

ISTRAŽIVANJA ANTIBIOTSKOG  
DJELOVANJA EKSTRAKTA MAHOVINA NA  
NEKE BAKTERIJE

ZLATKO PAVLETIĆ i BOŽIDAR STILINOVIĆ

(Iz Instituta za botaniku Sveučilišta u Zagrebu)

Uvod

U posljednje vrijeme mnogo se istražuju novi organizmi koji posjeduju svojstva antibiotskog djelovanja na različite bakterije. Ne istražuju se samo streptomiceti i gljivice, koje su dale čitav niz antibiotika i općenito su poznate po svome antagonističkom djelovanju, već se nastoji otkriti i u drugim organizmima izvan svijeta mikroorganizama slična svojstva.

Već je godine 1928. B. P. Tokin otkrio da mnoge biljke sadrže sokove koji ubijaju neke bakterije. Isti autor i njegovi suradnici (1951) dokazali su da mnoge biljke posjeduju sposobnost stvaranja fitoncida, pomoću kojih same sebe steriliziraju.

Prema G. F. Gauzeu (1958) postoji već izvjestan broj antibiotika, odnosno fitoncida koji su ekstrahirani i kemijski određeni a dobiveni su iz različitih biljaka. Tako je 1944. izoliran iz češnjaka (*Allium sativum*) antibiotik nazvan alicin koji posjeduje vrlo jaka antibiotska svojstva prema Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama. Nadalje je g. 1947. izoliran rafanin iz sjemena rotkvice (*Raphanus sativus*), krepin iz glavočiike *Crepis taraxacifolia* djelotvoran protiv stafilokoka, protoanemonin iz *Anemone pulsatilla*, tomatin iz rajčice koji djeluje protiv patogenih gljivica, te antibiotici iz čička (*Arctium minus*), *Asarum canadense* i drugih biljaka.

Bilo je pokušaja da se ispita antibiotska djelatnost i nekih drugih viših biljaka, ali dosada nismo mogli utvrditi da li se to pokušalo i s mahovinama.

Zbog toga se u Institutu za botaniku Sveučilišta u Zagrebu pristupilo širem ispitivanju antibiotskog djelovanja u mahovina s područja Hrvatske. Ovaj rad predstavlja preliminarna ispitivanja, na osnovu kojih će se usmjeriti daljnja istraživanja. Sada objavljujemo neke rezultate za koje smatramo da su od važnosti.

Ova su istraživanja u sklopu teme koju financira Republički fond za naučni rad SRH pa se i na ovome mjestu zahvaljujemo za pruženu pomoć.

### Upotrijebljeni materijal i metodika rada

Za naša istraživanja upotrijebili smo mahovinski materijal koji smo sabirali u raznim područjima Hrvatske. Kako nam je bio zadatak da dobijemo samo jedan pregled o eventualnom antibiotskom djelovanju pojedinih najvažnijih predstavnika iz raznih glavnijih skupina briofita, to smo nastojali da skupimo materijal raznog sistematskog porijekla bez obzira na geografsku provenijenciju. Stoga smo skupljali materijal iz raznih područja kako smo našli za shodno, da bi dobili ove najvažnije predstavnike.

Najviše smo skupljali na području Plitvičkih jezera, gdje je razvijena vrlo bujna mahovinska vegetacija na raznim staništima. Naročito je bujna mahovinska vegetacija koja raste po tamošnjem drveću u bukovim šumama ili u miješanoj šumi bukve i jele. S toga područja sabrali smo čitav niz mahovina iz raznih sistematskih skupina. Tako smo od marhancijala ubrali vrste *Marchantia polymorpha*, *Fegatella conica*, *Preissia commutata* i dr., od jungermanijala *Plagiochila asplenioides*, *Modothesca platyphylla*, *Scapania sp.* i dr., te od brijala razne brijaceje, dikranaceje, hipnaceje, mnijaceje, politrihaceje i dr.

Ovo smo područje posjetili u nekoliko navrata, a najviše smo materijala skupili za vrijeme našeg posjeta u jeseni, kada je veća količina vlage znatno pogodovala razvoju šumske briofitske vegetacije.

