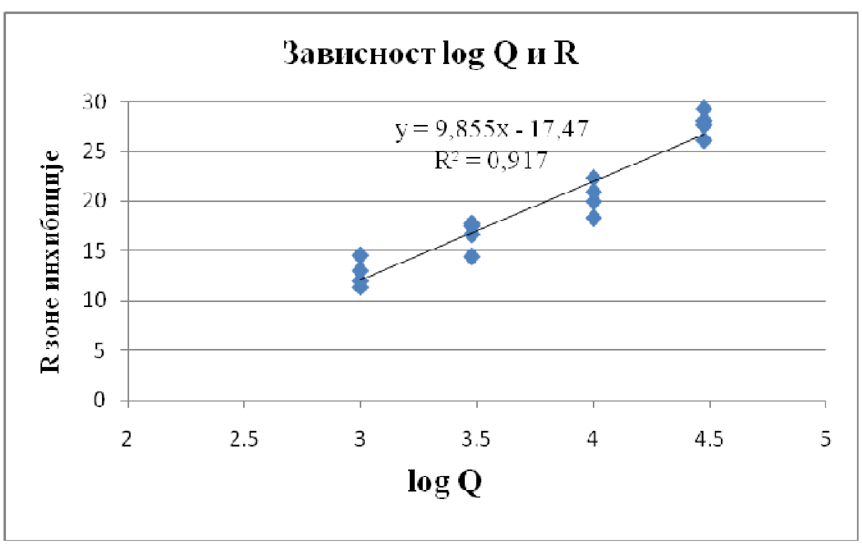
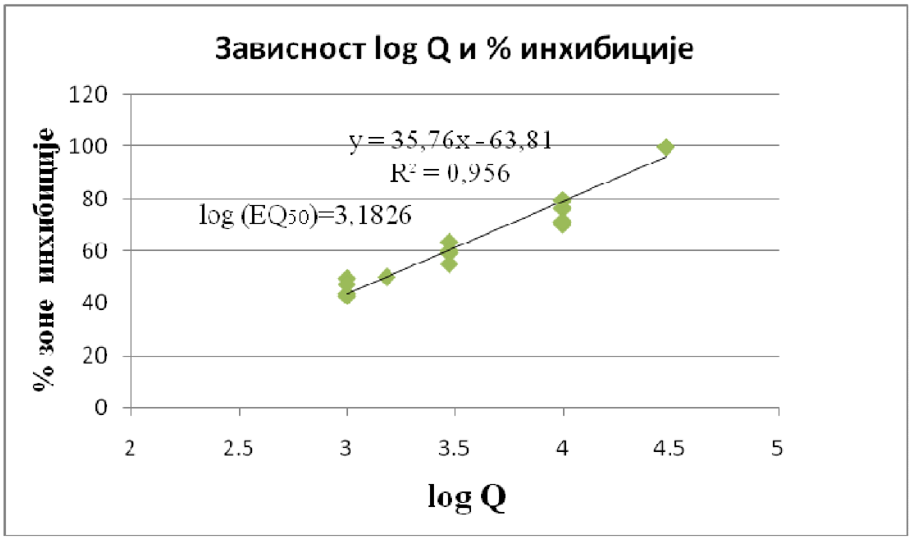


График 8. Зависност логаритма количине Q супстанце NAC и % зоне инхибиције на колонијама бактерије *Escherichia coli* ATCC 10536



За испитиване вредности супстанце NAC у количинама Q од 30 mg, 10 mg, 3 mg и 1 mg по диску логаритмована количина супстанце која изазива 50% максималног ефеката (EQ_{50}) је 3,1826 што антилогаритмовано износи 1522,65 µg односно изражено у милиграмима 1,52 (mg) за бактеријску културу *Escherichia coli* ATCC 10536. Добијене вредности се односе на прорачун добијен из вредности са графика logQ и % инхибиције које су измерене дејством испитиване супстанце мерењем пречника зона инхибиције. Вредности логаритма количина супстанце N-ацетил-L-цистеина су прерачунате за микрограмске вредности.

5.1.3. Линеарна регресија између логаритма количине алицина и површина/пречника зоне инхибиције на *Escherichia coli ATCC 10536*

У овој анализи испитивана је линеарна регресија између логаритамски трансформисаних количина за основу 10 (log Q) испитиване супстанце алицина, молекулске формуле $C_6H_{10}OS_2$ и површина зона инхибиције (P) изражених у mm², односно пречника зона (R) инхибиције изражених у mm. Одређивано је да ли између вредности логаритма количине Q од 600 µg, 500 µg, 400 µg и 300 µg супстанце апликованих на диск и површина, односно пречника зоне инхибиције постоји линеарна зависност и какве је јачине таква веза (Табела 3, График 9, 10, 11 и 12). Тестирање значајности линеарне регресије је одређивано за количине супстанце које су имале антибактеријски ефекат на бактерију *Escherichia coli ATCC 10536*. Резултати показују да између испитиваних обележја постоји статистички високо значајна линеарна повезаност и јака позитивна корелација:

1. Log Q и P: АНОВА тест: **F=151,35**; **p<0,001**; Пирсонов коефицијент корелције: **r=0,957**, кориговани коефицијент детерминације **r^2=0,915; p<0,001; Табела 3**). Спирманов коефицијент корелације ρ**=0,957, p<0,001**

2. Log Q и R: АНОВА тест: **F=194,907**; **p<0,001**, Пирсонов коефицијент корелције: **r=0,966**; кориговани коефицијент детерминације **r^2=0,933 p<0,001; Табела 3**). Спирманов коефицијент корелације ρ**=0.970; p<0,001**

Табела 3. Линеарна регресија логаритама количина супстанце Q алицина од 600 µg, 500 µg, 400 µg, 100 µg по диску и површина/пречника зона инхибиције на колонијама *Escherichia coli* ATCC 10536

Алицин	**Површине зоне инхибиције (mm²)**	**Пречник зоне инхибиције (mm)**	**Тестирање линеарне регресије**
600 µg	537,75	26,17	АНОВА тест P
по диску	435,57	23,56	
	487,33	24,92	**F=151,35; p<0,001,**
	402,23	22,64	**r=0,957; r^2=0,915**
Xs+SD	465,72±59,43	24,32±1,55	
500 µg	397,82	22,51	АНОВА тест R
по диску	344,16	20,94	
	335,67	20,68	**F=194,907, p<0,001,**
	259,44	18,18	**r=0,966; r^2=0,933**
Xs+SD	334,27±56,97	20,58±1,79	
400 µg	255,42	18,04	
по диску	231,95	17,19	Спирманов тест P
	240,31	17,50	ρ**=0,957; p<0,001**
	235,78	17,33	
Xs+SD	240,86±10,29	17,51±0,37	
300 µg	146,32	13,65	Спирманов тест R
по диску	117,56	12,24	ρ**=0,970; p<0,001**
	131,59	12,95	
	132,99	13,02	
Xs+Sd	132,11±11,76	12,96±0,58	

Xs- средња вредност површине и пречника зоне инхибиције
SD – стандардна девијација

График 9. Зависност логаритма количина супстанце Q алицина од 600 µg, 500 µg, 400 µg и 300 µg по диску и површина зоне инхибиције на колонијама бактерије *Escherichia coli* ATCC 10536

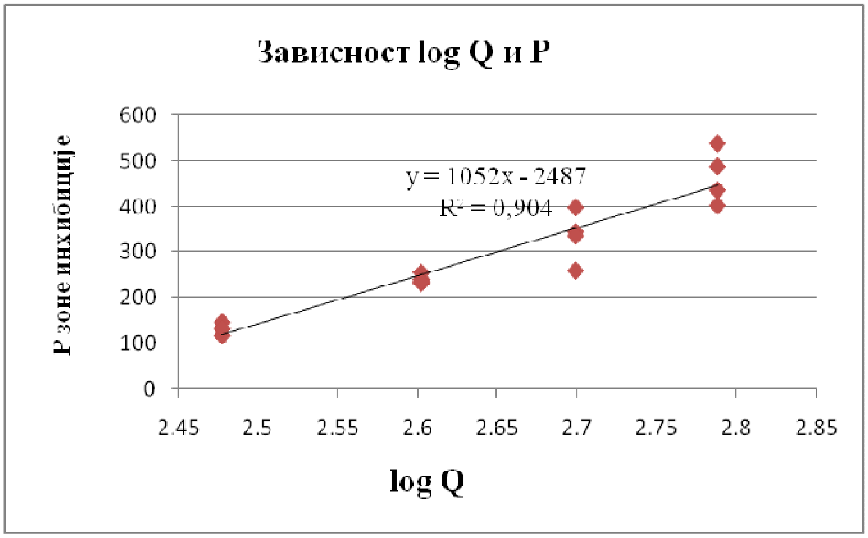
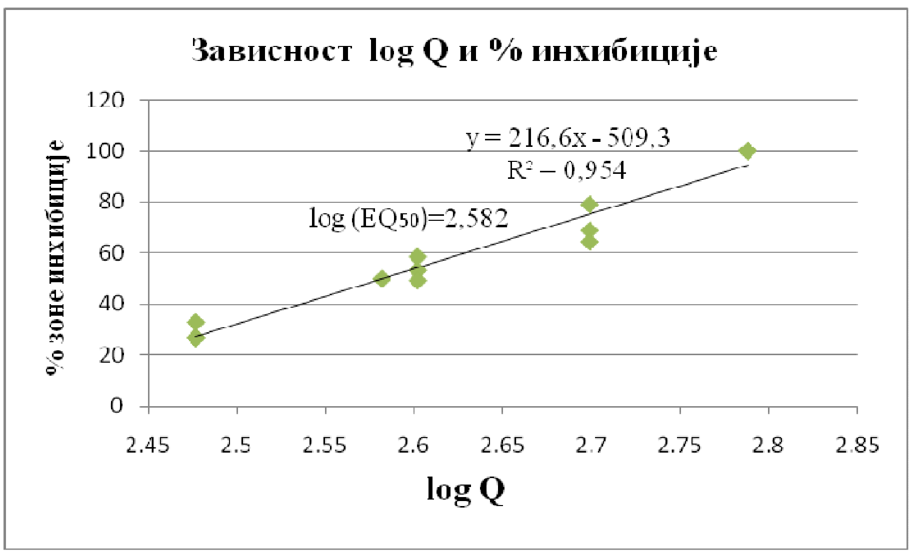


График 10. Зависност логаритма количина супстанце Q алицина и % зоне инхибиције на колонијама бактерије *Escherichia coli* ATCC 10536



За испитиване вредности алицина у количинама Q од 600 µg, 500 µg, 400 µg и 300 µg по диску логаритмована количина супстанце која изазива 50% максималног ефеката (EQ_{50}) је 2,582 што антилогаритмовано износи 391,84 µg односно изражено у милиграмима 0,39 (mg) за бактеријску културу *Escherichia coli* ATCC 10536. Добијене вредности се односе на прорачун добијен из вредности са графика logQ и % инхибиције које су измерене дејством испитиване супстанце мерењем површина зона инхибиције.

Вредности логаритма количина супстанце алицина су прерачунати на микрограмске вредности.

График 11. Зависност логаритма количине супстанце Q алицина од 600 μg, 500 μg, 400 μg и 300 μg по диску и пречника зоне инхибиције на колонијама бактерије *Escherichia coli* ATCC 10536

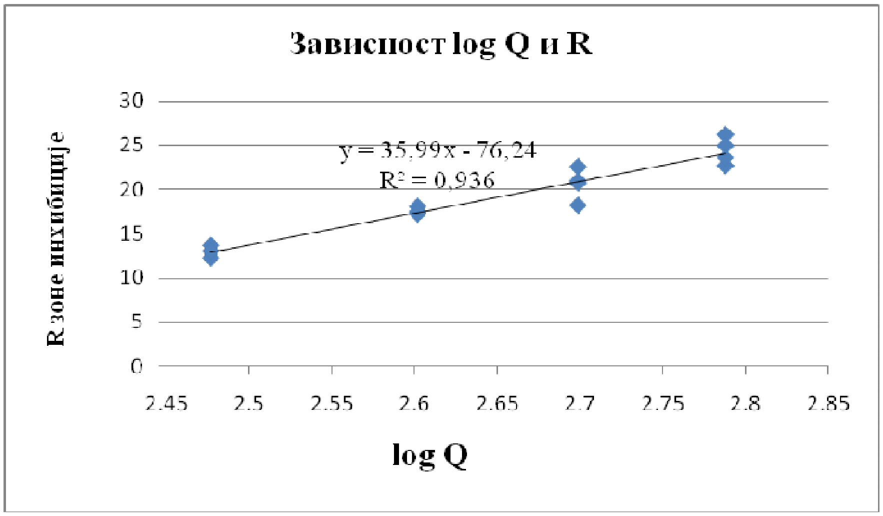
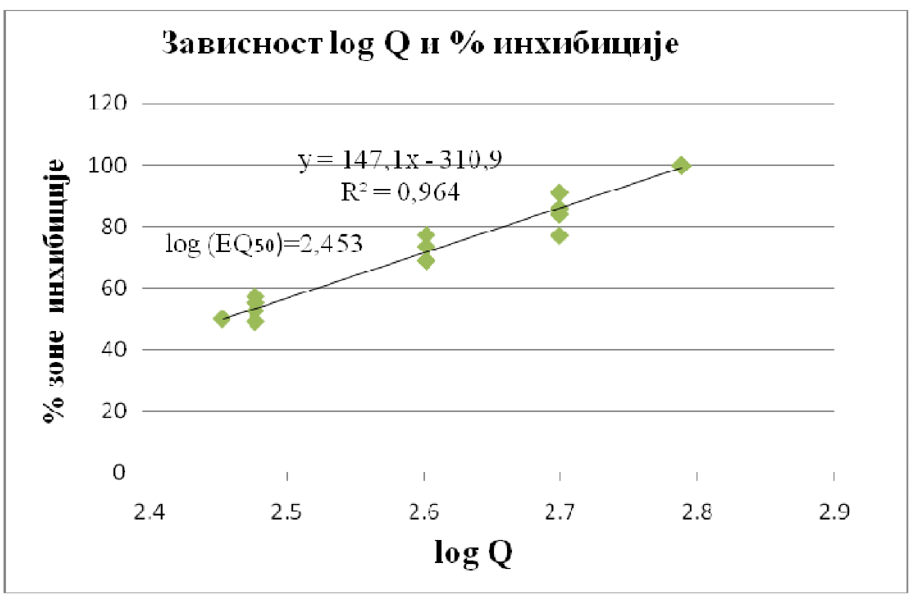


График 12. Зависност логаритма количина супстанце Q алицина и % зоне инхибиције на колонијама бактерије *Escherichia coli* ATCC 10536



За испитиване вредности алицина у количинама Q од 600 μg, 500 μg, 400 μg и 300 μg по диску логаритмована количина супстанце која изазива 50% максималног ефеката (EQ_{50}) је 2,453 што антилогаритмовано износи 283,79 μg односно изражено у милиграмима 0,28 (mg) за бактеријску културу *Escherichia coli* ATCC 10536. Добијене вредности се односе на прорачун добијен из вредности са графика logQ и % инхибиције које су измерене дејством испитиване супстанце мерењем пречника зона инхибиције. Вредности логаритма количина супстанце алицина су прерачунате за микрограмске вредности.

5.1.4. Линеарна регресија између логаритма количине контроле гентамицина и површина/пречника зоне инхибиције на *Escherichia coli* ATCC 10536

У овој анализи испитивана је линеарна регресија између логаритамски трансформисаних количина за основу 10 (log Q) испитиваног антибиотика гентамицина, молекулске формуле $C_{21}H_{43}N_5O_7$ и површина зона инхибиције (P) изражених у mm², односно пречника зона (R) инхибиције изражених у mm. Одређивано је да ли између вредности логаритма количине Q од 8 μg, 4μg, 0,4 μg и 0,1μg антибиотика апликованог на диск и површина, односно пречника зоне инхибиције постоји линеарна зависност и какве је јачине таква веза (Табела 4, График 13, 14, 15 и 16). Тестирање значајности линеарне регресије је одређивано за количине антибиотика које су имале антибактеријски ефекат на бактерију *Escherichia coli ATCC 10536*. Резултати показују да између испитиваних обележја постоји статистички високо значајна линеарна повезаност и јака позитивна корелација:

Табела 4. Линеарна регресија количина Q гентамицина 8 μg, 4 μg, 0,4 μg и 0,1 μg по диску и површина/пречника зоне инхибиције на колонијама *Escherichia coli* ATCC 10536

Антибиотик гентамицин	**Површине зоне инхибиције (mm²)**	**Пречник зоне инхибиције (mm)**	**Тестирање линеарне регресије**
8 μg	637,95	28,50	АНОВА тест P
по диску	609,77	27,86	
	617,83	28,05	F=**421,375; p<0,001,**
	615,98	28,00	**r=0,984; r^2=0,968**
Xs+SD	620,38±12,21	28,1±0,28	
4 μg	585,26	27,30	АНОВА тест R
по диску	564,23	26,80	
	597,45	27,58	F=**280,016**; **p<0,001,**
	570,15	26,95	**r=0,976; r^2=0,952**
Xs+SD	579,27±15,01	27,16±0,35	
0,4 μg по диску	394,72	22,42	
	438,19	23,62	Спирманов тест P
	459,44	24,18	ρ=**0,970; p<0,001**
Xs+SD	437,89	23,63	
	432,56±27,17	23,46±0,74	
0,1 μg	328,07	20,44	Спирманов тест R
по диску	263,50	18,32	ρ=**0,970; p<0,001**
	284,99	19,05	
	301,39	19,58	
Xs+Sd	294,49±27,24	19,35±0,89	

1. Log Q и P: АНОВА тест: **F=421,375**; **p<0,001**; Пирсонов коефицијент корелције: **r=0,984**, кориговани коефицијент детерминације **r^2=0,968; p<0,001; Табела 4**). Спирманов коефицијент корелације ρ**=0,970; p<0,001**

2. Log Q и R: АНОВА тест: **F=280,016**; **p<0,001**; Пирсонов коефицијент корелције: **r=0,976**, кориговани коефицијент детерминације **r^2=0,952; p<0,001; Табела 4**). Спирманов коефицијент корелације ρ**=0,970; p<0,001**

График 13. Зависност логаритма количине антибиотика гентамицина Q од 8μg, 4 μg, 0,4 μg, 0,1 μg по диску и површина зона инхибиције на колонијама бактерије *Escherichia coli* ATCC 10536

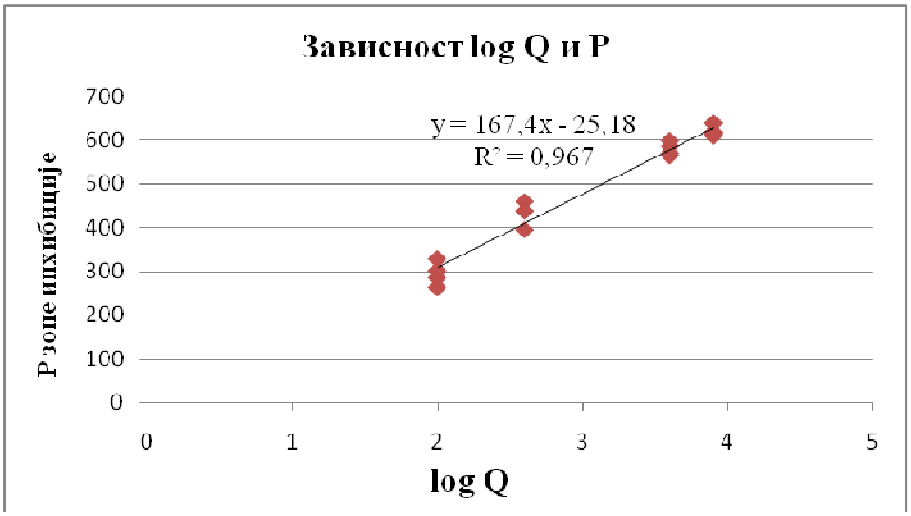
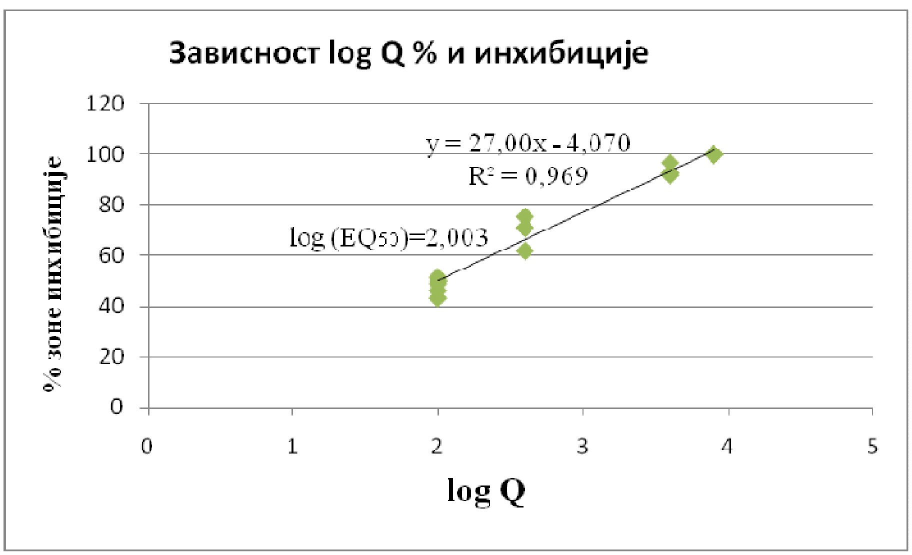


График 14. Зависност логаритма количине антибиотика гентамицина Q и % зоне инхибиције на колонијама бактерија *Escherichia coli ATCC 10536*



За испитиване вредности антибиотика гентамицина у количинама Q од 8 μg, 4μg, 0,4 μg и 0,1μg по диску логаритмована количина антибиотика која изазива 50%

максималног ефеката (EQ_{50}) је 2,003 што антилогаритмовано износи 100,693 ng односно изражено у микрограмима 0,1007 (μg) за бактеријску културу *Escherichia coli* ATCC 10536. Добијене вредности се односе на прорачун добијен из вредности са графика logQ и % инхибиције које су измерене дејством испитиваног антибиотика мерењем површина зона инхибиције су прерачунате за нанограмске вредности.

График 15. Зависност логаритма количина антибиотика гентамицина Q од 8 μg, 4μg, 0,4 μg и 0,1 μg по диску и пречника зоне инхибиције на колонијама бактерија *Escherichia coli* ATCC 10536

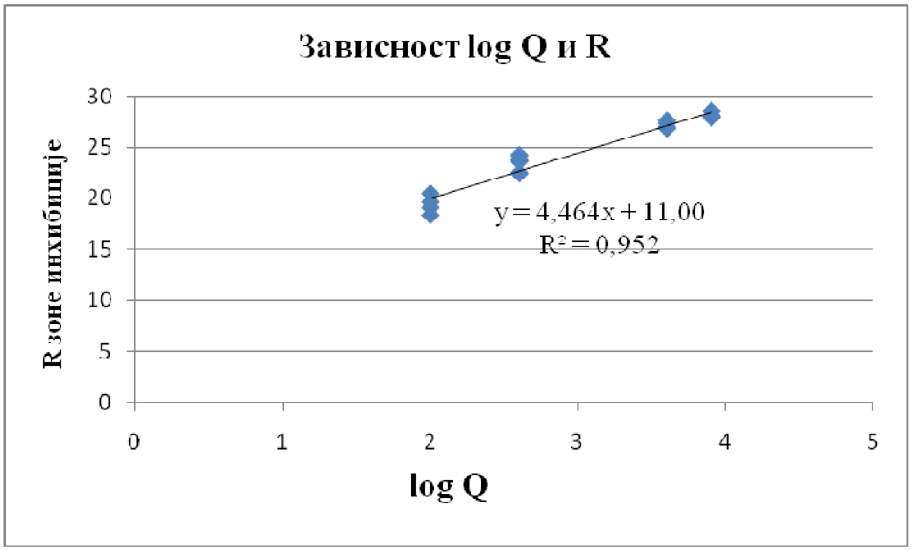
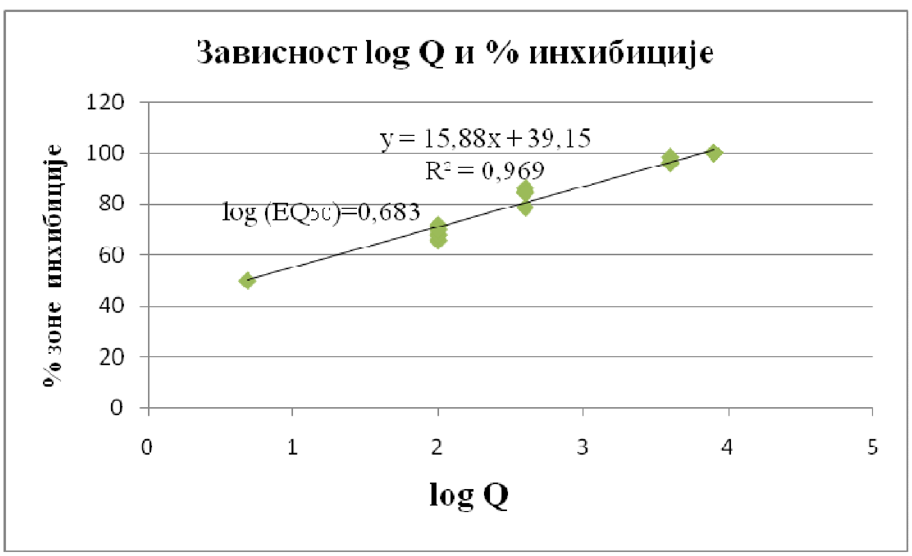


График 16. Зависност логаритма количина антибиотика гентамицина Q и % зоне инхибиције на колонијама бактерија *Escherichia coli* ATCC 10536



За испитиване вредности антибиотика гентамицина у количинама Q од 8 μg, 4μg, 0,4 μg и 0,1μg по диску логаритмована количина антибиотика која изазива 50%

максималног ефеката (EQ_{50}) је 0,683 што антилогаритмовано износи 4,822 ng односно изражено у микрограмима 0,0048 (µg) за бактеријску културу *Escherichia coli* ATCC 10536. Добијене вредности се односе на прорачун добијен из вредности са графика logQ и % инхибиције које су измерене дејством испитиваног антибиотика мерењем пречника зона инхибиције. Вредности логаритма количина антибиотика су прерачунати за нанограмске вредности.

Табела 5. Вредности EQ_{50} за водени екстракт белог лука и испитиване супстанце на колонијама бактерије *Escherichia coli ATCC 10536*

екстракт/ супстанца	**Однос log Q и површине**	**Однос log Q и пречника**	**Однос log Q и површине µg /диску**	**Однос log Q и пречника µg /диску**
водени екстракт белог лука	log (EQ_{50})=3,665	log (EQ_{50})=3,085	EQ_{50}= 4623,81	EQ_{50} = 1216,19
N-ацетил-L-цистеин	log (EQ_{50})=3,685	log (EQ_{50})=3,1826	EQ_{50} =4841,72	EQ_{50} =1522,65
алицин	log (EQ_{50})=2,582	log (EQ_{50})==2,453	EQ_{50}=381,94	EQ_{50} =283,792
S-метил-L-цистеин*	/	/	/	/
S-етил-L-цистеин*	/	/	/	/
S-пропил цистеин*	/	/	/	/
Гама-глутамил-L-цистеин*	/	/	/	/
L-цистеин*	/	/	/	/

* ове испитиване супстанце нису показале антимикробни ефекат на колоније бактерије *Escherichia coli* ATCC 10536

5.1.5. Одређивање минималне инхибиторне концетрације (МИК) за водени екстракт белог лука, алицин, N-ацетил-L-цистеин за бактерију *Escherichia coli ATCC 10536*

Минималне инхибиторне концентрације (МИК) су одређиване екстраполацијом регресионих линија логаритма количина Q воденог ектракта белог лука или активних принципа и пречника инхибиције раста микроорганизама. Вредности количина испитиваног екстракта и супстанци су логаритмовани за нанограмске вредности количина по диску. За водени екстракт белог лука, ацетил цистеин и алицин уз контролу антибиотик гентамицин добијени су следећи резултати:

Табела 6. Вредности МИК за водени екстракт белог лука, N-ацетил-L-цистеин и алицин на колонијама бактерије *Escherichia coli* ATCC 10536

екстракт/ супстанца	**ng/ml**	**µg/ml**
водени екстракт белог лука	428201,84	428,20
N-ацетил-L-цистеин	35304,90	35,30
алицин	4083,89	4,08

5.1.6. Сумпорни деривати који нису показали антибактеријски ефекат на *Escherichia coli* ATCC 10536

Сумпорни деривати цистеина, конституенси воденог екстракта белог лука су испитивани на бактерију *Escherichia coli* ATCC 10536. Супстанце S-метил-L-цистеин, S-етил-L-цистеин, S-пропил-L-цистеин, гама-глутамил-L-цистеин и L-цистеин у количинама Q од 30 mg, 10 mg, 3 mg, 1 mg, 300 µg и 100 µg апликованих на дискове, ни за једну количину нису испољили антимикробни ефекат, што значи да нема активности, што су показали прелиминарни и коначни резултати испитивања.

5.2. Анализа инхибиторне активности екстракта и конституенаса белог лука за бактеријску културу *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

5.2.1. Линеарна регресија између логаритма количина Q воденог екстракта белог лука и површина/пречника зоне инхибиције на бактерију *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

У овој анализи испитивана је линеарна регресија између логаритамски трансформисаних количина за основу 10 (log Q) испитиваног воденог екстракта белог лука и површина зона инхибиције (P) изражених у mm^2, односно пречника зоне (R) инхибиције изражених у mm. Одређивано је да ли између вредности логаритма количина Q од 30 mg, 10 mg и 3 mg воденог екстракта белог лука апликованих на диск и површина, односно пречника зоне инхибиције постоји линеарна зависност и какве је јачине таква веза (Табела 7, График 17,18,19 и 20). Тестирање значајности линеарне регресије је одређивано за количине екстракта које су имале антибактеријски ефекат на бактерију *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Резултати показују да између испитиваних обележја постоји статистички високо значајна линеарна повезаност и јака позитивна корелација.

