



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Светлана Ристић

ЛИШАЈИ ИНДИКАТОРИ КВАЛИТЕТА ВАЗДУХА ТОПЛИЧКОГ
РЕГИОНА И ЊИХОВ БИОМЕДИЦИНСКИ ПОТЕНЦИЈАЛ

Докторска дисертација

Крагујевац, 2017. године



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF SCIENCE

Svetlana Ristić

**LICHENS – INDICATORS OF AIR QUALITY OF TOPLICA DISTRICT
AND THEIR BIOMEDICAL POTENTIAL**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2017.

<i>I Аутор</i>
Име и презиме: Светлана Ристић
Датум и место рођења: 29.08.1988. године, Прокупље
Садашње запослење: Незапослена
<i>II Докторска дисертација</i>
Наслов: Лишаји индикатори квалитета ваздуха Топличког региона и њихов биомедицински потенцијал
Број страница: 170
Број слика: 99
Број библиографских података: 223
Установа и место где је рад израђен: Универзитет у Крагујевцу, Природно-математички факултет
Научна област (УДК): Микологија/ Лишајеви 582.28/29(497.11)
Ментор: Проф. др Бранислав Ранковић, Универзитет у Крагујевцу, Природно-математички факултет
<i>III Оцена и одбрана</i>
Датум пријаве теме: 31. 05. 2016.
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације:
Комисија за оцену подобности теме и кандидата:
<ol style="list-style-type: none"> 1. Др Бранислав Ранковић, редовни професор Природно-математичког факултета у Крагујевцу, ужа научна област: Алгологија, микологија и лихенологија; 2. Др Славиша Стаменковић, редовни професор Природно-математичког факултета у Нишу, ужа научна област: Екологија и заштита животне средине; 3. Др Снежана Симић, ванредни професор Природно-математичког факултета у Крагујевцу, ужа научна област: Екологија, биогеографија и заштита животне средине; 4. Др Маријана Косанић, доцент Природно-математичког факултета у Крагујевцу, ужа научна област: Алгологија и микологија.
Комисија за преглед и одбрану докторске дисертације:
<hr/> Др Славиша Стаменковић, редовни професор Природно-математичког факултета у Нишу, ужа научна област: Екологија и заштита животне средине (председник);
<hr/> Др Снежана Симић, ванредни професор Природно-математичког факултета у Крагујевцу, ужа научна област: Екологија, биогеографија и заштита животне средине;
<hr/> Др Маријана Косанић, доцент Природно-математичког факултета у Крагујевцу, ужа научна област: Алгологија и микологија.

Мојим родитељима

ЗАХВАЛНИЦА

Најсрдачније се захваљујем ментору и највећем узору, др Браниславу Ранковићу, редовном професору Природно-математичког факултета у Крагујевцу на искреном и свеобухватном усмеравању у раду, на подрици, стручној помоћи и саветима.

Др Маријани Косанић, доценту Природно-математичког факултета у Крагујевцу сам неизмерно захвална на несебичној помоћи и подрици током експерименталног истраживања, на стрпљењу, поверењу и вредним смерницама у свим фазама израде докторске дисертације.

Велико хвала и др Славиши Стаменковићу, редовном професору Природно-математичког факултета у Нишу који ме је увео у свет лихенологије, на подстицају и сугестијама током израде и писања рада.

Др Татјани Станојковић научном сараднику Института за онкологију и радиологију Србије захваљујем на стручној помоћи приликом испитивања антиканцерогене активности.

Захвалност дугујем и др Роберту Шајну научном саветнику Геолошког завода Словеније на изради карти.

Др Милице Стојковић Пиперац, доценту Природно-математичког факултета у Нишу захваљујем на помоћи у статистичкој обради података.

Др Снежани Симић, ванредном професору Природно-математичког факултета у Крагујевцу захваљујем на саветима и корисним сугестијама током писања докторске дисертације.

Захваљујем Весни Филиповић професору књижевности за лекторисање овог рада.

Велику захвалност дугујем својој породици и пријатељима на разумевању, љубави и подрици.

Светлана Ристић

Резиме

Лишаји су космополитски организми настали симбиозом гљива најчешће из подраздела Ascomycotina и алги из раздела Cyanobacteriophyta или Chlorophyta. Примењују се у процени стања квалитета ваздуха као организми индикатори, а осим тога имају изражен биомедицински потенцијал. Управо циљеви овог истраживања били су: индикација квалитета ваздуха коришћењем лишаја као биоиндикатора и биомедицинска карактеризација различитих врста лишаја сакупљених у истраживаним подручјима Луковске, Куршумлијске и Пролом бање, Радан планине као и града Куршумлије. Истраживање је спроведено у периоду од 2012. до 2015. године.

Лишајска индикација квалитета ваздуха обухвата испитивање квалитета ваздуха коришћењем лишаја као биоиндикатора дефинисањем зона различитог степена загађења ваздуха у оквиру сваког истраживаног подручја, као и дефинисање потенцијалних индикаторских таксона за процену квалитета ваздуха, коришћењем мултиваријантне методе вештачких неуронских мрежа (самоорганизујуће мапе, енгл. **Self Organizing Map** – SOM). Испитивањем разноврсности лишаја у Луковској бањи константовано је присуство 76 врста лишаја из 34 рода. У Куршумлијској бањи забележено је присуство 65 врста лишаја из 32 рода. На подручју Пролом бање забележено је присуство 72 врсте лишаја из 33 рода. Анализом диверзитета лишаја Радан планине константовано је присуство 76 врста лишаја из 34 рода. У Куршумлији је забележено присуство 42 врсте лишаја из 23 рода. Израчунате вредности индекса антропогеног утицаја (енгл. **Index of Human Impact** – IHI) кретале су се од 5 до 36. Израчунате вредности индекса атмосферске чистоће (енгл. **Index of Atmospheric Purity** – IAP) кретале су се од 10 до 75. У свим бањским насељима забележено је присуство „нормалне зоне” која обухвата читаву површину истраживаног подручја Луковске бање, Пролом бање и планине Радан, као и већи део површине истраживаног подручја Куршумлијске бање. Детаљнијом анализом је приказано да је ова зона подељена на три подзоне. У зони „борбе” налази се мањи, централни део Куршумлијске бање и већи део града Куршумлије, где је дошло до формирања подзона: „спољашња зона борбе” и „унутрашње зоне борбе”. Зона „лишајске пустиње” обухвата мањи део површине истраживаног подручја града Куршумлије.

Биомедицинска карактеризација обухвата добијање екстракта изабраних врста лишаја, изоловање секундарних метаболита лишаја и испитивање антимицробне, антиоксидативне и антиканцерогене активности. Испитивани су ацетонски екстракти лишаја *Cladonia coniocraea*, *C. fimbriata*, *C. foliacea*, *C. furcata*, *C. ramulosa*, *C. rangiferina*, *C. subulata*, *Lepraria incana*, *Melanelixia fuliginosa*, *M. glabra*, *M. subaurifera*, *Peltigera rufescens*, *Pertusaria amara*, *Physcia semipinnata*, *Platismatia glauca*, *Pleurosticta acetabulum*, *Ramalina fastigiata* и *R. fraxinea*, као и супстанце methyl evernate (изолована из екстракта лишаја *R. fastigiata*), obtusic acid (изолована из екстракта лишаја *R. fraxinea*), lecanogic acid (изолована из екстракта лишаја *M. subaurifera*) и 2'-O-methylanziaic acid (изолована из екстракта лишаја *M. fuliginosa*).

Сви тестирани узорци испољили су снажну антимицробну, антиоксидативну и антиканцерогену активност, што је од великог значаја због њихове потенцијалне примене у медицини, ветерини и фармацеутској индустрији.

Summary

Lichens are cosmopolitan organisms ensued from symbiosis of fungi, usually from Ascomycotina subphylum and algae from Cyanobacteriophyta or Chlorophyta phylum. They're applied in estimation of air quality condition as indicating organisms and, in addition, they've got a quite clear biomedical potential. The two very goals of this exploration were: indication of air quality by using lichens as bioindicators and the biomedical characterization of various lichen species collected within the area of Lukovska, Prolom and Kursumlijska spas, Radan Mountain and the town of Kursumlija. The exploration was conducted in the period 2012/2015.

The lichen air quality indication encompasses exploration of air quality using lichens as bioindicators by defining the zones of different degree of air pollution within each of the explored settlements, as well as defining some potential taxa for air quality estimation through a multivariate method of artificial neuronetworks (self organizing maps – SOM). By examining the lichen diversity in Lukovska Spa, 76 lichen species from 34 genera have been ascertained. The presence of 65 lichen species from 32 genera was noted in Kursumlijska Spa. Within the Prolom Spa area, 72 lichen species from 33 genera were recorded. Through the analysis of Radan Mountain lichen diversity, 76 lichen species from 34 genera were entered. In the town of Kursumlija, 42 lichen species from 23 genera were recorded. The calculated values of the Index of Human Impact fluctuated between 5 and 36. The calculated values of the Index of Atmospheric Purity – IAP varied between 10 and 75. The lichen “normal” zone was noted in all spa resorts. The “normal zone” covers entire area of Lukovska spa, Prolom spa and Radan mountain, as well as a major part of investigated area of Kursumlijska spa. A detailed analysis shows this zone divided into 3 subzones. The “struggle zone” encompasses a smaller, central part of Kursumlijska spa and major part of the town of Kursumlija where forming the subzones has taken place - “outer struggle zone” and “inner struggle zone”. The lichen “desert” zone includes a smaller part of the investigated area of the town.

Biomedical characterization encompasses derivation of extracts of chosen lichen species, isolation of secondary lichen metabolites and examination of antimicrobial, anti-oxidative and anti-carcinogenic activities. The following acetone lichen extracts were examined: *Cladonia coniocraea*, *C. fimbriata*, *C. foliacea*, *C. furcata*, *C. ramulosa*, *C. rangiferina*, *C. subulata*, *Lepraria incana*, *Melanelixia fuliginosa*, *M. glabra*, *M. subaurifera*, *Peltigera rufescens*, *Pertusaria amara*, *Physcia semipinnata*, *Platismatia glauca*, *Pleurosticta acetabulum*, *Ramalina fastigiata* and *R. fraxinea* as well as some substances like methyl evernate (isolated from the extract of *R. fastigiata* lichen, obtusic acid (isolated from the extract of *M. subaurifera* lichen) and 2'-O-methylanziaic acid (isolated from the extract of *M. fuliginosa* lichen)

All the tested samples demonstrated a strong antimicrobial, antioxidative and anticarcinogenic activity, which is quite significant for the potential use in medicine, veterinary medicine and pharmaceutical industry.

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
1.1. Морфологија и анатомија лишаја.....	2
1.2. Размножавање лишаја.....	4
1.3. Еколошке карактеристике лишаја.....	4
1.4. Значај лишаја.....	5
1.4.1. <i>Лишаји као биоиндикатори квалитета ваздуха</i>	5
1.4.2. <i>Биомедицински потенцијал лишаја</i>	7
1.5. Преглед досадашњих истраживања лишаја на територији Републике Србије и територији бивше СФРЈ.....	20
2. ЦИЉ РАДА	22
3. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ	24
3.1. Опис истраживаног подручја.....	27
3.2. Идентификација, сакупљање и чување материјала.....	35
3.3. Метод лишајске индикације квалитета ваздуха.....	35
3.3.1. <i>Израчунавање индекса атмосферске чистоће и картирање зона индикације квалитета ваздуха</i>	36
3.3.2. <i>Израчунавање индекса антропогеног утицаја</i>	37
3.4. Статистичка анализа података.....	38
3.5. Методологија испитивања биомедицинског потенцијала лишаја.....	40
3.5.1. <i>Испитивање антимицробне активности</i>	50
3.5.2. <i>Испитивање антиоксидативне активности</i>	53
3.5.3. <i>Испитивање антиканцерогене активности</i>	54
4. РЕЗУЛТАТИ	55
4.1. Преглед константованих лишаја.....	56
4.2. Картирање истраживаних тачака и дефинисање зона индикације квалитета ваздуха.....	63
4.3. Анализа статистичке обраде података.....	73
4.4. Анализа биомедицинског потенцијала лишаја.....	80
4.4.1. <i>Антибактеријска и антифунгална активност екстракта и изолованих компоненти испитиваних врста лишаја</i>	80

4.4.2. Антиоксидативна активност екстракта и изолованих компоненти испитиваних врста лишаја.....	105
4.4.3. Антикancerогена активност екстракта и изолованих компоненти испитиваних врста лишаја.....	109
5. ДИСКУСИЈА	114
5.1. Анализа добијених резултата и компарација са резултатима ранијих истраживања биоиндикације.....	115
5.2. Анализа добијених резултата биолошких активности испитиваних лишајских екстракта и метаболита.....	122
6. ЗАКЉУЧЦИ	128
7. ЛИТЕРАТУРА	132
8. ПРИЛОГ	145

1. УВОД

Лишаји су симбиотски организми који су сачињени од гљива, најчешће из подраздела Ascomycotina и алги из раздела Cyanobacteriophyta или Chlorophyta (Nash, 2008). У оваквој структури, алге и гљиве су се толико измениле и изгубиле своју самосталност да се не могу наћи као такве слободно у природи. Корист од ове симбиозе имају оба члана, јер се међусобно допуњују и омогућују опстанак један другом. Алга врши фотосинтезу и снабдева гљиву органским материјама, док гљива помоћу хифа упија из подлоге воду са минералним солима. Размена материја између алге и гљиве врши се преко њихових ћелијских зидова. Гљиве се сматрају градитељима лишаја, јер преовладавају у квантитативном смислу (Gadd, 2011).

Морфологија и анатомија лишаја

Веgetативно тело лишаја назива се талус. У зависности од врсте лишаја талус може бити различито обојен: мрко, наранџасто, жуто, зелено, па чак и потпуно црно. Међутим, није ни неуобичајено да боја варира у оквиру врсте. Боја зависи од присуства пигмената. Према морфологији талуса лишаји се могу поделити на корасте, листасте и жбунасте (сл. 1).

Корасте (кортиколни) лишаји су читавом својом површином чврсто везани за супстрат, па их је тешко одвојити од подлоге. Подела корастих лишаја извршена је према односу лишаја и подлоге на којој се развијају:

❖ **Епигени** лишаји настањују површину подлоге, и док они који се развијају на дрвећу представљају епифлеодне, они који се развијају на стенама представљају епилитне лишаје.

❖ **Ендогени** лишаји својим растом залазе у подлогу. Они који се развијају на дрвећу називају се хипофлеодни, а они који се развијају на стенама- ендолитни.

Листасте (фолиозни) лишаји су они чији је талус у облику лисне плоче са режњевима и плићим или дебљим усецима. Њихов талус је већим делом слободан, а мањим делом утврђен за подлогу хифама груписаним у снопове, тј. ризинијама.

Жбунасте (фрутикозни) лишаји представљају групу морфолошки најсложенијих лишаја. За подлогу су лабаво причвршћени гомфом, а у односу на подлогу су висећи или усправни (Nash, 2008).

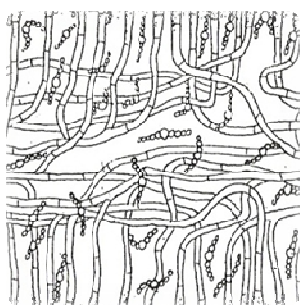


Сл. 1. Основни морфолошки типови талуса

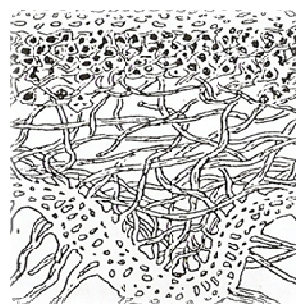
Према анатомској грађи разликујемо хомеомерне и хетеромерне лишаје (сл. 2).

Хомеомерни талус је одлика филогенетски старијих облика и често су слузаве конзистенције, јер су гонидије представљене модрозеленим алгама. У оваквом талусу, алге су равномерно распоређене.

Хетеромерни талус је карактеристичан за већину листастих и жбунастих форми лишаја. Листасти лишаји овакве грађе на горњој страни тела имају горњу кору која се састоји из три слоја хифа. Први слој чине дебелозидне тесно спојене хифе које образују плектенхим. У овом слоју нема алги. Испод овог слоја налази се гонидијални слој са растреситим, танкозидним хифама које обавијају алгу са којом су у тесној вези. Испод гонидијалног слоја хифе су још растреситије и гранатије, а између њих налазе се простори испуњени ваздухом. Овај слој представља срж. Доња страна лишаја гради доњу кору која је сличне грађе као и горња. Ризиније или ризоиди полазе од доње коре и служе за утврђивање за подлогу као и упијање воде и хранљивих материја (Marinović, 1981).



Хомеомеран талус лишаја



Хетеромеран талус лишаја

Сл. 2. Основни типови анатомске грађе талуса лишаја

Размножавање лишаја

Лишаји се размножавају вегетативно и полно. Из сваког комадића талуса који садржи и алгалну и фунгалну компоненту може настати лишај. Приликом полног размножавања гљива у саставу лишаја образује споре. Споре које су изашле из аскуса или са базидије могу се развити у лишај, ако „пронађу” алгу са којом ће ступити у симбиозу. Вегетативно размножавање лишаја одвија се на три начина:

Регенерацијом – када од било којег одломљеног дела талуса, ако доспе на одговарајућу подлогу, настане нови лишај. Овај начин бесполог размножавања карактеристичан је за сасушене листасте и жбунасте лишаје чије делове разноси ветар.

Соредијама – које представљају микроскопски ситне, лоптасте творевине, изграђене од једне или неколико ћелија алги које су обавијене хифама гљиве. Различито су обојене и имају различит положај и изглед, па представљају важне карактеристике за идентификацију неких врста лишаја. Када се образују у великом броју, кора лишаја пуца и изумире, а соредије покривају читаву површину тела. Лако се разносе ветром на велике удаљености.

Изидијама – које представљају израштаје на талусу лишаја у којиме се налазе хифе гљива и ћелије алги. Увек су покривене кором. Ови израштаји се лако одламају од талуса, па могу бити разнесене најчешће ветром на велике удаљености (Murati, 1992).

Еколошке карактеристике лишаја

До данас је описано око 18500 врста лишаја (Boustie and Grube, 2005). Лишаји су организми који се одликују изразито спорим растом, због ниског новог органске продукције. Стопа раста од једног центиметра годишње сматра се високом (Shukla et al., 2010). Веома брзо прелазе из стања засићености водом у суво стање и обрнуто, што за последицу има смењивање периода у којима се фотосинтеза врши и оних у којима је она стопирана или веома слаба.

Лишаји се развијају и расту на најразноврснијим подлогама. Најважнији услов за њихов опстанак је стабилност подлоге у дугом временском периоду. Уобичајена станишта лишаја су кора дрвећа, стене и земљиште, мада се могу наћи и на неким неуобичајеним подлогама антропогеног порекла – порцелану, прозорском стаклу старих кућа, хартији, платну, гвожђу, па чак и смоли. Према типу подлоге коју колонизују и на којој успешно расту лишаји могу бити:

- саксиколни – лишаји који насељавају стене;
- кортиколни – лишаји који насељавају кору дрвенастих биљних врста;
- териколни – лишаји који насељавају земљиште;
- лигниколни – лишаји који насељавају трула стабла;
- фоликолни – лишаји који насељавају листове (Shukla et al., 2014).

Лишаји који насељавају кору дрвенастих биљних врста су епифитни, па у ову групу сврставамо кортиколне и лигниколне лишаје (Rose, 1990; Bartels and Chen, 2012).

Једна од најзначајнијих карактеристика лишаја је њихова способност да толеришу екстремне услове станишта и одржавају раст, упркос честим периодима исушивања и рехидратације, ниском нивоу доступности хранљивих материја и великим дневним и годишњим температурним флукуацијама (Øvstedal and Lewis Smith, 2001). Лишаји насељавају подручја од леденог бореалног Арктика и региона Антарктика до сушних пустиња (Purvis, 2000). Наиме, многе врсте лишаја насељавају високопланинска подручја где изнад горње шумске границе граде тзв. зону лишаја. Константовано је присуство

лишаја у екстремним условима Хималаја, на висини од 7000 метара. На Антарктику је забележено око 350 врста лишаја, док у тропским пределима лишаји воде борбу око простора. Наиме, услед велике конкуренције за светлост и простор, јављају се тзв. фолиозни лишаји који у виду тањих или дебљих скрама покривају површину листова. Осим тога, доминантне заједнице лишаја пронађене су у неким од најврелијих пустиња где дневна температура достиже 55°C, док ноћу температура опада испод нуле (Nash, 1996).

Значај лишаја

Лишаји имају вишеструки значај. Користе се у медицини, ветерини, козметичкој, прехранбеној, хемијској, фармацеутској и индустрији алкохолних пића.

Лишаји рода *Umbilicaria* у Јапану се сакупљају и спремају као салата која се сматра деликатесом. Међутим, сматра се да је интензивно сакупљање овог лишаја довело до значајног смањења бројности лишаја на овом простору. За животиње арктичких предела лишаји су важан извор хране. Ирваси и карибуи током зиме, користе у исхрани лишаје родова *Cladonia* и *Cetraria*. У пустињама Либије овце се прехрањују лишајима који се тамо налазе у виду дебелих наслага на земљи и стенама.

Економски најзначајнија употреба лишаја данас односи се на њихову примену у производњи парфема. У том смислу најважније врсте лишаја су *Evernia prunastri* (L.) Ach. и *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf. које се интензивно сакупљају у јужној Француској, Мароку и земљама бивше Југославије, у великим количинама које достижу опсег од 8000 до 10000 тона годишње. Финални екстракти ових лишаја су карактеристичног слаткастог мириса, па се користе и као додаток парфемима да осигурају постојаност на кожи. Лишајни екстракт може износити од 1 до 12% готовог парфема (Nash, 1996).

Лишаји су коришћени и као средстава за бојење тканина, још у античкој Грчкој. У данашње време коришћење лишаја за бојење тканина нема велики економски значај. Лишај *Roccella montagnei* Bél (Nash, 1996) сакупљан је са стена и коришћен за добијање црвене и љубичасте боје на подручју Медитерана. Ове боје добијане су ферментацијом поменуте врсте лишаја или хемијски еквивалентних врста попут *Ochrolechia tartarea* (L.) A. Massal., *Ochrolechia androgyna* (Hoffm.) Arnold., или *Parmotrema tinctorum* (Despr. ex Nyl.) Hale. са разблаженим раствором амонијака. Добијене боје користиле су се за директно бојење вуне и свиле. Лишај *Parmelia omphalodes* (L.) Ach. користи се за добијање браон боје и бојење протеинских влакана, а пре свега за бојење вуне. Детаљнија истраживања показала су да је за продукцију боја поменуте врсте лишаја одговорна изолована супстанца – salazinic acid.

Лишаји као биоиндикатори квалитета ваздуха

Лишаји имају значајну примену у биоиндикацији квалитета ваздуха. Познато је да лишаји нису у истој мери осетљиви на различите полутанте. Такође, нису све врсте лишаја у истој мери осетљиве на различите нивое аерозагађења, што и пружа могућност њиховог коришћења у биоиндикацији.

Мониторинг и биоиндикација

На основу доступних сазнања о угрожености квалитета ваздуха појавила се потреба о познавању врсте и степена угрожености (Nauck et al., 2013). Један од основних предуслова за побољшање квалитета ваздуха јесте правовремена детекција и регистрација повећаног нивоа загађености ваздуха, односно организовање мониторинг система. Мониторинг систем представља систем сукцесивних осматрања елемената животне средине у простору и времену. Основни циљ мониторинг система огледа се у прикупљању података квантитативне и квалитативне природе о присуству и дистрибуцији загађивача, праћењу емисија и имисија извора загађења и њиховог ефекта, транспорт полутаната, а посебна улога овог система је да прати ефекат загађења на жива бића (Wolterbeek, 2002).

Развијене су две групе метода мониторинга:

1. физичко-хемијске методе мониторинга;
2. биолошке методе мониторинга.

Физичко-хемијске методе мониторинга заснивају се на физичко-хемијском мерењу и израчунавању количине и концентрације појединачних загађујућих супстанци у ваздуху, у јединичном волумену, у јединици времена или математичком моделовању (кибернетика) и предвиђању промена квалитета животне средине (Samanta et al., 2002).

Биолошке методе мониторинга заснивају се на регистровању и праћењу реакција и промена које се дешавају под утицајем полутаната на неком од нивоа биолошке организације живих бића (Paoli et al., 2015). Управо ови различити нивои посматрају се као специфичне мете деловања загађујућих супстанци.

Биолошке методе мониторинга показују извесне предности у поређењу са физичко-хемијским методама. Физичко-хемијске методе пружају само пресек тренутног стања и њима није могуће предвидети реални ефекат комплексног утицаја различитих фактора на жива бића, на месту на којем живе. За разлику од тога, методе биоиндикације сагледавају временску димензију негативног деловања полутаната у екосистему и заснивају се на одговору живих бића на истовремени збир свих утицаја различитих фактора животне средине (Das et al., 2013). Методама биоиндикације долази се до резултата и закључака који говоре и о кумулативном ефекту дуготрајног утицаја различитих концентрација загађујућих супстанци у ваздуху, што се не може детектовати методама физичко-хемијског мерења аерозагађења (Wolterbeek, 2002). Метода биоиндикације, користи организам индикатор као инструмент у откривању загађења. Најбољи организми биоиндикатори су лишаји (Lorri, 2014).

Лишаји су веома осетљиви на промене квалитета ваздуха. Они не поседују заштитни површински слој на свом талусу, тако да полутанти несметано продиру унутар талуса лишаја. Лишаји се хране усвајајући хранљиве супстанце из ваздуха. Ниво метаболизма лишаја се повећава када се налазе у хидратисаном стању, па су тада осетљивији него када су суви. Хидратисано стање се јавља управо у време када падавине „испирају“ из ваздуха штетне супстанце и доносе их до талуса лишаја. Лишаји немају могућност да одбаце поједине делове тела као што васкуларне биљке одбацују листове и да се на тај начин ослободе акумулираних штетних супстанци. Накупљање оваквих супстанци у талусу лишаја успешна је чињеницом да лишаји немају могућност излучивања, па оно што једном усвоје, остаје трајно у њиховом телу. Лишаји метаболишу

током читаве године и карактеришу се јако спорим растом, негативни утицаји штетних супстанци не могу бити брзо санирани, па их је могуће пратити дужи временски период (Stamenković, 2004).

Осетљивост лишаја на промене квалитета ваздуха примећена је већ 1866. године. Nylander је први запазио особину лишаја да реагују на штетне састојке у ваздуху и то је приписао утицају фабричких димова. Наиме, примећено је да је потпуни нестанак лишаја из Луксембуршког парка у Паризу у корелацији са експанзијом замене дрвета угљем за загревање домаћинства.

Примећено је да су лишаји потпуно нестали или се знатно променио њихов састав 1970-тих и 80-их година, на подручјима која се одликују смањеним квалитетом ваздуха. Након тога разним анализама доведена је у везу загађеност ваздуха са саставом лишаја (Mayer et al., 2013), па су формиране скале отпорности лишаја на загађење ваздуха. Прву такву скалу оформили су Hawksworth and Rose (1970).

Биомедицински потенцијал лишаја

Лишаји вековима имају примену у народној медицини, а њихова лековита својства користе се и данас у различитим деловима света. Употреба лишаја у медицинске сврхе почиње у 3. и 4. веку пре нове ере (Lebail 1853).

У тестовима фитомедицине, веома рано се указује на значај и наводи се неколико родова лишаја: *Cladonia*, *Evernia*, *Lobaria*, *Parmelia*, *Peltigera*, *Pertusaria*, *Physica*, *Rocella*, *Usnea* и *Xanthoria* (Perez-Llano, 1944). У 18. веку лишај *Pseudevernia furfuracea* први пут је употребљен као лек (Launert, 1981). У Северној Калифорнији *Letharia vulpina* L. (Hue) коришћена је против стомачних тегоба (Malhotra et al., 2008). Декокт лишаја *Pseudoevernia furfuracea* коришћен је за лечење респираторних болести. Лишај *Peltigera canina* (L.) Willd. користио се као лек против болести јетре. Касније је утврђено да је ово својство резултат високог садржаја аминокиселине метионина. Врсте родова *Evernia*, *Peltigera*, *Parmelia*, *Cladonia*, *Rocella* и *Pertusaria* коришћени су против запаљења, дијареје, инфекција, кожних обољења и епилепсије (Kumar et al., 1996). У Европској традиционалној медицини широку примену имао је лишај *Cladonia rangiferina* (L.) Weber ex F.H. Wigg. и то углавном у лечењу прехлада, грозница, кашља и туберкулозе. (Perez-Llano, 1944). Лишај *Cetraria islandica* (L.) Ach. и данас има велику употребну вредност. Користи се за лечење и ублажавање симптома сувог кашља као природни антитусик. Комерцијално се може наћи у облику екстракта, тинктура, а најчешће у облику врло популарног сирупа. Поседује слаб мирис и горког је укуса који потиче од цетрарске киселине (C₁₈H₁₆O₈).

Многобројним научним истраживањима потврђено да је широки спектар секундарних метаболита лишаја одговоран за изражену терапеутску активност лишаја. Један од најзначајнијих и најиспитиванијих метаболита лишаја, уснинска киселина, данас се користи као изузетан антисептик. Поред тога, уснинска киселина показује и спазмолитичка и антивирусна својства, а изузетно је ефикасна и у инхибицији грам-позитивних бактерија. Међутим, висока концентрација уснинске киселине показала је токсичне ефекте, приликом испитивања изведених на лабораторијским мишевима (Durazo et al., 2004).

Метаболити лишаја

Лишаји синтетишу метаболите који су подељени у две групе:

1. Примарни (интрацелуларни) метаболити;
2. Секундарни (екстрацелуларни) метаболити.

