

KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE BILJNIH
ANTIBIOTIKA U ČETINJAČAMA
DALMACIJE

Mit deutscher Zusammenfassung

STOJAN PAGON, JOSIP BAKIĆ i PETAR GANC

(Iz mikrobiološkog odjeljenja Vojne bolnice u Splitu)

Uvod

Prisustvo tvari u nekim višim biljkama koje djeluju izrazito inhibitorno na bakterije, protozoe i funge otkrio je godine 1928. Tokin i time dokazao postojanje antibioze između viših biljaka i mikroorganizama. Ti biljni antibiotici su prvobitno nazvani fitoncidi, pa se taj termin zadržao u upotrebi i do danas, iako sam autor priznaje da je on neadekvatan (1948). Biljni antibiotici mogu biti otopljeni u vodi, prisutni u terpeno-uljasto-eterim dijelovima (Jakimov 1957) ili u isparljivim frakcijama, pa se posljednjima pripisuje uloga kod antimikrobnog pročišćavanja zraka (Komarova 1954). Njihovo djelovanje na kulture bakterija je baktericidno i bakteriostatsko, pa zbog toga dolazi do stvaranja patuljastih kolonija (Sokolova i Voronina 1952). Fitoncidi se kod bijelog luka (*Allium sativum*) nalaze u formi profitoncida, koji prelaze u aktivnu formu kada se prekine cjelina glavice luka. Prema Tokinu »biljka sama sebe sterilizira«, jer se prilikom povrede aktiviraju profitoncidi, koji biljku štite od infekcije. Pošto je stvaranje profitoncida fotosintetičan proces, njegova je proizvodnja u mraku tri puta slabija nego na svjetlu (Nemirović-Dančenko 1952).

Ovi interesantni podaci ruskih autora naveli su nas da kod domaće mediteranske flore, koja inače predstavlja bogat izvor ljekovitog bilja, provjerimo prisustvo biljnih antibiotika.

Upotrebljeni materijal

U našem istraživanju antibiotika kod mediteranskog bilja iz našeg primorskog područja obuhvaćeno je bilo 267 uzoraka sa 174 raznih vrsta. U ovoj radnji želimo, međutim, prikazati samo rezultate istraživanja na četinjačama (tabela 1), radi komparacije dviju kvantitativnih metoda, koje smo provjerili u toku našeg rada.

Tabela 1

Popis ispitanih četinjača s oznakom njihovih lokaliteta prema priloženoj karti

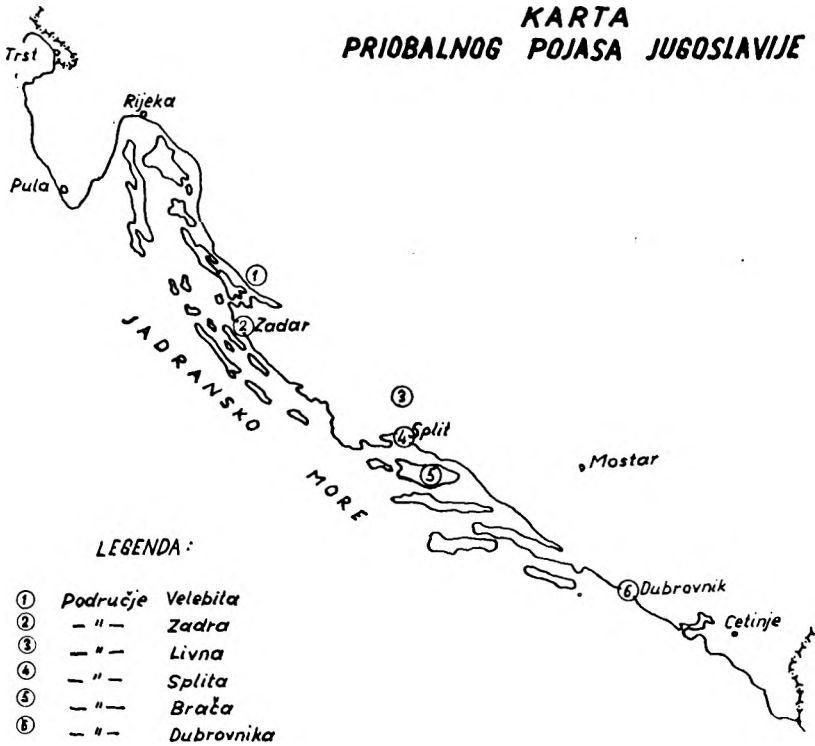
R. b.	Porodica	Vrsta	Lokalitet
1	Taxaceae	<i>Taxus baccata</i> L.	6
2	Pinaceae	<i>Cedrus deodara</i> Laws.	4
3		<i>Cedrus atlantica</i> Manetti	4
4		<i>Pinus nigra</i> ssp. <i>austriaca</i> var. <i>dalmatica</i> Visiani	5
5		<i>Pinus nigra</i> ssp. <i>austriaca</i> Aschers et Graeben	1
6		<i>Pinus halepensis</i> Mill.	4
7		<i>Pinus halepensis</i> var. <i>brutia</i> Henny	2
8		<i>Pinus montana</i> var. <i>mughus</i> Wilk.	1
9		<i>Pinus montana</i> Mill.	3
10		<i>Pinus pineaster</i> Sol.	2
11		<i>Pinus pinea</i> L.	2,4
12		Cupressaceae	<i>Cupressus sempervirens</i> var. <i>stricta</i> Ait.
13	<i>Cupressus sempervirens</i> var. <i>horizontalis</i> Gard.		4
14	<i>Cupressus arizonica</i> Greene		4
15	<i>Juniperus oxycedrus</i> L.		4
16	<i>Juniperus nana</i> Wild.		1
17	<i>Juniperus phoenicea</i> L.		5

