

# Učinak kadmija na fotosintezu i sadržaj sekundarnih metabolita u lišajeva *Parmelia sulcata*, *Evernia prunastri* i *Flavoparmelia caperata*

---

Maslač, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:398172>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Ana Maslač

**Učinak kadmija na fotosintezu i sadržaj sekundarnih metabolita u  
lišajeva *Parmelia sulcata*, *Evernia prunastri* i *Flavoparmelia  
caperata***

Diplomski rad

Zagreb, 2016.

Ovaj rad, izrađen u Botaničkom zavodu, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Mirte Tkalec, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja profesora biologije (magistra edukacije biologije).

## ZAHVALE...

*Posebnu zahvalu upućujem svojoj mentorici profesorici Mirti Tkalec koja mi je mnogo pomogla pri eksperimentalnom dijelu izrade diplomskog rada i njegovom pisanju. Hvala joj na svim savjetima i neizmjerne volji kojom me je usmjeravala u izradi ovog rada.*

*Veliko hvala Maji, mojoj sestri koja nikada nije prestala vjerovati u mene te mi je bila neizmjerne podrška i pomoć u svemu, znaš sve.*

*Hvala mojoj Ančici što je uvijek tu za mene, mojoj Jeleni, Jadri i Maji K. za sve riječi podrške i što su dio mog života.*

*Naravno, hvala mojoj obitelji (roditeljima, najboljoj sestri i najboljem šogoru Sanu) što su me podržavali sve ove godine i bili uvijek spremni pomoći.*

*Najposebnije hvala iz srca mojem sinu Josipu koji svemu ovome daje poseban smisao.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

### **Učinak kadmija na fotosintezu i sadržaj sekundarnih metabolita u lišajeva *Parmelia sulcata*, *Evernia prunastri* i *Flavoparmelia caperata***

Ana Maslač  
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb

Lišajevi se koriste kao uspješni bioindikatori kvalitete zraka budući da onečišćenje zraka može uzrokovati različite fiziološke promjene u lišajevima. Budući da je razina teškog metala kadmija često povećana u onečišćenom zraku cilj istraživanja je bio odrediti učinak kratkoročnog izlaganja otopini kadmija (50 mg/L) na fotosintetski aparat i sadržaj sekundarnih metabolita u lišajeva *Parmelia sulcata*, *Evernia prunastri* i *Flavoparmelia caperata*. Oštećenje fotosintetskog aparata procijenjeno je metodom fluorescencije klorofila *a*, a detekcija i kvantifikacija sekundarnih metabolita metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti. U sve tri vrste lišajeva optimalni prinos i stopa smanjenja fluorescencije nisu se razlikovali u kontrolnim uzorcima i onima tretiranim kadmijem prvi i treći dan nakon izlaganja dok je osmi dan primijećeno smanjenje vrijednosti što ukazuje na oštećenje fotosintetskog sustava. U sve tri vrste identificirani su sekundarni metaboliti specifični za tu vrstu; salazinska kiselina i atranorin u vrste *P. sulcata*, evernična kiselina, atranorin i kloratranorin u vrste *E. prunastri* te protocetrarična i usninska kiselina u vrste *F. caperata*. U lišajeva s listastim talusom (*P. sulcata* i *F. caperata*) izlaganih kadmiju uočena je smanjena koncentracija depsidona salazinske i protocetrarične kiseline, koji se nalaze u meduli lišaja, a povećana koncentracija depsidona atranorina i dibenzofurana usninske kiseline, uobičajenih za korteks. U lišaja s grmastim talusom (*E. prunastri*) nije došlo do značajnijih promjena u koncentraciji metabolita. Dobiveni rezultati pokazuju da su istraživane vrste donekle otporne na izlaganje kadmiju te da sekundarni metaboliti mogu imati ulogu u otpornosti na teške metale ali da to ovisi o njihovoj kemijskoj strukturi, dijelu talusa u kojem se nalaze i formi rasta lišajeva.

(42 stranice, 15 slika, 1 tablica, 53 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: kadmij, onečišćenje zraka, lišajevi, fotosinteza, sekundarni metaboliti  
Voditelj: Izv. prof. dr. sc. Mirta Tkalec

Ocjenitelji: Izv. prof. dr. sc. Mirta Tkalec

Izv. prof. dr. sc. Ines Radanović

Izv. prof. dr. sc. Ivančica Ternjej

Rad prihvaćen: 21.06.2016.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Graduation Thesis

### **The impact of cadmium on photosynthesis and secondary metabolites in lichens *Parmelia sulcata*, *Evernia prunastri* and *Flavoparmelia caperata***

Ana Maslač

Rooseveltovo trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Lichens are successfully used as air quality bioindicators, due to the fact that various physiological changes in lichens can be caused by air pollution. Since the level of heavy metal cadmium is often increased in polluted air, the objective of this research was to determine the impact of short-term exposure to cadmium (50 mg/L) on photosynthetic apparatus and secondary metabolites in lichens *Parmelia sulcata*, *Evernia prunastri* and *Flavoparmelia caperata*. Chlorophyll fluorescence was used to estimate photosynthetic damage, while detection and quantification of secondary metabolites was determined by high performance liquid chromatography. In all three species, optimum quantum yield and fluorescence decrease ratio did not show differences between cadmium-treated lichens and corresponding controls after first and third day of exposure. On the eighth day decreased values were observed, that can indicate damage of photosynthetic apparatus. Lichen substances typical for particular species were detected: salazinic acid and atranorin in *P. sulcata*; evernic acid, atranorin and chloroatranorin in *E. prunastri*; and protocetraric acid and usnic acid in *F. caperata*. In foliose lichens (*P. sulcata* and *F. caperata*) a decreased content of medullary depsidones salazinic and protocetraric acid, but increased content of cortical depsides atranorin and dibenzofurane usnic acid was observed in cadmium-treated lichens. In the fruticose lichen (*E. prunastri*) no significant changes were found in metabolites content. Results show that investigated species are partly resistant to cadmium-exposure and that secondary metabolites could have a role in heavy metal tolerance. However, the tolerance could depend on metabolites chemical structure, lichen growth form and part of the thallus where metabolites are deposited.

(42 pages, 15 figures, 1 table, 53 references, original in: Croatian)

Key words: cadmium, air pollution, lichens, photosynthesis, secondary metabolites

Supervisor: Assoc. Prof. dr. sc. Mirta Tkalec

Reviewers: : Assoc. Prof. dr. sc. Mirta Tkalec

Assoc. prof. dr. sc. Ines Radanović

Assoc. prof. dr. sc. Ivančica Ternjej

Thesis accepted: 21.06.2016.

# Sadržaj

1.	UVOD.....	1
1.1.	Lišajevi kao bioindikator onečišćenja .....	1
1.2.	Istraživane vrste .....	3
1.3.	Onečišćenje zraka teškim metalima .....	6
1.3.1.	Kadmij (Cd) .....	6
1.4.	Sekundarni metaboliti lišajeva .....	7
1.4.1.	Istraživani sekundarni metaboliti .....	8
1.5.	Fotosinteza .....	9
1.5.1.	Tijek fotosinteze .....	10
1.5.2.	Fluorescencija klorofila <i>a</i> .....	11
2.	CILJEVI.....	13
3.	MATERIJALI I METODE.....	14
3.1.	Kemikalije .....	14
3.2.	Lišajni materijal .....	14
3.3.	Tretiranje kadmijem .....	15
3.4.	Mjerenje fluorescencije klorofila <i>a</i> u uvjetima in vivo .....	15
3.5.	Analiza sekundarnih metabolita.....	16
3.5.1.	Ekstrakcija materijala .....	16
3.5.2.	Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti.....	16
3.6.	Statistička analiza .....	17
4.	REZULTATI.....	18
4.1.	Fluorescencija klorofila <i>a</i> .....	18
4.1.1.	<i>Flavoparmelia caperata</i> .....	18
4.1.2.	<i>Evernia prunastri</i> .....	20
4.1.3.	<i>Parmelia sulcata</i> .....	22
4.2.	Sekundarni metaboliti .....	24
4.2.1.	<i>Flavoparmelia caperata</i> .....	24
4.2.2.	<i>Evernia prunastri</i> .....	27
4.2.3.	<i>Parmelia sulcata</i> .....	29
5.	RASPRAVA.....	31
6.	ZAKLJUČCI.....	35
7.	LITERATURA.....	36
8.	ŽIVOTOPIS.....	40

# 1. UVOD

Većina ljudi smatra da su lišajevi vrlo jednostavni organizmi no zapravo su lišajevi vrlo složeni, simbiotski organizmi koji su ponekad sastavljeni od čak tri člana različitih carstva. Zbog te specifične zajednice koju sačinjavaju gljive i alge te ponekad cijanobakterije možemo reći da su jedinstveni oblik života koji nalazimo na Zemlji.

Lišajevi čine vrlo stabilan i uspješan odnos gljive kao mikobionta te alge koja sadrži klorofil, odnosno cijanobakterije koja sadrži modrozeleni fotosintetski pigment, kao fotobionta koji vrši fotosintezu. Gljiva sakuplja vodu, omogućuje oblik i zaštitu za algu te može kod određenih vrsta iz tla crpiti mineralne tvari za oboje. U velikom broju slučajeva nijedan od članova ovakve zajednice nije nađen da živi samostalno u prirodi. Zapravo intrigantno pitanje je imaju li i mikobiont i fotobiont koristi od zajednice koju čine. Mnogi biolozi smatraju lišaj jednim od školskih primjera simbioze (dva ili više organizma žive zajedno) jer su lišajevi jako rasprostranjeni i alge unutar lišajeva su zdrave. Drugi međutim vjeruju da je odnos koji nalazimo u lišaju „kontrolirani parazitizam“ odnosno da su stanice fotobionta žrtve, a ne partneri mikobionta. Prvi koji je otkrio da je lišaj čine dva organizma bio je Nijemac Simon Schwendener 1869. godine. Iako je njegovo otkriće tada bilo revolucionarno, nije bilo u potpunosti prihvaćeno (Purvis 2010).

Mnoge lihenizirane gljive su vrlo selektivne i formiraju zajednicu samo s odgovarajućim fotobiontom, no nalazimo i neke iznimke kao što su neki lišajevi koji sadrže različite fotobionte tijekom različitih stupnjeva svog razvoja ili isti mikobiont na različitom geografskom području sadrži različite fotobionte. Usprkos svemu oba partnera dijele jednu veliku korist, kao zajednica imaju mogućnost kolonizirati mnoga staništa koja kao zasebni organizmi ne bi mogli (Purvis 2010). Lišajeve kao raznoliku skupinu koja ima posebne prilagodbe za život u ekstremnim uvjetima nalazimo na gotovo svim kopnenim staništima, od tropskih pa sve do polarnih. Jedina područja gdje ih ne nalazimo su ona jako zasjenjena s obzirom da lišajevi trebaju svjetlost kako bi provodili fotosintezu.

Lišajevi su dugoživući, otporni, preferiraju svjetlost i rastu vrlo sporo pa je njihova uloga organizama koji prvi zauzimaju nova zahtjevna staništa velika. Kada lišajevi odumru, hranjive tvari koje nastaju stvaraju podlogu za nove organizme te se stoga često nazivaju „pionirima vegetacije“.

## 1.1. Lišajevi kao bioindikatori onečišćenja

Lišajevi su organizmi koji su danas široko rasprostranjeni na Zemlji, a dominiraju u okolišu gdje dolazi do krajnosti u temperaturi, isušivanju i hranjivim tvarima. Staništa su im najčešće izložene stijene i grane drveća. Razvili su brojne prilagodbe na stresne uvjete u okolišu pa uspijevaju normalno



fotosintetizirati i rasti na ekstremnim staništima. Lišajevi preuzimaju sve mineralne tvari iz atmosfere jer nemaju razvijen korijenov sustav. Osim toga oni su dugoživući ektohidrični organizmi s ograničenom kontrolom nad unutarnjom regulacijom vode i izmjenom plinova. Zahvaljujući nedostatku zaštitne kutikule i puči, talus može akumulirati mineralne tvari, pa tako i teške metale, iz atmosfere u količinama koje premašuju njegove metaboličke potrebe. Sve navedene karakteristike čine ih vrlo dobrim bioindikatorima onečišćenja zraka (Garty 2001). Osim toga različite vrste lišajeva su različito tolerantne na onečišćenje pa se prisutnost pojedinih vrsta koristi kao pokazatelj kvalitete zraka.

Lišajevi su prepoznati kao vrlo osjetljivi na onečišćenje zraka još u 19. stoljeću kad su neovisna promatranja u Engleskoj, Münchenu i Parizu dokumentirala kako lišajevi nestaju iz urbanih područja. Do početka 20. stoljeća ovaj „gradski efekt“ je već prepoznata pojava u Europi i pripisan je ugljenoj prašini, koju su tada ispuštale brojne ložionice na ugljen, tada glavno gorivo u kućanstvima i većini industrije. Tek kasnije je bezbojni plin, sumporni dioksid, prepoznat kao glavni fitotoksični agens. Danas je popis onečišćujućih tvari u zraku mnogo duži i uključuje različite sumporne i dušikove spojeve, hidrogen fluorid, metale, ozon, kisele kiše i različite organske tvari (Nash III 2008).

Osjetljivost lišajeva na zagađenje zraka je vezana uz njihovu biologiju. Većina vrsta živi desetljećima ili stotinama godina, a neke i više, stoga, kao trajnica može pokazati kumulativni efekt onečišćenja. Lišajevi nemaju vaskularni sustav za provođenje vode i nutrijenata, pa su razvili mehanizme za uzimanje vode i nutrijenata iz zraka. Magla i rosa, jedni od izvora vode za lišajeve, često imaju veću koncentraciju onečišćujućih tvari od padalina. Također, lišajevi imaju mehanizme za akumulaciju nutrijenata što također može doprinijeti većoj koncentraciji onečišćujućih tvari u talusu lišaja. Za razliku od brojnih vaskularnih biljaka, lišajevi nemaju dijelove koje sezonski odbacuju, stoga se sve akumulira u samom talusu. I na kraju, budući da nemaju puči ni kutikulu te se aerosol apsorbira cijelim talusom, lišajevi nemaju biološku kontrolu nad izmjenom plinova te plinoviti onečišćivači jednostavno difundiraju do fotobiontskog sloja. Osim toga, iako dehidracija omogućava lišajevima da prežive sušne periode, ona također dovodi do povećanja koncentracije svih tvari do razine koja može biti toksična (Garty 2001).

Lišajevi se često koriste za biomonitoring teških metala u atmosferi zbog njihove visoke osjetljivosti na različite zagađivače iz okoliša (Garty 2001). Izvrsni su bioakumulatori elemenata u tragovima, pošto se koncentracija nađena u njihovom talusu može direktno povezati s onom prisutnom u okolišu (Wolterbeek 2002). Učinkovitost lišajeva u preuzimanju čestica iz atmosfere, ali i iz supstrata zabilježena je u mnogim radovima (Loppi i sur. 1999, Pirintsos i sur. 2006). Te čestice lišajevi skladište ili na površini talusa ili mogu biti zarobljene u međustaničnom prostoru medule (Garty i sur. 1979) i tamo mogu ostati nepromijenjene duži vremenski period. Usprkos tome što

akumuliraju i sadržavaju mnoge teške metale u količinama koje premašuju fiziološke zahtjeve, lišajevi ih toleriraju tako što ih zarobljavaju izvanstanično u obliku oksalatnih kristala ili ih vežu na različite kiseline (Purvis 2014).

## 1.2. Istraživane vrste

U ovom sam istraživanju koristila tri relativno česte vrste lišajeva u Hrvatskoj, koje se razlikuju prema svojoj osjetljivosti na onečišćenje: *Parmelia sulcata*, *Flavoparmelia caperata* i *Evernia prunastri*.

*Parmelia sulcata* je kozmopolitski listasti (foliozni) lišaj iz porodice Parmeliaceae (Slika 1). Talus je veličine 4-20 cm u promjeru, a najčešće ga nalazimo na drveću, iako ga se ponekad može naći i na stijenama. Gornja površina talusa je srebrnasto sivo zelena, donja je strana tamnosmeđa i pričvršćena za podlogu crnim rizinama gotovo do ruba stieljke. Sorediji se stvaraju na bijelim ili blijedo-smeđim pukotinama koje tvore mrežoliki uzorak na gornjoj strani režnjeva. Plodišta se rijetko pojavljuju te se većinom razmnožavaju nespolno. Od sekundarnih metabolita sadrži u gornjem korteksu atranorin i kloroatranorin, a u meduli salazinsku i konsalazinsku kiselinu. Ova je vrsta relativno otporna na onečišćenja u okolišu (Nash III 2008).