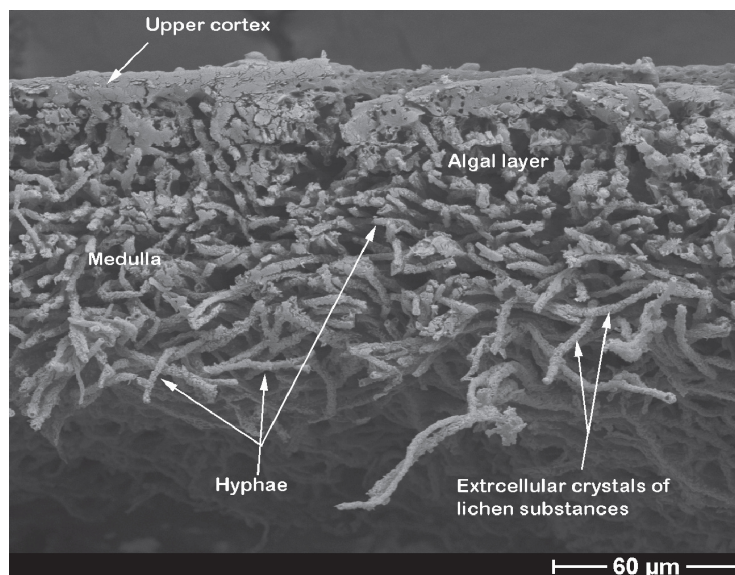
Примарни метаболити

Примарни метаболити лишаја укључују протеине, аминокиселине, каротеноиде, полисахариде и витамине. Често су растворљиви у води, односно хидросолубилни су и могу се лако екстраховати, чак и кључалом водом. Већина примарних метаболита је есенцијална за раст и развој лишаја. Примарни метаболити могу бити продуктовани од стране алгалне или фунгалне компоненте лишаја. Већина ових продуката изолованих из лишаја су неспецифични и често присутни у слободно живећим гљивама, алгама и вишим биљкама.

Најзначајнија једињења која чине примарне метаболите лишаја су: хитин (у зидовима хифа), лихенин, изолихенин, хемицелулоза, пектин, дисахариди, полиалкохоли, аминокиселине, ензими, алгални пигменти (хлорофил, β -каротени, ксантофили) и др. (Podterob, 2008).

Секундарни метаболити лишаја

Већина органских компоненти изолованих из лишаја су секундарни метаболити које продукује фунгална компонента лишаја. Секундарни метаболити се акумулирају у кортексу (као што су: атранорин, париедин и уснинска киселина) или у слоју медуле као екстрацелуларни ситни кристали на спољним површинама хифа (сл. 3).



Сл. 3. Пресек кроз талус лишаја *Hypogymnia physodes*. SEM микрографија (Molnar and Farkas, 2010)

Сви секундарни метаболити које продукују лишаји заједничким именом се зову лишајне супстанце. Ове супстанце најчешће се идентификују као лактони (нпр. protolichesterinic acid), фенолна једињења (нпр. atranol и resorcinol), депсиди (нпр. diffractic acid), деривати пулвинске киселине (нпр. vulpinic acid) и дибензофурани (Ranković and Kosanić, 2015).

Секундарни метаболити су често нерастворљиви у води и могу бити екстраховани једино неким органским растварачем попут ацетона, метанола или етанола. До данас, је идентификовано око 1050 секундарних метаболита, од којих је већина карактеристична искључиво за лишаје, а само мали део (од 50 до 60) константован је код нелихенизованих гљива и неких виших биљака (Stocker-Wörgötter, 2008). Секундарни продукти лишаја могу чинити до 20% суве тежине талуса, али у већини случајева овај износ варира од 5 до 10%.

Премда су изузетно богати секундарним метаболитима, ово богатство није равномерно распоређено у свим врстама лишаја. Обрасци дистрибуције секундарних метаболита су таксон специфични, па имају широку примену у таксономији и систематици лишаја.

Идентификација и изоловање секундарних метаболита лишаја

Интересовање органских хемичара за изоловање и идентификацију лишајних метаболита датира из раног 19. века, углавном због јединствености многих ароматичних једињења пронађених у лишајима. Истраживања су убрзана почетком 1900. године када је у првој обимнијој студији о лишајима описано и класификовано око 150 лишајних супстанци на основу њихове хемијске структуре (Zopf, 1907). Међутим, због ограничених техничких могућности у то време, ове информације нису биле довољно прецизне.

Таксономија лишаја некада је била заснована на боји талуса. Сивозелени род *Physcia* (садржи безбојну супстанцу атранорин у кортексу) био је издвојен од површно посматрано сличног, али жутонаранцастог рода *Xanthoria* (садржи кортикал париетин, наранџасти пигмент). Слично томе, *Parmeliopsis ambigua* (Wulfen) Nyl. (са жутиим талусом, због присуства уснинске киселине) је одвојена од морфолошки сличне *Parmeliopsis hyperopta* (Ach.) Arnold, чији је талус сиве боје због присуства атранорина (Hawksworth, 1976). Ипак, многе лишајне супстанце су безбојне и могу бити детектоване једино уз помоћ индиректних метода.

За идентификацију лишајских супстанци коришћене су следеће методе:

- Класични тачкасти тестови (енг. Classic spot tests);
- Микросталографија (енг. Microcrystallography);
- Папирна и танкослојна хроматографија (енг. Paper and thin-layer chromatography- TLC);
- Течна хроматографија високих перформанси (енг. High-performance liquid chromatography-HPLC);
- Хемијске методе (енг. Chemical methods);
- Гасна хроматографија и масена спектрометрија (енг. Gas chromatography and mass spectrometry) (Ranković and Kosanić, 2015).

Прва хемијска тестирања на талусу лишаја у таксономске сврхе у Европи спровео је Nylander 1866. године. Он је открио присуство различитих супстанци лишаја

укапавањем хемијских реагенаса директно на талус лишаја, што је продуковало карактеристичну промену боје. Овај тест назван је Classic spot tests. Nylander је користио растворе јода, калијум-хидроксида (К) и калцијум-хипохлорида (С). Осим тога коришћени су тест реагенси – КС (раствор К праћен С) и СК (са додатком реверзије). Резултати овог теста и дистрибуција пигмената пружили су прве доказе да лишајне супстанце нису равномерно распоређене у талусу лишаја. За неке врсте упечатљиви црвени или наранџасти антрахинонски деривати и жути пигмент уснинске киселине очигледно су ограничени на вршне делове кортекса. Осим тога, ови тестови показали су да је велики број депсида и депсидона ограничен на медуларни слој. Овај тест је коришћен као брза, неспецифична метода за прелиминарно детектовање присуства лишајних супстанци.

Прву класификацију лишајних супстанци засновану на познатим структурама и путевима биосинтезе конструисали су Asahina and Shibata (1954). Ови научници разјаснили су структуре многих лишајних супстанци, а затим и својства око 200 лишајних метаболита.

Иновативна микрокристализациона метода употребљена је за брзу идентификацију лишајних супстанци. Захваљујући једноставности, брзини, а пре свега прецизности ова техника била је прихваћена и од стране многих ботаничара, што им је помогло у идентификовању главних компонената неколико стотина биљних врста (Culberson, 1969). Годину дана касније, број идентификованих супстанци лишаја био је преко 400, захваљујући употреби спектроскопије и техника за раздвајање компонената. Мада је овај систем допринео развоју науке и усавршавању знања, он је претрпео и бројне модификације, па је с тога већина информација постала доступна тек касније (Culberson and Elix, 1989). Тест лишајних микрокристала био је знатно прецизнији у односу на претходно описан. Ова једноставна техника не захтева никакву посебну опрему. Примена овог теста почела је током 1930. и 1940. године. Основни недостатак овог теста огледа се у томе што је било готово немогуће детектовати ситније компоненте. Из тог разлога је данас, овај метод замењен много прецизнијим и осетљивијим хроматографским методама.

Током временског периода од 1952. до 1956. године почела је примена папирне хроматографије за идентификацију лишајних киселина и њихових хидролитичких продуката. Овим методама је потврђено да је хемијски састав многих лишајних врста много сложенији него што је приказала употреба микрокристализацијске технике. Међутим и ова техника имала је доста недостатака, а пре свега: експериментални проблеми, ниска осетљивост и пуно времена утрошеног на анализе. Ови недостаци довели су до потребе за превазилажењем ове методе и развоја савршеније TLC методе, односно танкослојне хроматографије. Ова техника је изузетно погодна јер је утицала на брзину и прецизност идентификовања супстанци лишаја, а све то уз помоћ средстава која су једноставна за коришћење и која су релативно јефтина. Танкослојна хроматографија се и данас веома често користи за идентификовање продуката лишаја.

Најпоузданија, а самим тим и најприменљивија техника која се користи за изоловање и идентификацију супстанци лишаја је течна хроматографија високих перформанси, односно HPLC (high performance liquid chromatography). Овом методом процес сепарације врши се на основу расподеле компоненти између стационарне и мобилне фазе. Предности коришћења ове методе огледају се у томе што је ова метода једноставна за контролу и изузетно прецизна. Осим тога ово је техника која је највише напредовала последњих година у смислу побољшања квалитета колоне, осетљивости детектора и софтверске контроле. Захваљујући великом избору колоне и детектора могу се

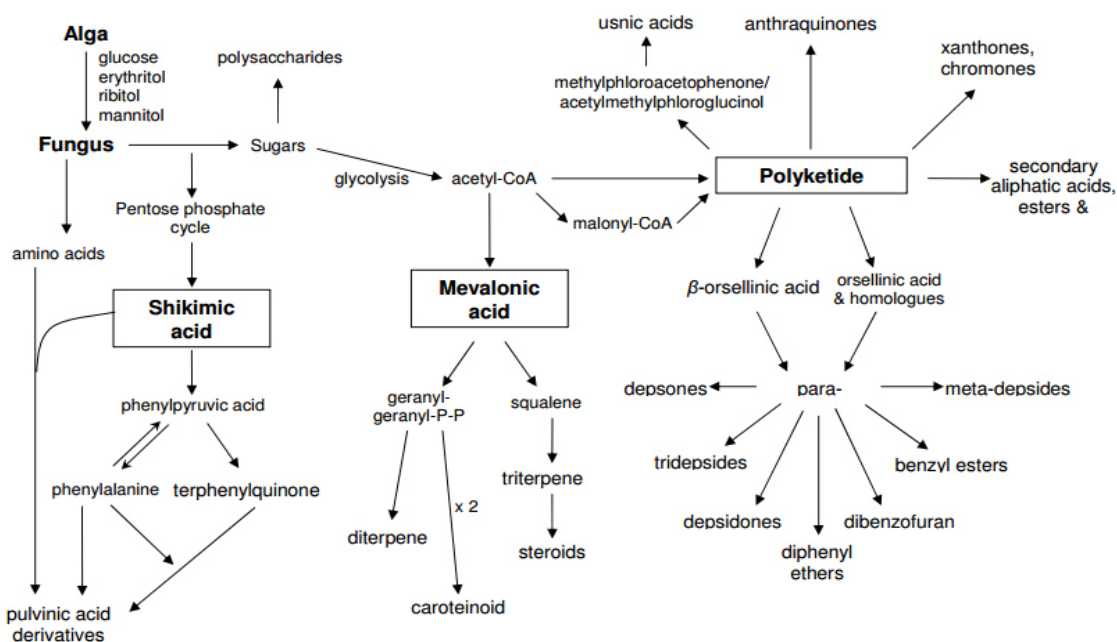
подесити услови за анализу веома великог броја супстанци. У поређењу са гасном хроматографијом смањен је ризик од деградације узорка, јер се не ради на високим температурама. Можда најзначајнија предност коришћења ове методе јесте аутоматизован поступак. Захваљујући HPLC методи сваке године изолује се и идентификује велики број нових супстанци и њихове структуре бивају детерминисане (Molnar and Farkas, 2010).

Нови подстицај у идентификацији лишајских супстанци пружају брже и побољшане хемијске методе за детекцију, изоловање и пречишћавање једињења и утврђивање њихових структура. Технике препаративне TLC, радијалне хроматографије и препаративне HPLC представљају брзе и ефикасне методе за пречишћавање лишајних супстанци.

Гасном хроматографијом са масеном спектрометријом – GCMS (енг. Gas chromatography and mass spectrometry), могу се проучавати ксантони, антрахинони, дибензофурани, терпени и деривати пулвиниске киселине који немају термолабилне естар групе.

Биосинтеза секундарних метаболита лишаја

Секундарни метаболити лишаја настају сложеним биосинтетским путевима. Већина секундарних метаболита лишаја настаје ацилполималонатним или поликетидним метаболитичким путем (polyketide pathway), док остали настају путем мевалонске киселине (mevalonic acid pathway) и шикиминске киселине (shikimic acid pathway) (сл. 4).



Сл. 4. Биосинтетски путеви који воде до главних група лишајних продуката (Модификација Nash, 1996)

Врста угљених хидрата која се ослобађа и испоручује гљиви, зависи од фотобионта, односно од испоручиоца тј. алге. Уколико фотобионт у талусу лишаја представљају алге из раздела *Cyanobacteriophyta*, угљени хидрат који се ослобађа и предаје гљиви је глукоза. У супротном, уколико је фотобионт алга из раздела *Chlorophyta*, угљени хидрати који се ослобађају и предају гљиви су полиоли и то: еритритол, рабитол или манитол (Smith, 1967).

На основу наведених биосинтетских путева секундарни метаболити лишаја се могу даље поделити на различите главне класе једињења. Поликетиди настају првенствено комбинацијом ацетатних (ацетил-СоА) и малонатних (малонил-СоА) јединица. Они представљају главну класу природних секундарних метаболита бактерија (прокариота), гљива, алги, виших биљака и животиња (динофлагелата, инсеката, мекушаца и сунђера). Ацилполималонатним метаболичким путем добијају се алифатичне киселине и ароматичне компоненте (феноли, антрахинони, хромони, нафтахинони и ксантони). Компоненте синтетисане ацилполималонатним метаболичким путем настају везивањем два или три орцинола и β - орцинола.

Биосинтетски пут шикиминске киселине обезбеђује деривате пулвинске киселине. Ово је алтернативни пут добијања ароматичних једињења, пре свега ароматичних аминокиселина: L-фенилаланин, L-тирозин и L-триптофан. Док се биосинтетским путем мевалонске киселине продукују углавном терпеноиди који су изведени из C₅ изопрених јединица и стероиди.

Ацилполималонатни метаболички пут:

Секундарни метаболити лишаја синтетисани ацилполималонатним путем представљају јединствену класу хемијских једињења предвођених алифатичним и ароматичним киселинама, а пре свега депсидима и депсидонима. Ове компоненте синтетише фунгални партнер, искључиво када је у асоцијацији са алгом (лишајска симбиоза). Ове компоненте играју важну улогу у успешној симбиотској заједници лишаја.

Метаболички пут мевалонске киселине:

Овим метаболичким путем углавном се синтетишу терпени и стероиди. Још увек није константовано присуство сесквитерпена у лишајима. Док су дитерпени изузетно ретки у лишајима, тритерпени се одликују изразитом учесталашћу, чак је 20 различитих тритерпена константовано у различитим врстама лишаја. Зеорин је најзначајнији тритерпен и он се истиче присуством у различитим врстама лишаја.

Метаболички пут шикиминске киселине:

Осим једињења која се синтетишу полималонилним и мевалонским метаболичким путевима, постоје и једињења која се синтетишу метаболичким путем шикиминске киселине и она су такође веома биолошки активна. Лишајне супстанце синтетисане овим путем представљају углавном *pulvinic acid* и *terphenylquinone*. Ова једињења настају спајањем две фенилпируватне јединице. Важно је истаћи да се ове хемијске компоненте широко јављају код лишаја фамилије *Stictaceae*.

Секундарни метаболити лишаја показују изражену биолошку активност укључујући антимикробну, антиоксидативну, антивиралну, антиканцерогену,

антипролиферативну, антиинфламаторну, антихербиворну и антипротозоалну активност, а осим тога они су потенцијални аналгетици и антипиретици (Shrestha and St. Clair, 2013).

Иако су ове вишеструке активности потврђене многобројним истраживањима, њихов терапеутски потенцијал још увек није у потпуности истражен, а самим тим ни фармаколошки искоришћен.

Према Miao et al. (2001) постоје два основна разлога због чега се ови ресурси биоактивних супстанци не експлоатишу у довољној мери:

1. Лишаји се одликују изузетно спорим растом у природним условима, па се коришћење лишаја из природе у комерцијалне сврхе не препоручује, нити је то еколошки прихватљиво;

2. Лишаје није лако формирати у лабораторијским културама, нити је могућа њихово култивисање. Иако је било успешних покушаја раста микобионта лишаја у одређеним културама (axenic culture), ове културе не производе метаболите који су идентични једињењима у природним талусима (Stocker-Worgotter and Elix, 2002).

Биолошка активност лишаја

Антимикробна активност лишаја

Антибиотици и антимикотици припадају најважнијим групама лекова, због своје велике ефикасности у лечењу. Међутим, позната је чињеница да су бактерије способне да развију различите механизме одбране и постану резистентне на дејство лека. Неконтролисана употреба антибиотика у медицини и ветерини у сврхе превенције и терапије бактеријских обољења, као и употреба у сточарству у сврху промоције раста животиња, довела је до све учесталије појаве резистенције, тј. отпорности патогена на антибиотике, што у данашње време представља озбиљан терапијски проблем. Осетљивост појединих микроорганизама на појединачне антимикробне лекове значајно варира. И поред развоја хемије, технологије и информатике који дају немерљив допринос у креирању нових, за човека важних, биоактивних једињења, природни производи, усавршавани милионима година еволуције извор су који је далеко од исцрпљеног (Balz, 2008). У потрази за новим биоактивним препаратима природног порекла, лишаји представљају предмет многобројних истраживања. Лишаји су потенцијални ресурси многих биолошки активних једињења која могу имати широку примену у медицини и фармацији.

Најбоље проучена биолошка улога секундарних метаболита лишаја односи се управо на антимикробну активност. Прва истраживања везана за антибактеријска својства лишаја спровео је Burkholder 1944. године. Овом приликом тестирани су водени екстракти 42 различите врсте лишаја против *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli*. Резултати ових истраживања указивали су да 27 врста лишаја показују инхибиторно дејство на раст бактерија *S. aureus* и *B. subtilis*, али ниједна од испитиваних врста није показала овакво дејство на *E. coli*.

Антимикробна активност екстраката лишаја варира у зависности од врсте микроба и састава њихове ћелијске мембране који се разликује код грам-позитивних и грам-негативних микроорганизама. Од грам-позитивних бактерија најдоминантнији родови на којима су тестирани екстракти лишаја су: *Bacillus* и *Staphylococcus*, затим *Mycobacterium*, *Streptococcus*, *Listeria* и *Micrococcus*. Исто тако биоактивна једињења у лишајима показала су антибактеријско дејство и на неким сојевима грам-негативних бактерија. Поред рода

Escherichia и други родови попут: *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Helicobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* и *Proteus* показали су се као осетљиви на различита биоактивна једињења изолована из лишаја.

Након што је по први пут изолована 1844. године, дибензофуран, уснинска киселина врло брзо постаје један од најчешће испитиваних секундарних метаболита лишаја, због своје изузетно јаке антимикуробне активности и своје комерцијалне доступности (Кпор, 1844). Овај секундарни метаболит одликује се изразитом заступљеношћу у оквиру родова *Alectoria*, *Cladonia*, *Usnea*, *Lecanora*, *Ramalina* и *Evernia* (Cansaran et al., 2006). Осим тога, запажено је да usnic acid, evernic acid и vulpinic acid делују инхибиторно на раст неких сојева грам-позитивних бактерија (Lawrey, 1986). Изузетно јак антимикуробни ефекат забележен је анализом екстраката различитих врста лишаја као и изолованим супстанцама лишаја: *Physcia aipolia* (Ehrh. ex Humb.) Fürnr. (изолована супстанца atranorin), *Cladonia furcata* (Huds.) Schrad. (fumarprotocetraric acid), *Umbilicaria polyphylla* (L.) Baumg. (gyrophoric acid), *Ochrolechia androgyna* (lecanoric acid), *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. (physodic acid), *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale (protocetraric acid), *Xanthoparmelia conspersa* (Ehrh. ex Ach.) Hale (stictic acid) и *Flavoparmelia caperata* (usnic acid), тесираних на шест бактеријских сојева, као и десет врста гљива (Ranković and Mišić, 2008). Manojlović et al. (2012) пронашли су да сирови екстракт врсте *Umbilicaria cylindrica* (L.) Delise ex Duby, испољава значајну антимикуробну активност на *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis* и *Klebsiella pneumonia*. Више различитих екстраката (етанолни, водени, ацетонски, метанолни, диетил-етарски, хлороформни и етил-ацетатни) лишаја *Roccella belangeriana*, тестирани на 12 бактеријских сојева. Наиме, најјача антимикуробна активност испољила се код хлороформног екстракта против *Enterococci* sp., док је најслабији ефекат добијен деловањем етил-ацетатног екстракта на *K. pneumoniae*, *Enterococci* sp., *Salmonella* sp. и *Shewanella* sp. (Karthikaidevi et al., 2009).

Међу новијим истраживањима, објављеним током 2013. године, значајни су подаци о потенцијалној антимикуробној активности водених и метанолних екстраката лишаја *Parmotrema* sp. против различитих врста патогена (Chauhan and Abraham, 2013). Том приликом антимикуробна својства поменутог лишаја тестирана су на осам бактеријских сојева (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Enterococci faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Klebsiella pneumonia*) и пет фунгалних (*Aspergillus terreus*, *Scedosporium* sp., *Ganoderma* sp., *Candida tropicalis* и *Fusarium* sp.). Добијени резултати показали су да метанолни екстракт лишаја *Parmotrema* sp. делује инхибиторно на раст свих тест организама. Најјача антибактеријска својства константована су на *P. aeruginosa* и *S. aureus*, док су најслабија уочена на *Salmonella* sp. Јака антифунгална активност изражена је на *Ganoderma* sp. и *Fusarium* sp. За разлику од метанолног екстракта, водени екстракт лишаја није показао ни антибактеријску, нити антифунгалну активност. На основу добијених резултата константовано је да су активне компоненте метанолног екстракта лишаја *Parmotrema* sp. потенцијани природни антимикуробни агенси.

Истраживања која су спровели Srivastava et al. (2013), односе се на испитивање антимикуробних својстава лишаја *Usnea ghattensis* G. Awasthi против сојева хуманих патогених бактерија. Лишај *U. ghattensis* садржи секундарни метаболит уснинску киселину као активну супстанцу, а екстракција је урађена помоћу ацетона, метанола и етанола. Метанолни екстракт поменутог лишаја и у концентрацији 0.1 mg/ml и у

концентрацији 0.2 mg/ml показао је јаку антибактеријску активност, нарочито против грам-позитивних бактеријских сојева. Лишајни екстракти нису деловали инхибиторно на раст *Escherichia coli* и *Salmonella typhimurium*. Ацетонски лишајни екстракт показује најзначајније ефекте на инхибицију. Док је етанолни екстракт *U. ghattensis*, показао најјачу инхибиторну активност на раст *Bacillus cereus* и *Pseudomonas aeruginosa*. На основу добијених резултата можемо константовати да је релативно јака активност лишаја испољена како приликом инхибиције раста грам-позитивних тако и грам-негативних бактерија.

Pompilio et al. (2013) објављују испитивања антибактеријске и антибиофилм активности три секундарна метаболита (usnic acid, atranorin и fumarprotocetraric acid) изолована из лишаја против три соја метицилин осетљивих и метицилин резистентних *Staphylococcus aureus*. Резултати ових истраживања показали су да уснинска киселина испољава снажније ефекте од атранорина, док фумарпротоцетрарна киселина није показала никакву активност. Уснинска киселина је много активнија у односу на атранорин и фумарпротоцетрарну киселину против метицилин резистентних *S. aureus*. Осим тога, уснинска киселина и атранорин показали су сличну активност против настанка биофилм формације. Дакле, можемо закључити да се поменути секундарни метаболити могу користити за продукцију нових лекова за лечење *S. aureus* инфекција код пацијената са цистичном фиброзом.

Различити секундарни метаболити лишаја показали су значајну антифунгалну активност. Многобројним истраживањима доказано је да лишајни екстракти делују инхибиторно на широк спектар гљива. Антифунгална активност испитивана је најчешће на врстама родова: *Aspergillus*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium* и *Trichoderma*. Ниске МИС вредности (од 0.00625 до 6.25 mg/ml) указују на интензивну антифунгалну активност екстраката појединих врста лишаја. Биоактивне компоненте лишаја које су након тестирања показале значајну антифунгалну активност су: divaricatic acid, zeorin, lecanoric acid, lichenic acid, atranorin, salanizic acid, protolichesterinic acid, fumarprotoacetraric acid, protocetraric acid, stictic acid и usnic acid (Ranković and Mišić, 2008; Manojlović et al., 2012; Sharma et al, 2013; Kosanić et al, 2014; Ranković, 2015; Ristić et al., 2016b).

Интересантан је податак који наводе Paudel et al. (2008a) да су метанолни екстракти пет врста лишаја који су сакупљани на подручју Антарктика *Caloplaca regalis* (Vain.) Zahlbr., *Caloplaca* sp., *Lecanora* sp., *Ramalina terebrata* Hook. f. & Taylor и *Stereocaulon alpinum* Lauret ex Funck, испољили циљно-специфичну антибактеријску активност, нарочито јаку према грам-позитивним бактеријама.

Mitrović et al. (2011) пронашли су да метанолни екстракти пет врста лишаја (*Parmelia sulcata* Taylor, *Flavoparmelia caperata*, *Evernia prunastri*, *Hypogymnia physodes* и *Cladonia foliacea* (Huds.) Willd.), који се одликују великом заступљеношћу на територији Републике Србије, показују јаку антимикуробну активност, сходно томе што су тестирани на 15 бактеријских сојева, 10 врста филаментозних гљива и четири врсте квасца.

Ristić et al. (2016a) истичу значајне резултате антиомикробне, антиоксидативне и антитуморске активности ацетонских екстраката и изолованих супстанци из лишаја *Melanelixia subaurifera* (Nyl.) O. Blanco, A. Crespo, Divakar, Essl., D. Hawksw. & Lumbsch и *M. fuliginosa* (Fr. ex Duby) O. Blanco, A. Crespo, Divakar, Essl., D. Hawksw. & Lumbsch.

Ацетонски екстракти врста *Cladonia furcata*, *C. pyxidata* (L.) Hoffm. и *C. rangiferina* као и изоловане компоненте atranorin и fumarprotocetraric acid испољили су антифунгално дејство на све тестиране врсте патогених гљива. Приметно је да су концентрације којима

изолиране компоненте инхибирају раст гљива, знатно ниже у односу на концентрације екстракта лишаја. Најосетљивија је била гљива *Candida albicans* чији раст инхибира компонента fumarprotocetraric acid са изузетно ниском МИС вредношћу 0.125 mg/ml (Kosanić et al., 2014a).

Екстракти лишаја *Laurera benguelensis* (Müll. Arg.) Zahlbr. показали су антифунгалне ефекте према следећим врстама гљива: *Candida albicans*, *Mucor mucedo* и *Trichoderma harsianum* (Manojlović et al., 2010). Осим тога, у истраживањима се наводи да је врста гљиве *Aspergillus niger* изузетно осетљива на етанолни екстракт врсте *Usnea subfloridana* Stirt. (Ekong et al., 2008).

Антиоксидативна активност

Антиоксиданси и слободни радикали су неизоставни део нашег свакодневног живота. Има их у свакој нашој ћелији и храни коју конзумирамо. Последњих година антиоксиданси и слободни радикали налазе се у жижи интересовања, када се говори о узроку и превенцији разних болести.

Слободни радикали играју важну улогу у многим хемијским процесима у ћелијама, али су такође повезани и са неким негативним ефектима узрокујући оштећења ћелија. Многим екстрактима лишаја приписује се улога природног антиоксиданса због садржаја фенола. Антиоксиданси снижавају ниво слободних радикала омогућавајући им да без причињавања велике штете изводе корисне биолошке функције. С обзиром да су синтетички антиоксиданси често канцерогени, све више расте интересовање за природним антиоксидансима.

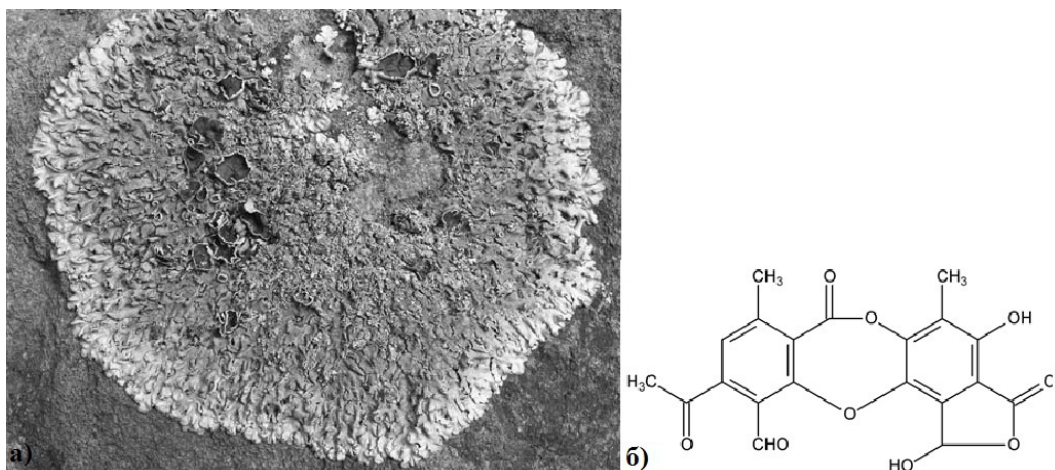
Слободни радикали могу бити од велике користи за организам уколико је њихова продукција добро контролисана тј. док постоји равнотежа између ћелијских система који производе слободне радикале и оних који одржавају антиоксидативне одбрамбене механизме. Ова равнотежа може бити нарушена под утицајем неког од ендогених (активност фагоцитних ћелија, процес респирације, коагулација, хипоксија, хипероксија...), или егзогених фактора (различити медикаменти, конзумација алкохола, пушење, појава авитаминозе, дејство ксенобиотика...). На тај начин долази до хиперпродукције реактивних врста кисеоника, као што су: супероксидни анијонски радикал ($O_2^{\cdot-}$), водоник-пероксид (H_2O_2), хидроксилни радикал (OH^{\cdot}) и синглентни кисеоник ($^1\Delta gO_2$). Као резултат нарушавања равнотеже долази до оксидативног стреса, који доводи до оштећења виталних ћелијских макромолекула.