1. Log Q и P: АНОВА тест: **F=150,758**; **p<0,001**; Пирсонов коефицијент корелције: **r=0,968**, кориговани коефицијент детерминације **r^2=0,938; p<0,001; Табела 7**). Спирманов коефицијент корелације ρ**=0,946; p<0,001**

2. Log Q и R: АНОВА тест: **F=58,703**; **p<0,001**; Пирсонов коефицијент корелције: **r=0,924**, кориговани коефицијент детерминације **r^2=0,854; p<0,001; Табела 7**). Спирманов коефицијент корелације ρ**=0,946; p<0,001**

Табела 7. Линеарна регресија логаритама количина Q од 30 mg, 10 mg и 3 mg воденог екстракта белог лука по диску и површине/пречника зоне инхибиције на колонијама бактерије *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

Екстракт Бели лук	**Површина зоне инхибиције P (mm²)**	**Пречник зоне инхибиције R (mm)**	**Линеарна регресија**
30 mg по диску Xs+SD	248,35 230,03 232,99 243,89 238,815±8,71	17,79 17,12 17,23 17,63 17,44±0,32	АНОВА тест logQ/P F=**150,778**; **p<0,001,** **r=0,968; r^2=0,938** АНОВА тест logQ/R F=**58,703**; **p<0,001,** **r=0,924; r^2=0,854** Спирманов тест logQ/P и logQ/R ρ**=0,946; p<0,001**
10 mg по диску Xs+SD	141,65 153,41 158,73 161,65 153,86±8,83	13,43 12,49 13,01 12,99 13,435±0,56	
3 mg по диску Xs+SD	120,17 112,24 103,59 111,72 111,93±6,77	12,37 11,96 11,49 11,93 11,94±0,36	

Xs- средња вредност површине и пречника зоне инхибиције

SD – стандардна девијација

График 17. Зависност логаритма количине екстракта белог лука Q од 30 mg, 10 mg и 3 mg по диску и површине зоне инхибиције на колонијама бактерије *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

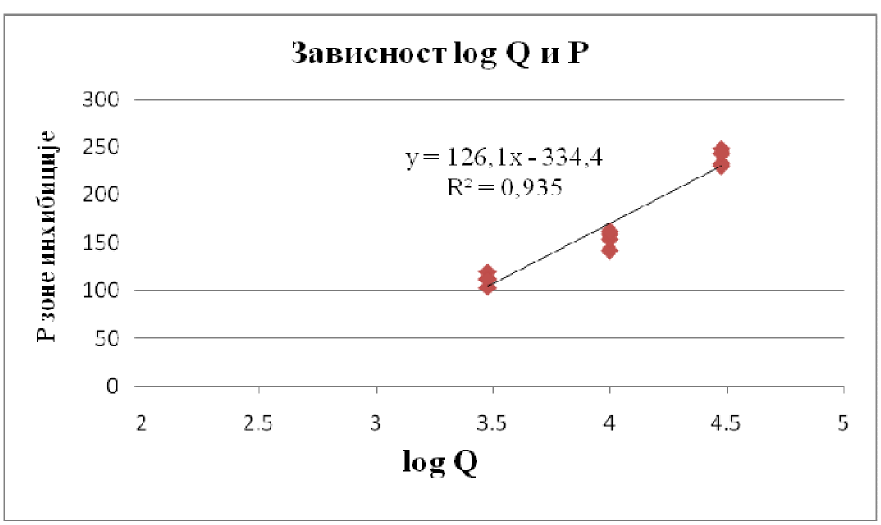
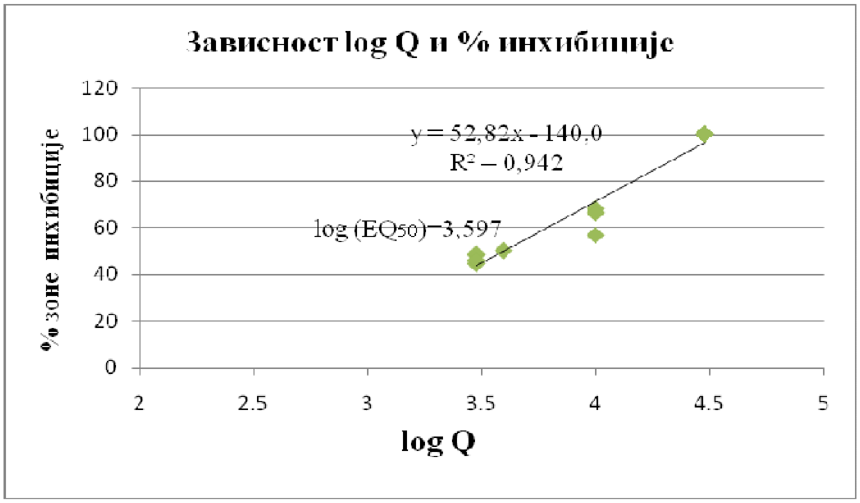


График 18. Зависност логаритма количине екстракта белог лука Q и % инхибиције на колонијама бактерије *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027



За испитиване вредности воденог екстракта белог лука у количинама Q од 30 mg, 10 mg и 3 mg по диску логаримована количина супстанце која изазива 50% максималног ефеката (EQ_{50}) је 3,597 што антилогаритмовано износи 3953,67 μg односно изражено у милиграмима 3,96 (mg) за бактеријску културу *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Добијене вредности се односе на прорачун добијен из вредности са графика logQ и % инхибиције које су измерене дејством испитиваног екстракта мерењем површина зона инхибиције. Вредности логаритма количина екстракта су прерачунате за микрограмске вредности.

График 19. Зависност логаритма количине екстракта белог лука Q од 30 mg, 10 mg и 3 mg по диску и пречника зоне инхибиције на колонијама бактерије *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

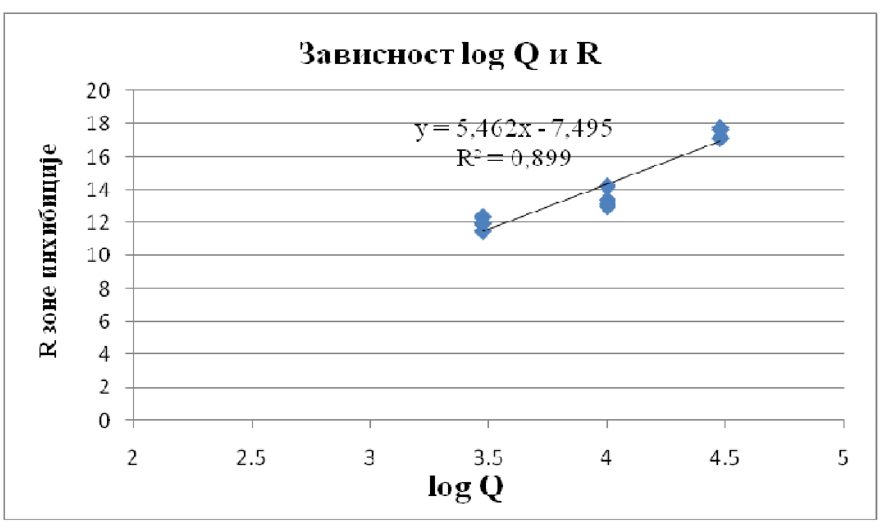
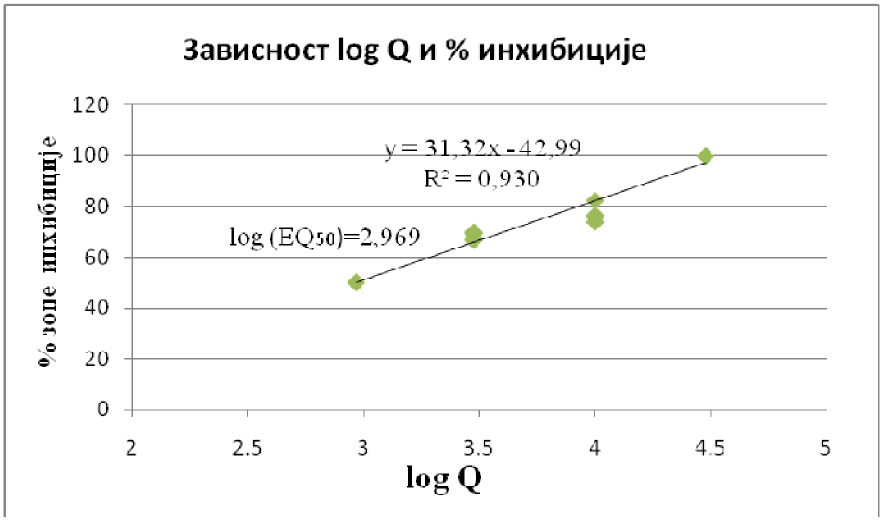


График 20. Зависност логаритма количине екстракта белог лука Q и % инхибиције на колонијама бактерије *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027



За испитиване вредности воденог екстракта белог лука у количинама Q од 30 mg, 10 mg и 3 mg по диску логаритмована количина супстанце која изазива 50% максималног ефеката (EQ_{50}) је 2,969 што антилогаритмовано износи 931,11 µg односно изражено у милиграмима 0,93 (mg) за бактеријску културу *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Добијене вредности се односе на прорачун добијен из вредности са графика logQ и % инхибиције које су измерене дејством испитиваног екстракта мерењем пречника зона инхибиције. Вредности логаритма количина екстракта су прерачунате за микрограмске вредности.

5.2.2. Линеарна регресија између логаритма количина NAC и површине/пречника зоне инхибиције на бактерију *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

У овој анализи испитивана је линеарна регресија између логаритамски трансформисаних количина за основу 10 (log Q) испитиване супстанце NAC (N-ацетил-L-цистеина), молекулске формуле $C_5H_9NO_3S$ и површина зона инхибиције (P) изражених у mm^2, односно пречника зона (R) инхибиције изражених у mm. Одређивано је да ли између вредности логаритма количине Q од 30 mg, 10 mg, 3 mg и 1 mg супстанце апликованих на диск и површина, односно пречника зоне инхибиције постоји линеарна зависност и какве је јачине таква веза (Табела 8, График 21, 22, 23 и 24). Тестирање значајности линеарне регресије је одређивано за количине супстанце које су имале антибактеријски ефекат на бактерију *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

Резултати показују да између испитиваних обележја постоји статистички високо значајна линеарна повезаност и јака позитивна корелација:

Табела 8. Линеарна регресија логаритама количина Q супстанце NAC од 30 mg, 10 mg, 3 mg, 1 mg по диску и површина/пречника зона инхибиције на колонијама бактерије *Pseudomonas aeruginosa,* ATCC 9027

Супстанца NAC	**Површина зоне инхибиције (mm²)**	**Пречник зоне инхибиције (mm)**	**Тестирање линеарне регресије**
30 mg по диску	558,76	26,68	АНОВА тест log Q/P
	462,80	24,28	
	501,46	25,27	**F=96,661; p<0,001;**
	479,38	24,71	**r=0,935; r^2=0,873**
Xs+Sd	500,60±41,88	25,235±1,04	
10 mg по диску	323,05	20,29	АНОВА тест log Q/R
	223,975	16,89	
	253,02	17,95	**F=157,988; p<0.001,**
	274,48	18,70	**r=0,958; r^2=0,919**
Xs+Sd	283,52±35,88	18,46±1,43	
3 mg по диску	198,78	15,91	Спирманов тест log Q/P
	138,95	13,30	ρ**=0,970; p<0,001**
	202,92	16,08	
	184,93	15,35	
Xs+Sd	181,39±29,32	15,16±1,23	
1 mg по диску	132,71	13,00	Спирманов тест log Q/R
	115,79	12,14	ρ**=0,970; p<0,001**
	96,49	11,09	
	108,02	11,73	
Xs+Sd	113,25±15,20	11,99±0,8	

Xs- средња вредност површине и пречника зоне инхибиције
SD – стандардна девијација

1. Log Q и P: АНОВА тест: **F=96,661**; **p<0,001**; Пирсонов коефицијент корелције: **r=0,935**; кориговани коефицијент детерминације **r^2=0,873; p<0,001; Табела 8**). Спирманов коефицијент корелације ρ**=0,970; p<0,001**

2. Log Q и R: АНОВА тест: **F=157,988**; **p<0,001**; Пирсонов коефицијент корелције: **r=0,958**, кориговани коефицијент детерминације **r^2=0,919; p<0,001; Табела 8**). Спирманов коефицијент корелације ρ**=0,970; p<0,001**

График 21. Зависност логаритма количина Q супстанце NAC од 30 mg, 10 mg, 3 mg, 1 mg по диску и површина зона инхибиције на колонијама бактерије *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

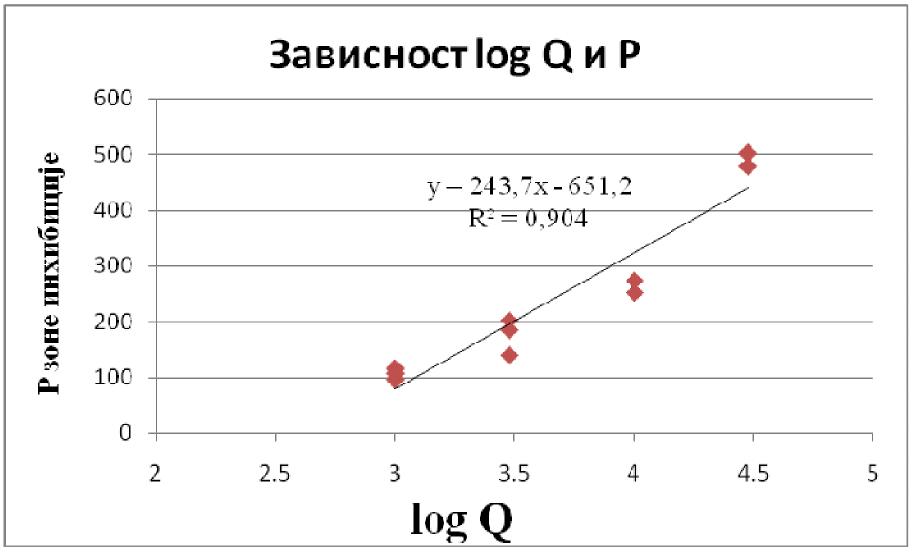
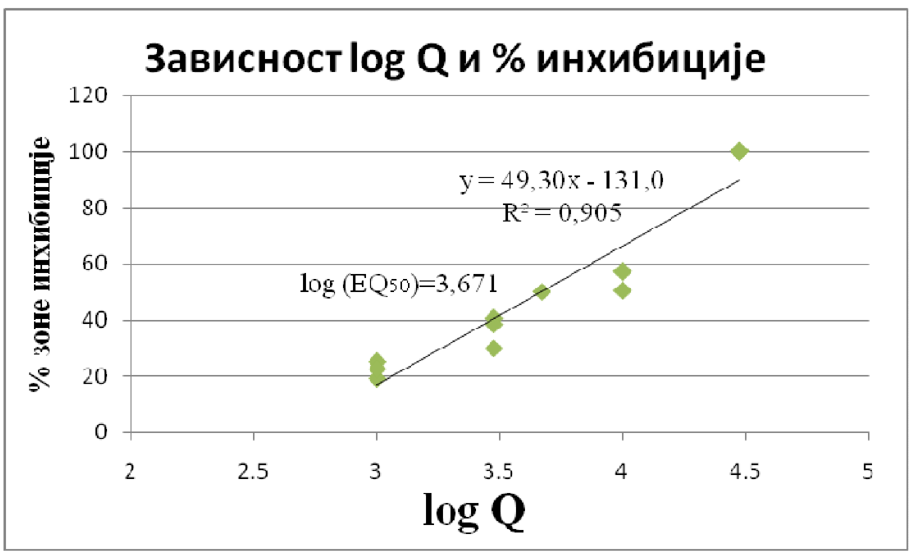


График 22. Зависност логаритма количина Q супстанце NAC и % зоне инхибиције на колонијама бактерије *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027



За испитиване вредности супстанце NAC у количинама Q од 30 mg, 10 mg и 3 mg и 1 mg по диску логаритмована количина супстанце која изазива 50% максималног ефеката (EQ_{50}) је 3,671 што антилогаритмовано износи 4688,13 µg односно изражено у милиграмима 4,69 (mg) за бактеријску културу *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Добијене вредности се односе на прорачун добијен из вредности са графика log Q и % инхибиције које су измерене дејством испитиване супстанце мерењем површина зона инхибиције. Вредности логаритма количина супстанце N-ацетил-L-цистеина су прерачунати за микрограмске вредности.

График 23. Зависност логаритма количина Q супстанце NAC од 30 mg, 10 mg, 3 mg, 1 mg по диску и пречника зоне инхибиције на колонијама бактерије *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

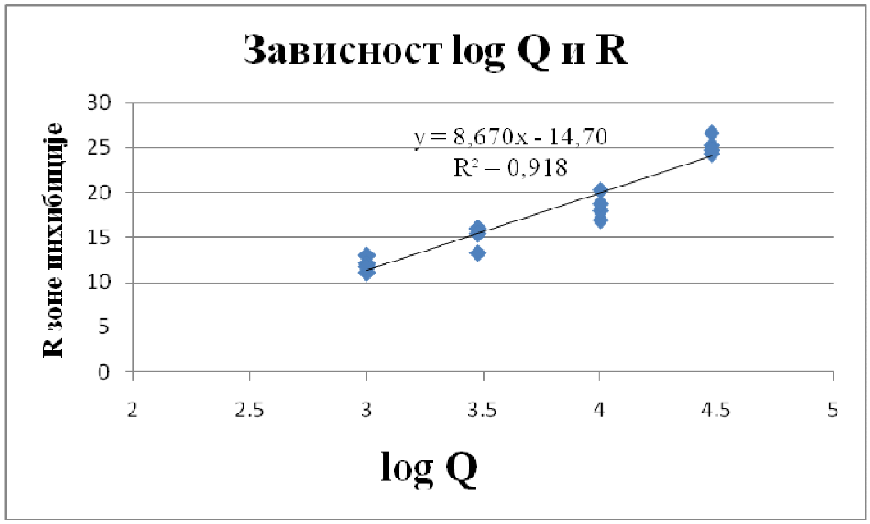
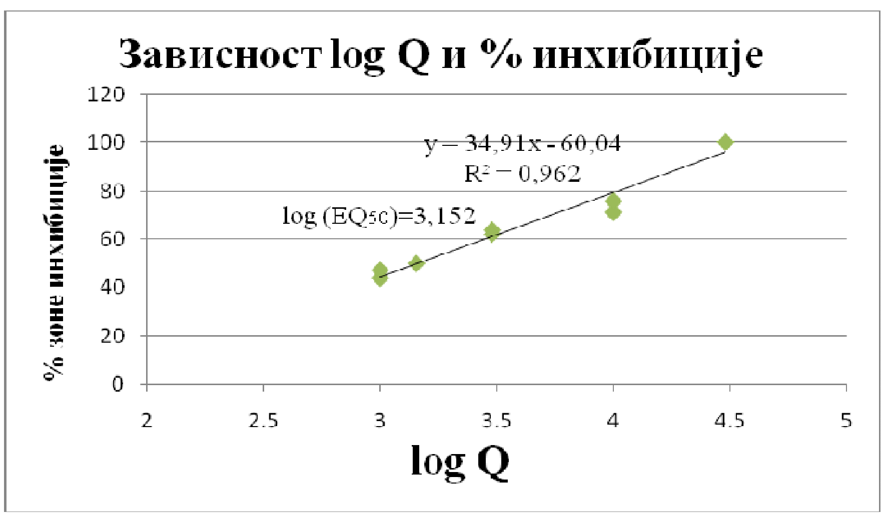


График 24. Зависност логаритма количине Q супстанце NAC и % зоне инхибиције на колонијама бактерије *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027



За испитиване вредности супстанце NAC у количинама Q од 30 mg, 10 mg, 3 mg и 1 mg по диску логаритмована количина супстанце која изазива 50% максималног ефеката (EQ_{50}) је 3,152 што антилогаритмовано износи 1419,06 µg односно изражено у милиграмима 1,42 (mg) за бактеријску културу *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Добијене вредности се односе на прорачун добијен из вредности са графика logQ и % инхибиције које су измерене дејством испитиване супстанце мерењем пречника зона инхибиције. Вредности логаритма количина супстанце N-ацетил-L-цистеина су прерачунате за микрограмске вредности.

5.2.3. Линеарна регресија између логаритма количине алицина и површина/пречника зоне инхибиције на *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

У овој анализи испитивана је линеарна регресија између логаритамски трансформисаних количина за основу 10 (log Q) испитиване супстанце алицина, молекулске формуле $C_6H_{10}OS_2$ и површина зона инхибиције (P) изражених у mm², односно пречника зона (R) инхибиције изражених у mm. Одређивано је да ли између вредности логаритма количине Q од 600 µg, 500 µg, 400 µg и 300 µg супстанце апликованих на диск и површина, односно пречника зоне инхибиције постоји линеарна зависност и какве је јачине таква веза (Табела 9, График 25, 26, 27 и 28). Тестирање значајности линеарне регресије је одређивано за количине супстанце које су имале антибактеријски ефекат на бактерију *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Резултати показују да између испитиваних обележја постоји статистички високо значајна линеарна повезаност и јака позитивна корелација:

Табела 9. Линеарна регресија логаритама количина супстанце Q алицина од 600 µg, 500 µg, 400 µg, 100 µg по диску и површина/пречника зона инхибиције на колонијама *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

Алицин	**Површине зоне инхибиције (mm²)**	**Пречник зоне инхибиције (mm)**	**Тестирање линеарне регресије**
600 µg по диску	322,65	20,27	АНОВА тест P
	256,99	18,09	
	297,27	19,46	**$F=140,196$; $p<0,001$,**
	261,45	18,25	**$r=0,954$; $r^2=0,909$**
Xs+SD	284,59±31,13	19,02±1,03	
500 µg по диску	238,69	17,44	АНОВА тест R
	209,94	16,35	
	201,40	16,02	**$F=235,010$, $p<0,001$,**
	168,64	14,66	**$r=0,971$; $r^2=0,944$**
Xs+SD	204,67±28,83	16,12±1,15	
400 µg по диску	158,36	14,20	
	143,81	13,53	Спирманов тест P
	148,99	13.78	**$\rho=0,970$; $p<0,001$**
	148,54	13,76	
Xs+SD	149,925±6,09	13,82±0,28	
300 µg по диску	96,57	11,09	Спирманов тест R
	88,17	10,60	**$\rho=0,970$; $p<0,001$**
	84,22	10,36	
	86,44	10,49	
Xs+Sd	88,85±5,39	10,635±0,32	

Xs- средња вредност површине и пречника зоне инхибиције
SD – стандардна девијација

1. Log Q и P: АНОВА тест: **F=140,196**; **p<0,001**; Пирсонов коефицијент корелције: **r=0,954**, кориговани коефицијент детерминације **r^2=0,909; p<0,001; Табела 9**). Спирманов коефицијент корелације ρ**=0,970, p<0,001**

2. Log Q и R: АНОВА тест: **F=235,010**; **p<0,001**, Пирсонов коефицијент корелције: **r=0,971**; кориговани коефицијент детерминације **r^2=0,944 p<0,001; Табела 9**). Спирманов коефицијент корелације ρ**=0,970; p<0,001**

График 25. Зависност логаритма количина супстанце Q алицина од 600 μg, 500 μg, 400 μg и 300 μg по диску и површина зоне инхибиције на колонијама бактерије *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

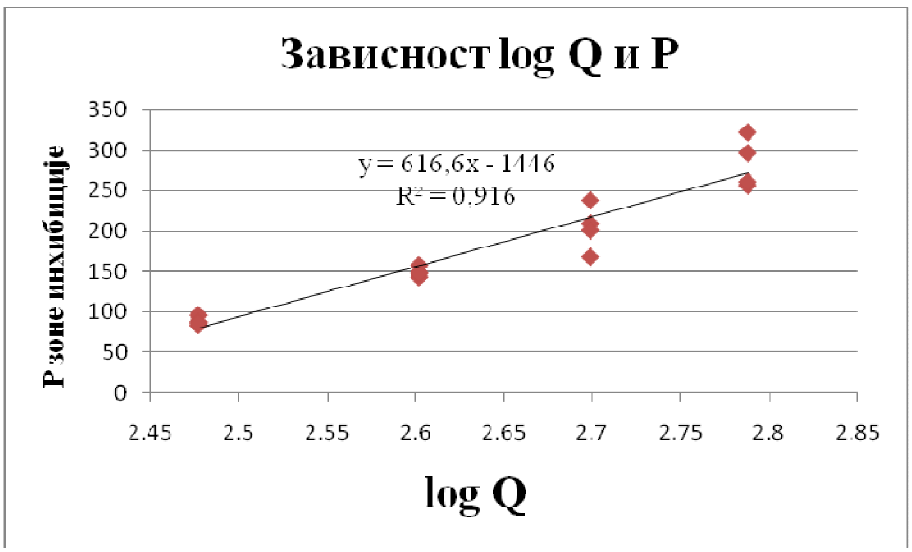
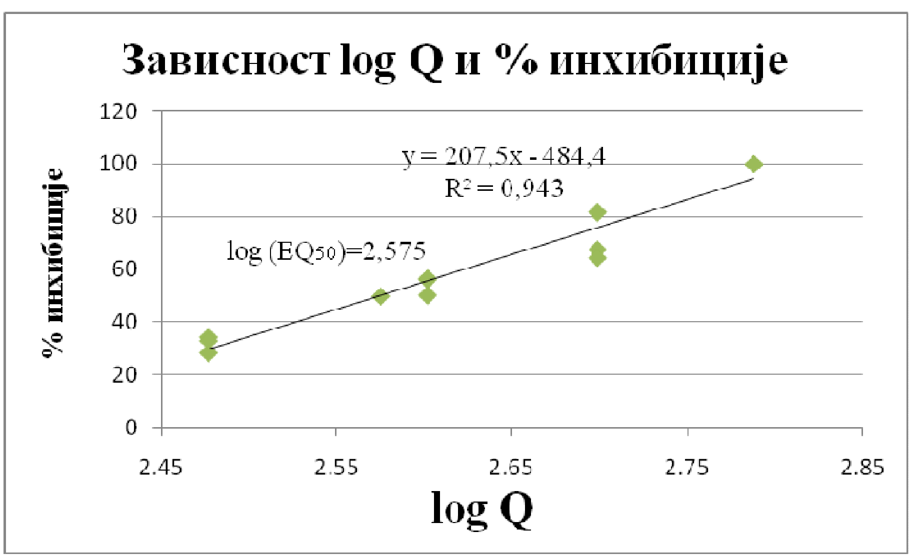


График 26. Зависност логаритма количина супстанце Q алицина и % зоне инхибиције на колонијама бактерије *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027



За испитиване вредности алицина у количинама Q од 600 µg, 500 µg, 400 µg и 300 µg по диску логаритмована количина супстанце која изазива 50% максималног ефеката (EQ_{50}) је 2,575 што антилогаритмовано износи 375,84 µg односно изражено у милиграмима 0,38 (mg) за бактеријску културу *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Добијене вредности се односе на прорачун добијен из вредности са графика logQ и % инхибиције које су измерене дејством испитиване супстанце мерењем површина зона инхибиције. Вредности логаритма количина супстанце алицина су прерачунати на микрограмске вредности.

График 27. Зависност логаритма количине супстанце Q алицина од 600 µg, 500 µg, 400 µg и 300 µg по диску и пречника зоне инхибиције на колонијама бактерије *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

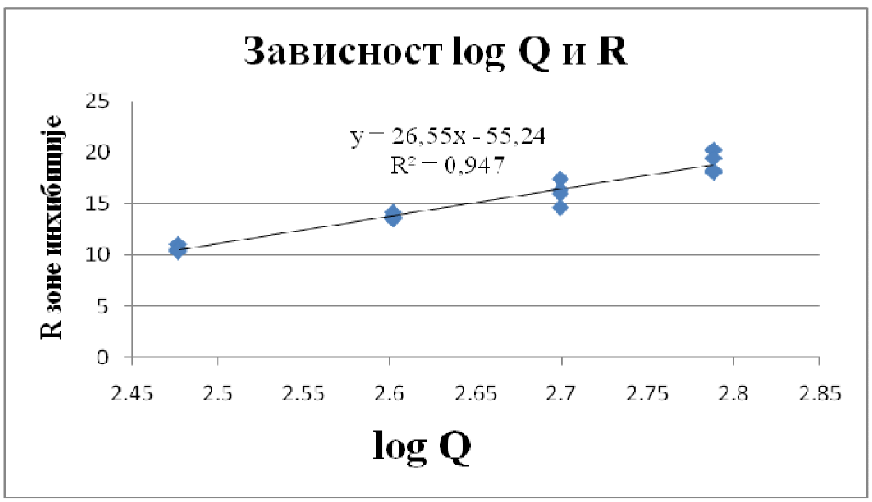
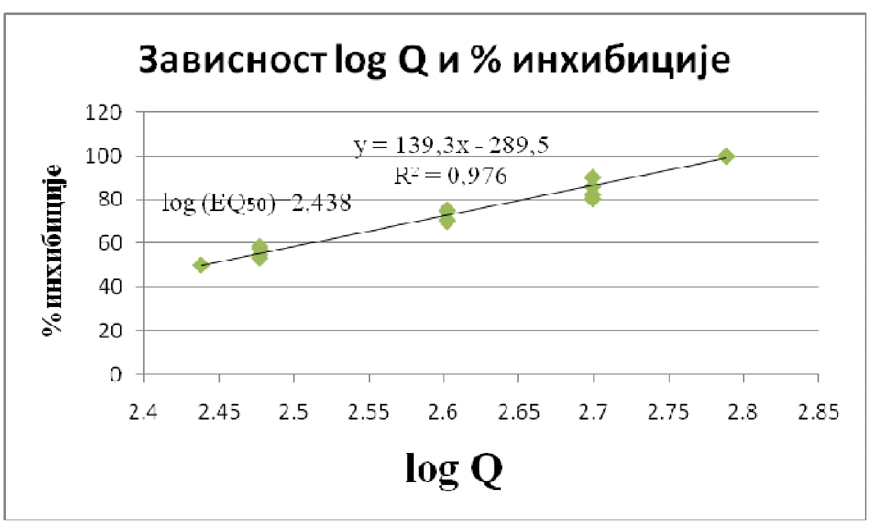


График 28. Зависност логаритма количина супстанце Q алицина и % зоне инхибиције на колонијама бактерије *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027



За испитиване вредности алицина у количинама Q од 600 μg, 500 μg, 400 μg и 300 μg по диску логаритмована количина супстанце која изазива 50% максималног ефеката (EQ_{50}) је 2,438 што антилогаритмовано износи 274,16 μg односно изражено у милиграмима 0,27 (mg) за бактеријску културу *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Добијене вредности се односе на прорачун добијен из вредности са графика logQ и % инхибиције које су измерене дејством испитиване супстанце мерењем пречника зона инхибиције. Вредности логаритма количина супстанце алицина су прерачунате за микрограмске вредности.