Kako se to vidi iz priložene karte, materijal, pretežno iglice četinjača, sakupljen je na raznim lokalitetima. Osim s lokaliteta uz more, istraživanju su bili podvrgnuti i neki uzorci s područja Velebita i planine Cincar kod Livna. Svježi materijal pakovan je na terenu u polietilenske vrećice i odmah dopreman na laboratorijsku obradu.

Metode istraživanja

Od mnoštva kvalitativnih metoda koje preporučuju ruski autori, u našem radu nismo primijenili ni jednu, jer su one mahom samo orijentativne i većinom teško je pomoću njih dokazati pretežno vrlo male količine biljnih antibiotika kao što je to slučaj kod mediteranskog bilja. Zbog toga smo se odmah na početku istraživanja odlučili da koristimo kvantitativne metode po Tokinu i Daniniju (1952), tzv. »kontaktnu« metodu i vlastitu »kombiniranu« metodu (Pagon 1964). U daljnjem izlaganju iznijet ćemo naša iskustva u radu s njima i usporediti njihove vrijednosti.

KARTA PRIOBALNOG POJASA JUGOSLAVIJE



Kontaktna metoda

Kod kontaktne metode upotrebljava se sterilni vodeni ekstrakt biljke, koji se dobije usitnjenjem biljnog materijala u tarioniku uz dodavanje destilirane vode do odnosa 1:5. Nakon maceracije i mućkanja biljna se kaša filtrira najprije kroz obični, a poslije toga kroz Seitzov filter, čime se postizava sterilizacija filtrata bez primjene termičkog postupka. Sterilnost se provjerava zasijavanjem filtrata na krvni agar i dekstrozni bujon.

Od sterilnog vodenog ekstrakta biljke pripreme se u dva reda epruveta progresivna razrjeđenja od 1:5 do 1:80 u 2,5 ml sterilne destilirane vode. U kontrolnim epruvetama svakog reda nalazi se po 2,5 ml sterilne destilirane vode. U prvi red, uključivši i kontrolu, stavlja se po 0,05 ml 18-satne bujonske kulture soja *Staphylococcus aureusa*, a u drugi red po 0,05 ml 18-satne bujonske kulture *Escherichia coli*. Baktericidno antibiotsko djelovanje provjerava se prebacivanjem kultura petljom promjera 1 mm iz svake epruvete i kontrole na po jednu epruvetu s dekstroznim bujonom nakon kontakta (otuda i naziv metode) od 1, 2, 4, 24 i 48 sati. Djelovanje je pozitivno ukoliko bujon ostaje

bistar, a negativno ukoliko se bujon zamuti, jer je klica u tom slučaju preživjela djelovanje ekstrakta. U kontrolnim epruветama mora doći do zamućenja, što svjedoči da je inokulum bio ispravan. Rezultati istraživanja jednog uzorka *Cedrus deodara* (tabela 2) prikazuju efikasnost te metode.

Tabela 2

Rezultati istraživanja antibiotskog djelovanja vodenog ekstrakta *Cedrus deodara* kontaktnom metodom

<i>Cedrus deodara</i> , Split, Marjan 5. V 1963.								
Kontakt sati	Sojevi	Razrjeđenja ekstrakta						
		5	10	20	40	80	160	K
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	O	O	O	O	O	O	O
	<i>Escherichia coli</i>	O	O	O	O	O	O	O
2	<i>Staphylococcus aureus</i>	O	O	O	O	O	O	O
	<i>Escherichia coli</i>	O	O	O	O	O	O	O
4	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	O	O	O	O
	<i>Escherichia coli</i>	O	O	O	O	O	O	O
24	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	O	O	O	O
	<i>Escherichia coli</i>	O	O	O	O	O	O	O
48	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	O	O	O	O
	<i>Escherichia coli</i>	O	O	O	O	O	O	O

Znakovi: + antibiotsko djelovanje pozitivno
O antibiotsko djelovanje negativno

Od istraženih test-sojeva upotrebljeni su po jedan predstavnik gram pozitivnih koka i jedan predstavnik gram negativnih bacila.