Osim toga, skupljali smo nešto materijala i u okolici Zagreba, a nešto potiče i iz našeg Botaničkog vrta. Isto tako, sabirali smo materijal i u drugim područjima, gdje smo boravili po raznim drugim zadacima, kao u dolini Une, Krke i dr.

Zbog karaktera eksperimenata trebalo je mahovinski materijal sačuvati u živom stanju, pa smo zbog toga morali pripremiti njihove kulture, kako bismo ih imali stalno na raspolaganju. Odmah nakon dolaska s terena pripremljene su vodene kulture različitog sastava, a sav upotrijebljeni mahovinski materijal držan je na mjestima koja najbolje odgovaraju prirodnim uslovima ovih mahovina. Zbog neprikladnih prostorija bilo je dosta teško pronaći takve uslove u našem laboratoriju, ali nam je ipak uspjelo gotovo sve kulture duže vremena održati u živom stanju.

Treba napomenuti da je među upotrijebljenim materijalom bilo i pravih hidrofita, koji inače žive u vodama tekućicama naših vapnenačkih voda, pa je postojala bojazan da se ove mahovine neće održati. Međutim, mi smo uspjeli da održimo i njihove kulture stalnim i čestim mijenjanjem vodene podloge.

Na terenu skupljali smo mahovinski materijal u polivinilske vrećice u koje smo dodavali i nešto vode u raznim količinama, već prema potrebi pojedinih vrsta.

Po dolasku u laboratorij prenijeli smo sav skupljeni materijal u velike Petrijeve posude (promjer 23 cm) u kojima smo mijenjali vodu

svaki dan barem jedanput. Na taj način dobili smo materijal za pripremanje kultura, a održavali smo ga kod temperature od 10—15° C. Do sada smo pripremali tri vrste kultura. Jedne su bile kulture koje su održavane u čistoj vodi. Spremali smo ih na taj način što smo dobro očišćene i oprane dijelove mahovina stavljali na vlažni filter-papir i dodavali vode iz vodovoda.

Pored toga, pripremali smo i hranjivu vodenu otopinu po C r o n e u. Otopinu smo lijevali nakon steriliziranja u Petrijeve posude promjera 15 cm i dodavali mahovinski materijal koji je prethodno dobro ispran.

Napokon smo upotrijebili i krutu podlogu, tzv. anorganski agar koji smo pripremili na taj način što smo C r o n e o v o j otopini dodali 10% agara. Na takvu krutu podlogu, koja je također sterilizirana, položili smo dijelove mahovina koji su se dalje razvijali vegetativnim putem.

Sve ispitivane vrste određivali smo prema standardnim ključevima za mahovine.

Zbog pomanjkanja potrebnih uputstava u literaturi, bili smo primorani da ispitivanje antibiotskih svojstava vršimo vlastitim metodama. Do sada smo se ograničili da ispitujemo samo prirodni ekstrakt iz raznih dijelova mahovina. Ekstrakt smo dobili gnječenjem očišćenih i izrezanih dijelova mahovina.

Antibiotsko djelovanje ekstrakta ispitivali smo na bakterijskim pločama s raznim test-bakterijama. Kao test-bakterije upotrijebili smo od Gram-pozitivnih *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea*, a od Gram-negativnih *Escherichia coli*. Čiste kulture bakterija pripremane su na hranjivom agaru u Petrijevim posudicama promjera 15 cm. Odmah nakon što se hranjiva podloga s bakterijama skrtnula, izbušene su sterilnim bušačem za čepove rupe u agaru (vidi sl. 1) i u njih je sterilnom pipetom dodavano nekoliko kapi ekstrakta. Nakon 24 sata pojavile su se oko nekih ekstrakta zone inhibicije koje smo mjerili u mm pomoću šestara.

### Ispitivanja antibiotskog djelovanja ekstrakta

U svemu smo do sada ispitivali 14 vrsta mahovina, i to:

#### *H e p a t i c a e*

*Marchantia polymorpha*,  
*Madotheca platyphylla*  
*Plagiochila asplenioides*

#### *M u s c i*

*Dicranum scoparium*  
*Cinclidotus aquaticus*  
*Mnium punctatum*  
*Mnium undulatum*  
*Platyhypnidium rusciforme*  
*Hypnum cupressiforme*  
*Ctenidium molluscum*  
*Rhytidiadelphus triquetrus*  
*Anomodon viticulosus*  
*Isoetecium viviparum*  
*Camptothecium phillippeanum*

Radi određivanja antibiotske djelatnosti, uzimali smo ekstrakte prema naprijed opisanom postupku. Gnječenje biljnih dijelova vršeno je u sterilnom tarioniku, a sam ekstrakt pomoću sterilne pipete prenijet je u udubine na test-podlogu.

