

Analiza antimikrobnog učinka ekstrakta češnjaka na mikroorganizme voda različitog podrijetla

Cepanec, Matija

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:666016>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-28**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku – Odjel za kemiju

Sveučilišni diplomski studij Kemija; istraživački smjer

Matija Cepanec

**ANALIZA ANTIMIKROBNOG UČINKA
EKSTRAKTA ČEŠNJAKA NA
MIKROORGANIZME VODA RAZLIČITOG
PODRIJETLA**

Diplomski rad

Osijek, 2024

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku – Odjel za kemiju

Sveučilišni diplomski studij Kemija; istraživački smjer

Matija Cepanec

**Analiza antimikrobnog učinka ekstrakta
češnjaka na mikroorganizme voda različitog
podrijetla**

Diplomski rad

Mentor: izv. prof. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik

Neposredni voditelj: dr. sc. Marija Paurević.

Osijek, 2024

Naziv sveučilišta: **Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku – Odjel za kemiju**

Naziv studija: **Sveučilišni diplomski studij Kemija; istraživački smjer**

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

Znanstvena grana: Biokemija

ANALIZA ANTIMIKROBNOG UČINKA EKSTRAKTA ČEŠNJAKA NA MIKROORGANIZME VODA RAZLIČITOG PODRIJETLA

MATIJA CEPANEC

Rad je izrađen na: Sveučilište u Osijeku – Odjel za kemiju

Mentor: izv. prof. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik

Sažetak: Antimikrobna svojstva raznih prirodnih spojeva postaju značajno područje istraživanja, ponajviše zbog sve veće rezistencije mikroorganizama na antibiotike koji su do sada bili u širokoj uporabi. Češnjak (*Allium sativum*) vrlo je cijenjen u kulinarstvu, no njegova ljekovita svojstva poznata su od davnina. Sadrži niz biološki aktivnih spojeva, uključujući mnoge s antimikrobnim svojstvima. U ovom radu istražen je antimikrobni učinak različitih ekstrakata domaćeg i kupovnog/uvoznog češnjaka (podrijetlom iz Kine) na patogene mikroorganizme prisutne u prirodnim vodama. Ekstrakti češnjaka pripremljeni su u acetonu, etanolu, metanolu i ultra čistoj vodi. Ekstrakt domaćeg češnjaka u acetonu pokazao je najbolje antimikrobno djelovanje i to na bakteriji *Listeria monocytogenes*. Na Gram(+)-bakterijama uočeno je izraženije antimikrobno djelovanje u odnosu na Gram(-)-bakterije. Bakterija *Pseudomonas aeruginosa* pokazala je najveću otpornost na ispitivane ekstrakte. Pomoću GC-MS u gotovo svim su ekstraktima detektirani spojevi: dialil-sulfid, dialil-disulfid, metil-disulfid, dimetil-trisulfid, metil-alil-disulfid te sumpor

Ključne riječi: Češnjak, aktivni spojevi, patogeni mikroorganizmi

Jezik izvornika: hrvatski jezik

Diplomski rad obuhvaća: 38 stranice, 10 slika, 7 tablica, 29 literaturnih navoda

Rad je prihvaćen:

Stručno povjerenstvo za ocjenu rada:

1. izv. prof. dr. sc. Vlatka Gvozdić, predsjednica povjerenstva
2. izv. prof. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik, mentorica i članica povjerenstva
3. izv. prof. dr. sc. Elvira Kovač-Andrić, članica povjerenstva
4. izv. prof. dr. sc. Martina Medvidović-Kosanović, zamjena člana

Rad je pohranjen: Knjižnica Odjela za kemiju, Kuhačeva 20, 31000 Osijek

Repozitorij Odjela za kemiju, Osijek

University Name: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek – Department of Chemistry**

Name of study programme: **University Graduate study programme in Chemistry; research programme**

Scientific area: Natural sciences

Scientific field: Chemistry

Scientific branch: Biochemistry

ANALYSIS OF THE ANTIMICROBIAL EFFECT OF GARLIC EXTRACT ON MICROORGANISMS FROM WATERS OF DIFFERENT ORIGIN

MATIJA CEPANEC

The paper was created on: Department of Chemistry

Supervisor: Martina Šrajter Gajdošik, PhD, associate prof.

Abstract: The antimicrobial properties of various natural compounds are becoming a significant area of research, mostly due to the growing resistance of microorganisms to antibiotics that have been widely used so far. Garlic (*Allium sativum*) is highly valued in cooking, however, its medicinal properties have been known since ancient times. It contains a number of biologically active compounds, including many with antimicrobial properties. In this paper, the antimicrobial effect of different extracts of home-grown and purchased/imported garlic (originating from China) on pathogenic microorganisms present in natural waters was investigated. Garlic extracts are prepared in acetone, ethanol, methanol and ultrapure water. The extract of home-grown garlic in acetone showed the best antimicrobial activity against *Listeria monocytogenes*. A more pronounced antimicrobial effect was observed on Gram(+) -bacteria compared to Gram(-) -bacteria. The bacterium *Pseudomonas aeruginosa* showed the highest resistance to the examined extracts. Using GC-MS, the following compounds were detected in almost all extracts: diallyl-sulfide, diallyl-disulfide, methyl-disulfide, dimethyl-trisulfide, methyl-allyl-disulfide and sulfur.

Keywords: Garlic, active compounds, pathogenic microorganisms

Original language: Croatian language

Thesis include: 38 pages, 10 figures, 7 tables, 29 references

Thesis accepted:

Reviewers:

1. Vlatka Gvozdić, PhD, assoc. prof., chair
2. Martina Šrajter Gajdošik, PhD, assoc. prof., supervisor and member
3. Elvira Kovač-Andrić, PhD, assoc. prof., member
4. Martina Medvidović-Kosanović, PhD, assoc. prof., alternate member

Thesis deposited in: Library of the Department of Chemistry, Ulica Franje Kuhača 20, Osijek
Repository of the Department of Chemistry, Osijek

SADRŽAJ

| | |
|---|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. LITERATURNI PREGLED | 2 |
| 2.1 Češnjak | 2 |
| 2.2. Organosumporni spojevi..... | 2 |
| 2.3. Tioeteri..... | 3 |
| 2.3.1. Dialil-sulfid | 4 |
| 2.3.2. Dialil-disulfid | 5 |
| 2.3.3. Metil-alil-disulfid | 6 |
| 2.4. Bakterijske kulture | 7 |
| 2.5. Gram-negativne bakterije | 8 |
| 2.5.1 <i>Escherichia coli</i> | 10 |
| 2.5.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 11 |
| 2.6. Gram-pozitivne bakterije | 12 |
| 2.6.1. <i>Bacillus subtilis</i> | 14 |
| 2.6.2. <i>Listeria monocytogenes</i> | 14 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 16 |
| 3.1. Kemikalije | 16 |
| 3.2. Ekstrakcija aktivnih tvari iz češnjaka | 16 |
| 3.2.1. Mikrobiološko ispitivanje | 18 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 21 |
| 5. ZAKLJUČAK | 28 |
| 6. LITERATURA | 29 |
| 7. PRILOG | 32 |

1.UVOD

Češnjak (*Allium sativum*) je biljka oduvijek poznata po svojim ljekovitim svojstvima. Brojna istraživanja pokazala su da biološki aktivni spojevi u zdrobljenom češnjaku utječu na različite mikroorganizme poput bakterija, gljivica, protozoa i virusa. Štoviše, otkriveno je da češnjak smanjuje koncentraciju lipida u krvi i ima antitumorske učinke. Češnjak sadrži alicin te ostale ogranosumporne spojeve (dialil-sulfid, dialil-disulfid, i dr.) odakle i potječe karakteristični miris češnjaka. Alliin postoji kao jedan izomer, (+)-S-alil-L-cistein sulfoksid i nema samo antimikrobno, već i antitumorsko i antioksidativno djelovanje. Veliki problem današnjice je dopremanje vode prikladne za konzumaciju ljudi do sve brojnije ljudske populacije, pogotovo u Zemljama trećeg svijeta. Kako bi se voda sterilizirala, prilikom postupka sterilizacije u vodu se dodaju halogeni elementi poput flouora i klora. Gledano s ekološkog aspekta, sam proces sterilizacije vode zahtjeva izmjenu metoda rada. U ovom radu istraživana je mogućnost smanjena količine bakterijskih stanica u vodi na način koji je prikladniji mjerama za očuvanje okoliša [1].

2. LITERATURNI PREGLED

2.1 Češnjak

Češnjak (*Allium sativum L.*) je biljka koja se upotrebljava i uzgaja širom svijeta, s ukupnom površinom od 1.437.690 hektara i godišnjom proizvodnjom suhih lukovica od 24.255.303 tona. Često korišten u kulinarske svrhe, češnjak je također cijenjen zbog svojih terapijskih i ljekovitih svojstava, kako u tradicionalnoj tako i modernoj medicini. Kao rezultat različitih složenih biokemijskih reakcija javlja se i različit okus. Glavni spojevi odgovorni za taj okus uglavnom su nehlapljive aminokiseline koje sadrže sumpor (tiosulfinati), među kojima su aliin ili S-alil-cistein sulfoksid. Drugi značajni hlapljivi spojevi sa snažnim bioaktivnim svojstvima su ajoeni, kao i nekoliko spojeva koji sadrže sumpor osim aliina, kao što su alicin, 1,2-vinilditiin, aliksin i S-alil-cistein, te sulfidi, kao što je dialil-, metil alil-, i dipropil mono-, di-, tri- i tetra-sulfidi, koji nastaju nakon razgradnje tiosulfinata. Hlapljiva priroda ovih bioaktivnih spojeva uvelike je uključena u obrambene mehanizme češnjaka protiv štetnika i nekoliko patogena, budući da je njihovo otpuštanje u kombinaciji s oštećenjem stanica i lezijama biljnog tkiva. Najkarakterističniji hlapljivi i mirisni organosumporni spojevi češnjaka oslobađaju se nakon razaranja stanične membrane, uzrokujući α,β -eliminaciju aliina i drugih sulfoksida koji se nalaze na razini citoplazme, enzimom aliinazom, koji se nalazi u vakuoli [1].

2.2. Organosumporni spojevi

Organosumporna kemija proučava svojstva i sinteze organosumpornih spojeva. To su organski spojevi koji sadrže sumpor. Organosumporni spojevi mogu se klasificirati prema funkcionalnim skupinama koje sadrže sumpor, te su navedene (približno) silaznim redoslijedom njihova pojavljivanja:

- Sulfidi - karakteriziraju ih C–S–C veze. U odnosu na C–C veze, C–S veze su dulje jer su atomi sumпора veći od atoma ugljika te su C–S veze slabije za oko 10 %.
- Tioli - sadrže R–SH funkcionalnu skupinu. Strukturno slična alkoholnoj skupini, ali funkcionalnost je vrlo različita. Tioli su nukleofilniji, kiseliji i lakše oksidiraju.

- Disulfidi - sadrže R-S-S-R funkcionalnu skupinu. Kovalentna veza između dva sumpora važna je za umrežavanje: u biokemiji za savijanje i stabilnost nekih proteina i u kemiji polimera za umrežavanje gume.
- Tioesteri – sadrže R-C(O)-S-R funkcionalnu skupinu. Srodni uobičajenim esterima (R-C(O)-O-R), ali su osjetljiviji na hidrolizu i ostale povezane reakcije [2].