5.2.4. Линеарна регресија између логаритма количине контроле гентамицина и површина/пречника зоне инхибиције на *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

У овој анализи испитивана је линеарна регресија између логаритамски трансформисаних количина за основу 10 (log Q) испитиваног антибиотика гентамицина, молекулске формуле $C_{21}H_{43}N_5O_7$ и површина зона инхибиције (P) изражених у mm^2, односно пречника зона (R) инхибиције изражених у mm. Одређивано је да ли између вредности логаритма количине Q од 8 μg, 4μg, 0,4 μg и 0,1μg антибиотика апликованог на диск и површина, односно пречника зоне инхибиције постоји линеарна зависност и какве је јачине таква веза (Табела 10, График 29, 30, 31 и 32). Тестирање значајности линеарне регресије је одређивано за количине антибиотика које су имале антибактеријски ефекат на бактерију *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Резултати показују да између испитиваних обележја постоји статистички високо значајна линеарна повезаност и јака позитивна корелација:

1. Log Q и P: AHOBA тест: **$F=481,197$**; **$p<0,001$**; Пирсонов коефицијент корелције: **$r=0,986$**, кориговани коефицијент детерминације **$r^2=0,972$; $p<0,001$; Табела 10**). Спирманов коефицијент корелације **$\rho=0,970$; $p<0,001$**

2. Log Q и R: AHOBA тест: **$F=307,340$**; **$p<0,001$**; Пирсонов коефицијент корелције: **$r=0,978$**, кориговани коефицијент детерминације **$r^2=0,956$ $p<0,001$; Табела 10**). Спирманов коефицијент корелације **$\rho=0,970$; $p<0,001$**

Табела 10. Линеарна регресија количина Q гентамицина 8 µg, 4 µg, 0,4 µg и 0,1 µg по диску и површина/пречника зоне инхибиције на колонијама *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

Антибиотик гентамицин	**Површине зоне инхибиције (mm²)**	**Пречник зоне инхибиције (mm)**	**Тестирање линеарне регресије**
8 µg по диску Xs+SD	401,91 396,35 395,41 400,39 398,515±3,13	22,63 22,47 22,44 22,58 22,53±0,09	АНОВА тест P F=**481,197; p<0,001;** **r=0,986; r^2=0,972**
4 µg по диску Xs+SD	362,86 361,11 364,44 347,79 359,05±7,63	21,50 21,45 21,55 21,05 21,39±0,23	АНОВА тест R F=**307,340**; **p<0,001;** **r=0,978; r^2=0,956**
0,4 µg по диску Xs+SD	252,62 280,44 284,85 275,87 273,45±14,36	17,94 18,90 19,05 18,75 18,66±0,49	Спирманов тест P ρ=**0,970; p<0,001**
0,1 µg по диску Xs+Sd	200,12 163,37 176,69 186,86 181,76±15,58	15,97 14,43 15,00 15,43 15,21±0,65	Спирманов тест R ρ=**0,970; p<0,001**

График 29. Зависност логаритма количине антибиотика гентамицина Q од 8µg, 4 µg, 0,4 µg, 0,1 µg по диску и површина зона инхибиције на колонијама бактерије *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

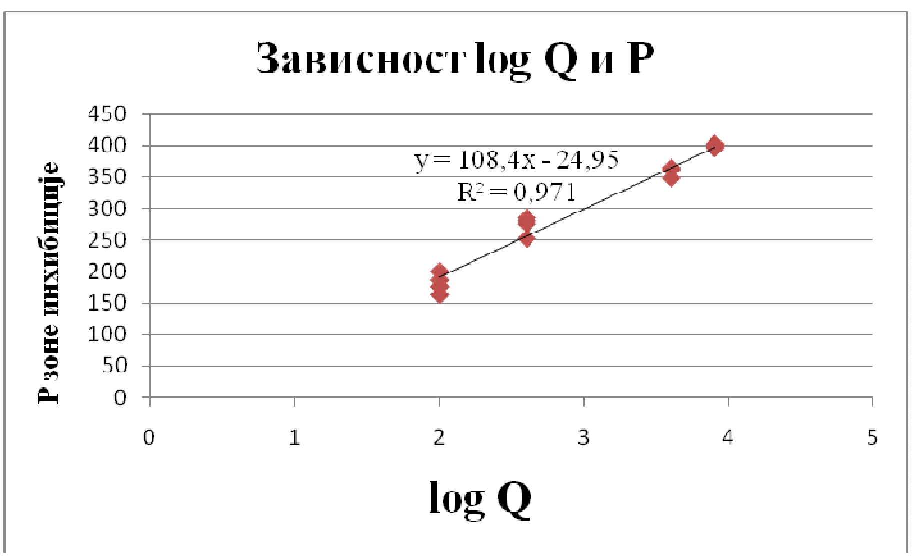
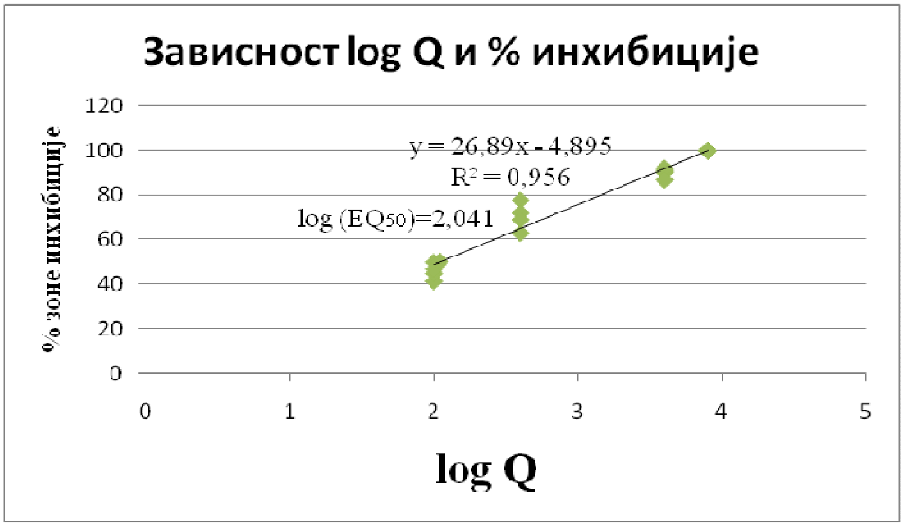


График 30. Зависност логаритма количине антибиотика гентамицина Q и % зоне инхибиције на колонијама бактерија *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027



За испитиване вредности антибиотика гентамицина у количинама Q од 8 µg, 4µg, 0,4 µg и 0,1µg по диску логаритмована количина антибиотика која изазива 50% максималног ефеката (EQ_{50}) је 2,041 што антилогаритмовано износи 109,90 ng односно изражено у микрограмима 0,11 (µg) за бактеријску културу *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Добијене вредности се односе на прорачун добијен из вредности са графика logQ и % инхибиције које су измерене дејством испитиваног антибиотика мерењем површина зона инхибиције. су прерачунате за нанограмске вредности.

График 31. Зависност логаритма количина антибиотика гентамицина Q од 8 µg, 4µg, 0,4 µg и 0,1 µg по диску и пречника зоне инхибиције на колонијама бактерија *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

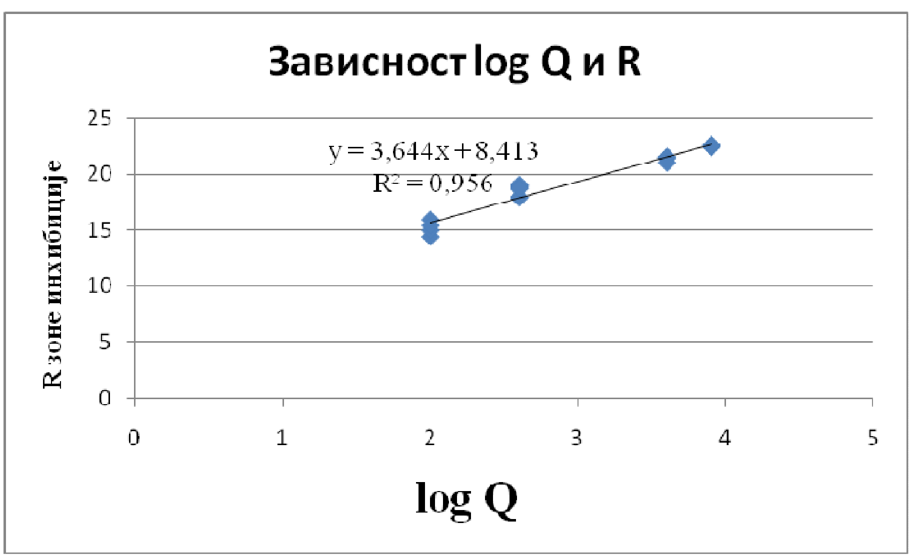
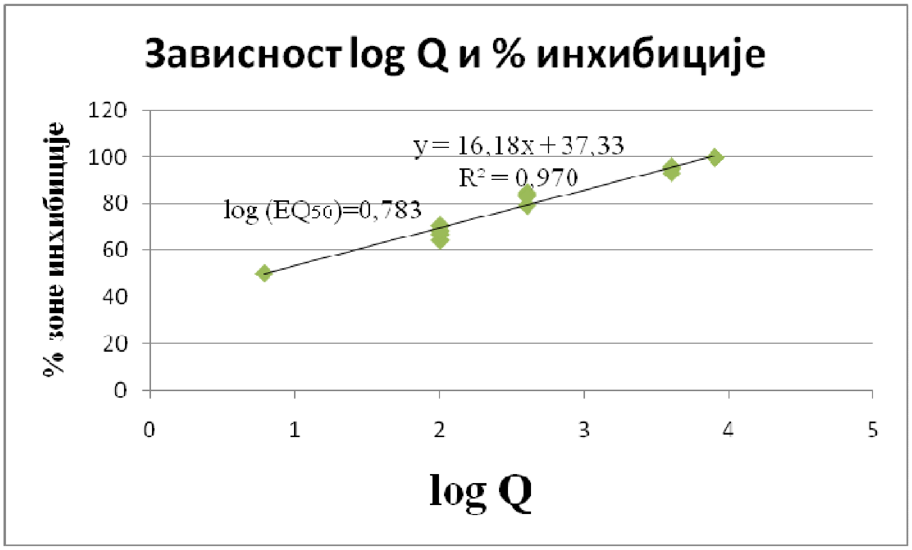


График 32. Зависност логаритма количина антибиотика гентамицина Q и % зоне инхибиције на колонијама бактерија *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027



За испитиване вредности антибиотика гентамицина у количинама Q од 8 µg, 4µg, 0,4 µg и 0,1µg по диску логаритмована количина антибиотика која изазива 50% максималног ефеката (EQ_{50}) је 0,783 што антилогаритмовано износи 6,067 ng односно изражено у микрограмима 0,006 µg за бактеријску културу *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Добијене вредности се односе на прорачун добијен из вредности са графика logQ и % инхибиције које су измерене дејством испитиваног антибиотика мерењем пречника зона инхибиције. Вредности логаритма количина антибиотика су прерачунати за нанограмске вредности.

Табела 11. Вредности EQ_{50} за водени екстракт белог лука и испитиване супстанце на колонијама бактерије *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

екстракт/ супстанца	**Однос log Q и површине**	**Однос log Q и пречника**	**Однос log Q и површине µg /диску**	**Однос log Q и пречника µg /диску**
водени екстракт белог лука	log (EQ_{50})= 3,597	log (EQ_{50})= 2,969	EQ_{50}= 3953,67	EQ_{50} = 931,11
N-ацетил-L-цистеин	log (EQ_{50})= 3,671	log (EQ_{50})= 3,152	EQ_{50} =4688,13	EQ_{50} =1419,06
алицин	log (EQ_{50})= 2,575	log (EQ_{50})= 2,438	EQ_{50}=375,84	EQ_{50} =274,16
S-метил-L-цистеин*	/	/	/	/
S-етил-L-цистеин*	/	/	/	/
S-пропил цистеин*	/	/	/	/
Гама-глутамил-L-цистеин*	/	/	/	/
L-цистеин*	/	/	/	/

* ове испитиване супстанце нису показале антимикробни ефекат на колоније бактерије *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

5.2.5. Одређивање минималне инхибиторне концетрације (МИК) за водени екстракт белог лука, алицин, N-ацетил-L-цистеин на колонијама бактерије *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

Минималне инхибиторне концентрације (МИК) су одређиване екстраполацијом регресионих линија логаритма количина Q воденог ектракта белог лука или активних принципа и пречника инхибиције раста микроорганизама. Вредности количина испитиваног екстракта и супстанци су логаритмовани за нанограмске вредности количина по диску. За водени екстракт белог лука, ацетил цистеин и алицин уз контролу антибиотик гентамицин добијени су следећи резултати:

Табела 12. Вредности МИК за водени екстракт белог лука, N-ацетил-L-цистеин и алицин на колонијама бактерије *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

екстракт/ супстанца	**ng/ml**	**μg/ml**
водени екстракт белог лука	440390,45	440,39
N-ацетил-L-цистеин	21835,80	21,84
алицин	11870,33	11,87

5.2.6. Сумпорни деривати који нису показали антибактеријски ефекат на *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

Сумпорни деривати цистеина, конституенси воденог екстракта белог лука су испитивани на бактерију *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Супстанце S-метил-L-цистеин, S-етил-L-цистеин, S-пропил цистеин, гама-глутамил-L-цистеин и L-цистеин у количинама Q од 30 mg, 10 mg, 3 mg, 1 mg, 300 μg и 100 μg апликованих на дискове, ни за једну количину нису испољили антимикробни ефекат, што значи да нема активности, што су показали прелиминарни и коначни резултати испитивања.

5.3. Анализа инхибиторне активности воденог екстракта белог лука и сумпорних конституенаса белог лука за бактеријску културу *Staphylococcus aureus* ATCC 43300

5.3.1. Линеарна регресија између логаритма количине воденог екстракта белог лука и површине/пречника зоне инхибиције на бактерију *Staphylococcus aureus* ATCC 43300

У овој анализи испитивана је линеарна регресија између логаритамски трансформисаних количина за основу 10 (log Q) испитиваног воденог екстракта белог лука и површина зона инхибиције (P) изражених у mm², односно пречника зоне (R) инхибиције изражених у mm. Одређивано је да ли између вредности логаритма количина Q од 30 mg, 10 mg и 3 mg воденог екстракта белог лука апликованих на диск и површина, односно пречника зоне инхибиције постоји линеарна зависност и какве је јачине таква веза (Табела 13, График 33,34,35 и 36). Тестирање значајности линеарне регресије је одређивано за количине екстракта које су имале антибактеријски ефекат на бактерију *Staphylococcus aureus* ATCC 43300. Резултати показују да између испитиваних обележја постоји статистички високо значајна линеарна повезаност и јака позитивна корелација.

Табела 13. Линеарна регресија логаритама количина Q од 30 mg, 10 mg и 3 mg воденог екстракта белог лука по диску и површина/пречника зоне инхибиције на колонијама бактерије *Staphylococcus aureus* ATCC 43300

Екстракт Бели лук	**Површине зоне инхибиције P (mm²)**	**Пречник зоне инхибиције R (mm)**	**Тестирање линеарне регресије**
30 mg по диску	344,10 318,72 322,82 337,92	20,94 20,15 20,28 20,75	АНОВА тест logQ/P F=**58,215**; **p<0,001, r=0,924; r^2=0,853**
Xs+SD	330,89±12,07	20,53±0,38	
10 mg по диску	198,65 171,67 182,54 185,90	15,91 14,79 15,25 15,39	АНОВА тест logQ/R F=**69,278**; **p<0,001, r=0,935; r^2=0,874**
Xs+SD	184,69±11,11	15,33±0,46	
3 mg по диску	162,59 151,86 140,15 151,16	14,39 13,91 13,36 13,88	Спирманов тест logQ/P и logQ/R **ρ=0,946; p<0,001**
Xs+SD	151,44±9,17	13,89±0,42	

Xs- средња вредност површине и пречника зоне инхибиције
SD – стандардна девијација

1. Log Q и P: АНОВА тест: **F=58,215**; **p<0,001**; Пирсонов коефицијент корелције: **r=0,924**, кориговани коефицијент детерминације **r^2=0,853; p<0,001; Табела 13**). Спирманов коефицијент корелације ρ**=0,946; p<0,001**

2. Log Q и R: АНОВА тест: **F=69,278**; **p<0,001**; Пирсонов коефицијент корелције: **r=0,935**, кориговани коефицијент детерминације **r^2=0,874, p<0,001; Табела 13**). Спирманов коефицијент корелације ρ**=0,946; p<0,001**

График 33. Зависност логаритма количине екстракта белог лука Q од 30 mg, 10 mg и 3 mg по диску и површине зоне инхибиције на колонијама бактерије *Staphylococcus aureus* ATCC 43300

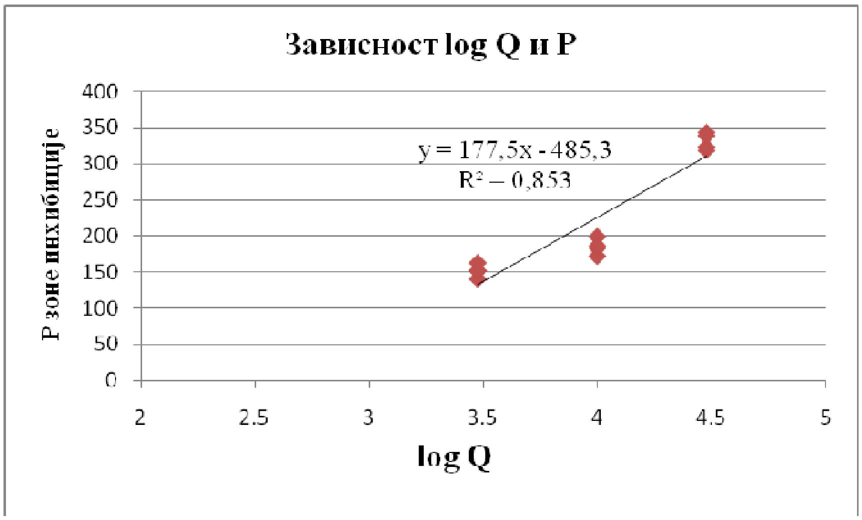
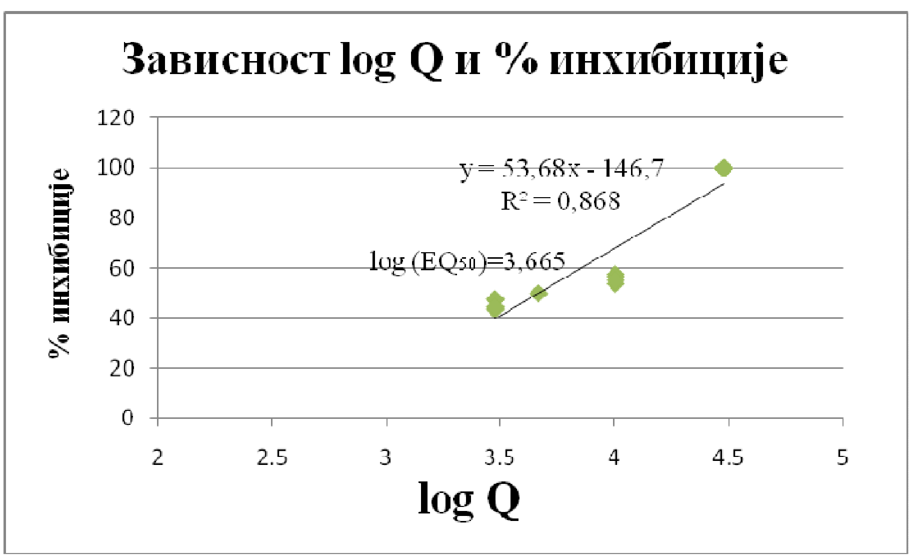


График 34. Зависност логаритма количине екстракта белог лука Q и % инхибиције на колонијама бактерије *Staphylococcus aureus* ATCC 43300



За испитиване вредности воденог екстракта белог лука у количинама Q од 30 mg, 10 mg и 3 mg по диску логаримована количина супстанце која изазива 50% максималног ефеката (EQ_{50}) је 3,597 што антилогаритмовано износи 4623,81 µg односно изражено у милиграмима 4,62 (mg) за бактеријску културу *Staphylococcus aureus* ATCC 43300. Добијене вредности се односе на прорачун добијен из вредности са графика logQ и % инхибиције које су измерене дејством испитиваног екстракта мерењем површина зона инхибиције. Вредности логаритма количина екстракта су прерачунате за микрограмске вредности.

График 35. Зависност логаритма количине екстракта белог лука Q од 30 mg, 10 mg и 3 mg по диску и пречника зоне инхибиције на колонијама бактерије *Staphylococcus aureus* ATCC 43300

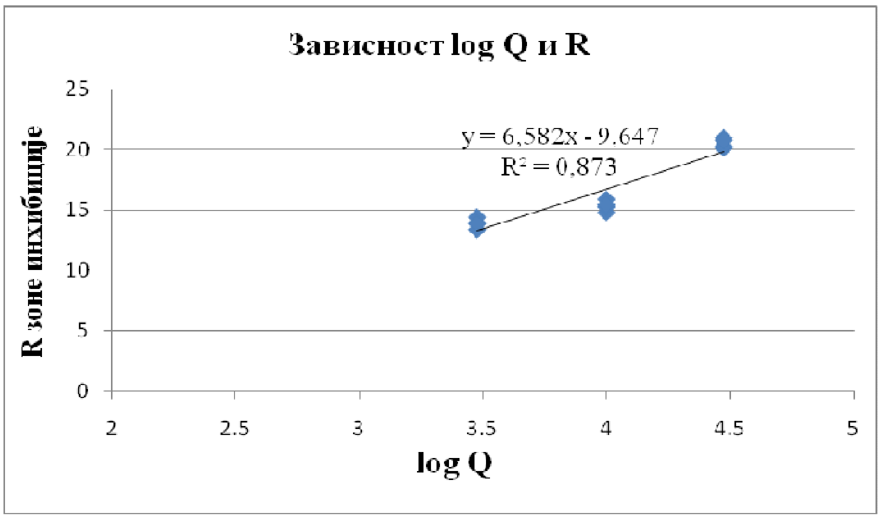
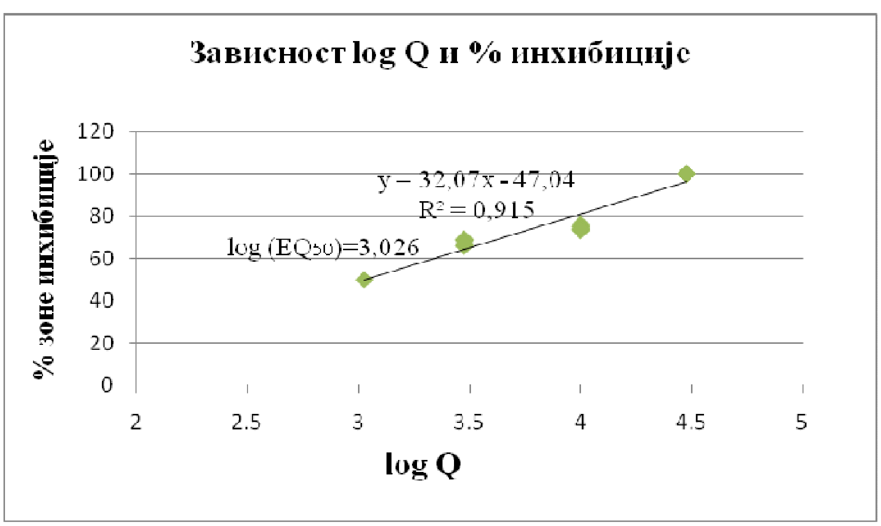


График 36 Зависност логаритма количине екстракта белог лука Q и % инхибиције на колонијама бактерије *Staphylococcus aureus* ATCC 43300



За испитиване вредности воденог екстракта белог лука у количинама Q од 30 mg, 10 mg и 3 mg по диску логаритмована количина супстанце која изазива 50% максималног ефеката (EQ_{50}) је 3,026 што антилогаритмовано износи 1061,70 µg односно изражено у милиграмима 1,06 (mg) за бактеријску културу *Staphylococcus aureus* ATCC 43300. Добијене вредности се односе на прорачун добијен из вредности са графика logQ и % инхибиције које су измерене дејством испитиваног екстракта мерењем пречника зона инхибиције. Вредности логаритма количина екстракта су прерачунате за микрограмске вредности.

5.3.2. Линеарна регресија између логаритма количина NAC и површина/пречника зоне инхибиције на бактерију *Staphylococcus aureus* ATCC 43300

У овој анализи испитивана је линеарна регресија између логаритамски трансформисаних количина за основу 10 (log Q) испитиване супстанце NAC (N-ацетил-L-цистеина), молекулске формуле $C_5H_9NO_3S$ и површина зона инхибиције (P) изражених у mm^2, односно пречника зона (R) инхибиције изражених у mm. Одређивано је да ли између вредности логаритма количине Q од 30 mg, 10 mg, 3 mg и 1 mg супстанце апликованих на диск и површина, односно пречника зоне инхибиције постоји линеарна зависност и какве је јачине таква веза (Табела 14, График 37, 38, 39 и 40). Тестирање значајности линеарне регресије је одређивано за количине супстанце које су имале антибактеријски ефекат на бактерију *Staphylococcus aureus* ATCC 43300. Резултати показују да између испитиваних обележја постоји статистички високо значајна линеарна повезаност и јака позитивна корелација:

1. Log Q и P: АНОВА тест: **F=99,694**; **p<0,001**; Пирсонов коефицијент корелције: **r=0,936**; кориговани коефицијент детерминације **r^2=0,877; p<0,001; Табела 14**). Спирманов коефицијент корелације ρ**=0,970; p<0,001**

2. Log Q и R: АНОВА тест: **F=163,253**; **p<0,001**; Пирсонов коефицијент корелције: **r=0,960**, кориговани коефицијент детерминације **r^2=0,921, p<0,001; Табела 14**). Спирманов коефицијент корелације ρ**=0,970; p<0,001**

Табела 14. Линеарна регресија логаритама количина Q супстанце NAC од 30 mg, 10 mg, 3 mg, 1 mg по диску и површина/пречника зона инхибиције на колонијама бактерије *Staphylococcus aureus* ATCC 43300

Супстанца NAC	**Површина зоне инхибиције (mm²)**	**Пречник зоне инхибиције (mm)**	**Линеарна регресија**
30 mg по диску	780,91 611,74 718,14 689,11	31,54 27,92 30,25 29,63	АНОВА тест logQ/P **F=99,694; p<0,001; r=0,936; r²=0,877**
Xs+Sd	699,975±70,20	29,835±1,50	
10 mg по диску	449,11 300,39 359,45 401,43	23,92 19,56 21,36 22,61	АНОВА тест logQ/R **F=163,253; p<0,001; r=0,960; r²=0,921**
Xs+Sd	377,595±63,17	21,86±1,86	
3 mg по диску	270,56 196,16 284,59 254,54	18,56 15,81 19,04 18,01	Спирманов тест logQ/P **ρ=0,970; p<0,001**
Xs+Sd	251,46±38,86	17,855±1,43	
1 mg по диску	182,48 119,16 128,28 153,93	15,25 12,32 12,78 14,00	Спирманов тест logQ/R **ρ=0,970; p<0,001**
Xs+Sd	145,96±28,45	13,59±1,35	

Xs- средња вредност површине и пречника зоне инхибиције
SD – стандардна девијација

График 37. Зависност логаритма количина Q супстанце NAC од 30 mg, 10 mg, 3 mg, 1 mg по диску и површина зона инхибиције на колонијама бактерије *Staphylococcus aureus* ATCC 43300

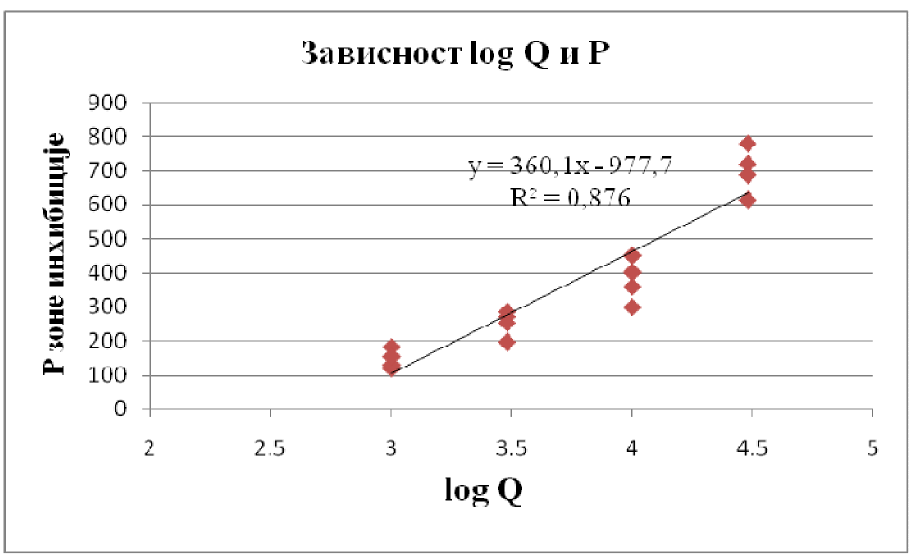
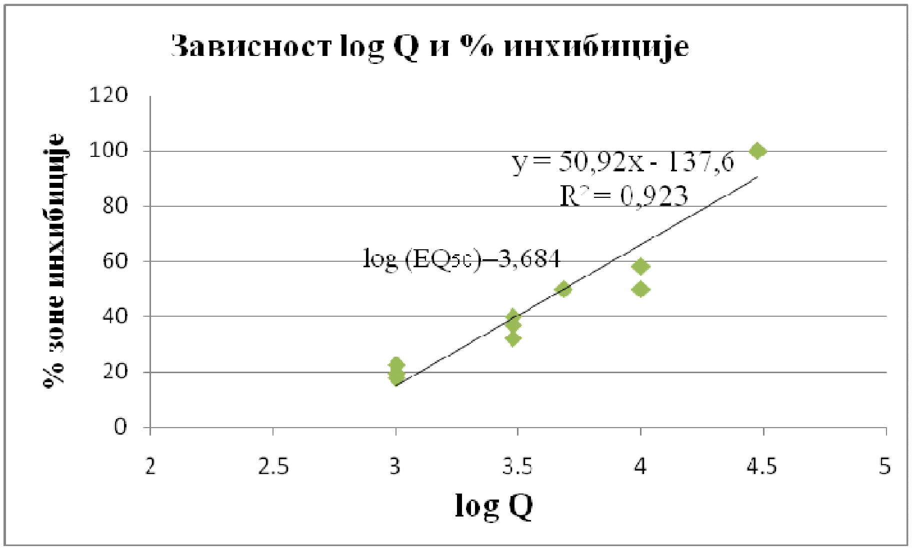


График 38. Зависност логаритма количина Q супстанце NAC и % зоне инхибиције на колонијама бактерије *Staphylococcus aureus* ATCC 43300



Вредност log (EQ_{50}) за испитиване вредности воденог екстракта белог лука је 3,684 што антилогаритмовано износи 4832,93 µg или изражено у милиграмима 4,83 (mg) по диску. Вредност ове количине је 50% његовог максималног ефекта на бактеријску културу *Staphylococcus aureus* ATCC 43300. Добијене вредности се односе на пропачун добијен из вредности са графика logQ и % инхибиције које су измерене дејством испитиваног екстракта мерењем површина зона инхибиције. Вредности логаритма количина супстанце NAC су прерачунати за микрограме.