Antibiotsko djelovanje utvrdili smo kod tri vrste između svih 14 navedenih. To su bile *Marchantia polymorpha*, *Madotheca platyphylla* i *Dicranum scoparium*. Najjače djelovanje do sada je pokazao *Dicranum scoparium* (sl. 2) kojeg zona inhibicije mjerena u mm sa test-bakterijom *Bacillus subtilis* iznosi 32 mm. Radi posebnog interesa, nastojalo se kod ove vrste ustanoviti koji dio biljke sadrži antagonističke supstance. U tu svrhu posebno se odvojio ekstrakt iz stabalca, listića i rizoida, te se ustanovilo da se glavni dio djelotvorne supstance nalazi u listićima (sl. 2). U našim istraživanjima namjeravamo vršiti dalju analizu na raznim test-bakterijama te po mogućnosti pokušati i kemijski izdvojiti aktivnu tvar.

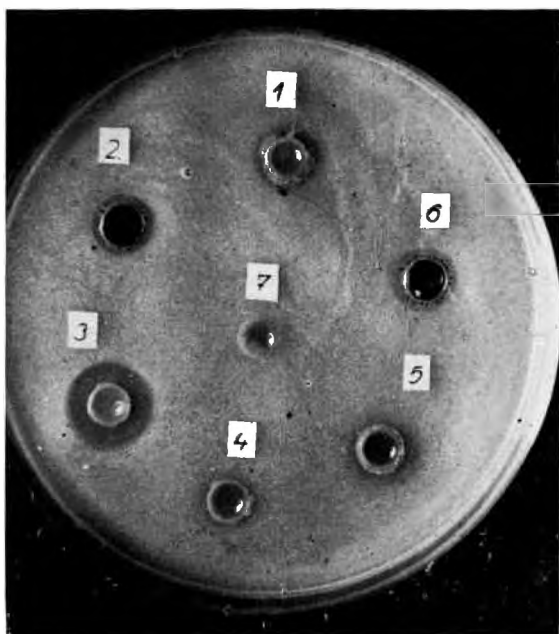
Antibiotsko djelovanje pokazale su i neke hepatike. S ekstraktom vrste *Marchantia polymorpha* vršilo se testiranje na test-bakterijama *Sarcina lutea* i *Staphylococcus aureus*, te se utvrdila umjerena i stalna zona inhibicije koja se kretala između 16—18 mm. Isto tako pokazivala je antibiotsko djelovanje i *Madotheca platyphylla* kod koje je zona inhibicije na *Bacillus subtilis* iznašala 22 mm (sl. 1). Radi boljeg pregleda donosimo tablicu u kojoj se vidi različita antibiotska djelatnost pojedinih ekstrakta prema širini zone inhibicije izražene u mm.

BAKTERIOSTATIČKI SPEKTRUM EKSTRAKTA zone inhibicije u mm				
Vrsta	Testni organizmi			
	B. subtilis	S. aureus	S. lutea	E. coli
<i>Dicranum scoparium</i>	32	32	28	0
<i>Marchantia polymorpha</i>	16	10	16	0
<i>Madotheca platyphylla</i>	22	0	18	0

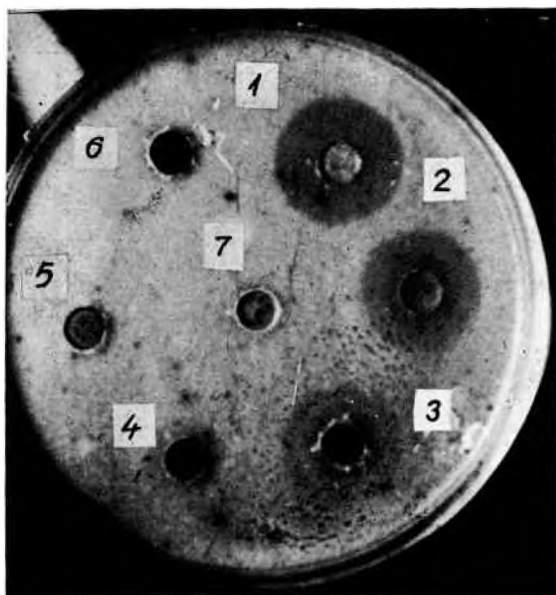
Svi pokusi radili su se u petrijevkama od 15 cm promjera po 7 proba odjednom, dok je debljina agara iznosila 5 mm.