Антиоксиданси су супстанце које, присутне у малим количинама у односу на супстрат подложен оксидацији (липиди, протеини, угљени хидрати, ДНК), инхибирају или потпуно спречавају њихову оксидацију. Бројна истраживања су показала да измерена антиоксидативна активност зависи од методе која се примењује. Већина метода за одређивање антиоксидативне активности се карактерише способношћу тестиране супстанце или продукта да хвата слободне радикале и/или да комплекси јона метала „возе“ оксидативни процес. Сви тест системи користе стабилне слободне радикале (на пример DPPH и ABTS) што даје информације о сакупљању радикала или антирадикалној активности, иако у многим случајевима ова активност не одговара антиоксидативној активности. Да би се добиле информације о стварној антиоксидативној активности у вези са стабилизаторима хране, на пример, неопходно је извести истраживања на стварним производима (биљним уљима, липопротеинима...) (Tirzitis and Bartosz, 2010).

Слободни радикали су некомплетни молекули – имају неспарен слободан електрон. Присуство неспареног електрона чини слободни радикал јаким оксидантом и високо реактивним зато што тежи да се спари са другим електроном и на тај начин оштећује ћелије ланчаном реакцијом (молекула који је остао без електрона и сам постаје слободан радикал). Кисеонични слободни радикали су: супероксид, водоник-пероксид, хидрокси-радикал. Слободни радикали могу оштетити ћелијску мембрану, масне киселине, холестерол, протеине и ДНК, и имају улогу у патогенези многих хроничних дегенеративних болести. Оксидација ћелијских протеина и мембрана може изазвати оштећење ткива код многих болести које су дуги низ година описиване као болести непознате етиологије: реуматоидни артритис, запаљенска цревна обољења и Паркинсонова болест. Оксидација ЛДЛ холестерола повећава ризик од атеросклерозе. Оксидативно оштећење ДНК може допринети настанку карцинома. Слободни радикали имају важну улогу и у процесу старења организма (Sies, 1991).

Јауаракаша and Јаганмохан (2000) дају преглед антиоксидативне активности метал орселината, атранорина, оселинилне киселине и леканорне киселине. Paudel et al. (2008b) указују на јачу антиоксидативну активност у екстрактима лишаја Антарктика у односу на лишаје пореклом из тропских предела.

Лишаји продукују велики број секундарних метаболита, а пре свега полисахариде и фенолне компоненте за које је потврђена антиоксидативна активност. Amo de Paz et al. (2010) наводи да метанолни екстракти *Xanthoparmelia camtschadalis* (Ach.) Hale и *X. conspersa* (Ehrh. ex Ach.) Hale (сл. 5) као и њихова изолована једињења (salazinic acid, stictic acid и usnic acid) штите хумане астроците од причињене штете водоник-пероксида. Астроцити представљају прву линију одбране у мозгу против неуротоксичности реактивних врста кисеоника (РОС), међутим претходно наведена једињења (salazinic acid, stictic acid и usnic acid) могу деловати као антиоксидативни агенси који инхибирају и спречавају токсичност реактивних врста кисеоника који изазивају низ неуродегенеративних обољења попут Алцхајмерове или Паркинсонове болести.



Сл. 5. Морфолошки изглед лишаја и структурна формула изоловане сипстанце
а) *Xanthoparmelia conspersa*; б) β -ornicol depsidone stictic acid (Molnar and Farkas, 2010)

Лишаји *Peltigera canina*, *P. praetextata* (Flörke ex Sommerf.) Zopf, *Sticta nylanderiana* Zahlbr., *Ramalina conduplicans* Vain., *Usnea ghattensis* G. Awasthi и *Parmotrema pseudotinctorum* (Abbayes) Hale, показали су изузетна антиоксидативна својства активношћу „хватања” (scavenging) DPPH радикала са више од 85%. Осим тога метанолни екстракти су показали највећу активност „хватања” (scavenging) супероксидних радикала и инхибицију липидне пероксидације (Vasudeo and Lew, 2012).

Kumar et al. (2010) указују на значајну антиоксидативну активност метанолних екстраката врста *Ramalina hossei* Vain. и *R. conduplicans*. Kosanić et al. (2014b) наводе изузетно снажну антиоксидативну активност метанолних екстраката врста *Lecanora muralis* (Schreb.) Rabenh., *Parmelia saxatilis* (L.) Ach., *Parmeliopsis ambigua*, *Umbilicaria crustulosa* (Ach.) Lamy и *U. polyphylla*. Приликом ових тестирања, аутори посебно истичу значај антиоксидативне активности врсте *U. polyphylla*.

Антиканцерогена активност

Канцер је један од водећих узрока смртности на шта указује и податак да сваке године у свету од рака оболи 12 милиона људи, а 7.6 милиона умре од овог обољења. Увид у ове податке наводи истраживаче из целог света на сталну потрагу за новим изворима антиканцерогене активности, а пре свега природним изворима. Лишаји, односно њихови секундарни метаболити, испољили су јаку антиканцерогену активност и цитотоксичне ефекте, па се могу примењивати како у превенцији, тако и за успоравање и заустављање процеса карциногенезе (Zeytinoglu et al., 2008).

Карциногенеза је процес у коме се нормална ћелија генетички и фенотипски прогресивно трансформише у ћелију тумора и тиме стиче способност неконтролисане деобе. Тумор је локално, атипично, аутономно, непрестано и несврсисходно бујање ткива. Можемо разликовати бенигне и малигне туморе. Бенигни тумори су јасно ограничени, расту споро при чему потискују и компримирају околно ткиво. Никада не метастазирају и најчешће су ограничени капсулом. Раст бенигну тумора не доводи до смрти организма домаћина. За разлику од њих, малигни тумори се карактеришу инфилтративним (инвазивним) и деструктивним растом при чему разарају околна нормална ткива. Нејасно су ограничени према околини, а расту брже од бенигну тумора. По правилу дају метастазе. У случају да се не лече, доводе до смрти организма домаћина.

Терапија која се примењује за успоравање и заустављање раста туморних ћелија, подразумева примену различитих једињења синтетичког или природног порекла и назива се хемотерапија. Основни недостатак примене ових хемотерапеутских агенаса односи се на њихову токсичност чак и према нормалним ћелијама. Поред тога, проблем у лечењу представља и то што је већина хуманих малигну тумора хеморезистентна. Данас се примењује велики број лекова за лечење канцера, али још увек нису добијени одговарајући резултати, а примена лекова природног порекла још увек је у фази испитивања. Из тих разлога, потрага за природним антиканцерогеним терапеутским агенсима ниске токсичности и широког спектра дејства представља актуелну тему данашњице.

Према неким истраживањима позиција различитих функционалних група у једињењима изолованим из лишаја утиче на ниво цитотоксичности. Установљено је да различите лишајне супстанце могу зауставити раст канцерогених ћелија у G1 или S фази ћелијског циклуса (Ваџковова et al., 2011). Механизам ћелијске смрти различитих

ћелијских линија карцинома узрокован лишајним метаболитима укључује апоптозу, некрозу и ангиогенезну инхибицију.

Цитотоксичност представља деловање медикамената и других материја на канцерогене ћелије где се врши супресија или заустављање њиховог раста и деобе. Испитивањем и мерењем цитотоксичности одређених материја, односно екстраката, мери се њихов утицај на раст и деобу ћелија. Свака ћелијска линија која се гаји у *in vitro* условима има специфичне захтеве, пре свега у погледу хранљиве подлоге на којој се гаји.

Употреба лишаја као антиканцерогених агенса датира из 1960. године када је први пут истраживана активност полисахарида лишаја против неких туморских ћелија (Nishikawa et al., 1969). Инхибиторна активност на туморске ћелије карцинома плућа првобитно је уочена код уснинске киселине изоловане из *Cladonia* sp. (Mayer et al., 2005). Након тога почињу интензивна истраживања антиканцерогене активности како сирових екстраката тако и пречишћених екстраката лишаја. Активности су испитиване на различитим туморским ћелијским линијама и том приликом добијени су и различити резултати ефикасности. Тако антиканцерогени ефекат зависи како од врсте лишаја, од растварача који се користи за прављење екстраката, тако и од ћелијске линије, односно њене осетљивости на антиканцерогене агенсе.

Прва детаљнија истраживања о лишајима као потенцијалним антиканцерогеним агенсима саопштили су Ingólfssdóttir et al. (2000). Они су испитивали антиканцерогене ефекте екстраката 29 различитих врста лишаја у односу на 12 канцерогених ћелијских линија. Bezivin et al. (2003) су испитивали антиканцерогени ефекат екстракта 24 врста лишаја и пронашли су веома јаку антиканцерогену активност за екстракте врста *Parmelia caperata*, *Cladonia convoluta*, *C. rangiformis*, *Platismatia glauca* (L.) W.L. Culb. & C.F. Culb. и *Ramalina cuspidata* (Ach.) Nyl.

Ranković et al. (2011) објављују резултате испитивања цитотоксичног ефекта ацетонских екстраката лишаја: *Cladonia furcata*, *Lecanora atra* (Huds.) Ach. и *L. muralis* на ћелијске линије хуманог меланома FemX и LS174 хуманог карцинома колоне. Лишајни екстракти испољили су снажну цитотоксичну активност на циљне ћелије, нарочито ацетонски екстракт врсте *L. atra*. Такође, добру цитотоксичну активност показала је врста *L. muralis* на обе ћелијске линије, док је слабија цитотоксична својства испољила *C. furcata*.

Метанолни екстракт *Hypogymnia physodes* тестиран је на хуманим ћелијским линијама рака дојке (MCF-7 и MDA-MB-231). Том приликом је уочено да екстракт ове врсте лишаја утиче на смањење вијабилности ћелија канцера (Ari et al., 2012). Антиканцерогена активност различитих супстанци изолованих из лишаја (usnic acid, cristazarin, protolichesterinic acid, polyporic acid, depsidone и lichenin) испитивана је на туморским ћелијама: меланома В-16, Р388 леукемија и К-562 леукемија. Лишајне супстанце usnic acid, lecanoric acid, gyrophoric acid, salazinic acid, lobaric acid, evernic acid, vulpinic acid и protolichesterinic acid, представљају значајне антиканцерогене агенсе, што је документовано научном литературом (Einarsdóttir et al., 2010; Bogo et al., 2010). Осим тога *in vitro* антиканцерогена активност екстраката лишаја оцењена је у складу са тестом ћелијске пролиферације у три типа туморских ћелијских линија и то: хуманог панкреаса (PANC-1) (Ingólfssdóttir et al., 2002), простате (DU-145) (Russo et al., 2006) и дојке (MCF7) (Bogo et al., 2010). Различити екстракти лишаја *Laurera benguelensis* испољили су цитотоксичне ефекте на ћелијске линије карцинома цервикса – HeLa (Vasiljević et al., 2009). Осим тога, Ren et al. (2009) објављују уочену антиканцерогену активност

ацетонског и метанолног екстракта лишаја *Lethariella zahlbruckneri* (Du Rietz) Krog. на ћелијске линије хуманог карцинома колона (HT-29). Munzi et al. (2014) показују да водени, етанолни и метанолни екстракти три врсте рода *Peltigera* (*P. canina*, *P. elisabethae* Gyeln. и *P. praetextata* (Flörke ex Sommerf.) Zopf) испољавају снажну антипролиферативну активност.

Секундарни метаболити изоловани из лишаја (diffractaic acid изолована из *Protousnea magellanica* (Mont.) Krog, vicanicin из *Psoroma pallidum* Nyl., lobaric acid из *Stereocaulon alpium* Laurer ex Funck., variolaric acid из *Ochrolechia deceptionis* (Hue) Darb., protolichesterinic acid из *Cornicularia aculeate* (Schreb.) Ach. и usnic acid из *Cladonia lepidophora* Ahti & Kashiw.) тестирани су на ћелијским линијама хуманог аденокарцинома колона (HCT-116), хуманог аденокарцинома дојке (MCF-7) и хуманог аденокарцинома цервикса (HeLa). Том приликом наведени секундарни метаболити показали су различите цитотоксичне ефекте у зависности од концентрације са већом осетљивошћу на HCT-116 ћелијским линијама и мањом на MCF-7 ћелијским линијама. Од поменутих шест метаболита vicanicin није показао никакву активност против нити једне ћелијске линије у тестираним концентрацијама, док су само diffractaic acid и usnic acid били активни против свих три ћелијских линија канцера (Brisdelli et al., 2013).

Преглед досадашњих истраживања лишаја на територији Републике Србије и територији бивше СФРЈ

Истраживање лишаја захтева поступно и студиозно сагледавање проблема, стрпљив, дуготрајан рад и разумно примењивање постојећих знања и искустава ради добијања релевантних закључака.

На територији некадашње Југославије истраживањем лишаја бавили су се многи аутори. На просторима Србије лишаји се први пут помињу 1859. године у делу Јосифа Панчића (Pančić, 1859). Након тога, у часопису "Наставник" су објављени резултати лихенолошких истраживања (Simić, 1892; Katić, 1907). У бившој СФР Југославији лишаји су први пут употребљени као показатељи аерозагађења у Загребу (Barbalić, 1952). Картирањем епифитских лишаја установљено је да је Загреб већ тада био прилично загађен и да је велики број осетљивих врста лишаја нестао из ширег градског подручја. Касније научници започињу интензивнија истраживања идентификације лишаја на подручју Србије, што уједно представља и први прилог за испитивање диверзитета лишаја у Србији. Резултати дуготрајних истраживања су научни радови, у којима је описано 1159 врста и 750 нових форми лишаја (Kušan, 1953).

Нешто касније, шездесетих година на аерозагађење обратили су пажњу и чланови кружока чије је радове о нестајању лишаја у загађеним пределима објављивала ревија "Протеус". Ово пионирско дело кружока на том пољу понегде је прерасло у прави истраживачки пројекат (Skoberne, 1973-74, 1974/75, 1975, 1977, 1977/78, 1979; Врачко, 1975/76; Batić 1978/79, 1979/80).

Овом проблематиком такође се самоиницијативно баве и неке истраживачке установе у Словенији. У Љубљани је од 1974. до 1977. године картиран диверзитет лишаја у граду и околини (Batić et al., 1979) и то по истој методи као и у осталим европским градовима. И у другим крајевима СФР Југославије долази до веће заинтересованости за истраживања ове врсте. У Загребу се поново картира присуство епифитних лишаја (Barbalić, 1978) а први пут оваква истраживања објављена су и у Скопљу (Pavletić i Murati, 1980) и Београду (Milić, 1981). У Словенији је Батич наставио са радом (Batić, 1984).

У Србији се после већ поменутог рада Милића из 1981. године истраживања настављају прво кроз серију дипломских и магистарских радова студената биологије на Катедри за алгологију, микологију и лихенологију Биолошког факултета Универзитета у Београду, а затим и кроз радове објављене у домаћим часописима или у страним публикацијама (Gajić and Korać, 1991; Milić and Blaženčić, 1993; Savić, 1995, 1996, 1998a, 1998b; Stamenković, 1995, 1997, 1998; Cvijan and Stamenković, 1996a, 1996b; Dimović and Jokić, 2000; Dimović, 2001; Cvijan et al., 1997, 2008; Stamenković et al., 2003, 2010, 2013).

Све чешће и све бројније појављивање радова из области индикације аерозагађења коришћењем лишаја на научним скуповима у земљи као и веома позитиван однос шире научне јавности према овом, деценијама неоправдано занемариваном проблему, говори о интензивној експанзији интересовања за ову област у Србији.

Бројне институције у Србији – научне, стручне и друштвене баве се истраживањем, планирањем, контролом и остваривањем заштите животне средине.

Досадашња употреба лишаја као бионидикатора у Србији заснива се на парцијалним и неинтегрисаним научним радовима који се објављују или као засебне студије, или као реферати на појединим научним и стручним скуповима.

Испитивања биолошких активности лишаја наводило је многе истакнуте истраживаче да дају свој допринос науци. Савремена истраживања заснивају се на изоловању, идентификацији и потенцијалном коришћењу секундарних метаболита лишаја као биолошких агенаса (Ranković et al., 2008; 2010a, 2010b, 2011, 2014, 2015; Mitrović et al., 2011, 2014; Kosanić et al., 2011, 2012, 2013, 2014a, 2014b; Manojlović et al., 2012).

2. ЦИЉ РАДА

Циљ ове докторске дисертације је процена квалитета ваздуха употребом лишаја као биоиндикатора и испитивање биомедицинског значаја различитих врста лишаја сакупљених на истраживаном подручју.

Процена стања квалитета ваздуха на територији Луковске, Куршумлијске и Пролом бање, Радан планине као и града Куршумлије коришћењем лишаја као биоиндикатора обухвата:

- идентификацију лишаја истраживаног подручја;
- анализу диверзитета лишаја и покривности;
- израчунавање вредности индекса атмосферске чистоће;
- израчунавање вредности индекса антропогеног утицаја;
- картирање зона различитог степена загађења ваздуха у оквиру сваког истраживаног подручја;
- издвајање потенцијалних индикаторских врста за одређене зоне индикације квалитета ваздуха.

Биомедицинска карактеризација лишаја обухвата:

- добијање аценотних екстраката изабраних врста лишаја;
- испитивање присуства секундарних метаболита;
- изоловање секундарних метаболита и фитохемијску анализу;
- испитивање биолошких активности –
 - антимикуробне активности у односу на различите врсте бактерија и гљива, који су чести биљни, животињски и хумани патогени, као и узрочници кварења хране;
 - антиоксидативне активности;
 - антиканцерогене активности ацетонских екстраката изабраних врста лишаја као и изолованих секундарних метаболита.

3. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ

У раду је коришћен метод лишајске индикације квалитета ваздуха, као и анализа биомедицинског потенцијала изабраних врста лишаја чије је присуство константовано на подручју Топличког региона. Сакупљање материјала спроведено је у Луковској (сл. 9), Куршумлијској (сл. 10) и Пролом бањи (сл. 12), на делу Радан планине који припада Топличком округу (сл. 12) и на урбаном подручју града Куршумлије (сл. 14). Испитивањем је обухваћено укупно 75 истраживаних тачака, односно 15 тачака на сваком истраживаном подручју (таб. 1).

Таб. 1. Листа истраживаних подручја са редним бројевима истраживаних тачака и географским координатама

Истраживано подручје	Број истраживане тачке	Географске координате	
		Латитуда N	Лонгитуда E
Луковска бања	1	43°9'58.56"	21° 2'5.34"
	2	43°10'2.28"	21° 2'32.52"
	3	43°10'5.83"	21° 2'31.39"
	4	43°10'5.95"	21° 2'6.60"
	5	43°10'4.87"	21° 2'13.66"
	6	43°10'2.95"	21° 2'0.92"
	7	43°10'6.71"	21° 2'25.90"
	8	43° 9'58.99"	21° 2'31.29"
	9	43° 9'52.48"	21° 1'54.51"
	10	43°10'1.16"	21° 2'3.23"
	11	43° 9'52.46"	21° 2'3.11"
	12	43° 9'54.91"	21° 2'16.26"
	13	43° 9'55.69"	21° 1'57.98"
	14	43° 9'55.14"	21° 2'10.23"
	15	43° 9'58.55"	21° 1'59.83"
Куршумлијска бања	16	43° 3'35.57"	21°15'23.72"
	17	43° 3'32.85"	21°15'12.28"
	18	43° 3'29.95"	21°15'13.40"
	19	43° 3'23.48"	21°15'7.67"
	20	43° 3'25.44"	21°15'16.61"
	21	43° 3'25.47"	21°15'2.74"
	22	43° 3'29.83"	21°15'9.89"
	23	43° 3'25.41"	21°14'55.67"
	24	43° 3'26.15"	21°14'44.34"
	25	43° 3'21.89"	21°14'46.43"
	26	43° 3'29.53"	21°15'19.96"
	27	43° 3'21.38"	21°14'56.63"
	28	43° 3'27.11"	21°14'29.81"
	29	43° 3'20.70"	21°15'3.50"
	30	43° 3'21.93"	21°15'23.41"
Пролом бања	31	43° 2'53.61"	21°24'6.51"
	32	43° 2'49.75"	21°23'52.31"
	33	43° 2'46.31"	21°23'58.76"
	34	43° 2'47.93"	21°23'50.46"

Таб. 1 (наставак). Листа истраживаних подручја са редним бројевима истраживаних тачака и географским координатама

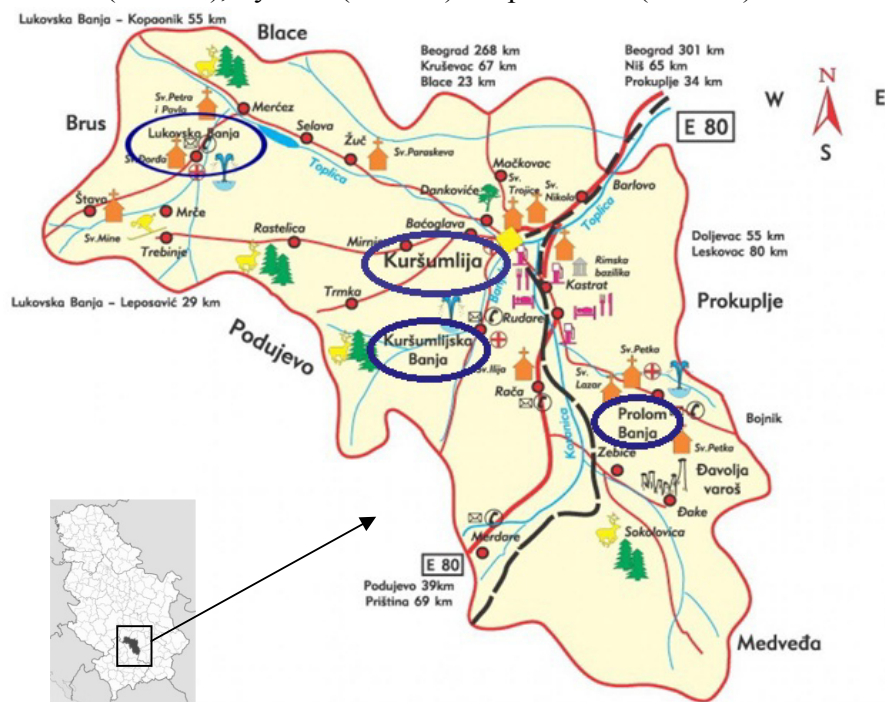
Истраживано подручје	Број истраживане тачке	Географске координате	
		Латитуда N	Лонгитуда E
Пролом бања	35	43° 2'46.56"	21°24'14.52"
	36	43° 2'45.71"	21°24'10.92"
	37	43° 2'52.18"	21°23'59.22"
	38	43° 2'42.35"	21°24'0.71"
	39	43° 2'43.36"	21°23'58.37"
	40	43° 2'43.57"	21°24'5.80"
	41	43° 2'51.40"	21°23'54.87"
	42	43° 2'39.82"	21°23'57.24"
	43	43° 2'43.54"	21°23'52.64"
	44	43° 2'46.77"	21°24'2.45"
	45	43° 2'50.16"	21°24'1.88"
Радан планина	46	43° 4'13.30"	21°21'42.70"
	47	43° 1'31.80"	21°22'53.50"
	48	43° 2'7.50"	21°19'37.60"
	49	42°58'54.50"	21°24'20.00"
	50	42°57'52.10"	21°24'15.70"
	51	43° 0'45.91"	21°25'58.17"
	52	42°57'33.60"	21°27'2.60"
	53	42°57'25.78"	21°25'49.06"
	54	42°59'10.30"	21°21'56.00"
	55	42°59'59.20"	21°27'8.70"
	56	43° 0'24.61"	21°21'7.69"
	57	42°59'18.77"	21°26'30.24"
	58	43° 1'50.40"	21°26'44.24"
	59	43° 1'8.21"	21°28'9.60"
	60	43° 0'4.73"	21°19'46.16"
Град Куршумлија	61	43° 8'43.00"	21°15'55.57"
	62	43° 8'23.61"	21°16'2.47"
	63	43° 8'29.30"	21°16'20.71"
	64	43° 8'23.10"	21°16'18.40"
	65	43° 8'13.77"	21°16'6.30"
	66	43° 8'11.40"	21°16'32.00"
	67	43° 8'25.69"	21°16'42.92"
	68	43° 8'19.10"	21°16'50.34"
	69	43° 8'26.15"	21°16'50.74"
	70	43° 8'31.70"	21°17'9.50"
	71	43° 8'38.10"	21°16'49.40"
	72	43° 8'47.10"	21°16'37.40"
	73	43° 8'35.82"	21°17'45.43"
	74	43° 8'23.64"	21°17'32.96"
	75	43° 8'14.12"	21°17'7.46"

Опис истраживаног подручја

Територија Србије се налази на централном делу Балканског полуострва. Топлички регион се налази на југу Републике Србије. Територија Топличког региона обухвата површину од 2231 km². Налази се између Јастрепца на северу, Пожара и Копаоника на западу, Соколовице, Радана, Видојевице и Пасјаче на југу док се на истоку спаја са Јужним Поморављем (Stanojević, 2001). Географски положај Топличког региона је одређен координатама 42°54'-43°24' северне географске ширине и 18°30'-19°30' источне географске дужине. Региону припадају општине: Прокупље, Куршумлија, Блаце и Житорађа.

Општина Куршумлија налази се на југу Србије у горњем сливу реке Топлице и њених притока Косанице и Бањске, на југоисточним падинама Копаоника и северозападним падинама Радан планине (сл. 6). Атрактивност туристичког потенцијала општине Куршумлија огледа се у природним раритетима: Луковска, Куршумлијска и Пролом бања, планина Радан и град Куршумлија. Простире се на површини од 952 km² што чини 42.7% од укупне површине Топличког региона. На подручју општине постоји 1 градско и 89 сеоских насеља (Мацејка and Танасковић, 2008). Општина Куршумлија спада у групу најнеразвијенијих општина у Србији (девастирано подручје). Према попису становништва из 2011. године у овој неразвијеној општини живи око 19213 становника. Густина насељености износи 20 ст./ km² што је два пута мање од просечне насељености Топличког округа.

Подручје општине је брдско планинско. Надморска висина се креће од 300 до 1703 m. Највиши врх је Пилатовица (1703 m). Познати планински врхови су и Пардушка Глава (1260 m), Глоговица (1200 m), Рудине (1316 m) и Врлетница (1320 m).

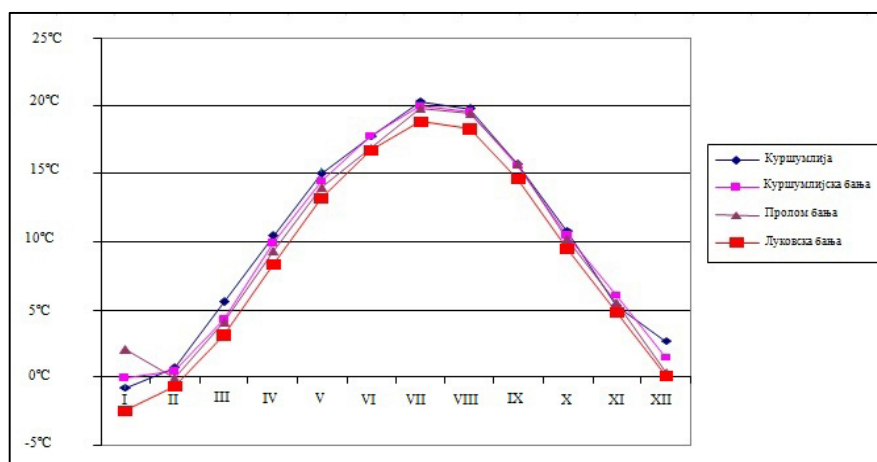


Сл. 6. Географски положај општине Куршумлија на карти Републике Србије и истраживаних подручја (Архива ТО Куршумлија)

Клима територије општине Куршумлија је умерено-континентална, али се одликује извесном специфичношћу, што условљава одговарајуће микроклиматске модификације, у зависности од положаја и рељефа котлине. Најнижи делови територије одликују се умереним климатским карактеристикама, са одсуством јаких ветрова, добром осунчаности и присуством шумских аеросола. У ободном планинском делу преовладава висинска клима (800-1300 m) са сниженим ваздушним притиском, ниском аерозагађености и смањеним садржајем водене паре. Температура ваздуха је изузетно битан климатски елемент. На основу увида у податке о средњим месечним и годишњим температурама ваздуха, уочавају се повољне климатске прилике (таб. 2). Температура ваздуха варира у зависности од надморске висине, сунчеве радијације, географског положаја и рељефа. На температуру ваздуха утиче и вегетација, с обзиром да дрвеће врло ефективно апсорбује долазећу радијацију тако да њен мали део долази до тла. Током дана температура ваздуха близу површине тла нижа је него на висини дрвећа. Ноћу, дрвеће спречава губитак топлоте са тла које се налази испод (Frank, 2016). Варирања средњих месечних температура ваздуха приметна су и у оквиру истраживаних подручја општине Куршумлија (сл. 7).