**Slika 1.** Lišaj *Parmelia sulcata* (L.) Hale (autor: Maja Maslač)

***Flavoparmelia caperata*** je također listasti (foliozni) lišaj iz porodice Parmeliaceae koji većinom raste na sunčanoj strani kore drveća. Gornja površina mu je specifično blijedo žuto-zelene boje i na njenom većem dijelu površine nalaze se žućkasto zeleni soraliji (Slika 2). Režnjevi su široki do oko 1 cm, obično naborani u središtu i tvore velike taluse do 10 cm promjera. Donja površina je u sredini crne boje dok je prema rubovima smeđa i pričvršćena je za podlogu crnim rizinama. Plodišta se rijetko pojavljuju, a razmnožava se nespolno pomoću soralija. Od sekundarnih metabolita u gornjem korteksu nalazimo usninsku kiselinu i atranorin, a u meduli protocetraričnu i kaperatičnu kiselinu (Nash III 2008). Nekoć široko rasprostranjena vrsta lišaja zbog svoje osjetljivosti na SO<sub>2</sub> nestala je na vrlo zagađenim područjima zbog negativnog utjecaja industrije. Posljednjih godina s poboljšanjem kvalitete zraka zbog smanjenja emisije SO<sub>2</sub> uslijed jače zakonske regulative po pitanju dopuštene emisije SO<sub>2</sub> ova se vrsta polako vraća na svoja stara staništa (Purvis 2010).



**Slika 2.** Lišaj *Flavoparmelia caperata* Taylor (autor: Maja Maslač)

***Evernia prunastri*** je grmasti (frutikozni) lišaj iz porodice Parmeliaceae te je jedna od rijetkih vrsta lišajeva koja ima hrvatsko ime – hrastov lišaj (Slika 3). Svojedobno je bilo rašireno njegovo intenzivno sakupljanje na području Hrvatske, osobito na području Slavonije. Hrastov lišaj koristio se u industriji parfema stoga danas više nije tako čest kao nekad. Osim sakupljanjem, brojnost mu je još više smanjena nestajanjem hrastove šume koja je dobrim dijelom danas posječena, promjenama mikroklimatskih uvjeta te onečišćenjem zraka budući da je dosta osjetljiv (Purvis 2010). Gornja površina je zelenkasta, a donja bjelkaste boje. Razmnožava se nespolno soredijima. Od sekundarnih metabolita u gornjem korteksu nalazimo usninsku kiselinu koja ponekad izostane, atranorin i kloroatranorin te u meduli evernična kiselina (Yoshimura i sur. 1994). Hrastov lišaj je rasprostranjen na većem dijelu sjeverne polutke, a većinom raste na neutralnoj do kiseloj kori, osobito na hrastu. Nalazimo ga na područjima visoke vlage s dosta sunca.



**Slika 3.** Lišaj *Evernia prunastri* (L.) Ach (autor: Maja Maslač)

### **1.3. Onečišćenje zraka teškim metalima**

Kako raste broj svjetskog stanovništva tako raste i intenzitet ljudskih djelatnosti što na kraju ima izravni utjecaj na okoliš. Zbog industrije te prometa ispuštaju se onečišćujuće tvari u zrak, odnosno mijenja se kemijski sastav u okolišu, a samim time i uvjeti života za organizme u biosferi. Onečišćenje zraka danas predstavlja ne samo ekološki već i zdravstveni te ekonomski problem. U onečišćenju zraka posebno je naglašen i manje istražen problem zagađenja zraka teškim metalima. Teške metale nalazimo u sastavu Zemljine kore. Zajedničko je svim teškim metalima da se tijekom vremena mogu nakupljati u tkivima živih bića (bioakumulacija), posebno u vršnim predatorima (biomagnifikacija) te u cijelim ekosustavima. Teški metali su kemijski elementi čije je relativna gustoća veća od  $5 \text{ g/cm}^3$ , a dijele se na esencijalne, odnosno biogene (Cu, Fe, Mn, Zn, Mo, Ni, Cr, Co) i neesencijalne, odnosno, nebiogene (Cd, Pb, Hg, As, Sn). Esencijalni su potrebni za pravilno funkcioniranje organizama, pa njihov nedostatak može biti štetan za organizam, isto kao i njihova visoka koncentracija u organizmu, tako da je pitanje njihove toksičnosti samo pitanje količine. Teški metali predstavljaju značajnu sirovinu za brojne industrijske grane, koje su ujedno značajni zagađivači. Najveći izvori kontaminacije tla teškim metalima su metalurška, metaloprerađivačka, elektronička industrija, rudarstvo, postrojenja za pročišćavanje vode, vojni poligoni, odlagališta otpada i sl. (Tchounwou i sur. 2012). Veliki doprinos onečišćenju okoliša teškim metalima potječe od cestovnog prometa, a promet autocestama, održavanje prometnica posebno tijekom zimske sezone kada se prometnice tretiraju solima, trošenje kolnika, abrazija kočnica i korozija najčešće se spominju kao izvor teških metala uz prometnice. Od toga izravno od pogonskog i kočionog sustava potječu kadmij, bakar i nikal, od maziva kadmij, bakar i cink, od emisije ispušnih plinova olovo, a od abrazije pneumatika cink. Plinovi koji potječu iz industrijskih postrojenja također, uz ispuštanje teških metala, zakiseljuju i tlo te tako pospješuju oslobađanje teških metala u tlu što ometa rast biljaka.

#### **1.3.1. Kadmij (Cd)**

Kadmij je metal visoke topljivosti te je jedan od najopasnijih teških metala. Kadmij je drugi najveći onečišćivač okoliša, odmah iza olova zbog čega sam ga i odabrala u svom istraživanju. Predstavlja veliku opasnost za zdravlje čovjeka jer je toksičan u vrlo malim količinama (Tchounwou i sur. 2012). Za razliku od cinka i bakra kadmij nije biogeni element. Među zagađivačima kadmijem se ističu petrokemije, produkcija klora, industrija gnojiva te željezare i čeličane. Kadmij se upotrebljava za prekrivanje drugih metala elektroplatiniranjem, osobito željeza i čelika, za izradu nisko taljivih legura te ponovo punjivih Ni-Cd baterija. Proizvodnja ovih baterija znatno je porasla zadnjih godina zbog njihovog velikog električnog kapaciteta i male mase. Ugrađuju se u najrazličitije uređaje od

elektromobila, pokretnih izvora napajanja do kućanskih i toaletnih uređaja. Kadmij se koristi i kao materijal za kontrolu fisije u nuklearnim reaktorima te za zaštitu plavog i zelenog fosforescentnog nanosa katodnih cijevi TV uređaja u boji. Kadmij nastaje u industriji plastičnih masa, preradi cinka i olova te u proizvodnji i pri korištenju umjetnih gnojiva. U prirodi je najčešće zastupljen u obliku kadmijeva sulfida (CdS), kadmijeva oksida (CdO), kadmijeva hidroksida (Cd(OH)<sub>2</sub>) te kadmijeva sulfata 4 (CdSO<sub>4</sub>). Može se javiti u mineralima koji su zastupljeni u tlu te organskim tvarima (Tchounwou i sur. 2012).

Veće koncentracije kadmija u biljkama inhibiraju metabolizam željeza, što uzrokuje kloroze i tako smanjuju intenzitet fotosinteze. Također, visoke koncentracije kadmija inhibiraju i stanično disanje i transport elektrona u procesu oksidativne fosforilacije. Kadmij inhibira transpiraciju zatvaranjem stanica puči (Sanità di Toppi i sur. 2005).

#### **1.4. Sekundarni metaboliti lišajeva**

Lišajevi proizvode veliki broj različitih sekundarnih metabolita i većina njih su specifični za lišajeve. Neki sekundarni metaboliti lišajeva imaju mnogostruke biološke aktivnosti (Huneck 1999). Proizvodi ih mikobiont (Elix i Stocker-Wörgötter 2008) i skladišti ih kao sitne izvanstanične kristale na vanjskoj površini hifa. Dok su neki sekundarni metaboliti smješteni u gornjem korteksu, većinu ipak nalazimo u meduli (Solhaug i sur. 2009). Produkcija sekundarnih metabolita ovisi i fotobiontu, odnosno, o šećerima koje sintetizira. Lišajni metabolizam, kao i biljni metabolizam, dijelimo na primarni i sekundarni. Sekundarni metabolizam nije potreban za preživljavanje odnosno rast, razvoj te reprodukciju i njegovi proizvodi se nalaze ekstracelularno te su topivi u organskim otapalima, dok je primarni metabolizam bitan za opstanak i produkciju esencijalnih tvari za održavanje života. Sekundarni metaboliti su kemijski različiti, ali su proizvedeni od nekoliko ključnih intermedijera primarnog metabolizma, odnosno šećera, koje organizam proizvodi te su općenito i kategorizirani pomoću intermedijera iz kojih se proizvode (Bennett i Ciegler 1983). Istraživanja analitičkim i eksperimentalnim metodama rezultirala su otkrivanjem više od 1050 različitih spojeva u lišajevima (Molnár i Farkas 2010). Većina tih spojeva je specifična samo za lišajeve te imaju veliku ulogu u njihovoj taksonomiji i sistematici. Osim te primjene, sekundarni metaboliti imaju i nekoliko mogućih bioloških uloga, uključujući fotozaštitu protiv intenzivnog zračenja, kao i alelokemijsko, antivirusno, antitumorsko, antibakterijsko, antiherbivorno i antioksidativno djelovanje (Huneck i Yoshimura 1996), a mnoge se vrste lišajeva već par stotina godina koriste u industriji hrane, parfema i boja (Elix i Stocker-Wörgötter 2008). Ovi spojevi su također važni čimbenici u homeostazi metala i toleranciji talusa lišaja na onečišćenja. Iako se naše znanje o doprinosu tih izvanstaničnih spojeva značajno



povećalo u posljednjih nekoliko desetljeća (Molnár i Farkas 2010), njihove biotičke i abiotičke uloge nisu u potpunosti istražene. Sekundarni metaboliti lišajeva klasificiraju se prema Culberson i Elix (1989) po njihovom biosintetskom podrijetlu i značajki u kemijskoj strukturi. Većina sekundarnih metabolita su izvedeni iz acetil-polimalonilnog puta koji je put svojstven samo lišajevima gdje nastaju posebne, samo njima svojstvene, skupine spojeva (depsidi, depsidoni, dibenzofurani i usninska kiselina), dok ostali spojevi potječu iz putova mevalonske kiseline i putova šikiminske kiseline koje nalazimo i kod biljaka. Sekundarne metabolite nalazimo u meduli ili gornjem korteksu lišaja te na površini lišaja gdje ih nalazimo u količini i do oko 20 % suhe tvari (Huneck i Yoshimura 1996). Danas su metode za razdvajanje i identifikaciju pojedinih metabolita standardizirane te se najčešće koriste tankoslojna kromatografija (eng. *thin-layer chromatography – TLC*) i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *high performance liquid chromatography – HPLC*). S obzirom da se sekundarni metaboliti koriste u kemotaksonomiji, relativno su dobro istraženi unutar najčešćih vrsta i rodova, zbog čega su i standardizirane metode za njihovo istraživanje.

**Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)** jedna je od najučestalije korištenih analitičkih metoda. Ova metoda ima mogućnost razdvajanja komponenti smjesa različitih kemijskih sastava te se zbog toga koristi za odjeljivanje, identifikaciju i kvantitativno određivanje kemijskih sastojaka. Određuje ju postojanje mobilne ili pokretne faze i stacionarne ili nepokretne faze. Uzorak se stavlja u određeno otapalo i zatim se mali volumen uzorka kao mobilna faza pušta kroz kromatografsku kolonu pod visokim tlakom. Visoki tlak se koristi jer povećava linearnu brzinu i tako komponente imaju manje vremena za zadržavanje na koloni te se time poboljšava rezolucija razdvajanja. Odjeljivanje sastojaka temelji se na različitim brzinama kretanja odnosno njihovoj specifičnosti vezivanja za čestice stacionarne faze. Molekule otapala se natječu sa molekulama uzorka za apsorpcijska mjesta na površini stacionarne faze. Vrijeme zadržavanja ovisi o prirodi tvari koja se analizira, stacionarnoj fazi i sastavu mobilne faze. Vrijeme u kojem tvar eluira odnosno dođe do kraja kolone naziva se retencijsko vrijeme i karakteristično je za određenu tvar. Koncentraciju neke tvari određujemo mjerenjem površine ispod pikova na kromatogramu te to primjenjujemo kada je potrebno otkriti i kvantificirati promjene neke tvari. Za identifikaciju i kvantifikaciju pojedinih tvari koriste se standardi poznate koncentracije.

#### **1.4.1. Istraživani sekundarni metaboliti**

**Evernična kiselina** je glavni fenolni spoj u vrsti lišaja *Evernia prunastri*. Evernična kiselina spada u depside orcinolnog tipa. Depsidi tvore veliku skupinu sekundarnih metabolita lišajeva. Ovaj organski spoj jedan je od tri najčešćih alergena koji spadaju u sekundarne metabolite lišajeva.

Evernična kiselina kao sekundarni metabolit lišajeva ima jaku antimikotičnu i alelopatsku ulogu (Halama i Van Haluwin 2004). Koristi se u kozmetičkoj industriji i industriji parfema.

**Atranorin** je jedan od najčešćih sekundarnih metabolita u lišajeva. Dokazano izaziva alergiju kod nekih ljudi kada se nalazi u parfemima (Dahlquist i Fregert 1980). Atranorin spada u  $\beta$ -orcinol depside.

**Protocetrarična kiselina** spada u grupu depsidona. Dokazana je njena antimikrobna uloga, te potencijalna upotreba kao lijeka protiv patogena (Nishanth i sur. 2015). Također je detektirana i potencijalna antifungalna uloga (Nishanth i sur. 2015). Rodovi u kojima ju najčešće nalazimo su *Parmelia*, *Cladonia* i *Usnea*.

**Usninska kiselina** je jedan od najpoznatijih sekundarnih metabolita u lišajeva i nalazimo je u izobilju kod rodova *Alectoria*, *Cladonia*, *Usnea*, *Lecanora*, *Ramalina* i *Evernia*. Usninska kiselina je žućkasti kortikalni pigment koji spada u grupu dibenzofurana i nalazimo je u dva enantiomera (Ingolfsdottir 2002). Ova kiselina je od svoje prve izolacije 1844. godine dosad daleko najistraženiji sekundarni metabolit lišajeva te je od polovice 20. stoljeća izdano na stotine radova sa polja taksonomije, ekologije, medicinske-farmakologije, kozmetike i agrikulture (Cocchietto i sur. 2002). Od ekoloških uloga najpoznatije su antibiotska, antimikotska, antiprotozoalna, antiinflamatorna, analgetička, fitotoksična i UV protektivna (Ingolfsdottir 2002).

**Salazinska kiselina** spada u grupu depsidona. U istraživanju njezine antimikrobne uloge pokazalo se da reagira ovisno o vrsti bakterije (Candan i sur. 2007). Najčešće ju nalazimo u rodovima *Punctelia*, *Usnea*, *Cladonia*, *Parmelia*, *Heterodermia* i *Xanthoparmelia*.

## 1.5. Fotosinteza

Sva živa bića na našoj planeti trebaju energiju za život. Većina energije koju koriste živa bića na Zemlji dolazi od Sunca. Fotosinteza je najvažniji biokemijski proces na Zemlji jer se njime apsorbirana Sunčeva energija ugrađuje u energijom bogate kemijske veze organskih spojeva. Sunčeva svjetlost je čista energija koju međutim mnogi organizmi ne mogu direktno koristiti. Biljke, alge i neki prokarioti sposobni su svjetlosnu energiju koristiti za sintezu organskih spojeva koji su izvor energije ili prekursori za ostale organske spojeve. To je jedan od najvažnijih procesa koji omogućuje život svim živim bićima na Zemlji. Tijekom fotosinteze se oslobađa kisik nužan za proces staničnog disanja kod aerobnih organizama, a i njezina uloga je nezamjenjiva u stvaranju hrane za sve heterotrofne organizme. Fotosintezu čini niz reakcija: apsorpcija sunčeve svjetlosti, prijenos elektrona i enzimske reakcije kojima se proizvode ugljikohidrati.