#### Osvrt na postignute rezultate

Iz ovih pokusa je vidljivo da u ekstraktu nekih mahovina postoje supstance koje pokazuju antibiotsku djelatnost prema nekim bakterijama. Ako pogledamo sistematsku pripadnost tih mahovina, vidimo da



Sl. 1. Antibiotško djelovanje ekstrakta mahovina na *Bacillus subtilis*:  
*Marchantia polymorpha* 1, 2 i 6; *Madotheca platyphylla* 3; *Mnium undulatum* 4; *Cinclidotus aquaticus* 5; *Cratoneurum commutatum* 7.



Sl. 2. Antibiotško djelovanje ekstrakta iz raznih dijelova mahovine *Dicranum scoparium* na *Staphylococcus aureus*: 1, 2 i 3 ekstrakt iz listića; 4, 5, 6 i 7 ekstrakt iz ostalih dijelova gametofita

postoje stanovite razlike između predstavnika hepatika i muska. Naime, od tri ispitane hepatike pokazuju antagonističku djelatnost dvije vrste, a od jedanaest vrsta muska samo ekstrakt iz jedne pokazuje pozitivno djelovanje. To znači da, uzevši u obzir ispitivane vrste, veći broj antagonista prema bakterijama nalazimo u skupini hepatika, nego među mnogo brojnijim muscima. Međutim, što se tiče jakosti antagonističkog djelovanja, ono je najjače kod jedinog predstavnika pravih mahova *Dicranum scoparium*.

Ovo češće pojavljivanje antagonističkih tvari kod hepatika nego kod musca moglo bi se dovesti u vezu s uljnim tjelešcima koja možemo utvrditi kod gotovo svih hepatika (K. Müller 1951). Naime, prema I. V. Toropcevu i I. E. Kamnevu (1946) fitoncidi predstavljaju ulja koja se mogu nalaziti u biljkama u slobodnom stanju ili u spojevima. Zbog toga je vjerojatno da i uljna tjelešca hepatika sadrže neke antibiotski aktivne tvari. Takva uljna tjelešca ne posjeduju musci. S tim u vezi bilo bi potrebno ispitati da li zaista postoji veza između uljnih tjelešaca i antibiotski aktivnih tvari kod hepatika.

Kao što je već istaknuto najjače antibiotsko djelovanje pokazuje ekstrakt *Dicranum scoparium*. Zanimljivo je da i kod ove prave mahovine antibiotska tvar nije raspoređena po cijeloj biljci, nego je lokalizirana samo u listićima. To znači da i kod muska bez obzira na nedostatak uljnih tjelešaca fitoncide nalazimo u asimilatoričkim organima.

U vezi s djelovanjem ekstrakta na pojedine bakterijske vrste zanimljivo je uočiti da ne djeluju u jednakoj mjeri na sve ispitane bakterije. U tom pogledu mogu se jasno izlučiti gram-pozitivne i gram-negativne bakterije. Naime, skoro sve testne bakterije gram-pozitivne skupine bile su više-manje osjetljive na ekstrakte spomenutih aktivnih mahovina, dok je predstavnik gram-negativnih bakterija *Escherichia coli* bila potpuno rezistentna.

Prvi rezultati ovih ispitivanja pokazuju da su i mahovine pogodan objekt za istraživanje i eventualno dobivanje novih antibiotika, što nas obavezuje da proširimo i produbimo ova naša početna istraživanja, tim prije što u literaturi ne nalazimo gotovo nikakvih podataka o antibiotskom djelovanju mahovina.

## Z a k l j u č a k

Na kraju želimo ukratko iznijeti glavne rezultate ovih naših ispitivanja.