Таб. 2. Средње месечне и средње годишње температуре ваздуха у Куршумлији, за период 2012.-2015. год. (Републички хидрометеоролошки завод Србије. http://www.hidmet.gov.rs/ciril/meteorologija/klimatologija_godisnjaci.php)

Месец Година	Месечна температура (°C)												Годишња температура (°C)
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	
2012	-0.6	-4.3	6.5	11.5	14.7	21.6	24.5	23.5	18.9	13.0	8.7	-0.1	11.5
2013	2.0	4.0	5.7	12.3	17.0	18.8	20.8	22.1	15.2	12.3	8.1	1.0	11.6
2014	3.5	6.3	8.1	10.9	14.2	18.2	20.4	20.3	15.7	11.0	8.1	2.4	11.6
2015	1.8	2.1	5.2	10.1	16.6	18.0	22.8	21.7	17.8	11.0	6.9	2.1	11.4

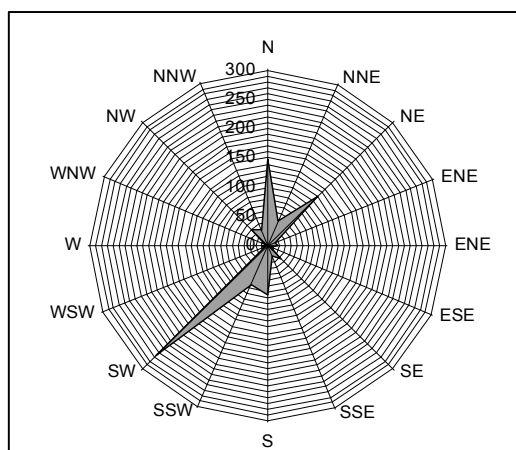


Сл. 7. Графички приказ средњих месечних температура ваздуха у општини Куршумлија за 2012. год. (Републички хидрометеоролошки завод Србије. http://www.hidmet.gov.rs/ciril/meteorologija/klimatologija_godisnjaci.php)

Ветрови

Својим правцем кретања, честином и јачином ветар утиче на туристичка кретања непосредно и посредно преко дејства на остале климатске елементе. Правац и брзина ветра се мења у зависности од конфигурације терена (сл. 8). Источни ветрови се јављају зими и доносе суво и хладно време. Западни ветрови су најчешће у пролеће и представљају главни извор падавина. Јужни и југозападни ветрови су релативно топли, крајем зиме и почетком пролећа убрзавају отапање снега.

Најчешће дува ветар из југозападног правца $310^{\circ}/_{00}$, затим са севера $171^{\circ}/_{00}$ и североистока $162^{\circ}/_{00}$.



Сл. 8. „Ружа” ветрова општине Куршумлија (Републички хидрометеоролошки завод Србије. http://www.hidmet.gov.rs/ciril/meteorologija/klimatologija_godisnjaci.php)

Релативна влажност ваздуха

У сразмери са кретањем дневног тока температуре јавља се промена влажности ваздуха (**таб. 3**).

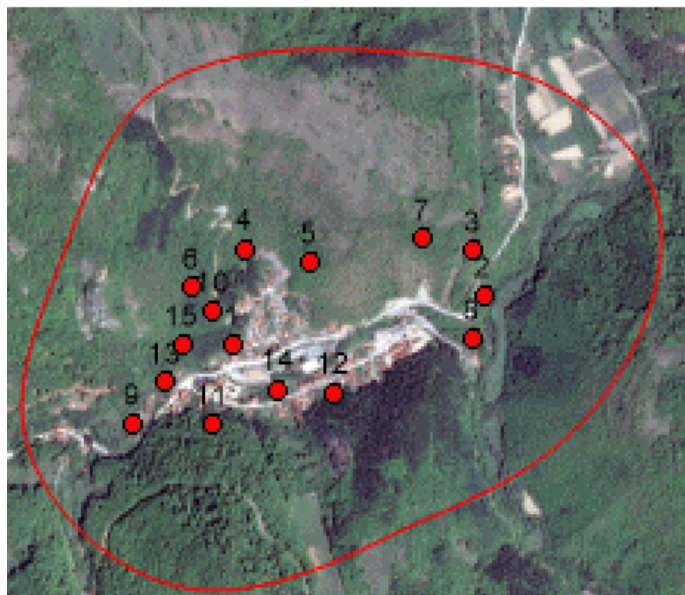
Таб. 3. Средње месечне и годишње вредности релативне влажности ваздуха у Куршумлији за период од 2012. до 2015. године. (Републички хидрометеоролошки завод Србије. http://www.hidmet.gov.rs/ciril/meteorologija/klimatologija_godisnjaci.php)

Месец Година	Месечна влажност (%)												Годишња влажност (%)
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	
2012	77	74	60	63	70	60	55	46	58	70	76	84	66
2013	79	79	74	64	67	73	60	59	70	75	81	82	72
2014	81	72	73	79	76	73	74	75	85	84	86	85	79
2015	79	80	78	63	69	73	60	64	73	85	76	83	74

Ваздух је у току године у истраживаним подручјима општине Куршумлија умерено влажан, јер средња годишња релативна влажност износи 73%. Максимум релативне влажности јавља се 2014. године и то у новембру 86% и децембру 85% што је последица обилних падавина и ниских температура у то доба године, а минимум у 2012-године и то у августу 46% када су и средње температуре ваздуха највише (таб. 3) (Републички хидрометеоролошки завод Србије).

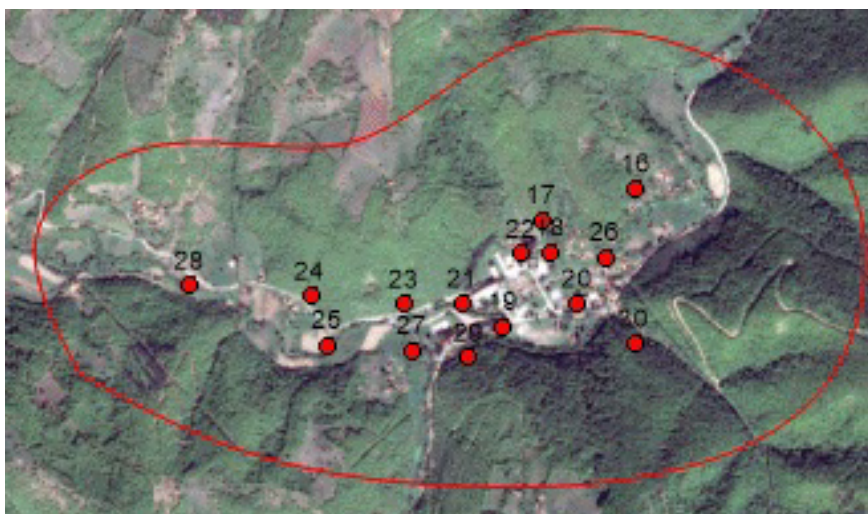
Ово подручје представља сложени комплекс велике површине на којем су развијене стене вулканског порекла које по преовлађујућем саставу хемијских елемената припадају силикатним Лецкиом андезитском масиву. Овај комплекс обухвата андезите и пирокластите у централном, западном и јужном ободном делу масива, а у северним и источним деловима развијени су кристаласти шкриљци. На површини терена све ове стене се јављају као изданци, блокови и распадина, и тако представљају подлогу лишајима (Jakšić i sar., 2002).

Луковска бања се налази у западном делу општине Куршумлија, на источној падини Копаоника (сл. 9). Захвата површину од 134.19 km², или 14.11% територије општине. Удаљена је од Куршумлије 36 km. Налази се на 681 m надморске висине, што је чини највишом бањом у Србији. Насељски атар обухвата површину од 25.51 km², по чему је то једно од површински већих насеља у Општини (Архива ТО Куршумлија). Према попису становништа 2011. године у овом бањском насељу живи 275 становника. Луковска Бања је у саставу села Луково, које се налази 1.5 km низводно од ње. Подручје је изразито брдско-планинског карактера. Највећи део територије (59%) је под шумом, под ливадама и пашњацима је 31% територије. Орнице и воћњаци заузимају свега 9%, а остало је неплодно земљиште. Подручје Луковске бање веома је богато биљним светом. Од листопадних биљних врста најзаступљеније су врсте: *Quercus cerris* L., *Fagus sylvatica* L., *Carpinus betulus* L. и *Acer campestre* L. Од зимзелених дрвенастих врста, у пределима са већом надморском висином, расту: *Pinus sylvestris* L., *Abies alba* Mill. и *Picea abies* (L.) Karst.

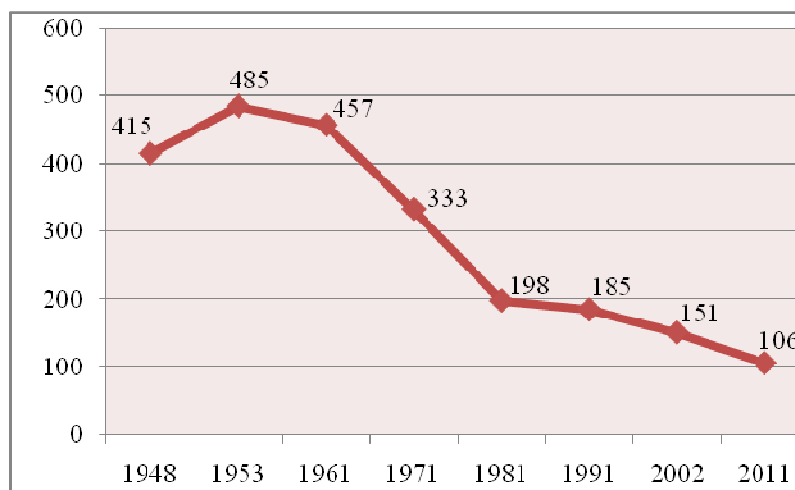


Сл. 9. Сателитски снимак истраживаног подручја Луковске бање са обележеним истраживаним тачкама

Куршумлијска бања се налази на југоисточним падинама Копаоника, у котлини Бањске реке, на 442 m надморске висине (сл. 10). Ово бањско насеље смештено је у југозападном делу општине Куршумлија, 11 km јужно до града Куршумлије. Насељски атар обухвата површину од 7.77 km², по чему је то једно од површински мањих насеља у Општини (Архива ТО Куршумлија). Са свих страна је окружена добро пошумљена планинским косама и врховима страна, чија висина не прелази 900 m. (Војовић, 2012). Рехабилитациони центар, саграђен 1982. године требало је да обезбеди континуирани равој Куршумлијске бање, али од како је 2006. године рехабилитациони центар престао са радом, Куршумлијска бања је у веома лошем стању, а томе у прилог говори и опадање броја становника (сл. 11). Према попису становништва из 2011. године број становника у овом насељу износи 106 .

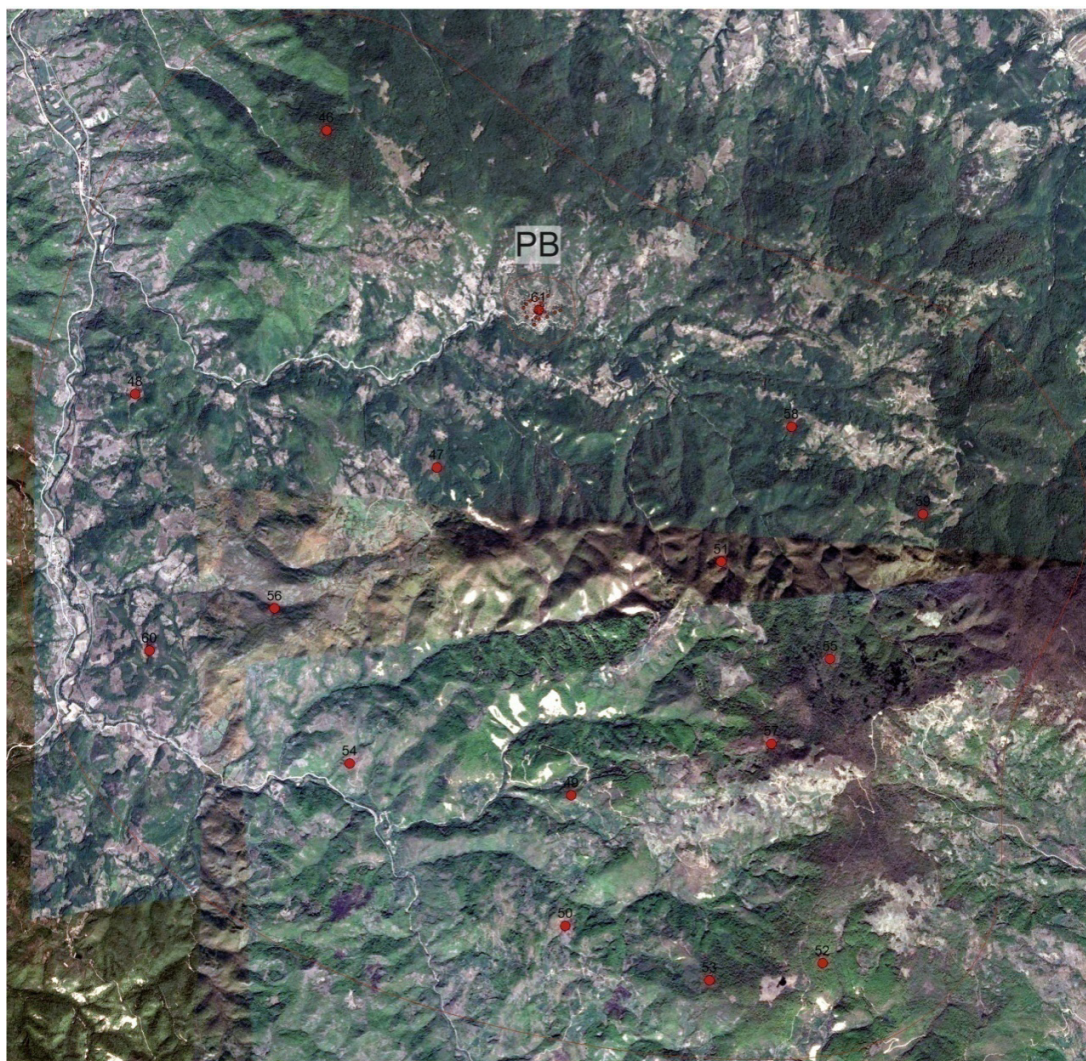


Сл. 10. Сателитски снимак истраживаног подручја Куршумлијске бање са обележеним истраживаним тачкама



Сл. 11. Промена броја становника у Куршумлијској бањи за период од 1948. до 2011. године (Републички завод за статистику. <http://popis2011.stat.rs>.)

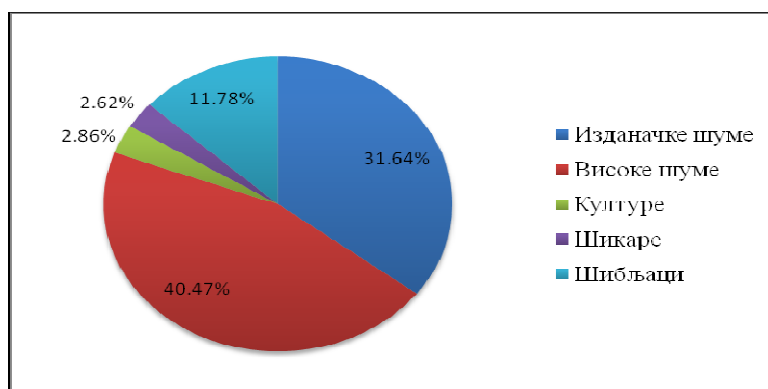
Пролом бања се налази 23 km југоисточно од Куршумлије, на јужним падинама планине Радан (сл. 12). Овај бањски центар налази се висини од 598 m и уоквирују га, осим планине Соколовице (1.050 m), на северу, и Арбанаска планина (1.009 m), затим врхови планине Радана–Самар (1.008 m), Вијогор (1.128 m) и Соколовац (1.260 m), на истоку, Проломска планина (1.104 m) и Мејанска планина (962 m), на југу, док је западно долином Проломске реке нешто отворенија према долини Косанице (Војовић, 2012). Насељски атар обухвата површину од 18.10 km², по чему је то једно од површински средње великих насеља у Општини (Архива ТО Куршумлија). У Пролом бањи данас живи 131 становник. Интензиван развој Пролом бање почиње 1961. године. У наредним деценијама број туриста се полако повећавао. У данашње време Пролом бања се по перспективи развоја истиче међу бањским туристичким местима од националног значаја. Пролом Бања је најразвијенија и најуређенија бања и представља највећи туристички центар општине Куршумлија.



Сл. 12. Сателитски снимак истраживаног подручја Радан планине у чијем саставу се налази и истраживано подручје Пролом бање са обележеним истраживаним тачкама

Радан планина представља предео изузетних одлика. Ово подручје, у ширем смислу, некада је било прекривено густим шумама и ретко насељено (сл. 12). Са аспекта данашњег стања шума на Радан планини, у оквиру заштићеног природног добра „Радан“, улазе државне шуме површине од 16230.57 ha Јабланичког и Топличког шумског подручја.

Шумско газдинство „Топлица“ из Куршумлије, на подручју стављеном под заштиту, обухвата седам газдинских јединица у укупној површини од 12264.62 ha, запремине 1526.784 m³ и укупног годишњег прираста 38.961 m³. Анализа стања државних шума по пореклу за шумско газдинство „Топлица“ из Куршумлије, показује да најдоминантнији тип вегетације чине високе природне шуме (сл. 13).



Сл. 13. Стање државних шума планине Радан шумског газдинства "Топлица" по површини

У групи високих природних шума најзаступљеније су букове шуме и шуме храста китњака, док преостали део високих природних шума заузимају састојине сладуна, букве и граба, сладуна и цера, букве и китњака и цера, јасике, брезе и јасике (Јакшић и сар., 2002).

С обзиром да су на ово читаво подручје остварени слични флорогенетски и сингенетски утицаји, биљни покривач је у великој мери сличан. Релативно мала надморска висина утицала је да потенцијална вегетација целог овог подручја буде шумска.

На планини Радан потенцијалну вегетацију чине два вертикална вегетацијска појаса. На нижим надморским висинама (од 300 до 700 m) развија се појас климазоналне шуме *Quercetum farnetto-cerris*, а изнад 700 m букова шума (*Fagetum montanum moesiicum*).

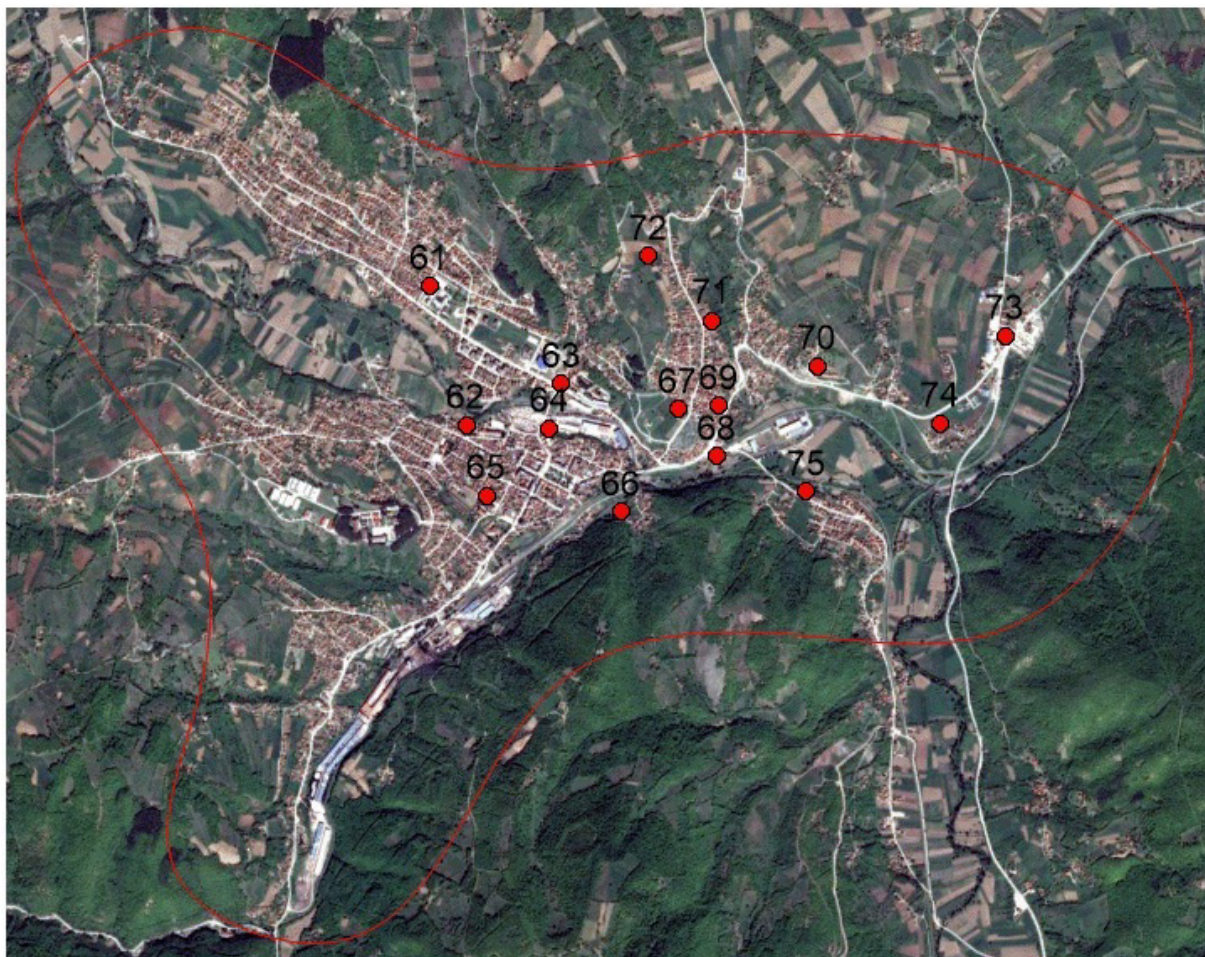
У оквиру ова два вегетацијска појаса на реликтним стаништима се развијају полидоминантне шуме, што се посебно односи на појас букових шума у оквиру кога се развија шума букве са мечјом леском (*Corylo colurnae-Fagetum*).

Иако је шумски покривач на ширем подручју планине Радан у великој мери очуван у односу на друге планинске масиве, ипак на овом подручју преовладавају различити типови секундарне вегетације, а најчешће брдске ливаде и пашњаци. Осим тога, на истраживаном простору јављају се и долине ливаде, вегетација стена и вегетација крчевина. Свакако највећи биодиверзитетски значај имају асоцијације које се развијају на огољеним андезитским стенама и у њиховим пукотинама (Јакшић и сар., 2002).

Куршумлија је административни и културни центар општине. Седиште и највеће насељено место у општини Куршумлија, смештено у њеном средишњем делу (сл. 14). Налази се на надморској висини 345-528 m. Насељски атар обухвата површину од 11.40 km², по чему је то једно од површински средњих насеља у Општини (Архива ТО Куршумлија). Према последњем попису становништва 2011. године Куршумлија је градско насеље са 13200 становника.

Куршумлија данас нема неке нарочите потенцијалне загађиваче ваздуха. Једини могући узрочници аерозагађења јесу релативно развијен моторни саобраћај у граду и индивидуална кућна ложишта.

Раније је Куршумлија имала развијену текстилну, дрвну и металну индустрију, и то МК „7. јули”, ШИК „Копаник”, МИ „Металац” и АД „Планинка”. Данас једино предузеће које успешно ради је АД „Планинка” које експлоатише воду из Пролом бање (Стратегија одрживог развоја општине Куршумлија 2010-2020. године. <http://tokursumlija.rs/wp-content/uploads/2016/06/strategija-2010-2020.pdf>).



Сл. 14. Сателитски снимак истраживаног подручја града Куршумлије са обележеним истраживаним тачкама

Идентификација, сакупљање и чување материјала

Истраживање индикације квалитета ваздуха спроведено је у Луковској, Пролом и Куршумлијској бањи, на делу Радан планине, који припада Топличком региону и на урбаном подручју града Куршумлије.

Теренски део истраживања обављен је у периоду од априла месеца 2012. до октобра месеца 2015. године, изласцима на терен два пута годишње, лети и зими. Испитивањем је обухваћено укупно 75 истраживаних тачака, односно по 15 тачака на сваком истраживаном подручју (таб. 1). Свака истраживана тачка састојала се од 5 супстратних јединица. Супстратне јединице чинили су неорганска (стене) и органска подлога (земљишта и коре различитих дрвенастих врста биљака у шумама, дрворедима, парковима, воћњацима и другим зеленим површинама). Истраживани су епифитни (лигникolni и кортиколни), териколни и саксиколни лишаји.

Идентификација лишаја вршена је на лицу места, сакупљани су само мали делови талуса оних врста лишаја који су захтевали детаљнија испитивања и чија идентификација није могла бити урађена на лицу места. Лишаји су идентификовани помоћу кључева: Dobson, 2000; Wirth, 1995, док је систематика дата према Marinović, 1988. Врсте лишаја чија идентификација није могла бити урађена на лицу места сакупљане су помоћу дела стандардног протокола (Asta et al., 2002). За сакупљање узорака на терену коришћен је нож, с обзиром да су прикупљани узорци врста лишаја које расту на кори дрвећа или тлу, који се веома тешко одвајају од подлоге и геолошки чекић за врсте које расту на стенама. Узорци су потом паковани у папирне врећице, на којима су бележени редни бројеви. Исти редни бројеви уписивани су у теренски дневник као и сви остали релевантни подаци.

Утврђивање битних карактера лишаја обављено је помоћу лабораторијске лупе Bresser Science ETD 101 7-45x, а за неке родове који су фенотипски пластични и варијабилни коришћен је светлосни микроскоп марке "LEICA DM 1000" са могућношћу максималног увећања од 1350x.

За детерминацију лишаја коришћена је бојена хемијска реакција са следећим једињењима – регагенсима: NaClO_2 , KOH (50% раствор), P (парафенилендиамин) реагенс и Луголов раствор. Примерци детерминисаних врста чувају се на Департману за биологију и екологију, Природно-математичког факултета у Крагујевцу.

Метод лишајске индикације квалитета ваздуха

Уз помоћ радне мреже димензија 50 x 10 cm одређена је покривност лишаја, визуелном методом. Мрежа је постављана на сваку супстратну јединицу. Приликом истраживања епифитних лишаја разматрана су само стабла на висини од 1 до 1.5 m од тла, чији је угао нагиба био мањи од 5° . Број квадрата радне мреже у којима је уочено присуство сваке врсте појединачно изражава се процентуално, за сваку супстратну јединицу. С обзиром да се свака истраживана тачка састојала од пет супстратних јединица аритметичком средином добијене су вредности покривности у процентима сваке врсте појединачно. Покривност сваке константоване врсте лишаја изражена је вредностима од 0 до 10, на скали која карактерише покривност: вредности 9-10 додељиване су врстама са веома високом учесталашћу налажења и врло високим степеном покривности (од 80 до 100%) ; вредности 7-8 додељиване су врстама са високом учесталашћу или високим степеном покривности (60 до 80%); вредности 5-6 додељиване су врстама које се не налазе често или које имају мали степен покривности (од 40 до 60%); вредности 3-4 додељиване

су врстама које се срећу ретко или које имају низак степен покривности (од 20 до 40%); вредности 0-2 додељиване су врстама које су врло ретке и са врло ниским степеном покривности (од 0 до 20 %) (Vyazrov, 2002).

У теренском дневнику, поред сваке истраживане тачке, бележена је врста супстрата на којој су нађени лишаци као и вредности коефицијента покривности (f) таксона на свакој истраживаној тачки. Фреквенција сваке врсте је рачуната у односу на процентуалну заступљеност на укупном броју истраживаних тачака.

Редни бројеви истраживаних тачака и њихове координате одмах су уписивани на радну мапу подручја.

Израчунавање индекса атмосферске чистоће и картирање зона индикације квалитета ваздуха

У истраживању је коришћена нумеричка метода израчунавања индекса атмосферске чистоће. Према, Loppi et al., (1997); Kricke and Loppi, (2002), IAP (енг. Index of Atmospheric Purity – IAP) вредности рачунате су према формули:

$$IAP = \sum f$$

где f представља покривност лишација.

Индекс атмосферске чистоће рачунат је за сваку истраживану тачку у оквиру истраживаних подручја. За процену степена загађења ваздуха и одређивање зона индикације коришћена је скала (Conti and Cecchetti, 2001). Веће вредности индекса указују на бољи квалитет ваздуха, док ниже вредности указују на то да је ваздух слабијег квалитета (таб. 4).

Таб. 4. Скала процене квалитета ваздуха на основу степена загађења и вредности IAP (Conti and Cecchetti, 2001)

Степен загађења	Екстремно високо	Врло високо	Високо	Умерено	Слабо	Врло слабо
Боја						
IAP	0	12.5	25.0	37.5	50.0	
Лишајске зоне индикације	„Лишајска пустиња“		Зона „борбе“		„Нормална зона“	

Интерполацијска метода универзалног кригинга са линераним вариограмом (Davis, 1986) примењена је за конструисање карти које приказују формиране зоне индикације квалитета ваздуха на основу вредности IAP. За графички приказ дистрибуције тачака са различитим вредностима IAP коришћене су карте са перцентилима где различите боје приказују различите вредности IAP.

На основу вредности IAP, разликују се три основне зоне квалитета ваздуха:

1. „Нормална зона” заузима подручја на којима је ваздух чист или нема аерозагађења у значајнијем степену ($IAP > 37.5$);
2. Зона „борбе” обухвата површину са умереним нивоом загађености ($12.5 \leq IAP \leq 37.5$);
3. „Лишајска пустиња” заузима територију са највишим степеном загађености ваздуха ($0 < IAP \leq 12.5$) (Conti and Cecchetti, 2001).