Specifično kemijsko ponašanje organskih spojeva koji sadrže sumpor u odnosu na njihove analoge kisika i dušika temelji se, velikim dijelom, na mjestu sumpora kao elementa trećeg reda. Uključivanje 3s, 3p (i povremeno 3d) orbitala za sumpor rezultira valentnim elektronima koji se nalaze mnogo dalje od jezgre nego za elemente drugog reda zbog znatno veće veličine ovih orbitala. Ova povećana udaljenost povezana je sa smanjenim elektrostatskim privlačenjem (s jezgrom) koje slabije drži te elektrone ili ima veću mogućnost polarizacije. Stoga, sumpor pokazuje veću nukleofilnost od kisika i dušika, što predstavlja manje stroge zahtjeve za elektrofilno djelovanje jer je također manje elektronegativan. [3].

2.3. Tioeteri

Tioeteri su sulfidi, sastoje se od atoma sumpora vezanog na dvije alkilne ili arilne skupine i stoga imaju opću strukturu R-S-R'. Ova funkcionalna skupina ih razlikuje od etera koji sadrže kisik i daje im njihova posebna kemijska i fizikalna svojstva. Kao rezultat manje snage C-S veze u usporedbi s C-O vezom u eterima, tioeteri imaju tendenciju da budu manje reaktivni u uobičajenim okolnostima. Međutim, zbog svoje veličine i sposobnosti polarizacije postoji veća vjerojatnost da će tioeteri sudjelovati u reakcijama nukleofilne supstitucije. Oni također imaju niža vrelišta od analognih spojeva s kisikom jer su međumolekularne sile slabije. Spojevi niske molekulske mase odgovorni su za njihov karakterističan neugodan miris poput onog kakav ima češnjaku [4].

Tioeteri se uglavnom proizvode alkiliranjem tiolata – deprotoniranih oblika tiola. Alternativno, simetrični tioeteri mogu se dobiti reakcijom između alkil-halida i natrijevog sulfida. S tioeterima se odvijaju razne reakcije uključujući oksidaciju u sulfokside i sulfone kao i cijepanje elektrofilnim reagensima. Tioeteri uglavnom zauzimaju važnu ulogu u biološkim sustavima. Aminokiselina koja sadrži sumpor je metionin, koji je neophodan za ljudski organizam. Biotin je još jedan važan koenzim koji ima prstenastu strukturu tipa tioetera [5].

Organosumporni spojevi posjeduju veliki broj korisnih svojstava, uključujući antioksidativna, protuupalna i antimikrobna djelovanja. Međutim, biološke aktivnosti tioetera su složene i ovise o nekoliko čimbenika kao što su struktura, doza i metabolička sudbina. Tioeteri imaju primjenu i izvan prirode kao intermedijeri u organskoj sintezi gdje se posebno koriste za farmaceutske proizvode i agrokemikalije, dok neki tioeteri također pokazuju farmakološke aktivnosti te se potencijalno koriste kao antihistaminici, protuupalna sredstva i sredstva protiv raka. Nasuprot tome, određeni tioeteri dobiveni iz nafte posjeduju nepovoljna svojstva koja ih čine zagađivačima okoliša [4].

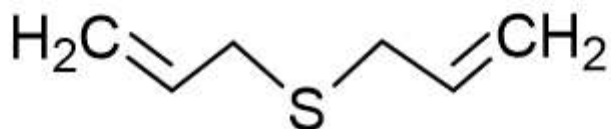
2.3.1. Dialil-sulfid

Dialil-sulfid, bezbojna do blijedožuta tekućina s oštrim mirisom poput češnjaka, je organosumporni spoj iz klase tioetera. ($C_6H_{10}S$). Struktura sadrži dvije alilne skupine povezane atomom sumpora (Slika 1.). Ovaj spoj je istaknuti sastojak češnjaka (*Allium sativum*), koji značajno pridonosi karakterističnom okusu i mirisu biljke. Enzimska pretvorba alina, stabilnog sulfoksida aminokiseline cisteina, u alicin, katalizirana alinazom, označava početni korak nastanka dialil-sulfida. Nakon toga, alicin prolazi spontanu razgradnju da bi se dobili različiti organosumporni spojevi, uključujući dialil-sulfid. Osim u češnjaku, dialil-sulfid je prisutan i u drugim vrstama *Allium*, iako u različitim koncentracijama. Značajno je da je njegova prisutnost u luku (*Allium cepa*) i poriluku (*Allium porrum*) manje izražena u usporedbi s češnjakom [5].

Biološka svojstva dialil sulfida izazvala su značajan znanstveni interes. *In vitro* studije na životinjama pokazale su da ovaj spoj ima različite farmakološke aktivnosti, uključujući antioksidativne, protuupalne, antimikrobne, antikancerogene i hepatoprotektivne učinke. Njegov antioksidativni kapacitet pripisuje se sposobnosti hvatanja slobodnih radikala, pri čemu ublažava oksidativno oštećenje stanica i tkiva. Protuupalno djelovanje dialil-sulfida povezano je s njegovim inhibicijskim učincima na upalne medijatore kao što su prostaglandini i leukotrieni. Nadalje, dialil-sulfid je pokazao antimikrobno djelovanje protiv raznih bakterija, gljivica i virusa, što ukazuje na njegov potencijal kao prirodnog antimikrobnog sredstva [6].

Antikancerogena svojstva spoja povezana su s njegovom sposobnošću da inducira apoptozu, inhibira proliferaciju stanica i modulira ekspresiju gena. Međutim, precizni mehanizmi koji leže u pozadini ovih učinaka složeni su i višestrani. Dialil-sulfid je privukao pozornost kao potencijalno kemopreventivno sredstvo, s epidemiološkim i eksperimentalnim studijama koje

ukazuju na smanjeni rizik od određenih vrsta raka, posebno onih gastrointestinalnog trakta, u populacijama s visokom konzumacijom češnjaka [7].



Slika 1. Struktura dialil-sulfida

2.3.2. Dialil-disulfid

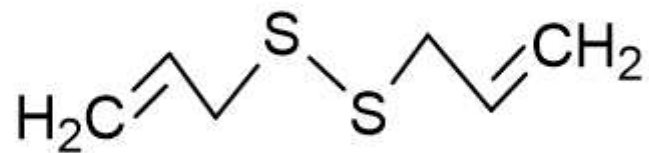
Dialil-disulfid, bezbojna do blijedožuta tekućina s oštrim mirisom nalik na češnjak, organosumporni je spoj molekularne formule C₆H₁₀S₂. Strukturno se sastoji od dvije alilne skupine povezane disulfidnom vezom (Slika 2.). Ovaj spoj je istaknuti sastojak češnjaka, i značajno doprinosi njegovom prepoznatljivom okusu i mirisu [8].

In vitro studije na životinjama pripisale su ovom spoju različite farmakološke aktivnosti, uključujući antioksidativne, protuupalne, antimikrobne, antikancerogene i hepatoprotektivne učinke [9].

Njegov antioksidativni kapacitet rezultat je sposobnosti da neutralizira slobodne radikale, čime se ublažava oksidativno oštećenje staničnih komponenti. Protuupalno djelovanje spoja povezano je s njegovim inhibicijskim učincima na medijatore upale, poput prostaglandina i leukotriena. Štoviše, dialil-disulfid je pokazao antimikrobno djelovanje protiv spektra mikroorganizama, uključujući bakterije, gljivice i viruse. Potencijal spoja kao kemopreventivnog sredstva izazvao je posebno zanimanje, s epidemiološkim i eksperimentalnim studijama koje ukazuju na smanjeni rizik od određenih vrsta raka, posebno

onih koji pogađaju gastrointestinalni trakt, u populacijama s visokom konzumacijom češnjaka [10].

Međutim, precizni mehanizmi koji leže u osnovi ovih zdravstvenih prednosti su složeni i višestruki, što zahtijeva daljnje istraživanje kako bi se utvrdile konačne uzročno-posljedične veze. Uloga dialil-disulfida kao ključne komponente okusa u češnjaku ima kulinarske implikacije. Iako je njegov opor okus cijenjen u mnogim kuhinjama, njegov se intenzitet može mijenjati kroz metode kuhanja. Toplina može dovesti do degradacije dialil-disulfida, što utječe na ukupni profil okusa jela koja sadrže češnjak [11].

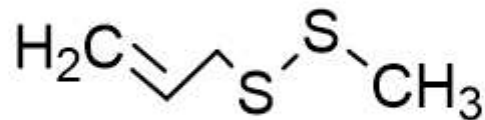


Slika 2. Struktura dialil-disulfida

2.3.3. Metil-alil-disulfid

Metil-alil-disulfid prirodni je organosumporni spoj koji se nalazi u češnjaku i drugim vrstama luka. Formule C₄H₈S₂, njegova molekulska struktura ima reaktivnu disulfidnu vezu i alilnu skupinu (Slika 3.), ključnu za njegovu kemijsku reaktivnost i biološke učinke. Snažno antimikrobno djelovanje ovog spoja proizlazi iz njegove sposobnosti da narušava integritet membrana mikrobnih stanica, inhibira bitne enzime i izaziva oksidativni stres unutar mikrobnih stanica. Kao rezultat toga, učinkovit je protiv širokog spektra patogena, uključujući bakterije, gljivice i potencijalno viruse [12].

Zbog svojih antimikrobnih svojstava i karakterističnog okusa, metil-alil-disulfid široko je upotrebljavan u prehrambenoj industriji kao prirodni konzervans i aroma. Pomaže produžiti rok trajanja raznih proizvoda i smanjiti kvarenje. Osim toga, znanstvenici istražuju njegove potencijalne zdravstvene dobrobiti, kao što su potpora imunitetu, antimikrobno djelovanje, pa čak i mogući učinci protiv raka. Iako je općenito siguran kada se konzumira u tipičnim koncentracijama u kojima je prisutan u hrani, metil-alil-disulfid može biti iritantan za kožu, oči i dišni sustav u svom čistom obliku. Stoga zahtijeva pažljivo rukovanje u industrijskim i laboratorijskim uvjetima [13].



Slika 3. Struktura metil-alil-disulfida

2.4. Bakterijske kulture

Bakterije, mikroskopski jednostanični organizmi, uspijevaju u okolišima od oceanskih dubina do atmosferskih visina. Budući da prethode većini oblika života, ključni su za povijest Zemlje. Kao prokariotski organizmi, bakterije nemaju jezgru i membranski vezane organele, što ih razlikuje od eukariotskih stanica. Imaju različite oblike, uključujući sfere (koke), štapiće (bacile) i spirale (spirile). Njihov genetski materijal, prvenstveno kružna DNA, često uključuje plazmide za izvankromosomsko nasljeđivanje. Iako se često povezuje s bolešću, većina bakterija je bezopasna ili korisna, i igraju ključne uloge u ekosustavu razgradnjom organske tvari, kruženju hranjivih tvari i stvaranju simbiotskih odnosa s biljkama i životinjama [14].

Ljudski mikrobiom, složena bakterijska zajednica, ključan je za probavu, imunološku funkciju i cjelokupno zdravlje. Bakterije se također koriste za industrijske procese, proizvodnju

antibiotika, fermentirane hrane i biogoriva. Međutim, patogene bakterije predstavljaju značajne izazove, uzrokujući i širok raspon infekcija. Otpornost na antibiotike, koja izaziva zabrinutost, naglašava potrebu za stalnim istraživanjem i novim antimikrobnim strategijama. Proučavanje bakterija produbilo je ljudsko razumijevanje života i njegovih procesa, što je dovelo do napretka u medicini, poljoprivredi i znanosti o okolišu. Od svog drevnog porijekla do suvremenog utjecaja, bakterije ostaju zagonetne i bitne komponente našeg svijeta [15].

