

Mr. prof. Ignac Munjko
 Dipl. ing. Ružica Mikličan
 Služba za kontrolu voda — OKI, Zagreb

Prilog poznavanju biorazgradnje fenola pomoću lišajeva

Uvod

U našoj literaturi ima malo podataka o biološkoj aktivnosti lišajeva. Pokorny (1970) ispituje metabolički put d-metionina u lišajevima i nalazi da je metabolički put d-izomera aminokiseline strogo određen evolucionim stupnjem biljne kategorije. Lišajevi zbog specifičnog načina života zauzimaju posebno mjesto među biljkama. Rezultati ukazuju da oni metaboliziraju d-aminokiseline na jedan drugi način nego ostale kategorije bilja. O kemijskom sastavu lišajeva postoji dosta radova, koji su važni zbog njegove taksonomije (Santesson, 1969, a, b, Culberson, 1970, Petro-Parvis et al., 1970). Nifontova (1967) ispituje mogućnost fiksacije $^{14}\text{CO}_2$ (sa 20 °C); pri povišenoj temperaturi (50°C—25,6‰, 100°C—1,6‰). Richardson i Smith (1968) pomoću ^{14}C iz NaHCO_3 dokazuju da lišajevi uzimaju ugljikovodike za vrijeme fotosinteze. U studijama o prelaženju ugljika iz alga u gljive služe se markiranim $^{14}\text{CO}_2$ Mosbach (1967) i Barashkova (1968).

Mnogo se radi na izolaciji lišajskih kiselina, jer neke od njih imaju antibiotsko djelovanje (usninska). Dosada su izolirane parietinska, laktonska, izousninska, fenolna, giroforna i druge (Shibata i Taguchi, 1967, Fox i Mosbach, 1967, Heneck i Follmann, 1967, Bloomer et al., 1968, Piatelli i Giudici, 1968, Mitchell i Shibata, 1969, Taguchi et al.,

1969). Mosbach (1967) je izolirao vulpinsku kiselinu ($C_{19}H_{14}O_5$) iz gljive lišaja *Candelariella vitellina* (uzgojenog na ekstraktu slada), koju nije našao u samom lišaju. Goas i Bernard (1967) ispitali su mogućnost korištenja dušika iz amina i amida.

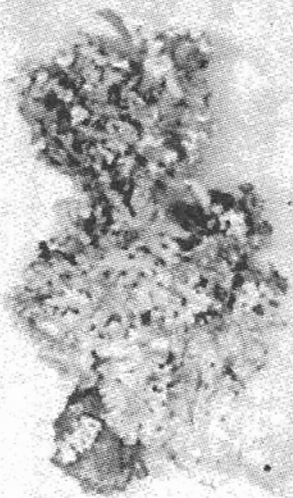
Aktivne invertaze, amilaze, betaglukozidaze, cireaze, katalaze i fenoloksidaze kod lišajeva dokazuju Galstryan i Avundzhyan (1967) i Seibert (1970).

Poznato je da je nestanak flore lišajeva indikator industrijskog zagađenja zraka od plinova kao što su SO_2 , SO_3 , H_2S , HF i dr. (Munjko, 1970). Međutim Pyatt (1968) ispituje inhibitorско djelovanje SO_2 u količini od 2 ppm na lišajeve, a Schoenbeck (1968) određuje najnižu koncentraciju SO_2 u količini od 0,08 mg/m³, od koje ostaje na životu 40% lišajeva nakon 68 dana. Koncentracija od 0,04 mg/m³ SO_2 ne djeluje otrovno na floru lišajeva. Paribok (1970) dokazuje da lišajevi akumuliraju 10—100 puta veće količine Fe, Ti, Pb, Sn i dr. od drugih biljaka, a Gilbert (1971) ispituje akumuliranje sumpora na lišajevima. Santesson (1969 i 1970) ispituje 230 vrsta roda *Caloplaca*, te spektrofotometrijski i kromatografski određuje ksantorin, fragilin, emodin i dr.