График 39. Зависност логаритма количина супстанце NAC од 30 mg, 10 mg, 3 mg, 1 mg по диску и пречника зоне инхибиције на колонијама бактерије *Staphylococcus aureus* ATCC 43300

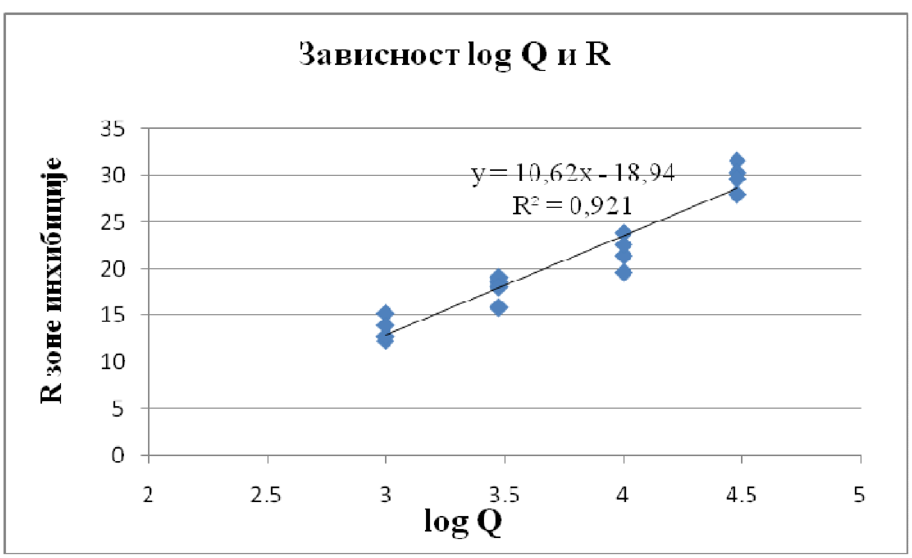
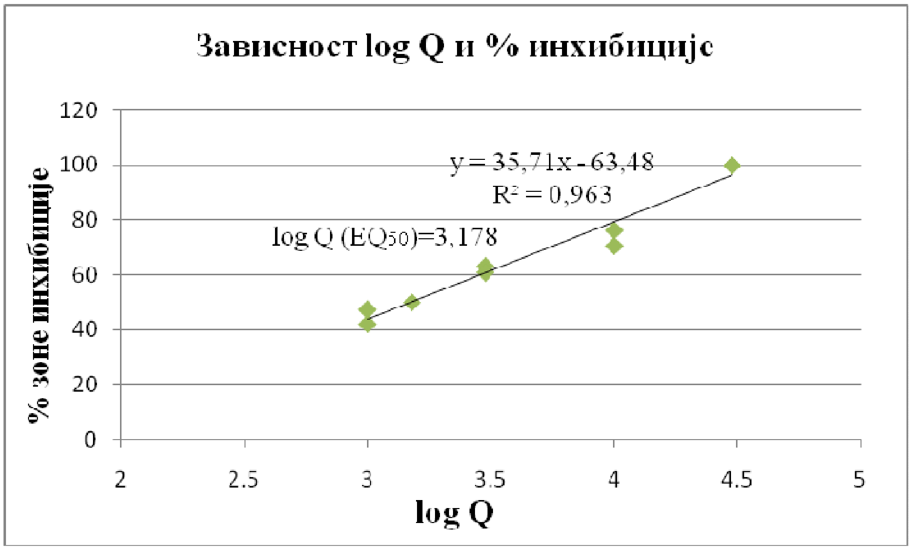


График 40. Зависност логаритма количине Q супстанце NAC и % зоне инхибиције на колонијама бактерије *Staphylococcus aureus* ATCC 43300



За испитиване вредности супстанце NAC у количинама Q од 30 mg, 10 mg, 3 mg и 1 mg по диску логаритмована количина супстанце која изазива 50% максималног ефеката (EQ_{50}) је 3,178 што антилогаритмовано износи 1506,61 μg односно изражено у милиграмима 1,51 (mg) за бактеријску културу *Staphylococcus aureus* ATCC 43300. Добијене вредности се односе на прорачун добијен из вредности са графика logQ и % инхибиције које су измерене дејством испитиване супстанце мерењем пречника зона инхибиције. Вредности логаритма количина супстанце N-ацетил-L-цистеина су прерачунате за микрограмске вредности.

5.3.3. Линеарна регресија између логаритма количине алицина и површина/пречника зоне инхибиције *Staphylococcus aureus* ATCC 43300

У овој анализи испитивана је линеарна регресија између логаритамски трансформисаних количина за основу 10 (log Q) испитиване супстанце алицина, молекулске формуле $C_6H_{10}OS_2$ и површина зона инхибиције (P) изражених у mm^2, односно пречника зона (R) инхибиције изражених у mm. Одређивано је да ли између вредности логаритма количине Q од 600 μg, 500 μg, 400 μg и 300 μg супстанце апликованих на диск и површина, односно пречника зоне инхибиције постоји линеарна зависност и какве је јачине таква веза (Табела 15, График 41, 42, 43 и 44). Тестирање значајности линеарне регресије је одређивано за количине супстанце које су имале антибактеријски ефекат на бактерију *Staphylococcus aureus* ATCC 43300. Резултати показују да између испитиваних обележја постоји статистички високо значајна линеарна повезаност и јака позитивна корелација:

1. Log Q и P: АНОВА тест: **F=151,35**; **p<0,001**; Пирсонов коефицијент корелције: **r=0,957**, кориговани коефицијент детерминације **r^2=0,915; p<0,001; Табела 15**). Спирманов коефицијент корелације ρ**=0,957, p<0,001**

2. Log Q и R: АНОВА тест: **F=194,907**; **p<0,001**, Пирсонов коефицијент корелције: **r=0,966**; кориговани коефицијент детерминације **r^2=0,933 p<0,001; Табела 15**). Спирманов коефицијент корелације ρ**=0,970; p<0,001**

Табела 15. Линеарна регресија логаритама количина супстанце Q алицина од 600 µg, 500 µg, 400 µg, 100 µg по диску и површина/пречника зона инхибиције на колонијама *Staphylococcus aureus* ATCC 43300

Алицин	**Површине зоне инхибиције (mm²)**	**Пречник зоне инхибиције (mm)**	**Тестирање линеарне регресије**
600 µg по диску	564,64	26,82	АНОВА тест logQ/P
	479,13	24,70	
	526,32	25,89	**F=151,35; p<0,001,**
	438,43	23,63	**r=0,957; r^2=0,915**
Xs+SD	502,13±55,01	25,26±1,39	
500 µg по диску	409,75	22,85	АНОВА тест logQ/R
	361,37	21,46	
	355,81	21,23	**F=194,907, p<0,001,**
	300,95	19,58	**r=0,966; r^2=0,933**
Xs+SD	356,97±44,51	21,28±1,34	
400 µg по диску	263,08	18,31	
	243,55	17,61	Спирманов тест logQ/P
	249,92	17,84	ρ**=0,957; p<0,001**
	247,57	17,76	
Xs+SD	251,03±8,45	17,88±0,30	
300 µg по диску	149,25	13,79	Спирманов тест logQ/R
	126,96	12,72	ρ**=0,970; p<0,001**
	140,80	13,39	
	139,64	13,34	
Xs+Sd	139,16±9,19	13,31±0,44	

Xs- средња вредност површине и пречника зоне инхибиције
SD – стандардна девијација

График 41. Зависност логаритма количина супстанце Q алицина од 600 μg, 500 μg, 400 μg и 300 μg по диску и површина зоне инхибиције на колонијама бактерије *Staphylococcus aureus* ATCC 43300

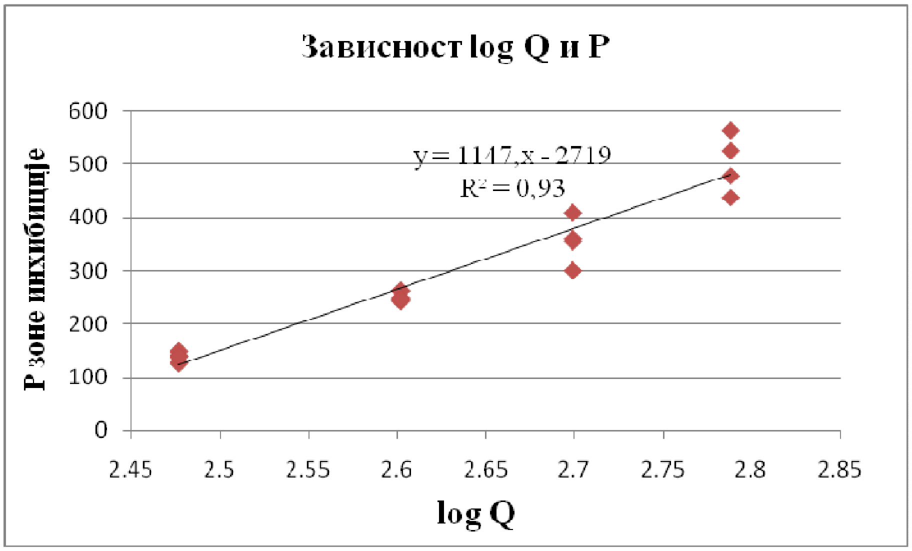
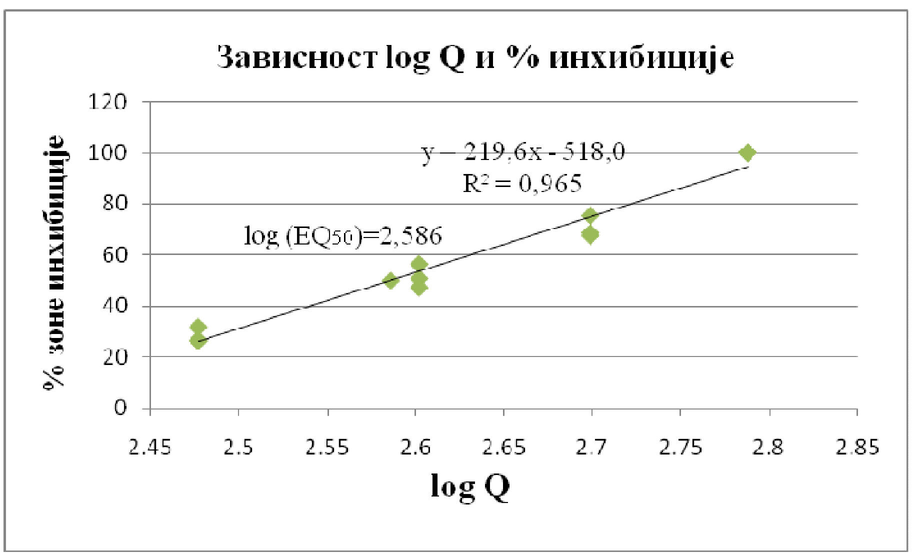


График 42. Зависност логаритма количина супстанце Q алицина и % зоне инхибиције на колонијама бактерије *Staphylococcus aureus* ATCC 43300



За испитиване вредности алицина у количинама Q од 600 μg, 500 μg, 400 μg и 300 μg по диску логаритмована количина супстанце која изазива 50% максималног ефеката (EQ_{50}) је 2,586 што антилогаритмовано износи 385,48 μg односно изражено у милиграмима 0,39 (mg) за бактеријску културу *Staphylococcus aureus* ATCC 43300. Добијене вредности се односе на прорачун добијен из вредности са графика logQ и % инхибиције које су измерене дејством испитиване супстанце мерењем површина зона инхибиције. Вредности логаритма количина супстанце алицина су прерачунати на микрограмске вредности.

График 43. Зависност логаритма количине супстанце Q алицина од 600 µg, 500 µg, 400 µg и 300 µg по диску и пречника зоне инхибиције на колонијама бактерије *Staphylococcus aureus* ATCC 43300

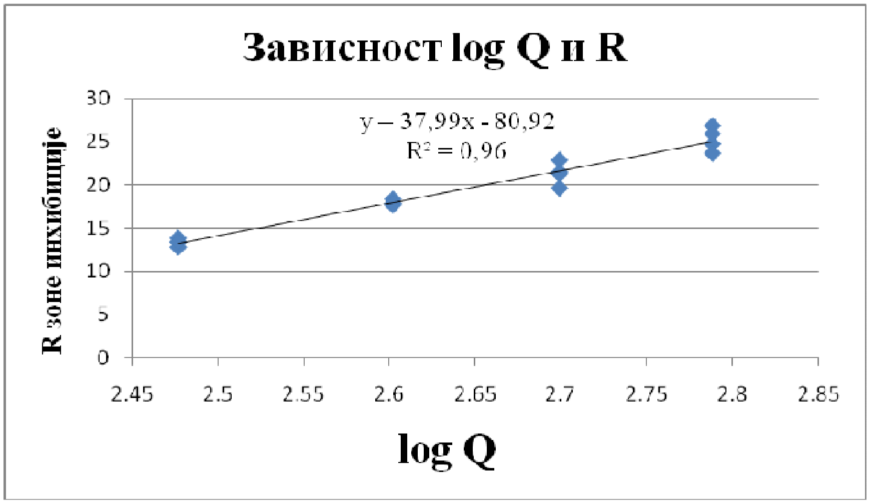
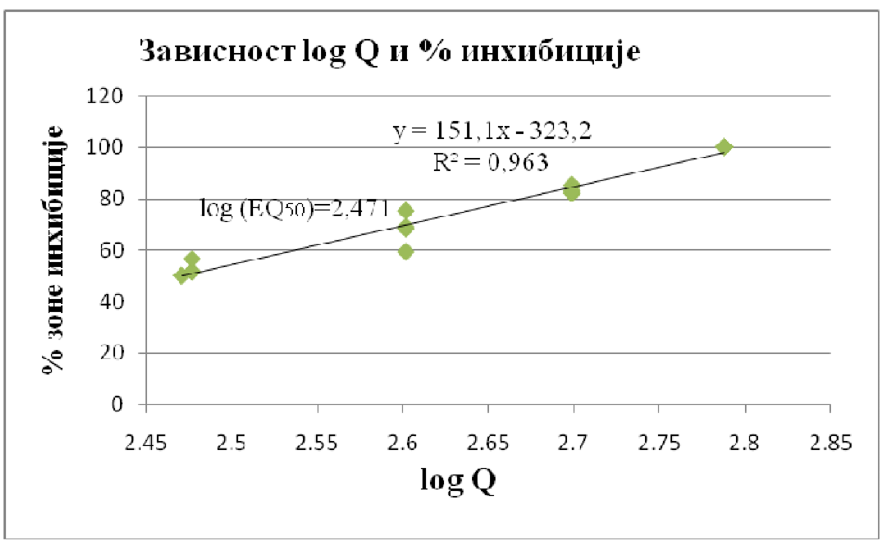


График 44. Зависност логаритма количина супстанце Q алицина и % зоне инхибиције на колонијама бактерије *Staphylococcus aureus* ATCC 43300



За испитиване вредности алицина у количинама Q од 600 µg, 500 µg, 400 µg и 300 µg по диску логаритмована количина супстанце која изазива 50% максималног ефеката (EQ_{50}) је 2,471 што антилогаритмовано износи 295,80 µg односно изражено у милиграмима 0,30 (mg) за бактеријску културу *Staphylococcus aureus* ATCC 43300. Добијене вредности се односе на прорачун добијен из вредности са графика logQ и % инхибиције које су измерене дејством испитиване супстанце мерењем пречника зона инхибиције. Вредности логаритма количина супстанце алицина су прерачунате за микрограмске вредности.

5.3.4. Линеарна регресија између логаритма количине контроле гентамицина и површина/пречника зоне инхибиције на *Staphylococcus aureus* ATCC 43300

У овој анализи испитивана је линеарна регресија између логаритамски трансформисаних количина за основу 10 (log Q) испитиваног антибиотика гентамицина, молекулске формуле $C_{21}H_{43}N_5O_7$ и површина зона инхибиције (P) изражених у mm², односно пречника зона (R) инхибиције изражених у mm. Одређивано је да ли између вредности логаритма количине Q од 8 µg, 4µg, 0,4 µg и 0,1µg антибиотика апликованог на диск и површина, односно пречника зоне инхибиције постоји линеарна зависност и какве је јачине таква веза (Табела 16, График 45, 46, 47 и 48). Тестирање значајности линеарне регресије је одређивано за количине антибиотика које су имале антибактеријски ефекат на бактерију *Escherichia coli* ATCC 10536. Резултати показују да између испитиваних обележја постоји статистички високо значајна линеарна повезаност и јака позитивна корелација:

Табела 16. Линеарна регресија log Q 8 µg, 4 µg, 0,4 µg и 0,1 µg гентамицина по диску и P/R зоне инхибиције на колонијама *Staphylococcus aureus* ATCC 43300

Антибиотик гентамицин	**Површине зоне инхибиције (mm²)**	**Пречник зоне инхибиције (mm)**	**Тестирање линеарне регресије**
8 µg	829,33	32,50	АНОВА тест logQ/P
по диску	823,19	32,38	
	827,89	32,47	**$F=528{,}950$, $p<0{,}001$,**
	800,77	31,94	**$r=0{,}987$; $r^2=0{,}974$**
Xs+SD	820,29±13,28	32,32±0,26	
4 µg	754,98	31,01	АНОВА тест logQ/R
по диску	739,14	30,68	
	769,56	31,31	**$F=332{,}844$; $p<0{,}001$,**
	729,79	30,49	**$r=0{,}980$; $r^2=0{,}960$**
Xs+SD	748,38±17,54	30,87±0,36	
0,4 µg по диску	532,91	26,05	
	578,41	27,14	Спирманов тест logQ/P
	583,49	27,26	**$\rho=0{,}987$; $p<0{,}001$**
Xs+SD	582,39	27,24	
	569,3±24,36	26,92±0,58	
0,1 µg	410,09	22,86	
по диску	345,19	20,97	Спирманов тест logQ/R
	379,04	21,97	**$\rho=0{,}980$; $p<0{,}001$**
	394,82	22,43	
Xs+Sd	382,28±27,79	22,06±0,81	

1. Log Q и P: АНОВА тест: **F=528,950**; **p<0,001**; Пирсонов коефицијент корелције: **r=0,987**, кориговани коефицијент детерминације **r^2=0,974; p<0,001; Табела 16**). Спирманов коефицијент корелације ρ**=0,987; p<0,001**

2. Log Q и R: АНОВА тест: **F=332,844**; **p<0,001**; Пирсонов коефицијент корелције: **r=0,980**, кориговани коефицијент детерминације **r^2=0,960; p<0,001; Табела 16**). Спирманов коефицијент корелације ρ**=0,980; p<0,001**

График 45. Зависност логаритма количине антибиотика гентамицина Q од 8µg, 4 µg, 0,4 µg, 0,1 µg по диску и површина зона инхибиције на колонијама бактерије *Staphylococcus aureus* ATCC 43300

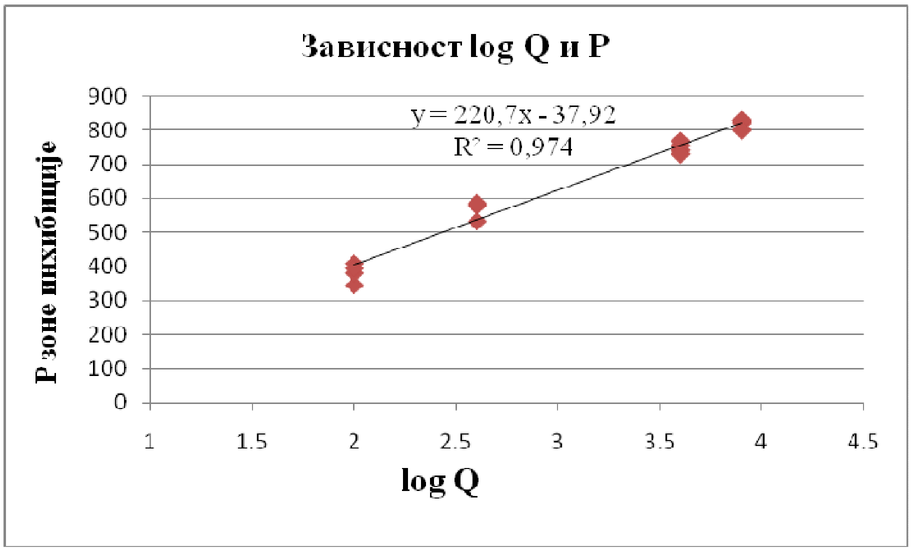
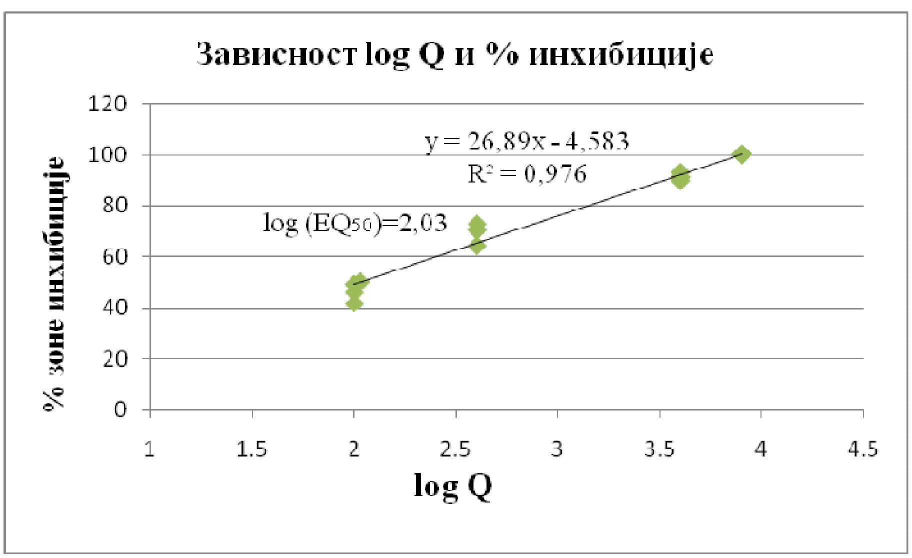


График 46. Зависност логаритма количине антибиотика гентамицина Q и % зоне инхибиције на колонијама бактерија *Staphylococcus aureus* ATCC 43300



За испитиване вредности антибиотика гентамицина у количинама Q од 8 μg, 4μg, 0,4 μg и 0,1μg по диску логаритмована количина антибиотика која изазива 50% максималног ефеката (EQ_{50}) је 2,03 што антилогаритмовано износи 107,15 ng односно изражено у микрограмима 0,107 (μg) за бактеријску културу *Staphylococcus aureus* ATCC 43300. Добијене вредности се односе на прорачун добијен из вредности са графика logQ и % инхибиције које су измерене дејством испитиваног антибиотика мерењем површина зона инхибиције. су прерачунате за нанограмске вредности.

График 47. Зависност логаритма количина антибиотика гентамицина Q од 8 μg, 4μg, 0,4 μg и 0,1 μg по диску и пречника зоне инхибиције на колонијама бактерија *Staphylococcus aureus* ATCC 43300

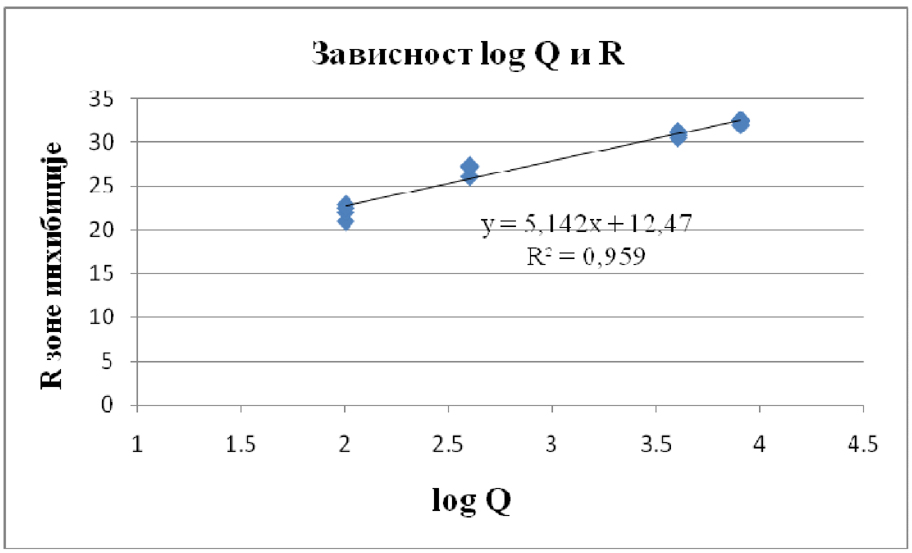
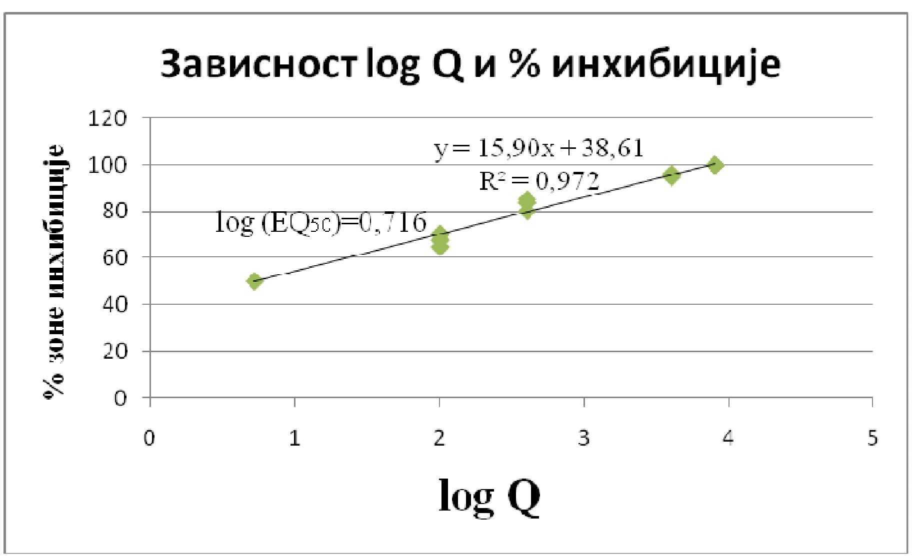


График 48. Зависност логаритма количина антибиотика гентамицина Q и % зоне инхибиције на колонијама бактерија *Staphylococcus aureus* ATCC 43300



За испитиване вредности антибиотика гентамицина у количинама Q од 8 μg, 4μg, 0,4 μg и 0,1μg по диску логаритмована количина антибиотика која изазива 50% максималног ефеката (EQ_{50}) је 0,783 што антилогаритмовано износи 6,067 ng односно изражено у микрограмима 0,006 (μg) за бактеријску културу *Staphylococcus aureus* ATCC 43300. Добијене вредности се односе на прорачун добијен из вредности са графика logQ и % инхибиције које су измерене дејством испитиваног антибиотика мерењем пречника зона инхибиције. Вредности логаритма количина антибиотика су прерачунати за нанограмске вредности.

Табела 17. Вредности EQ_{50} за водени екстракт белог лука и испитиване супстанце на колонијама бактерије *Staphylococcus aureus* ATCC 43300

екстракт/ супстанца	**Однос log Q и површине**	**Однос log Q и пречника**	**Однос log Q и површине μg /диску**	**Однос log Q и пречника μg /диску**
водени екстракт белог лука	log (EQ_{50})= 3,597	log (EQ_{50})= 3,026	EQ_{50}= 4623,81	EQ_{50} = 1061,70
N-ацетил-L-цистеин	log (EQ_{50})= 3,684	log (EQ_{50})= 3,178	EQ_{50} =4832,93	EQ_{50} =1506,61
алицин	log (EQ_{50})= 2,586	log (EQ_{50})= 2,471	EQ_{50}=385,48	EQ_{50} =295,80
S-метил-L-цистеин*	/	/	/	/
S-етил-L-цистеин*	/	/	/	/
S-пропил цистеин*	/	/	/	/
Гама-глутамил-L-цистеин*	/	/	/	/
L-цистеин*	/	/	/	/

* ове испитиване супстанце нису показале антимикробни ефекат на колоније бактерије *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (пример Слика 7б)

5.3.5. Одређивање минималне инхибиторне концетрације (МИК) за водени екстракт белог лука, алицин и N-ацетил-L-цистеин на бактерији *Staphylococcus aureus* ATCC 43300

Минималне инхибиторне концентрације (МИК) су одређиване екстраполацијом регресионих линија логаритма количина Q воденог ектракта белог лука или активних принципа и пречника инхибиције раста микроорганизама. Вредности количина испитиваног екстракта и супстанци су логаритмовани за нанограмске вредности количина по диску. За водени екстракт белог лука, ацетил цистеин и алицин уз контролу антибиотик гентамицин добијени су следећи резултати:

Табела 18. Вредности МИК за водени екстракт белог лука, N-ацетил-L-цистеин и алицин на колонијама бактерије *Staphylococcus aureus* ATCC 43300

екстракт/ супстанца	**ng/ml**	**µg/ml**
водени екстракт белог лука	156331,94	156,33
N-ацетил-L-цистеин	8661,26	8,66
алицин	1573,23	1,57

5.3.6. Сумпорни деривати који нису показали антибактеријски ефекат на *Staphylococcus aureus* ATCC 43300

Сумпорни деривати цистеина, конституенси воденог екстракта белог лука су испитивани на бактерију *Staphylococcus aureus* ATCC 43300. Супстанце S-метил-L-цистеин, S-етил-L-цистеин, S-пропил цистеин, гама-глутамил-L-цистеин и L-цистеин у количинама Q од 30 mg, 10 mg, 3 mg, 1 mg, 300 µg и 100 µg апликованих на дискове, ни за једну количину нису испољили антимикробни ефекат, што значи да нема активности, што су показали прелиминарни и коначни резултати испитивања.

5.4. Анализа инхибиторне активности воденог екстракта белог лука и сумпорних конституенаса белог лука за бактеријску културу *Bacillus subtilis* ATCC 11774

5.4.1. Линеарна регресија између логаритма количине воденог екстракта белог лука и површине/пречника зоне инхибиције раста бактерије *Bacillus subtilis* ATCC 11774

У овој анализи испитивана је линеарна регресија између логаритамски трансформисаних количина за основу 10 (log Q) испитиваног воденог екстракта белог лука и површина зона инхибиције (P) изражених у mm², односно пречника зоне (R) инхибиције изражених у mm. Одређивано је да ли између вредности логаритма количина Q од 30 mg, 10 mg и 3 mg воденог екстракта белог лука апликованих на диск и површина, односно пречника зоне инхибиције постоји линеарна зависност и какве је јачине таква веза (Табела 19, График 49,50,51 и 52). Тестирање значајности линеарне регресије је одређивано за количине екстракта које су имале антибактеријски ефекат на бактерију *Bacillus subtilis* ATCC 11774. Резултати показују да између испитиваних обележја постоји статистички високо значајна линеарна повезаност и јака позитивна корелација.