Израчунавање индекса антропогеног утицаја

Вредности индекса антропогеног утицаја (енг. Index of Human Impact – ИИ) рачунате су за сваку истраживану тачку појединачно. Изузетак је подручје Радан планине где на истраживаним тачкама нису израчунаване вредности ИИ.

Gombert et al., (2004) указује да ИИ вредности имају за циљ да окарактеришу сваку истраживану тачку користећи следеће параметре животне средине: степен урбанизације (U- енгл. Urbanization), интензитет саобраћаја (T- енгл. Traffic), локални развој (D- енгл. Local developments) и експозиција (E- енгл. Exposure). Категорије од 1 до 4 приписују се сваком параметру да би представиле градијент алтернација (**таб. 5**).

Индекс антропогеног утицаја, рачунат је према формули:

$$ИИ = U (T + D + E)$$

Таб. 5. Квантитативна процена квалитативних варијабли основних параметара животне средине (Gombert et al., 2004)

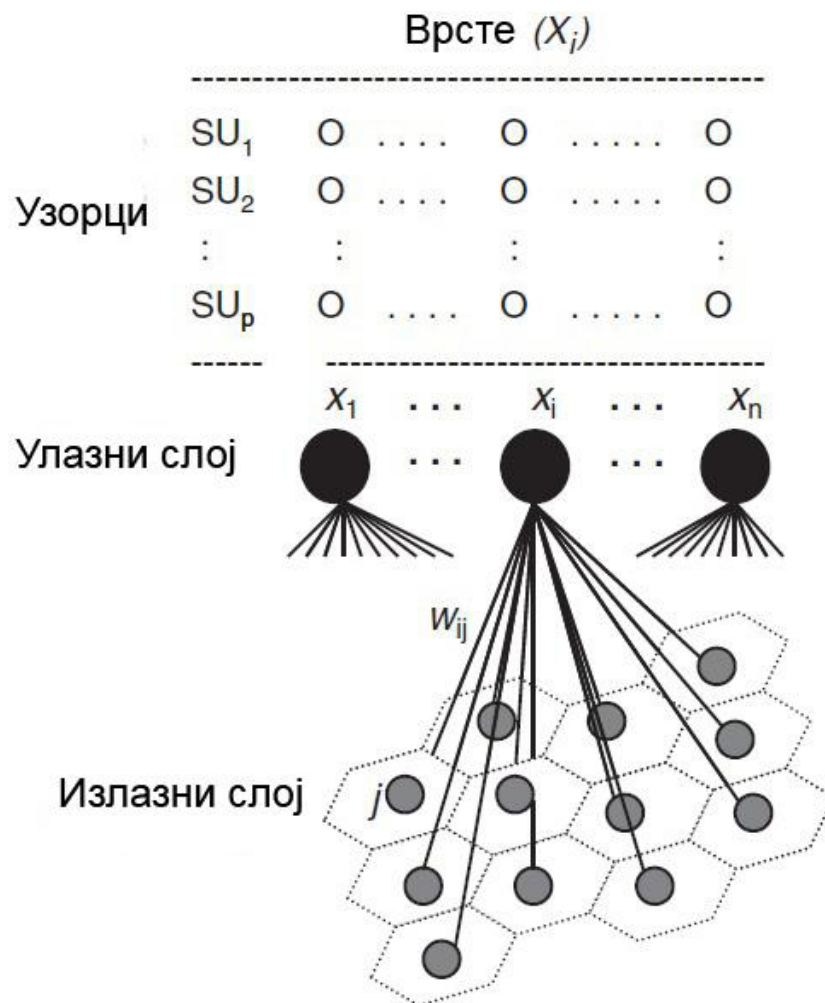
Параметри		
Урбанизација (U)	Рурална област 1	Субурбана или урбана област 4
Интензитет саобраћаја (T)	Слаба изложеност већим саобраћајницама 1	Јака изложеност већим саобраћајницама 4
Локални развој (D)	Зелене површине 1	Насељена места, паркинзи за аутомобиле 4
Експозиција (E)	Индивидуалне дрвенасте врсте или дрвореди 1	Груписане дрвенасте врсте 4

Статистичка анализа података

Анализа података добијених теренским истраживањем вршена је уз помоћ вештачке неуронске мреже која је јако ефикасна у одређивању образаца просторне дистрибуције лишаја. У овом раду коришћене су Кохоненове (Kohonen) самоорганизујуће мапе (енг. **Self Organizing Maps – SOM**; Kohonen, 1982, 2001), које представљају тип вештачке неуронске мреже односно ненадгледани алгоритам. SOM метода представља технику моделовања и визуелизације линераних и нелинеарних веза у високо димензионалном сету података у виду нискодимензионалног простора (неуромреже). Самоорганизујуће мапе разликују се од других типова неуронских мрежа по томе што чувају информацију о тополошким својствима улаза помоћу функције суседних неурона. Кохоненова мрежа се састоји од извесног броја неурона од којих сваки садржи скуп тежинских фактора једнаке дужине као улазни вектор података. Структура SOM-а састоји се од улазног и излазног слоја (сл. 15).

Подаци се уносе у анализу помоћу улазне матрице. Улазна матрица за приказивање просторне дистрибуције лишаја састојала се од 75 редова (истраживане тачке) и 88 колона (таксони). Након уношења података у SOM путем улазне матрице почиње процес тренирања мреже који се заснива на секвенцијалном укључивању сваког улазног вектора (таксон) у мрежу, који се пресликавају у одређене неуроне излазне мреже формирајући карактеристичан модел података. У току рада Кохоненове мреже узима се по једна инстанца података. Сваки неурон одређује Еуклидско растојање између свог тренутног вектора тежинских фактора и вредности дате инстанце података. Неурон за који је ово растојање најмање од свих у мрежи се проглашава за „победника”. Инстанца података је најближа групи инстанци за које је исти „победник” исти неурон. Самоорганизујућа мапа се може интерпретирати као скуп неурона, од којих сваки представља по једну групу података, при чему податак припада оној групи која је представљена неуроном „победником”. Сваки излазни неурон носи одређени модел испитиваних података. Излазни слој чине излазни хексагонални неурони организовани у виду дводимензионалне решетке. По завршетку тренирања мреже, сви локалитети додељени су одговарајућим неуронима. Резолуција SOM мреже за ову анализу је 7 x 6.

Како SOM анализа не приказује статистичке индикације врста одговорних за одвајање кластера, спроведена је примена IndVal методе (енг. the **Indicator Values**; Dufrière and Legendre, 1997). Да би се идентификовале значајне врсте са вредностима IndVal параметра већим од 25%, примењен је Monte Carlo тест значајности са 1000 пермутација. Такве врсте су репрезентативне за групу локалитета са релативном фреквенцом и густином не мањом од 50%. Врсте које имају IndVal вредност мању од 25%, а статистички су значајне ($p < 0,05$), представљају таксоне који су важни за групу. Ове врсте обезбеђују додатне информације о групи, али нису репрезентативне, јер имају ниске вредности релативне фреквенце. Анализа IndVal методе је спроведена коришћењем PC-ORD 4.0 програмског пакета (McCune and Mefford, 1999)



Сл. 15. Структура самоорганизујуће мапе (Chon, 2011).

Методологија испитивања биомедицинског потенцијала лишаја

Одабране врсте лишаја (таб. 6) које су коришћене за испитивање различитих биолошких активности осушене су на ваздуху, на собној температури и чуване у папирним врећама на тамном и сувом месту до момента екстракције. Екстракти се чувају на Департману за биологију и екологију, Природно-математичког факултета у Крагујевцу (DBFS).

Таб. 6. Листа врста лишаја коришћених за испитивање биолошких активности

Лишај	Код	Локалитет	Година узорковања
<i>Cladonia coniocraea</i> (Flörke) Spreng.	DBFS 84	Пролом бања	2013
<i>Cladonia fimbriata</i> (L.) Fr.	DBFS 85	Пролом бања	2014
<i>Cladonia foliacea</i> (Huds.) Willd.	DBFS 86	Куршумлијска бања	2013
<i>Cladonia furcata</i> (Huds.) Schrad.	DBFS 87	Луковска бања	2012
<i>Cladonia ramulosa</i> (With.) J.R. Laundon	DBFS 88	Радан планина	2014
<i>Cladonia rangiferina</i> (L.) Weber ex F.H. Wigg.	DBFS 89	Пролом бања	2013
<i>Cladonia subulata</i> (L.) Weber ex F.H. Wigg.	DBFS 90	Куршумлијска бања	2012
<i>Lepraria incana</i> (L.) Ach.	DBFS 91	Радан планина	2015
<i>Melanelixia fuliginosa</i> (Fr. ex Duby) O. Blanco, A. Crespo, Divakar, Essl., D. Hawksw. & Lumbsch	DBFS 92	Радан планина	2013
<i>Melanelixia glabra</i> (Schaer.) O. Blanco, A. Crespo, Divakar, Essl., D. Hawksw. & Lumbsch	DBFS 93	Радан планина	2014
<i>Melanelixia subaurifera</i> (Nyl.) O. Blanco, A. Crespo, Divakar, Essl., D. Hawksw. & Lumbsch	DBFS 94	Пролом бања	2013
<i>Peltigera rufescens</i> (Weiss) Humb.	DBFS 95	Луковска бања	2012
<i>Pertusaria amara</i> (Ach.) Nyl.	DBFS 96	Пролом бања	2015
<i>Physcia semipinnata</i> (Leers ex J.F. Gmel.) Moberg	DBFS 97	Куршумлијска бања	2013
<i>Platismatia glauca</i> (L.) W.L. Culb. & C.F. Culb.	DBFS 98	Радан планина	2014
<i>Pleurosticta acetabulum</i> (Neck.) Elix & Lumbsch	DBFS 99	Луковска бања	2014
<i>Ramalina fastigiata</i> (Pers.) Ach.	DBFS 100	Луковска бања	2012
<i>Ramalina fraxinea</i> (L.) Ach.	DBFS 101	Луковска бања	2012

Карактеристике изабраних врста лишаја*Cladonia coniocraea* (Flörke) Spreng.**Classis:** Ascolichenes**Subclassis:** Gymnocarpeae**Ordo:** Lecideales**Familia:** Cladoniaceae**Species:** *Cladonia coniocraea*Сл. 16. *Cladonia coniocraea*

Примарни талус у виду љуспица. Секундарни талус чине подеције, које су појединачне, витке, према врху се благо сужавају. Подеције висине од 1 до 2.5 cm, сивозеленкасте боје, у влажном стању често изразито зелене боје. Углавном, посуте прашкастим соредијама. Апотеције ретке, браон боје, на врховима подеција. Широко распротрањена на земљишту, дрвећу обраслом маховином, на трулим пањевима и пре свега у основи дрвећа. Активна супстанца: fumarprotocetraric acid (Culberson, 1969).

Cladonia fimbriata (L.) Fr.**Classis:** Ascolichenes**Subclassis:** Gymnocarpeae**Ordo:** Lecideales**Familia:** Cladoniaceae**Species:** *Cladonia fimbriata*Сл. 17. *Cladonia fimbriata*

Примарни талус љуспаст. Подеције често од 2 до 3 cm високе, цилиндричне, на врху се нагло проширују, сиве, сивкасте или зеленкасте боје, потпуно покривене брашнастим соредијама. Апотеције доста честе, седеће или на кратким дршкама. Живи на земљишту, између маховина, на стенама, у основи стабала, на обореним трупцима. Релативни је индикатор чистог ваздуха. Активна супстанца: atranoric acid, fimbriatic acid и fumarprotocetraric acid (Culberson, 1969).

Cladonia foliacea (Huds.) Willd.

Classis: Ascolichenes

Subclassis: Gymnocarpeae

Ordo: Lecideales

Familia: Cladoniaceae

Species: *Cladonia foliacea*



Сл. 18. *Cladonia foliacea*

Примарни талус прилично крупан (до 2 cm дужине) са базалним сквамулама. Режњеви дубоко урезани и издужени, видљиво повијена на горе. Зелене до жутозелене боје са горње стране, нарочито када су у свежем стању. Наличје режњева бледо жуте боје. Подеције изузетно ретке и неупадљиве, неправилног облика. Апотеције браонкасторозе боје, када су свеже. Често је присутна на пешчаним или кречњачким теренима. Активна супстанца: usnic acid, atranorin и fumarprotocetraric acid (Culberson, 1969).

Cladonia furcata (Huds.) Schrad.

Classis: Ascolichenes

Subclassis: Gymnocarpeae

Ordo: Lecideales

Familia: Cladoniaceae

Species: *Cladonia furcata*



Сл. 19. *Cladonia furcata*

Примарни талус се јавља у виду љуспица, а секундарни талус жбунаст. Секундарни талус чине подеције које су разгранате, висине до 10 cm. Боја подеција варира од сивкастозелене до браон. Апотеције се ретко образују, браон боје, ситне и налазе се на врховима грана. Фитобионт је алга из рода *Trebouxia*. Расте на земљишту, стенама, ређе на трулом дрвећу. Активна супстанца: atranorin, fumarprotocetraric acid, и ascorbic acid (Culberson, 1969).

Cladonia ramulosa (With.) J.R. Laundon**Classis:** Ascolichenes**Subclassis:** Gymnocarpeae**Ordo:** Lecideales**Familia:** Cladoniaceae**Species:** *Cladonia ramulosa*Сл. 20. *Cladonia ramulosa*

Подације зеленобраон боје. Веома променљивог изгледа. Одликује се присуством бројних, кратких и усправних грана или неправилним, асиметричним проширењима које су на ивицама разгранате. По површини обложене малим брадавицама, понекад са сквамлама. Соредије нису присутне или су јако ретке. Базалне сквамле мале и урезане. Апотеције су често присутне, розе до црвеносмеђе боје, прстенастог облика. Широко распрострањена на деградираном, тресетном станишту. Активна супстанца: confumarprotocetraric acid, fumarprotocetraric acid, homosekikaic acid, protocetraric acid и sekikaic acid (Culberson, 1969).

Cladonia rangiferina (L.) Weber ex F.H. Wigg.**Classis:** Ascolichenes**Subclassis:** Gymnocarpeae**Ordo:** Lecideales**Familia:** Cladoniaceae**Species:** *Cladonia rangiferina*Сл. 21. *Cladonia rangiferina*

Подације усправне, беле до бледо сиве боје при основи, док су горњи делови пурпурносиве боје и светлији када су суви и постају браон на самим врховима. Гранчице снажно повијене у једном смеру, при врху се гранају на четири вршне. Висине од 50 до 120 mm и ширине од 0.8 до 1.8 mm. Пикнидије мале и браон боје. Апотеције ретко присутне, на врховима гранчица, браон боје. Широко распрострањена врста, налази се у виду простирке на земљишту, између маховина. Активна супстанца: atranogin, fumarprotocetraric acid и protocetraric acid (Culberson, 1969).

Cladonia subulata (L.) Weber ex F.H. Wigg.**Classis:** Ascolichenes**Subclassis:** Gymnocarpeae**Ordo:** Lecideales**Familia:** Cladoniaceae**Species:** *Cladonia subulata*Сл. 22. *Cladonia subulata*

Примарни талус сквамuloзан. Сквamuле дугачке од 1 до 4 mm, а широке од 1 до 6 mm. Подеције обилне, висине од 15 до 50 mm, а дебљине од 1.5 до 4 mm, негранате или слабо гранате. Подеције бледо сиве до сивкастозелене боје, при врху се проширују. Апотеције ретке. Пикнидије на врховима шилјатих подеција, овалног до купастог облика. Врста *Cladonia subulata* расте на тресетном земљишту. Активна супстанца: fumarprotocetraric acid (Culberson, 1969).

Lepraria incana (L.) Ach.**Classis:** Deuterolichenes**Species:** *Lepraria incana*Сл. 23. *Lepraria incana*

Талус дифузан, прашкаст, кораст. Боја талуса варира од зеленкастосиве, светло сиве до плавичасте. *Lepraria incana* се може наћи на кори ацидофилних листопадних и четинарских дрвенастих врста. Активна супстанца: divaricatic acid, nordivaricatic acid, zeorin и atranorin (Culberson, 1969).

Melanelixia fuliginosa (Fr. ex Duby) O. Blanco, A. Crespo, Divakar, Essl., D. Hawksw. & Lumbsch

Classis: Ascolichenes

Subclassis: Gymnocarpeae

Ordo: Lecanorales

Familia: Parmeliaceae

Species: *Parmelia glabratula*¹



Сл. 24. *Parmelia glabratula*

Талус фолиозан, пречника од 7 до 10 cm. Режњеви кратки и заобљени, ређе издужени. Горња површина бледо маслинастозелене, браон или тамноцрвенкастобраон боје. Старији делови талуса „пресвучени” густим, баршунастим, цилиндричним до разгранатим изидијама, које остављају беле ожилјке када се уклоне. Апотеције повремено присутне са црвенкастобраон дисковима, до 6 mm пречника. Расте на кори дрвенастих биљака или на силикатним стенама. Активна супстанца: lecanoric acid и skyrin (Culberson, 1969).

Melanelixia glabra (Schaer.) O. Blanco, A. Crespo, Divakar, Essl., D. Hawksw. & Lumbsch

Classis: Ascolichenes

Subclassis: Gymnocarpeae

Ordo: Lecanorales

Familia: Parmeliaceae

Species: *Parmelia glabra*²



Сл. 25. *Parmelia glabra*

Талус листастог типа, прирастао за подлогу или благо издигнут ка периферији, пречника од 11 до 15 cm. Режњеви кратки, округли до благо издужени, глатки или благо наборани. Маслинастозелене до тамнобраон боје, понекад са примесама жућкасте и црвенкасте. Апотеције честе, до 8 mm пречника. Пикнидије честе. Активна супстанца: lecanoric acid (Culberson, 1969).

¹ Хомотипски синоним врсте *Melanelixia fuliginosa*

² Хомотипски синоним врсте *Melanelixia glabra*

Melanelixia subaurifera (Nyl.) O. Blanco, A. Crespo, Divakar, Essl., D. Hawksw. & Lumbsch

Classis: Ascolichenes

Subclassis: Gymnocarpeae

Ordo: Lecanorales

Familia: Parmeliaceae

Species: *Parmelia subaurifera*¹



Сл. 26. *Parmelia subaurifera*

Талус розетаст или неправилан од 5 до 8 cm велики, маслинастозелене до тамнобраон, обојен слично подлози, често сјаји, чврсто прилепљен за супстрат, дубоко урезан. Без соредија, често су присутне изидије и апотеције. Изидије обично груписане у центру талуса, исте боје као и талус. Доња страна у средини црна, на ивицама светлија, сјајна. Расте на кори различитих дрвенастих врста, нарочито на мањим гранама, ређе на стенама. Индикатор чистог ваздуха. Активна супстанца: lecanoric acid (Culberson, 1969).

Peltigera rufescens (Weiss) Humb.

Classis: Ascolichenes

Subclassis: Gymnocarpeae

Ordo: Cyanophilales

Familia: Peltigeraceae

Species: *Peltigera rufescens*



Сл. 27. *Peltigera rufescens*

Талус листастог типа од 5 до 15 cm пречника. Горња површина свежег талуса браон или сивобраон боје, а када је талус сув пепељастосиве је боје, без изидија и соредија. Режњеви глатки и издужени, до 10 mm ширине и дужине до 5 cm, често дихотомо разгранати. Медула бела, са лабаво испреплитаним хифама. Доња површина талуса светлобраон до крем боје. Апотеције често присутне, издужене, налазе се на режњевима. Расте између маховина или на голом тлу.

¹ Хомотипски синоним врсте *Melanelixia subaurifera*

Pertusaria amara (Ach.) Nyl.

Classis: Ascolichenes
Subclassis: Pyrenocarpeae
Ordo: Verrucariales
Familia: Verrucariaceae
Species: *Verrucaria faginea*¹

Сл. 28. *Verrucaria faginea*

Талус сиве боје, корастог типа, често маргинално зониран, захвата обимне површине. Присутне кружно груписане беле соредије. Апотеције ретке. Широко распрострањена врста и уобичајена на кори листопадног дрвећа. Активна супстанца: picrolichenic acid, protocetraric acid и atranorin (Culberson, 1969).

Physcia semipinnata (Leers ex J.F. Gmel.) Moberg

Classis: Ascolichenes
Subclassis: Gymnocarpeae
Ordo: Caloplacales
Familia: Caloplacaceae
Species: *Physcia semipinnata*

Сл. 29. *Physcia semipinnata*

Талус листастог типа, светлосиве боје, са уским и испупченим режњевима, који су ограничени дугим, упадљивим маргиналним цилијама. Соредије сасвим одсутне. Апотеције са дебелим ободом, тамнобраон боје. Расте на кори листопадних дрвенастих врста. Нема идентификованих секундарних метаболита.

¹ Хомотипски синоним врсте *Pertusaria amara*

Platismatia glauca (L.) W.L. Culb. & C.F. Culb.**Classis:** Ascolichenes**Subclassis:** Gymnocarpeae**Ordo:** Lecanorales**Familia:** Parmeliaceae**Species:** *Cetraria glauca*¹Сл. 30. *Cetraria glauca*

Талус листастог типа, крупан, зеленкастоплаве до браон боје, са усправним соредијама или изидијама по ивицама. Соредије првобитно беле и грануларне, понекад постају браон боје. Апотеције ретке. Расте на кори ацидофилних дрвенастих врста. Активна супстанца: atranorin, chloroatranorin и caperatic acid (Culberson, 1969).

Pleurosticta acetabulum (Neck.) Elix & Lumbsch**Classis:** Ascolichenes**Subclassis:** Gymnocarpeae**Ordo:** Lecanorales**Familia:** Parmeliaceae**Species:** *Parmelia acetabulum*²Сл. 31. *Parmelia acetabulum*

Талус розетаст или неправилан, велики до 20 cm, дебео, тврд, кожаст, сивкасте, сивозелене или зеленобраон боје. Режњеви у центру талуса попречно нагужвани. Без соредија и изидија. Апотеције честе. Доња страна црна са ризинијама, а на ивицама знатно светлија са појасом, без ризинија. Живи на кори дрвећа. Индикатор чистог ваздуха. Активна супстанца: atranorin и norstictic acid (Culberson, 1969).

¹ Хомотипски синоним врсте *Platismatia glauca*

² Хомотипски синоним врсте *Pleurosticta acetabulum*

Ramalina fastigiata (Pers.) Ach.**Classis:** Ascolichenes**Subclassis:** Gymnocarpeae**Ordo:** Lecanorales**Familia:** Ramalinaceae**Species:** *Ramalina fastigiata*Сл. 32. *Ramalina fastigiata*

Талус жбунастог типа, зелене (када је влажан) до сиве боје (када је сув). Издигнут или viseћи, веома разграанат. Апотеције су беле и удубљене док су младе, а када су зреле постају равне и испупчене. Гране су равне и прекривене великим бројем рупа и бразда. Аскоспоре су бубрежастог облика, најчешће димензија 10 x 6 μm . *Ramalina fastigiata* је веома осетљива на загађење ваздуха, па је јако добар индикатор чистог ваздуха. Расте на стаблима и гранама дрвенастих врста. Може се наћи и на стенама. Активна супстанца: usnic acid (Culberson, 1969).

Ramalina fraxinea (L.) Ach.**Classis:** Ascolichenes**Subclassis:** Gymnocarpeae**Ordo:** Lecanorales**Familia:** Ramalinaceae**Species:** *Ramalina fraxinea*Сл. 33. *Ramalina fraxinea*

Талус зеленосиве боје, viseћи, у виду гранчица карактеристичног облика. Појединачне гране имају наборан изглед. Апотеције конвексне и налазе се дуж ивица грана или на основи. Индикатор чистог ваздуха. Активна супстанца: usnic acid у кортексу (Culberson, 1969). Нема идентификованих секундарних метаболита.

Екстракција

Екстракти материјала лишаја направљени су у Лабораторији за микологију, Природно-математичког факултета у Крагујевцу. Проучавање биолошке активности изабраних врста лишаја, изведено је на претходно направљеним ацетонским екстрактима.

Припрема ацетонског екстракта изабраних врста лишаја: осушен на собној температури а потом и фино уситњен материјал лишаја (100 g) преливен је са 300ml ацетона у Soxhlet апарату (Kimble Chase) у времену од 4 часа на температури нижој од тачке кључања растварача (56.5°C). Добијени екстракти су филтрирани кроз филтер папир (Whatman No. 1) а затим концентровани под сниженим притиском на ротационом вакуум упаривачу (ИКА) на температури нижој од тачке кључања растварача (Lin et al., 1999; Gulcin et al., 2010).

Изоловање метаболита лишаја

Сирови екстракти који су добијени екстракцијом раздвојени су на танком слоју силика гела TLC (SiO₂-G). Квантитативно одвајање супстанци извршено је препаративном хроматографијом на SiO₂ (плоча 20 x 40 MN-Силика гел P/UV₂₅₄ са CaSO₄, дебљина слоја 1,75 mm), у систему растварача толуен/ диоксан/ сирћетна киселина: 90:25:4. Изоловане супстанце су прекристалисане и поново раздвојене на TLC-у и идентификовани спектроскопском анализом (IC- инфрацрвена спектроскопија, H¹- NMR спектроскопија и MS- масена спектрометрија).

Изоловане супстанце чуване су на -20°C. Раствори различитих концентрација добијени су растварањем у 5% DMSO.

Испитивање антимикробне активности

Тест микроорганизми

Антибактеријска и антифунгална активност изабраних врста лишаја као и њихових изолованих метаболита, испитивана је у односу на пет врста бактерија и 10 врста гљива, који су врло често и узрочници различитих обољења.

Антибактеријска активност испитивана је у односу на грам-позитивне бактерије: *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *B. subtilis* (ATCC 6633) и *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923); и грам-негативне бактерије: *Escherichia coli* (ATCC 25922) и *Proteus mirabilis* (ATCC 12453).

Антифунгална активност испитивана је у односу на следеће врсте гљива: *Aspergillus flavus* (ATCC 9170), *A. niger* (ATCC 16888), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Mucor mucedo* (ATCC 20094), *Trichoderma viride* (ATCC 13233), *Cladosporium cladosporioides* (ATCC 11275), *Fusarium oxysporum* (ATCC 62506), *Alternaria alternata* (ATCC 11680), *Penicillium expansum* (ATCC 20466), *P. chrysogenum* (ATCC 10106).

Култивација микроорганизма

Бактерије које су коришћене за потребе испитивања антибактеријске активности екстраката изабраних врста лишаја и њихових изолованих секундарних метаболита, потичу из Америчке колекције узорака култура (ATCC). Бактеријске културе одржаване су на подлогама Müller Hinton агар и хранљиви агар (Торлак, Београд) на 4°C и субкултивисане петнаестодневно.

Инокулуми су добијени од култура које су инкубиране 24h на 37°C на Muller Hinton агар подлози и дотеране разблаживањем стерилном дестилованом водом према 0.5 McFarland стандарду на приближно 10^8 CFU/ml (таб. 7).

Таб. 7. Карактеристике McFarland Стандарда

McFarland Стандард	0.5	1	2	3	4
1.0% Бариум хлорид (ml)	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4
1.0% Сумпорна киселина (ml)	9.95	9.9	9.8	9.7	9.6
Приближна густина ћелија (1×10^8 CFU/ml)	1.5	3.0	6.0	9.0	12.0
% Трансмисија (на таласној дужини од 600 nm)	74.3	55.6	35.6	26.4	21.5
Апсорбанца (на таласној дужини од 600 nm)	0.132	0.257	0.451	0.582	0.669

Тестиране врсте гљива потичу из Америчке колекције узорака култура (ATCC) и из Микотеке, миколошке лабораторије Департмана за биологију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу. Културе гљива чуване су на кромпир декстрозном (PD) агару и Sabourad dextroze (SD) агару (Торлак, Београд) на 4°C и субкултивисане петнаестодневно.

У току испитивања антифунгалне активности суспензија спора гљива припремана је од 3 до 7 дана старих култура гајених на 27°C на PDA подлози. Густина суспензије спора одређивана је спектрофотометријски на 530 nm. Споре су испиране са стерилном дестилованом водом и разблаживане до приближно 10^6 CFU/ml, по методици препорученој од NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards M 38 - P, 1998).

Одређивање минималне инхибиторне концентрације

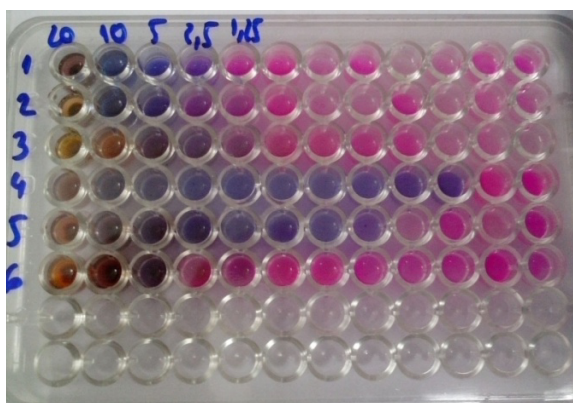
Осетљивост различитих врста микроорганизама према ацетонским екстрактима испитиваних врста лишаја, као и изолованим супстанцама лишаја вршена је одређивањем минималне инхибиторне концентрације (MIC) микродилуционом методом (Sarker et al., 2007). Микродилуциона метода је брза, осетљива, релативно јефтина, поуздана и помоћу ње је могуће утврдити минималне инхибиторне и бактерицидне концентрације антимикуробних агенаса.