2.5. Gram-negativne bakterije

Gram-negativne bakterije sastoje se od vrlo velike raznolike skupine mikroorganizama koje karakterizira posebna struktura stanične stijenke. Ova arhitektura ne samo da definira njihova svojstva bojenja, već i značajno utječe na njihove interakcije s okolišem, uključujući otpornost na antibiotike i uzročnost bolesti [16].

Sveprisutne u prirodi, te bakterije igraju ključnu ulogu u ekosustavima od tla i vode do probavnog trakta životinja i ljudi. Njihova je stanična stijenka strukturno složena, za razliku od debelog peptidoglikana gram-pozitivnih bakterija. Umjesto njega, gram-negativne bakterije posjeduju višeslojnu staničnu ovojnici:

- Vanjska membrana: lipidni dvosloj u koji su ugrađeni proteini i lipopolisaharidi (LPS). Ova barijera štiti stanicu od antibiotika i deterdženata.
- Sloj peptidoglikana: Tanki sloj peptidoglikana ispod vanjske membrane pruža strukturnu potporu. Njegova tanja priroda u usporedbi s gram-pozitivnim bakterijama objašnjava njihovu negativnost bojenja po Gramu.
- Periplazmatski prostor: gelasto područje u kojem se nalaze enzimi i transportni proteini. Pomaže pri prijenosu hranjivih tvari, prijenosu elektrona i detoksikaciji. Unutarnja (plazmatska) membrana: fosfolipidni dvosloj s proteinima za transport, stvaranje energije i signalizaciju. Održava unutarnje okruženje stanice. Brojne gram-negativne vrste su ljudski i životinjski patogeni. Njihov potencijal izazivanja bolesti često je u korelaciji s komponentama stanične stijenke, posebice s LPS [17].

Klinički važni patogeni uključuju:

- *Escherichia coli* Vrlo svestran, u rasponu od bezopasnih crijevnih simbiota do opasnih patogena koji uzrokuju teške bolesti izazvane hranom, upala mokraćnog

mjehura i neonatalni meningitis. Enterohemoragična *E. coli* (EHEC) proizvodi Shiga toksin, što dovodi do krvavog proljeva i potencijalno smrtonosnog hemolitičkog uremičkog sindroma (HUS).

- *Salmonella spp.*: Uzrokuje gastroenteritis i trbušni tifus. *Salmonella enterica* serotip je odgovoran za trbušni tifus, tešku sustavnu bolest, dok netifusni serotipovi *Salmonella* obično uzrokuju trovanje hranom i gastroenteritis.
- *Neisseria gonorrhoeae*: Uzrokuje gonoreju, spolno prenosivu infekciju karakteriziranu uretritisom, cervicitisom i upalnom bolešću zdjelice. Rastuća otpornost na antibiotike predstavlja veliki problem za javno zdravlje.
- *Neisseria meningitidis*: vodeći uzročnik bakterijskog meningitisa i sepse, osobito u male djece i adolescenata. Izbijanje meningokokne bolesti zahtijeva brzu dijagnozu i liječenje.
- *Pseudomonas aeruginosa*: Oportunistički patogen posebno opasan za imunokompromitirane pojedince i one s kroničnim plućnim bolestima poput cistične fibroze. Njegova intrinzična otpornost na antibiotike i stvaranje biofilma ometaju liječenje.
- *Haemophilus influenzae*: Uzrokuje niz infekcija, od blagih respiratornih bolesti do teških invazivnih bolesti poput meningitisa i septikemije, osobito u djece.
- *Klebsiella pneumoniae*: značajan uzročnik upale pluća, infekcija krvotoka i infekcija mokraćnog sustava u zdravstvenim ustanovama, često zbog svoje otpornosti na antibiotike [17].

Otpornost na antibiotike kritičan je izazov koji predstavljaju gram-negativne bakterije. Njihova vanjska membrana djeluje kao barijera te ovi mikroorganizmi posjeduju različite mehanizme otpora:

- Efuks pumpe: Transportni proteini koji aktivno izbacuju antibiotike, smanjujući njihovu unutarstaničnu koncentraciju i učinkovitost. Mogu pokazivati otpornost na više klasa antibiotika, pridonoseći otpornosti na više lijekova tzv. „*multidrug resistance*“.
- Beta-laktamaze: Enzimi koji hidroliziraju beta-laktamski prsten antibiotika poput penicilina i cefalosporina, inaktivirajući ih. Beta-laktamaze proširenog spektra razgrađuju širok raspon beta-laktama, komplicirajući liječenje.

- Mutacije porina: Promjene u proteinima porina vanjske membrane smanjuju unos antibiotika, osobito za beta-laktame i aminoglikozide, povećavajući otpornost.
- Modifikacija cilja: Promjene u ciljanim mjestima antibiotika, poput proteina koji vežu penicilin ili ribosomskih podjedinica, smanjuju afinitet vezanja antibiotika, što dovodi do rezistencije.
- Enzimska inaktivacija: Neke bakterije proizvode enzime koji modificiraju ili inaktiviraju antibiotike. Na primjer, enzimi koji modificiraju aminoglikozide dodaju kemijske skupine aminoglikozidima, sprječavajući ciljno vezanje.

Pojava gram-negativnih bakterija rezistentnih na više lijekova, kao što su *Enterobacteriaceae* otporne na karbapenem i *E. coli* koja proizvodi beta-laktamaze proširenog spektra, velika je prijetnja javnom zdravlju. Te su bakterije povezane s visokim stopama morbiditeta i mortaliteta, osobito u zdravstvenim ustanovama gdje uzrokuju izbijanje infekcija povezanih sa zdravstvenom skrbi. Gram-negativne bakterije pokazuju izuzetnu metaboličku raznolikost, što im omogućuje da napreduju u različitim ekološkim nišama. Oni koriste različite izvore energije i putove poput aerobnog disanja: mnogi koriste kisik kao terminalni akceptor elektrona u lancu transporta elektrona, generirajući ATP kroz oksidativnu fosforilaciju što je vrlo učinkovito u aerobnim okruženjima [17].

2.5.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli, je gram-negativna bakterija štapićastog oblika. Otkrio ju je Theodor Escherich 1885. u crijevnoj flori dojenčadi, a od tada je postala kamen temeljac mikrobiologije i biotehnologije. Većina sojeva *E. coli* su komezalni stanovnici ljudskih crijeva, gdje pomažu u probavi, sintezi vitamina i razvoju imunološkog sustava [18].

Međutim, neki patogeni sojevi uzrokuju bolesti u rasponu od blagog proljeva do infekcija opasnih po život. Ove patogene varijante koriste faktore virulencije, kao što su adhezini, toksini i invazini, za koloniziranje i oštećenje tkiva domaćina. Enteropatogena *E. coli* (EPEC) i enterotoksigena *E. coli* (ETEC) poznate su kao uzročnici teških proljeva, osobito u zemljama u razvoju. *E. coli* (STEC) koja proizvodi shiga toksin, uključujući zloglasni O157 soj, može dovesti do hemoragičnog kolitisa, hemolitičkog uremičkog sindroma i smrti. Izvancrijevne

infekcije kao što su infekcije mokraćnog sustava, neonatalni meningitis i sepsa također su uzrokovane ovom bakterijom [18].

Unatoč svom patogenom potencijalu, *E. coli* je bila neprocjenjiva u znanstvenim istraživanjima. Njen jednostavan genom, brza stopa rasta i lakoća manipulacije čine ju modelnim organizmom za proučavanje temeljnih bioloških procesa. *E. coli* se koristi kao jedna od glavnih bakterija u genetičkom inženjeringu, proizvodnji proteina i metaboličkom inženjerstvu. Osim toga, uloga ove bakterije kao indikatorskog organizma za fekalnu kontaminaciju vode i hrane ima značajne implikacije na javno zdravlje. Kontinuirana evolucija *E. coli*, u njenom genetskom sastavu i interakcijama s domaćinima, predstavlja stalne izazove za istraživače i kliničare. Razumijevanje zamršene biologije ove bakterije ključno je za razvoj učinkovite prevencije, dijagnoze i strategija liječenja bolesti povezanih s *E. coli*, dok se njezin potencijal iskorištava za korisne primjene [18].

2.5.2.. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa je sveprisutna, gram-negativna bakterija štapićastog oblika. U početku je karakterizirana kao biljni patogen, no njena sposobnost da napreduje u različitim okruženjima i uzrokuje širok raspon infekcija učvrstila je njen status značajnog ljudskog patogena. Ova oportunistička bakterija, često povezana s bolničkim infekcijama, posebno je vješta u kolonizaciji medicinskih uređaja, opeklinških rana i dišnih puteva imunokompromitiranih pojedinaca. Njena intrinzična otpornost na više antibiotika, zajedno sa sposobnošću brze prilagodbe, predstavlja ogroman izazov za pružatelje zdravstvenih usluga [19].

Metabolička svestranost bakterije omogućuje joj iskorištavanje različitih izvora hranjivih tvari, pridonoseći njezinom preživljavanju u različitim staništima. „*Quorum sensing*“, sustav komunikacije između stanica, omogućuje koordiniranu ekspresiju gena i razvoj biofilma, povećavajući njegov patogeni potencijal. Iako je *P. aeruginosa* prvenstveno prepoznata kao ljudski patogen, ona također utječe na životinje i biljke. Unatoč izazovima koje predstavlja ova bakterija, tekuća istraživanja njezine fiziologije, genetike i patogeneze dovela su do napretka u strategijama prevencije, dijagnoze i liječenja. Razvijanje novih antimikrobnih sredstava i istraživanje alternativnih terapijskih pristupa ključni su za borbu protiv sve veće prevalencije infekcija *P. aeruginosa* [19].

2.6. Gram-pozitivne bakterije

Gram-pozitivne bakterije velika su i raznolika skupina mikroorganizama koji imaju značajnu ulogu u različitim ekološkim i kliničkim kontekstima. Njihova karakteristika je debeli sloj peptidoglikana u staničnoj stijenci, koji ih razlikuje od gram-negativnih bakterija i doprinosi njihovim jedinstvenim svojstvima bojenja i osjetljivosti na određene antibiotike. Razumijevanje gram-pozitivnih bakterija uključuje ispitivanje njihove stanične strukture, patogenog potencijala, otpornosti na antibiotike, uloge u okolišu i metaboličke raznolikosti. Stanična stijenka gram-pozitivnih bakterija značajno se razlikuje od one gram-negativnih bakterija [20].

Ključne značajke uključuju:

- Debeli sloj peptidoglikana: Gram-pozitivne bakterije posjeduju debelu, višeslojnu stijenku peptidoglikana, koja može činiti do 90 % strukture stanične stijenke. Ovaj opsežni sloj peptidoglikana osigurava krutost i zaštitu, omogućujući ovim bakterijama da izdrže visoke osmotske tlakove
- Teihoične kiseline: U sloj peptidoglikana ugrađene su teihoične kiseline i lipoteihoične kiseline koje doprinose strukturnom integritetu stanične stijenke i imaju ulogu u održavanju stanične stijenke i regulaciji iona. Teihoične kiseline također služe kao receptori za određene bakteriofage i mogu biti uključene u prijanjanje na površine i tkiva.
- Odsutnost vanjske membrane: Za razliku od gram-negativnih bakterija, gram-pozitivne bakterije nemaju vanjsku membranu. Taj ih nedostatak čini osjetljivijima na određene antibiotike koji ciljaju na sintezu peptidoglikana, ali također znači da im nedostaje zaštitna vanjska barijera koja pruža otpornost gram-negativnih bakterija [20].