1. Log Q и P: АНОВА тест: **F=58,215**; **p<0,001**; Пирсонов коефицијент корелције: **r=0,924**, кориговани коефицијент детерминације **r^2=0,853; p<0,001; Табела 19**). Спирманов коефицијент корелације ρ**=0,946; p<0,001**

2. Log Q и R: АНОВА тест: **F=69,278**; **p<0,001**; Пирсонов коефицијент корелције: **r=0,935**, кориговани коефицијент детерминације **r^2=0,874, p<0,001; Табела 19**). Спирманов коефицијент корелације ρ**=0,946; p<0,001**

Табела 19. Линеарна регресија логаритама количина Q од 30 mg, 10 mg и 3 mg воденог екстракта белог лука по диску и површина/пречника зоне инхибиције на колонијама бактерије *Bacillus subtilis* ATCC 11774

Екстракт Бели лук	**Површине зоне инхибиције P (mm²)**	**Пречник зоне инхибиције R (mm)**	**Тестирање линеарне регресије**
30 mg по диску	326,89 299,60 300,22 307,51	20,41 19,55 19,56 19,79	АНОВА тест logQ/P F=**58,215**; **p<0,001, r=0,924; r^2=0,853**
Xs+SD	305,555±12,74	19,83±0,40	
10 mg по диску	173,34 171,67 169,76 171,03	15,91 14,79 14,71 15,39	АНОВА тест logQ/R F=**69,278**; **p<0,001, r=0,935; r^2=0,874**
Xs+SD	171,45±1,49	15,2±0,56	
3 mg по диску	149,58 139,71 133,14 136,04	13,80 13,34 13,02 13,16	Спирманов тест logQ/P и logQ/R ρ**=0,946; p<0,001**
Xs+SD	139,62±7,16	13,33±0,34	

Xs- средња вредност површине и пречника зоне инхибиције
SD – стандардна девијација

График 49. Зависност логаритма количине екстракта белог лука Q од 30 mg, 10 mg и 3 mg по диску и површине зоне инхибиције на колонијама бактерије *Bacillus subtilis* ATCC 11774

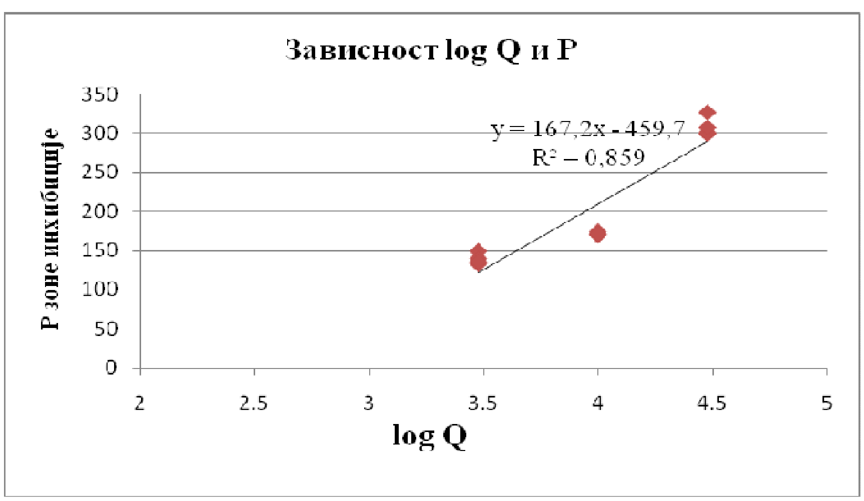
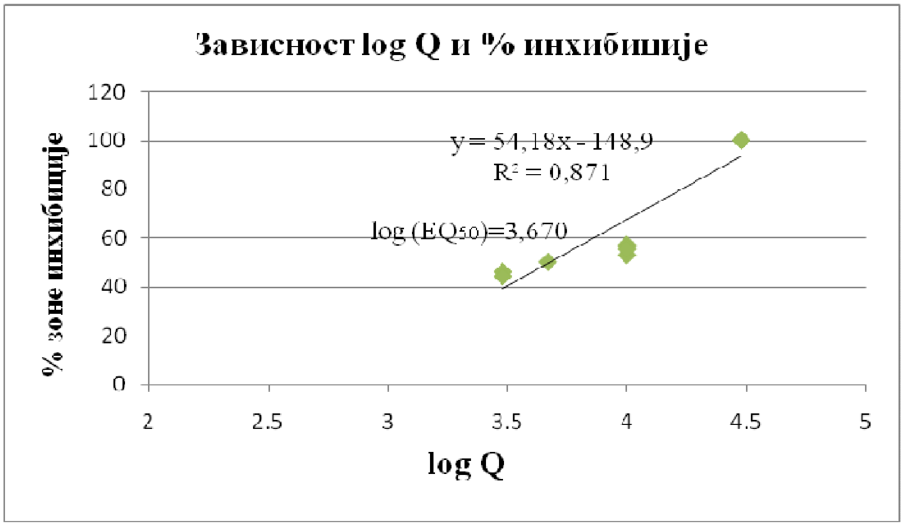


График 50. Зависност логаритма количине екстракта белог лука Q и % инхибиције на колонијама бактерије *Bacillus subtilis* ATCC 11774



За испитиване вредности воденог екстракта белог лука у количинама Q од 30 mg, 10 mg и 3 mg по диску логаримована количина супстанце која изазива 50% максималног ефеката (EQ_{50}) је 3,670 што антилогаритмовано износи 4677,35 µg односно изражено у милиграмима 4,68 (mg) за бактеријску културу *Bacillus subtilis* ATCC 11774. Добијене вредности се односе на прорачун добијен из вредности са графика logQ и % инхибиције које су измерене дејством испитиваног екстракта мерењем површина зона инхибиције. Вредности логаритма количина екстракта су прерачунате за микрограмске вредности.

График 51. Зависност логаритма количине екстракта белог лука Q од 30 mg, 10 mg и 3 mg по диску и пречника зоне инхибиције на колонијама бактерије *Bacillus subtilis* ATCC 11774

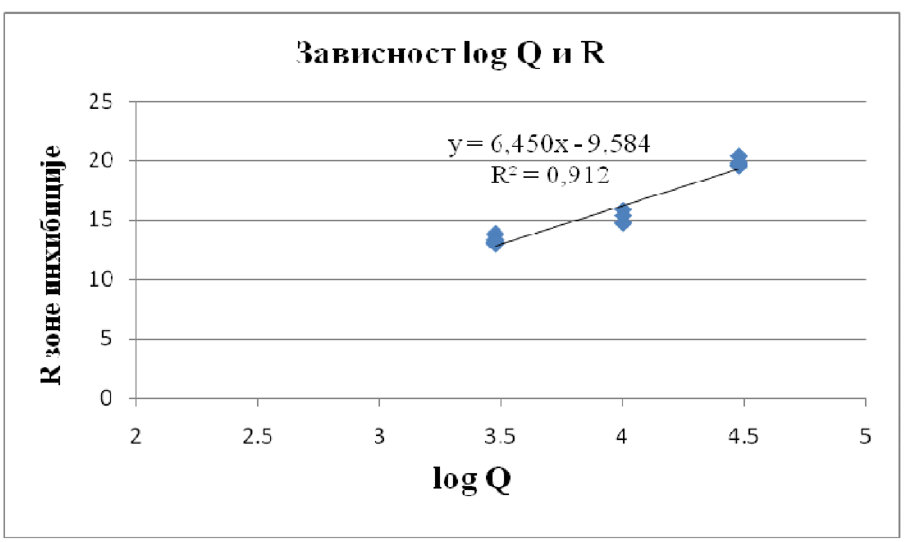
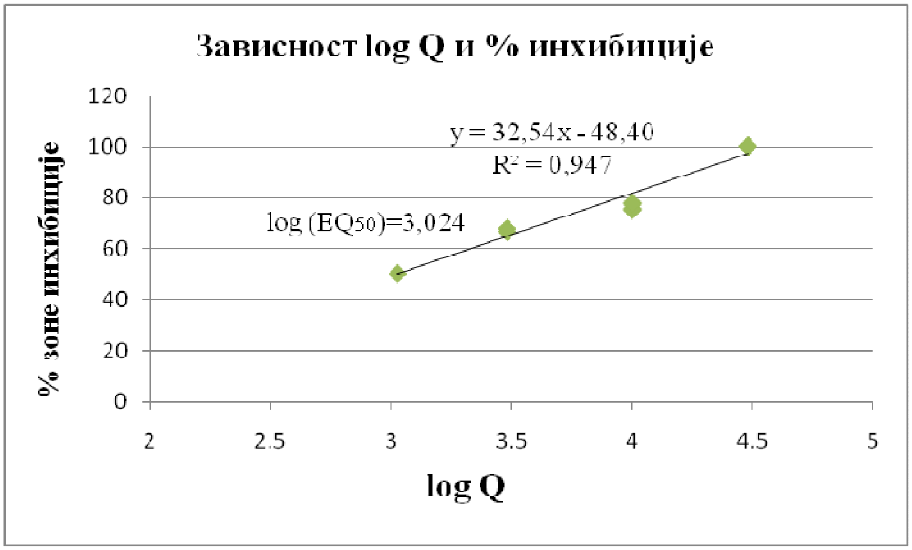


График 52. Зависност логаритма количине екстракта белог лука Q и % инхибиције на колонијама бактерије *Bacillus subtilis* ATCC 11774



За испитиване вредности воденог екстракта белог лука у количинама Q од 30 mg, 10 mg и 3 mg по диску логаритмована количина супстанце која изазива 50% максималног ефеката (EQ_{50}) је 3,024 што антилогаритмовано износи 1056,82 µg односно изражено у милиграмима 1,06 (mg) за бактеријску културу *Bacillus subtilis* ATCC 11774. Добијене вредности се односе на прорачун добијен из вредности са графика logQ и % инхибиције које су измерене дејством испитиваног екстракта мерењем пречника зона инхибиције. Вредности логаритма количина екстракта су прерачунате за микрограмске вредности.

5.4.2. Линеарна регресија између логаритма количина NAC и површина/пречника зоне инхибиције на бактерију *Bacillus subtilis* ATCC 11774

У овој анализи испитивана је линеарна регресија између логаритамски трансформисаних количина за основу 10 (log Q) испитиване супстанце NAC (N-ацетил-L-цистеина), молекулске формуле $C_5H_9NO_3S$ и површина зона инхибиције (P) изражених у mm², односно пречника зона (R) инхибиције изражених у mm. Одређивано је да ли између вредности логаритма количине Q од 30 mg, 10 mg, 3 mg и 1 mg супстанце апликованих на диск и површина, односно пречника зоне инхибиције постоји линеарна зависност и какве је јачине таква веза (Табела 20, График 53, 54, 55 и 56). Тестирање значајности линеарне регресије је одређивано за количине супстанце које су имале антибактеријски ефекат на бактерију *Bacillus subtilis* ATCC 11774. Резултати показују да између испитиваних обележја постоји статистички високо значајна линеарна повезаност и јака позитивна корелација:

1. Log Q и P: АНОВА тест: **F=107,153**; **$p<0{,}001$**; Пирсонов коефицијент корелције: **r=0,940**; кориговани коефицијент детерминације **r^2=0,844; $p<0{,}001$; Табела 20**). Спирманов коефицијент корелације ρ**=0,970; $p<0{,}001$**

2. Log Q и R: АНОВА тест: **F=163,253**; **$p<0{,}001$**; Пирсонов коефицијент корелције: **r=0,960**, кориговани коефицијент детерминације **r^2=0,921, $p<0{,}001$; Табела 20**). Спирманов коефицијент корелације ρ**=0,970; $p<0{,}001$**

Табела 20. Линеарна регресија логаритама количина Q супстанце NAC од 30 mg, 10 mg, 3 mg, 1 mg по диску и површина/пречника зона инхибиције на колонијама бактерије *Bacillus subtilis* ATCC 11774

Супстанца NAC	**Површина зоне инхибиције (mm²)**	**Пречник зоне инхибиције (mm)**	**Линеарна регресија**
30 mg	710,63	30,09	АНОВА тест log Q/P
по диску	703,78	29,94	
	599,74	27,63	**F=107,153; $p<0{,}001$;**
	657,16	28,93	**r=0,940; r^2=0,844**
Xs+Sd	667,83±51,23	29,15±1,13	
10 mg	404,12	22,69	АНОВА тест log Q/R
по диску	288,37	19,17	
	341,48	20,86	**F=163,253; $p<0{,}001$;**
	377,34	21,92	**r=0,960; r^2=0,921**
Xs+Sd	352,83±50,05	21,16±1,52	
3 mg	243,50	17,61	Спирманов тест log Q/P
по диску	189,26	15,52	ρ**=0,970; $p<0{,}001$**
	261,51	18,46	
	241,81	17,55	
Xs+Sd	234,02±31,14	17,28 ±1,23	
1 mg	166,06	14,54	Спирманов тест logQ/R
по диску	116,78	12,20	ρ**=0,970; $p<0{,}001$**
	123,15	12,53	
	144,69	13,58	
Xs+Sd	137,67±22,38	13,21±1,06	

Xs - средња вредност површине и пречника зоне инхибиције
SD – стандардна девијација

График 53. Зависност логаритма количина Q супстанце NAC од 30 mg, 10 mg, 3 mg, 1 mg по диску и површина зона инхибиције на колонијама бактерије *Bacillus subtilis* ATCC 11774

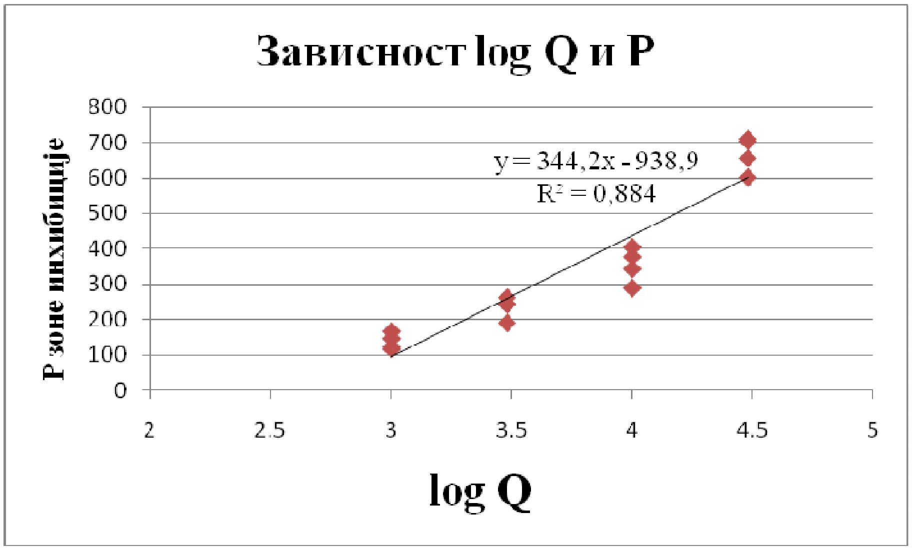
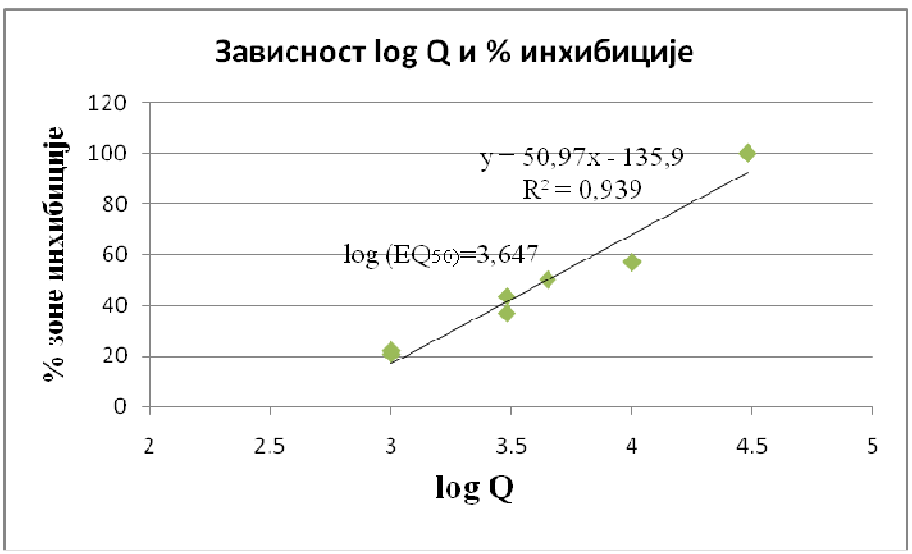


График 54. Зависност логаритма количина Q супстанце NAC и % зоне инхибиције на колонијама бактерије *Bacillus subtilis* ATCC 11774



За испитиване вредности супстанце NAC у количинама Q од 30 mg, 10 mg и 3 mg и 1 mg по диску логаритмована количина супстанце која изазива 50% максималног ефеката (EQ_{50}) је 3,647 што антилогаритмовано износи 4436,09 μg односно изражено у милиграмима 4,44 (mg) за бактеријску културу *Bacillus subtilis* ATCC 11774. Добијене вредности се односе на прорачун добијен из вредности са графика log Q и % инхибиције које су измерене дејством испитиване супстанце мерењем површина зона инхибиције. Вредности логаритма количина супстанце N-ацетил-L-цистеина су прерачунати за микрограмске вредности.

График 55. Зависност логаритма количина Q супстанце NAC од 30 mg, 10 mg, 3 mg, 1 mg по диску и пречника зоне инхибиције на колонијама бактерије *Bacillus subtilis* ATCC 11774

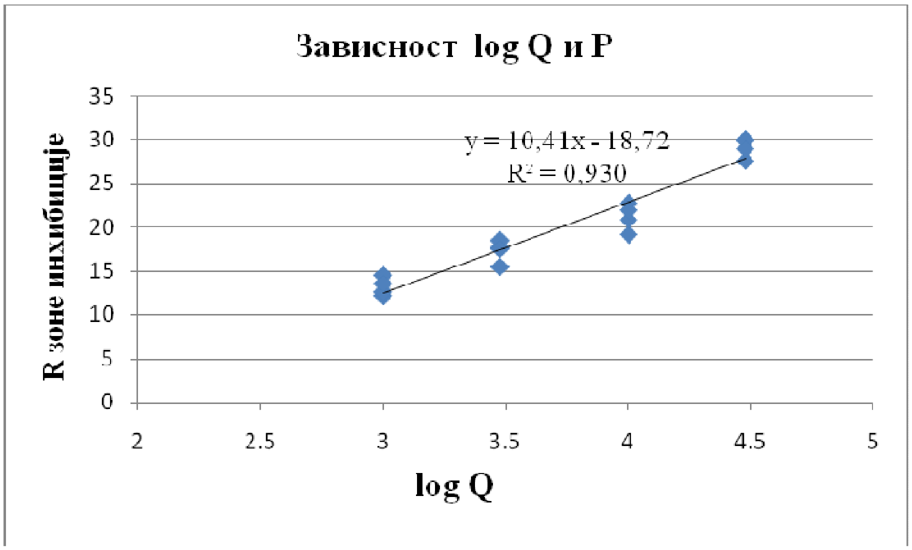
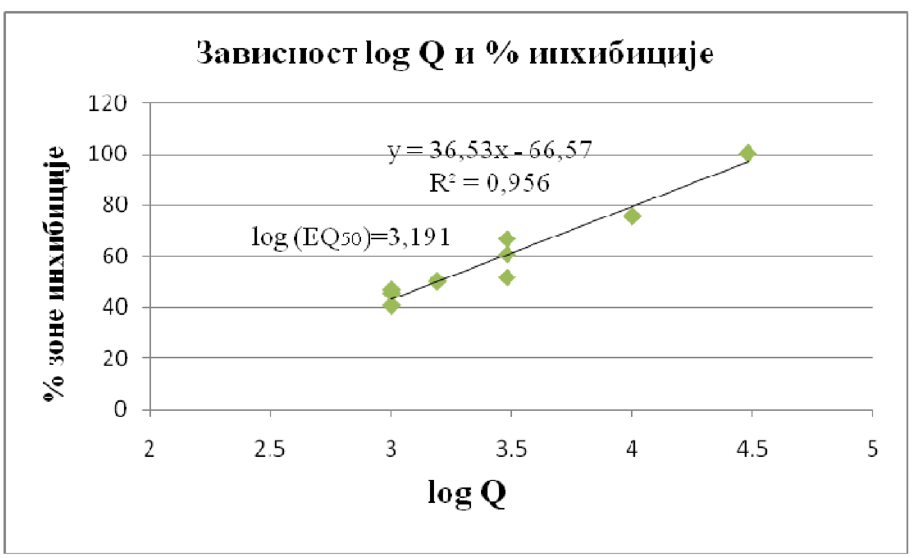


График 56. Зависност логаритма количине Q супстанце NAC и % зоне инхибиције на колонијама бактерије *Bacillus subtilis* ATCC 11774



За испитиване вредности супстанце NAC у количинама Q од 30 mg, 10 mg, 3 mg и 1 mg по диску логаритмована количина супстанце која изазива 50% максималног ефеката (EQ_{50}) је 3,191 што антилогаритмовано износи 1551,68 μg односно изражено у милиграмима 1,56 (mg) за бактеријску културу *Bacillus subtilis* ATCC 11774. Добијене вредности се односе на прорачун добијен из вредности са графика logQ и % инхибиције које су измерене дејством испитиване супстанце мерењем пречника зона инхибиције. Вредности логаритма количина супстанце N-ацетил-L-цистеина су прерачунате за микрограмске вредности.

5.4.3. Линеарна регресија између логаритма количине алицина и површина/пречника зоне инхибиције на *Bacillus subtilis* ATCC 11774

У овој анализи испитивана је линеарна регресија између логаритамски трансформисаних количина за основу 10 (log Q) испитиване супстанце алицина, молекулске формуле $C_6H_{10}OS_2$ и површина зона инхибиције (P) изражених у mm², односно пречника зона (R) инхибиције изражених у mm. Одређивано је да ли између вредности логаритма количине Q од 600 μg, 500 μg, 400 μg и 300 μg супстанце апликованих на диск и површина, односно пречника зоне инхибиције постоји линеарна зависност и какве је јачине таква веза (Табела 21, График 57, 58, 59 и 60). Тестирање значајности линеарне регресије је одређивано за количине супстанце које су имале антибактеријски ефекат на бактерију *Bacillus subtilis* ATCC 11774. Резултати показују да између испитиваних обележја постоји статистички високо значајна линеарна повезаност и јака позитивна корелација:

1. Log Q и P: АНОВА тест: **F=228,194**; **p<0,001**; Пирсонов коефицијент корелције: **r=0,971**, кориговани коефицијент детерминације **r^2=0,942; p<0,001; Табела 21**). Спирманов коефицијент корелације ρ**=0,971, p<0,001**

2. Log Q и R: АНОВА тест: **F=455,427**; **p<0,001**, Пирсонов коефицијент корелције: **r=0,985**; кориговани коефицијент детерминације **r^2=0,970 p<0,001; Табела 21**). Спирманов коефицијент корелације ρ**=0.970; p<0,001**

Табела 21. Линеарна регресија логаритама количина супстанце Q алицина од 600 μg, 500 μg, 400 μg, 100 μg по диску и површина/пречника зона инхибиције на колонијама *Bacillus subtilis* ATCC 11774

Алицин	**Површине зоне инхибиције (mm²)**	**Пречник зоне инхибиције (mm)**	**Тестирање линеарне регресије**
600 μg по диску	502,53	25,30	АНОВА тест P
	445,59	23,82	
	489,48	24,97	**F=228,194; p<0,001,**
	412,12	22,91	**r=0,971; r^2=0,942**
Xs+SD	462,43±41,45	24,25 ±1,1	
500 μg по диску	372,87	21,79	АНОВА тест R
	339,69	20,80	
	338,02	20,75	**F=455,427, p<0,001,**
	291,92	19,28	**r=0,985; r^2=0,970**
Xs+SD	335,63±33,26	20,65±1,03	
400 μg по диску	242,03	17,56	
	233,81	17,26	Спирманов тест log Q/P
	224,93	16,93	ρ**=0,971; p<0,001**
	240,14	17,49	
Xs+SD	235,23±7,71	17,31±0,28	
300 μg по диску	134,32	13,08	
	123,15	12,52	Спирманов тест logQ/R
	140,80	13,39	ρ**=0,970; p<0,001**
	130,94	12,91	
Xs+Sd	132,30±7,35	12,97±0,36	

Xs- средња вредност површине и пречника зоне инхибиције
SD – стандардна девијација

График 57. Зависност логаритма количина супстанце Q алицина од 600 μg, 500 μg, 400 μg и 300 μg по диску и површина зоне инхибиције на колонијама бактерије *Bacillus subtilis* ATCC 11774

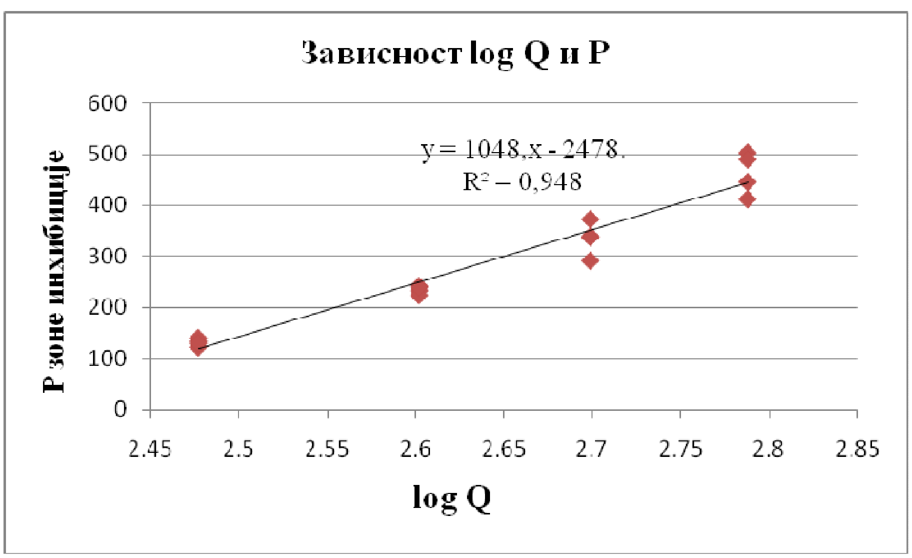
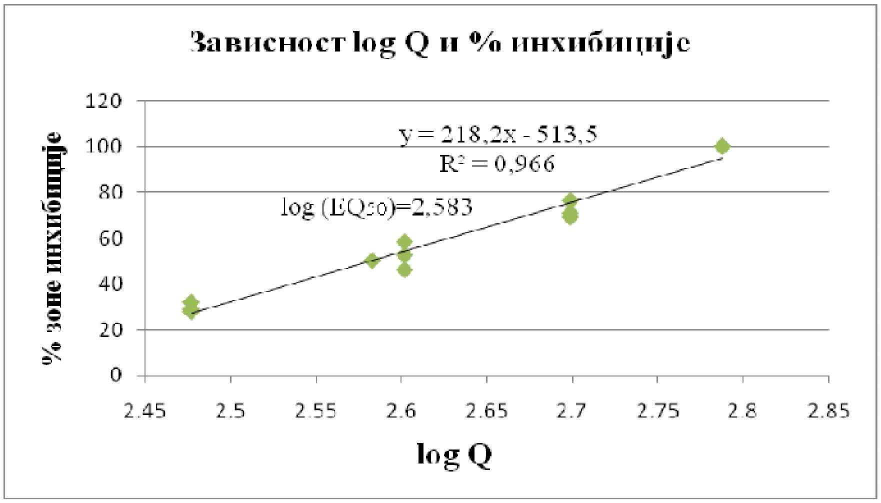


График 58. Зависност логаритма количина супстанце Q алицина и % зоне инхибиције на колонијама бактерије *Bacillus subtilis* ATCC 11774



За испитиване вредности алицина у количинама Q од 600 μg, 500 μg, 400 μg и 300 μg по диску логаритмована количина супстанце која изазива 50% максималног ефеката (EQ_{50}) је 2,583 што антилогаритмовано износи 382,82 μg односно изражено у милиграмима 3,83 (mg) за бактеријску културу *Bacillus subtilis* ATCC 11774. Добијене вредности се односе на прорачун добијен из вредности са графика logQ и % инхибиције које су измерене дејством испитиване супстанце мерењем површина зона инхибиције. Вредности логаритма количина супстанце алицина су прерачунати на микрограмске вредности.

График 59. Зависност логаритма количине супстанце Q алицина од 600 μg, 500 μg, 400 μg и 300 μg по диску и пречника зоне инхибиције на колонијама бактерије *Bacillus subtilis* ATCC 11774

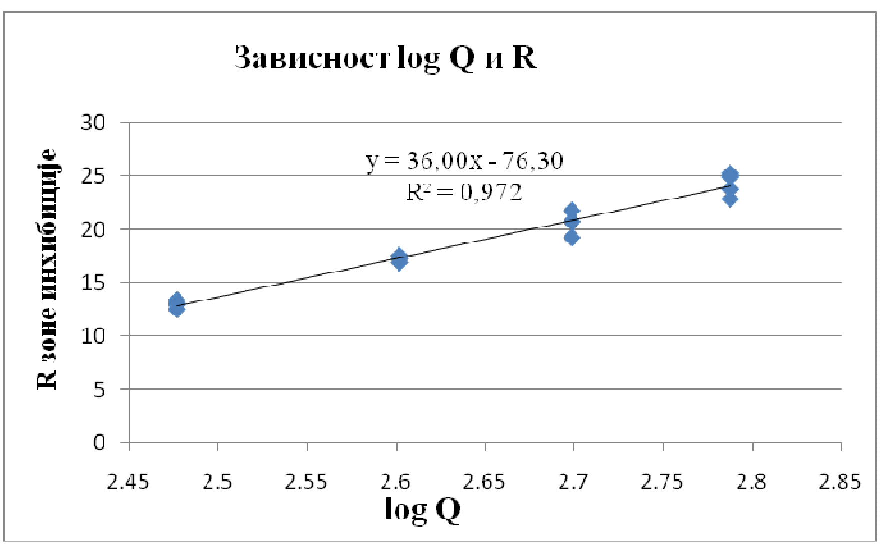
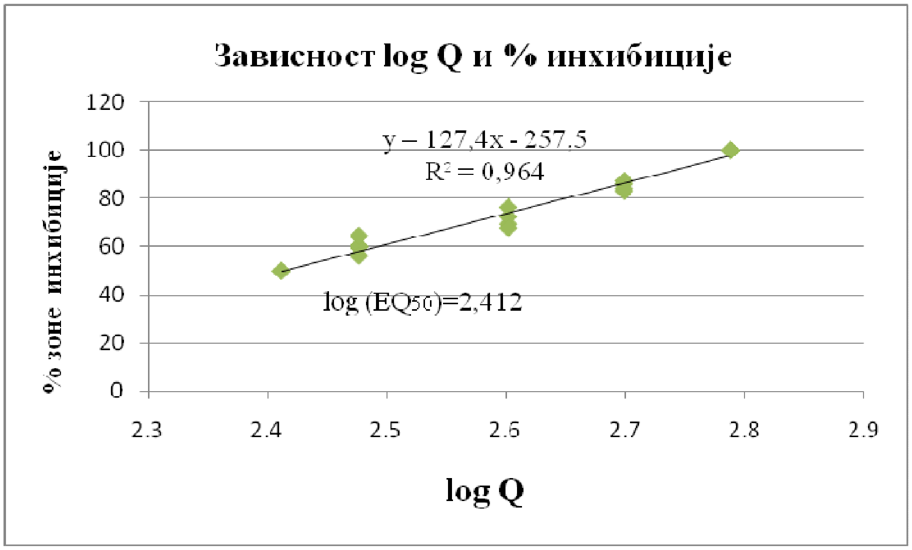


График 60. Зависност логаритма количина супстанце Q алицина и % зоне инхибиције на колонијама бактерије *Bacillus subtilis* ATCC 11774



За испитиване вредности алицина у количинама Q од 600 μg, 500 μg, 400 μg и 300 μg по диску логаритмована количина супстанце која изазива 50% максималног ефеката (EQ_{50}) је 2,412 што антилогаритмовано износи 258,23 μg односно изражено у милиграмима 2,58 (mg) за бактеријску културу *Bacillus subtilis* ATCC 11774. Добијене вредности се односе на прорачун добијен из вредности са графика logQ и % инхибиције које су измерене дејством испитиване супстанце мерењем пречника зона инхибиције. Вредности логаритма количина супстанце алицина су прерачунате за микрограмске вредности.