Ispitana je antagonistička djelatnost ekstrakta 14 različitih mahovina na neke bakterije. Kao test-bakterije poslužile su *Bacillus subtilis*, *Sarcina lutea*, *Staphylococcus aureus* od gram-pozitivnih, a od gram-negativnih *Escherichia coli*.

Od svih ispitivanih vrsta, antibiotsku djelatnost pokazali su ekstrakti vrsta *Dicranum scoparium*, *Madotheca platyphylla* i *Marchantia polymorpha*. Najjaču aktivnost pokazivala je vrsta *Dicranum scoparium*, i to na gram-pozitivne bakterije.

Utvrđeno je da se djelotvorna tvar kod *Dicranum scoparium* nalazi lokalizirana u listićima.

Spomenute dvije hepaticke djeluju također, ali u manjem obimu, na gram-pozitivne bakterije.

Na gram-negativnu bakteriju *Escherichiu coli* ne djeluje niti jedan od ispitivanih ekstrakta.

Izneseno je također mišljenje da je antibiotska tvar kod hepatica koncentrirana u uljnim tjelešcima.

#### L I T E R A T U R A

*Gauze, G. F.* (1959): Lekciji po antibiotikam, Izdanje trjetje, Moskva.

*Müller, K.* (1951—1956): Die Lebermoose in Rabenhorsts Kryptogamenflora, III Auflage, Berlin.

*Token, B. P.* (1951): Fitoncidi, Moskva.

*Toropcev, I. V. i Kamnev, I. E.* (1946): Nekatorije danije o prirode fitoncidov. — Dokladi Akademiji nauk SSSR, 51, 369.



## ZUSAMMENFASSUNG

### UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE ANTIBIOTISCHE WIRKUNG VON MOOSEXTRAKTEN AUF EINIGE BAKTERIEN

Zlatko Pavletić u. Božidar Stilinović  
(Aus dem Botanischen Institut der Universität Zagreb)

In dieser Arbeit wurde die antibiotische Wirkung bei manchen Moosen aus verschiedenen Gebieten Kroatiens untersucht. Einige Arten verschiedener systematischer Gruppen wurden ausgesucht. Im ganzen wurden 14 Arten des Moooses geprüft, u. zw. *Marchantia polymorpha*, *Madotheca platyphylla*, *Plagiochila asplenioides*, *Dicranum scoparium*, *Cinclidotus aquaticus*, *Mnium punctatum*, *M. undulatum*, *Platyhypnidium rusciforme*, *Hypnum cupressiforme*, *Ctenidium molluscum*, *Rhytidiadelphus triquetrus*, *Anomodon viticulosus*, *Isothecium viviparum* und *Campthothecium philippeanum*.

Diese Untersuchungen stellen preliminäre Forschungen dar, die später bedeutend erweitert werden.

Es wurde die antagonistische Wirkung aus gepresster Säfte untersucht, die durch Dreschung ganzer Gametophyten oder ihrer Teile, besonders der Blättchen, bekommen wurden.

Das Moosmaterial wurde am Lande gesammelt und in Wasserkulturen bei einer Temperatur von 10—15° C erhalten.

Die antibiotische Wirkung wurde an bakteriellen Platten untersucht, und als Testorganismen dienten *Bacillus subtilis*, *Sarcina lutea*, *Staphylococcus aureus* vom Gram-positiv und vom Gram-negativ *Escherichia coli*.

Von allen untersuchten Arten zeigten antibiotischen Wirkung *Dicranum scoparium*, *Marchantia polymorpha* und *Madotheca platyphylla*. Die stärkste Aktivität offenbarte die Art *Dicranum scoparium*, u. zw. nur auf grampositiven Bakterien, auf denen sie grosse Inhibitionszonen machen.

Zur Feststellung der Herkunft der aktiven Substanz wurde bei dieser Art der Extrakt aus einzelnen Teilen der Gametophyten genommen und so wurde festgestellt, dass die grösste Aktivität der Extrakt der Blättchen zeigte.

Die vorher genannten Lebermoosen zeigen bedeutend kleinere Zonen der Inhibition, aber sie wirken auch auf die vorher genannten grampositiven Bakterien.

Auf die gramnegative Bakterie *Escherichia coli* wirkt keins von den untersuchten Moosen.