Gram-pozitivne bakterije uključuju nekoliko klinički značajnih patogena odgovornih za širok raspon bolesti. Neki značajni gram-pozitivni patogeni i bolesti koje uzrokuju su:

- *Staphylococcus aureus*: Ova je bakterija glavni uzročnik infekcija kože i mekog tkiva, apscesa, upale pluća i septikemije. Sojevi *Staphylococcus aureus*, zlatni stafilocoki, otporni na meticilin posebno su problematični zbog svoje otpornosti na više antibiotika.

- *Streptococcus pyogenes*: poznat po tome što uzrokuje streptokokni faringitis (streptokokna upala grla), šarlah i invazivne bolesti kao što su nekrotizirajući fasciitis i reumatska groznica.
- *Streptococcus pneumoniae*: vodeći uzročnik bakterijske upale pluća, meningitisa, upale srednjeg uha i sinusitisa, osobito kod djece i starijih osoba.
- *Enterococcus spp.*: Često se nalaze u gastrointestinalnom traktu. Vrste *Enterococcus* mogu uzrokovati infekcije mokraćnog sustava, bakterijemiju i endokarditis, osobito u hospitaliziranih pacijenata.
- *Clostridium spp.*: Uključuje nekoliko patogenih vrsta kao što su *Clostridium botulinum* (botulizam), *Clostridium tetani* (tetanus), *Clostridium perfringens* (plinska gangrena) i *Clostridioides difficile* (proljev i kolitis povezani s primjenom antibiotika).
- *Bacillus anthracis*: Uzročnik antraksa, ozbiljne bolesti koja pogađa i ljude i životinje, a karakteriziraju je kožni, inhalacijski i gastrointestinalni oblici.

Dok gram-pozitivne bakterije općenito nemaju vanjsku membranu koja doprinosi otpornosti na antibiotike kod gram-negativnih bakterija, razvile su druge mehanizme za preživljavanje antimikrobnog liječenja:

1. Proizvodnja beta-laktamaza: neke gram-pozitivne bakterije proizvode beta-laktamaze koje razgrađuju beta-laktamske antibiotike. *Staphylococcus aureus* poznat je po proizvodnji penicilinaze, vrste beta-laktamaze.
2. Promjena ciljanih mjesta: Gram-pozitivne bakterije mogu modificirati ciljna mjesta antibiotika, kao što su proteini koji vežu penicilin smanjujući učinkovitost lijekova. *S. aureus* otporan na meticilin (MRSA) mijenja svoje PBP-ove kako bi bio otporan na meticilin i druge beta-laktame.
3. Efluksne pumpe: Ovi transportni proteini mogu izbaciti antibiotike iz bakterijske stanice, smanjujući unutarstanične koncentracije i omogućujući bakterijama da prežive.
4. Zadebljana stanična stijenka: Neke bakterije mogu promijeniti strukturu svoje stanične stijenke kako bi smanjile prodor antibiotika. Na primjer, enterokoki otporni na vankomicin (VRE) modificiraju svoje molekule prekursora peptidoglikana kako bi spriječili vezanje vankomicina.
5. Stvaranje biofilma: Mnoge gram-pozitivne bakterije mogu stvarati biofilm na površinama, medicinskim uređajima i tkivima. Biofilmovi pružaju zaštitno

okruženje koje štiti bakterije od antibiotika i imunološkog sustava, doprinoseći kroničnim i upornim infekcijama [21].

2.6.1. *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis, gram-pozitivna bakterija štapićastog oblika, dokaz je mikrobne prilagodljivosti i svestranosti. Obično se naziva bacilom sijena, a nastanjuje tlo, gastrointestinalni trakt životinja, pa čak i morsko okruženje. Njegova sposobnost stvaranja vrlo otpornih endospora omogućuje preživljavanje u ekstremnim uvjetima, što ga čini sveprisutnim organizmom. Osim svog ekološkog značaja, *B. subtilis* je zaslužio titulu modela organizma u mikrobiologiji, pružajući neprocjenjiv uvid u temeljne biološke procese kao što su dioba stanica, sporulacija i regulacija gena [22].

Njegov genom, relativno kompaktan, ali složen, opsežno je proučavan, čime je olakšana genetska manipulaciju i metabolički inženjering. Ova je bakterija plodan proizvođač enzima, antibiotika i drugih bioaktivnih spojeva, što je čini kamenom temeljcem industrijske biotehnologije. Naime, *B.* je privukao pozornost kao probiotički organizam, s potencijalnim dobrobitima za zdravlje crijeva i imunološku funkciju [22].

Iako su primarno nepatogeni, određeni sojevi su uključeni u oportunističke infekcije, čime je naglašena važnost razumijevanja njihovog patogenog potencijala [22].

2.6.2. *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes, gram-pozitivna bakterija u obliku štapića, ljudski je patogen poznat po tome što uzrokuje listeriozu, tešku infekciju koja pogađa trudnice, novorođenčad, starije osobe i osobe oslabljenog imuniteta. Ovaj organizam, sposoban preživjeti na temperaturama hlađenja, trajno zagađuje zalihe hrane, što predstavlja značajan izazov za javno zdravlje [23].

L. monocytogenes pokazuje izvanrednu prilagodljivost, s unutarstaničnom i izvanstaničnom fazom rasta. Njena sposobnost invazije i replikacije unutar stanica domaćina, uključujući imunološke stanice, ključni je čimbenik virulencije za sustavnu diseminaciju. Sposobnost bakterije da manipulira signalnim putovima stanica domaćina i izbjegne imunološki odgovor naglašava njezinu patogenu snagu. Listerioza se očituje u nizu kliničkih manifestacija, od

blagog gastroenteritisa do teške invazivne bolesti koja zahvaća središnji živčani sustav, krvotok i placentu. Trudnice su pod povećanim rizikom od fetalne infekcije, mrtvorodjenčeta, pobačaja i neonatalne sepse [23].

Unatoč težini bolesti, dostupno je učinkovito antimikrobno liječenje. Međutim, prevencija kroz strogu praksu sigurnosti hrane ostaje osnova kontrole listerioze. Složeno međudjelovanje između *L. monocytogenes* i njezinog ljudskog domaćina i dalje je područje aktivnog istraživanja, s ciljem razvoja novih strategija za prevenciju, dijagnozu i liječenje ovog izazovnog patogena [23].

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Kemikalije

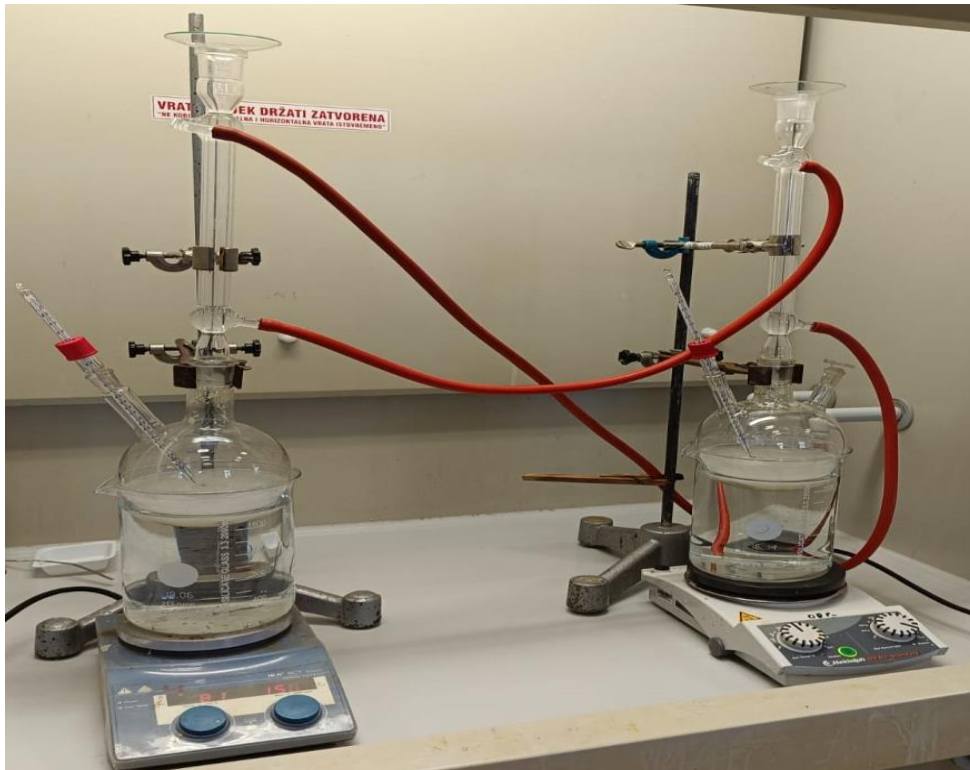
Za provođenje eksperimenta upotrijebljeni su kemijski reagensi analitičkog stupnja čistoće i bez prethodnog pročišćavanja. Njihove su značajne karakteristike sljedeće:

- Etanol C_2H_5OH , 46,07 g/mol, $t_f = -117,3$ °C (Gram-mol)
- Metanol, CH_3OH , 32,04 g/mol, $t_f = -97,6$ °C (Gram-mol)
- Aceton, C_3H_6O , 58,08 g/mol, $t_f = -95$ °C (Gram-mol)
- Ultra-čista voda, H_2O , 18,03 g/mol, $t_f = 0$ °C

Vaganje potrebnih uzoraka provedeno je na analitičkoj vagi KERN EMB 600-2. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom napravljena je pomoću ultrazvučne kupelji (Sonorex super RK 100). Plinska kromatografija provedena je na uređaju za plinsku kromatografiju (GC) (Agilent, GC 7890B).

3.2. Ekstrakcija aktivnih tvari iz češnjaka

Ekstrakcija aktivnih tvari iz češnjaka napravljene je u 3 trogrle okrugle tikvice od 1000 i 500 ml te u jednoj Erlenmayerovoj tikvici od 500 ml (Slika 4). Ukupno je provedeno 8 ekstrakcija. U prve 4 ekstrakcije korišten je uzorak domaćeg češnjaka, dok je u druge 4 korišten kupovni češnjak porijeklom iz Kine. Za ekstrakciju su zasebno korištena četiri različita otapala: etanol, metanol, aceton i ultra čista voda.. U svaku tikvicu dodano je 30 grama češnjaka, fino usitnjenog u tarioniku s tučkom (Slika 5). Potom je u 3 tikvice dodano redosljedom: etanol, metanol, aceton i to u količini od 300 ml. Omjer masa tvari namijenjenih za ekstrakciju te otapala koji se koristi pri ekstrakciji treba biti 1:6, jer je cilj dobiti razrijeđeni ekstrakt koji je kasnije može uparavati po potrebi (Tablica 1.). Tikvice su postavljene u aparaturu za destilaciju, a potom zagrijane električnim grijačem na temperaturu od 50 °C u trajanju od 6 sati. U posljednjoj ekstrakciji korišteno je 300 ml ultra-čiste vode, te je tikvica postavljena u ultrazvučnu kupelj na energiju od 35 kHz i ostavljena 24 sata u kupelji. Po završetku ekstrakcija, ekstrakti su profiltrirani te pohranjeni u staklene bočice s čepom za daljnju mikrobiološku i kromatografsku analizu (GC).