У бунарчићима микротитар плоча које су коришћене у експерименту додато је по 100 μ l бујона (Muller Hinton за бактерије и SD за гљиве). У први ред додато је 100 μ l екстракта одређене почетне концентрације и направљена је серија двоструких разблажења. Потом је у све бунарчиће у којима смо испитивали антибактеријску

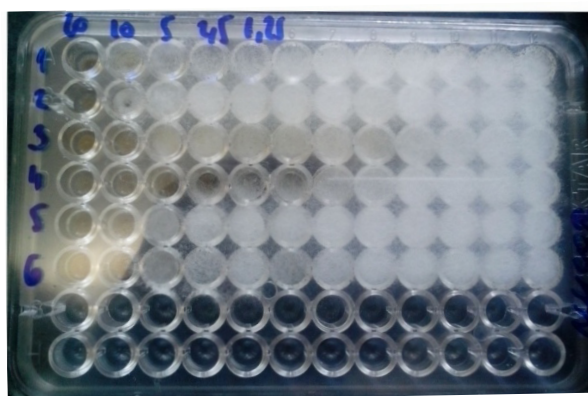
активност и у којима се налази подлога за бактерије, додато 10 μ l раствора ресазурина припремљеног растварањем 270 mg ресазурина у 40 ml стерилне дестиловане воде. На крају у све бунарчиће додато је 10 μ l одговарајућег инокулума. Након инокулације плоче су инкубиране 24 h на 37°C (бактерије), односно 48 h на 27°C (гљиве).

МИС је одређена визуелно на основу константовања раста гљива или променом боје ресазурина, када је у питању праћење раста бактерија, с обзиром да је најнижа концентрација при којој не долази до промене боје ресазурина дефинисана као МИС (сл. 34 и 35). Ресазурин служи као индикатор ћелијског раста који се користи у многим другим тестовима. У оксидованом облику ресазурин је плаве боје и није флуоресцентан нити токсичан, те из тог разлога има велику примену. У присуству ћелијског раста, деловањем ћелијских оксидоредуктаза, редукује се у флуоресцентан резорурфин који је ружичасте боје.

Као позитивна контрола за инхибицију раста бактерија коришћен је антибиотик стрептомицин, а за инхибицију раста гљива антимицотик кетоконазол. Такође је постављена и позитивна контрола која је садржала подлогу са микроорганизмима да би се пратио њихов несметан раст. Упоредо са тим, постављена је и негативна контрола на утицај растварача.



Сл. 34. Микродилуциони метод- изглед микротитар плоче након инкубације (бактерије)



Сл. 35. Микродилуциони метод- изглед микротитар плоче након инкубације (гљиве)

Испитивање антиоксидативне активности

Инхибиција DPPH радикала

Антиоксидативна активност лишајних екстраката одређена је модификованим (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazil) DPPH тестом (Ibanez et al., 2003; Dorman et al., 2004). Смеша метанолног раствора DPPH радикала концентрације 0.05 mg/ml и лишајних екстраката у односу 2 ml : 1 ml, инкубирана је на собној температури, у мраку, 30 минута. Након инкубације мерена је апсорбанца на 517 nm на спектрофотометру ("Jenway" UK). Као позитивна контрола коришћена је аскорбинска киселина (ascorbic acid).

Капацитет неутралисања слободних радикала израчунат је по следећој формули:

$$\text{Капацитет неутралисања DPPH радикала (\%)} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

где је A_0 апсорбанца негативне контроле и A_1 апсорбанца реакционе смеше или стандарда.

Редукциони капацитет екстраката

Редукциони капацитет екстраката одређен је по методи Ouyazu (1986).

Екстракт лишаја (1 ml) помешан је са фосфатним пуфером (2.5 ml, 0.2M, pH 6.6) и калијум ферицианидом (2.5 ml, 1%). Потом, смеша је инкубирана 20 минута на 50°C а затим је додато 2.5 ml 10% раствора трихлорсирћетне киселине. Након центрифугирања, супернатант (2.5 ml) је помешан са дестилованом водом (2.5 ml) и 0.1% раствором гвожђе (III) хлорида (0.5 ml). Апсорбанца је мерена на 700 nm на спектрофотометру.

Као позитивне контроле коришћени су аскорбинска киселина, ВНА и α -tocopherol.

Одређивање укупних полифенолних једињења у екстрактима

Укупан садржај фенола у екстрактима одређен је са Folin-Ciocalteu reagensom по методи Slinkard and Singleton (1997).

Реакциона смеша припремљена је мешањем 1 ml екстракта, 46 ml дестиловане воде, 1ml Folin-Ciocalteu реагенса и 3 ml 2% раствора натријум карбоната. Након 2 h инкубације измерене су апсорбанце спектрофотометријски на 760 nm. Једначина стандардне криве је одређена мерењем апсорбанце серије концентрација pyrocatechol (од 0.1 до 0.02 mg/ml).

Укупан садржај фенолних компоненти у екстрактима изражен је као μg pyrocatechol еквивалент (PE) /mg екстракта

$$\text{Апсорбанца} = -0.064 \times \text{укупни феноли } [\mu\text{g (PE)/mg екстракта}] + 0.031, (R^2 = 0.489)$$

Одређивање укупних флавоноида у екстрактима

Садржај укупних флавоноида у екстрактима одређен је спектрофотометријском методом са алуминијум хлоридом која се базира на стварању комплекса флавоид-алуминијум (Meda et al., 2005).

У 2 ml 2% метанолног раствора алуминијум (III) хлорида додата је иста запремина екстракта. После инкубације на собној температури у трајању од 10 минута, мерена је апсорбанца реакционе смеше у односу на негативну контролу на 415 nm. На основу измерених апсорбанци, са калибрационе криве стандардног раствора рутина прочитана је концентрација (μg) укупних флавоноида, а затим је садржај укупних флавоноида у екстракту изражен као μg еквивалента рутина (RE)/mg екстракта.

$$\text{Апсорбанца} = 2.849 \times \text{укупни флавоноиди } [\mu\text{g (RE)/mg екстракта}] + 0.469, (R^2 = 0.955)$$

Испитивање антиканцерогене активности**Ћелијске линије**

Антиканцерогена активност екстраката изабраних врста лишаја, као и њихових изолованих супстанци испитивана је на циљним ћелијским линијама: ћелије епителијалног карцинома цервикса (HeLa ћелије), ћелије хуманог карцинома плућа (A549), ћелије хуманог карцинома колона (LS174).

Све поменуте ћелијске линије добијене су од American Type Culture Collection (Manasas, VA, Сједињене Америчке Државе).

Третман ћелијских линија

Циљне ћелијске линије култивисане су у виду монослоја у хранљивом медијуму RPMI 1640, pH 7.2, са 10% инактивисаним серумом говечета (FBS), L-глутамином, тако да финална концентрација буде 3Mm и антибиотцима, на 37°C у атмосфери ваздуха обогаћеним 5% CO₂ и засићеним воденом паром.

Испитивани екстракти и изолована једињења растворени су у DMSO-у до шток концентрације од 100 µg/ml. Шток раствор испитиваних екстраката и једињења растворен је у одговарајућем медијуму до потребних радних концентрација. Неопластичне HeLa ћелије (5000 ћелија по бунарчићу), A549 ћелије (5000 ћелија по бунарчићу) и LS174 ћелијама (5000 ћелија по бунарчићу) су засејане на 96-коморне микротитарске плоче, а 24 h касније, након адхеренције ћелија, пет различитих, душло разблажен концентрација испитиваних екстраката се додају у бунарчиће. Финалне концентрације екстраката примењене на циљне малигне ћелије биле су: 200, 100, 50, 25 и 12.5 µg/ml, осим у контролним бунарчићима у којима је додат само хранљиви медијум. Културе су инкубиране наредних 72 h.

Одређивање ћелијског преживљавања (MTT тест)

Ефекат испитиваних узорака на преживљавање ћелија канцера одређен је 72 h након додавања екстраката или изолованих компонената, помоћу MTT теста (Microculture tetrazolium test), коришћењем методе Mosman-a, (1983). У сваки бунарчић додато је по 20 µl MTT раствора (5 mg/ml PBS) и инкубиран још 4 h на 37°C у 5% CO₂. Након тога, додато је 100 µl раствора 10% natrium dodecilsulfat-a (SDS) ради растварања кристала формазана формираних од MTT-а, након конверзије митохондријалних дехидрогеназа вијабилних ћелија. Апсорбанце сразмерно броју вијабилних ћелија, мерене су на microplate читачу (Multiskan EX, Thermo Scientific, Finland), на 570 nm.

За статистичку обраду података добијених експерименталним истраживањем, коришћени су програми Microsoft Excel v. 2007. Origin 7.0. (OriginLab Corporation, Northampton, USA, 1991-2002). Статистичка значајност утврђена је ANOVA тестом, где је статистички значајна разлика утврђена на нивоу грешке од 5% (p > 0.05).

4. РЕЗУЛТАТИ

Анализом проучаваних лишаја у истраживаним подручјима регистровано је присуство 88 таксона лишаја, представника 34 рода (таб. 8).

Утврђено је присуство 14 врста териколних, седам врста саксиколних и 67 врста епифитних лишаја од којих 26 врста има кораст тип талуса, 34 врсте листаст, док седам врста има жбунаст тип талуса.

Преглед константованих лишаја

Таб. 8. Листа таксона и тип талуса лишаја нађених на истраживаном подручју

Таксон	Тип талуса		
	епифитни	териколни	саксиколни
<i>Anaptychia ciliaris</i> (L.) Körb. ex A. Massal.	+ листаст		
<i>Buelia punctata</i> (Hoffm.) Massal	+ кораст		
<i>Caloplaca cerina</i> (Ehrh. ex Hedw) Th. Fr.	+ кораст		
<i>Candelaria concolor</i> (Diskson) Stein	+ кораст		
<i>Candelariella aurella</i> (Hoffm.) Zahlbr.	+ кораст		
<i>Candelariella vitellina</i> (Hoffm.) Müll. Arg.	+ кораст		
<i>Candelariella xanthostigma</i> (Ach.) Lettau	+ кораст		
<i>Cetraria islandica</i> (L.) Ach.		+	
<i>Cladonia coniocraea</i> (Flörke) Spreng.		+	
<i>Cladonia convoluta</i> (Lam.) Anders		+	
<i>Cladonia fimbriata</i> (L.) Fr.		+	
<i>Cladonia foliacea</i> (Huds.) Willd.		+	
<i>Cladonia furcata</i> (Huds.) Schrad.		+	
<i>Cladonia ramulosa</i> (With.) J.R. Laundon		+	
<i>Cladonia rangiferina</i> (L.) Weber ex F.H. Wigg.		+	
<i>Cladonia rangiformis</i> Hoffm.		+	

Таб. 8 (наставак). Листа таксона и тип талуса лишаја нађених на истраживаном подручју

Таксон	Тип талуса		
	епифитни	териколни	саксиколни
<i>Cladonia pyxidata</i> (L.) Hoffm.		+	
<i>Cladonia subulata</i> (L.) Weber ex F.H. Wigg.		+	
<i>Evernia prunastri</i> (L.) Ach.	+ листаста		
<i>Flavoparmelia caperata</i> (L.) Hale	+ листаста		
<i>Graphis elegans</i> (Borrer ex Sm.) Ach.	+ кораста		
<i>Graphis scripta</i> (L.) Ach.	+ кораста		
<i>Hypogymnia physodes</i> (L.) Nyl.	+ листаста		
<i>Hypogymnia tubulosa</i> (Schaerer) Havaas	+ листаста		
<i>Lecanora allophana</i> (Ach.) Nyl.	+ кораста		
<i>Lecanora argentata</i> (Ach.) Malme	+ кораста		
<i>Lecanora atra</i> (Huds.) Ach.			+
<i>Lecanora carpinea</i> (L.) Vain	+ кораста		
<i>Lecanora chlarotera</i> Nyl.	+ кораста		
<i>Lecanora confusa</i> Almb.	+ кораста		
<i>Lecanora conizaeoides</i> Nyl. ex Cromb.	+ кораста		
<i>Lecanora expallens</i> Ach.	+ кораста		
<i>Lecanora glabrata</i> (Ach.) Malme	+ кораста		
<i>Lecanora intumescens</i> (Rebent.) Rabenh.	+ кораста		
<i>Lecanora muralis</i> (Schreb.) Rabenh.			+

Таб. 8 (наставак). Листа таксона и тип талуса лишаја нађених на истраживаном подручју

Таксон	Тип талуса		
	епифитни	териколни	саксиколни
<i>Lecanora pulicaris</i> (Pers.) Ach.	+ корасти		
<i>Lecidella carpathica</i> Körb.			+
<i>Lecidella elaeochroma</i> (Ach.) Choisy	+ корасти		
<i>Lepraria aeruginosa</i> (F.H. Wigg.) Sm.			+
<i>Lepraria incana</i> (L.) Ach.	+ корасти		
<i>Melanohalea elegantula</i> (Zahlbr.) O. Blanco, A. Crespo, Divakar, Essl., D. Hawksw. & Lumbsch	+ листаста		
<i>Melanohalea exasperata</i> (De Not.) O. Blanco, A. Crespo, Divakar, Essl., D. Hawksw. & Lumbsch	+ листаста		
<i>Melanohalea exasperatula</i> (Nyl.) O. Blanco, A. Crespo, Divakar, Essl., D. Hawksw. & Lumbsch	+ листаста		
<i>Melanohalea olivacea</i> (L.) O. Blanco, A. Crespo, Divakar, Essl., D. Hawksw. & Lumbsch	+ листаста		
<i>Melanelixia fuliginosa</i> (Fr. ex Duby) O. Blanco, A. Crespo, Divakar, Essl., D. Hawksw. & Lumbsch	+ листаста		
<i>Melanelixia glabra</i> (Schaer.) O. Blanco, A. Crespo, Divakar, Essl., D. Hawksw. & Lumbsch	+ листаста		
<i>Melanelixia subaurifera</i> (Nyl.) O. Blanco, A. Crespo, Divakar, Essl., D. Hawksw. & Lumbsch	+ листаста		
<i>Melanelixia subargentifera</i> (Nyl.) O. Blanco, A. Crespo, Divakar, Essl., D. Hawksw. & Lumbsch	+ листаста		
<i>Ochrolechia pallescens</i> (L.) Massal.	+ корасти		
<i>Parmelia saxatilis</i> (L.) Ach.	+ листаста		
<i>Parmelia sulcata</i> Taylor	+ листаста		

Таб. 8 (наставак). Листа таксона и тип талуса лишаја нађених на истраживаном подручју

Таксон	Тип талуса		
	епифитни	териколни	саксиколни
<i>Parmelia tiliacea</i> (Hoffm.) Hale	+ листаста		
<i>Parmelina pastilifera</i> (Harm.) Hale	+ листаста		
<i>Parmelina quercina</i> (Willd.) Hale	+ листаста		
<i>Parmeliopsis ambigua</i> (Wulfen) Nyl.	+ листаста		
<i>Peltigera canina</i> (L.) Willd.		+	
<i>Peltigera collina</i> (Ach.) Schrad.		+	
<i>Peltigera rufescens</i> (Weiss) Humb.		+	
<i>Pertusaria albescens</i> (Huds.) M. Choisy & Werner	+ кораста		
<i>Pertusaria amara</i> (Ach.) Nyl.	+ кораста		
<i>Pertusaria pertusa</i> (L.) Tuck.	+ кораста		
<i>Phaeophyscia orbicularis</i> (Neck.) Moberg	+ листаста		
<i>Physcia adscendens</i> (Fr.) H. Olivier	+ листаста		
<i>Physcia aipolia</i> (Ehrh. ex Humb.) Fűrnr.	+ листаста		
<i>Physcia caesia</i> (Hoffm.) Hampe ex Fűrnr.	+ листаста		
<i>Physcia clementei</i> (Turner) Lyngø	+ листаста		
<i>Physcia semipinnata</i> (Leers ex J.F. Gmel.) Moberg	+ листаста		
<i>Physcia stellaris</i> (L.) Nyl.	+ листаста		
<i>Physcia tenella</i> (Scop.) DC.	+ листаста		
<i>Physconia detersa</i> (Nyl.) Poelt	+ листаста		

Таб. 8 (наставак). Листа таксона и тип талуса лишаја нађених на истраживаном подручју

Таксон	Тип талуса		
	еписитни	териколни	саксиколни
<i>Physconia distorta</i> (With.) J.R. Laundon	+ листаста		
<i>Physconia enteroxantha</i> (Nyl.) Poelt	+ листаста		
<i>Physconia grisea</i> (Lam.) Poelt	+ листаста		
<i>Platismatia glauca</i> (L.) W.L. Culb. & C.F. Culb.	+ листаста		
<i>Pleurosticta acetabulum</i> (Neck.) Elix & Lumbsch	+ листаста		
<i>Pseudevernia furfuracea</i> (L.) Zopf	+ жбунаста		
<i>Ramalina canariensis</i> J. Steiner	+ жбунаста		
<i>Ramalina farinacea</i> (L.) Ach.	+ жбунаста		
<i>Ramalina fastigiata</i> (Pers.) Ach.	+ жбунаста		
<i>Ramalina fraxinea</i> (L.) Ach.	+ жбунаста		
<i>Rhizocarpon geographicum</i> (L.) DC.			+
<i>Rinodina colobina</i> (Ach.) Th.Fr.	+ корасти		
<i>Rinodina pyrina</i> (Ach.) Arnold	+ корасти		
<i>Usnea hirta</i> (L.) Weber ex F.H. Wigg.	+ жбунаста		
<i>Usnea subfloridana</i> Stirt.	+ жбунаста		
<i>Xanthoparmelia conspersa</i> (Ehrh. ex Ach.) Ach.			+
<i>Xanthoparmelia somloënsis</i> (Gyeln.) Hale			+
<i>Xanthoria parietina</i> (L.) Beltr.	+ листаста		

Супстрат на коме је евидентирано присуство епифитних врста лишаја чиниле су најчешће листопадне дрвенасте биљне врсте. Све териколне врсте лишаја у истраживаним подручјима константоване су на земљишту углавном обраслом маховинама, док су саксиколне врсте уочене на силикатним стенама.

Испитивањем лишаја у Луковској бањи утврђено је присуство 76 врста из 34 рода (**таб. 9-прилог**).

Карактеристично је присуство 59 епифитних врста (21 врста са корастим, 32 врсте са листовитим и шест врста са жбунастим типом талуса), 14 териколних врста као и три врсте саксиколних лишаја.

Најфреквентније врсте (100%) биле су: *Hypogymnia physodes*, *Parmelia sulcata* и *Physcia adscendens*, присутне на свим истраживаним тачкама у Луковској бањи. Све врсте које су окарактерисане као најфреквентније одликују се листовитим типом талуса. Забележена је и висока вредност фреквенције врсте *Melanelixia subaurifera* (93.33%), чије је присуство забележено на укупно 14 истраживаних тачака. Најнижу фреквенцију (6.67%) имале су следеће врсте: *Cetraria islandica*, *Cladonia ramulosa*, *C. rangiferina*, *Graphis elegans*, *Lecanora expallens*, *L. glabrata*, *Lecidella carpathica*, *Melanohalea olivacea*, *Peltigera collina*, *Pertusaria pertusa*, *Physcia clementei* и *Rinodina colobina*.

Подлога на којој је евидентирано присуство епифитних лишаја и са које су прикупљени узорци изабраних врста лишаја ради детаљније детерминације, била је најчешће кора дрвенастих биљака врста: *Quercus frainetto* Ten., *Q. cerris* L., *Juglans regia* L., *Malus domestica* Borkh., *Prunus domestica* L., *Pyrus communis* L. и *Fagus moesiaca* (K.Malý) Czeccott.

На истраживаним тачкама у Куршумлијској бањи било је присутно 65 врста из 32 рода (**таб. 10-прилог**).

На овом истраживаном подручју доминирали су епифитни лишаји укупно 52 врсте и то: 28 врста са листовитим типом талуса, 17 врста са корастим и седам врста са жбунастим талусом. Поред епифитних, забележено је и присуство 11 териколних, као и две саксиколне врсте лишаја. Најфреквентније врсте (100%) биле су: *Evernia prunastri*, *Flavoparmelia caperata*, *Hypogymnia physodes*, *Lecidella elaeochroma*, *Melanelixia subaurifera*, *Parmelia sulcata*, *Phaeophyscia orbicularis*, *Physcia aipolia*, *P. tenella*, *Physconia grisea* и *Pseudevernia furfuracea*. Следеће врсте имале су, такође, изузетно високу фреквенцију (93.33%): *Hypogymnia tubulosa*, *Lecanora intumescens*, *Physcia adscendens*, *Usnea hirta* и *Xanthoria parietina*. Насупрот томе, утврђено је да су на подручју Куршумлијске бање следеће врсте имале најнижу фреквенцију (6.67%): *Candelaria concolor*, *Cladonia ramulosa*, *C. pyxidata*, *Lecanora chlorotera*, *Parmelina quercina*, *Pleurosticta acetabulum* и *Ramalina canariensis*.

Дрвенасте биљне врсте на којима је регистровано присуство епифитних врста лишаја биле су: *Quercus cerris* L., *Juglans regia* L., *Prunus domestica* L., *Malus domestica* Borkh., *Tilia platyphyllos* L., *Acer campestre* L., *Populus deltoides* Marschall. и *Robinia pseudoacacia* L.

На подручју Пролом бање забележено је присуство 72 врсте лишаја из 33 рода (**таб. 11-прилог**). Пронађено је 57 врста епифитних лишаја- 20 врста са корастим талусом, 31 врста са листовитим и шест врста са жбунастим типом талуса. Забележено је и присуство 10 врста териколних и пет врста саксиколних лишаја. Најфреквентније врсте (100%) биле су: *Hypogymnia physodes*, *Lecidella elaeochroma*, *Parmelia sulcata*, *Phaeophyscia orbicularis*, *Physcia adscendens* и *P. stellaris*, чије је присуство забележено на свим истраживаним

тачкама у Пролом бањи. Такође, изузетно високу фреквенцију (93.33%) имале су врсте: *Flavopermelia caperata*, *Hypogymnia tubulosa*, *Melanelixia subaurifera* и *Xanthoria parietina*. У Пролом бањи утврђено је и присуство појединих врста које имају изузетно ниску фреквенцију (6.67%): *Lecanora confusa*, *L. glabrata*, *M. subargentifera*, *Parmelia conspersa*, *Parmelina quercina*, *Physconia detersa*, *P. distorta*, *Rhizocarpon geographicum* и *Rinodina colobina*.

Подлога на којој је евидентирано присуство лишaja и са које су сакупљани узорци појединих врста била је најчешће кора дрвенастих врста биљака: *Quercus frainetto* Ten., *Q. cerris* L., *Prunus domestica* L., *Robinia pseudoacacia* L. и *Juglans regia* L.

Анализом састава лишaja Радан планине утврђено је присуство 76 лишaja из 34 рода (**таб. 12-прилог**). Епифитни листасте лишaji били су најбројнији. Од 59 врста епифитних лишaja 31 врста има листасте талус, 22 кораст и шест врста жбунасти. На овом подручју забележено је присуство 12 териколних врста и пет врста саксиколних лишaja.

Највиши проценат фреквенције (100%) забележен је код врста: *Parmelia sulcata*, *Phaeophyscia orbicularis* и *Physcia adscendens*. Фреквенцију 93.33% имале су: *Evernia prunastri*, *Hypogymnia physodes* и *Melanelixia subaurifera*. Најнижу фреквенцију (6.67%) имале су следеће врсте лишaja: *Caloplaca cerina*, *Candelariella vitellina*, *Cladonia rangiferina*, *Lecanora confusa*, *L. glabrata*, *M. subargentifera*, *Parmelina quercina*, *Pertusaria pertusa*, *Physconia detersa*, *Rinodina colobina* и *R. pyrina*.

Радан планина одликује се веома добро развијеном вегетацијом. Супстрат на коме је примећено присуство лишaja чиниле су најчешће дрвенасте биљне врсте: *Quercus frainetto* Ten., *Q. cerris* L., *Q. petraea* (Mattuschka) Liebl., *Fagus moesiaca* (K.Maly) Czecczott., *Carpinus betulus* L. и *Populus tremula* L.

У Куршумлији је забележено присуство 42 врсте лишaja из 23 рода (**таб. 13-прилог**). Епифитне врсте биле су најбројније. Од укупно 40 епифитних врста 25 су са листастим типом талуса, 12 са корастим, а само три врсте са жбунастим типом талуса. Забележено је и присуство две саксиколне врсте лишaja. Најфреквентније врсте (100%) биле су *Hypogymnia physodes* и *Physcia adscendens* чије је присуство константовано на свим истраживаним тачкама. Високу фреквенцију (93.33%) имале су врсте *Parmelia sulcata* и *Xanthoria parietina*. Међу најчесталијим су врсте са листастим типом талуса. Најнижу фреквенцију (6.67%) имале су врсте *Lepraria aeruginosa* и *Xanthoparmelia somloënsis*.

Дрвенасте врсте на којима су нађени лишaji биле су углавном: *Acer campestre* L., *Cornus mas* L., *Juglans regia* L., *Malus domestica* Borkh., *Robinia pseudoacacia* L., *Tilia platyphyllos* Scop.

Обрадом добијених података израчунате су IAP вредности које су варирале од 10 до 75 (**таб. 9-13-прилог**).

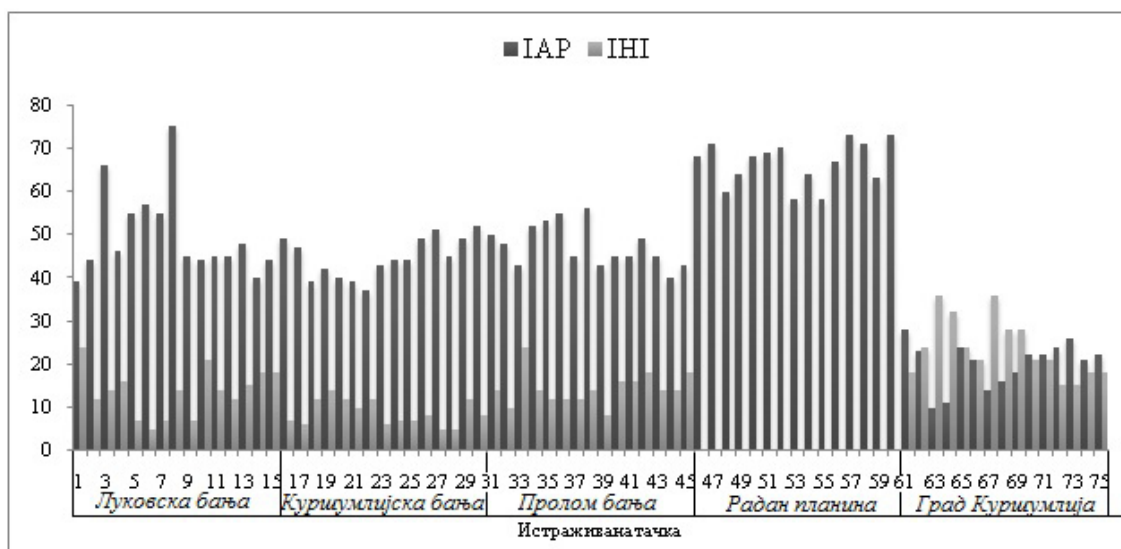
Израчунате вредности IAP за истраживано подручје Луковске бање кретале су се од 39 до 75 (**таб. 9-прилог**). Вредности IAP на истраживаним тачкама у Куршумлијској бањи варирале су од 37 до 52 (**таб. 10-прилог**). За истраживано подручје Пролом бање опсег варирања вредности IAP био је од 40 до 56 (**таб. 11-прилог**). Вредности IAP на истраживаном подручју Радан планине биле су изузетно високе и кретале су се од 58 до 73 (**таб. 12-прилог**). Вредности IAP на истраживаном подручју града Куршумлије варирале су од 10 до 28 (**таб. 13-прилог**).

Вредности ИИ варирале су од 5 до 36. За истраживано подручје Луковске бање ИИ вредности су се кретале од 5 до 24. Најнижа ИИ вредност израчуната је на тачки 6, док је

највиша ИИ вредност израчуната на тачки 1. Израчунате вредности ИИ за подручје Куршумлијске бање крећу се од 5 до 14. Вредности ИИ у Пролом бањи кретале су се од 8 до 24. Најнижа вредност израчуната је на тачки 39, док је највиша вредност израчуната на тачки 33. За подручје Радан планине нису рачунате вредности ИИ, с обзиром да се ради о веома ретко насељеном подручју, природном екосистему на коме не можемо мерити ниво урбанизације, интензитет саобраћаја и локални развој. Вредности ИИ су, очекивано, највеће у Куршумлији, урбаном екосистему. Кретале су се од 15 колико је израчунато на тачкама 72 и 73, до 36 колико је израчунато на тачкама 63 и 67 (таб. 14-прилог).

На различитим истраживаним тачкама константовано је присуство различитог броја и састава таксона, па је сходно томе приметно варирање вредности IAP. ИИ вредности на различитим истраживаним тачкама, такође су се разликовале у зависности од вредности општих параметара животне средине: степена урбанизације, интензитета саобраћаја, локалног развоја и експозиције.

На основу компаративне анализе варирања вредности IAP и ИИ на различитим истраживаним тачкама приметно је да су ове вредности обрнуто пропорционалне. Истраживане тачке на којима су израчунате високе IAP вредности одликовале су се ниским ИИ вредностима и обрнуто. Највише IAP вредности забележене су на истраживаним тачкама на Радан планини, међутим за ово подручје нису рачунате вредности ИИ, па није могуће урадити поређење. Резултати компаративне анализе јасно приказују да су највише ИИ вредности забележене на истраживаним тачкама у Куршумлији. Уједно на овим тачкама израчунате IAP вредности су најниже. Идентични резултати компаративне анализе добијени су и за остала истраживана подручја (сл. 37).