### **1.5.1. Tijek fotosinteze**

Fotosinteza se sastoji od primarnih ili svjetlosnih reakcija i sekundarnih reakcija odnosno Calvinovog ciklusa. Tijekom primarnih reakcija na molekulama i proteinskim kompleksima u tilakoidnim membranama kloroplasta događa se apsorpcija svjetlosti, prijenos elektrona do  $\text{NADP}^+$  te fotofosforilacija ADP-a u ATP (Pevalek-Kozlina 2003). Primarni procesi obuhvaćaju dvije usklađene i serijski povezane fotokemijske reakcije. Svaka je vezana uz svoj reakcijski sustav, odnosno fotosistem I (P700) i fotosistem II (P680). Oni su funkcionalne i strukturne jedinice uključene u proces fotosinteze i zajedno provode apsorpciju svjetlosti te prijenos energije i elektrona. Fotosistem I i II su proteinski kompleksi građeni od dva dijela: reakcijskog središta i antena kompleksa. Ulogu u apsorpiranju energije fotona svjetlosti ima antena kompleks izgrađen od molekula karotenoida i klorofila, vezanih uz proteine, koji prenose energiju do molekule klorofila  $a$  smještene u reakcijskom središtu (Pevalek-Kozlina, 2003). Svaki fotosistem ima svoj specifični klorofil  $a$  s određenom valnom duljinom apsorpcije.

Fotokemijske reakcije počinju apsorpcijom svjetlosti na fotosistemu I, prijenosom energije do reakcijskog središta gdje se zbiva fotokemijska reakcija odnosno iz klorofila  $a$  se izbijaju dva elektrona koji se, tako obogaćeni energijom, prenose enzimima do oksidiranoga koenzima  $\text{NADP}^+$ , te ga reduciraju u NADPH. Fotosistem I (P+700) otpuštanjem elektrona ostaje pozitivno nabijen. Radi toga mora nadoknaditi elektrone iz fotosistema II (P680), za što je također potrebna apsorpcija dvaju fotona svjetlosti koja dovodi do fotokemijske reakcije u reakcijskom središtu fotosistema II te do prijenosa elektrona na lanac prijenosa elektrona. Plastokinon, citokrom i plastocijanin su dijelovi lanca elektrona koji elektron prenose do oksidiranog središta fotosistema I. Gubitkom elektrona fotosistem II (P+680) ostaje također pozitivno nabijen, a nadoknađuje elektrone fotolizom vode pri čemu se oslobađa kisik i protoni. Tijekom primarnih reakcija povećava se koncentracija protona u tilakoidnom prostoru što dovodi do stvaranja protonskog gradijenta. Zbog razlike u naponu i koncentraciji između tilakoidnog prostora i strome kloroplasta, protoni prolaze kroz enzim ATP sintazu dovodeći do stvaranje adenzinotriposfata odnosno ATP-a, koji je, uz NADPH, produkt primarnih procesa.

U sekundarnim reakcijama fotosinteze (Calvinov ciklus) koji se zbivaju u stromi kloroplasta ugljični dioksid ( $\text{CO}_2$ ) se veže pomoću enzima ribuloza-1,5-difosfat-karboksilaze/oksigenaze (RUBISCO) na akceptorsku molekulu ribuloze-1,5-difosfat te nastaje nestabilni spoj sa 6 ugljikovih atoma, koji se brzo raspada na dvije molekule 3-fosfoglicerata. One se reduciraju pomoću produkata primarnih procesa, NADPH i ATP, u gliceraldehid-3-fosfat. Nastali trioza-fosfati regeneriraju molekulu ribuloza-1,5-difosfat odnosno služe za sintezu saharoze ili škroba. Za efikasno odvijanje Calvinovog ciklusa moraju se vezati tri molekule ( $\text{CO}_2$ ) pri čemu u konačnici nastaje šest molekula gliceraldehid-3-

fosfata od kojih ih je pet potrebno za regeneraciju tri akceptorske molekule, a jedna ide u sintezu saharoze tj. škroba.

### **1.5.2. Fluorescencija klorofila *a***

Apsorpcijom fotona svjetlosti pomoću fotosintetskih pigmenata započinje fotosinteza. Svjetlosna energija apsorbirana molekulama klorofila može biti iskorištena na tri načina: dio energije ulazi u proces fotosinteze, dio se oslobađa u obliku topline, a dio u obliku fotona crvene svjetlosti što rezultira fluorescencijom klorofila *a*. Sva tri procesa međusobno ovise jedan o drugome, što znači da povećanje prinosa jednog procesa rezultira smanjenjem prinosa druga dva procesa (Maxwell i Johnson 2000). Od ukupne apsorbirane svjetlosti samo se mali dio energije (manje od 5 %) emitira u obliku fluorescencije (Taiz i Zeigler 1998). Danas se brojni parametri fluorescencije klorofila koriste kako bi se odredio fotosintetski kapacitet i funkcija fotosintetskog aparata, a promjena krivulje fluorescencije kod uzoraka adaptiranih na mrak daje važne informacije o sakupljanju svjetlosne energije, transportu elektrona, stanju tilakoidne membrane i procesima fiksacije ugljikovog dioksida (Babani i Lichtenthaler 1996).

Fotosistem II je dio fotosintetskog aparata koji je najviše podložan oštećenju te su njegova oštećenja prvi pokazatelj stresa u organizmu. Mjerenjem fluorescencije klorofila *a* zapravo dobivamo podatke o fotosistemu II pa ova metoda otkriva vrlo rane znakove smanjenog fotosintetskog kapaciteta uzrokovanog vodnim stresom, zagađenjem zraka, UV stresom i dr. Naime, u stresnim uvjetima učinkovitost procesa fotosinteze se može smanjiti pa će se veći udio energije oslobađati fluorescencijom što se pomoću osjetljivog uređaja može izmjeriti (Maxwell i Johnson, 2000). Fluorescencija klorofila *a* mjeri se pomoću uređaja koji se nazivaju fluorimetri.

Pomoću fluorimetra mjeri se fluorescencije klorofila *a* iz koje izračunavamo različite parametre koji nam ukazuju na učinkovitost fotosistema II (Lichtenthaler i Babani 2004). Prije mjerenja uzorak mora stajati u mraku 20-30 minuta kako bi reakcijski centri bili potpuno otvoreni i mogli sudjelovati u fotokemijskim reakcijama. Uzorak se prvo obasjava crvenom svjetlošću vrlo niskog intenziteta svjetlosti koji nije dovoljan da se pokrene fotosinteza. U tim uvjetima minimalnog osvjetljenja kada su svi plastokinoni potpuno oksidirani mjeri se minimalni prinos fluorescencije ( $F_0$ ). Zatim se uzorak obasja svjetlošću visokog intenziteta ( $\sim 2000 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) koji dovodi do zasićenja fotosinteze. Pri uvjetima jakog osvjetljenja kada se plastokinoni potpuno reduciraju, a reakcijska središta zatvore mjeri se maksimalni prinos fluorescencije ( $F_m$ ). Trajanjem osvjetljenja dolazi do aktivacije fotosintetskih procesa pa fotosistem I preko lanca prijenosa elektrona od reduciranih akceptora elektrona preuzima elektron, što dovodi do otvaranja reakcijskih centara

fotosistem II te intenzitet fluorescencije počinje padati sve do stabilnog stanja (Lichtenthaler i sur. 2005). Razlika između maksimalne i minimalne fluorescencije naziva se varijabilnom fluorescencijom ( $F_v$ ). Omjer varijabilne i maksimalne fluorescencije ( $F_v/F_m$ ) predstavlja optimalan prinos fotosistema II i mjera je potencijalnog maksimalnog prinosa kvanta fotosistema II koji za većinu biljnih vrsta iznosi od 0,70 do 0,83 (Roger i Weiss, 2001). Parametar  $R_{Fd}$  se definira kao stopa smanjenja fluorescencije klorofila do stabilnog stanja.  $R_{Fd}$  predstavlja indeks vitalnosti fotosintetskog aparata jer ukazuje na funkcionalnost procesa fotosinteze od apsorbiranja svjetlosne energije pa do fiksacije ugljikovog dioksida nakon uspostavljanja stabilnog stanja (Lichtenthaler i Babani 2004). Parametar  $R_{Fd}$  nam za vrijeme vegetacijskog razdoblja i razdoblja stresa govori o mogućim promjenama fotosintetske aktivnosti odnosno pokazuje je li potencijalni fotosintetski kapacitet izražen kao  $F_v/F_m$  postignut i održan tijekom stabilnog stanja.

Obzirom da se vrijednosti parametara fluorescencije mijenjaju prilikom izlaganja stresnim uvjetima odabrala sam ovu metodu u sklopu svog diplomskog rada kako bih pratila učinak kadmija na lišajeve.

## 2. CILJEVI

Lišajevi su organizmi koje nalazimo na gotovo svim staništima na Zemlji, uključujući i staništa koja se ističu ekstremnim uvjetima vezanima uz temperaturu, vlagu i dostupnost hranjivim tvarima. Tijekom evolucije lišajevi su razvili mnoge prilagodbe na stresne uvjete, zbog kojih, unatoč stresnim uvjetima vrše fotosintezu, što im omogućuje rast i razvoj. Zbog svoje specifične građe lišajevi nemaju razvijen korijenov sustav, niti zaštitnu kutikulu i puči, pa stoga sve mineralne tvari, uključujući i teške metale, uzimaju direktno iz atmosfere. Dugoživući su organizmi te većina vrsta živi desetljećima ili čak stotinama godina, pa i više te nam kao takvi mogu ukazivati na duži period promjena u okolišu. Zbog svih tih karakteristika oni su prepoznati kao bioindikator onečišćenja okoliša. Stoga sam ih i izabrala u svom istraživanju kao modelne organizme za istraživanje utjecaja teških metala. Odlučila sam koristiti tri epifitske vrste lišajeva, jer su se već u brojnim radovima pokazali kao dobri bioindikator.

Cilj mi je bio u svom diplomskom radu pokušati dokazati u kojoj mjeri teški metali, odnosno u ovom istraživanju jednokratno izlaganje visokoj koncentraciji kadmija, utječu na fiziološke promjene u lišajevima kao bioindikatorima onečišćenja u okolišu. Kako bih istražila utjecaj na fiziologiju lišajeva, istraživala sam utjecaj kadmija na učinkovitost fotosinteze i na količinu sekundarnih metabolita.

U sve tri vrste pokušala sam detektirati sekundarne metabolite koji se nalaze u ovim vrstama lišajeva jer sam htjela utvrditi dolazi li do promjene u količini pojedinog sekundarnog metabolita ovisno o unosu kadmija u organizam. Zbog vrlo velike uloge sekundarnih metabolita kod lišajeva htjela sam ovim radom pokušati dokazati koliko pojedini sekundarni metaboliti imaju ulogu u toleranciji lišajeva na teške metale.

### 3. MATERIJALI I METODE

U istraživanju učinka kadmija na lišajeve koristila sam tri vrste lišajeva *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale, *Parmelia sulcata* Taylor i *Evernia prunastri* (L.) Ach. Za određivanje oštećenja fotosintetskog aparata pod utjecajem kadmija koristila sam metodu fluorescencije klorofila *a in vivo* dok sam za odvajanje te kvalitativno i kvantitativno određivanje sekundarnih metabolita koristila metodu HPLC-a.

#### 3.1. Kemikalije

Kemikalije korištene u ovom istraživanju su bile analitičke čistoće (p. a.) (Tablica 1), a metanol koji je služio kao mobilna faza za HPLC te aceton koji je služio za ekstrakciju uzoraka, su bili HPLC čistoće. Korištena je deionizirana i profiltrirana voda.

**Tablica 1.** Kemikalije korištene u radu.

Kemikalija	Proizvođač
Aceton	<i>Sigma</i>
Metanol	<i>Sigma</i>
Benzojeva kiselina	<i>Merck</i>
Fosfatna kiselina	<i>Kemika</i>
Kadmij-klorid	<i>Sigma</i>

#### 3.2. Lišajni materijal

Uzorke svih triju vrsta lišaja sakupila sam u parku Maksimir (45°49'45"N, 16°01'17"E, 160 m nadmorske visine) koji se nalazi na istočnoj strani grada Zagreba. Uzorkovala sam u kasnu jesen krajem listopada 2014. godine po 10 jedinki svake vrste lišaja. Uzorci su uzeti sa starih i otpalih grana hrasta (*Quercus* sp.). Stavljanjem lišajeva (uzoraka) u vlažnu vrećicu osigurala sam da se ne isuše tijekom transporta u laboratorij u koji su dopremljeni u roku 24 h. Zatim sam izabrala lišajeve podjednake veličine, stavila ih u petrijeve posude na nekoliko slojeva filter papira namočenog destiliranom vodom te ih stavila u klima-komoru kako bi se prilagodili uvjetima u samoj komori. Uvjeti u klima-komori su bili 16 h svjetla ( $60 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) i 8 h tame uz temperaturu  $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ . Uzorci lišajeva su stavljeni na aklimatizaciju tijekom sedam dana prije samog izlaganja kadmiju.

### 3.3. **Tretiranje kadmijem**

Nakon aklimatizacije lišajnog materijala dio uzoraka sam natopila otopinom kadmija koncentracije 50 µg/ml u volumenu od 5 ml. Dio uzoraka sam koristila kao negativnu kontrolu te sam ih natopila samo destiliranom vodom. Zatim sam uzorke vratila u klima-komoru te sam daljnje pokuse vršila 0., 1., 3. i 8. dan pokusa. Nakon što bih izmjerila fluorescenciju klorofila *a*, dio uzoraka sam odvojila za daljnju analizu sekundarnih metabolita. Svi uzorci su mjereni u najmanje tri replike.

### 3.4. **Mjerenje fluorescencije klorofila *a* u uvjetima *in vivo***

Prije samog mjerenja fluorescencije lišajni materijal sam stavila u tamu na 30 minuta. Uključila sam računalo te pokrenula program Logger Pro 3.2 koji je povezan fluorometrom. Za mjerenje fluorescencije klorofila *a in vivo* koristila sam se metodom koju su opisali Lichtenthaler i Babani (2004) te Lichtenthaler i sur. (2005), a mjerena je pomoću sustava Qubit (Kanada).

Postavljanjem uzorka na filter papir natopljen destiliranom vodom koji se nalazi na stalku fluorimetra započela sam mjerenje fluorescencije. Prvo sam uzorak izložila crvenoj svjetlosti niskog intenziteta ( $1 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) te zabilježila minimalnu vrijednost fluorescencije ( $F_0$ ). Zatim sam isti uzorak izložila bijeloj svjetlosti visokog intenziteta ili aktiničnom svjetlu ( $1500 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) u trajanju od 7 minuta. Nakon izlaganja bijeloj svjetlosti fluorescencija klorofila je porasla do maksimalne vrijednosti fluorescencije ( $F_m$ ) nakon čega je u idućih 7 minuta padala do stabilnog stanja ( $F_s$ ). Kad je vrijeme isteklo isključila sam bijelu svjetlost te je uzorak tada bio osvijetljen crvenom svjetlošću, što je označilo završetak mjerenja. Uzorke sam mjerila istom metodom 0., 1., 3. i 8. dan.

Program Logger Pro 3.2 bilježi dobivene rezultate u obliku grafa, kojem se na apscisi nanosi vrijeme, a na ordinate relativni intenzitet fluorescencije. Iz grafova sam iščitavala podatke za  $F_0$ ,  $F_m$  i  $F_s$  te sam iz njih pomoću programa Microsoft Excel 2007 prema dolje navedenim formulama (Lichtenthaler i sur. 2005) računala slijedeće parametre:

OMJER VARIJABILNE I MAKSIMALNE FLUORESCENCIJE

$$(F_v/F_m)F_v/F_m = (F_m - F_0) / F_m \quad (\text{FORMULA 1})$$

OMJER VARIJABILNE I MINIMALNE FLUORESCENCIJE ( $F_v/F_0$ )

$$F_v/F_0 = (F_m - F_0)/F_0 \quad (\text{FORMULA 2})$$

STOPA SMANJENJA FLUORESCENCIJE KLOROFILA *a*

$$R_{Fd} = (F_m - F_s)/F_s \quad (\text{FORMULA 3})$$

### **3.5. Analiza sekundarnih metabolita**

Prije ekstrakcije materijala za HPLC analizu uzorke sam liofilizirala 24 sata u liofilizatoru Alfa 1-2, Christ, Njemačka.

Za analizu sekundarnih metabolita koristila sam po tri replike lišajnog materijala za svaku vrstu lišaja te sam mjerenja vršila 1., 3. i 8. dan na kontrolnim i onim uzorcima izloženim kadmiju.

#### **3.5.1. Ekstrakcija materijala**

Za ekstrakciju sam izvagala 18 mg liofiliziranog lišajnog materijala po uzorku. Uzimala sam vršne dijelove lišaja (do 5 mm) jer sadrže veće količine sekundarnih metabolita (Bjerke i sur. 2004, 2005). Zatim sam dodala 1,5 ml hladnoga acetona te ekstrahirala materijal u trajanju od 60 minuta na +4 °C (Feige i sur. 1993). Nakon toga sam uzorke centrifugirala na 25000 g tijekom 30 minuta na +4 °C. Dobiveni supernatant sam otpipetirala u prethodno pripremljene označene tubice te stavila na -20 °C do daljnje obrade.