Slika 4. Prikaz aparature za tradicionalnu ekstrakciju



Slika 5. Prikaz izvagane količine češnjaka

Tablica 1. Prikaz omjera ekstrakt-češnjak

| Ekstrakt | Češnjak | množinski omjer komponenti | maseni omjer komponenti (g) |
|------------------|---------|-------------------------------|--------------------------------|
| Etanol | Domaći | 1:6 | 30:236,82 |
| Metanol | Domaći | 1:6 | 30:237,55 |
| Aceton | Domaći | 1:6 | 30:235.2 |
| Ultra-čista voda | Domaći | 1:6 | 30:300 |
| Etanol | Kupovni | 1:6 | 30:236,82 |
| Metanol | Kupovni | 1:6 | 30:237,55 |
| Aceton | Kupovni | 1:6 | 30:235.2 |
| Ultra-čista voda | Kupovni | 1:6 | 30:300 |

3.2.1. Mikrobiološko ispitivanje

U eksperimentalnom istraživanju korištene su kulture gram-negativnih i gram-pozitivnih bakterija iz zbirke mikrobnih kultura Zavoda za biologiju i mikrobiologiju Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek.

- Gram-negativne bakterije: *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*
- Gram-pozitivne bakterije: *Bacillus subtilis* i *Listeria monocytogenes*

Prije procjene antibakterijske aktivnosti ekstrakta češnjaka, bakterijski sojevi su revitalizirani sekvencijalnom inokulacijom tijekom tri dana na TGK agar (Tryptic Glucose Yeast Extract agar; Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italija) uz inkubaciju na 37 °C. Antibakterijsko djelovanje ekstrakta češnjaka procijenjeno je na sljedeći način: sterilna fiziološka otopina (0,85 % NaCl) dodana je na kosi agar nakon 24-satnog rasta bakterijske kulture i pripremljena je suspenzija bakterijskih stanica mikrobiološkom petljom. Suspenzija je pipetirana u epruvetu koja je sadržavala sterilnu fiziološku otopinu, a koncentracija stanica je mjerena korištenjem Den-1B denzitometra (Grant Instruments Ltd, Royston, Engleska) kako bi se postigla optička gustoća od 0,5 McFarland. Određeni volumen pripremljene suspenzije (8 mL) je zatim pipetiran u sterilni Mueller-Hinton agar (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italija) nakon sterilizacije i temperiranja u GFL tip 1008 vodenoj kupelji (GFL, Berlin, Njemačka) na 50° C.

Nakon inokulacije i homogenizacije medija sa staničnom suspenzijom, 20 mL smjese je prebačeno u sterilnu epruvetu za centrifugu od 50 mL i izliveno u sterilne Petrijeve zdjelice. Nakon što se skrutne i ohladi, četiri jažice agara, jednako razmaknute, napravljene su korištenjem sterilne plutene bušilice promjera 7,5 mm. Agar je uklonjen sterilnom pincetom kako bi se napravile jažice promjera 7,5 mm u koje je pipetirano 100 μ L ekstrakta češnjaka ili otopine antibiotika. Ploče su ohlađene na 4 °C tijekom 1 sata, zatim inkubirane 24 sata na 37 °C i izmjerene digitalnim kaliperom u dva okomita smjera [Jahangirian et al., 2013.] (Slika 6.). Kao kontrola korišteni su sljedeći antibiotici: A – Ampho-Moronal, 100 mg amfotericina B, Dermapharm GmbH, Beč, Austrija Kl – Klavocin, 1 g (875 mg amoksicilina kao trihidrata i 125 mg klavulanske kiseline), Pliva, Zagreb, Hrvatska Co. KO– Kloramfenikol rekonstituiran sa 7 mL otopine (3,5 mL 50% etilnog alkohola + 3,5 mL sterilne demineralizirane vode), Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italija R – Rimactan, 300 mg, Pliva, Zagreb, Hrvatska Svi antibiotici (osim kloramfenikola) otopljeni su u sterilnoj otopini dimetil-sulfoksida (Carlo Erba, Milano, Italija) i 10% Tween80 (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italija)) i prenijeti u istom volumenu (100 μ L) kao ekstrakt češnjaka. Testiranja su provedena u duplikatu.



Slika 6. Prikaz inhibicijskih zona u Petrijevoj zdjelici

3.2.2. Analiza aktivnih komponenti pomoću GC-MS

Tijekom mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi, vršne pare se skupljanju u prostoru iznad uzorka koji se nalazi u hermetički zatvorenoj bočici tzv. vijalici od 20 ml. Za ekstrakciju vršnih para ekstrakta bijelog luka odabrano je vlakno: DVB/PDMS (Ljubičasto vlakno debljine filma 65 μ m, Supelco Co., SAD). Prije upotrebe bilo je potrebno aktivirati

navedena vlakna (250 °C), a to je učinjeno u skladu s uputama proizvođača uvođenjem igle u dio PAL sustava za kondicioniranje vlakana. Nakon provedenog postupka kondicioniranja, vlakna su korištena za ekstrakciju vršnih para iz uzoraka ekstrakta luka. U staklenu bočicu volumena 20 mL stavljen je 0,1 g pripremljenog uzorka ekstrakta luka te je bočica nakon toga hermetički zatvorena čepom sa septom. PAL sustav je automatski izvršio uzorkovanje vršnih para ekstrakta luka kroz 40 min uz periodično miješanje. Nakon skupljanja vršnih para ekstrakta luka, vlakno je uvučeno u iglu i preneseno do GC-MS injektora (250 °C) za termalnu desorpciju tijekom 7 min izravno u inlet GC-MS uređaja. Analiza je započela odmah po injektiranju vlakna u inlet uređaja. Uvjeti analize GC-MS analize su dani u tablici 2. tablici.

Tablica 2. Uvjeti GC-MS analize

| | |
|------------------------------------|--|
| GC kolona | HP-5MS nepolarna kapilarna kolona (5 % fenil-metilpolisiloksan stacionarna faza; 30 m duljina; 0,25 mm unutarnji promjer; 0,25 µm debljina stacionarne faze) |
| Plin nositelj | helij, protok: 1 mL/min |
| Injektor | temperatura: 250 °C, omjer cijepanja: 1:20 |
| Temperaturni program kolone | 70 °C izotermno 2 min; porast od 70 °C do 200 °C po 3 °C/min; 200 °C izotermno 15 min |
| Uvjeti rada MS detektora | temperatura: ionskog izvora 230 °C, temperatura kvadropola: 150 °C energija ionizacije: 70 eV, interval snimanja masa: 30-450 masenih jedinica |

4. REZULTATI I RASPRAVA

Istraživanje antimikrobnih svojstava raznih prirodnih spojeva postaje sve značajnije zbog rastuće otpornosti mikroorganizama na dosad široko korištene antibiotike. Češnjak (*Allium sativum*), poznat po svojoj kulinarскоj vrijednosti, od davnina je cijenjen i zbog svojih ljekovitih svojstava. Sadrži niz biološki aktivnih spojeva, uključujući mnoge s antimikrobnim svojstvima [24]. U ovom je radu ispitivan antimikrobni učinak različitih ekstrakata domaćeg i kupovnog češnjaka (porijeklom iz Kine) na patogene mikroorganizme koji su prisutni u prirodnim vodama. Za pripremu ekstrakata korišteni su aceton, etanol, metanol i ultra čista voda. Mikrobiološka ispitivanja provedena su metodom izbušenih rupica u agaru na četiri soja bakterija: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* i *Listeria monocytogenes*. Pomoću GC-MS određene je sastav pripremljenih ekstrakata.

Podaci dobiveni mikrobiološkim testiranjem osam ekstrakata češnjaka na inhibiciju rasta gram(-)-bakterije *E. coli* dani su u tablici 3 i grafički prikazani na slici 7. Sposobnost inhibicije rasta *E. coli* zabilježena je kod ekstrakata domaćeg češnjaka u etanolu (1), acetonu (5) i ultračistoj vodi (7) sa srednjim vrijednostima zone inhibicije 10,65 mm, 11,27 mm i 13,62 mm dok je jedino ekstrakt kupovnog češnjaka u acetonu (6) pokazao antimikrobno djelovanje protiv ove bakterije sa zonom inhibicije 13,92 mm.

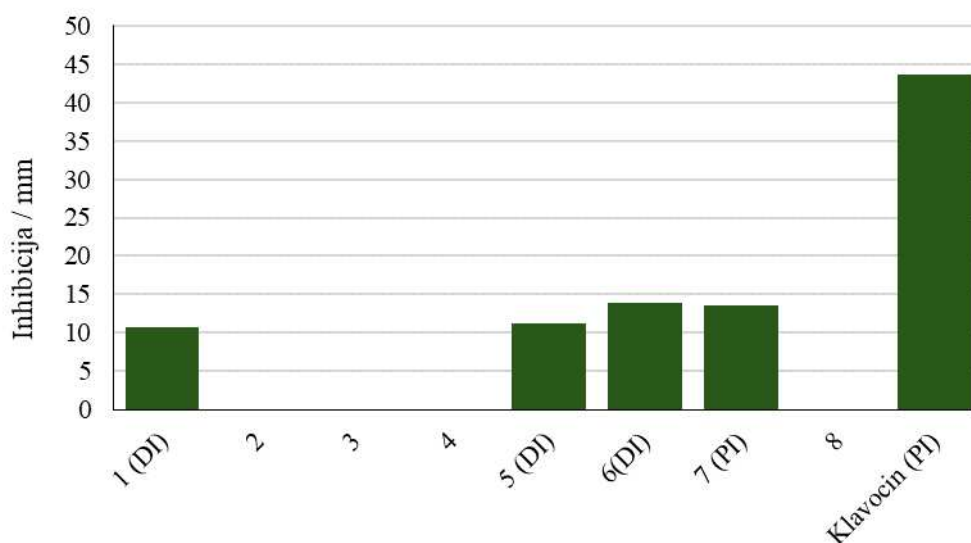
Tablica 3. Vrijednosti zone inhibicije ispitivanih ekstrakata na *E. coli* izražene u mm. PI – potpuna inhibicija, DI – djelomična inhibicija

| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | A | KL | KO | R |
|----------------------|----|------------|-----|-----|-----|------------|------------|------------|-----|-----|------------|-----|------------|
| Zona inhibicije u mm | 1. | 10,11 (DI) | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 11,13 (DI) | 14,13 (DI) | 13,36 (PI) | 0,0 | 0,0 | 41,63 (PI) | 0,0 | 24,34 (PI) |
| | 2. | 11,18 (DI) | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 11,41 (DI) | 13,71 (DI) | 13,88 (PI) | 0,0 | | | | |
| Srednja vrijednost | | 10,65 (DI) | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 11,27 (DI) | 13,92 (PI) | 13,62 (PI) | 0,0 | 0,0 | 41,63 (PI) | 0,0 | 24,34 (PI) |

1 – domaći češnjak/etanol; 2 – kupovni češnjak/etanol; 3 – domaći češnjak/metanol; 4 – kupovni češnjak/metanol; 5 – domaći češnjak/aceton; 6 – kupovni češnjak/aceton; 7 – domaći češnjak/ultračista voda; 8 – kupovni češnjak/ultračista voda; A - Amfotericin; KL – Klavocin; KO – kontrola (0,8% Tween 80); R – Rifampicin.