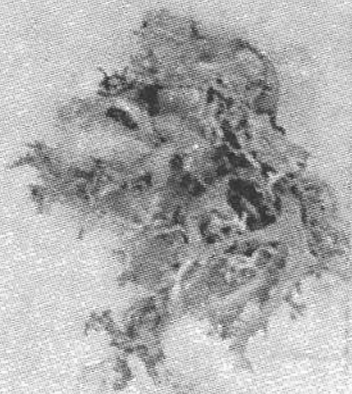
Triterpene iz lišaja *Stictis mangietina* izolirali su Corbett i Cumming (1971). Shibata et al., (1971) izolirali su iz *Centuria islandica* kruti polisaharid koji dobro djeluje na sarkom-180, kod miševa. De Silva i Jansen (1971) izolirali su iz 21 vrste lišajeva vitamine E i D. Kod nas prve pokuse biorazgradnje fenola pomoću mikroflora lišaja radi Munjko (1971). Zapaženo je da postoji vrlo bogata flora lišajeva na otoku Olibu u blizini žala, koja su jako zagađena teškim alkilatima (katran, mazut), čiji se miris širi u unutrašnjost otoka. U Gorskom kotaru je također primjećeno da lišajevi ne ugibaju u neposrednoj blizini mazuta, koji je proličen iz autocisterne. Prilikom naših ispitivanja zanimalo nas je kako se ponašaju lišajevi u vodenom mediju koji sadrži visoke koncentracije fenola (do 500 ppm) i da li su sposobni svojim fenoloksidazama razgraditi fenol i do kojeg stupnja.

Materijal i metodika rada

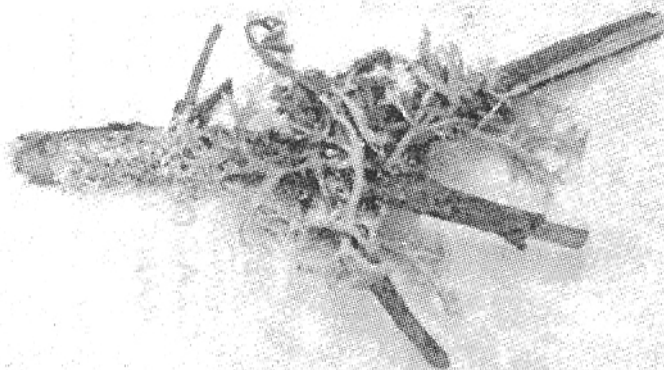
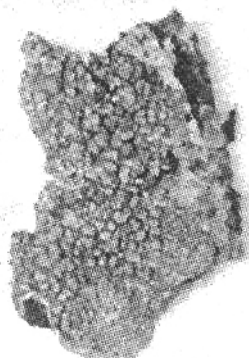
Ispitivanja su započela 21. srpnja 1969. i trajala su do 28. rujna 1971. godine. Dala su niz zanimljivih podataka kao prilog poznavanju biokemijske aktivnosti lišajeva i njihove mikroflora.



Objekt LICHENES
Razred ASCOLICHENES
Rod DARMELIA
Vista



Objekt LICHENES
Razred ASCOLICHENES
Rod CLADONIA
Vista **CLADONIA**
RANGIFERA



Uzorci *Xanthoria parietina* ubrani su sa Titove pećine na otoku Visu (21. VII 1969), gdje je ima u velikim količinama. Ista vrsta ubrana je 24. VII 1971. na Biševu, na vrhu pećine (iznad uvale Balun), u kojoj se nalazi Modra spilja. Ovdje je nalazimo dosta rijetko, u neznatnim količinama.



Vrste *Rhizocarpon geographicum*, *Cladonia foliacea* var. *convulata*, te *Cladonia rangifera* sakuplene su na otoku Olibu uz kamenu ogradu na putu prema uvali, gdje je uzemljen električni dalekovod. Želimo navesti da se na puteljcima prema južnoj uvali (bivše pristanište), nailazi na mnoštvo malih busenića pomenutih vrsta lišajeva, kao i na lišajeve imperfekte. Lišajevi imperfekti ubrani su sa kore drveta u Savskom Marofu, (23. VIII 1971) i u Postojni (22. IX 1971).

Pokuse biorazgradnje fenola radili smo i sa neodređenim vrstama (*Usnea* sp., *Parmelia* sp., *Cetraria* sp., te *Petrusaria communia*) koje su ubrane na otocima Visu i Svecu i na planini Zlataru.