#### **3.5.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti**

Pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) sam u pripremljenim uzorcima napravila kvalitativnu i kvantitativnu analizu sekundarnih metabolita. Analizu sam vršila pomoću HPLC sustava Perkin Elmer 200 (Perkin Elmer, SAD) opremljenog kvarternom pumpom, automatskim ubrizgivačem uzorka, nosačem uzorka i detektorom UV/VIS s diodnim nizom te reverzno-faznu kolonu Brownlee Spehri-5 ODS (5 µm, 250 × 4,6 mm, Perkin Elmer, SAD) s odgovarajućom predkolonom istog proizvođača i tipa (1,5 cm × 3,2 mm). Cijeli sustav je povezan s osobnim računalom opremljenim računalnim programom TotalChrom v6 2.1 (Perkin Elmer, SAD) koji upravlja, prikuplja, analizira i obrađuje podatke. Kao unutarnji standard koristila sam 0,002% benzojevu kiselinu pripremljenu otapanjem 2 mg benzojeve kiseline u 100 ml acetona.

Mobilna faza sastojala se od dviju otopina: (A) 1% (v/v) fosfatne kiseline u deioniziranoj vodi te (B) 100% metanola. Elucijski program razdvajanja, koji sam prilagodila iz metode po Feige i sur. (1993), optimiziran je s obzirom na svaku vrstu i njezin sadržaj sekundarnih metabolita. Protokol razdvajanja za vrstu *Parmelia sulcata* je bio sljedeći: ekvilibracija 5 minuta s 30% otopine B, linearni gradijent 11 minuta od 30 do 70% otopine B, linearni gradijent 8 minuta od 70 do 100% otopine B, izokratno 10 minuta 100% otopine B. Protokol razdvajanja za vrste *Evernia prunastri* i *Flavoparmelia caperata* je bio sljedeći: ekvilibracija 5 minuta s 30% otopine B, linearni gradijent 20 minuta od 30% B do 70% B, linearni gradijent 8 minuta od 70% do 100% otopine B, izokratno 10 minuta 100% otopine

B. Injekcijski volumen uzoraka bio je 20  $\mu\text{l}$ , brzina protoka 0,8  $\text{ml min}^{-1}$ , temperatura peltijera +10  $^{\circ}\text{C}$ , temperatura kolone je bila sobna (oko +23  $^{\circ}\text{C}$ ), a metaboliti su detektirani na 245 nm. Uzorke sam prije puštanja na HPLC-u ponovno centrifugirala (25000 g 30 minuta na +4  $^{\circ}\text{C}$ ) te pipetirala supernatant u označene testne tubice od 2 ml te ih potom još jednom pipetirala u označene vijalice od tamnog stakla.

Kako bih identificirala i kvantificirala pojedine sekundarne metabolite lišajeva izolirala sam njihove standarde tako što sam sakupljala pojedinačne odijeljene komponente u testnu tubicu tijekom analize na HPLC-u. Pojedinačne komponente sam identificirala pomoću podataka o retencijskom vremenu poznatih iz literature odnosno spektara dobivenih HPLC analizom pomoću detektora UV/VIS s diodnim nizom. Spektre pojedinih izoliranih i identificiranih komponenti sam dodatno analizirala pomoću spektrofotometra (UV/VIS spektrofotometar Spekol 1100, Analytik Jena, Njemačka) tako što sam izmjerila apsorbcije svake pojedine komponente u području 200-800 nm. Iz dobivenog spektra i vrijednosti apsorbcija na određenim valnim duljinama te poznatih molarnih ekstinkcijskih koeficijenata odredila sam koncentraciju izoliranih standarda pomoću Lambert-Beerovog zakona. Izolirala sam sljedeće sekundarne metabolite za koje navodim valne duljine maksimalne apsorbcije i ekstinkcijske koeficijente (Huneck i Yoshimura 1996): usninska kiselina (287 nm,  $\log \epsilon = 4,41$ ), salazinska kiselina (239 nm,  $\log \epsilon = 4,31$ ), atranorin (252 nm,  $\log \epsilon = 4,16$ ), protocetrarična (242 nm i  $\log \epsilon = 4,44$ ) i evernična kiselina (269 nm,  $\log \epsilon = 4,48$ ).

Za izradu kalibracijskog pravca potrebnog za određivanje koncentracije svakog spoja u uzorcima lišajeva koristila sam otopine pojedinih izoliranih standarda (atranorin, usninska, protocetrarična, evernična i salazinska kiselina) koje sam dodatno razrijedila kako bih imala niz poznatih koncentracija s kojima sam napravila kalibracijski pravac.

Usporedbom površine ispod svakog maksimuma pojedinog spoja iz uzoraka s površinama odgovarajućeg standarda poznatih koncentracija izračunala sam koncentraciju tog spoja u uzorku.

### **3.6. Statistička analiza**

Dobiveni rezultati su prikazani grafovima, koji prikazuju srednju vrijednost  $\pm$  standardna pogreška. Rezultati koji se razlikuju na razini  $p \leq 0,05$  su označeni različitim slovima. Za obradu dobivenih podataka koristila sam Microsoft Excel 2010 i Statistica 10 (StatSoft Inc., SAD). Međusobno sam dobivene rezultate usporedila analizom varijance (one-way ANOVA) i post hoc Tukey testom.



## 4. REZULTATI

### 4.1. Fluorescencija klorofila *a*

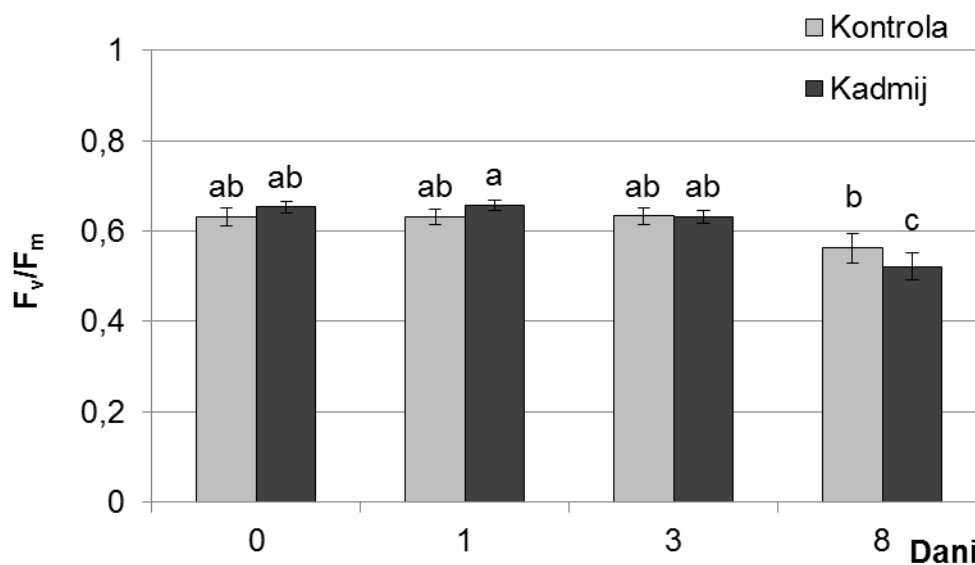
Kako bih provjerila fiziološko stanje sakupljenih lišajeva i vidjela jesu li se uspješno aklimatizirali na uvjete u klima-komori te utvrdila tzv. nulto stanje, fluorescenciju klorofila *a in vivo* izmjerila sam prije samog tretiranja lišajeva kadmijem i to je na grafu prikazano kao 0. dan. Zatim sam fluorescenciju klorofila *a* mjerila 1., 3. i 8. dan nakon samog tretmana kadmija i na kontrolnim uzorcima koji nisu bili tretirani kadmijem i na onima koji su bili tretirani kako bih mogla utvrditi dolazi li i u kontrolnim uzorcima do nekih promjena tijekom duljeg držanja u klima-komori. Od parametara fluorescencije koristila sam optimalni prinos fluorescencije ( $F_v/F_m$ ) kao pokazatelj učinkovitosti fotosistema II te stopu smanjenja fluorescencije ( $R_{Fd}$ ) kao pokazatelj stope fotosinteze.

#### 4.1.1. *Flavoparmelia caperata*

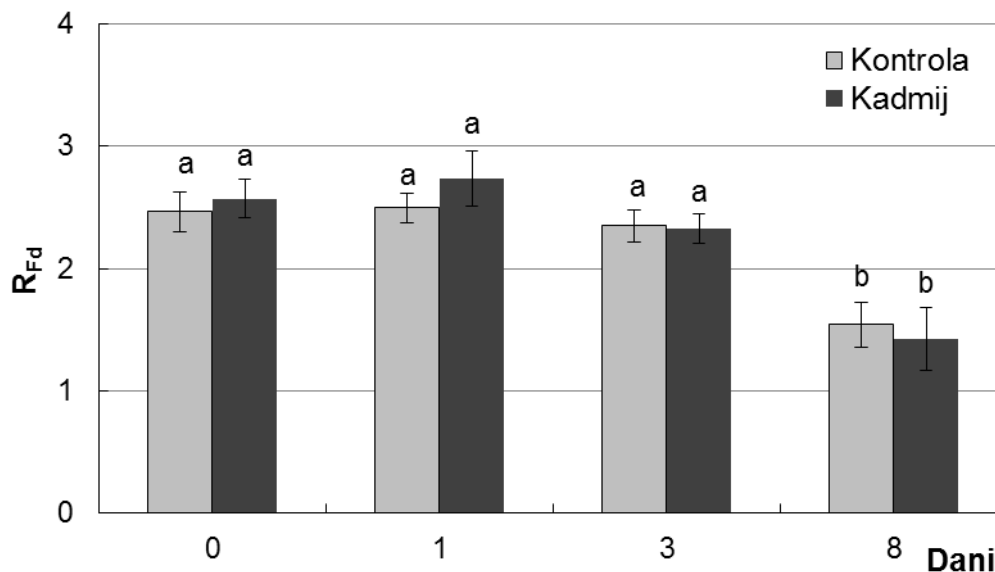
U vrste *Flavoparmelia caperata* nulti dan (0. dan) nije bilo značajne razlike u istraživanim parametrima fluorescencije klorofila *a* između onih primjeraka lišajeva koji će biti kontrolni i onih koji će poslije biti tretirani kadmijem (Slika 4 i 5).

Nakon 1. i 3. dana izlaganja kadmiju također nije bilo značajne promjene u istraživanim parametrima. Međutim, 8. dan pokusa utvrdila sam smanjenje vrijednosti parametra  $F_v/F_m$  i kod kontrolnih i kod lišajeva tretiranih kadmijem s time da smanjenje u kontrolnim uzorcima nije bilo značajno u odnosu na kontrolu 0. dan dok je smanjenje u uzorcima tretiranim kadmijem bilo značajno niže u odnosu na 0. dan što govori o negativnom učinku kadmija na fotosintetsku učinkovitost fotosistema II (Slika 4).

Također, 8. dan sam uočila i značajno sniženje vrijednosti  $R_{Fd}$  parametra u odnosu na 0. dan i u kontrolnim i u uzorcima tretiranim kadmijem što ukazuje na smanjenje stope fotosinteze i u uzorcima koji nisu bili tretirani i u onima koji jesu (Slika 5).



**Slika 4.** Optimalni prinos fluorescencije ( $F_v/F_m$ ) u vrste *Flavoparmelia caperata*. Parametri fluorescencije klorofila *a* određivani su 0., 1., 3. i 8. dan tretmana u lišajevima koji nisu bili tretirani kadmijem (Kontrola) te u lišajevima tretiranim kadmijem (Kadmij) u koncentraciji 50 mg/l. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost od najmanje tri replike  $\pm$  standardna pogreška. Različita slova iznad stupaca predstavljaju statistički značajne razlike između uzoraka ( $p < 0,05$ ).



**Slika 5.** Stopa smanjenja fluorescencije ( $R_{Fd}$ ) u vrste *Flavoparmelia caperata*. Parametri fluorescencije klorofila *a* određivani su 0., 1., 3. i 8. dan tretmana u lišajevima koji nisu bili tretirani kadmijem (Kontrola) te u lišajevima tretiranim kadmijem (Kadmij) u koncentraciji 50 mg/l. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost od najmanje tri replike  $\pm$  standardna pogreška. Različita slova iznad stupaca predstavljaju statistički značajne razlike između uzoraka ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.2. *Evernia prunastri*

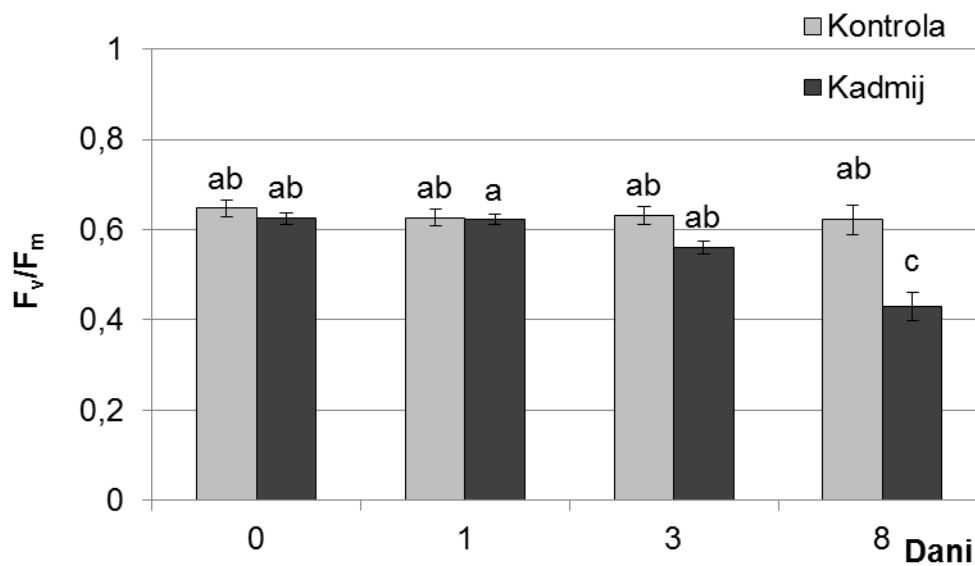
U vrste *Evernia prunastri* 0. dan nisam uočila značajnu razliku u istraživanim parametrima fluorescencije klorofila *a* između onih primjeraka lišajeva koji će biti kontrolni i onih koji će se kasnije tretirati kadmijem (Slike 6 i 7).

Nakon 1. dana izlaganja kadmiju nije došlo do značajnije promjene u istraživanim parametrima. Trećeg dana izlaganja došlo je do vrlo malog smanjenja vrijednosti parametra  $F_v/F_m$  kod lišajeva tretiranih kadmijem u odnosu na 0. dan dok je u kontrolnim uzorcima vrijednost ostala stabilna u odnosu na kontrolu 0. dan. Također 3. dan izlaganja nije bilo značajne promjene u stopi smanjenja fluorescencije ( $R_{Fd}$ ).

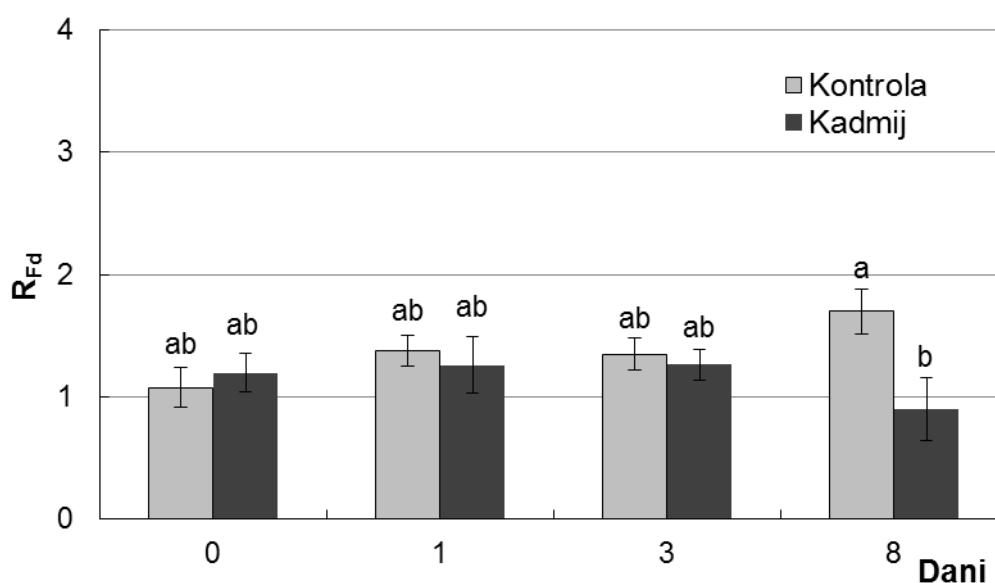
Zadnjim mjerenjem, odnosno 8. dan utvrdila sam smanjenje parametra  $F_v/F_m$  u lišajeva tretiranih kadmijem koje je bilo značajno u odnosu na 0. dan dok je vrijednost kod kontrolnih uzoraka

ostala slična i nije bilo značajne razlike u odnosu na 0. dan što nam govori o negativnom učinku kadmija na fotosintetsku učinkovitost fotosistema II (Slika 6).