Opisanom kontaktnom metodom bilo je testirano 18 uzoraka četinjača. Vrijednost djelovanja izražava se najvećim razrjeđenjem biljnog ekstrakta i najkraćim vremenom koje je bilo potrebno da se pokaže baktericidni efekt na istraživane klice. Tako bi npr. rezultat iz tabele 2. glasio: vodeni ekstrakt iglica *Cedrus deodara* djeluje na ispitivani soj *Staphylococcus aureus* u razrjeđenju 1:20 nakon kontakta od 4 sata. U tom smislu su prikazani u tabeli 3. rezultati svih 18 istraženih predstavnika četinjača zajedno s oznakom sezone kada su uzorci ubrani.

Kolikogod su rezultati jasni, nije međutim jednostavno na prvi pogled usporediti pojedine vrijednosti, npr. djelovanje 1:20 poslije 48 sati s djelovanjem 1:40 poslije 4 sata i sl. Zbog toga je za našu vlastitu upotrebu izrađen indeks djelovanja, koji pruža mogućnost relativnog međusobnog uspoređivanja djelovanja (tabela 4).

Tabela 3

Vrijednosti antibiotskog djelovanja iglica četinjača ispitanih kontaktnom metodom

R. b.	Naziv biljke	Staphyl. aureus			Escherich. coli			Sezona branja
		kon- takt sati	razrje- đenje	indeks djelo- vanja	kon- takt sati	razrje- đenje	indeks djelo- vanja	
1.	Cedrus deodara			0	48	1:40	8	ljetno
2.	Cedrus deodara	24	1:20	8			0	zimno
3.	Cedrus deodara	4	1:20	48			0	zimno
4.	Cedrus atlantica			0	24	1:40	16	ljetno
5.	Cedrus atlantica	48	1:5	1			0	zimno
6.	Pinus nigra v. dalmatica	48	1:20	4			0	ljetno
7.	Pinus halepensis	24	1:10	4			0	ljetno
8.	Pinus halep. v. brutia	24	1:40	16			0	ljetno
9.	Pinus pineaster	24	1:40	16			0	ljetno
10.	Pinus pineaster	24	1:10	4			0	zimno
11.	Pinus pinea	2	1:20	96			0	ljetno
12.	Pinus pinea	4	1:10	24			0	zimno
13.	Pinus pinea			0			0	zimno
14.	Cupressus s. var. stricta	48	1:10	2			0	ljetno
15.	Cupressus s. v. horizont.			0			0	ljetno
16.	Cupressus arizonica			0			0	ljetno
17.	Juniperus oxycedrus			0			0	ljetno
18.	Juniperus phoenicea	24	1:10	4			0	ljetno

Tabela 4

Izračunavanje antibiotskog indeksa kod kontaktne metode

Razrje- đenje	Sati trajanja kontakta				
	1	2	4	24	48
1:5	48	24	12	2	1
1:10	96	48	24	4	2
1:20	192	96	48	8	4
1:40	384	192	96	16	8
1:80	768	384	192	32	16

Najslabiji stupanj djelovanja (deblja brojka u tabeli) predstavlja razrjeđenje 1 : 5 s kontaktom od 48 sati. Ako to djelovanje označimo indeksom 1, možemo preko njega izvesti sve ostale vrijednosti

Razrjeđenje	Kontakt	Indeks
1 : 5	48 h	1
1 : 5	24 h	2
1 : 5	4 h	12

Premda je ova tablica potpuno proizvoljna, omogućuje unutar pokusa koji su izvedeni relativno uspoređivanje rezultata.

Uspirkos dobrim stranama kontaktne metode pred kvalitativnim metodama, pokazali su se u daljnjem radu i neki nedostaci. Tako se njome može dokazivati samo baktericidni a ne i bakteriostatski efekt. Gustoća bakterijskog inokuluma također pokazuje uvijek izvjesne varijacije, što nije poželjno za standardnu metodu. Osim toga je teško predočiti pravu antibiotsku vrijednost djelovanja bez usporedbe s nekim poznatim antibiotskim sredstvom. Prikazani indeks djelovanja kod kontaktne metode može poslužiti korisno samo unutar jedne izvedene grupe pokusa.

U nastojanju da se uklone navedeni nedostaci sastavljena je vlastita laboratorijska metoda, koja objedinjuje neke poznate tehnike prilagođene našem zadatku, pa smo je stoga nazvali kombinirana metoda (1. c).