5.4.4. Линеарна регресија између логаритма количине контроле гентамицина и површина/пречника зоне инхибиције на *Bacillus subtilis* ATCC 11774

У овој анализи испитивана је линеарна регресија између логаритамски трансформисаних количина за основу 10 (log Q) испитиваног антибиотика гентамицина, молекулске формуле $C_{21}H_{43}N_5O_7$ и површина зона инхибиције (P) изражених у mm², односно пречника зона (R) инхибиције изражених у mm. Одређивано је да ли између вредности логаритма количине Q од 8 μg, 4μg, 0,4 μg и 0,1μg антибиотика апликованог на диск и површина, односно пречника зоне инхибиције постоји линеарна зависност и какве је јачине таква веза (Табела 22, График 61,62,63 и 64). Тестирање значајности линеарне регресије је одређивано за количине антибиотика које су имале антибактеријски ефекат на бактерију *Bacillus subtilis* ATCC 11774.

Резултати показују да између испитиваних обележја постоји статистички високо значајна линеарна повезаност и јака позитивна корелација:

Табела 22. Линеарна регресија количина Q гентамицина 8 µg, 4 µg, 0,4 µg и 0,1 µg по диску и површина/пречника зоне инхибиције на колонијама *Bacillus subtilis* ATCC 11774

Антибиотик гентамицин	**Површине зоне инхибиције (mm²)**	**Пречник зоне инхибиције (mm)**	**Тестирање линеарне регресије**
8 µg	825,22	32,42	АНОВА тест log Q/ P
по диску	823,98	32,40	
	824,43	32,41	F=**528,950, p<0,001,**
	831,24	32,54	**r=0,987; r^2=0,974**
Xs+SD	826,22±3,39	32,44±0,06	
4 µg	754,34	31,00	АНОВА тест log Q/R
по диску	749,22	30,89	
	779,39	31,51	F=**357,725**; **p<0,001,**
	751,57	30,94	**r=0,981; r^2=0,962**
Xs+SD	758,63±14,00	31,08±0,29	
0,4 µg по диску	544,47	26,34	
	594,01	27,51	Спирманов тест log Q/P
	589,22	27,40	ρ=**0,970; p<0,001**
	593,46	27,49	
Xs+SD	580,29±23,98	27,18±0,56	
0,1 µg	414,57	22,98	
по диску	365,92	21,59	Спирманов тест logQ/R
	383,44	22,10	ρ=**0,970; p<0,001**
	419,82	23,13	
Xs+Sd	395,94±22,22	22,45±0,73	

1. Log Q и P: АНОВА тест: **F=528,950**; **p<0,001**; Пирсонов коефицијент корелције: **r=0,987**, кориговани коефицијент детерминације **r^2=0,974; p<0,001; Табела 22**). Спирманов коефицијент корелације ρ**=0,970; p<0,001**

2. Log Q и R: АНОВА тест: **F=357,725**; **p<0,001**; Пирсонов коефицијент корелције: **r=0,981**, кориговани коефицијент детерминације **r^2=0,962; p<0,001; Табела 22**). Спирманов коефицијент корелације ρ**=0,970; p<0,001**

График 61. Зависност логаритма количине антибиотика гентамицина Q од 8µg, 4 µg, 0,4 µg, 0,1 µg по диску и површина зона инхибиције на колонијама бактерије *Bacillus subtilis* ATCC 11774

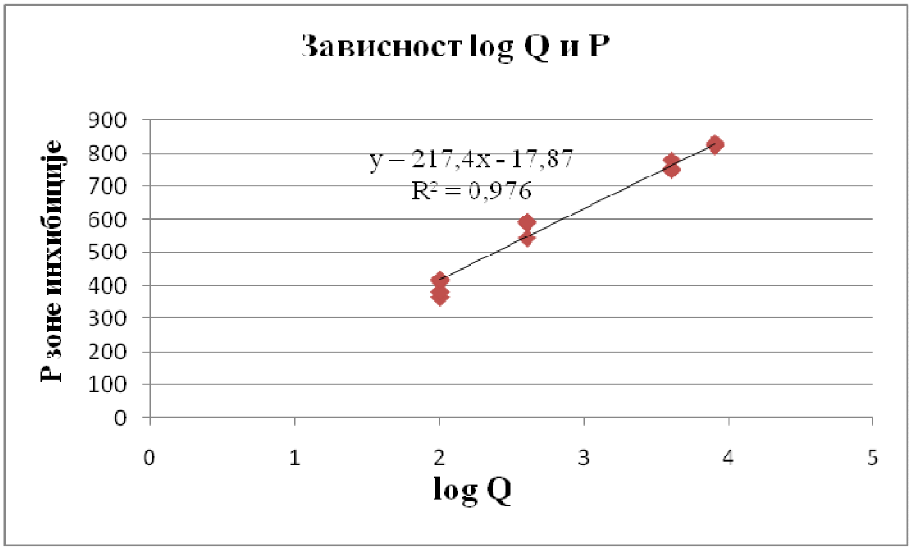
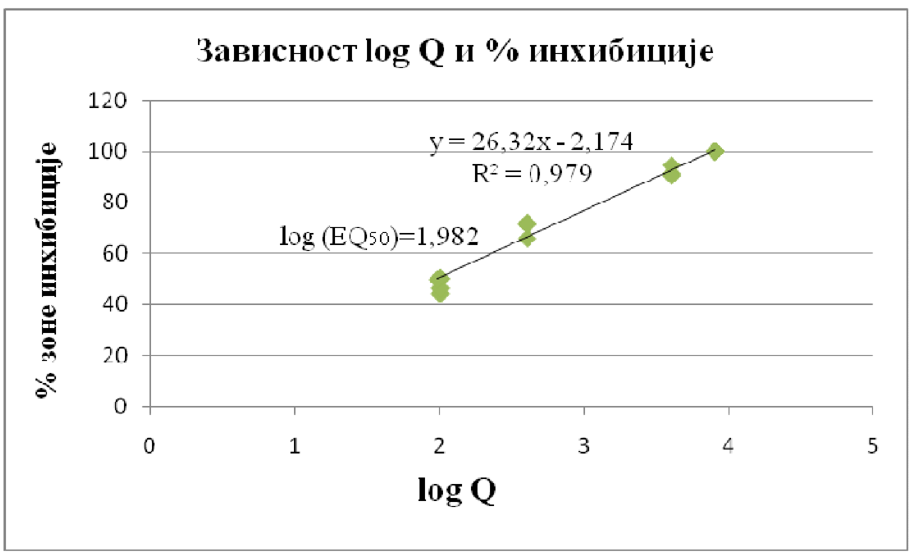


График 62. Зависност логаритма количине антибиотика гентамицина Q и % зоне инхибиције на колонијама бактерија *Bacillus subtilis* ATCC 11774



За испитиване вредности антибиотика гентамицина у количинама Q од 8 µg, 4µg, 0,4 µg и 0,1µg по диску логаритмована количина антибиотика која изазива 50% максималног ефеката (EQ_{50}) је 1,982 што антилогаритмовано износи 95,94 ng односно изражено у микрограмима 0,96 (µg) за бактеријску културу *Bacillus subtilis* ATCC 11774. Добијене вредности се односе на прорачун добијен из вредности са графика logQ и % инхибиције које су измерене дејством испитиваног антибиотика мерењем површина зона инхибиције. су прерачунате за нанограмске вредности.

График 63. Зависност логаритма количина антибиотика гентамицина Q од 8 µg, 4µg, 0,4 µg и 0,1 µg по диску и пречника зоне инхибиције на колонијама бактерија *Bacillus subtilis* ATCC 11774

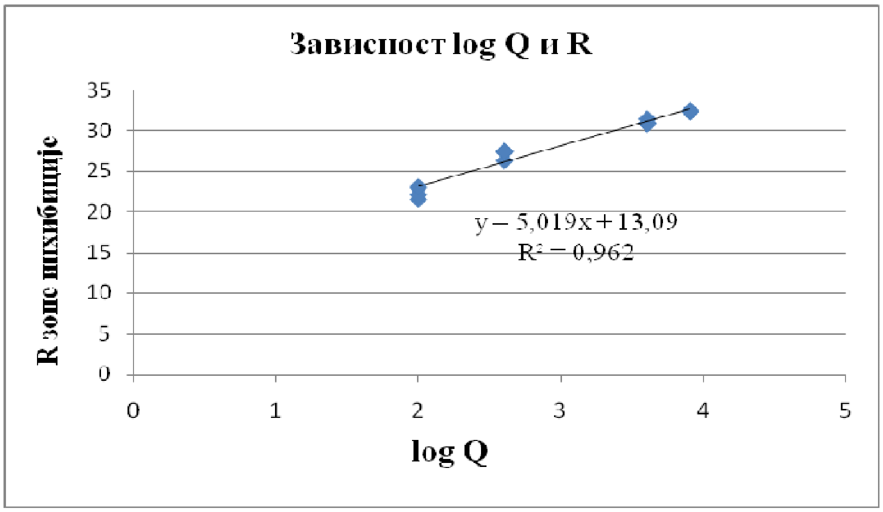
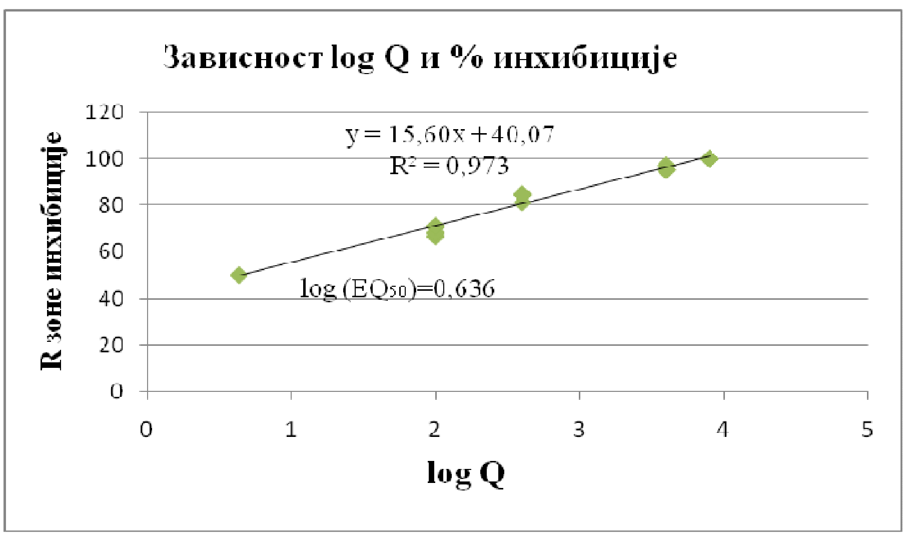


График 64. Зависност логаритма количина антибиотика гентамицина Q и % зоне инхибиције на колонијама бактерија *Bacillus subtilis* ATCC 11774



За испитиване вредности антибиотика гентамицина у количинама Q од 8 µg, 4µg, 0,4 µg и 0,1µg по диску логаритмована количина антибиотика која изазива 50% максималног ефеката (EQ_{50}) је 0,636 што антилогаритмовано износи 4,325 ng односно изражено у микрограмима 0,0043 (µg) за бактеријску културу *Bacillus subtilis* ATCC

11774. Добијене вредности се односе на прорачун добијен из вредности са графика logQ и % инхибиције које су измерене дејством испитиваног антибиотика мерењем пречника зона инхибиције. Вредности логаритма количина антибиотика су прерачунати за нанограмске вредности.

Табела 23. Вредности log (EQ_{50}) и EQ_{50} за водени екстракт белог лука, ацетил цистеин, алицин и гентамицин на колонијама бактерије *Bacillus subtilis* ATCC 11774

екстракт/ супстанца	**Однос log Q и површине**	**Однос log Q и пречника**	**Однос log Q и површине µg /диску**	**Однос log Q и пречника µg /диску**
водени екстракт белог лука	log (EQ_{50})= 3,670	log (EQ_{50})= 3,024	EQ_{50}= 4677,35	EQ_{50} = 1056,82
N-ацетил-L-цистеин	log (EQ_{50})= 3,647	log (EQ_{50})= 3,191	EQ_{50} =4436,09	EQ_{50} =1551,68
алицин	log (EQ_{50})= 2,583	log (EQ_{50})= 2,412	EQ_{50}=382,82	EQ_{50} =258,23
S-метил-L-цистеин*	/	/	/	/
S-етил-L-цистеин*	/	/	/	/
S-пропил цистеин*	/	/	/	/
Гама-глутамил-L-цистеин*	/	/	/	/
L-цистеин*	/	/	/	/

* ове испитиване супстанце нису показале антимикробни ефекат на колоније бактерије *Bacillus subtilis* ATCC 11774

5.4.5. Одређивање минималне инхибиторне концетрације (МИК) за водени екстракт белог лука, алицин, N-ацетил-L-цистеин за бактерију *Bacillus subtilis* ATCC 11774

Минималне инхибиторне концентрације (МИК) су одређиване екстраполацијом регресионих линија логаритма количина Q воденог ектракта белог лука или активних принципа и пречника инхибиције раста микроорганизама. Вредности количина испитиваног екстракта и супстанци су логаритмовани за нанограмске вредности количина по диску. За водени екстракт белог лука, ацетил цистеин и алицин уз контролу антибиотик гентамицин добијени су следећи резултати:

Табела 24. Вредности МИК за водени екстракт белог лука, N-ацетил-L-цистеин, алицина и гентамицина на колонијама бактерије *Bacillus subtilis* ATCC 11774

екстракт/ супстанца	**ng/ml**	**µg/ml**
водени екстракт белог лука	168919,68	168,92
N-ацетил-L-цистеин	11580,58	11,58
алицин	2041,95	2,04

5.4.6. Сумпорни деривати који нису показали антибактеријски ефекат на *Bacillus subtilis* ATCC 11774

Сумпорни деривати цистеина, конституенси воденог екстракта белог лука су испитивани на бактерију *Bacillus subtilis* ATCC 11774. Супстанце S-метил-L-цистеин, S-етил-L-цистеин, S-пропил цистеин, гама-глутамил-L-цистеин и L-цистеин у количинама Q од 30 mg, 10 mg, 3 mg, 1 mg, 300 µg и 100 µg апликованих на дискове, ни за једну количину нису испољили антимикробни ефекат, што значи да нема активности, што су показали прелиминарни и коначни резултати испитивања.

5.5. Сумарни резултати студије

У овој анализи испитивана је линеарна регресија између логаритма количина воденог екстракта белог лука, алицина и NAC и површина/пречника и одређивано је да ли постоји линеарна зависност између наведених параметара односно независне и зависне варијабле које су испитиване. Утврђена је директна веза између логаритма количина екстракта и супстанци са површином/пречником зоне инхибиције тј. дозно завистан одговор бактеријских култура који је испитиван следећим релацијама.

Код бактеријске културе ***Eserihia coli*** **ATCC 10536** за водени екстракт белог лука, показано је да постоји статистички високо значајна директна позитивна веза између количине екстракта и површина зоне инхибиције и да је више од 80% варијабилности тако исказаног антимикробног ефекта (зоне инхибиције) условљено променама у количини испитиваних активних принципа (**$r>0,9$; $p<0,001$; $r^2>0,8$; табела бр. 1**). Суштински слични резултати добијени су и када је у питању изражавање антимикробног дејства воденог екстрата путем пречника зоне инхибиције (**$r>0,9$; $p<0,001$; $r^2>0,8$; табела бр. 1**). Веродостојност ових резултата потврђује и анализа корелације ранга за повезаност логаритма количина воденог екстракта и површине, односно пречника зоне инхибиције (**$\rho>0,9$; $p<0,001$; табела бр. 1**) на што указују рангови који су приближно исти и позитивно корелисани. За бактеријску културу ***Eserihia coli*** **ATCC 10536** вредности **EQ_{50}** за водени екстракт белог лука износе **1,22** mg (**табела бр. 5**) по диску прерачунато из графика log Q/% зоне инхибиције преко пречника инхибиторне зоне. Методом најмањих квадрата израчунато преко пречника зоне инхибиције према методологији описаној у раду Кронвала и осталих по моделу који је описан претходно у раду, минимална инхибиторна концетрација за водени екстракт белог лука износи **428,20 µg/ml (табела бр. 6)** за бактеријски сој ***Eserihia coli* ATCC 10536**. Добијени резултати пречника зоне инхибиције и минималне инхибиторне концетрације за водени екстракт белог лука су компаративни са подацима добијеним из других релевантних студија[87].

Код бактеријске културе ***Eserihia coli* ATCC 10536** за супстанцу алицин, показано је да постоји статистички високо значајна директна позитивна веза између количине супстанце и површина зоне инхибиције и да је више од 80% варијабилности тако исказаног антимикробног ефекта (зоне инхибиције) условљено променама у количини испитиваних активних принципа (**$r>0,9$; $p<0,001$; $r^2>0,8$; табела бр. 2**). Суштински слични резултати добијени су и када је у питању изражавање антимикробног дејства супстанце алицина путем пречника зоне инхибиције (**$r>0,9$; $p<0,001$; $r^2>0,8$; табела бр. 2**). Веродостојност ових резултата потврђује и анализа корелације ранга за повезаност логаритма количина супстанце алицина и површине, односно пречника зоне инхибиције (**$\rho>0,9$; $p<0,001$; табела бр. 2**) на што указују рангови који су приближно исти и позитивно корелисани. За бактеријску културу ***Eserihia coli* ATCC 10536** вредности **EQ_{50}** за супстанцу алицин износе **283,8 µg (табела бр. 5)** по диску прерачунато из графика log Q/% зоне инхибиције преко пречника инхибиторне зоне. Методом најмањих квадрата израчунато преко пречника зоне инхибиције и према методологији описаној у раду Кронвала и осталих по моделу који је описан претходно у раду минимална инхибиторна концетрација за супстанцу алицин износи **4,08 µg/ml (табела бр. 6)** за бактеријски сој *Eserihia coli* ATCC 10536. Добијени резултати пречника зоне инхибиције и минималне инхибиторне концетрације за супстанцу алицин су компаративни са подацима добијеним из других студија[27].

Код бактеријске културе ***Eserihia coli* ATCC 10536** за супстанцу NAC, показано је да постоји статистички високо значајна директна позитивна веза између количине супстанце и површина зоне инхибиције и да је више од 80% варијабилности тако исказаног антимикробног ефекта (зоне инхибиције) условљено променама у количини испитиваних активних принципа (**$r>0,9$; $p<0,001$; $r^2>0,8$; табела бр. 3**). Суштински слични резултати добијени су и када је у питању изражавање антимикробног дејства супстанце NAC путем пречника зоне инхибиције (**$r>0,9$; $p<0,001$; $r^2>0,8$; табела бр. 3**). Веродостојност ових резултата потврђује и анализа корелације ранга за повезаност логаритма количина супстанце NAC и површине, односно пречника зоне инхибиције (**$\rho>0,9$; $p<0,001$; табела бр. 3**) на што указују рангови који су приближно исти и позитивно корелисани. За бактеријску културу ***Eserihia coli* ATCC 10536** вредности

EQ_{50} за супстанцу NAC износе **1,52 mg (табела бр. 5)** по диску прерачунато из графика log Q/% зоне инхибиције преко пречника инхибиторне зоне. Методом најмањих квадрата израчунато преко пречника зоне инхибиције према методологији описаној у раду Кронвала и осталих по моделу који је описан претходно у раду минимална инхибиторна концентрација за супстанцу NAC износи **35,30 µg/ml (табела бр. 6)** за бактеријски сој *Eserihia coli* ATCC 10536. Добијени резултати пречника зоне инхибиције и минималне инхибиторне концентрације за супстанцу NAC су компаративни са подацима добијеним из других студија[88].

Код бактеријске културе ***Pseudomonas aeruginosa*** **ATCC 9027** за водени екстракт белог лука, показано је да постоји статистички високо значајна директна позитивна веза између количине екстракта и површина зоне инхибиције и да је више од 80% варијабилности тако исказаног антимикробног ефекта (зоне инхибиције) условљено променама у количини испитиваних активних принципа (**$r>0,9$; $p<0,001$; $r^2>0,8$; табела бр. 7**). Суштински слични резултати добијени су и када је у питању изражавање антимикробног дејства воденог екстракта путем пречника зоне инхибиције (**$r>0,9$; $p<0,001$, $r^2>0,8$; табела бр. 7**). Веродостојност ових резултата потврђује и анализа корелације ранга за повезаност логаритма количина воденог екстракта и површине, односно пречника зоне инхибиције (**$\rho>0,9$; $p<0,001$; табела бр. 7**) на што указују рангови који су приближно исти и позитивно корелисани. За бактеријску културу ***Pseudomonas aeruginosa*** **ATCC** 9027 вредности **EQ_{50}** за водени екстракт белог лука износе **0,93** mg **(табела бр. 11)** по диску прерачунато из графика log Q/% зоне инхибиције преко пречника инхибиторне зоне. Методом најмањих квадрата израчунато преко пречника зоне инхибиције према методологији описаној у раду Кронвала и осталих по моделу који је описан претходно у раду минимална инхибиторна концетрација за водени екстракт белог лука износи **440,39 µg/ml (табела бр. 12)** за бактеријски сој ***Pseudomonas aeruginosa*** **ATCC**. Добијени резултати пречника зоне инхибиције и минималне инхибиторне концетрације за водени екстракт белог лука су компаративни са подацима добијеним из других студија[87].

Код бактеријске културе ***Pseudomonas aeruginosa*** **ATCC** за супстанцу алицин, показано је да постоји статистички високо значајна директна позитивна веза између количине супстанце алицина и површина зоне инхибиције и да је више од 80% варијабилности тако исказаног антимикробног ефекта (зоне инхибиције) условљено променама у количини испитиваних активних принципа (**$r>0,9$; $p<0,001$; $r^2>0,8$; табела бр. 8**). Суштински слични резултати добијени су и када је у питању изражавање антимикробног дејства супстанце алицина путем пречника зоне инхибиције (**r>0,9; p<0,001; r^2>0,8; табела бр. 8**). Веродостојност ових резултата потврђује и анализа корелације ранга за повезаност логаритма количина воденог екстракта и површине, односно пречника зоне инхибиције (**ρ>0,9; p<0,001; табела бр. 8**) на што указују рангови који су приближно исти и позитивно корелисани. За бактеријску културу ***Pseudomonas aeruginosa* ATCC**. вредности **EQ$_{50}$** за супстанцу алицин износе **274,16 µg (табела бр. 11)** по диску прерачунато из графика log Q/% зоне инхибиције преко пречника инхибиторне зоне. Методом најмањих квадрата израчунато преко пречника зоне инхибиције према методологији описаној у раду Кронвала и осталих и по моделу који је описан претходно у раду, минимална инхибиторна концетрација за супстанцу алицин износи **11,87 µg/ml (табела бр. 12)** за бактеријски сој ***Pseudomonas aeruginosa* ATCC**. Добијени резултати пречника зоне инхибиције и минималне инхибиторне концетрације за супстанцу алицин су компаративни са подацима добијеним из других студија[27].

Код бактеријске културе ***Pseudomonas aeruginosa* ATCC** за супстанцу NAC, показано је да постоји статистички високо значајна директна позитивна веза између количине супстанце и површина зоне инхибиције и да је више од 80% варијабилности тако исказаног антимикробног ефекта (зоне инхибиције) условљено променама у количини испитиваних активних принципа (**r>0,9; p<0,001; r^2>0,8; табела бр. 8**). Суштински слични резултати добијени су и када је у питању изражавање антимикробног дејства NAC путем пречника зоне инхибиције (**r>0,9; p<0,001; r^2>0,8; табела бр. 8**). Веродостојност ових резултата потврђује и анализа корелације ранга за повезаност логаритма количина супстанце NAC, односно пречника зоне инхибиције (**ρ>0,9; p<0,001; табела бр. 8**) на што указују рангови који су приближно исти и позитивно корелисани. За бактеријску културу ***Pseudomonas aeruginosa* ATCC** вредности **EQ$_{50}$** за супстанцу NAC износе **1,42 mg (табела бр. 11)** по диску прерачунато из графика log Q/% зоне инхибиције преко пречника инхибиторне зоне. Методом најмањих квадрата израчунато преко пречника зоне инхибиције према методологији описаној у раду Кронвала и осталих по моделу који је описан претходно у раду минимална инхибиторна концетрација за супстанцу NAC износи **21,84 µg/ml (табела бр. 12)** за бактеријски сој ***Pseudomonas aeruginosa* ATCC**. Добијени резултати пречника зоне инхибиције и минималне инхибиторне концетрације за супстанцу NAC су компаративни са подацима добијеним из других студија[88].

Код бактеријске културе ***Staphylococcus aureus* ATCC 43300** за водени екстракт белог лука, показано је да постоји статистички високо значајна директна позитивна веза између количине екстракта и површина зоне инхибиције и да је више од 80% варијабилности тако исказаног антимикробног ефекта (зоне инхибиције) условљено променама у количини испитиваних активних принципа (**$r>0,9$; $p<0,001$; $r^2>0,8$; табела бр. 13**). Суштински слични резултати добијени су и када је у питању изражавање антимикробног дејства воденог екстракта путем пречника зоне инхибиције (**$r>0,9$; $p<0,001$; $r^2>0,8$; табела бр. 13**). Веродостојност ових резултата потврђује и анализа корелације ранга за повезаност логаритма количина воденог екстракта и површине, односно пречника зоне инхибиције (**$\rho>0,9$; $p<0,001$; табела бр. 13**) на што указују рангови који су приближно исти и позитивно корелисани. За бактеријску културу ***Staphylococcus aureus* ATCC 43300** вредности **EQ_{50}** за водени екстракт белог лука износе **1,06** mg **(табела бр. 17)** по диску прерачунато из графика log Q/% зоне инхибиције преко пречника инхибиторне зоне. Методом најмањих квадрата израчунато преко пречника зоне инхибиције према методологији описаној у раду Кронвала и осталих по моделу који је описан претходно у раду минимална инхибиторна концетрација за водени екстракт белог лука износи **156,33 μg/ml (табела бр. 18)** за бактеријски сој ***Staphylococcus aureus* ATCC 43300**. Добијени резултати пречника зоне инхибиције и минималне инхибиторне концетрације за водени екстракт белог лука су компаративни са подацима добијеним из других студија[89].

Код бактеријске културе ***Staphylococcus aureus* ATCC 43300** за супстанцу алицин, показано је да постоји статистички високо значајна директна позитивна веза између количине супстанце алицина и површина зоне инхибиције и да је више од 80% варијабилности тако исказаног антимикробног ефекта (зоне инхибиције) условљено променама у количини испитиваних активних принципа (**$r>0,9$; $p<0,001$; $r^2>0,8$; табела бр. 14**). Суштински слични резултати добијени су и када је у питању изражавање антимикробног дејства супстанце алицина путем пречника зоне инхибиције (**$r>0,9$; $p<0,001$; $r^2>0,8$; табела бр. 14**). Веродостојност ових резултата потврђује и анализа корелације ранга за повезаност логаритма количина воденог екстракта и површине, односно пречника зоне инхибиције (**$\rho>0,9$; $p<0,001$; табела бр. 14**) на што указују рангови који су приближно исти и позитивно корелисани. За бактеријску културу ***Staphylococcus aureus* ATCC 43300.** вредности **EQ_{50}** за супстанцу алицин износе **295,80 μg (табела бр. 17)** по диску прерачунато из графика log Q/% зоне инхибиције преко пречника инхибиторне зоне. Методом најмањих квадрата израчунато преко пречника зоне инхибиције према методологији описаној у раду Кронвала и осталих и по моделу који је описан претходно у раду, минимална инхибиторна концетрација за супстанцу алицин износи **1,57 µg/ml (табела бр. 18)** за бактеријски сој ***Staphylococcus aureus*** **ATCC 43300.** Добијени резултати пречника зоне инхибиције и минималне инхибиторне концетрације за супстанцу алицин су компаративни са подацима добијеним из других студија[27,89].

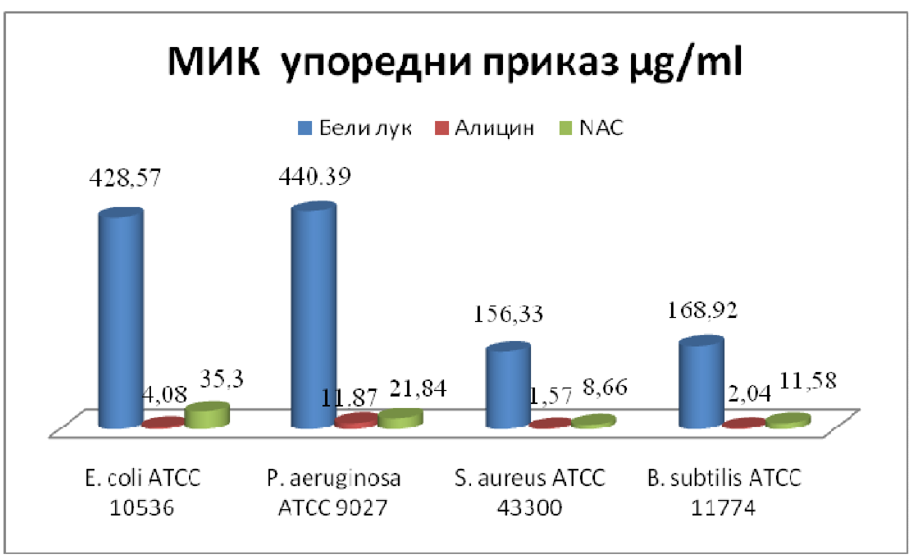
Код бактеријске културе ***Staphylococcus aureus*** **ATCC 43300** за супстанцу NAC, показано је да постоји статистички високо значајна директна позитивна веза између количине супстанце и површина зоне инхибиције и да је више од 80% варијабилности тако исказаног антимикробног ефекта (зоне инхибиције) условљено променама у количини испитиваних активних принципа (**$r>0,9$; $p<0,001$; $r^2>0,8$, табела бр. 15**). Суштински слични резултати добијени су и када је у питању изражавање антимикробног дејства воденог екстрата путем пречника зоне инхибиције (**$r>0,9$; $p<0,001$, $r^2>0,8$; табела бр. 15**). Веродостојност ових резултата потврђује и анализа корелације ранга за повезаност логаритма количина супстанце NAC, односно пречника зоне инхибиције (**$\rho>0,9$; $p<0,001$; табела бр. 15**) на што указују рангови који су приближно исти и позитивно корелисани. За бактеријску културу ***Staphylococcus aureus*** **ATCC 43300** вредности **EQ_{50}** за супстанцу NAC износе **1,51 mg (табела бр. 17)** по диску прерачунато из графика log Q/% зоне инхибиције преко пречника инхибиторне зоне. Методом најмањих квадрата израчунато преко пречника зоне инхибиције према методологији описаној у раду Кронвала и осталих по моделу који је описан претходно у раду минимална инхибиторна концетрација за супстанцу NAC износи **8,66 µg/ml (табела бр. 18)** за бактеријски сој ***Staphylococcus aureus*** **ATCC 43300.** Добијени резултати пречника зоне инхибиције и минималне инхибиторне концетрације за супстанцу NAC су компаративни са подацима добијеним из других студија[88].