Kod mjerenja vrijednosti  $R_{Fd}$  parametra 8. dan pokusa uočila sam lagano povećanje vrijednosti u kontrolnim uzorcima u odnosu na 0. dan, a kod lišajeva tretiranih kadmijem značajno smanjenje vrijednosti u odnosu na netretirane lišajeve što nam ukazuje na smanjenje stope fotosinteze u tretiranim uzorcima i na negativan učinak kadmija (Slika 7).



**Slika 6.** Optimalni prinos fluorescencije ( $F_v/F_m$ ) u vrste *Evernia prunastri*. Parametri fluorescencije klorofila *a* određivani su 0., 1., 3. i 8. dan tretmana u lišajevima koji nisu bili tretirani kadmijem (Kontrola) te u lišajevima tretiranim 50 mg/l kadmijem (Kadmij). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost od najmanje tri replike  $\pm$  standardna pogreška. Različita slova iznad stupaca predstavljaju statistički značajne razlike između uzoraka ( $p < 0,05$ ).



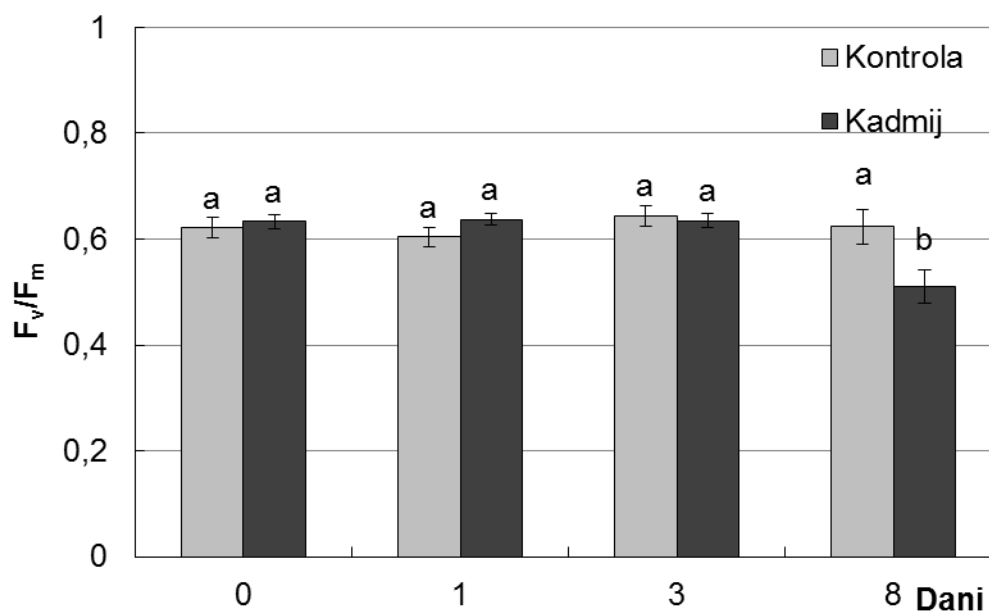
**Slika 7.** Stopa smanjenja fluorescencije ( $R_{Fd}$ ) u vrste *Evernia prunastri*. Parametri fluorescencije klorofila *a* određivani su 0., 1., 3. i 8. dan tretmana u lišajevima koji nisu bili tretirani kadmijem (Kontrola) te u lišajevima tretiranim 50 mg/l kadmijem (Kadmij). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost od najmanje tri replike  $\pm$  standardna pogreška. Različita slova iznad stupaca predstavljaju statistički značajne razlike između uzoraka ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.3. *Parmelia sulcata*

U vrste *Parmelia sulcata* 0. dan razlika u istraživanim parametrima fluorescencije klorofila *a* između primjeraka kontrolnih lišajeva i onih koji će se kasnije tretirati kadmijem nije bila značajna (Slike 8 i 9).

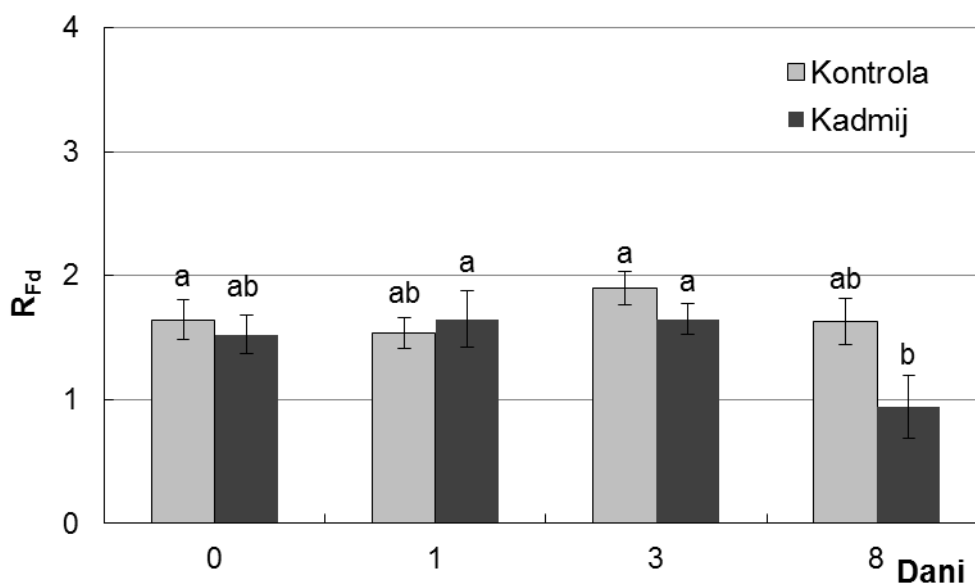
Pri mjerenju 1. i 3. dan nakon tretiranja kadmijem također nije bila uočena značajna promjena u istraživanim parametrima.

Osmog dana pokusa utvrdila sam smanjenje vrijednosti parametra  $F_v/F_m$  kod uzoraka lišajeva tretiranih kadmijem u odnosu na 0. dan te u odnosu na netretirane lišajeve 8. dan što nam ukazuje na negativan učinak kadmija na fotosintetsku učinkovitost fotosistema II. Kod kontrolnih uzoraka nije došlo do značajnije promjene u odnosu na kontrolu 0. dan.



**Slika 8.** Optimalni prinos fluorescencije ( $F_v/F_m$ ) u vrste *Pamelia sulcata*. Parametri fluorescencije klorofila *a* određivani su 0., 1., 3. i 8. dan tretmana u lišajevima koji nisu bili tretirani kadmijem (Kontrola) te u lišajevima tretiranim 50 mg/l kadmijem (Kadmij). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost od najmanje tri replike  $\pm$  standardna pogreška. Različita slova iznad stupaca predstavljaju statistički značajne razlike između uzoraka ( $p < 0,05$ ).

Također, 8. dan sam uočila sniženje vrijednosti parametra  $R_{fd}$  na uzorcima tretiranim kadmijem u odnosu na 0. dan te u odnosu na netretirane lišajeve 8. dan, ali to sniženje nije bilo statistički značajno. Kod kontrolnih uzoraka  $R_{fd}$  vrijednost je ostala stabilna u odnosu na 0. dan.



**Slika 9.** Stopa smanjenja fluorescencije ( $R_{Fd}$ ) u vrste *Pamelia sulcata*. Parametri fluorescencije klorofila *a* određivani su 0., 1., 3. i 8. dan tretmana u lišajevima koji nisu bili tretirani kadmijem (Kontrola) te u lišajevima tretiranim 50 mg/l kadmijem (Kadmij). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost od najmanje tri replike  $\pm$  standardna pogreška. Različita slova iznad stupaca predstavljaju statistički značajne razlike između uzoraka ( $p < 0,05$ ).

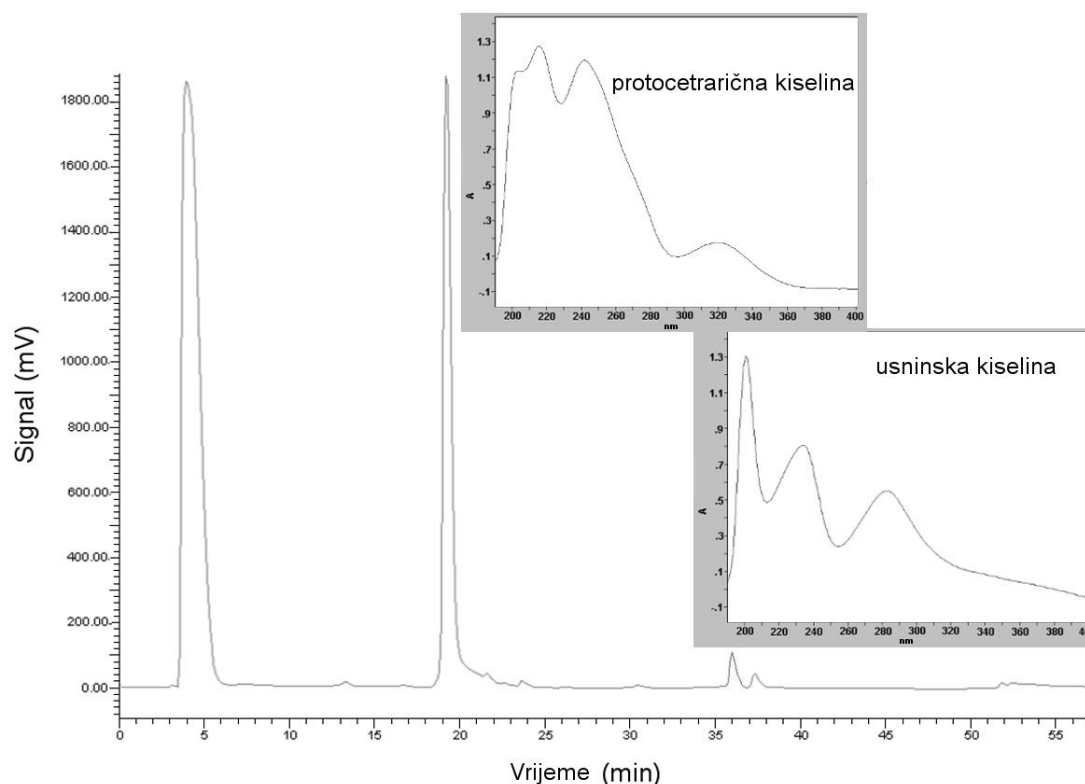
## 4.2. Sekundarni metaboliti

Sekundarni metaboliti lišajeva su kemijski različiti spojevi većinom specifični samo za lišajeve. Budući da se spominju kao važni čimbenici u homeostazi metala i toleranciji lišaja na onečišćenje u ovom sam radu identificirala sekundarne metabolite u svim istraživanim vrstama lišajeva te odredila njihovu koncentraciju u jedinkama koje nisu bile izlagane kadmiju te u onima izlaganim kadmiju (1., 3. i 8. dan). Kao metodu za razdvajanje i identifikaciju te određivanje koncentracije pojedinih sekundarnih metabolita istraživanih lišajeva koristila sam tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC).

### 4.2.1. *Flavoparmelia caperata*

Na kromatogramu (Slika 10) dobivenom iz acetonskih ekstrakata lišaja *Flavoparmelia caperata* pomoću HPLC-a jasno se uočava nekoliko razdvojenih pikova. Svaki od pikova na kromatogramu predstavlja pojedinačne spojeve. Prvi sa najkraćim retencijskim vremenom je aceton

(oko 5 minute), zatim slijedi protocetrarična kiselina (oko 20 minute) i na kraju usninska kiselina (oko 35-36 minute). Pik koji izlazi nakon usninske kiseline najvjerojatnije je atranorin. Spojeve sam identificirala pomoću snimljenih UV-VIS spektara tih spojeva (Slika 10) koje sam usporedila s literaturnim podacima.

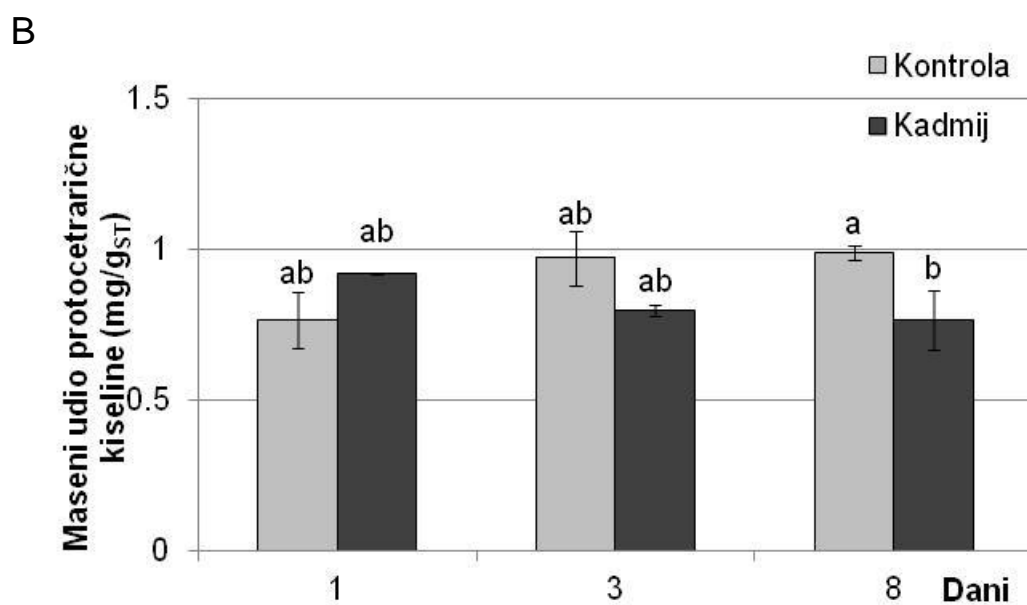
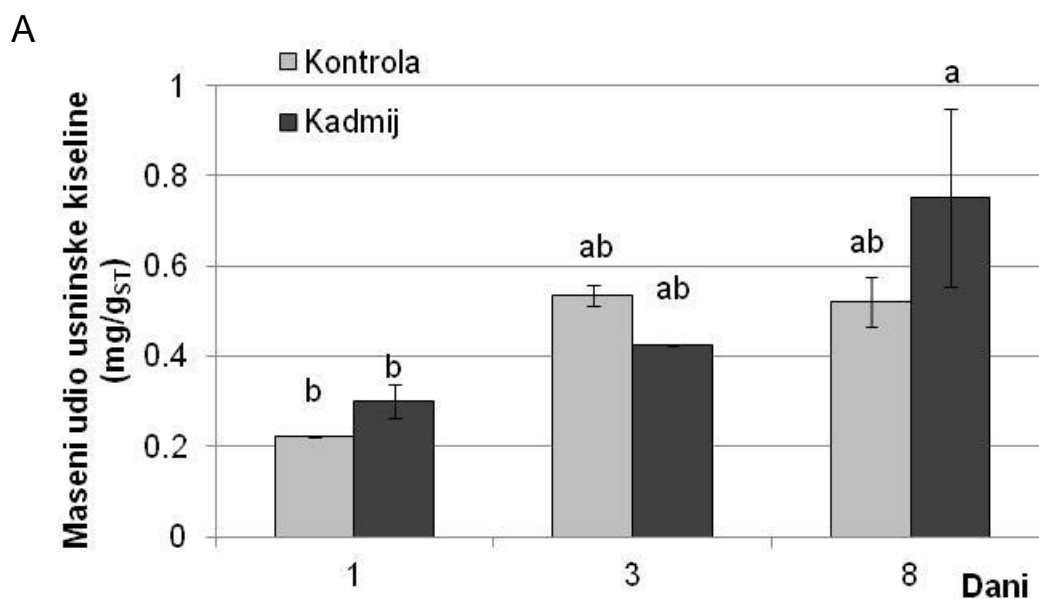


**Slika10.** Kromatogram acetonskog ekstrakta vrste *Flavoparmelia caperata* i UV-VIS spektri protocetrarične i usninske kiseline.

Kvantifikacija pojedinih spojeva pokazala je da je u kontrolnim uzorcima vrste *Flavoparmelia caperata* došlo do malog porasta u udjelu protocetrarične kiseline (od 0,77 mg/g do 0,92 mg/g<sub>ST</sub>) i usninske kiseline (od 0,22 mg/g do 0,52 mg/g<sub>ST</sub>) od 1. do 8. dana pokusa (Slika 10) koji nije bio značajan.