Kombinirana metoda

Priređivanje sterilnih vodenih ekstrakta poboljšano je nekim tehničkim modifikacijama. Pokazalo se, naime, da je za usitnjavanje biljnog materijala najpodesniji obični mlinac za orahe, a za istiskivanje vodene mješavine specijalna hidraulična preša, kojom se može izvesti pritisak od 300 Atm. Na taj način se pripremao osnovni vodeni ekstrakt biljke u razrjeđenju 1 : 5 (1 dio biljne kaše na 4 dijela destilirane vode), steriliziran filtracijom kroz Seitzov filter.

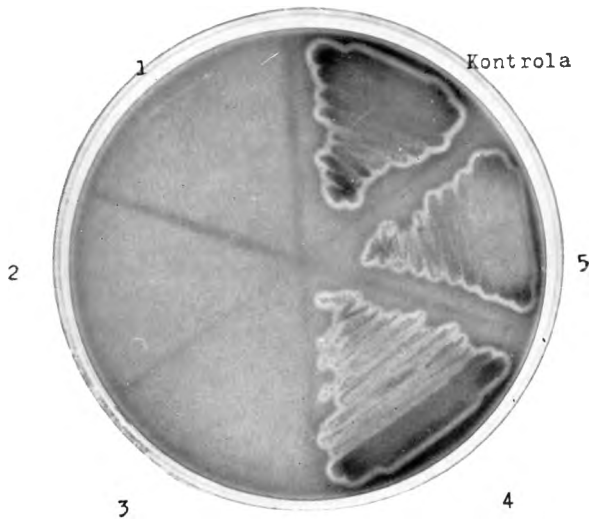
Reakcija se izvodi sa 18-satnom bujonskom kulturom *Staphylococcus aureus* (soj 409 P), koja je bujonom razrijeđena u odnosu 1 : 50.000 i podijeljena u dva reda epruveta, u količini od 1 ml. U prvom redu se bakterije tretiraju s progresivnim razrjeđenjima sterilnog vodenog ekstrakta biljke od 1 : 10 dalje, a u drugom se redu epruveta ista suspenzija tretira s poznatim dozama penicilina od 1 jedinice u 1 ml na niže.

Potpuno isti postupak se ponavlja u dva reda epruveta s bujonskom kulturom *Escherichia coli* (soj rutinskog materijala) i s biljnim ekstraktom u komparaciji s poznatim količinama streptomicina od 5 gama na niže.

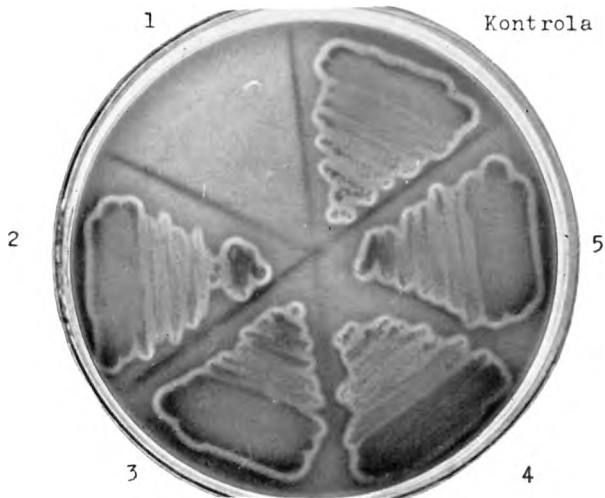
Nakon 24-satne inkubacije kod 37 °C određuje se rezultat djelovanja, pa se na sl. 1. može zapaziti da su prve tri epruvete s ekstraktom *Cedrus deodara* ostale bistre, dok je u redu s poznatim količinama klasičnih antibiotika vidljivo da je isti baktericidni efekt postigla količina od 5 gama streptomicina.



Sl. 1. Uspoređivanje djelovanja ekstrakta *Cedrus deodara* i poznatih količina streptomicina za soj *Escherichia coli*



Sl. 2. Provjeravanje baktericidnog djelovanja ekstrakta *Cedrus deodara* na *Escherichia coli* kulturom na krvnom agaru



Sl. 3. Provjeravanje baktericidnog djelovanja poznatih količina streptomicina na *Escherichia coli* kulturom na krvnom agaru

Antibiotsko baktericidno djelovanje prikazano na sl. 1. provjerava se prebacivanjem kulture petljom promjera 1 mm iz svake epruvete na pojedine sektore krvnog agara, a rezultat čita nakon 24-satne inkubacije. Ekstrakt iz *Cedrus deodara*, razrijeđen 1:40, inhibirao je rast *Escherichia coli* još u trećoj epruveti i zato na prva tri sektora krvnog agara nema porasta (sl. 2). U redu sa streptomycinom vidimo da je isti antibiotski-baktericidni efekt postignut u prvoj epruveti sa 5 gama streptomicina, pa zato na prvom sektoru krvnog agara nema porasta (sl. 3). Prema tome možemo ta dva djelovanja međusobno usporediti ovako:

Ekstrakt *Cedrus deodara* razrijeđen u odnosu 1:40 djeluje jednako kao 5 gama streptomicina u 1 ml. Ako želimo utvrditi koliko gama streptomicinuskog ekvivalenta sadrži 1 g iglica *Cedrus deodara*, moramo jednadžbu (*Cedrus deodara* 1/40 = 5 grama streptomicina) pomnožiti sa 40, jer je biljna kašica iglica himalajskog cedra bila razrijeđena u odnosu 1:40. Na taj način dobijemo rezultat da istraživani uzorak *Cedrus deodara* sadrži 200 gama baktericidnog streptomicinuskog ekvivalenta.

U prikazanom primjeru slučajno nije vidljiv i bakteriostatski efekt, koji se očituje u smanjenom porastu bakterija. U tom slučaju može doći do djelomičnog zamućenja u pojedinoj epruveti, kako u redu s biljnim ekstraktom, tako i u redu s poznatim antibiotikom. Još bolje se ta pojava može pratiti na odgovarajućem sektoru krvnog agara, gdje se ta bakteriostatičnost može pratiti u svim gradacijama od pojave pojedinačnih kolonija do samo neznatnog smanjenja porasta u usporedbi s kontrolom (2/3 porasta ili 3/4 porasta). Izračunavanje bakteriostatskog djelovanja je analogno kao kod baktericidnog djelovanja, bazirano na principu uspoređivanja istih intenziteta djelovanja.

Rezultat djelovanja vodenih ekstrakta biljaka se prema tome izražava kod kombinirane metode ekvivalentom baktericidnog i bakteriostatskog djelovanja u usporedbi s klasičnim antibioticima. Tom metodom bio je istražen 21 uzorak četinjača Dalmacije (tabela 5).

Diskusija

Našim ispitivanjem je bila obuhvaćena u cjelini grupa četinjača iz nekih krajeva našeg primorja, pa je u svakom slučaju interesantno usporediti naše rezultate s onima ruskih autora, koji toj biljnoj grupi pripisuju znatnu baktericidnu aktivnost. Prašak iglica sibirske jele (*Abies sibirica* Ledeb.), takozvani »Pihtoform«, prema navodima Pavolockog (1959) smanjuje upalnu reakciju i pospješuje zarašćivanje eksperimentalnih kožnih rana. Isparljivi fitoncidi jele, za koje se pretpostavlja da su visoko baktericidna eterska ulja, također djeluju povoljno na regenerativne procese eksperimentalnih rana nakon ekspozicije od 15 minuta, dok daljnja ekspozicija od 30 minuta djeluje nepovoljno (Mironova 1959). Vitgeft (1959) je proučavao djelovanje iglica i kore neko-licine četinjača iz okoline Tomska (*Pinus silvestris*, *Pinus sibirica*, *Abies sibirica*, *Picea obovata* i *Larix sibirica*) na uzročnike difterije. Primi-

Tabela 5

Količine antibiotskog ekvivalenta uzoraka četinjača istraženih kombiniranom metodom u 1 g biljne supstancije

R. b.	Naziv biljke	Materijal	Penicilin		Streptomicin	
			bakteri- cidno djelov.	bakterio- stasko djelov.	bakteri- cidno djelov.	bakterio- stasko djelov.
1	<i>Taxus baccata</i>	iglice	0	0	0	0
2	<i>Cedrus deodara</i>	iglice	0,3125	0	—	—
3	<i>Cedrus atlantica</i>	iglice	0,078125	0	0	1,171875
4	<i>Cedrus atlantica</i>	plod	0	0	0	0
5	<i>Pinus nigra v. dalmatica</i>	iglice	0	0	0	0
6	<i>Pinus nigra v. dalmatica</i>	plod	0	0	0	0
7	<i>Pinus nigra ssp. austr.</i>	iglice	0	0	0	0
8	<i>Pinus halepensis</i>	iglice	0,15625	0	0	0
9	<i>Pinus halep. v. brutia</i>	iglice	0	0	0	0
10	<i>Pinus montana v. mughus</i>	iglice	0	0,234375	0	0
11	<i>Pinus montana</i>	iglice	0,3125	0	0	0
12	<i>Pinus pineaster</i>	iglice	0,3125	0	6,25	0
13	<i>Pinus pinea</i>	iglice	0	0	0	0
14	<i>Cupressus s. v. stricta</i>	iglice	0	0	0	0
15	<i>Cupressus s. v. horizont.</i>	iglice	0	0	0	0
16	<i>Cupressus arizonica</i>	iglice	0	0	0	0
17	<i>Juniperus oxycedrus</i>	iglice	0	0	0	0
18	<i>Juniperus oxycedrus</i>	plod	0	0	0	0
19	<i>Juniperus nana</i>	iglice	0	0	0	0
20	<i>Juniperus phoenicea</i>	iglice	0	0	0	0
21	<i>Juniperus phoenicea</i>	plod	0	0	0	0