Unatoč nešto manjoj zoni inhibicije u usporedbi s uzorkom 6, možemo zaključiti da uzorak 7 pokazuje jači inhibitorski učinak jer je jedino kod ovog uzorka zamijećena potpuna inhibicija, dok je kod ostalih uzoraka bila prisutna samo djelomična inhibicija. Djelomična inhibicija je pojam

koji opisuje zonu inhibicije (**Slika 6**) koja u sebi sadrži male količine zamućenja, koje odgovaraju metaboličkim ostacima bakterija te mogućim razvojem novih kolonija, što može biti posljedica nedovoljne koncentracije antimikrobnog sredstva koja je korištena pri testiranju. Kod potpune inhibicije sama zona inhibicije je prozirna, te nema nikakvih zamućenja [24]. Važno je napomenuti da su svi ekstrakti u primijenjenim količinama pokazali znatno slabiju sposobnost inhibicije rasta *E. coli* u odnosu na antibiotik Klavocin (**Slika 7**).



Slika 7. Grafički prikaz antibakterijskog djelovanja ekstrakta češnjaka na Gram(-)-bakteriju *E. coli*. Rezultati predstavljaju zonu inhibicije izraženu u mm. **1** – domaći češnjak/etanol; **2** – kupovni češnjak/etanol; **3** – domaći češnjak/metanol; **4** – kupovni češnjak/metanol; **5** – domaći češnjak/acetone; **6** – kupovni češnjak/acetone; **7** – domaći češnjak/ultračista voda; **8** – kupovni češnjak/ultračista voda; Klavocin kao pozitivna kontrola.

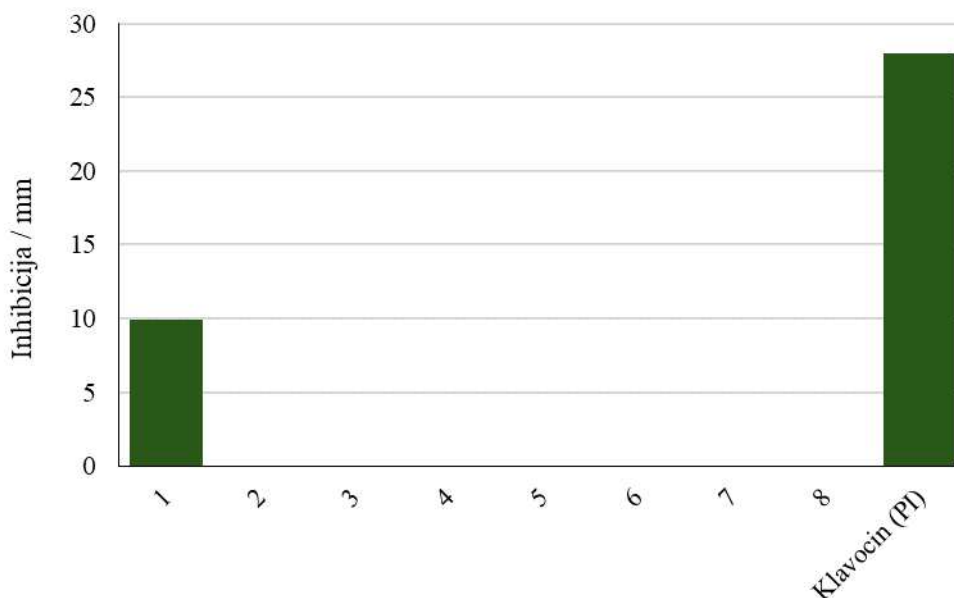
Rezultati inhibicije rasta još jedne Gram(-) bakterije, *P. aeruginosa*, dani su u tablici 4 i grafički prikazani na slici 8. Jedini ekstrakt koji je pokazao inhibitorni učinak na ovu bakteriju bio je onaj domaćeg češnjaka u etanolu (**1**) što upućuje na značajnu otpornost *P. aeruginosa* prema ispitivanim ekstraktima. Uzimajući u obzir nedostatak inhibicije ostalih ekstrakata, inhibitorno djelovanje ekstrakta br. 1 moglo bi biti rezultat negativnog utjecaja samog otapala tj. etanola na ispitivanu bakteriju.

Tablica 4. Vrijednosti zone inhibicije ispitivanih ekstrakata na *P. aeruginosa* izražene u mm.

PI – potpuna inhibicija, DI – djelomična inhibicija

| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | A | KL | KO | R |
|----------------------|----|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------------|-----|------------|
| Zona inhibicije u mm | 1. | 9,95 (PI) | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 27,96 (PI) | 0,0 | 28,56 (PI) |
| | 2. | 9,95 (PI) | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | | | | |
| Srednja vrijednost | | 9,95 (PI) | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 27,96 (PI) | 0,0 | 28,56 (PI) |

1 – domaći češnjak/etanol; 2 – kupovni češnjak/etanol; 3 – domaći češnjak/metanol; 4 – kupovni češnjak/metanol; 5 – domaći češnjak/acetone; 6 – kupovni češnjak/acetone; 7 – domaći češnjak/ultračista voda; 8 – kupovni češnjak/ultračista voda; A - Amfotericin; KL – Klavocin; KO – kontrola (0,8% Tween 80); R – Rifampicin.



Slika 8. Grafički prikaz antibakterijskog djelovanja ekstrakta češnjaka na gram(-)-bakteriju *P. aeruginosa*. Rezultati predstavljaju zonu inhibicije izraženu u mm. 1 – domaći češnjak/etanol; 2 – kupovni češnjak/etanol; 3 – domaći češnjak/metanol; 4 – kupovni češnjak/metanol; 5 – domaći češnjak/acetone; 6 – kupovni češnjak/acetone; 7 – domaći češnjak/ultračista voda; 8 – kupovni češnjak/ultračista voda; Klavocin kao pozitivna kontrola.

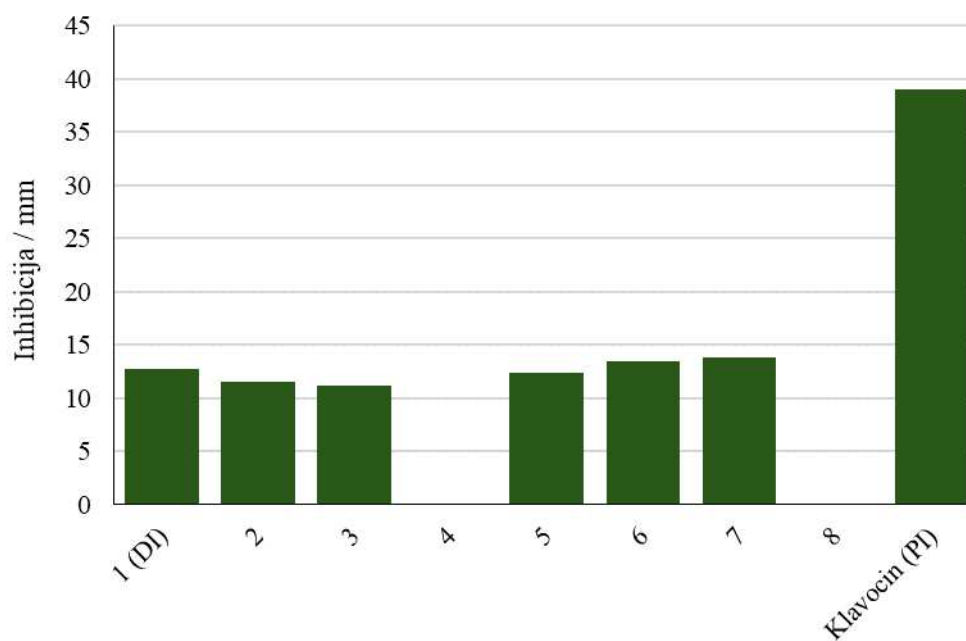
Kao što je vidljivo u tablici 5. i iz grafičkog prikaza na slici 9. kod Gram(+)-bakterije *B. subtilis* primijećena je djelomična inhibicija s podjednakim zonama inhibicije kod organskih ekstrakata, dok je kod ekstrakata s ultra čistom vodom u oba uzorka češnjaka (4 i 8) izostala inhibicija.

Takvi rezultati mogu ukazivati na sposobnost organskih otapala da bolje degradiraju staničnu stijenku, te tako omogućavaju lakši ulazak aktivnih tvari u stanicu.

Tablica 5. Vrijednosti zone inhibicije ispitivanih ekstrakata na *B. subtilis* izražene u mm. PI – potpuna inhibicija, DI – djelomična inhibicija

| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | A | KL | KO | R |
|----------------------|----|---------------|---------------|---------------|-----|---------------|---------------|---------------|-----|-----|---------------|-----|---------------|
| Zona inhibicije u mm | 1. | 12,59 (DI) | 11,40 (DI) | 11,18 (DI) | 0,0 | 12,34 (DI) | 13,44 (DI) | 13,95 (DI) | 0,0 | 0,0 | 38,95 (PI) | 0,0 | 23,77 (PI) |
| | 2. | 12,80 (DI) | 11,78 (DI) | 11,17 (DI) | 0,0 | 12,35 (DI) | 13,40 (DI) | 13,65 (PI) | 0,0 | | | | |
| Srednja vrijednost | | 12,70 (DI) | 11,59 (DI) | 11,18 (DI) | 0,0 | 12,35 (DI) | 13,42 (DI) | 13,80 (DI) | 0,0 | 0,0 | 38,95 (PI) | 0,0 | 23,77 (PI) |

1 – domaći češnjak/etanol; 2 – kupovni češnjak/etanol; 3 – domaći češnjak/metanol; 4 – kupovni češnjak/metanol; 5 – domaći češnjak/aceton; 6 – kupovni češnjak/aceton; 7 – domaći češnjak/ultračista voda; 8 – kupovni češnjak/ultračista voda; A - Amfotericin; KL – Klavocin; KO – kontrola (0,8% Tween 80); R – Rifampicin.



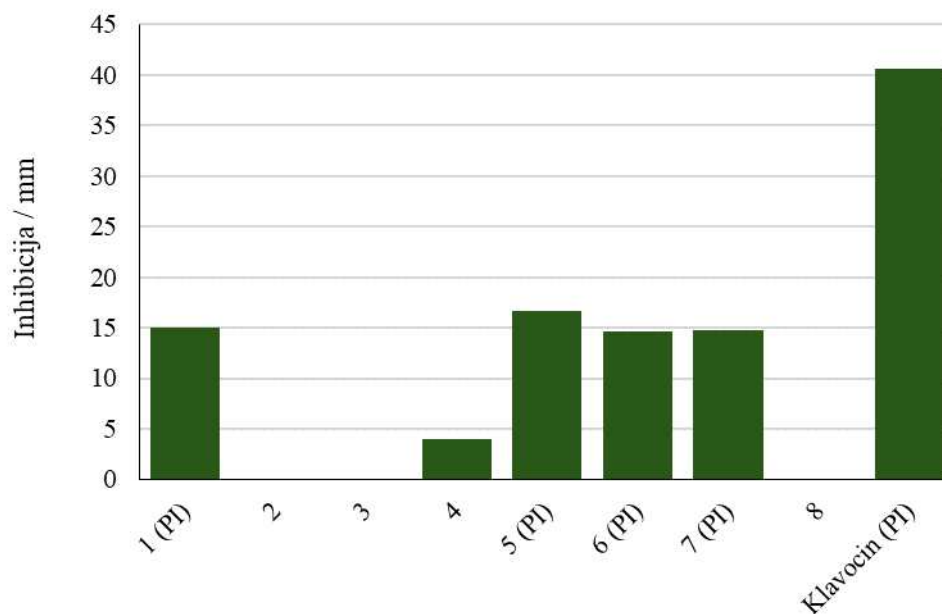
Slika 9. Grafički prikaz antibakterijskog djelovanja ekstrakta češnjaka na Gram(-)-bakteriju *B. subtilis*. Rezultati predstavljaju zonu inhibicije izraženu u mm. 1 – domaći češnjak/etanol; 2 – kupovni češnjak/etanol; 3 – domaći češnjak/metanol; 4 – kupovni češnjak/metanol; 5 – domaći češnjak/aceton; 6 – kupovni češnjak/aceton; 7 – domaći češnjak/ultračista voda; 8 – kupovni češnjak/ultračista voda; Klavocin kao pozitivna kontrola.