U uzorcima lišajeva tretiranih kadmijem količina protocetrarične kiseline bila je nešto veća (0,92 mg/g<sub>ST</sub>) u odnosu na kontrolne uzorke nakon 1. dana izlaganja. Nakon 3. dana izlaganja udio se smanjio na 0,80 mg/g<sub>ST</sub> i na kraju nakon 8. dana na 0,76 mg/g<sub>ST</sub> što je značajno niže u odnosu vrijednost u kontrolnim uzorcima tog istog dana (Slika 11A). Količina usninske kiseline u tretiranim uzorcima se nije značajno mijenjala u odnosu na kontrolne nakon 1. i 3. dana izlaganja, no nakon 8. dana došlo je do porasta količine do vrijednosti 0,75 mg/g<sub>ST</sub> (Slika 11B).

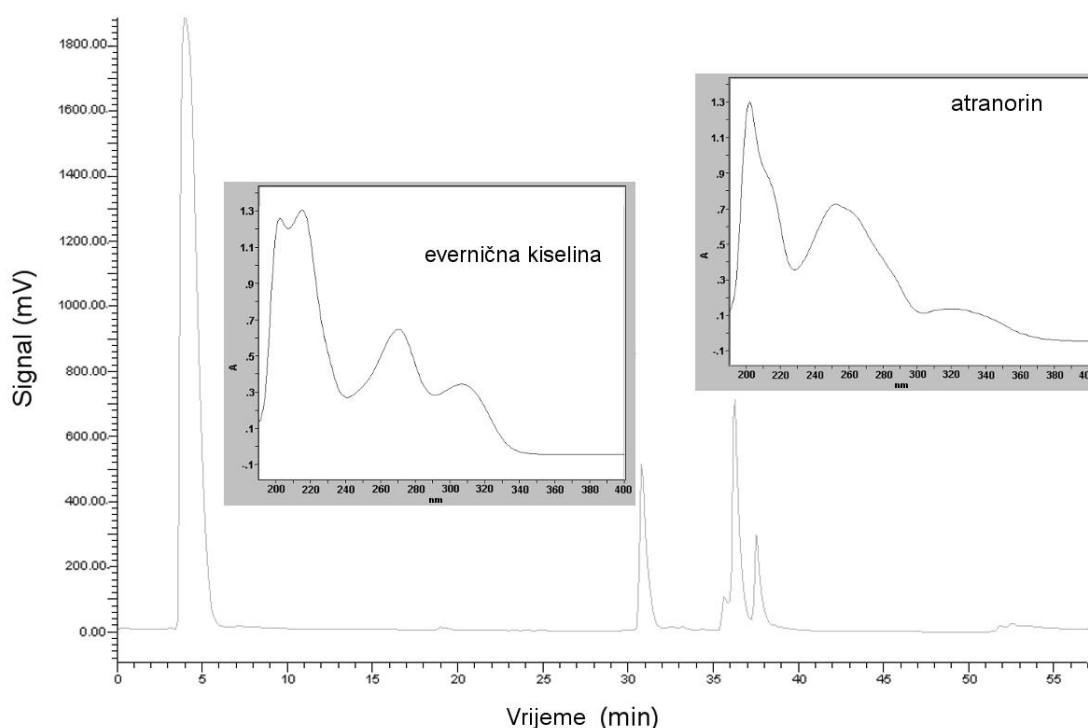




**Slika 11.** Maseni udio protocetrarične (A) i usninske kiseline (B) u tkivu vrste *Flavoparmelia caperata*. Maseni udio metabolita je mjereno 1., 3. i 8. dan pokusa u lišajevima koji nisu bili tretirani kadmijem (Kontrola) i u lišajevima tretiranim 50 mg/l kadmijem (Kadmij). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost od najmanje tri replike  $\pm$  standardna pogreška. Različita slova iznad stupaca predstavljaju statistički značajne razlike između uzoraka ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.2. *Evernia prunastri*

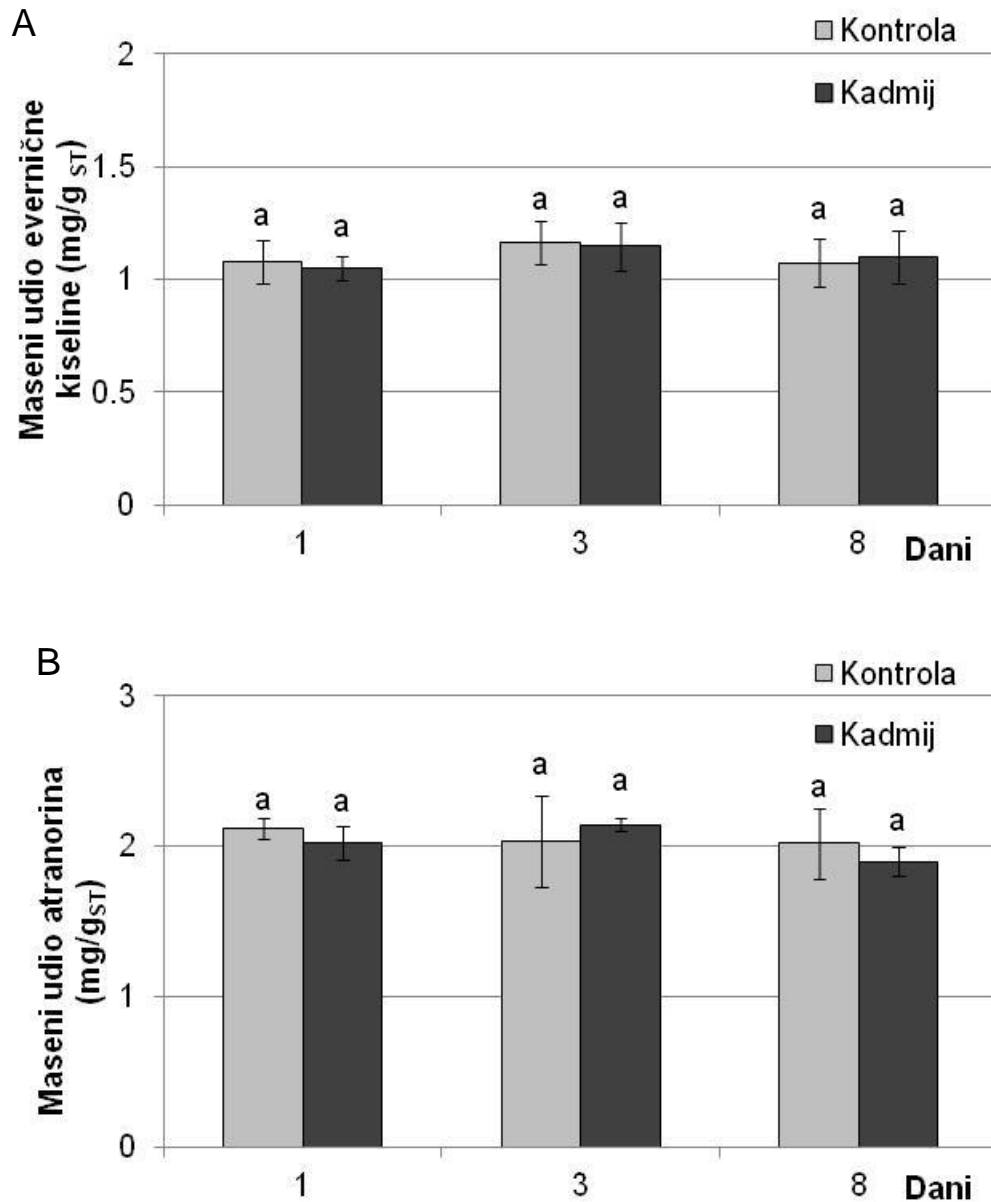
Na kromatogramu dobivenom razdvajanjem iz ekstrakata lišaja *Evernia prunastri* vidljivo je nekoliko dobro razdvojenih pikova. Prvi sa najkraćim retencijskim vremenom je aceton (oko 5 min), zatim slijedi evernična kiselina (oko 31 minute) pa atranorin (oko 36-37 minute) kao glavni sekundarni metabolit i kloroatranorin (oko 37-38 minute) u manjini (Slika 12). Navedene spojeve sam našla u svim izmjerenim uzorcima, ali sam kvantificirala samo dva glavna metabolita, everničnu kiselinu i atranorin.



**Slika 12.** Kromatogram acetonskog ekstrakta vrste *Evernia prunastri* i UV-VIS spektri evernične kiseline i atranorina.

Kod kontrolnih uzoraka vrste *Evernia prunastri* udio evernične kiseline i atranorina nije se mijenjao tijekom pokusa od 1. do 8. dana te se kretao oko 1,10 mg/g<sub>ST</sub> za everničnu kiselinu i 2,05 mg/g<sub>ST</sub> za atranorin (slika 13).

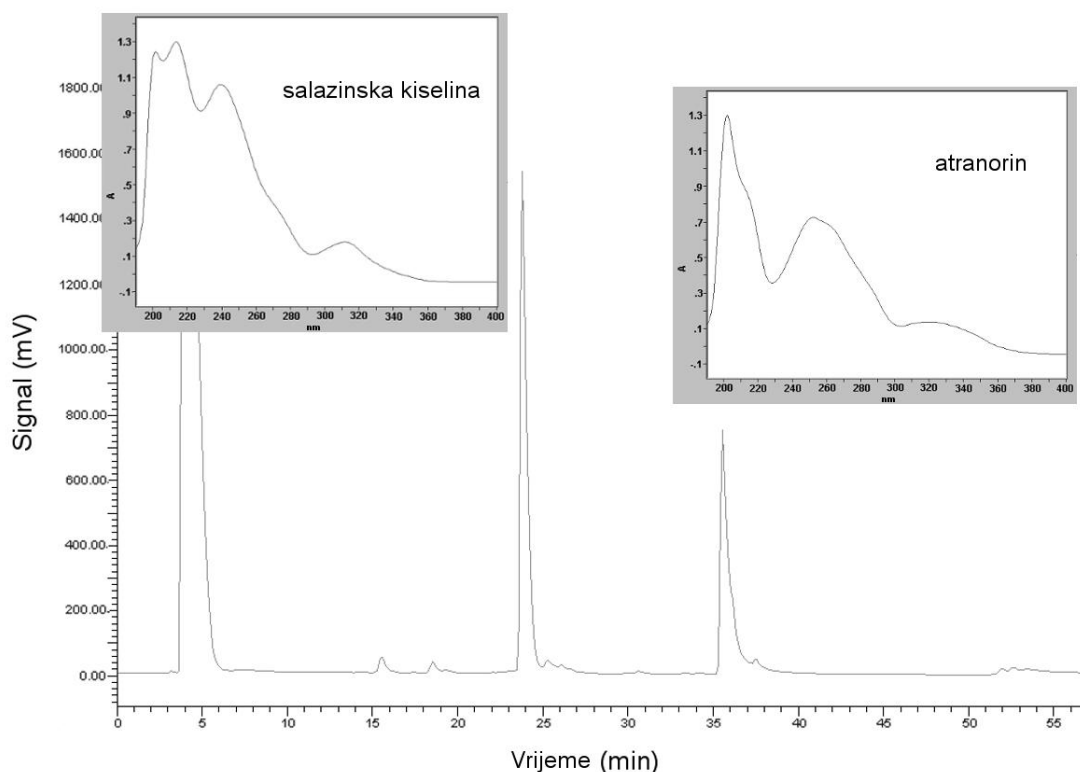
U uzorcima tretiranih kadmijem nije uočena značajna promjena u udjelu metabolita tijekom trajanja pokusa od 1. do 8. dana.



**Slika 13.** Maseni udio evernične kisleine (A) i atranorina (B) u vrste *Evernia prunastri*. Maseni udio metabolita mjereno je 1., 3. i 8. dan pokusa u lišajevima koji nisu bili tretirani kadmijem (Kontrola) i u lišajevima tretiranim 50 mg/l kadmijem (Kadmij) te izražena u mg po g suhe tvari. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost od najmanje tri replike ± standardna pogreška. Različita slova iznad stupaca predstavljaju statistički značajne razlike između uzoraka ( $p < 0,05$ ).

### 4.2.3. *Parmelia sulcata*

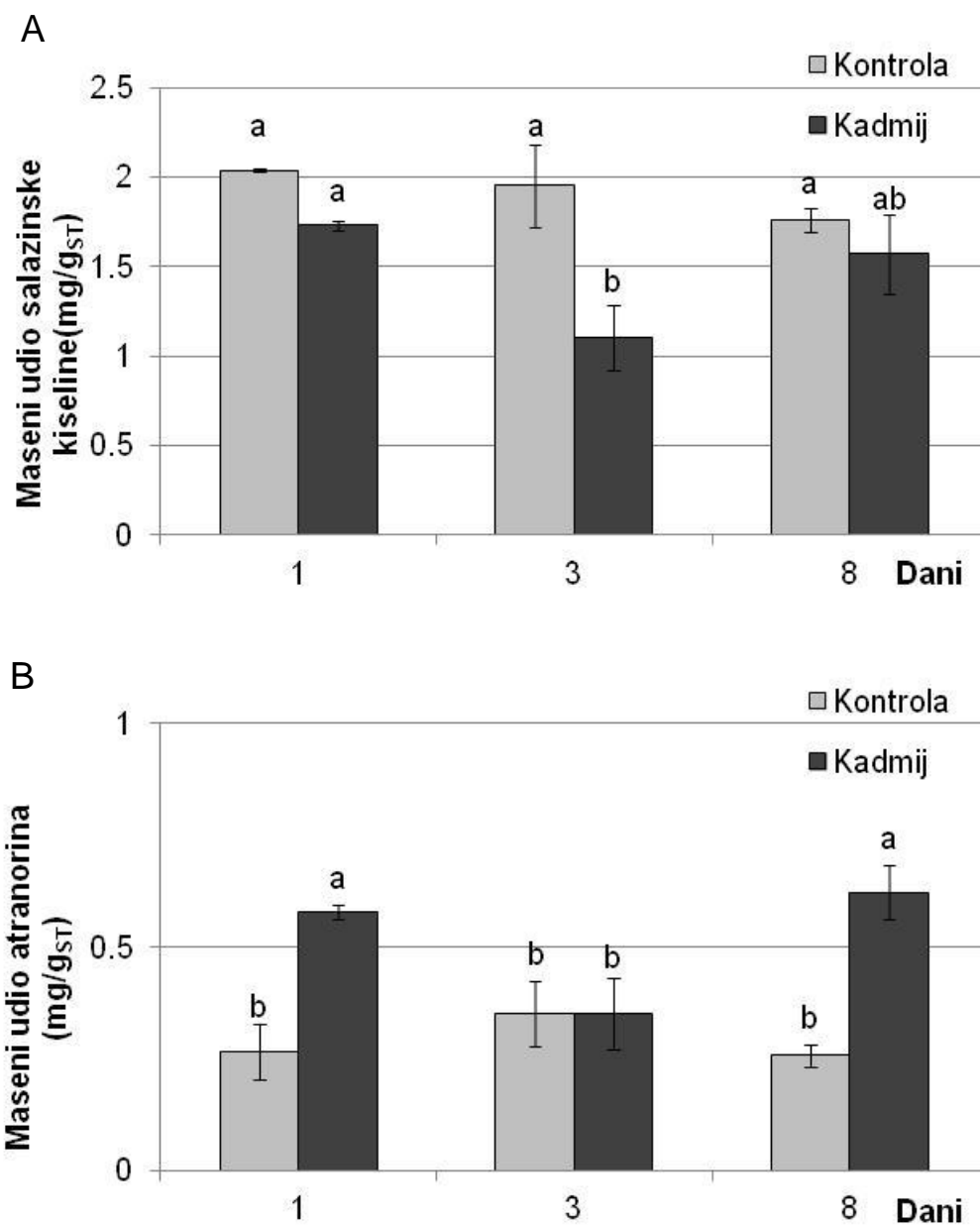
U acetonskim ekstraktima lišaja *Parmelia sulcata* izdvojila sam dva sekundarna metabolita i odredila ih prema retencijskom vremenu i UV spektrima. Kod ove vrste lišaja glavni metabolit je salazinska kiselina (izlazi oko 24 minute) dok je onaj u manjini atranorin (oko 36 minute) (slika 14). Navedeni spojevi nađeni su u svim mjerenim uzorcima.



**Slika 14.** Kromatogram acetonskog ekstrakta vrste *Parmelia sulcata* i UV-VIS spektri salazinske kiseline i atranorina.

Tijekom trajanja pokusa količina salazinske kiseline u kontrolnim uzorcima lišajeva se malo smanjila od 1. do 8. dana, sa 2,04 na 1,76 mg/g<sub>ST</sub> dok se količina atranorina nije značajno mijenjala tijekom pokusa (slika 15).