Znakovi: 0 antibiotsko djelovanje negativno
— nije radeno

Tabela 6

Uspoređenje indeksa antibiotskog djelovanja kod porodica borova i čempresa

Staphylococcus aureus		Escherichia coli	
borovi	čempresi	borovi	čempresi
17	1,2	1,7	0

jetio je da su naročito djelotvorne smole, koje su pokazivale baktericidnu aktivnost na izabrane sojeve *Corynebacterium diptheriae* u razrjeđenjima od 1 : 4 000 (*Picea obovata*) do 1 : 640 000 (*Pinus sibirica*). Izražene baktericidne osobine smola i balzama potvrdio je također Jakimov (1957), koji je našao da terpeno-etero-uljasti dio četinjača djeluje na bakterije u razrjeđenju od 1 : 75 000. Pojedine vrste roda *Juniperus* i cedrova djeluju inhibitorno na infuzorije (Drobotko i dr. 1958).

Nasuprot dobrim rezultatima ruskih autora s njihovim vrstama četinjača, naša su istraživanja pokazala vrlo skroman sadržaj penicilinskog i streptomocinskog tipa, pa čak u uspoređenju s ostalim pripadnicima mediteranske flore, kod kojih su nađene vrijednosti do 10 jedinica penicilinskog i do 800 gama streptomocinskog ekvivalenta u 1 g biljne supstancije.

Uspoređivanjem rezultata antibiotskog djelovanja kod porodica borova i čempresa dobivenih kontaktnom metodom utvrđeno je da je sadržaj biljnih antibiotika višestruko veći kod porodice borova nego kod porodica tisa i čempresa (tabela 6), dok se kombiniranom metodom kod porodica tisa i čempresa uopće nije mogla utvrditi antibiotska djelatnost njihovih sokova.

Kod uzoraka četinjača su u većoj mjeri prisutni penicilinski tipovi antibiotika nego streptomocinski, te prema rezultatima obadviju metoda, kontaktne i kombinirane, taj je odnos 18 prema 4 uzorka u korist penicilinskog tipa.

Utjecaj sezone branja uzoraka na količinu biljnih antibiotika odražava se u kvalitativnom i kvantitativnom pogledu. Kod uzoraka himalajskog i atlantskog cedra, ubranih ljeti, registrirani su antibiotici streptomocinskog tipa, dok su kod zimskih uzoraka nađeni antibiotici penicilinskog tipa (tabela 3). Također se može pratiti opadanje aktivnosti na relaciji ljeto-zima. Kod uzoraka *Pinus pineaster*, s indeksom djelovanja 16 u ljetnom uzorku, dokazan je u zimskom samo indeks 4. Uzorak *Pinus pinea* je mjeseca jula pokazivao visoki indeks 96, decembra još indeks 24, dok je u februaru nalaz bio negativan.

Četiri uzorka ploda koji su bili pregledani kombiniranom metodom nisu pokazivali prisustvo biljnih antibiotika.

U odnosu na ostale pripadnike mediteranske flore grupa četinjača pokazuje niske vrijednosti biljnih antibiotika.

Z a k l j u č a k

1. Kombiniranom metodom moguće je kvantitativno odrediti baktericidno i bakteriostatsko djelovanje pomoću ekvivalenta prema klasičnim antibioticima.

2. Porodica borova sadrži više biljnih antibiotika od porodice tisa i čempresa.

3. U četinjačama Dalmacije prevladava penicilinski tip antibiotika.

4. Kod uzoraka četinjača ubranih zimi smanjuje se, iščezava ili dolazi do promjene tipa antibiotika u uspoređenju s uzorcima ubranih ljeti.

5. Ispitani uzorci plodova četinjača nisu sadržali antibiotskih tvari.
6. Količina biljnih antibiotika u četinjačama Dalmacije u uspoređenju s ostalim mediteranskim biljkama je neznatna.

*

Dugujemo osobitu zahvalnost naučnom suradniku Instituta za jadranske kulture i melioraciju Krša u Splitu inž. Dušanu Jedlowskom i upravniku Šumskog gospodarstva u Zadru inž. Branku Tkalčiću za stručne savjete i pomoć kod prikupljanja biljaka.