Сл. 37. Компаративна анализа варирања вредности IAP и ИИ на различитим истраживаним тачкама

Картирање истраживаних тачака и дефинисање зона индикације квалитета ваздуха

Распоредом истраживаних тачака на основу вредности IAP на карти истраживаних подручја добијене су контуре граница и општа карта простирања зона индикације различитог степена квалитета ваздуха свих истраживаних подручја (сл. 38). На општој

карти индикације квалитета ваздуха приказана су сва истраживана подручја са циљем визуелне компарације стања квалитета ваздуха на различитим подручјима. Запажа се присуство три основне зоне индикације квалитета ваздуха – „Нормална зона”, зона „борбе” и зона „лишајске пустиње”.

➤ „Нормална зона” је приказана различитим нијансама светлије зелене и тамнозелено-плаве боје, на основу скале са вредностима IAP (сл. 38). Одликује се slabим или врло slabим загађењем. Ова зона окарактерисана је вредностима $IAP > 37.5$ (таб. 4). „Нормална зона” је присутна на читавом истраживаном подручју Радан планине, Луковске бање и Пролом бање и на већем делу површине истраживаног подручја Куршумлијске бање. Све истраживане тачке на подручју Радан планине имале су изузетно високе IAP вредности које су се кретале од 58 до 73 (таб. 12-прилог), због чега је ово подручје обележено различитим нијансама плаве боје што указује да је загађење врло слабо и да цело подручје припада „нормалној зони” индикације квалитета ваздуха. „Нормална зона” на подручју Луковске бање обухватила је истраживане тачке које се одликују вредностима IAP од 39 до 75 (таб. 9-прилог). На општој карти индикације квалитета ваздуха види се да се читаво истраживано подручје Луковске бање налази у „нормалној зони” која је обележена различитим нијансама плаве боје – североисточни део истраживаног подручја на коме се налазе тачке чије су вредности $IAP > 50$ и зелене боје – већи део површине подручја на коме се налазе истраживане тачке које се одликују вредностима $37.5 \leq IAP \leq 50$ (сл. 38). Вредности IAP на истраживаним тачкама у Пролом бањи варирале су од 40 до 56 (таб. 11-прилог). На општој карти индикације квалитета ваздуха види се да је „нормална зона” обухватила подручје Пролом бање обележено нијансама плаве боје – југоисточни део истраживаног подручја на коме се налазе тачке чије су вредности $IAP > 50$ и зелене боје – већи део површине истраживаног подручја на коме се налазе тачке које се одликују вредностима $37.5 \leq IAP \leq 50$ (сл. 38). Вредности IAP на истраживаним тачкама у Куршумлијској бањи варирале су од 37 до 52 (таб. 10-прилог). „Нормална зона” у Куршумлијској бањи обухватила је део површине истраживаног подручја обележен тамнозеленим нијансама – југоисточни део подручја на коме се налазе истраживане тачке чије су вредности $IAP > 50$ и светлозеленим нијансама – већи део површине истраживаног подручја на коме се налазе истраживане тачке које се одликују вредностима $37.5 \leq IAP \leq 50$ (сл. 38).

➤ Зона „борбе” је приказана различитим нијансама наранџасте и наранџасто-жуте боје (сл. 38). Одликује се високим или умереним степеном загађења (таб. 4). Ова зона окарактерисана је вредностима $12.5 \leq IAP \leq 37.5$ и обухватила је мањи део површине истраживаног подручја Куршумлијске бање и готово цело истраживано подручје града Куршумлије. На слици се види да је зона „борбе” обухватила централни део истраживаног подручја Куршумлијске бање обележен жутом бојом, на коме се налазе истраживане тачке које се одликују вредностима $25 \leq IAP \leq 37.5$. На општој карти индикације квалитета ваздуха види се да је зона „борбе” у Куршумлији обухватила периферне делове града обележене нијансама светлонанџасте боје – мањи, углавном периферни део истраживаног подручја на коме се налазе истраживане тачке које се одликују вредностима $25 \leq IAP \leq 37.5$ и тамнонаранџасте боје – већи део површине подручја на коме се налазе истраживане тачке чије су вредности $12.5 \leq IAP \leq 25$ (сл. 38).

➤ „Лишајска пустиња” на општој карти је приказана нијансама изразито црвене боје (сл. 38). Зона „лишајске пустиње” према скали процене квалитета ваздуха одликује се екстремно високим и врло високим загађењем (таб. 4). У овом раду нису добијене IAP

вредности које указују на екстремно висок степен загађења. Зону „лишајске пустиње” карактеришу вредности $0 < IAP \leq 12.5$. Ова зона је присутна само на истраживаном подручју ужег центра града Куршумлије (сл. 38).

Детаљнијом анализом сваког истраживаног подручја добијене су карте на којима је приказана просторна дистрибуција истраживаних тачака и прецизнија подела основних зона на подзоне на основу различитих вредности IAP (сл. 39-43). Наиме, приказане основне зоне индикације квалитета ваздуха нису монолитне већ су диференциране на подзоне како би се добила прецизнија слика индикације квалитета ваздуха коришћењем лишаја као биоиндикатора.

На општој карти приказано је да цело истраживано подручје Луковске бање припада „нормалној зони” индикације квалитета ваздуха (сл. 38). „Нормална зона” (А) на истраживаном подручју Луковске бање је рашчлањена на три подзоне (A_1 , A_2 и A_3) односно три дела „нормалне зоне” на основу дистрибуције тачака са различитим вредностима IAP (сл. 39). Прву подзону (A_1) карактерише девет истраживаних тачака (тачке 1, 4, 9, 10, 11, 12, 13, 14 и 15) на југозападном делу истраживаног подручја и једна истраживана тачка (тачка 2) у североисточном делу подручја. Ова подзона има дисконтинуални облик. Вредности IAP на овим истраживаним тачкама кретале су се од 39 (истраживана тачка 1) до 48 (тачка 13). Следећа формирана подзона (A_2) у Луковској бањи карактерише се са две истраживане тачке (тачке 5 и 7) и захвата југозападни део подручја. На истраживаним тачкама вредности IAP=55. Трећа формирана подзона (A_3) карактерише се присуством три истраживане тачке (тачке 3, 8 и 6). Обухвата периферне, углавном североисточне делове подручја. Ни ова подзона нема континуалан облик, већ се њени фрагменти налазе на северозападном делу подручја. Ова подзона одликује се вредностима IAP од 57 до 75 (сл. 39).

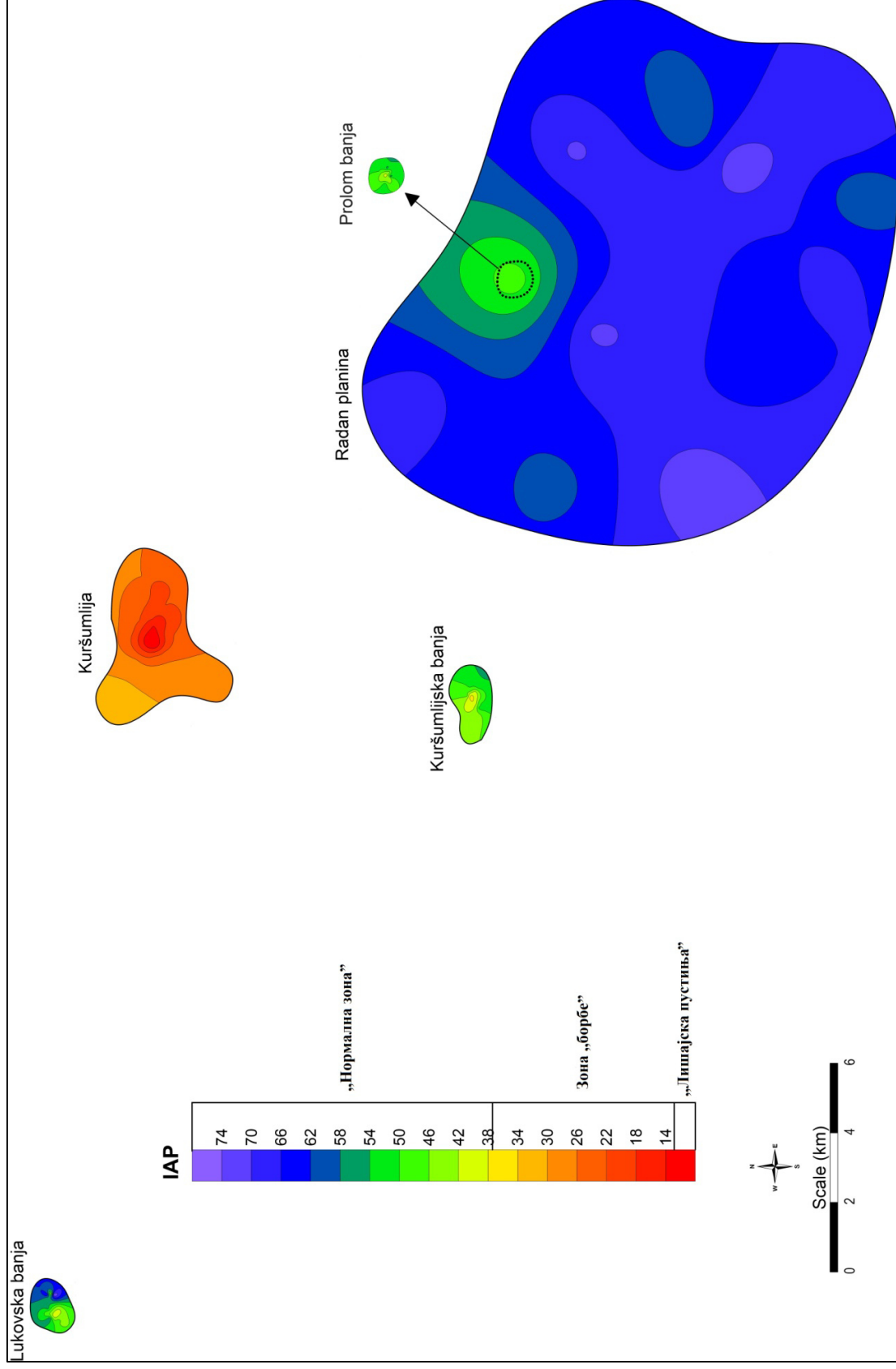
На општој карти приказано је да се већи, углавном југоисточни део истраживаног подручја Куршумлијске бање налази у „нормалној зони”, док се мањи, централни део подручја налази у зони „борбе” (сл. 38). Прецизнија слика распореда зона индикације квалитета ваздуха на истраживаном подручју Куршумлијске бање указује да је и на овом подручју дошло до поделе на подзоне и на тај начин појаве нијансираности (сл. 40). Зона „борбе” (В) се одликује само једном истраживаном тачком (тачка 22) чија је вредност IAP=37. „Нормална зона” (А) у Куршумлијској бањи веома је пространа и подељена на три подзоне – A_1 , A_2 и A_3 . Прва подзона (A_1) „нормалне зоне” обухвата централни и северозападни део подручја. Карактеришу је тачке 18, 19, 20, 21, 23, 24 и 25 које имају нешто ниже вредности IAP (од 39 до 44) у односу на остале подзоне у Куршумлијској бањи. Друга подзона (A_2) „нормалне зоне” обухвата североисточне и југозападне делове подручја. Карактеришу је тачке 16, 17, 28, 26 и 29, чије се вредности IAP крећу од 45 до 49. Трећа подзона (A_3) обухвата углавном југоисточни део подручја. Сачињавају је истраживана тачка 27 (IAP =51) и тачка 30 (IAP =52) (сл. 40).

Истраживано подручје Пролом бање налази се у „нормалној зони” индикације квалитета ваздуха (сл. 38). Детаљнијим приказом истраживаног подручја учачамо поделу „нормалне зоне” на три подзоне- A_1 , A_2 и A_3 (сл. 41). Прва подзона (A_1) карактерише се тачкама 33, 37, 39, 40, 41, 43, 44, 45 које се одликују најнижим вредностима IAP (од 40 до 45) у односу на остале истраживане тачке овог подручја. Друга подзона (A_2) одликује се тачкама 31, 32 и 42, чије вредности IAP варирају од 48 до 50. Трећа формирана подзона (A_3) је окарактерисана је са пет истраживаних тачака- 34, 35, 36, 38 и 52. Обухвата углавном југоисточни део подручја и дисконтинуалног је облика, па се њени фрагменти

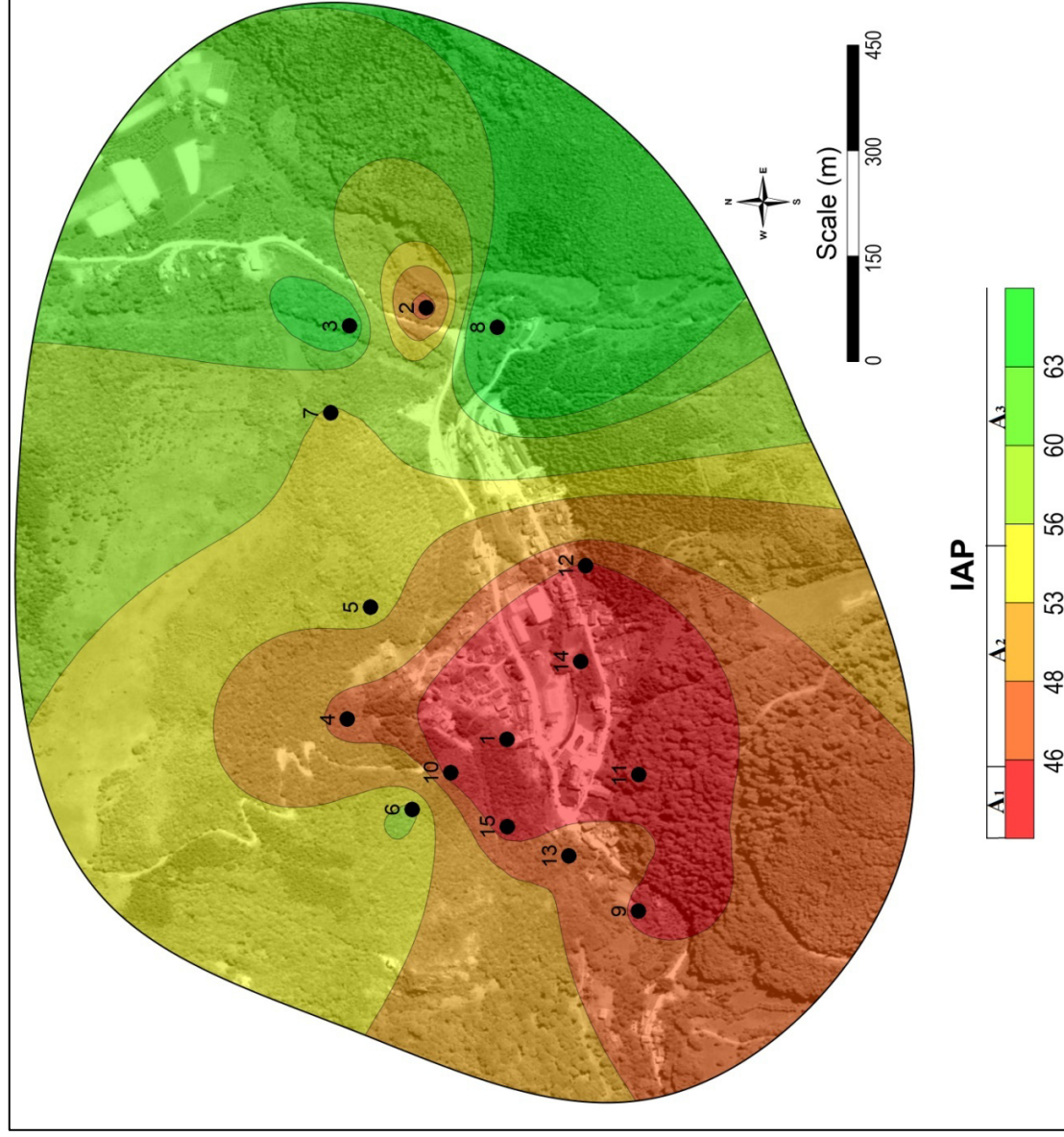
налазе на северозападу (тачка 34). Вредности IAP тачака које се налазе у овој подзони варирају од 52 до 56 (сл. 41).

Читаво истраживано подручје Радан планине одликује се веома високим IAP вредностима и налази се у „нормалној зони” (сл. 38). „Нормална зона” (А) је даље диференцирана на три подзоне- А₁, А₂ и А₃ (сл. 42). Прва подзона (А₁) карактерише се истраживаним тачкама 48, 55 и 53. Ова подзона има дисконтинуалног облик, односно све три истраживане тачке налазе се у различитим деловима подручја. Истраживане тачке које чине ову подзону одликују се најнижим IAP вредностима (од 58 до 60), у односу на вредности свих осталих истраживаних тачака на подручју Радан планине. Северни део подручја Радан планине такође се налази у овој подзони, с обзиром да тај део припада истраживаном подручју Пролом бање која се налази на обронцима Радан планине и одликује се знатно нижим IAP вредностима у односу на IAP вредности на истраживаним тачкама Радан планине. Друга формирана подзона (А₂) одликује се тачкама 49, 54 и 59. Карактерише се IAP вредностима 63 и 64. Као и претходна, и ова подзона је дисконтинуалног облика, углавном обухвата југозападни део истраживаног подручја, али се њени фрагменти (тачка 59) налазе и на југоисточном делу истраживаног подручја. Трећу и последњу формирану подзону (А₃) у оквиру „нормалне зоне” у истраживаном подручју Радан планине карактеришу девет истраживаних тачака (46, 47, 50, 51, 52, 56, 57, 58 и 60). Ни ова подзона није јединствена, већ се фрагменти уочавају на јужном делу подручја (тачка 50) и на северозападном делу (тачка 46). Све истраживане тачке у овој подзони одликују се веома високим вредностима IAP од 67 до 73 (сл. 42).

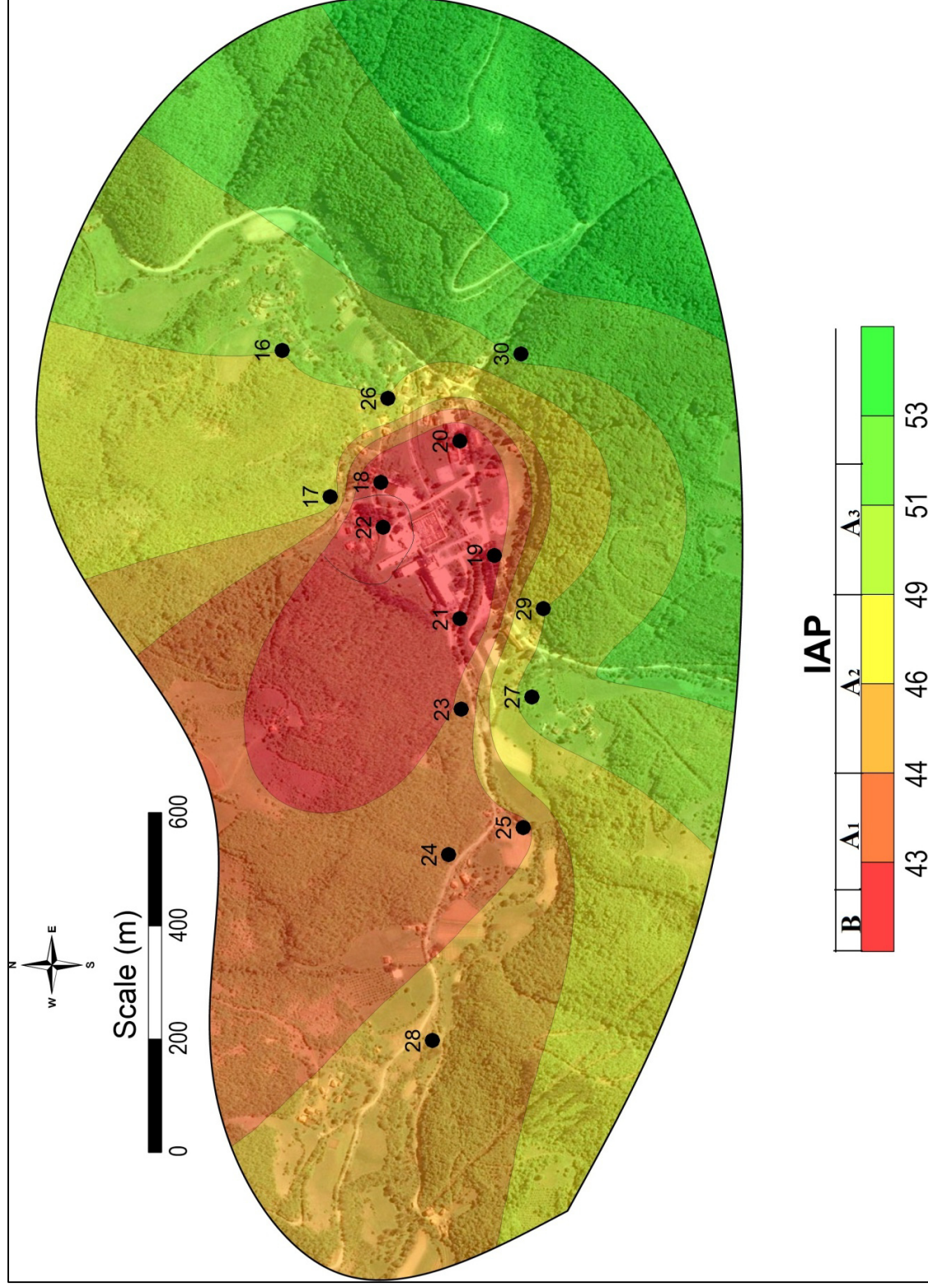
Већи део истраживаног подручја града Куршумлије налази се у зони „борбе”, док се мањи део подручја налази у зони „лишајске пустиње” (сл. 38). Прецизнија слика распореда зона индикације квалитета ваздуха на истраживаном подручју града Куршумлије показује да основне зоне нису монолитне већ је на овом подручју дошло до поделе на подзоне (сл. 43). Зона „лишајске пустиње” (Р) обухвата ужи центар града и одликује се присуством само две истраживане тачке – 63 и 64. Ова зона се карактерише веома ниским IAP вредностима – 10 и 11. Зона „борбе” (В) на истраживаном подручју града Куршумлије подељена је на две подзоне. Прва подзона или „спољашња зона борбе” (В₁) наставља се на зону „лишајске пустиње” и простира на југоисточном делу подручја. Обухвата девет истраживаних тачака (62, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 74 и 75). Вредности IAP варирају од 14 (тачка 67) до 23 (тачка 62). Друга формирана подзона или „унутрашња зона борбе” (В₂) обухвата североисточни и северозападни део подручја. У овој подзони налазе се тачке 61, 65, 72 и 73. Вредности IAP на овим тачкама крећу се од 24 до 28, што су и највише вредности IAP у односу на остале тачке истраживаног подручја града.



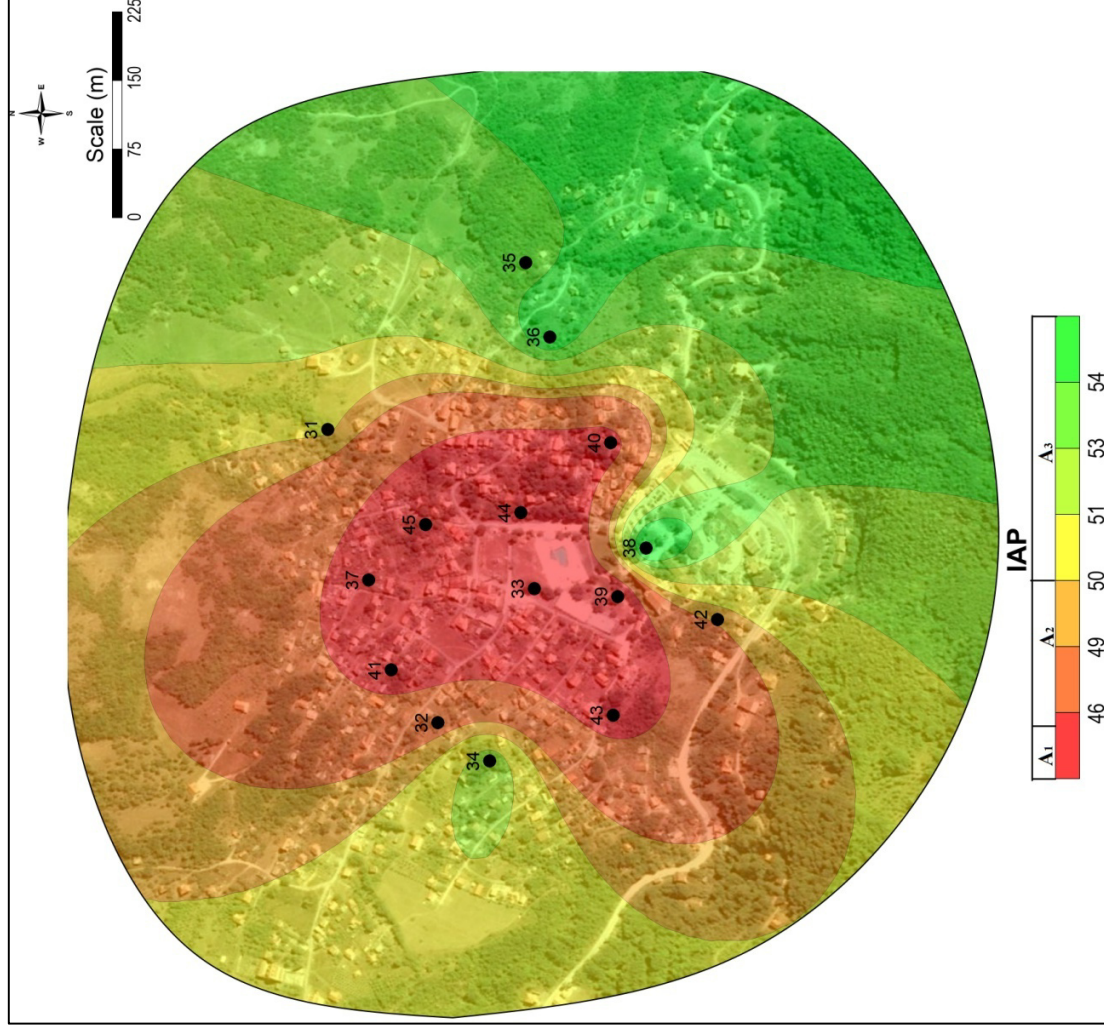
Сл. 38. Општа карта просторне дистрибуције зона индикације квалитета ваздуха на свим истраживаним подручјима



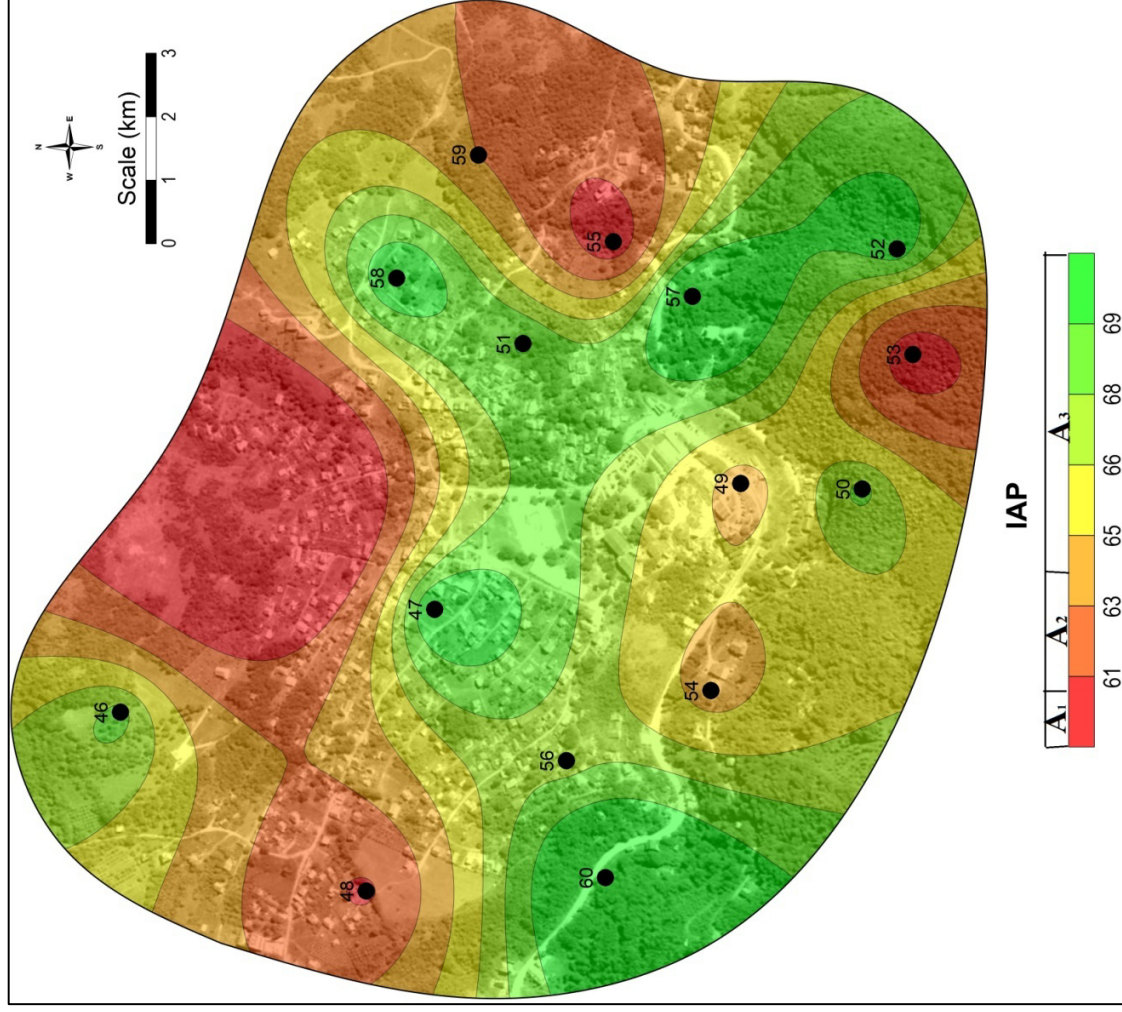
Сл. 39. Просторна дистрибуција „нормалне зоне” индикације квалитета ваздуха у Луковској бањи
(A₁, A₂, A₃- подзоне „нормалне зоне”)