U uzorcima lišajeva tretiranih kadmijem količina salazinske kiseline je bila niža u odnosu na kontrolne vrijednosti no razlika je bila značajna tek nakon 3. dana izlaganja kada je vrijednost pala na 1,10 mg/g<sub>ST</sub> (slika 15A). Kod atranorina se dogodilo suprotno odnosno uočen je značajni rast količine nakon 1. i 8. dana izlaganja kadmiju (slika 15B).



**Slika 15.** Maseni udio salazinske kiseline (A) i atranorina (B) u vrste *Parmelia sulcata*. Maseni udio metabolita mjereno je 1., 3. i 8. dan pokusa u lišajevima koji nisu bili tretirani kadmijem (Kontrola) i u lišajevima tretiranim 50 mg/l kadmijem (Kadmij) te izražena u mg po g suhe tvari. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost od najmanje tri replike  $\pm$  standardna pogreška. Različita slova iznad stupaca predstavljaju statistički značajne razlike između uzoraka ( $p < 0,05$ ).

## 5. RASPRAVA

Za svoje istraživanje utjecaja kadmija na fotosintezu i sekundarne metabolite u ovom radu sam koristila epifitske lišajeve koji su poznati kao vrlo dobri biološki indikatori onečišćenja zraka te su kao takvi prepoznati u Europi još 1860-tih godina (Nash III 2008). Lišajevi su organizmi bez korijenovog sustava i kutikule te kao takvi primaju sve hranjive tvari pa tako i metale isključivo iz atmosfere (Conti i Cecchetti 2001). Također je važna i njihova značajka da zbog svoje velike površine te sporog rasta mogu akumulirati količine metala van svojih fizioloških potreba (Garty 1988). Zbog svega navedenog lišajevi su organizmi koji se često koriste kao pokazatelji zagađenja zraka iz različitih industrija, cestovnog prometa i drugih izvora (Loppi i sur. 2004, Lackovičová i sur. 2013, Stamenković i sur. 2013). U ovom istraživanju koristila sam vrste *Parmelia sulcata*, *Evernia prunastri* i *Flavoparmelia caperata*, koje su se u dosadašnjim istraživanjima pokazale osjetljive na zagađenje zraka metalima (Loppi i sur. 2004, Lackovičová i sur. 2013, Stamenković i sur. 2013).

Mjerenje različitih parametara fluorescencije klorofila *a* uspješno je korišteno tijekom zadnjih 20-tak godina u mnogim istraživanjima s lišajevima (Jensen 2002). Kao i u biljaka jedan od parametara je optimalni kvantni prinos FSII ( $F_v/F_m$ ), koji je važan pokazatelj fotosintetske učinkovitosti (Maxwell i Johnson 2000). U radovima u kojima su lišajevi korišteni kao bioindikatori zagađenja korišten je i kao pokazatelj vitalnosti lišajeva (Paoli i sur. 2015). U ovom radu kod sve tri istraživane vrste lišajeva, vrijednost parametra  $F_v/F_m$  kod lišajeva većinom je odgovarala vrijednostima karakterističnim za lišajeve od 0,63 do 0,76, koje su niže nego vrijednosti koje nalazimo u biljkama, od 0,74 do 0,83 (Jensen 2002). U uzorcima lišajeva tretiranih kadmijem izmjerene su znatno niže vrijednosti parametra  $F_v/F_m$  koje ukazuju na oštećenja fotosintetskog aparata. Dobiveni rezultati bili su očekivani jer se u stresnim uvjetima učinkovitost procesa fotosinteze smanjuje i veći udio energije se oslobađa fluorescencijom. Poznato je da kadmij uzrokuje ultrastrukturne promjene i inhibira sintezu klorofila te može uzrokovati oksidacijski stres (Sanità di Toppi i sur. 2005) što može dovesti do inhibicije procesa fotosinteze te oštećenja fotosintetskog aparata. Međutim, smanjenje učinkovitosti fotosinteze je uočeno tek nakon 8. dana izlaganja kadmiju, što nam zapravo ukazuje na relativnu otpornost fotosinteze prema kadmiju kod lišajeva. Bačkor i sur. (2010) su također utvrdili kako kadmij ima relativno nisku toksičnost u lišajeva *Peltigera rufescens* i *Cladonia arbuscula*, kad ga uspoređujemo s drugim teškim metalima, kao što je na primjer bakar. Karakoti i sur. (2014) pokazali su kako je talus lišaja *Pyxine cocoes* koji je sadržavao različite metala (aluminij, željezo, zink, olovo, bakar) u različitim količinama imao  $F_v/F_m$  vrijednost sličnu onoj koju je imao talus koji nije bio izlagan metalima. Suprotno tome, smanjenje  $F_v/F_m$  vrijednosti je uočeno kod epifitskog grmastog lišaja *Ramalina lacera* koji je sadržavao visoke količine barija, nikla, sumpora, vanadija i cinka nakon izlaganja antropogenom onečišćenju (Garty i sur. 2000). Iz svega možemo zaključiti da osjetljivost

fotosintetske aktivnosti na različite metale prilično varira ovisno o vrsti lišaja te vrsti metala. Primijećena odgoda učinka kadmija na proces fotosinteze u ovom radu nam potencijalno ukazuje da toksičnost može ovisiti i o duljini vremena izlaganja. Naime lišajevi u ovom radu nakon tretiranja kadmijem nisu bili ispirani nego su samo stalno vlaženi kako bi bili u stanju aktivnog metabolizma pa je za pretpostaviti da je cijelo to vrijeme nanesei kadmij mogao ulaziti u tkivo talusa i akumulirati se. To je djelomično i potvrđeno mjerenjem koncentracije kadmija u talusu istraživanih lišajeva koje je pokazalo da se tijekom pokusa koncentracija kadmija u vrsta *E. prunastri* i *P. sulcata* proporcionalno povećavala s približno 0,45  $\mu\text{g/g}_{\text{ST}}$  prije izlaganja na oko 400 i 570  $\mu\text{g/g}_{\text{ST}}$  1., odnosno 3. dan, nakon tretmana kadmijem, pa sve do 1100  $\mu\text{g/g}_{\text{ST}}$  8. dan. U vrste *F. caperata* prije izlaganja je izmjereno oko 8,5  $\mu\text{g Cd/g}_{\text{ST}}$ , a nakon tretmana kadmijem 530 i 835  $\mu\text{g Cd/g}_{\text{ST}}$  1. i 3. dan odnosno 2200  $\mu\text{g Cd/g}_{\text{ST}}$  8. dan (neobjavljeni rezultati). No kako je za određivanje metala ostala mala količina tkiva koja je bila dovoljna samo za jednu repliku ove rezultate bi trebalo dodatno potvrditi. Također, u istraživanjima učinaka olova, otkriveno je da produljeno izlaganje dovodi do dodatnog smanjenja vrijednosti parametra  $F_v/F_m$  u vrste *Flavoparmelia caperata* (Garty 2002). Osim parametra  $F_v/F_m$  u ovom radu sam također mjerila stopu smanjenja fluorescencije ( $R_{Fd}$ ), parametar koji je direktno povezan sa stopom fotosinteze, odnosno govori nam i o tome što se događa u sekundarnim reakcijama fotosinteze (Lichtenthaler i sur. 2005). Ako je vrijednost tog parametra smanjenja znači da je došlo do smanjenje učinkovitosti Calvinovog ciklusa i smanjenog trošenja ATP-a i NADPH što posljedično dovodi do inhibicije primarnih reakcija fotosinteze. U ovom radu  $R_{Fd}$  vrijednost u kontrolnim uzorcima je većinom bila podjednaka  $R_{Fd}$  vrijednostima izmjerenima kod lišaja *Anaptychia ciliaris* (Valladeras i sur. 1995). Međutim, u mojem pokusu produljeno vrijeme uzgoja lišajeva u laboratorijskim uvjetima uzrokovalo je smanjenje parametra  $R_{Fd}$  tijekom pokusa u kontrolnim talusima vrste *F. caperata*, što nam vjerojatno pokazuje da je ova vrsta osjetljiva na okolišne uvjete koji nisu prirodni. U uzorcima lišajeva tretiranih kadmijem,  $R_{Fd}$  parametar je pokazao isti trend kao i  $F_v/F_m$  parametar u svim istraživanim vrstama, odnosno došlo je do smanjenja i to osobito 8. dan izlaganja kadmiju. S obzirom da je parametar  $R_{Fd}$  rijetko istraživan kod lišajeva, nisam pronašla nikakve podatke o tom parametru u lišajeva koji su bili izlagani onečišćenju teškim metalima.

Većina metabolita koji spadaju u sekundarne metabolite kao i njihove kombinacije specifična je za svaku pojedinu vrstu lišaja te se stoga njihovo određivanje vrlo često koristi u taksonomiji i sistematici lišajeva (Molnár i Farkas 2010). Također ti su metaboliti poznati po tome da funkcioniraju kao helatori teških metala (Bačkor i Loppi 2009) i stoga imaju važnu ulogu u toleranciji lišajeva na onečišćenja teškim metalima. U vrstama lišajeva koje smo analizirali u ovom istraživanju gotovo svi sekundarni metaboliti specifični za tu vrstu su uspješno detektirani. Tako sam u vrste *P. sulcata* utvrdila salazinsku kiselinu i atranorin, u vrste *E. prunastri* everničnu kiselinu, atranorin i

kloroatranorin, a u vrste *F. caperata* protocetraričnu i usninsku kiselinu (Nash i sur. 2002). Budući da se navedeni spojevi ne mogu kupiti kao standardi morala sam ih sama izolirati pomoću HPLC metode i/ili metode tankoslojne kromatografije iz onih vrsta lišajeva za koje su specifični (Nash i sur. 2002) te ih zatim potvrditi pomoću UV-VIS spektara koji su karakteristični za svaki specifični metabolit. Nisam uspjela detektirati samo konsalazinsku kiselinu, metabolit koji nalazimo u manjoj količini kod vrste *P. sulcata* i kaperatičnu kiselinu, također metabolit koji se u manjoj količini nalazi u vrste *F. caperata*. Kaperatična kiselina spada u alifatske kiseline koje se ne mogu detektirati putem HPLC metode koja je korištena u ovom istraživanju. Rezultati kvantitativne analize sekundarnih metabolita pokazali su da je kod lišajeva koji imaju listastu formu talusa tijekom izlaganja kadmiju došlo do smanjenja sadržaja metabolita karakterističnih za pojedinu vrstu. Tako je u vrste *P. sulcata* uočena niža količina salazinske kiseline, a u vrste *F. caperata* protocetrarične kiseline. Zanimljivo je da oba dva metabolita po svojoj kemijskog strukturi spadaju u grupu depsidona za koje je karakteristično da se akumuliraju u meduli lišajeva. S druge strane, izlaganje kadmiju je dovelo do porasta količine metabolita koji su karakteristični za korteks lišaja; depsida atranorina u vrste *P. sulcata* i dibenzofurana usninske kiseline u vrste *F. caperata*. Međutim, kod grmastog lišaja *E. prunastri* nije došlo do nikakvih značajnijih promjena u količini sekundarnih metabolita nakon tretmana kadmijem. Rezultati mog istraživanja mogli bi potvrditi da kemijska struktura metabolita te dio lišaja u kojem se pojedini metaboliti deponiraju, meduli ili korteksu, značajno utječu na funkciju tog metabolita u homeostazi teških metala. Također čini se da bi i način na koji lišaj raste odnosno forma rasta (listasti/grmasti) mogao imati utjecaj. Neki autori predlažu da uloga sekundarnih metabolita ovisi o dijelu lišaja u kojem su deponirani pa se tako za kortikalne depside pretpostavlja da štite od viška sunčevog zračenja, dok se za medularne depsidone misli da bi mogli imati ulogu helatora za katione ili da su pak antiherbivorne tvari (Solhauget i sur. 2009). Povišene razine fizodalične kiseline depsidona karakterističnog za medulu nađene su kod vrste *Hypogymnia physodes*, nakon što je bila prenesena i transplantirana u industrijskom području sa visokom emisijom teških metala kadmija, kroma, nikla, olova, cinka te sumpora (Bialonska i Dayan 2005). U iste vrste nađena je smanjena razina kortikalnog depsida atranorina. Pawlik-Skowrońska i Bačkor (2011) utvrdili su veće količine depsida lekanorične kiseline kod vrste *Hypocenomyce scalaris* i depsidona fumaroprocetrarične kiseline u lišaju *Cladonia furcata* na rudarskom području zagađenom olovom i cinkom u usporedbi sa onima na nezagađenom staništu. Rezultati nekoliko istraživačkih radova pokazali su da sekundarni metaboliti lišaja kontroliraju homeostazu metala tako da potiču vezanje određenog kationa to jest esencijalnog metala i/ili reduciraju apsorpciju drugog metala koji je potencijalno toksičan (Molnár i Farkas 2010). Na primjer, fizodalična kiselina iz vrste *Hypogymnia physodes* je povećala vezanje  $Fe^{2+}$  iona i smanjila vezanje  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  i  $Na^{+}$  iona (Hauck i Huneck 2007, Hauck 2008). Kod sekundarnih metabolita dibenzofurana usninske kiseline i divarikatične kiseline je otkriveno da oba povećavaju intracelularni



unos  $\text{Cu}^{2+}$  iona u vrsta *Evernia mesomorpha* i *Ramalina menziessii* (Hauck i sur. 2009), ali smanjuju unos i vezanje  $\text{Mn}^{2+}$  iona. Spektroskopske metode i metoda rendgenske difrakcije pokazale su široku rasprostranjenost kompleksa koju ioni metala čine sa sekundarnim metabolitima lišajeva (Bačkor i Fahselt 2004, Hauck i sur. 2009). Međutim, Gauslaa i sur. (2015) su objavili kako se kod grmastih lišajeva (*Ramalina farinacea*, *Usnea dasypoga*) smanjila koncentracija medularnih sekundarnih metabolita na zagađenim područjima, dok to nije bio slučaj kod listastih vrsta (*Parmelia sulcata*, *Lobaria pulmonaria*). U istom radu utvrđeno je da kod niti jedne od navedenih vrsta nije došlo do promjene količine kortikalnih metabolita. Uz to kod lišaja *Lobaria pulmonaria* uočeno je jako smanjenje vijabilnosti na zagađenom području unatoč povećanju sadržaja medularnog spoja stiktične kiseline koja ima mogućnost vezanja s teškim metalima.

Iz svega navedenog može se zaključiti da iako se unazad nekoliko godina povećao broj istraživanja i saznanja o sekundarnim metabolitima lišajeva, njihova biološka uloga još uvijek nije potpuno razjašnjena.

## 6. ZAKLJUČCI

Na temelju kvantitativne analize sekundarnih metabolita te parametara fluorescencije klorofila u vrsta lišajeva *Flavoparmelia caperata*, *Evernia prunastri* i *Parmelia sulcata* izloženih kadmiju mogu zaključiti sljedeće:

1. U uzorcima tretiranim kadmijem utvrdila sam niže vrijednosti parametara  $F_v/F_m$  i  $R_{Fd}$  što ukazuju na smanjenu fotosintetsku učinkovitost i negativan učinak kadmija.
2. Značajno niže vrijednosti parametara  $F_v/F_m$  i  $R_{Fd}$  izmjerene su tek 8. dan pokusa što ukazuje da su istraživane vrste relativno otporne na izlaganje kadmiju.
3. Vrsta *F. caperata* se pokazala najosjetljivijom na promjene prirodnih uvjeta staništa budući da je i kod kontrolnih uzoraka uočeno smanjenje vrijednosti parametara  $F_v/F_m$  i  $R_{Fd}$ .
4. U sve tri vrste lišaja sam pomoću HPLC metode uspješno detektirala sekundarne metabolite karakteristične za pojedinu vrstu: u vrste *F. caperata* protocetraričnu i usninsku kiselinu, u vrste *E. prunastri* everničnu kiselinu i atranorin, a u vrste *P. sulcata* salazinsku kiselinu i atranorin.
5. Izlaganje kadmiju uzrokovalo je niži sadržaj medularnih metabolita u listastih lišajeva: salazinske kiseline (*P. sulcata*) i protocetrarične kiseline (*F. caperata*), a povećani sadržaj kortikalnih, atranorina (*P. sulcata*) te usninske kiseline (*F. caperata*). U grmastog lišaja *E. prunastri* nije utvrđena značajnija promjena sadržaja metabolita nakon izlaganja kadmiju.
6. Rezultati istraživanja sekundarnih metabolita pokazuju da više faktora, uključujući kemijsku strukturu spojeva, dio lišaja gdje se spojevi deponiraju te forma rasta (listasti/grmasti) određuje ulogu sekundarnih metabolita u homeostazi teških metala.
7. Iz rezultata dobivenih u ovom istraživanju mogu zaključiti da su istraživane vrste relativno otporne na kratkoročno izlaganje kadmiju i da bi sekundarni metaboliti mogli imati važnu ulogu u zaštiti od negativnog učinka kadmija, barem kod nekih vrsta.