Metodika rada

Uzorci lišajeva sakupljeni su u sterilne polietilenske vrećice. Količini od 1 g uzorka određene vrste lišaja u Winklerovoj bočici od 300 ml dodalo se 100 ml sterilne otopine fenola (100 ili 500 ppm) sa 0,6% (NH₄)₂HPO₄. Tako pripremljeni uzorak dobro se promućkao, odredio se pH i količina fenola, a zatim je uzorak stavljen u inkubator na 20°C, termostat na 30°C ili je ostavljen na sobnoj temperaturi koja se za vrijeme pokusa kretala između 23—27°C. Nakon određenog vremena opet bi se ustanovio pH i preostali fenol prema Schmauh-Grubbovoj metodi pri 289 nm (vidi JUS.H.Z1. 147).

Rezultati ispitivanja

Tabela 1. Komparativna ispitivanja biorazgradnje fenola (100 ppm) pomoću lišajeva nakon 4 dana uz 0,6% (NH₄)₂HPO₄ pri 20°C i 25°C

Vrsta lišaja	pH kod 20°C		pH kod 25°C		% biološke razgradnje fenola	
	prije pokusa	nakon pokusa	prije pokusa	nakon pokusa	20°C	25°C
Rhizocarpon geographicum	8,0	6,7	8,0	6,6	93,0	98,0
Cladonia foliacea var. convulata	8,0	6,7	8,0	6,7	96,0	99,0
Cladonia rangifera	8,0	7,0	8,0	7,1	99,0	99,9
Xanthoria parietina	8,0	6,7	8,0	7,2	99,0	99,9

Također su se vršila ispitivanja sa *Xanthoria p.* koja je držana godinu dana u polietilenskoj vrećici na suhom i tamnom mjestu. Od 300 ppm fenola razgradilo se 34% nakon 7 dana na 37°C a pH se smanjio sa 7,4 na 7,1.

Nasađivanjem kulture lišaja, koja je držana 14 dana u otopini fenola, na simoncitratnu podlogu promijenila se kroz 24 sata boja podloge od zelene u plavu.

Nasađivanjem kulture lišaja na hranljivi agar, koji sadrži 2,3,5-tri-feniltetrazolijev klorid (TTC), mjesta oko samog lišaja sva su pocrvenjela.

Tabela 2. Komparativna ispitivanja biorazgradnje fenola (500 ppm) nakon 7 i 14 dana pomoću lišajeva uz 0,6% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ pri 37°C

Vrsta lišajeva	pH nakon dana			% biorazgradnje fenola nakon dana	
	0	7	14	7	14
<i>Rhizocarpon geographicum</i>	7,5	6,1	7,9	45,0	92,0
<i>Cladonia foliacea</i> var. <i>convulata</i>	7,5	6,3	7,1	96,0	99,6
<i>Cladonia rangifera</i>	7,5	6,8	7,3	94,0	99,6
<i>Xanthoria parietina</i>	7,5	5,9	6,2	87,0	99,2
<i>Lichenes imperfecti</i>	7,5	6,9	6,1	10,0	99,0
<i>Usnea</i> sp.	7,5	6,7	7,3	63,0	90,8
<i>Petrusaria communis</i>	7,5	6,5	6,9	50,0	74,0
<i>Cetraria</i> sp.	7,5	7,1	7,6	10,0	37,0
<i>Parmelia</i> sp.	7,5	7,0	7,3	40,0	86,0

ppm = dijelova na milion

Tokom pokusa biorazgradnje fenola pomoću lišajeva primjećeno je da se u uzorcima sa *Xanthoria parietina* i *Lichenes imperfecti* već nakon tri dana stvorila velika količina pjene, a miris fenola bio je zamijenjen jednim vrlo neugodnim mirisom. Međutim u ostalih vrsta također dolazi do stvaranja pjene i ugodnog mirisa na koru drveta. Također je primjećeno da lišajevi ne gube svoja morfološka svojstva, kao što su čvrstoća i boja talusa (osim *Cetraria* sp., čiji je talus postao mekan i lako se lomio pri dodiru).

Diskusija o rezultatima

Rezultati iz tabela 1 i 2 jasno nam pokazuju da lišajevi i njihova mikroflora posjeduju mehanizme- fenoloksidaze, pomoću kojih

razgrađuju fenol sve do CO_2 i koriste se njime kao jedinim izvorom ugljika u podlozi.