Tehnički saradnici: medicinski laboranti Koviljka Radusinović-Jovanović i Anka Zalović.

Fotografije snimila Mira Kovačić.

R e z i m e

Prikazane su dvije kvantitativne metode za određivanje antibiotika u višem bilju i istraženi predstavnici četinjača Dalmacije iz porodica tisa, borova i čempresa. »Kontaktnom« metodom po Tokinu i Daniniju pregledano je 18 biljnih uzoraka, a vlastitom »kombiniranom« metodom 21 biljni uzorak. Prednosti kombinirane metode su u preciznom određivanju antibiotskog ekvivalenta, pri čemu postoji i mogućnost odvojenog prikazivanja baktericidnog i bakteriostatskog djelovanja izraženog s vrijednostima klasičnih antibiotika.

Kod pripadnika borova može se utvrditi veća količina biljnih antibiotika nego kod čempresa i tisa. Sadržaj penicilinu sličnih je četiri i pol puta veći od sadržaja streptomycinu sličnih supstancija. Utjecaj sezone branja manifestira se smanjivanjem ili čak potpunim iščezavanjem biljnih antibiotika u zimskim mjesecima. Na uzorcima cedra zapaženo je da ljeti prevladava streptomycinški tip, a zimi penicilinski tip biljnih antibiotika. U istraženim uzorcima plodova nisu dokazane antibiotske tvari. Količina biljnih antibiotika u četinjačama Dalmacije u usporedbi s ostalim pripadnicima mediteranskih biljaka je neznatna.

L i t e r a t u r a

1. Adamović, L., 1911: Biljnogeografske formacije zimzelenog pojasa Dalmacije, Hercegovine i Crne Gore, Rad JAZU 188, 1-54.
2. Anić, M., 1946: Šumarski priručnik, Poljoprivredni nakladni zavod, Zagreb, 475-495.
3. Danini, E. M., 1952: Elementarne metodiki izučeniya antibakterialnih svojstv fitonciodov visših rastenij, Sb. »Fitoncidi. ih rolj v prirode i značenje dlja medicini«, M. Izd. AMN SSSR, 330-334.
4. Domac, R., 1950: Flora za određivanje i upoznavanje bilja, Zagreb.
5. Dobrotko, V. G., Eisenman, B. E., Švaiger, M. O., Zelepuha, S. I. i Mandrik T. P., 1958: Antimikrobnie veščestva visših rastenij, Izdatelstvo Akademii Ukr. SSR, Kiev, 139-148.
6. Fiori, A., 1921: Iconografia florae Italice, Sancasiano.
7. Fiori, A., 1923-1929: Nuova flora analitica d'Italia, Vol. I et II, Firenze.