## 7. LITERATURA

- Babani F., Lichtenthaler H. K., 1996. Light-induced and age-dependent development of chloroplasts in etiolated barley leaves as visualized by determination of photosynthetic pigments, CO<sub>2</sub> assimilation rates and different kinds of chlorophyll fluorescence ratios. *Journal of Plant Physiology* 148, 555–566.
- Bačkor M., Fahselt D., 2004. Using EDX-microanalysis and X-ray mapping to demonstrate metal uptake by lichens. *Biologia* 59, 39-45.
- Bačkor M., Kováčik J., Piovár J., Pisani T., Loppi S. 2010. Physiological aspects of cadmium and nickel toxicity in the lichens *Peltigera rufescens* and *Cladonia arbuscula* subsp. *mitis*. *Water, Air, and Soil Pollution* 207, 253-262.
- Bačkor M., Loppi S., 2009. Interactions of lichens with heavy metals. *Biologia Plantarum* 53, 214–222.
- Bennett Joan W., Ciegler A., 1983. Secondary metabolism and differentiation in fungi. M. Dekker, New York.
- Białońska D., Dayan F. E., 2005. Chemistry of the lichen *Hypogymnia physodes* transplanted to an industrial region. *Journal of Chemical Ecology* 31, 2975-2991.
- Candan M., Yilmaz M., Tay T., Erdem M., Turk A. O., 2007. Antimicrobial activity of extracts of the lichen *Parmelia sulcata* and its salazinic acid constituent. *Zeitschrift für Naturforschung C* 62, 619–621.
- Cocchietto M., Skert N., Nimis P., Sava G., 2002. A review on usnic acid, an interesting natural compound. *Naturwissenschaften* 89, 137-146.
- Conti M. E., Cecchetti, G., 2001. Biological monitoring: lichens as bioindicators of air pollution assessment—a review. *Environmental Pollution* 114, 471-492.
- Culberson C. F., Elix J. A., 1989. Lichen substance. *Methods in Plant Biochemistry* 1, 509-535.
- Dahlquist I., Fregert S., 1980. Contact allergy to atranorin in lichens and perfumes. *Contact Dermatitis* 6, 111–119.
- Elix J. A., Stocker-Wörgötter E., 2008. Biochemistry and secondary metabolites. U: Nash III T. H., (ur.), Lichen biology. Cambridge University Press, Cambridge, 104–133.
- Feige G. B., Lumbsch H. T., Huneck S., Elix J. A., 1993. Short communication identification of lichen substances by a standardized liquid chromatographic method. *Journal of Chromatography A* 646, 417-427.
- Garty J., 2001. Biomonitoring atmospheric heavy metals with lichens: theory and application. *Critical Reviews in Plant Sciences* 20, 309-371.

- Garty J., Galun M., Kessel M., 1979. Localization of heavy metals and other elements accumulated in the lichen thallus. *New Phytologist* 82, 159–168.
- Garty J., Hagemeyer J., 1988. Heavy metals in the lichen *Ramalina duriaei* transplanted at biomonitoring stations in the region of a coal-fired power plant in Israel after 3 years of operation. *Water, Air, and Soil Pollution* 38, 311-323.
- Garty J., 2002. Biomonitoring heavy metal pollution with lichens. U: Kranner, I., Beckett, R. P., Varma A. K. (ur.), Protocols in lichenology. Springer Verlag, Berlin, 458–482.
- Garty J., Weissman L., Tamir O., Beer S., Cohen Y., Karnieli A., Orlovsky L., 2000. Comparison of five physiological parameters to assess the vitality of the lichen *Ramalina lacera* exposed to air pollution. *Physiologia Plantarum* 109, 410-418.
- Gauslaa Y., Yemets O. A., Asplund J., Solhaug K. A., 2016. Carbon based secondary compounds do not provide protection against heavy metal road pollutants in epiphytic macrolichens. *Science of the Total Environment* 541, 795-801.
- Halama P., Haluwin C. Van, 2004. Antifungal activity of lichen extracts and lichenic acids. *BioControl* 49, 95-107.
- Hauck M., 2008. Metal homeostasis in *Hypogymnia physodes* is controlled by lichen substances. *Environmental Pollution* 153, 304-308.
- Hauck M., Huneck S., 2007. Lichen substances affect metal adsorption in *Hypogymnia physodes*. *Journal of Chemical Ecology* 33, 219-223.
- Hauck M., Willenbruch K., Leuschner C., 2009. Lichen substances prevent lichens from nutrient deficiency. *Journal of Chemical Ecology* 35, 71-73.
- Huneck S., 1999. The significance of lichens and their metabolites. *Naturwissenschaften* 86, 559-570.
- Huneck S., Yoshimura I., 1996. Identification of lichen substances. Springer, Berlin Heidelberg.
- Ingoldsdottir K., 2002. Usnic acid. *Phytochemistry* 61, 729-736.
- Jensen M., 2002. Measurement of chlorophyll fluorescence in lichens. U: Kranner I., Beckett R. P., Varma A. K. (ur.), Protocols in lichenology. Springer Verlag, Berlin, 135-151.
- Karakoti N., Bajpai R., Upreti D. K., Mishra G. K., Srivastava A., Nayaka S., 2014. Effect of metal content on chlorophyll fluorescence and chlorophyll degradation in lichen *Pyxine coccinea* (Sw.) Nyl.: a case study from Uttar Pradesh, India. *Environmental Earth Sciences* 71, 2177-2183.
- Lackovičová A., Guttová A., Bačkor M., Pišút P., Pišút I., 2013. Response of *Evernia prunastri* to urban environmental conditions in Central Europe after the decrease of air pollution. *The Lichenologist* 45, 89-100.

- Lichtenthaler H. K., Babani F., 2004. Light adaptation and senescence of the photosynthetic apparatus. Changes in pigment composition, chlorophyll fluorescence parameters and photosynthetic activity. Chlorophyll *a* fluorescence, Springer Netherlands, 713-736.
- Lichtenthaler H. K., Buschmann C., Knapp M., 2005. How to correctly determine the different chlorophyll fluorescence parameters and the chlorophyll fluorescence decrease ratio RFd of leaves with the PAM fluorometer. *Photosynthetica* 43, 379-393.
- Loppi S. Pirintsos S.A., Dominicis V. de, 1999. Soil contribution to the elemental composition of epiphytic lichens (Tuscany, Central Italy). *Environmental Monitoring and Assessment* 58, 121-131.
- Loppi S., Fratti L., Paoli V., Bigagli V., Rossetti C., Bruscoli C., Corsini A., 2004. Biodiversity of epiphytic lichens and heavy metal contents of *Flavoparmelia caperata* thalli as indicators of temporal variations of air pollution in the town of Montecatini Terme (central Italy). *Science of the Total Environment* 326, 113-122.
- Maxwell K., Johnson G. N., 2000. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51, 659-668.
- Molnár K., Farkas E., 2010. Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review. *Zeitschrift für Naturforschung C* 65, 157-173.
- Nash III T. H. 2008. Lichen biology, second edition, Cambridge University Press, Cambridge.
- Nash T. H., Ryan B. D., Gries C., Bungartz F., 2002. Lichen flora of the greater Sonoran Desert Region, vol. 1. Lichens unlimited, Arizona State University, Tempe.
- Nishanth K. S., Sreerag R. S., Deepa I., Mohandas C., Nambisan B., 2015. Protocetraric acid: an excellent broad spectrum compound from the lichen *Usnea albopunctata* against medically important microbes. *Natural product research* 29, 574-577.
- Pawlik-Skowrońska B., Bačkor M., 2011. Zn/Pb tolerant lichens with higher content of secondary metabolites produce less phytochelatins than specimens living in unpolluted habitats. *Environmental and Experimental Botany* 72, 64-70.
- Paoli L., Guttová A., Grassi A., Lackovi A., Sorbo S., Basile A., Loppi S., 2015. Ecophysiological and ultrastructural effects of dust pollution in lichens exposed around a cement plant (SW Slovakia). *Environmental Science and Pollution Research* 20, 15891–15902.
- Pevalek-Kozlina B., 2003. Fiziologija bilja, Profil international, Zagreb.
- Pirintsos S. A., Frati L., Caprasecca E., Santoni S., Gaggi C., Guttova A., Gaudino S., Pati A., Rosamilia S., Loppi S., 2006. Effects of NO<sub>2</sub> and NH<sub>3</sub> from road traffic on epiphytic lichens. *Environmental Pollution* 142, 58–64.
- Purvis O. W., 2014. Adaptation and interaction of saxicolous crustoselichens with metals. *Botanical Studies* 55, 23.

- Purvis O. W., 2010. Lichens and industrial pollution. U: Batty LC, Hallberg K (ur.), Ecology of industrial pollution. Cambridge University Press, Cambridge, 41–69.
- Roger M. J. R., Weiss O., 2001. Fluorescence techniques. Handbook of plant ecophysiology techniques, Kluwer academic publishers, Dordrecht, 155.
- Sanità di Toppi L., Musetti R., Vattuone Z., Pawlik-Skowrońska B., Fossati F., Bertoli L., Badiani M., Favali M. A., 2005. Cadmium distribution and effects on ultrastructure and chlorophyll status in photobionts and mycobionts of *Xanthoria parietina*. *Microscopy Research and Techniques*, 66, 229-238.
- Solhaug K.A., Lind M., Nybakken L., Gauslaa Y., 2009. Possible functional roles of cortical depsides and medullary depsidones in the foliose lichen *Hypogymnia physodes*. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 204, 40–48.
- Stamenković S. S., Mitrović T. Lj., Cvetković V. J., Krstić N. S., Baošić R. M., Marković M. S., Nikolić N. D., Marković V. Lj., Cvijan M. V., 2013. Biological indication of heavy metal pollution in the areas of Donje Vlake and Cerje (southeastern Serbia) using epiphytic lichens. *Archives of Biological Sciences* 65, 151-159.
- Taiz, L., Zeiger E., 1998. Plant physiology. 2nd edition. Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts.
- Tchounwou P. B., Yedjou C. G., Patlolla A. K., Sutton D. J., 2012. Heavy metal toxicity and the environment. *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology* 101, 133-164.
- Valladares F., Sanchez-Hoyos A., Manrique, E., 1995. Diurnal changes in photosynthetic efficiency and carotenoid composition of the lichen *Anaptychia ciliaris*: effects of hydration and light intensity. *Bryologist* 98, 375-382.
- Wolterbeek B., 2002. Biomonitoring of trace element air pollution: principles, possibilities and perspectives. *Environmental Pollution* 120, 11–21.
- Yoshimura I., Kinoshita Y., Yamamoto Y., Huneck S., Yamada Y., 1994. Analysis of secondary metabolites from lichen by high performance liquid chromatography with a photodiode array detector. *Photochemical Analysis* 5, 107-205.

## OSOBNJE INFORMACIJE

## Maslač Ana

 Vrapčanska 175/2, 10090 Zagreb (Hrvatska)

 +385 92 2457787

 ana.maslach@yahoo.com

Spol Žensko | Datum rođenja 15/02/1981 | Državljanstvo hrvatsko

## RADNO ISKUSTVO

22/05/2009–18/06/2009

## Profesorica biologije

Osnovna škola "Pavla Štoosa", Kraljevec na Sutli (Hrvatska)

Poučavanje učenika da bi stekli znanja, vještine i razvili sposobnosti, te uloga odgajatelja, koja obuhvaća poučavanje učenika da bi usvojili određene vrijednosti, stavove i navike

Korištenje suvremenih psihološko-pedagoških i didaktičko-metodičkih spoznaja o procesima učenja i oblicima poučavanja

Predavanja, seminari, rad u laboratoriju, rad u radionici, terenska nastava, stručne ekskurzije i slični oblici komunikacije profesora i učenika

01/09/2009–31/08/2010

## Profesorica biologije

Osnovna škola "Pavla Štoosa", Kraljevec na Sutli (Hrvatska)

Poučavanje učenika da bi stekli znanja, vještine i razvili sposobnosti, te uloga odgajatelja, koja obuhvaća poučavanje učenika da bi usvojili određene vrijednosti, stavove i navike

Korištenje suvremenih psihološko-pedagoških i didaktičko-metodičkih spoznaja o procesima učenja i oblicima poučavanja

Predavanja, seminari, rad u laboratoriju, rad u radionici, terenska nastava, stručne ekskurzije i slični oblici komunikacije profesora i učenika

06/09/2010–08/01/2011

## Profesorica biologije

Osnovna škola "Pavla Štoosa", Kraljevec na Sutli (Hrvatska)

Poučavanje učenika da bi stekli znanja, vještine i razvili sposobnosti, te uloga odgajatelja, koja obuhvaća poučavanje učenika da bi usvojili određene vrijednosti, stavove i navike

Korištenje suvremenih psihološko-pedagoških i didaktičko-metodičkih spoznaja o procesima učenja i oblicima poučavanja

Predavanja, seminari, rad u laboratoriju, rad u radionici, terenska nastava, stručne ekskurzije i slični oblici komunikacije profesora i učenika

22/09/2011–10/08/2012

## Profesorica biologije

Osnovna škola "Pavla Štoosa", Kraljevec na Sutli (Hrvatska)

Poučavanje učenika da bi stekli znanja, vještine i razvili sposobnosti, te uloga odgajatelja, koja obuhvaća poučavanje učenika da bi usvojili određene vrijednosti, stavove i navike

Korištenje suvremenih psihološko-pedagoških i didaktičko-metodičkih spoznaja o procesima učenja i oblicima poučavanja

Predavanja, seminari, rad u laboratoriju, rad u radionici, terenska nastava, stručne ekskurzije i slični oblici komunikacije profesora i učenika

13/04/2012–04/05/2012

## Profesorica kemije

Osnovna škola "Pavla Štoosa", Kraljevec na Sutli (Hrvatska)

Poučavanje učenika da bi stekli znanja, vještine i razvili sposobnosti, te uloga odgajatelja, koja obuhvaća poučavanje učenika da bi usvojili određene vrijednosti, stavove i navike

Korištenje suvremenih psihološko-pedagoških i didaktičko-metodičkih spoznaja o procesima učenja i oblicima poučavanja

Predavanja, seminari, rad u laboratoriju, rad u radionici i slični oblici komunikacije profesora i učenika

## OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

1999–danas **profesor biologije**

Prirodoslovno – matematički fakultet, Biološki odsjek, Sveučilište u Zagrebu  
Rooseveltove trg 6, Zagreb (Hrvatska)

1995–1999 **srednja stručna sprema**

II. gimnazija  
Križanićeva 4, Zagreb (Hrvatska)

## OSOBNJE VJEŠTINE

Materinski jezik hrvatski

Ostali jezici

	RAZUMJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
engleski	C1	C1	C1	C1	C1
njemački	A2	A2	A2	A2	A2

Stupnjevi: A1 i A2: Početnik - B1 i B2: Samostalni korisnik - C1 i C2: Iskusni korisnik

Komunikacijske vještine

Odlične komunikacijske vještine koje sam stekla radom u školi sa različitim profilom djece, njihovih roditelja te kolega  
Kreativna i elokventna

Organizacijske / rukovoditeljske vještine

Organizirana i pedantna  
Sposobna i sistematična u radu sa nekoliko istovremenih zadataka (odraz osobnih karakteristika)

Poslovne vještine

Lako se uklopim u različite radne sredine  
Lako i brzo usvajam nova znanja  
Etika (ljudska, moralna i poslovna) na visokom nivou  
Optimistična i komunikativna po prirodi

Digitalna kompetencija

SAMOPROCJENA				
Obrada informacija	Komunikacija	Stvaranje sadržaja	Sigurnost	Rješavanje problema
Samostalni korisnik	Samostalni korisnik	Samostalni korisnik	Temeljni korisnik	Temeljni korisnik



Vozačka dozvola B

#### DODATNE INFORMACIJE

---

**Znanstveni radovi** A. Maslač, M. Tkalec, M. Maslač (prihvaćeno za objavljivanje): The impact of cadmium on photosynthesis performance and secondary metabolites in lichens *Parmelia sulcata*, *Evernia prunastri* and *Flavoparmelia caperata*. Acta Botanica Croatica. Zagreb.

**Konferencije** **18-23/9/2015 - 12. Hrvatski biološki kongres; Sv. Martin na Muri, Hrvatska.**  
A. Maslač, M. Tkalec, M. Maslač: Učinak kadmija na fotosintezu i sadržaj sekundarnih metabolita u lišajeva *Parmelia sulcata*, *Everniaprunastri* i *Elavoparmelia caperata*

- postersko priopćenje

**Projekti** 2009 - **Noć biologije; Biološki odsjek, PMF, Sveučilište u Zagrebu**

- sudionik volonter na događaju

**Projekti** 2009-2012 - **Eko-škole**

- eko-koodinator tijekom rada u školi