L. monocytogenes, Gram(+) bakterija koja pokazuje otpornost na niz antibiotika i antimikrobnih sredstava, imala je iznenađujuće najmanju otpornost na ekstrakte češnjaka od svih ispitivanih bakterija. Čak su četiri ekstrakta (1, 5, 6 i 7) pokazala potpunu inhibiciju sa zonama inhibicije slijedom: 14,98 mm, 16,71 mm, 14,64, mm i 14,79 mm. Kod ove su bakterije ujedno uočene i najveće zone inhibicije u odnosu na ostale bakterije, dok je najveću zonu inhibicije imao ekstrakt domaćeg češnjaka u acetonu.

Tablica 6. Vrijednosti zone inhibicije ispitivanih ekstrakata na *L. monocytogenes* izražene u mm. PI – potpuna inhibicija, DI – djelomična inhibicija

| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | A | KL | KO | R |
|----------------------|----|------------|-----|-----|-----------|------------|------------|------------|-----|-----------|------------|-----|------------|
| Zona inhibicije u mm | 1. | 14,76 (PI) | 0,0 | 0,0 | 4,10 (PI) | 16,50 (PI) | 14,64 (PI) | 14,79 (PI) | 0,0 | 19,1 (PI) | 40,66 (PI) | 0,0 | 35,77 (PI) |
| | 2. | 15,2 (PI) | 0,0 | 0,0 | 3,90 (PI) | 16,91 (PI) | 14,64 (PI) | 14,79 (PI) | 0,0 | | | | |
| Srednja vrijednost | | 14,98 (PI) | 0,0 | 0,0 | 4,00 (PI) | 16,71 (PI) | 14,64 (PI) | 14,79 (PI) | 0,0 | 19,1 (PI) | 40,66 (PI) | 0,0 | 35,77 (PI) |

1 – domaći češnjak/etanol; 2 – kupovni češnjak/etanol; 3 – domaći češnjak/metanol; 4 – kupovni češnjak/metanol; 5 – domaći češnjak/aceton; 6 – kupovni češnjak/aceton; 7 – domaći češnjak/ultračista voda; 8 – kupovni češnjak/ultračista voda; A - Amfotericin; KL – Klavocin; KO – kontrola (0,8% Tween 80); R – Rifampicin.



Slika 10. Grafički prikaz antibakterijskog djelovanja ekstrakta češnjaka na Gram(-)-bakteriju *L. monocytogenes*. Rezultati predstavljaju zonu inhibicije izraženu u mm. 1 – domaći češnjak/etanol; 2 – kupovni češnjak/etanol; 3 – domaći češnjak/metanol; 4 – kupovni češnjak/metanol; 5 – domaći češnjak/aceton; 6 – kupovni češnjak/aceton; 7 – domaći češnjak/ultračista voda; 8 – kupovni češnjak/ultračista voda; Klavocin kao pozitivna kontrola.

Kako bi se utvrdio sastav ekstrakata češnjaka u etanolu, metanolu i ultračistoj vodi, provedena je GC-MS analiza. Postotni udjeli najistaknutijih aktivnih spojeva prisutnih u češnjaku dani su u tablici 7 dok se tablica svih detektiranih spojeva i njihovih udjela nalazi u prilogu (Tablica 8). Rezultati u tablici 7. poklapaju se s rezultatima inhibicije u tablicama 3-6. Vidljivo je da su najveće koncentracije dialil-disulfida detektirane u ekstraktu acetona, što je u skladu s rezultatima dobijenim mikrobiološkom analizom (Tablica 5).

Tablica 7. GC-MS analiza ekstrakata češnjaka. Rezultati su izraženi kao postotni udio (%) spoja u ekstraktu. RT – vrijeme retencije, RI - Kováts indeks retencije;

| Spoj | RT | RI | 1 [%] | 2 [%] | 3 [%] | 4 [%] | 5 [%] | 6 [%] |
|----------------------------|-----------|-----------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Metil-disulfid | 2,437 | 761 | 0,06 | 0,06 | 0,04 | 3,95 | 1,58 | 0,03 |
| Dialil-sulfid | 3,651 | 867 | 0,11 | 0,06 | 0,04 | - | 0,42 | 0,10 |
| Metil-alil-disulfid | 4,702 | 924 | 0,47 | 2,87 | 1,37 | 9,09 | 4,54 | 1,32 |
| Dimetil-trisulfid | 5,991 | 978 | - | - | 0,12 | 0,41 | 0,16 | 0,15 |
| Dialil-disulfid | 9,335 | 1083 | 11,29 | 35,06 | 9,70 | 29,22 | 28,88 | 13,49 |
| Sumpor (S8) | 44,316 | 2011 | 1,92 | 0,46 | 2,58 | 0,50 | 0,10 | 1,51 |

1 – domaći češnjak/etanol; **2** – domaći češnjak/acetona, **3** – domaći češnjak/ultračista voda; **4** – kupovni češnjak/etanol;; **5** – kupovni češnjak/acetona; **6** – kupovni češnjak/ultračista voda; **K** – Klavocin kao pozitivna kontrola.

Ovo istraživanje je potvrdilo da češnjak posjeduje antibakterijsko djelovanje. Ovaj način ekstrakcije, kao što je prikazano u tablici 8. koja se nalazi u prilogu, nastoji očuvati aktivne tvari češnjaka od termičkog raspadanja jer su skoro sve aktivne tvari ispitivane u ovom radu termički nestabilne. Isto tako, naglasak je na mogućnosti uparavanja ekstrakata na željenu koncentraciju, koja je nužna zbog očuvanja izoliranih tvari. Primarni cilj je bio istražiti antibakterijsko djelovanje ekstrakta češnjaka na bakterijske sojeve izolirane iz uzoraka voda različitog podrijetla, te su gore navedeni rezultati pokazali učinkovitost. Ekstrakti kupovnog (kineskog) i lokalnog češnjaka u vodi i organskim otapalima pokazali su antimikrobno djelovanje protiv svih ispitivanih mikroorganizama. Ovi su rezultati u skladu s prethodnim

izvješćima u kojima je češnjak pokazao snažan inhibitorni učinak protiv 20 različitih serotipova *E. coli*, uključujući enterohemoragičnu i enterotoksigenu *E. coli* [25]. Rezultati ovoga istraživanja mogli biti od velikog interesa za prehrambenu industriju jer je *E. coli* glavni patogen koji se prenosi hranom. Organski ekstrakti otapala kupovne sorte bili su učinkovitiji na *Bacillus subtilis* u usporedbi s vodenim ekstraktima. Slični rezultati zabilježeni su kada su kultivari češnjaka s bijelom i ljubičastom korom ekstrahirani u organskim otapalima uspoređeni s njihovim emulzijama na bazi vode [26].

Ovi rezultati mogli bi utjecati na izbor ekstrakata koji će se koristiti u hrani. Nasuprot tomu, vodeni ekstrakti pokazali su najbolju inhibitornu aktivnost na rast *Listeria monocytogenes*. U prethodnoj studiji, vodena ekstrakcija češnjaka pri niskom pH pokazala je najbolju antimikrobnu aktivnost u usporedbi s etanolom i metanolom [27].

Antimikrobno djelovanje češnjaka očituje se u njegovoj sposobnosti da naruši strukturni integritet stanične membrane a to se lakše postiže pri niskim pH vrijednostima. Rezultati prethodnih istraživanja upućuju na to da struktura stanične stijenke koja razlikuje gram-pozitivne od gram-negativnih vrsta utječe na učinkovitost biljnog ekstrakta [28].

Sadržaj različitih aktivnih tvari u ekstraktima varira ovisno o otapalu koje se koristi za ekstrakciju. Pregledom literature utvrđeno je da su vodeni ekstrakti najprikladniji za ekstrakciju alicina, dok su postupci na bazi metanola i etanola optimalni za izolaciju polifenola. Upotrijebljeno otapalo također utječe na sadržaj ostalih aktivnih tvari u ekstraktu. Vodeni i etanolni ekstrakti poznati su po svojim brojnim svojstvima koja promiču zdravlje, uključujući antibakterijsko, antikancerogeno, antidijabetičko, antifungalno, antihiperkolesterolemično, antihipertenzivno, protuupalno, antioksidativno, antiparazitsko, antivirusno i imunostimulirajuće djelovanje. Iako su potrebna daljnja istraživanja, dosadašnja su pokazala da zbog svojih antioksidativnih i imunostimulirajućih učinaka, vodeni i etanolni ekstrakti češnjaka mogu biti korisni kao dodatak konvencionalnim terapijama protiv raka. Međutim, uporaba tvari poput metanola i/ili organskih otapala ograničena je zbog njihove toksičnosti, osobito kada gutanjem unesu u organizam [29].

5. ZAKLJUČAK

Sadržaj različitih aktivnih tvari u ekstraktima varira ovisno o otapalu koje se koristi za ekstrakciju. Najbolje antimikrobno djelovanje pokazao je ekstrakt domaćeg češnjaka u acetonu na bakteriji *Listeria monocytogenes*. Uočeno je izraženije antimikrobno djelovanje većine ekstrakata na Gram(+)-bakterije u odnosu na one Gram(-). Najslabije antimikrobno djelovanje ekstrakti su pokazali na bakteriji *Pseudomonas aeruginosa*. Pomoću GC-MS u gotovo svim su ekstraktima detektirani spojevi: dialil-sulfid, dialil-disulfid, metil-disulfid, dimetil-trisulfid, metil-alil-disulfid te sumpor. Unaprijeđenje metoda koje se bave povećanjem stabilnosti bioaktivnih spojeva u ekstraktima češnjaka i odabir najučinkovitijih načina i oblika za njihovu terapijsku dostavu moglo bi povećati učinkovitost njegovih ekstrakata. Dobiveni rezultati pružaju uvid u potencijalnu upotrebu prirodnih spojeva iz češnjaka za suzbijanje patogena koji se prenose vodom, čime se doprinosi rješavanju ključnih problema u javnom zdravstvu i zaštiti okoliša.