Od ekoloških faktora važni su temperatura i koncentracija fenola, kao i vrijeme trajanja pokusa. Po mjerenjima pH vrijednosti prije i nakon pokusa vidi se da se biorazgradnjom fenola stvaraju neke lišajske kiseline, koje se kasnije i same potpuno ili djelomično razgrađuju.

Ovi pokusi (Tabele 1 i 2) dokazuju da lišajevi nisu osjetljivi na količine fenola od 100 i 500 ppm, kao što su osjetljivi na SO_2 .

Zaključak

Lišajevi i njihova mikroflora sposobni su da se koriste fenolom kao jedinim izvorom ugljika, a istovremeno dobro reduciraju TTC i koriste se limunskom kiselinom iz podloge simoncitrata.

Stupanj njihove biorazgradnje fenola ovisi o vrsti lišajeva, a ne o geografskom smještaju nađene vrste, jer fenol podjednako razgrađuju lišajevi koji žive kao endoliti i kao epifiti.

Mr. prof. Ignac Munjko
Dipl. ing. Ružica Mikličan
Water Control Service
OKI — Zagreb

CONTRIBUTION TO THE KNOWLEDGE OF THE BIODEGRADATION OF PHENOLS BY LICHENES

In the first part of the study comparative tests of biodegradation of 100 ppm of phenol were performed in fluid medium with 0,6% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ at 20°C and 25°C over 4 days.

In the second part of the study comparative tests of biodegradation of 500 ppm of phenol were performed in fluid medium with 0,6% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ at 37°C over 7 and 14 days.

The residual phenol was measured by extinction differences in alkaline and acid solutions at the maximum absorption of 289 nm (Schmauh and Grubb, 1954).

The basic problem of the study was the biodegradation of phenol by lichenes (100 and 500 ppm) as the only source of carbon.

LITERATURA

- Barashkova, E. A., (1968): Some data on the transportation of ^{14}C -containing substances in the thallus of *Cladonia rangiferina*. Bot. Zh (Leningrad). 53, (3). 378-9. Chem. Abstr. 69, No 8907w.
- Bloomer, J. L., Eder, W. R. and Hoffman, W. F. (1968): The biosynthesis of (-)-protolichesterinic acid. Chem. Commun. 7, 354-5. Chem. Abstr. 69, No 752w.
- Corbert, R. E. and Cumming, S. D. (1971): Lichenes and fungi. VII. Extractives from *Sticta mougeotiana*. J. Chem. Soc. C, 5, 955-60. Chem. Abstr. 74, No 108095b.
- Culberson, W. L., (1970): Chemosystematics and ecology of lichen-forming fungi. Annu. Rev. Ecol. Syst. 1970, 1, 153-170. Chem. Abstr. 74, No 121575c.
- De Silva, E. J. and Jansen, A. (1971): Chlorine, ergosterol and tocopherol content of some Norwegian lichenes. J. Sci. Food Arg. 1971, 22, (6), 308-11. Chem. Abstr. 75, No 72744s.
- Fox, C. H. and Mosbach (1967): The biosynthesis of lichen substances. III. Lichen acids as products of a symbiosis. Acta Chem. Scand. 21 (9), 2327-30. Chem. Abstr. 68, No 47048r.
- Galstyan, A. S. and Avundzhyan, Z. S. (1967): Enzymatic activity of silt under lichens and moss growing. Dokl. Akad. Nauk. Arm. SSR. 45 (2), 78-81. Chem. Abstr. 68, No 56540x.
- Gilbert, O. L. (1971): Effect of sulfur dioxide on lichens and bryophytes around Newcastle upon Tyne. Chem. Abstr. 74, No 6334d.
- Goas, G. and Bernard, T. (1967): Nitrogen metabolism of lichens different nitrogen forms of various species of the family Stictaceae. Acad. Sci., Paris, Ser. D. 265 (17) 1187-90. Chem. Austr. 68, No 27502f.
- Huneck, S. and Follmann, G. (1967): Lichen components. XLVII. Components of *Dirina ceratoma*, *Diploschistes ocellatus* and *Cladonia endiviaefolia*. Z. Naturforsch., B. 22 (12). 1368-9. Chem. Abstr. 68 No 112204e.
- Mitchell, J. C. and Shibata, S. (1969): Immunologic activity of some substances derived from lichenized fungi. J. Invest. Dermatol. 52 (6) 517-20. Chem. Abstr. 71 No 11339j.
- Mosbach, K. (1967): The biosynthesis of lichen substances. IV. The formation of pulvic acid derivatives by isolated lichen fungi. Acta Chem. Scand. 21 (9) 2331-4. Chem. Abstr. 48 No 47049s.
- Munjko, I. (1970): Izvori i vrste zagađenja zraka — aerozagađenja. Nar. Zb. 1. XII, 138-139, 2. Rijeka.
- Munjko, I. (1971): Prilog poznavanju biološke razgradnje fenola. Magistr. rad. PMF-Sveučilišta u Zagrebu.
- Nifontova, M. G. (1967): Aftereffect of dehydration on high temperatures on the photosynthesis of lichens. Biol.-Med. Nauk. 2. 57-62. Chem. Abstr. 68 No 102563g.
- Paribok, T. A. (1970): Accumulation of rare and trace elements by plants of the Far North. Akad. Nauk. SSSR, ser. 4, No 20. 184-195. Chem. Abstr. 74, No 39206z.
- Petro-Parvis, V., Ugo, A. and Bonfacini, V. (1970): Histochemical study of lichen amyloidosis. Dermatol. 45, (7). 421-39. Chem. Abstr. 74 No 30211q.
- Piattelli, F. B. (1968): M. and Giudici, N. M. (1968): Anthraquinone pigments from *Xanthoria parietina*. Phytochemistry. 7 (7). 1183-7. Chem. Abstr. 69 No 41748t.
- Pokorný, M. (1970): Metabolički putevi d-metionima u višim i nižim biljkama. Dizertacija PMF-Sveučilišta u Zagrebu.
- Fyatt, F. B. (1968): Effect on sulfur dioxide on the inhibitory influence of *Peltigera canina* on the germination and growth of grasses. Bryologist, 71 (2). 97-101. Chem. Abstr. 69 No 103900x.