Код бактеријске културе ***Bacillus subtilis*** **ATCC 11774** за водени екстракт белог лука, показано је да постоји статистички високо значајна директна позитивна веза између количине екстракта и површина зоне инхибиције и да је више од 80% варијабилности тако исказаног антимикробног ефекта (зоне инхибиције) условљено променама у количини испитиваних активних принципа (**$r>0,9$; $p<0,001$; $r^2>0,8$; табела бр. 19**). Суштински слични резултати добијени су и када је у питању изражавање антимикробног дејства воденог екстракта путем пречника зоне инхибиције (**$r>0,9$; $p<0,001$; $r^2>0,8$; табела бр. 19**). Веродостојност ових резултата потврђује и анализа корелације ранга за повезаност логаритма количина воденог екстракта и површине, односно пречника зоне инхибиције (**$\rho>0,9$; $p<0,001$; табела бр. 19**) на што указују рангови који су приближно исти и позитивно корелисани. За бактеријску културу ***Bacillus subtilis* ATCC 11774** вредности **EQ_{50}** за водени екстракт белог лука износе **1,06 (табела бр. 23)** mg по диску прерачунато из графика log Q/% зоне инхибиције преко пречника инхибиторне зоне. Методом најмањих квадрата израчунато преко пречника зоне инхибиције према методологији описаној у раду Кронвала и осталих по моделу који је описан претходно у раду минимална инхибиторна концетрација за водени екстракт белог лука износи **168,92 µg/ml (табела бр. 24)** за бактеријски сој ***Bacillus subtilis* ATCC 11774**. Добијени резултати пречника зоне инхибиције и минималне инхибиторне концетрације за водени екстракт белог лука су компаративни са подацима добијеним из других студија[89].

Код бактеријске културе ***Bacillus subtilis* ATCC 11774** за супстанцу алицин, показано је да постоји статистички високо значајна директна позитивна веза између количине супстанце алицина и површина зоне инхибиције и да је више од 80% варијабилности тако исказаног антимикробног ефекта (зоне инхибиције) условљено променама у количини испитиваних активних принципа (**$r>0,9$; $p<0,001$; $r^2>0,8$; табела бр. 20**). Суштински слични резултати добијени су и када је у питању изражавање антимикробног дејства супстанце алицина путем пречника зоне инхибиције (**$r>0,9$; $p<0,001$; $r^2>0,8$; табела бр. 20**). Веродостојност ових резултата потврђује и анализа корелације ранга за повезаност логаритма количина воденог екстракта и површине, односно пречника зоне инхибиције (**$\rho>0,9$; $p<0,001$; табела бр. 20**) на што указују рангови који су приближно исти и позитивно корелисани. За бактеријску културу ***Bacillus subtilis* ATCC 11774**. вредности **EQ_{50}** за супстанцу алицин износе **258,23 µg (табела бр. 23)** по диску прерачунато из графика log Q/% зоне инхибиције преко пречника инхибиторне зоне. Методом најмањих квадрата израчунато преко пречника зоне инхибиције према методологији описаној у раду Кронвала и осталих и по моделу који је описан претходно у раду, минимална инхибиторна концетрација за супстанцу алицин износи **2,04 µg/ml (табела бр. 24)** за бактеријски сој ***Bacillus subtilis* ATCC 11774**. Добијени резултати пречника зоне инхибиције и минималне инхибиторне концетрације за супстанцу алицин су компаративни са подацима добијеним из других студија[27].

Код бактеријске културе ***Bacillus subtilis* ATCC 11774** за супстанцу NAC, показано је да постоји статистички високо значајна директна позитивна веза између количине супстанце и површина зоне инхибиције и да је више од 80% варијабилности тако исказаног антимикробног ефекта (зоне инхибиције) условљено променама у количини испитиваних активних принципа (**$r>0,9$; $p<0,001$; $r^2>0,8$; табела бр. 21**). Суштински слични резултати добијени су и када је у питању изражавање антимикробног дејства NAC путем пречника зоне инхибиције (**$r>0,9$; $p<0,001$; $r^2>0,8$; табела бр. 21**). Веродостојност ових резултата потврђује и анализа корелације ранга за повезаност логаритма количина супстанце NAC, односно пречника зоне инхибиције (**$\rho>0,9$; $p<0,001$; табела бр. 21**) на што указују рангови који су приближно исти и позитивно корелисани. За бактеријску културу ***Bacillus subtilis* ATCC 11774** вредности **EQ_{50}** за супстанцу NAC износе **1,56 mg (табела бр. 23)** по диску прерачунато из графика log Q/% зоне инхибиције преко пречника инхибиторне зоне. Методом најмањих квадрата израчунато преко пречника зоне инхибиције према методологији описаној у раду Кронвала и осталих и по моделу који је описан претходно у раду минимална инхибиторна концетрација за супстанцу NAC износи **11,58 μg/ml (табела бр. 24)** за бактеријски сој ***Bacillus subtilis* ATCC 11774**. Добијени резултати пречника зоне инхибиције и минималне инхибиторне концетрације за супстанцу NAC су компаративни са подацима добијеним из других студија[88].

График 65. Упоредни приказ МИК за водени екстракт белог лука, алицин и NAC на бактеријским врстама *Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 и *Bacillus subtilis* ATCC 11774



6. ДИСКУСИЈА

Велики број студија је показао да биљка и екстракт белог лука спречавају раст и размножавање одређених сојева бактерија и да поседује јако антимикробно дејство. Данас се сматра се да су алицин и остала сумпорна једињења одговорна за ту врсту активности. Према већини аутора најважнији састојци белог лука, али и читавог рода *Alium* су органосумпорна једињења међу које спадају и испитивани деривати амино киселине цистеина[90]. Релативно мало података се може пронаћи претрагом литературе о антимикробној активности воденог екстракта белог лука који је добијен на претходно описан начин као и његовој минималној инхибиторној концентрацији[87,91,95].

Прецизније утврђивање антимикробне активности воденог екстракта белог лука и активних принципа који су одговорни за ту активност је био циљ нашег истраживања. тј, да ли и у ком обиму органосумпорни деривати утичу на раст бактеријских култура *Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 и *Bacillus subtilis* ATCC 11774. Такође је испитиван ефекат воденог екстракта белог лука са идентичним количинама по диску, док је ефекат алицина и контролног аминогликозидног антибиотика гентамицина одређиван за стандардне вредности које се користе у сличним студијама са увек идентичним запреминама и количином бактеријске суспензије од 100 μl која је засејавана на МХ агар подлогу бактеријске густине од око 5 Мек Фарланд јединица према одговарајућим нумеричким вредностима концетрације бактеријске суспензије и њихове оптичке густине на 550 nm односно у запремини коју смо апплицирали на површину Милер Хинтон агарне плоче бактериолошке концентрације од приближно $1{,}5 \cdot 10^7$ ћелија/ml. Веома је важно напоменути, да смо суспензију бактерија засејавали на *Miller Hinton* агару (чврста подлога), који је био већ разливен у Петри кутије**.** Инокулацију смо обавили на тај начин што смо разливали суспензије бактерија по површини агара. Значи да, суспензија бактерија није хомогено распоређена у подлози, већ да је култура равномерно распоређена по површини агара, где се и развијала. Поменуту бактериолошку концентрацију смо испитивали у студији јер код тешких облика различитих инфекција вредност може бити и већа.

Планирање и дизајнирање студије је било урађено тако да су од чистих супстанци чији се ефекат утврђивао одабрани за експеримент органосумпорни деривати цистеина који су конституенти белог лука[92,93,94]. Други услов који је поштован у дизајнирању студије је био да су одабране супстанце биле растворне у води. За испитиване деривате цистеина S-метил-L-цистеин, S-етил-L- цистеин, S-пропил-L-цистеин, γ-глутамил-L-цистеин и сам L-цистеин који су конституенти белог лука утврђено је да немају инхибиторни ефекат на испитиване бактеријске врсте што су показали прелиминарни и коначни резултати испитивања што је приказано у резултатима рада.

Водени екстракт белог лука, алицин и NAC су показали инхибиторни ефекат и на основу тих чињеница су рађена даља испитивања по математичком моделу који је описан у делу који описује методолошки аспект рада[85]. За водени екстракт белог лука и алицин се зна да поседују антимикробна својства и то потврђују релевантни подаци из студија о томе. Циљ рада је био прецизније одређивање обима и удела антимикробног дејства и других органосумпорних једињења деривата цистеина који су истовремено и конституенати белог лука као и њихово евентуално учешће у инхибиторној активности воденог екстракта белог лука.

На основу претходно изнетих чињеница спровели смо студију *in vitro* ради прецијнијег одређивања инхибиторног ефекта воденог екстракта белог лука и питање које је постављено је да ли водени екстракт белог лука, алицин и NAC, утичу на раст колонија грам-негативних бактерија: *Escherichia coli* ATCC 10536 и *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 и грам-позитивних: *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 и *Bacillus subtilis* ATCC 11774. Утврђено је постојање антибактеријског ефеката и у ком обиму и уделу, имају водени екстракт белог лука, алицин и N-ацетил-цистеин чија директна антимикробна својства нису до сада испитивана на овим стандардним сојевима. Вредности инхибиције за водени екстракт белог лука са ових простора и чистог алицина су донекле истраживане у радовима док вредности за N-ацетил-L-цистеин нам нису доступне и познате за директни инхибиторни односно антибактеријски ефекат. Потребно је такође напоменути да су за поменуте количине које су испољиле ефекат рађена додатна испитивања са еквимоларним количинама манитола и натријум хлорида да би се искључио евентуални хипотонични ефекат. Све количине супстанце које су испољиле ефекат нису биле хипотоничног карактера након тестирања у више понављања.

Упоређујући добијене вредности МИК алицина са МИК чисте супстанце NAC долазимо до сазнања о обиму антибактеријског дејства и других органосумпорних компонети које су присутне у воденом екстракту белог лука и конкретно за бактеријски сој ***Eserihia coli*** **ATCC 10536** он износи **11,56 %** што у поређењу са МИК алицина чији је антимикробни ефекат релативно познат закључујемо да поседује близу девет пута слабију инхибиторну активност и потенцијал у односу на главни активни принцип алицин који се налази у белом луку. За бактеријски сој ***Pseudomonas aeruginosa*** **ATCC** однос минималних инхибиторних вредности је износио **54,35 %** што у поређењу са МИК алицина износи да поседује близу два пута слабију инхибиторну активност у односу на алицин. За бактеријски сој ***Staphylococcus aureus*** **ATCC 43300** однос минималних инхибиторних вредности је износио **18,13 %** што у поређењу са МИК алицина износи да поседује близу пет пута слабију инхибиторну активност у односу на алицин. За бактеријски сој ***Bacillus subtilis*** **ATCC 11774** однос минималних инхибиторних вредности је износио **17,62 %** што у поређењу са МИК алицина износи да поседује близу шест пута слабију инхибиторну активност у односу на алицин.

N-ацетил-L-цистеин је ацетиловани прекусор амино киселина L-цистеина и редукованог глутатиона (GSH). Користи се као муколитик у терапији хроничних респираторних инфекција као и антидот код хепатотоксичног ефеката код прекорачења доза ацетоминофена и тровања карбон моноксидом. Студије су показале да је он јак антиоксиданс и да се може бити потенцијално терапеутско средство у лечењу канцера, болести срца, ХИВ инфекција, тровања тешким металима и осталим болестима које карактерише присуство слободних радикала односно нарушене оксидације. Такође, одређени ефекти су показани код инфлуенце, терапије престанка пушења, хепатитиса Ц и миоклонусне епилепсије[95].

У испитивању утицаја на микроорганизам *Staphylococcus epidermidis* која је чест узок болничких инфекција у студији *in vitro* испитиван је утицај антибиотика линезалида и NAC на инфекције које су изазване овом бактеријом и које се на самом месту инфекције налазе у облику биофилма. У третману заједно потврђено је синергистичко дејство док је највећи ефекат на испитиване микроорганизме показао NAC. Препорука аутора је да је ова комбинација потенцијални кандидат у лечењу поменутих инфекција[96]. Код особа са ослабљеним имунитетом бактерије *Enterococcus faecalis* у одређеним условима изазивају инфекције где се бактерије такође налазе у облику биофилма и планктона. Испитиван је антибактеријски утицај NAC и показано је да за вредности медијума где су се бактерије налазиле од pH 11 његова минимална концетрација износи 1,56 mg/ml за испитивану бактеријску врсту односно да делује бактерицидно на њу[97]. Бактерија *Pseudomonas aeruginosa* је чест патоген који се јавља код хроничних респираторних инфекција. Обично се јавља такође у облику биофилма што чини лечење ових инфекција компликовано. Испитиван је утицај NAC биофилм ових бактерија и добијене вредности за минималне инхибиторне концетрације су биле у опсегу од 10 до 40 mg/ml док је у комбинацији са антибиотиком показан синергистички ефекат код 50% изолата док код 50% није било синергије односно било какве интеракције. Такође је испитивано и анализирано присуство полисахарида у бактеријском биофилму. Добијени резултати указују на смањење од чак 27,46% и 44,59% са додатком 0,5 mg и 1 mg NAC. Наведене чињенице указују да NAC поседује антибактеријска својства и да може довести до нарушавања биофилма бактерија. Аутори студије[88] су дали препоруку да коришћење NAC у терапији инфекција изазваних бактеријом *Pseudomonas aeruginosa* може бити нова стратегија лечења али да је терапију за лечење потребно потврдити у клиничким студијама. У раду у коме је испитиван утицај антибиотика ципрофлоксацина и на бактеријске врсте *Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Escherichia coli, Klebseilla pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa* и *Proteus vulgaris* NAC појединачно и у комбинацији које су изоловане код пацијената који су добили инфекције приликом употребе катетера на уретралним стент површинама добијени су резултати који указују да највећи инхибиторни ефекат на биофилм бактерија од 86-100 % испољавају антибиотик и NAC заједно. Сам антибиотик испољава ефекат од 78% док вредности за инхибиторни ефекат NAC износе 62 %. Из резултата ове студије се може закључити да NAC појачава терапеутска својства ципрофлоксацина код инфекција које се јављају приликом употребе уретралних катетера[98] као и на одређене врсте бактеријских филмова са васкуларних катетера[99].

Антибактеријски ефекат NAC је испитиван у експериментима *In vivo* и клиничким студијама на бактеријске изолате хуманог и животињског порекла који углавном егзистирају у облику бактеријског биофилма.

Сепса је клинички синдром, и компликација тешких инфекција, а карактеришу је системско запаљење, обимно оштећење ткива и системски одговор организма на инфекцију. У експерименталном моделу сепсе у студији[100] показано је значајно веће преживљавање код мишева који су примали N-ацетил-L-цистеин у дози од 150 mg/kg у односу на контролну групу која није примала лек. Ови подаци упућују на могућности оправданости употребе NAC у третману и лечењу ове болести која је други узрок смртности у САД.

У клиничкој студији са 60 пацијента који су имали инфекцију желуца са бактеријом *Helicobacter pylori* а који су примали тројну терапију пентопразол, ципрофлоксацин и бизмут субцитрат показано је да NAC поседује адитиван ефекат на дејство антибиотика примењених у лечењу. Проценат излечења у експерименталној групи је био 70% док је у контролној био 60,7%[101]. У студији је наведено да није познат директни антибактеријски утицај NAC на поменуту бактерију али да се претпоставља да он може повећати пропустљивост антибиотика на месту инфекције и на тај начин повећати ефикасност терапије и да за прецизније одређивање ефекта био потребан већи узорак пацијената. Такође је испитиван ефекат NAC на бактерије *Helicobacter pylori* и *Helicobacter felis* код лабораторијских мишева код којих је индукован гастритис. Резултати осетљивости агар дилуциони и бујон тест указују да NAC инхибира раст биофилма поменутих бактеријских врста које су узроци инфекције[102].

У претходно наведеним студијама испитиван је утицај N-ацетил-L-цистеина. Могући механизам за описане ефекте NAC у овим истраживањима објашњени су утицајем на редукцију бактеријског биофилма кроз смањење стварања полисахаридног екстраћелиског матрикса и стимулацију разградње формираног биофилма бактерија где долази до интеракције тиолне SH групе са бактеријским полисахаридима који представљају заштитни слој заједно са протеинима који имају заштитну улогу од спољних утицаја и као такве могу да адхерирају на живу површину.

У нашој студији добијени резултати указују да потенцијални механизам дирекног антимикробног дејства испитиване супстанце NAC може бити објашњен такође дејством тиолне SH групе али са полисахаридима који се налазе као конституенси у ћелијском зиду грам позитивних бактерија *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 и *Bacillus subtilis* ATCC 11774. Повећање количина NAC по диску узрокује разградњу ћелијског зида бактерија декомпозицијом полисахарида што доводи до смрти ових организама у зони инхибиције чиме се може објаснити антимикробни ефекат ове супстанце на поменуте микроорганизме. Ћелијски зид грам негативних бактерије *Escherichia coli* ATCC 10536 и *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 садржи као градивну компоненту липополисахаридни слој који је део спољашне мембране која се састоји још и од липоида А и протеина. Патогена способност ове врсте бактерија је управо посебно везана за ову компонету ћелијског зида. Претпоставка за добијени антибактеријски ефекат код грам негативних бактерија би била да тиолна група реагује прво са липополисахаридним слојем па тек након тога са капсулним полисахаридима познатих као гликокаликс. Добијени резултати наше студије управо потврђују ову претпоставку где је минимална инхибиторна активност била знатно нижа од вредности добијених за грам негативне бактерије.

О осталим органосумпорним једињењима која су присутна у воденом екстракту белог лука а истовремено се сматрају конституентима белог лука нема пуно података.

Њихова појединачна својства, њихова потенцијална инхибиторна активност као и обим њиховог дејства на изабране сојеве бактеријских врста у нашој студији и њиховој евентуалној минималној инхибиторној концетрацији на одређене сојеве бактеријских врста нису у потпуности разјашњена. За боље разумевање ефеката које смо добили испитивањем воденог екстракта белог лука и његових активних конституенаса била би потребна додатна истраживања.

Најзначајни резултати ове студије огледају се у *in vitro* показаном директном антимикробном дејсту N-ацетил-L-цистеина, што уз раније описане ефекте на бактеријски биофилм потенцијално отвара нове клиничке перспективе када је у питању примена ове супстанце у лечењу различитих инфекција. Додатна испитивања су неопходна у циљу прецизног утврђивања механизма антибактеријског дејства и терапијских ефеката NAC у зависности од примењене дозе, начина примене лека и врсте бактеријске инфекције.

7. ЗАКЉУЧАК

У нашем истраживању, у којем је испитивано антибактеријско дејство воденог екстракта белог лука гајеног на подручју Шумадије, алицина и органосумпорних једињења растворних у води на грам-негативне бактерије: *Escherichia coli* ATCC 10536 и *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 и грам-позитивне бактерије: *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 и *Bacillus subtilis* ATCC 11774, дошли смо до следећих запажања:

- Испитивањем линеарне регресије између количина воденог екстракта белог лука и површине/пречника зоне инхибиције на тестираним бактеријским врстама, дошли смо до закључка да он инхибира раст микроорганизама *Eserihia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 и *Bacillus subtilis* ATCC 11774 *in vitro.*

- Поређењем резултата за минималне инхибиторне вредности МИК за водени екстракт белог лука долазимо до закључка да је његов антибактеријски ефекат био најачи на грам-позитивне бактерије *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (МИК = 156,33 μg/ml), нешто слабији на *Bacillus subtilis* ATCC 11774 (МИК = 168,92 μg/ml) док су резултати за грам-негативне бактерије били нешто већих вредности и то за *Eserihia coli* ATCC 10536 (МИК = 428,20 μg/ml), док је најслабији антимикробни ефекат испољио на *Pseudomonas aeruginosa* (МИК = 440,39 μg/ml).

- Испитивањем линеарне регресије између количина чисте супстанце алицина и површине/пречника зоне инхибиције на тестираним бактеријским врстама, дошли смо до закључка да он инхибира раст микроорганизама *Eserihia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 и *Bacillus subtilis* ATCC 11774 *in vitro*.

- Поређењем резултата за минималне инхибиторне вредности МИК за алицин долазимо до закључка да је његов антибактеријски ефекат био најачи на грам-позитивне бактерије *Staphylococcus aureus* ATCC 43300

(МИК = 1,57 µg/ml), нешто слабији на *Bacillus subtilis* ATCC 11774 (2,04 µg/ml) док су резултати за грам-негативне бактерије били нешто већих вредности и то за *Eserihia coli* ATCC 10536 (МИК = 4,08 µg/ml), док је најслабији антимикробни ефекат испољио на *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (МИК = 11,87 µg/ml).

- Испитивањем линеарне регресије између количина чисте супстанце N-ацетил-L-цистеина и површине/пречника зоне инхибиције на тестираним бактеријским врстама, дошли смо до закључка да он инхибира раст микроорганизама *Eserihia coli* ATCC 10536*, Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027*, Staphylococcus aureus* ATCC 43300 и *Bacillus subtilis* ATCC 11774 *in vitro.*

- Поређењем резултата за минималне инхибиторне вредности МИК за N-ацетил-L-цистеин долазимо до закључка да је његов антибактеријски ефекат био најачи на грам-позитивне бактерије *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (МИК = 8,66 µg/ml), нешто слабији на *Bacillus subtilis* ATCC 11774 (МИК = 11,58 µg/ml) док су резултати за грам-негативне бактерије били нешто већих вредности и то за *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (МИК = 21,84 µg/ml), док је најслабији антимикробни ефекат испољио на *Eserihia coli* ATCC 10536 (МИК = 35,30 µg/ml)

- S-метил-L-цистеин, S- етил-L-цистеин, S-пропил-L-цистеин, γ-Glu-L-цистеин и цистеин немају антибактеријски ефекат на микроорганизме *Eserihia coli* ATCC 10536*, Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027*, Staphylococcus aureus* ATCC 43300 и *Bacillus subtilis* ATCC 11774 *in vitro.*

- На основу добијених резултата, антибактеријски ефекат поред воденог екстракта белог лука и алицина чија су својства позната директни инибиторни ефекат на испитиване бактерије испољава и N-ацетил-L-цистеин, односно показано је да постоји између количине супстанце и површине/пречника зоне инхибиције линеарна повезаност код све четири испитиване бактеријске врсте што доводи до закључка да и он припада групи активних принципа који су присутни у белом луку односно да поседује дирекни антимикробни потенцијал на испитиване бактеријске врсте у студији.

- Добијени резултати могли би да допринесу бољем разумевању антимикробног дејства активних принципа белог лука. N-ацеил-L-цистеин је идентификован као конституенс белог лука који је одговоран за његову антибактеријску активност, што може бити основа за израду нових лековитих антимикробних препарата, као и за проширење индикација постојећих лекова. Нпр. N-ацеил-L-цистеин се сада већ користи као муколитик, а у овом раду је показано да његово антимикробно дејство може утицати на потенцијално корените промене у начину примене терапије код пацијената са респираторним инфекцијама, у циљу унапређења терапијске ефикасности и безбедности.

8. ЛИТЕРАТУРА

1. Lawson LD. Garlic: a review of its medicinal effects and indicated active compounds. In: Lawson LD, Bauer R, eds. Phytomedicines of Europe: Chemistry and Biological Activity. Washington DC: American Chemical Society; 1998. p.177-209.
2. Schulz V, Hänsel R, Tyler VE. Rational Phytotherapy. A Physician's Guide to Herbal Medicine, 4th ed. Berlin: Springer-Verlag; 2001.
3. Tyler VE. Herbal medicine: From the past to the future. Public Health Nutr 2000; 3: 447–2
4. Lukić P. Farmakognozija. Beograd: Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu; 1993.
5. Сарић М. Лековите биљке Србије. Београд: Српска академија наука и уметности; 1989.
6. Туцаков Ј. Лечење биљем. Београд: Рад; 2010.
7. Harvey A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. Drug Disc Today 2000; 5: 294-300.
8. Blumenthal M, Busse WR, Goldberg A, et al. The Complete German Commission E Monographs. Austin: American Botanical Council; 1999.
9. Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. J Nat Prod 2003; 66: 1022.
10. World Health Organization. Traditional medicine. World Health Organization Fact sheet 134. Geneva: World Health Organization; 2008. Доступно на: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/ (посећено 20.05.2013.)
11. Tatić B, Petković B. Morfologija biljaka. Beograd: Naučna knjiga; 1991.
12. Tatić B. Fam. Aliaceae J.G. Agargh 1858. U: Josipović M, ur. Flora SR Srbije VII. Beograd: SANU; 1975. str. 592.
13. Mcneill J, Barrie FR, Burdet HM, et al. International Code of Botanical Nomenclature (Vienna Code). Regnum Vegetabile 146. A.R.G. Gantner Verlag KG; 2006.
14. Rivlin RS. Historical perspective on the use of garlic. J Nutr 2001; 131(3s):951S-4S.
15. Wheelwright E.G. Medicinal Plants and Their History. New York: Dover Pub; 1997.
16. Kovačević N. Osnovi farmakognozije. Beograd: Srpska školska knjiga, NBS; 2002. str. 186-8.
17. Lanzotti, V. The analysis of onion and garlic. J Chromatogr A 2006; 1112:3-22.
18. Ayaz E, Alpsoy HC. Garlic (Allium sativum) and traditional medicine. Turkiye Parazitol Derg 2007; 31(2):145-9.

19. Goncagul G, Ayaz E. Antimicrobial effect of garlic (Allium sativum). Recent Pat Antiinfect Drug Discov 2010; 5(1):91-3.
20. Vulinović ZS. Bijeli luk, hrana i lijek. Beograd: Partenon; 2004.
21. Houshmand B, Mahjour F, Dianat O. Antibacterial effect of different concentrations of garlic (Allium sativum) extract on dental plaque bacteria. Indian J Dent Res 2013; 24(1):71-5.
22. Yin MC, Tsao SM. Inhibitory effect of seven Allium plants upon three Aspergillus species. Int J Food Microbiol 1999; 49:49-56
23. Whitmore BB, Naidu AS. Tiosulfinates. In: Naidu AS, ed. Natural Food Antimicrobial Systems. Boca Raton Florida: CRC Press; 2000. p. 265-380.
24. Benkeblia N. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (Allium cepa) and garlic (Allium sativum). LWT/Food Science and Technology 2004; 37:263-68.
25. Ariga T, Seki T. Antithrombotic and anticancer effects of garlic-derived sulfur compounds: a review. Biofactors 2006; 26(2):93-103.
26. Casella S, Leonardi M, Melai B, Fratini F, Pistelli L. The Role of Diallyl Sulfides and Dipropyl Sulfides in the In Vitro Antimicrobial Activity of the Essential Oil of Garlic, Allium sativum L, and Leek, Allium porrum L. Phytother Res 2013; 27:380–3.
27. Ankri S, Mirelman D. Antimicrobial properties of allicin from garlic. Microbes Infect 1999; 1(2):125-9.
28. Ross ZM, O'Gara EA, Hill DJ, Sleightholme HV, Maslin DJ. Antimicrobial properties of garlic oil against human enteric bacteria: evaluation of methodologies and comparisons with garlic oil sulfides and garlic powder. Appl Environ Microbiol 2001; 67(1):475-80.
29. Amagase H, Petesch BL, Matsuura H, Kasuga S, Itakura Y. Intake of garlic and its bioactive components. J Nutr 2001; 131(3s):955S-62S.
30. Edwards QT, Colquist S, Maradiegue A. What's cooking with garlic: is this complementary and alternative medicine for hypertension? J Am Acad Nurse Pract 2005; 17(9):381-5.
31. Ruddock PS, Liao M, Foster BC, Lawson L, Arnason JT, Dillon JA. Garlic natural health products exhibit variable constituent levels and antimicrobial activity against Neisseria gonorrhoeae, Staphylococcus aureus and Enterococcus faecalis. Phytother Res 2005; 19(4):327-34.

32. Borrego S, Valdés O, Vivar I, et al. Essential Oils of Plants as Biocides against Microorganisms Isolated from Cuban and Argentine Documentary Heritage. ISRN Microbiol 2012; 2012:826786.
33. Cavallito CJ, Bailey JH. Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum.* I. Isolation, physical properties and antimicrobial action. J Amer Chem Soc 1944; 66: 1950-1.
34. Јанковић С, ур. Фармакологија и токсикологија. Крагујевац: Медицински факултет; 2011.
35. Sobenin IA, Andrianova IV, Fomchenkov IV, Gorchakova TV, Orekhov AN. Time-released garlic powder tablets lower systolic and diastolic blood pressure in men with mild and moderate arterial hypertension. Hypertens Res 2009; 32(6):433-7.
36. Rahman K. Historical perspective on garlic and cardiovascular disease. J Nutr 2001; 131:977S–9S.
37. Kuda T, Iwai A, Yano T. Effect of red pepper Capsicum annuum var. conoides and garlic Allium sativum on plasma lipid levels and cecal microflora in mice fed beef tallow. Food Chem Toxicol 2004; 42(10):1695-1700.
38. Sobenin IA, Nedosugova LV, Filatova LV, Balabolkin MI, Gorchakova TV, Orekhov AN. Metabolic effects of time-released garlic powder tablets in type 2 diabetes mellitus: the results of double-blinded placebo-controlled study. Acta Diabetol 2008; 45(1):1-6.
39. Sheela CG, Kumud K, Augusti KT. Anti-diabetic effects of onion and garlic sulfoxide amino acids in rats. Planta Med 1995; 61(4):356-7.
40. Augusti KT. Therapeutic values of onion (Allium cepa L.) and garlic (Allium sativum L.). Indian J Exp Biol 1996; 34(7):634-40.
41. Yamada K, Naemura A, Sawashita N, Noguchi Y, Yamamoto J. An onion variety has natural antithrombotic effect as assessed by thrombosis/thrombolysis models in rodents. Thromb Res 2004; 114(3):213-20.
42. Steiner M, Li W. Aged garlic extract, a modulator of cardiovascular risk factors: a dose-finding study on the effects of AGE on platelet functions. J Nutr 2001; 131(3s): 980S-4S.
43. Yang CS**,** Chhabra SK**,** Hong JY**,** Smith TJ. Mechanisms of inhibition of chemical toxicity and carcinogenesis by diallyl sulfide (DAS) and related compounds from garlic. J Nutr 2001; 131(3s):1041S-5S.
44. Thomson M, Ali M. Garlic [Allium sativum]: a review of its potential use as an anti-cancer agent. Curr Cancer Drug Targets 2003; 3(1):67-81.