6. LITERATURA

1. A. Korpi, J. Järnberg, A.L. Pasanen, Microbial Volatile Organic Compounds. *Crit. Rev. Toxicol.* **2009**, *39*, 139–193
2. G. Stotzky, S. Schenck, Volatile organic compounds and microorganisms. *Crit. Rev. Microbiol.* **1976**, *4*, 333-382
3. W. Mabey, T. Mil, Critical Review of Hydrolysis of Organic Compounds in Water Under Environmental Conditions. *JPCRD*, **1978**, *2*, 383-415
4. M. İhsan, G. Küçükgülzel, Thioethers: An Overview, *Bentham Science Publishers*, **2022**, *23*, 170-219
5. X. Tang, Y. Zhao, A Review on Sulfur-Directed C–H Bond Activation, *Bentham Science Publishers*, **2021**, *18*, 902-924
6. S. Suman, Y. Shukla, Diallyl Sulfide and Its Role in Chronic Diseases Prevention, *Adv. Exp. Med. Biol.* **2016**, *929*, 127–144
7. S. Yang Chung, K. Chhabra Saranjit, J.Y. Hong, J. Smith Theresa, Mechanisms of Inhibition of Chemical Toxicity and Carcinogenesis by Diallyl Sulfide (DAS) and Related Compounds from Garlic, *J Nutr*, **2001**, *131*, 1041-1045
8. P. S. S Rao, M. Midde, D. Miller, C. Duane, K. Subhash, K. Anil, Diallyl Sulfide: Potential Use in Novel Therapeutic Interventions in Alcohol, Drugs, and Disease Mediated Cellular Toxicity by Targeting Cytochrome P450 2E1, *Bentham Science Publishers*, **2015**, *16*, 486-503
9. S. Mitra, R. Das, T. B. Emran, R. Khan L. Noor-E-Tabassum Noor-E-Tabassum, I. Fahadul, I. Rohit, S. Rohit, A. Islamudin, N. Firzan, C. Kumarappan Chidambaram, A. Fahad, C. Deepak, C. R. Capasso, P. Wilairatana, Diallyl Disulfide: A Bioactive Garlic Compound with Anticancer Potential. *Front. Pharmacol.* **2022**, *13*, 150-184
10. L. Yi, Q. Su, Molecular mechanisms for the anti-cancer effects of diallyl disulfide. *FCT*, 2013, *57*, 362-370
11. X. Song , Z. Yue, L. Nie, P. Zhao, K. Zhu, Q. Wang, Biological Functions of Diallyl Disulfide, a Garlic-Derived Natural Organic Sulfur Compound. *eCAM*, 2021, *2021*, 147-160
12. Y. Huang, S. X. Chen, S. H. Ho, Bioactivities of Methyl Allyl Disulfide and Diallyl Trisulfide from Essential Oil of Garlic to Two Species of Stored-Product Pests,

- Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *J. Econ. Entomol.*, **2000**, *93*, 537–543
13. L. Yan, A. Li, X. Jiang, X. Zhu, X. Feng, X. Sun, Z. Zhao, Metabolism and Pharmacokinetics Studies of Allyl Methyl Disulfide in Rats. *Xenobiotica*, **2018**, *49*, 90–97.
 14. A. Persat, C. D. Nadell, M. K. Kim, F. Ingremeau, A. Siryaporn, K. Drescher, N. S. Wingreen, B. L. Bassler, Z. Gitai, H. A. Stone, The Mechanical World of Bacteria, *Cell Press*, **2015**, *161*, 988-997
 15. H. Nikaido, Multidrug Resistance in Bacteria, *Annu. Rev. Biochem.* **2009**, *78*, 119-146
 16. G. Waterer, R. G. Wunderink, Increasing threat of Gram-negative bacteria, *Crit. Care Med.* **2001**, *29*, 75-81
 17. K. Poole, Multidrug resistance in Gram-negative bacteria, *COMICR*, **2001**, *4*, 500-508
 18. K. S. Kaye, J. M. Pogue, Infections Caused by Resistant Gram-Negative Bacteria: Epidemiology and Management, *Pharmacotherapy*, **2015**, *35*, 889-976
 19. J.A. Lepe, L. Martínez-Martínez, Resistance mechanisms in Gram-negative bacteria, *Medicina Intensiva*, **2022**, *46*, 392-402
 20. N. Woodford, D. M. Livermore, Infections caused by Gram-positive bacteria: a review of the global challenge, *J. Infect. Res.* **2009**, *59*, 4-16
 21. B. B. Bächli, Resistance mechanisms of Gram-positive bacteria, *IJMM*, **2002**, *292*, 27-35
 22. Louis B. Rice, Antimicrobial resistance in gram-positive bacteria, *Am. J. Infect. Control*, **2006**, *34*, 11-19
 23. S. M. Bhavnani, C. H. Ballow, New agents for Gram-positive bacteria, *COMICR*, **2000**, *3*, 528-534
 24. H. jahangiriana, J. Haronb, M. Halim Shah, R. Rafiee-Moghaddamc, L. Afsah-Hejri, V. Abdollahi, M. Rezayi, N. Vafaei, Well diffusion method for evaluation of antibacterial activity of copper phenyl fatty hydroxamate synthesized from canola and palm kernel oils. *Dig. J. Nanomater. Bios*, **2013**, *8*, 1263 – 1270
 25. J.C., Crank, E.L., Ghabban, H.A., Horsburgh, M.J. Deferred Growth Inhibition Assay to Quantify the Effect of Bacteria-derived Antimicrobials on Competition. *J. Vis. Exp.* **2016**, *115*, 127-133

26. M.N. Indu, A.A.M. Hatha, C. Abirosh, U. Harsha, G. Vivekanandan, Antimicrobial activity of some of the south-Indian spices against serotypes of Escherichia coli, Salmonella, Listeria monocytogenes and aeromonas hydrophila. *J. Microbiol* **2006**, *37*, 153–158
27. H.S. El-Sayed, R. Chizzola, A.A. Ramadan, A.E. , Edris, Chemical composition and antimicrobial activity of garlic essential oils evaluated in organic solvent, emulsifying, and self-microemulsifying water based delivery systems, *Food Chem.* **2017**, *221*, 196–204
28. C. Chen, C.H. Liu, J. Cai, W. Zhang, W.L. Qi, Z. Wang, Z. Liu Bin, Y. Yang, Broad-spectrum antimicrobial activity, chemical composition and mechanism of action of garlic (*Allium sativum*) extracts, *Food Control*, **2018**, *86*, 117–125
29. E.M.Z. Michielin, A.A. Salvador, C.A.S. Riehl, A. Smaania, E.F.A. Smaania, S.R.S. Ferreira, Chemical composition and antibacterial activity of *Cordia verbenacea* extracts obtained by different methods, *Bioresour. Technol*, **2009**. *24*, 6615–6623

7. PRILOG

Tablica 8. Cjelokupni rezultati analize GC-MS-a

| Broj | Spoj | Rt | RI | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|------|--|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1. | Etanol | 1,555 | < 700 | 0,67 | - | 0,69 | - | - | - |
| 2. | Etil acetat | 1,790 | < 700 | 0,32 | 0,11 | 0,36 | - | - | - |
| 3. | 3-metilbutanal | 1,928 | < 700 | 0,07 | - | 0,07 | - | - | - |
| 4. | Metil disulfid | 2,437 | 761 | 0,06 | 0,06 | 0,04 | 3,95 | 1,58 | 0,03 |
| 5. | Hexanal | 2,859 | 805 | 0,05 | - | - | 0,14 | 2,08 | - |
| 6. | Dialil sulfid | 3,651 | 867 | 0,11 | 0,06 | 0,04 | - | 0,42 | 0,10 |
| 7. | 3-metilpiridin | 3,776 | 875 | - | - | - | 0,47 | - | - |
| 8. | 2,4-dimetiltiofen | 4,468 | 912 | 0,09 | - | 0,07 | - | - | - |
| 9. | Metil alil disulfid | 4,702 | 924 | 0,47 | 2,87 | 1,37 | 9,09 | 4,54 | 1,32 |
| 10. | (E)-Hept-2-enal | 5,546 | 961 | 0,14 | - | 0,03 | - | 0,35 | - |
| 11. | 3H-1,2-ditiol | 5,646 | 965 | 0,53 | 0,33 | 0,76 | 0,95 | 0,98 | 1,49 |
| 12. | Benzaldehid | 5,718 | 968 | 0,20 | - | 0,10 | 0,71 | 1,66 | - |
| 13. | Dimetil trisulfid | 5,991 | 978 | - | - | 0,12 | 0,41 | 0,16 | 0,15 |
| 14. | Oct-1-en-3-one | 6,107 | 982 | 0,14 | - | - | - | 0,35 | - |
| 15. | Fenol | 6,212 | 986 | - | - | - | 0,47 | - | - |
| 16. | 2-etilheksan-1-ol | 7,582 | 1033 | - | - | 0,21 | 0,64 | - | - |
| 17. | Benzenacetaldehid | 8,120 | 1050 | 0,21 | - | 0,40 | 1,62 | - | - |
| 18. | (E)-Oct-2-enal | 8,553 | 1062 | 0,15 | - | - | - | - | - |
| 19. | Dialil disulfid | 9,335 | 1083 | 11,29 | 35,06 | 9,70 | 29,22 | 28,88 | 13,49 |
| 20. | (Z)-1-Alil-2-(prop-1-en-1-il)disulfan | 9,862 | 1096 | 1,43 | 3,37 | 1,28 | 1,62 | 1,48 | 1,12 |
| 21. | (E)-1-Alil-2-(prop-1-en-1-il)disulfan | 10,097 | 1102 | 1,21 | 6,49 | 1,25 | 1,08 | 0,93 | 1,86 |
| 22. | Nonanal | 10,194 | 1105 | 0,25 | - | - | - | 1,00 | - |
| 23. | Metil 2-propenil trisulfid | 11,521 | 1143 | 21,18 | 3,20 | 4,58 | 6,62 | 6,61 | 6,97 |
| 24. | 3-vinil-3,6-dihidro-1,2-ditiin | 13,431 | 1188 | 0,24 | 0,39 | 0,51 | - | - | 4,23 |
| 25. | 4H-1,2,3-tritiin | 13,846 | 1197 | 0,89 | 0,84 | 1,14 | 0,37 | - | 2,42 |
| 26. | 2-vinil-4H-1,3-ditiin | 14,212 | 1207 | - | - | 1,18 | 1,32 | - | - |
| 27. | 3-vinil-1,2-ditiacikloheks-5-en | 14,488 | 1214 | 0,84 | 1,00 | 2,03 | 1,49 | 0,16 | 8,48 |
| 28. | Di-prop-2-enil trisulfid | 18,139 | 1300 | 37,36 | 31,89 | 38,82 | 18,48 | 37,27 | 46,46 |
| 29. | 1-Alil-3-propiltrisulfan | 18,646 | 1313 | 1,50 | 2,11 | 0,58 | 0,34 | 0,55 | 1,73 |
| 30. | (Z)-1-Alil-3-(prop-1-en-1-il)trisulfan | 19,037 | 1323 | 2,26 | 0,23 | 1,65 | 0,07 | 0,10 | 0,49 |

| | | | | | | | | | |
|-----|--|--------|------|------|------|-------|------|------|------|
| 31. | (E)-1-Alil-3-(prop-1-en-1-il)trisulfan | 19,254 | 1329 | 4,23 | 1,71 | 5,70 | 4,36 | 0,25 | 1,23 |
| 32. | 5-metil-1,2,3,4-tetratian | 20,623 | 1362 | 0,81 | 0,28 | 1,17 | 3,82 | 0,05 | 0,60 |
| 33. | Di-prop-2-enil tetrasulfid | 27,803 | 1539 | 5,76 | 0,75 | 11,32 | 1,28 | 1,08 | 2,62 |
| 34. | Heksadekan | 30,179 | 1600 | 0,33 | - | 1,07 | - | - | - |
| 35. | Oktadekan | 37,385 | 1800 | 0,28 | - | 0,39 | - | - | - |
| 36. | Sumpor (S8) | 44,316 | 2011 | 1,92 | 0,46 | 2,58 | 0,50 | 0,10 | 1,51 |

- 1-etanol, 2-aceton, 3-ultra-čista voda (domaći češnjak)
- 3-etanol, 4-aceton, 5-ultra-čista voda (kupovni češnjak)