- Richardson, D. H. S. and Smith, D. C. (1968): Lichen physiology. IX. Carbohydrate movement from the *Trebouxia* symbiont of *Xanthoria aureola* to the fungus. *New Phytol.* 67 (1). 61-68. Chem. Abstr. 68. No 85020h.
- Santesson, J. (1969): Studies on lichens. XIX. Infrared and mass spectra of some lichen Xanthonenes. *Ark. Kemi.* 30 (48). 479-90. Chem. Austr. 71. No 12958x.
- Santesson, J. (1970): Chemical study of lichens. XXIX. Anthraquinones in *Caloplaca*. *Phytochemistry*, 9. (10). 2149-66. Chem. Abstr. 74. No 10367s.
- Schoenbeck, H. (1968): Effect of atmospheric impurities (sulphur dioxide) on transplanted lichens. *Naturwissenschaften*, 55 (9), 451-2. Chem. Abstr. 69. No 99147n.
- Schmauh, L. J. and Grubb, H. M. (1954): Determination of phenols in waste waters by ultraviolet absorption. *Anal. Chem.* 26. 308.
- Seibert, M. A. (1970): Lichen enzyme studies — a preliminary report. *Bryologist*, 73 (3), 597-61. Chem. Abstr. 74. No 61621c.
- Shibata, A. and Taguchi, H. (1967): Occurrence of isousnic acid in lichens with reference to »isolidydrousnic acid« derived from dehydrousnic acid. *Tetrahedron Lett.* 48, 4867-71. Chem. Abstr. 68. No 114325u.
- Shibata, S. and Nishikawa, Y. (1971): Antitumor polysaccharides from lichens. *Fukuoka Fumiko, Japan*, 71, 17. 147. Chem. Abstr. 75, No 67474z.
- Taguchi, H., Sankawa, U. and Shibata, S. (1969): Biosynthesis of natural products. VII. Biosynthesis of usnic acid in lichens seasonal variation observed in biosynthesis of usnic acid. *Chem. Pharm. Bull.* 17 (10). 2061-64. Chem. Abstr. 72. No 39798c.