45. Clement F, Pramod SN, Venkatesh YP. Identity of the immunomodulatory proteins from garlic (Allium sativum) with the major garlic lectins or agglutinins. Int Immunopharmacol 2010; 10(3):316-24.
46. Ishikawa H, Saeki T, Otani T, Suzuki T, Shimozuma K, Nishino H, et al. Aged garlic extract prevents a decline of NK cell number and activity in patients with advanced cancer. J Nutr 2006; 136:816S-20
47. Youn HS, Lim HJ, Lee HJ, et al. Garlic (Allium sativum) extract inhibits lipopolysaccharide-induced Toll-like receptor 4 dimerization. Biosci Biotechnol Biochem 2008; 72:368-75.
48. Lau BHS., Yamasaki T, Gridley DS. Garlic compounds modulate macrophage and T-lymphocyte functions. Mol Biother 1991; 3:103-7.
49. Lamm DL, Riggs DR. Enhanced immunocompetence by garlic: role in bladder cancer and other malignancies. J Nutr 2001; 131(3s):1067S-70S.
50. Singh SP, Abraham SK, Kesavan PC. In vivo radioprotection with garlic extract. Mutat Res 1995; 345(3-4): 147-53.
51. Borek C. Antioxidant health effects of aged garlic extract. J Nutr 2001; 131(3s):1010S-5S.
52. Nuutila AM. Puuponen-Pimiä T, Aarni M, Oksman-Caldentey KM. Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity. Food Chem 2003; 81: 485-93.
53. Saravanan G, Prakash J. Effect of garlic (Allium sativum) on lipid peroxidation in experimental myocardial infarction in rats. J Ethnopharmacol 2004; 94(1): 155-8.
54. Bozin B, Mimica-Dukic N, Samojlik I, Goran A, Igic R. Phenolics as antioxidants in garlic (Allium sativum L., Alliaceae). Food Chem 2008; 111: 925–9.
55. Moriguchi T, Saito H, Nishiyama N. Anti-aging effect of aged garlic extract in the inbred brain atrophy mouse model. Clin Exp Pharmacol Physiol 1997; 24:235-4.
56. Nishiyama N, Moriguchi T, Saito H. Beneficial effects of aged garlic extract on learning and memory impairment in the senescence-accelerated mouse. Exp Gerontol 1997; 32(1-2):149-60.
57. Brude IR, Drevon CA, Hjermann I, et al. Peroxidation of LDL from combined-hyperlipidemic male smokers supplied with omega-3 fatty acids and antioxidants. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997; 17(11):2576-88.
58. Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. Organosulfur compounds from alliaceae in the prevention of human pathologies. Biomed Pharmacother 2004; 58(3):183-93.

59. Yamada M, Yasuhara H. Clinical pharmacology of MAO inhibitors: safety and future. Neurotoxicology 2004; 25(1-2): 215-21.
60. Jugoslovenska farmakopeja, 5. izd, 2. knjiga. Beograd: Savezni zavod za zaštitu i unapređenje zdravlja 2000; 479.
61. World Health Organization. Monographs on Selected Medicinal Plants - Volume 1. Geneva: World Health Organization; 1999.
62. US Pharmacopeia (USP), 23 - National Formulary 18, 10th Supplement. Garlic and Powdered Garlic 1999; 5079-5081.
63. European Pharmacopeia, 4th ed. Council of Europe: Strasbourg Cedex, France 2002; 2.8.12:183-4.
64. Stabler SN, Tejani AM, Huynh F, Fowkes C. Garlic for the prevention of cardiovascular morbidity and mortality in hypertensive patients. Cochrane Database Syst Rev 2012; 8:CD007653.
65. Qidwai W, Ashfaq T. Role of garlic usage in cardiovascular disease prevention: an evidence-based approach. Evid Based Complement Alternat Med 2013; 2013:125649.
66. Agarwal KC. Therapeutic actions of garlic constituents. Med Res Rev 1996; 16:111–24.
67. Gorunović M, Lukić P. Farmakognozija. Beograd: Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet; 2001.
68. Ebadi M. Pharmacodynamic Basis of Herbal Medicine. Boca Raton: CRC Press; 2002.
69. Piscitelli SC, Burstein AH, Welden N, Gallicano KD, Falloon J. The effect of garlic supplements on the pharmacokinetics of saquinavir. Clin Infect Dis 2002; 34(2):234-8.
70. Williamson, E.M. Interactions between herbal and conventional medicines. Expert Opinion on Drug Safety 2005; 4 (2): 355-78.
71. Chavez ML, Jordan MA, Chavez PI. Evidence-based drug--herbal interactions. Life Sci 2006; 78(18): 2146-57.
72. Borrelli F, Capasso R, Izzo AA. Garlic (Allium sativum L.): adverse effects and drug interactions in humans. Mol Nutr Food Res 2007; 51(11):1386-97.
73. Berginc K, Kristl A. The mechanisms responsible for garlic - drug interactions and their in vivo relevance. Curr Drug Metab 2013; 14(1):90-101.
74. Gonthier MP, Verny MA, Besson C, Rémésy C, Scalbert A. Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats. J Nutr 2003; 133(6): 1853-9.

75. Willits MG, Giovanni M, Prata RT, et al. Bio-fermentation of modified flavonoids: an example of in vivo diversification of secondary metabolites. Phytochemistry 2004; 65(1):31-41.
76. Stearn WT. European species of Allium and allied genera of Alliaceae: a synonimic enumeration. Ann Mus Goulandris 1978; 4:83-198.
77. Mathew B. A review of Allium sect. Kew, UK : Allium Royal Botanic Gardens; 1996.
78. Gregory M, Fritsch RM, Friesen NW, Khassanov FO, McNeal DW. Nomenclator Alliorum names and synonyms-a world guide. Kew, UK: Royal Botanic Gardens; 1998.
79. Швабић Влаховић М, ур. Медицинска бактериологија. Београд: Савремена администрација; 2005.
80. Andrews J. BSAC standardized disc susceptibility testing method. Antimicrob Chemother 2005; 56:60-76.
81. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol 1966; 45:493-6.
82. Jorgensen JH, Turnidge JD. Susceptibility test methods: dilution and disc diffusion methods. In: Murray PR, Baron E J, Jorgensen JH, Pfaller MA, Yolken RH, eds. Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. Washington DC: ASM Press; 2003. p. 1119-25.
83. Novaković M, Janković S. Metodologija određivanja antibakterijske aktivnosti biljnih ekstrakata disk-difuzionom metodom in vitro. Racionalna terapija 2011; 3(2):33-7.
84. Cooper KE. The theory of antibiotic inhibition zones. In: Kavanagh F, ed. Analytical microbiology. New York: Academic Press, Inc; 1963. p. 1-86.
85. Kronvall G. Analysis of a single reference strain for determination of gentamicin regression line constants and inhibition zone diameter breakpoints in quality control of disk diffusion antibiotic susceptibility testing. J Clin Microbiol 1982; 16 (5):784-93.
86. Hulley SB, Cummings SR, Browner WS, et al., eds. Designing Clinical Research, 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
87. Gull I, Saeed M, Shaukat H, Aslam S, Samra ZQ, Athar AM. Inhibitory effect of Allium sativum and Zingiber officinale extracts on clinically important drug resistant pathogenic bacteria. Ann Clin Microbiol and Antimicrob 2012; 11:8.
88. Zhao T, Youning L. N-acetylcysteine inhibit biofilms produced by Pseudomonas aeruginosa. BMC Microbiol 2010; 10:140.

89. Woods-Panzaru S, Nelson D, McCollum G, et al. An examination of antibacterial and antifungal properties of constituents described in traditional Ulster cures and remedies. Ulster Med J 2009; 78(1):13-15.
90. Lu X, Rasco BA, Jabal JMF, Aston DE, Lin M, Konkel ME. Investigating Antibacterial Effects of Garlic (Allium sativum) Concentrate and Garlic-Derived Organosulfur Compounds on Campylobacter jejuni by Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy, Raman Spectroscopy, and Electron Microscopy. Appl Environ Microbiol 2011;77(15): 5257-69.
91. Rahman S, Parvez AK, Islam R, Khan MH. Antibacterial activity of natural spices on multiple drug resistant Escherichia coli isolated from drinking water, Bangladesh. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2011; 10:10.
92. Nishikawa-Ogawa M, Wanibuchi H, Morimura K, et al. N-acetylcysteine and S-methylcysteine inhibit MeIQx rat hepatocarcinogenesis in the post-initiation stage. Carcinogenesis 2006; 27:982-8.
93. Ou CC, Tsao SM, Lin MC, Yin MC. Protective action on human LDL against oxidation and glycation by four organosulfur compounds derived from garlic. Lipids 2003; 38(3):219-24.
94. Yin MC, Cheng WS. Antioxidant and antimicrobial effects of four garlic-derived organosulfur compounds in ground beef. Meat Sci 2003; 63(1):23-8.
95. Monograph N-acethylcisteine. Alternative Medicine Review 2000; 5(5): 467-71.
96. Leite B, Gomes F, Teixeira P, Souza C, Pizzolitto E, Oliveira R. Combined effect of linezolid and N-acetylcysteine against Staphylococcus epidermidis biofilms. Enferm Infecc Microbiol Cli. 2013 Apr 30. doi:pii: S0213-005X(12)00433-8. 10.1016/j.eimc.2012.11.011. [Epub ahead of print]
97. Quah SY, Wu S, Lui JN, Sum CP, Tan KS. N-acetylcysteine inhibits growth and eradicates biofilm of Enterococcus faecalis. J Endod 2012; 38(1):81-5.
98. El-Feky MA, El-Rehewy MS, Hassan MA, Abolella HA, Abd El-Baky RM, Gad GF. Effect of ciprofloxacin and N-acetylcysteine on bacterial adherence and biofilm formation on ureteral stent surfaces. Pol J Microbiol 2009; 58(3):261-7.
99. Aslam S, Trautner BW, Ramanathan V. Darouiche R. Combination of tigecycline and N-acetylcysteine reduces biofilm-embedded bacteria on vascular catheters. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51:1556-8.
100. de Mello RO, Lunardelli A, Caberlon E, et al. Effect of N-acetylcysteine and fructose-1,6-bisphosphate in the treatment of experimental sepsis. Inflammation 2011; 34(6):539-50.

101. Karbasi A, Hossein Hosseini S, Shohrati M, Amini M, Najafian B. Effect of oral N-acetyl cysteine on eradication of Helicobacter pylori in patients with dyspepsia. Minerva Gastroenterol Dietol 2013;59(1): 107-12.

102. Huynh HQ, Couper RT, Tran CD, Moore L, Kelso R, Butler RN. N-acetylcysteine, a novel treatment for Helicobacter pylori infection. Dig Dis Sci 2004; 49(11-12):1853-61.

ПРИЛОЗИ

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ

Редни број: **РБ**	
Идентификациони број: **ИБР**	
Тип документације **ТД**	Монографска публикација
Тип записа: **ТЗ**	Текстуални штампани материјал
Врста рада: **ВР**	Докторска дисертација
Аутор: **АУ**	Милан Љ. Новаковић
Ментор/коментор: **МН**	Проф. др Слободан Јанковић
Наслов рада: **НР**	Анализа антимикробне активности екстракта белог лука (*Allium sativum L.)*
Језик публикације: **ЈП**	Српски
Језик извода: **ЈИ**	Српски / Енглески
Земља публиковања: **ЗП**	Србија
Уже географско подручје: **УГП**	Крагујевац, Шумадија
Година: **ГО**	2013.

Издавач: **ИЗ**	Ауторски репринт
Место и адреса: **МС**	34000 Крагујевац, Светозара Марковића 69
Физичи опис рада: **ФО**	Дисертација садржи 109 страна, 8 поглавља, 24 табеле, 65 графикона, 7 слика и 102 цитата
Научна област:	Медицина
Научна дисциплина: **ДИ**	Експериментална и клиничка фармакологија
Предметна одредница/ кључне речи **ПО**	Водени екстракт белог лука, сумпорне компоненте, N-ацетил-L-цистеин, антибактеријска активност, грам негативне/ позитивне бактерије
УДК	
Чува се: **ЧУ**	У библиотеци Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
Важна напомена: **МН**	
Извод: **ИД**	Употреба биљака у лечењу и исхрани стара је колико и сама историја људског рода. Вештина лечењем биљем развијала се код свих народа света и сачувала се мање или више све до данашњих дана уз тендецију пораста примене фитотерапије у економски развијеним земљама последњих година. Научни интерес за лековитост белог лука почиње у другој половини XIX века када је Луј Пастер утврдио да ова биљка спречава раст и размножавање одређених сојева бактеријсих врста и од тада је предмет сталних научних истраживања. У овом раду испитивана је антимикробна активност воденог екстракта белог лука гајеног са подручја Шумадије, главног активног принципа алицина као и неких органосумпорних једињења конституенаса биљке *Alium Sativum L.*, растворних у води деривата цистеина, на грам-негативне бактерије *Eserihia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 и грам-позитивне бактерије *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Bacillus subtilis* ATCC 11774. Мерења и квантификовање антимикробног дејства су била одређена коришћењем површинског диск дифузионог метода на *Mueller Hinton* агарној подлози уз примену апликативног софтвера *Motic images plus* 2.0 ML на чистим бактеријским културама и референтном супстанцом антибиотиком гентамицином коришћеног у свим експериментима као контрола. Очекивану антимикробну активност је испољио екстракт белог лука и најачи активни принцип алицин, али је

истовремено и конституенс N-ацетил-L-цистеин такође испољио ефекат на све у раду испитиване бактеријске сојеве. N-ацетил-L-цистеин је већи антимикробни ефекат показао на испитиване грам-позитивне него на грам-негативне бактеријске врсте. Претпоставка за добијени антимикробни ефекат код грам негативних бактерија би била да тиолна група реагује прво са липополисахаридним слојем па тек након тога са капсулним полисахаридима познатих као гликокаликс, односно да разлике у структури ћелијског зида директно утичу на добијене вредности зоне инхибиције. Добијени резултати наше студије управо би могли да потврде ову прет-поставку где је минимална инхибиторна активност била знатно нижа од вредности добијених за грам-негативне бактерије. Одређивање пречника зоне инхибиције, минималне инхибиторне концетрације, прецизније одређивање антибактеријског ефекта екстракта белог лука као и непосредно утврђивање да и конституенс N-ацетил-L-цистеин припада групи активних принципа који су присутни у белом луку би могли да допринесу знатно бољем разумевању обима антимикробног дејства белог лука. Чињеница да поред алицина и N-ацетил-L-цистеин поседује дирекни антимикробни потенцијал на испитиване бактеријске врсте у студији би могла бити основ за израду нових лековитих антимикробних препарата као и за проширење индикација постојећих лекова. Познато је да се N-ацетил-L-цистеин сада већ користи као муколитик, а у овом раду је показано да његово директно антимикробно дејство може утицати на потенцијално корените промене у начину примене терапије код пацијената са респираторним инфекцијама, у циљу унапређења терапијске ефикасности и безбедности.

Датум прихватања теме од стране ННВ: 17.11.2011. године
ДП

Датум одбране:
ДО

Чланови комисије: Доц. др Јасмина Миловановић, председник
КО Факултет медицинских наука у Крагујевцу

Проф. др Дејан Баскић, члан
Факултет медицинских наука у Крагујевцу

Доц. др Радмила Величковић Радовановић, члан
Медицински факултет у Нишу

KEY WORDS DOCUMENTATION

UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICINE KRAGUJEVAC

Accession number: **ANO**	
Identification number: **INO**	
Documentation type: **DT**	Monographic publication
Type of record: **TR**	Textual material, printed
Contents code: **CC**	Ph.D. Thesis
Author: **AU**	Milan Lj. Novaković
Menthor/co-mentor **MN**	Prof. dr Slobodan Janković
Title: **TI**	Analysis and antimicrobial activity of garlic extract (*Allium sativum L.)*
Language of text: **LT**	Serbian
Language of abstract:	Serbian / English
Country of publication: **CP**	
Locality of publication: **LP**	Kragujevac
Publication year: **PY**	2013.
Publisher: **PU**	Author reprint
Publication place: **PP**	34000 Kragujevac, Svetozara Markovića 69

Physical description: Thesis contains 109 pages, 8 chapters, 65 graphs,
PD 24 tables and 102 literature references

Scientific field: Medicine
SF

Scientific discipline: Experimental and clinical pharmacology
SD

Subject/key words: water garlic extract, sulfur compounds,
SKW N-acetyl-L-cysteine, antibacterial activity,
gram negative/positive bacteria

UDC

Holding data: Library of Faculty of Medical Science,
University of Kragujevac, Serbia

Note:
N

Abstract:
AB

The use of plants in medical treatment and nutrition is as old as human history itself. The skills for treatment using plants have been developed in all nations of the world and have been maintained more or less up to the present day. Developed countries show the tendency to increase use of phototherapy in recent years. Scientific interest in the curative properties of garlic begins in the second half of the nineteenth century, when Louis Pasteur found out that this herb inhibits the growth and reproduction of certain strains of bacteria. The garlic has been subject to ongoing scientific research since then. This study examined the antimicrobial activity of aqueous extract of garlic cultivated in Šumadija region and its main active principle of allicin and some organosulfur compound constituents of plants *Alium sativum L.*, soluble in water derivatives of cysteine on gram- negative bacteria Eserihia coli ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 and gram- positive bacteria Staphylococcus aureus ATCC 43300, *Bacillus subtilis* ATCC 11774. Measurement and quantification of antimicrobial activity were determined using surface disk diffusion method on Mueller Hinton agar substrate with the use of Motic Images Plus 2.0 ML software on pure bacterial cultures. The

antibiotic gentamicin is reference substance and is used in all experiments as a control. The garlic extract and its strongest active constituent of allicin has showed the expected antimicrobial activity, but also the constituent N-acetyl-L-cysteine has showed the effect on all bacterial strains used for this study. N-acetyl-L-cysteine demonstrated greater antimicrobial effect on gram-positive bacteria tested than gram- negative bacteria. The presumption of resulting antimicrobial effect of gram negative bacteria would be that the thiol group reacts first with lipopolysaccharide layer and only then with the capsule polysaccharides known as glycocalyx and differences in the structure of the cell wall directly affect the resulting value of the inhibition zone. The results of our study would be able to confirm this hypothesis where the minimum inhibitory activity was significantly lower than the values obtained for gram-negative bacteria. Determining the diameter of the inhibition zone, minimum inhibitory concentration, or more precisely determine the antibacterial effect of garlic extract and the identification and assessment of the N-acetyl-L cysteine as a group of active substances which are present in garlic could contribute significantly to a better understanding of the scope of antimicrobial activity of garlic. The fact that N-acetyl-cysteine beside allicin has direct antimicrobial potential on bacterial species examined in the study could be the basis for the development of new therapeutic antimicrobial agents. This also can be used to expand the indications of existing drugs. It is known that N-acetyl-L-cysteine is now used as mucolytic. This work shows that its direct antimicrobial activity may potentially cause the fundamental changes in therapy with respiratory infections patients, to improve therapeutic efficacy and security.

Accepted by the Scientic Board on: 17.11.2011.
ASB

Defended on:
DE

Thesis defended board
(Degree/name/surname/title/faculty)

DB

Doc. dr Jasmina Milovanovic - Chairmen,
Faculty of medical science in Kragujevac

Prof. dr Dejan Baskić – Member,
Faculty of medical science in Kragujevac

Doc. dr Radmila Veličković Radovanović - **Member**
Medical Faculty in Niš

Биографски подаци аутора

Милан Новаковић, специјалиста хемије, смер биохемија, рођен је 9.3.1972. године у Крагујевцу. Основну школу Радоје Домановић и Прву крагујевачку гимназију завршио је у Крагујевцу.

Природно математички факултет, одсек хемија, Универзитета у Крагујевцу завршио је 2004. године. По дипломирању, уписује академску специјализацију на одсеку хемија коју успешно завршава са темом "Испитивање антрахинона у лишају врсте *Caloplaca lactea*" 2005. године и тиме стиче звање специјалисте хемијских наука - смер биохемија. Исте године уписује магистарске студије на катедри биохемија на ПМФ-у и са успехом завршава прву годину магистарских студија. Након тога, школске 2006/2007 уписује докторске академске студије Факултету медицинских наука. Студент је постдипломских Докторских академских студија на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, изборно подручје Клиничка и експериментална фармакологија, положио је све испите предвиђене програмом а 13. јуна 2011. године положио је и Усмени докторантски испит са оцемом 9. Докторску дисертацију под насловом "Анализа антимикробне активности екстракта белог лука (*Allium sativum L.*)" пријавио је 17.11.2011. године.

Од 2007. до данас ради на месту вишег лабораторијског сарадника на Факултету медицинских наука у Крагујевцу. Као један од истраживача у оквиру *ФП7* пројекта Европске Уније, од 1. фебруара до 1. марта 2010. године боравио је на Универзитету Аристотел у Солуну, Медицински факултет - Институт за Фармакологију успешно похађајући тренинг у оквиру пројекта "Предклиничка фармаколошка тестирањима активних супстанци" под руководством проф. др Димитроса Коувеласа. Учесник је на два Темпус пројекта ("Postgraduation Qualification in Pharmacy: The Way Forward" и "Strenghtening Quality Assurance System within Western Balkans HEIs in Support of National and Regional Planning"), једног међународног ("Indigenous Traditional Plants for Preparing Added Value New Products With Different Applications") као и Јуниор пројекта бр. 10/10 на Факултету медицинских наука у Крагујевцу. Члан је Медицинског друштва за рационалну терапију Републике Србије (Медрат). Технички је уредник националног часописа "Рационална терапија".

Влада енглеским језиком, а поседује и специфична знања из различитих области рада на персоналним рачунарима.

Има објављена 3 рада на међународним конгресима (штампани у изводу), 3 рада на међународним конференцијама, 3 рада објављена на домаћим саветовањима и конференцијама (штампани у изводу), 2 рада штампана у целини у националним часописима и 5 радова штампана у целини у часописима од међународног значаја [SCI (SSCI) листа].

Милан Новаковић живи у Крагујевцу, ожењен је и отац је једног детета.

Списак објављених радова

1. Jeremić MŽ, Matović MD, Janković SM, Milošev MZ, **Novaković M**, Spasojević-Tišma VD, Urošević VD. Comparison of three methods used for measurement of radioiodine fixation in thyroid gland of micE. Nucl Technol Radiat 2013, 28(2), 225-31.

2. Milošev M, **Novaković M**. Mobile phone radiation simulator could be used for testing effects of microwaves on biological systems. Serbian Journal of Experimental and Clinical Research 2012, 13(1), 31-2.

3. **Новаковић М**, Слободан Јанковић. Методологија одређивања антибактеријске активности биљних екстраката диск дифузионом методом. Рационална терапија 2011; 3(2): 33-7.

4. Matovic M, Jankovic S, Jeremic M, **Novakovic M**, Milosev M, Vlajkovic M. Effect of furosemide on radioiodine-131 retention in mice thyroid gland. Hell J Nucl Med 2009; 12(2):129-31.

5. Jankovic SM, Jankovic SV, Stojadinovic D, Stojadinovic M, Kostovic V, **Novakovic M**, Markovic V. Effects of exogenous glutamate and kainate on electric field-stimulated contractions of isolated human ureter. Urology 2009; 73(5):1136-9.

6. Bugarcić ZD, Petrović B, Bugarcić ZM, Janković SM, Janković SV, Lukić G, **Novaković M**, Kostović V, Popović S, Djurdjević P, Baskić D. and Arsenijević N. Effects of cisplatin and other Pt(II) complexes on spontaneous motility of isolated human oviduct. Toxicol In Vitro 2008; 22(8): 1878-82.

7. Manojlovic N, **Novaković M**, Stevović V. and Solujić S. Antimicrobial activity of three Serbian Caloplaca. Pharmaceutical Biology 2005; 43 (8): 1-5.

Author's curriculum vitae

Milan Novakovic, a specialist in chemistry, major in biochemistry, was born on March the 9th 1972 in Kragujevac. He attended the elementary school Radoje Domanovic and The First high school of Kragujevac in Kragujevac. He completed his studies on Faculty of Science, Department of Chemistry, University in Kragujevac in 2004. After graduation, he enrolled in an the academic specialization in chemistry department which he successfully completed with the study "Testing of anthraquinones in the lichen species *Caloplaca lactea*" in 2005. He became a specialist of chemical Sciences - Biochemistry. That same year he enrolled graduate studies in the Department of Biochemistry at the Faculty of Science. He successfully ends the first year of master's studies. In 2006/2007 school year he started with doctoral studies on Faculty of Medical Science. He is the student of postgraduate doctoral studies at the Faculty of Medical Science, University of Kragujevac, Clinical and Experimental Pharmacology, where has passed all the exams according to the program on June the 13th 2011. He passed the doctoral oral exam with the grade 9. Ph.D. thesis entitled "Analysis of the antimicrobial activity of garlic extract (*Allium sativum L.*)" is reported on November the 17th 2011.

Since 2007, he has been working as senior laboratory associate at the Faculty of Medical Science in Kragujevac. As one of the researchers in the FP7 program of the European Union, he successfully attended the training as part of the "pre-clinical pharmacological testing of active substances" under the guidance of prof. Dr. Dimitrios Kouvelas in Aristotle University of Thessaloniki , School of Medicine - Department of Pharmacology " from February the 1st to March the 1st 2010. He participated in two Tempus projects ("Postgraduation Qualification in Pharmacy: The Way Forward" and "Strengthening Quality Assurance System within Western Balkans Heis in Support of National and Regional Planning"), an international ("Traditional Indigenous Plants for Preparing New Products Added Value with Different Applications") as well as Junior project no. 10/10 at the Faculty of Medical Science in Kragujevac.

He is the member of the Medical Society of rational therapy of Serbia (Medrat). He is technical editor of the national journal "Rational therapy".

Milan is fluent in English, and has specific expertise in various fields of work on personal computers.

He has published 3 papers in international congresses (published as an abstract), 3 papers at international conferences, 3 papers at national conferences and symposia (published as an abstract) , 2 papers published in its entirety in national magazines and 5 papers printed in the journals of international importance [SCI (SSCI) list] .

Milan Novakovic lives in Kragujevac, is married and has one son.

List of publications (both international and national)

1. Jeremić MŽ, Matović MD, Janković SM, Milošev MZ, **Novaković M**, Spasojević-Tišma VD, Urošević VD. Comparison of three methods used for measurement of radioiodine fixation in thyroid gland of mice. Nucl Technol Radiat 2013, 28(2), 225-31.

2. Milošev M, **Novaković M**. Mobile phone radiation simulator could be used for testing effects of microwaves on biological systems. Serbian Journal of Experimental and Clinical Research 2012, 13(1), 31-2.

3. **Новаковић М**, Слободан Јанковић. Методологија одређивања антибактеријске активности биљних екстраката диск дифузионом методом. Рационална терапија 2011; 3(2): 33-7.

4. Matovic M, Jankovic S, Jeremic M, **Novakovic M**, Milosev M, Vlajkovic M. Effect of furosemide on radioiodine-131 retention in mice thyroid gland. Hell J Nucl Med 2009; 12(2):129-31.

5. Jankovic SM, Jankovic SV, Stojadinovic D, Stojadinovic M, Kostovic V, **Novakovic M**, Markovic V. Effects of exogenous glutamate and kainate on electric field-stimulated contractions of isolated human ureter. Urology 2009; 73(5):1136-9.

6. Bugarcić ZD, Petrović B, Bugarcić ZM, Janković SM, Janković SV, Lukić G, **Novaković M**, Kostović V, Popović S, Djurdjević P, Baskić D. and Arsenijević N. Effects of cisplatin and other Pt(II) complexes on spontaneous motility of isolated human oviduct. Toxicol In Vitro 2008; 22(8): 1878-82.

7. Manojlovic N, **Novaković M**, Stevović V. and Solujić S. Antimicrobial activity of three Serbian Caloplaca. Pharmaceutical Biology 2005; 43 (8): 1-5.

Индетификациона страница докторске дисертације

I. Аутор
Име и презиме: Милан Љ. Новаковић
Датум и место рођења: 9.3.1972. године, Крагујевац
Садашње запослење: виши лабораторијски сарадник
II. Докторска дисертација
Наслов: Анализа антимикробне активности белог лука (*Allium Sativum L.*)
Број страница: 109
Број слика: 72 (65 графикона, 7 слика)
Број библиографских података: 102
Установа и место где је рад израђен: Катедра за експерименталну и клиничку фармакологију, лаб. за фармацију 1, Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
Научна област (УДК): Медицина (Експериментална и клиничка фармакологија)
Ментор: Проф. др Слободан Јанковић
III. Оцена и обрана
Датум пријаве теме: 19.8.2011. године
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: 1632/7 од 22.11.2011. год.
Комисија за оцену подобности теме и кандидата: 1. Доц. др Јасмина Миловановић, председник 2. Проф. др Слободан Јанковић, ментор 3. Доц. др Радмила Величковић Радовановић, члан
Комисија за оцену подобности теме и кандидата: 1. Доц. др Јасмина Миловановић, председник 2. Проф. др Слободан Јанковић, ментор 3. Доц. др Радмила Величковић Радовановић, члан
Комисија за оцену докторске дисертације: 1. Доц. др Јасмина Миловановић, председник 2. Проф. др Дејан Баскић, члан 3. Доц. др Радмила Величковић Радовановић, члан
Комисија за одбрану докторске дисертације: 1. Доц. др Јасмина Миловановић, председник 2. Проф. др Дејан Баскић, члан 3. Доц. др Радмила Величковић Радовановић, члан
Датум одбране дисертације: 26.12.2013. године

ОБРАЗАЦ 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Милан Новаковић

број уписа 76/2006

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Анализа антимикробне активности екстракта белог лука (Allium sativum L.)"

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Крагујевцу, 25. 11. 2013. г.

ОБРАЗАЦ 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Милан Новаковић
Број уписа 76/2006
Студијски програм Докторске академске студије - клиничка и експериментална фармакологија
Наслов рада Анализа антимикробне активности екстраката белог лука (Allium sa
Ментор Проф. др. Слободан Јанковић

Потписани ______________________

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Крагујевцу.

Потпис аутора

У Крагујевцу, 25.11.2013.г.

ОБРАЗАЦ 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Крагујевцу унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Анализа антимикробне активности екстракта белог лука (Allium sativum L.)"

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Крагујевцу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, чији је кратак опис дат је на обрасцу број 4.).

Потпис аутора

У Крагујевцу, 25. 11. 2013. г.