8. *Giperborejski, B. i Marković, T.* 1952: Dendrologija, Svjetlost, Sarajevo.
9. *Girometa, U.*, 1922: Flora Marjana, Split.
10. *Gramenickaja, V. G.*, 1952: O baktericidnih svojstvah česnoka (*Allium sativum* L.), Sb. »Fitoncidi ih rolj v prirode i značenje dlja medicini«, Izd. AMN SSSR, M., 50-64.
11. *Hayek, A.*, 1933: *Prodromus Florae peninsulae Balcanicae*, Bd. I-III, Berlin-Dahlem.
12. *Horvatić, S.*, 1954: *Ilustrirani bilinar*, Zagreb.
13. *Jakimov, P. A.*, 1957: Fitoncidi i svojstva smol i balzamov obrazuernih drevno-hvojnimi porodami i zadači dalneiših issledovanij v etoi oblasti, Fitoncidi ih rolj v prirode, Izdatelstvo leningradskogo universiteta, 132-134.
14. *Komarova, M. A.*: 1954: Opit ispolzovanija fitoncidov pri sanaciji vozduha pomeščenij detskih jaslej, Inst. eksp. med AMN SSSR, Tezisi dokladov, 27-28.
15. *Mironova, N. P.*, 1959: Vlijanie fitoncidov nekotarih rastenij na zaživlenie eksperimentalnih kožnih ran, Fitoncidi v medicine, Izdatelstvo Akademii nauk Ukrainskoj SSR, Kiev, 139-147.
16. *Nemirović-Dančenko, M. M.*, 1952: Fitoncidi česnoka v processe ontogeneza etogo rastenija, Sb. Fitoncidi ih rolj v prirode i značenje dlja medicini. Izd. AMN. SSSR, 75-78.
17. *Pagon, S.*, 1964: Antibiotiske supstancije s područja Dalmacije, Doktorska disertacija, Zagreb.
18. *Pagon, S., Kraljević, Lj., Bakić, J., Jakobušić, A., Sokolić, J. i Škaričić, T.*: 1965: Određivanje antibiotskih supstancija u biljkama Dalmacije i njihovo djelovanje na inficirane rane, *Acta medica Iugoslavica*, Vol. XIX, Fasc. 2, 152-175.
19. *Pavari, A.*, 1954: Cenni botanici sulle conifere, *Monti e boschi*, rivista mensile del Touring Club Italiano, No 11-12, Milano.
20. *Pavletić, Z., Stilinović, B.*, 1963: Istraživanja antibiotskog djelovanja ekstrakta mahovina na neke bakterije, *Acta botanica Croatica* 22, 133-139.
21. *Pavolocki, Š. I.*, 1959: Eksperimentalno-kliničeskoe issledovanie fitoncidnih preparatov pihti, Fitoncidi v medicine, Izdatelstvo Akademii nauk Ukrainskoj SSR, Kiev, 27-39.
22. *Sokolova, N. M. i Voronina, E. V.* 1952: Vlijanie fitoncidov česnoka na kulj-turu brjušnoga tifa (*B. typhi abdominalis*), Sb. Fitoncidi ih rolj v prirode i značenje dlja medicini, Izd. AMN. SSSR, M., 230-237.
23. *Stilinović, B. i Pavletić, Z.*, 1962: Antagonističko djelovanje nekih oblika roda *Streptomyces* iz zemlje crvenice s otoka Prvića u Dalmaciji, *Acta botanica Croatica* 20/21, 39-46.
24. *Tassinari, G.*, 1941: *Manuale dell'agronomo (Conifere)* Ramo editoriale degli agricoltori, Roma, 542-552.
25. *Tokar, R. G. i Pavolocki, Š. I.*, 1959: Antibakterialnoe deistvie fitoncidov pihti na nekotarie vidi mikrobov, Fitoncidi v medicine, Izdatelstvo Akademii nauk Ukrainskoj SSR, Kiev, 83-85.
26. *Tokin, B. P.*, 1948: Fitoncidi, Izd. AMN. SSSR, M., I izd.
27. *Tokin, B. P.*, 1937: (Pod redakcijej) Fitoncidi, ih rolj v prirode, Izabranne dokladi vtorigo soveščanija po probleme fitoncidov, (Kiev 4-7 ijunia 1955 g.), Izdatelstvo leningradskogo universiteta.
28. *Trifunović, D.*, 1954: Borovi, Institut za naučna istraživanja i šumarstvo Srbije, Beograd.
29. *Tucakov, J.*: Antibiotici u višem bilju, *Galenika* 7, 377.
30. *Vitgeft, A. E.*, 1959: Deistvie fitoncidov hvojnih rastenij na vzbuditelja difterii, Fitoncidi v medicine, Izdatelstvo Akademii nauk Ukrainskog SSR, Kiev, 199.

ZUSAMMENFASSUNG

DIE QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER PFLANZLICHEN ANTIBIOTICA IN DEN NADELHÖLZERN DALMATIENS

Stojan Pagon, Josip Bakić und Petar Ganc

Es wurden zwei quantitative Methoden für die Bestimmung der Antibiotica in höheren Pflanzen dargestellt, mit welchen die Nadelhölzer aus der Familien der Kiefer-, Zypressen und Eibengewächse geprüft worden sind. Mit sogenannten »kontakten« Methode nach Tokin und Danini wurden 18 und mit eigener sogenannten »kombinierten« Methode 21 pflanzlichen Muster untersucht. Die Vorteile der kombinierten Methode zeigen sich in der präzisen Bestimmung des antibiotischen Equivalentes, ausgedrückt mit den Werten der klassischen Antibiotica, wobei sich auch die Möglichkeit der separaten Darstellung der bakteriziden und bakterio-statischen Wirkung darbietet.

Bei den Vertretern der Kiefergewächse konnte man ein grösseres Gehalt der pflanzlichen Antibiotica, als bei den Zypressen und Eibengewächse feststellen. Das Gehalt an Penicillinähnlichen Substanzen ist vier und ein halb mal so gross wie jenes an Streptomycinähnlichen. Der Einfluss der Sammlungszeit prägt sich durch eine Verminderung oder sogar durch das vollkommene Verschwinden der pflanzlichen Antibiotica in den Wintermonaten. Beim Pflanzenmaterial der Zedern wurde in der Sommerzeit eine Prävalenz des Streptomycintyp, im Winter aber eines Penicillintyp der pflanzlichen Antibiotica beobachtet. Im geprüften Material von den Früchten wurden keine antibiotischen Stoffe nachgewiesen.

Das antibiotische Gehalt in den Nadelhölzern Dalmatiens im Vergleich mit den anderen Vertretern der mediteranischen Pflanzen ist gering.