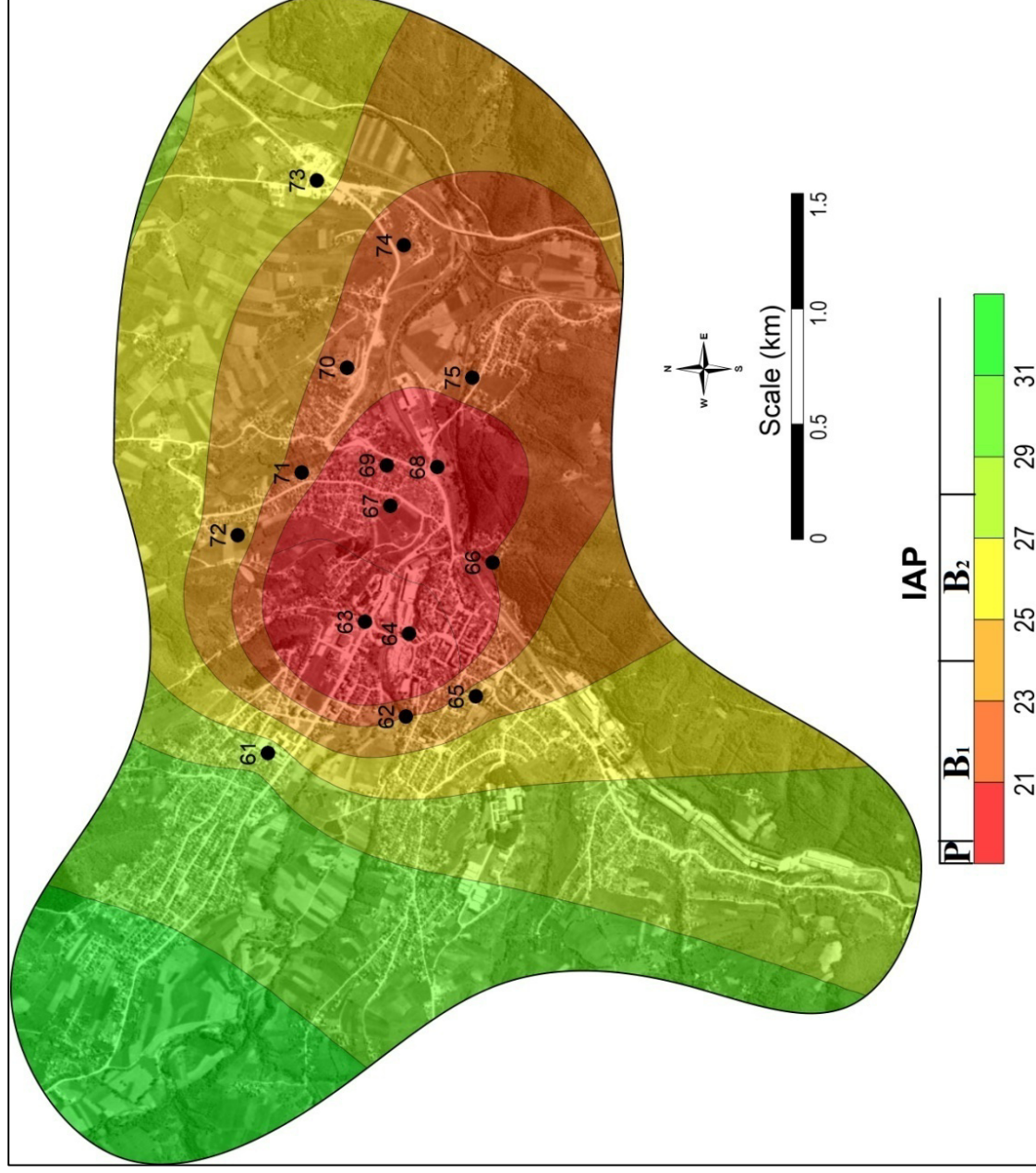
Сл. 40. Просторна дистрибуција зона лишајске индикације квалитета ваздуха у Куршумлијској бањи (B- зона „борбе“; A₁, A₂, A₃- подзоне „нормалне зоне“)



Сл. 41. Просторна дистрибуција „нормалне зоне” индикације квалитета ваздуха у Пролом бањи (A₁, A₂, A₃- подзоне „нормалне зоне”)



Сл. 42. Просторна дистрибуција „нормалне зоне” индикације квалитета ваздуха на Радан планини (A₁, A₂, A₃- подзоне „нормалне зоне”)



Сл. 43. Просторна дистрибуција зона лишајске индикације квалитета ваздуха у Куршумлији (P- зона „лишајске пустање“; B- зона „борбе“; B₁- „спољашња зона борбе“ , B₂- „унутрашња зона борбе“)

Анализа статистичке обраде података

Статистички су обрађени подаци добијени испитивањем 75 истраживаних тачака на истраживаном подручју на којима је константовано укупно присуство 88 таксона лишаја. Сви испитивани узорци распоређени су у неуроне дводимензионалне мреже (7 x 6) према сличности у квалитативном и квантитативном саставу лишаја.

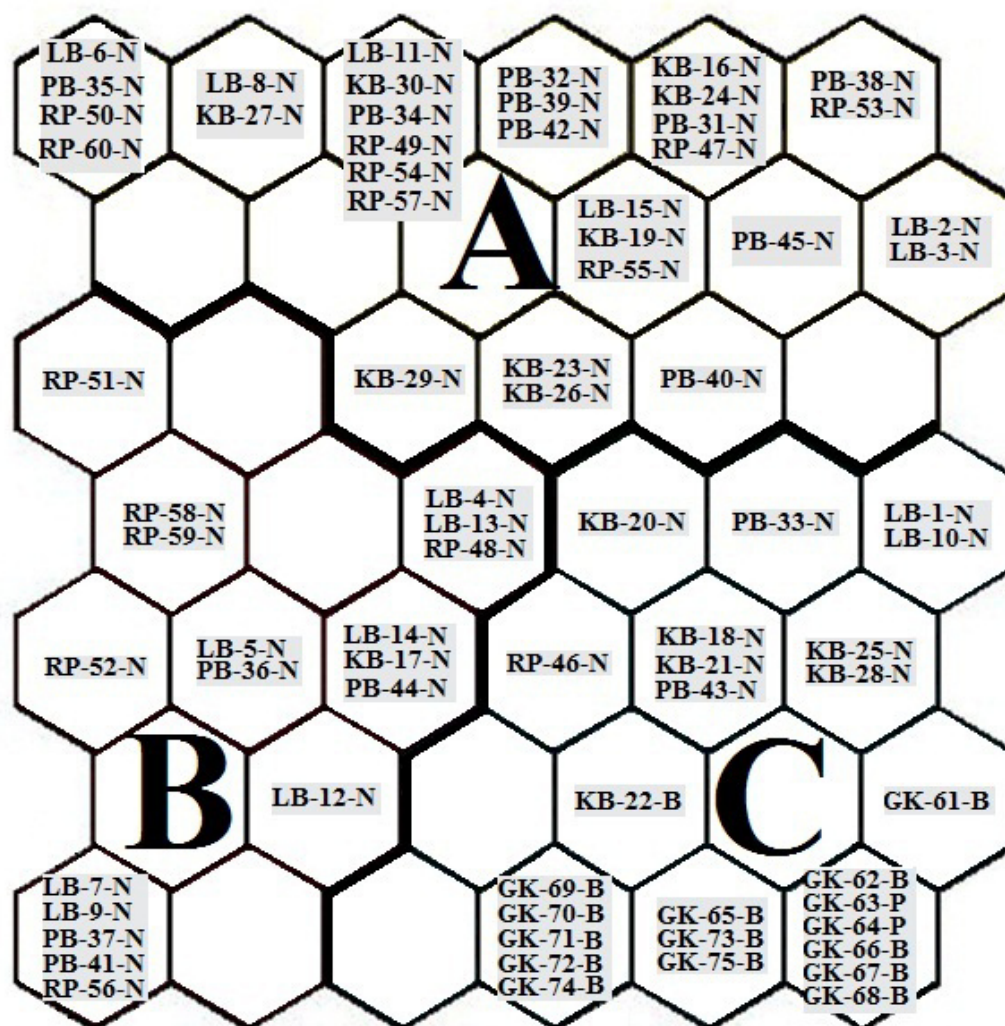
Применом самоорганизујућих мапа, издвојиле су се три групе – А, В и С (сл. 44).

Групу А карактерише највећи број истраживаних тачака (31) и све припадају „нормалној зони” индикације квалитета ваздуха.

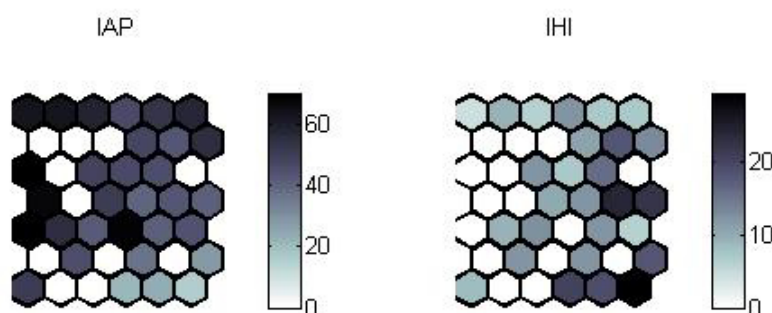
Група В се састоји од 18 истраживаних тачака. Слично као и у групи А, све тачаке које чине ову групу припадају „нормалној зони” индикације квалитета ваздуха.

Група С је окарактерисана присуством 26 истраживаних тачака. За разлику од група А и В, у овој групи забележено је присуство свих 15 истраживаних тачака лоцираних у граду Куршумлији, односно једином урбаном истраживаном подручју. Највећи број тачака које се налазе у групи В припада зони „борбе”. Ове тачке чине 53.85% групе С. Истраживане тачке које припадају зони „лишајске пустиње” чине 7.69% групе, док 10 од укупно 26 тачака у групи С (38.46%) припадају „нормалној зони” лишајске индикације.

Једна од могућности SOM анализе јесте визуализација дистрибуције IAP и INI на дводимензионалној SOM мапи (сл. 45). Приказано је да је тамна засенченост за оба индекса високо корелисана са максималном вредношћу забележеном током студије, док су светлије нијансе индиковале опадање вредности представљених параметара. Оба индекса показала су јасан градијент у промени својих вредности на SOM мапи. На слици се види да се највећим вредностима IAP одликују истраживане тачке које чине групу А (сл. 45). На основу приказане скале закључујемо да се ове вредности углавном крећу од 40 до 60, док се вредности INI крећу у распону од 0 до 10. Истраживане тачке којима је окарактерисана група В показују сличне резултате. Наиме вредностима IAP варирају од 40 до 60, док вредности INI на овим тачкама варирају од 0 до 10. На слици се види да је група С окарактерисана истраживаним тачкама чије вредности IAP углавном варирају од 20 до 40. Међутим вредности INI крећу углавном од 10 до 20. Вредности ова два индекса (IAP и INI) обрнуто су пропорционалне, односно, што су тамније обојени неурони на SOM мапи која приказује дистрибуцију вредности IAP, то су светлије обојени неурони на SOM мапи која приказује дистрибуцију вредности INI (сл. 45).



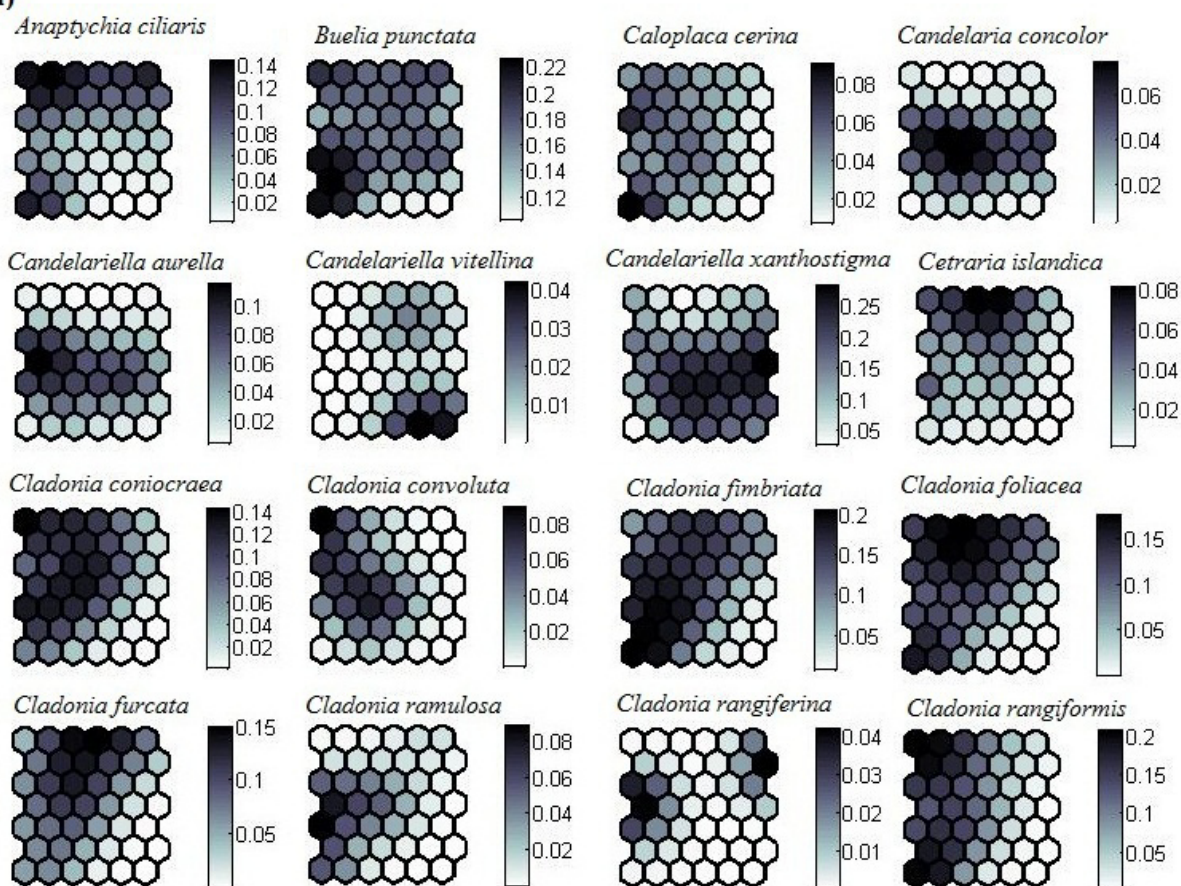
Сл. 44. Визуализација дистрибуције истраживаних тачака и зона индикације различитог степена загађења ваздуха на дводимензионалној SOM мапи (А, В и С- групе неурона; ознаке у оквиру неурона представљају истраживано подручје, бројеве истраживаних тачака и зоне лишајске индикације аерозагађења)



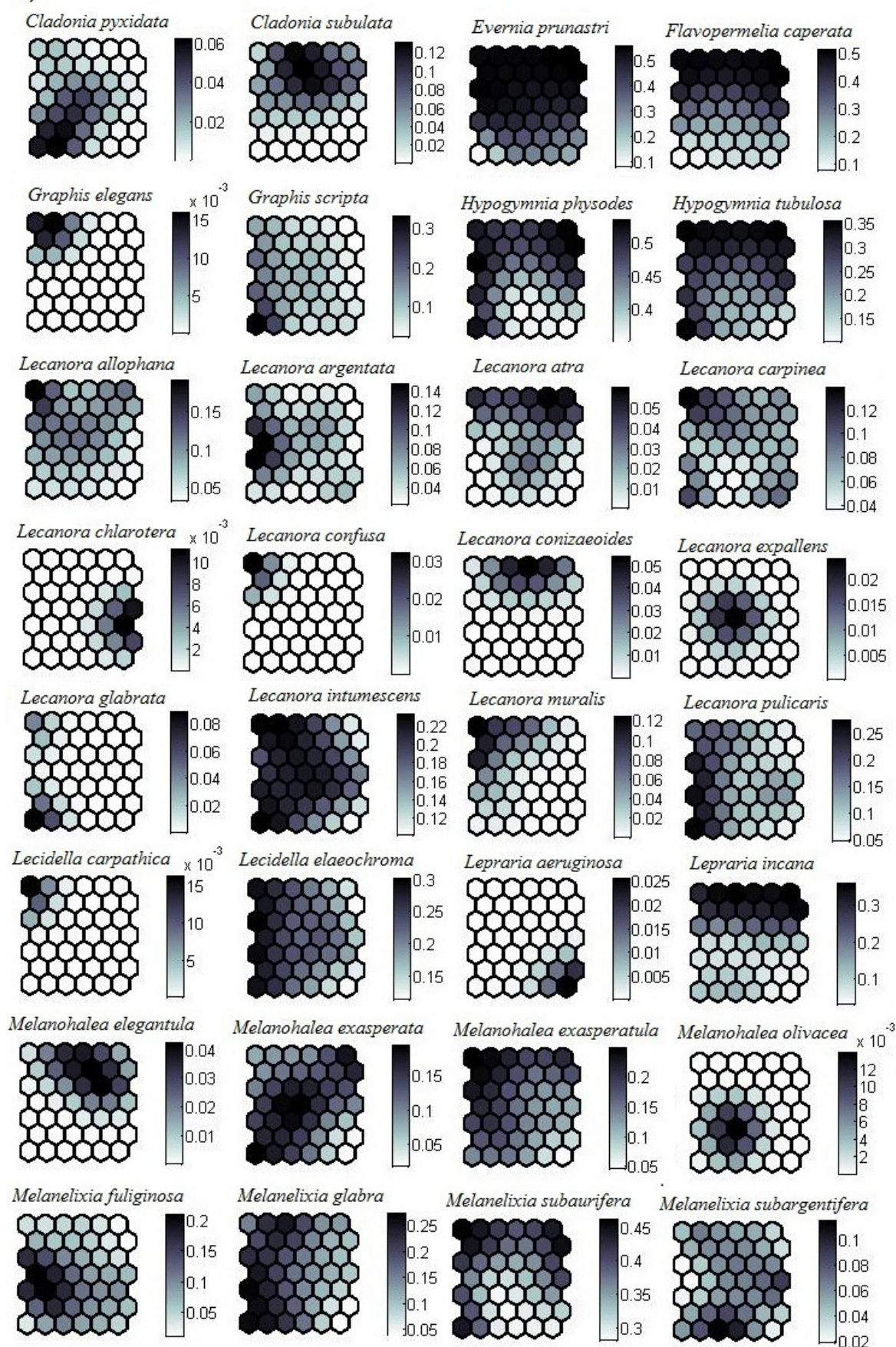
Сл. 45. Визуализација дистрибуције вредности IAP и IHI на SOM мапи
(скеле на мапама представљају вредности индекса)

SOM анализа, такође, има могућност да прикаже и дистрибуциони образац сваке врсте понаособ на дводимензионалној мрежи. Оваква визуелизација дистрибуције врста по неуронима представљена је у виду компонентних графикана за сваку врсту укључену у анализу појединачно (сл. 46).

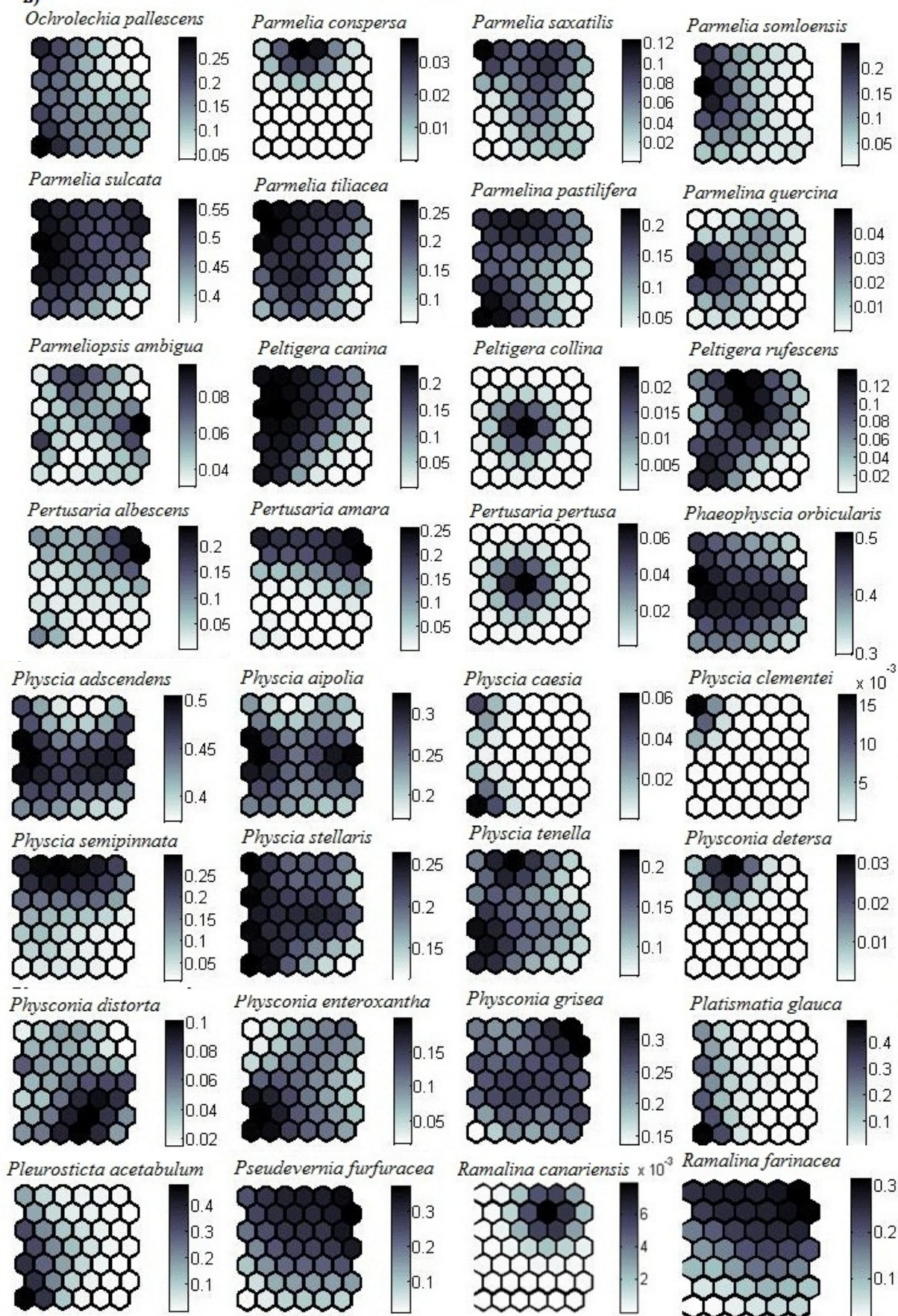
а)

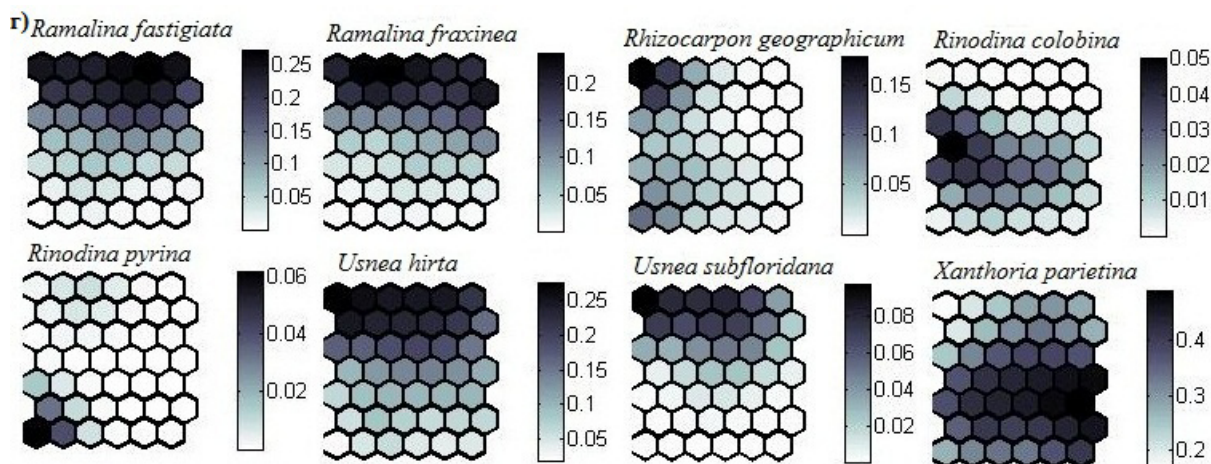


б)



B)





Сл. 46. (а-г) SOM визуализација дистрибуције константованих 88 таксона лишаја (скала за сваку мапу представља абундантност таксона)

На основу ове визуализације (сл. 46) види се да су константовани таксони у различитој мери дистрибуирани у групама А, В и С. Графикони показују да су групе А и В најсличнији по квантитативном и квалитативном саставу лишаја. Наиме врсте: *Cladonia rangiferina*, *Lecidella carpathica*, *Lecanora glabrata*, *L. confusa*, *L. muralis*, *Physcia caesia* и *Platismatia glauca* присутне су искључиво у групама А и В, док су у групи С одсутне. Врсте: *Graphis elegans*, *Physconia detersa*, *Lecanora conizaeoides*, *Xanthoparmelia conspersa* и *Pertusaria amara* присутне су само у групи А. Таксони карактеристични за групу В су *Rinodina pyrulina* и *Cladonia ramulosa*. Врсте присутне искључиво у групи С су *Lecanora chlorotera* и *Lepraria aeruginosa*.

Индикаторске вредности врста

Резултатима IndVal анализе издвојене су врсте са статистички значајним индикаторским вредностима за групе А, В и С. Репрезентативни таксони групе имају IndVal > 25%. Остали наведени таксони су значајни за групу. Врсте приказане задебљалим словима представљају индикаторе сваке групе са IndVal вредношћу већом од 25% (таб. 15).

Резултати анализе су показали да се број врста индикатора разликује између група. Издвојено је укупно 40 индикаторских таксона и то 36 таксона репрезентативних и 4 таксона значајна за групе (таб. 15).

За групу А издвојено је 16 репрезентативних таксона чије су IndVal вредности веће од 25%, различитих нивоа значајности. Високе и статистички значајне IndVal вредности кретале су се од 26.5 до 69.3. Издвојена је и врста *Anaptychia ciliaris* са IndVal вредношћу испод граничне (24), што је издваја као значајну али само за одређени неурон.

За групу В издвојен је 21 репрезентативни таксон са високим и статистички значајним вредностима IndVal. Ову групу најбоље описује врста *Pleurosticta acetabulum* са изузетно високом индикаторском вредности (80.2). Међутим, од укупно 21 врсте, три врсте имају индикаторске вредности мање од 25% (од 16.6 до 21), али је ниво значајности

> 0.05. Врсте *Candelariella aurella*, *Cladonia pyxidata* и *Parmelina quercina* се могу сматрати важним и значајним али само за одређене неуроне.

Групу С описују две репрезентативне врсте – *Xanthoria parietina* и *Candelariella xanthostigma*.

Таб. 15. Репрезентативни и значајни таксони лишаја за групе формиране SOM анализом

Група А		Група В	
Таксон	IndVal	Таксон	IndVal
<i>Pertusaria amara</i>	69.3***	<i>Pleurosticta acetabulum</i>	80.2***
<i>Ramalina fraxinea</i>	69.2***	<i>Melanelixia glabra</i>	45.3**
<i>Lepraria incana</i>	68.1***	<i>Lecanora pulicaris</i>	44.9**
<i>Ramalina fastigiata</i>	64.1***	<i>Platismatia glauca</i>	44.7***
<i>Flavoparmelia caperata</i>	62.3***	<i>Graphis scripta</i>	42.8**
<i>Physcia semipinnata</i>	59.5***	<i>Physcia stellaris</i>	40.1*
<i>Usnea hirta</i>	58.9***	<i>Cladonia fimbriata</i>	39.9**
<i>Ramalina farinacea</i>	52.4***	<i>Ochrolechia pallescens</i>	39.8*
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	51.6***	<i>Phaeophyscia orbicularis</i>	39.7*
<i>Evernia prunastri</i>	46.2***	<i>Peltigera canina</i>	39.5**
<i>Usnea subfloridana</i>	43.8***	<i>Lecidella elaeochroma</i>	38.8*
<i>Hypogymnia tubulosa</i>	41.4*	<i>Cladonia rangiformis</i>	34.9**
<i>Hypogymnia physodes</i>	39.3*	<i>Melanohalea exasperata</i>	34.2*
<i>Cladonia subulata</i>	29.4**	<i>Melanelixia fuliginosa</i>	33.9**
<i>Cladonia foliacea</i>	28.1*	<i>Xanthoparmelia somloënsis</i>	30.1**
<i>Pertusaria albescens</i>	26.5*	<i>Physconia enteroxantha</i>	30*
<i>Anaptychia ciliaris</i>	24*	<i>Buelia punctata</i>	27.1*
		<i>Cladonia ramulosa</i>	26.5***
		<i>Candelariella aurella</i>	21*
		<i>Cladonia pyxidata</i>	19.2**
		<i>Parmelina quercina</i>	16.6*

Група С	
Таксон	IndVal
<i>Xanthoria parietina</i>	42.8**
<i>Candelariella xanthostigma</i>	34.1*

*<0.05, **<0.01, ***<0.001 - ниво значајности

Анализа биомедицинског потенцијала лишаја

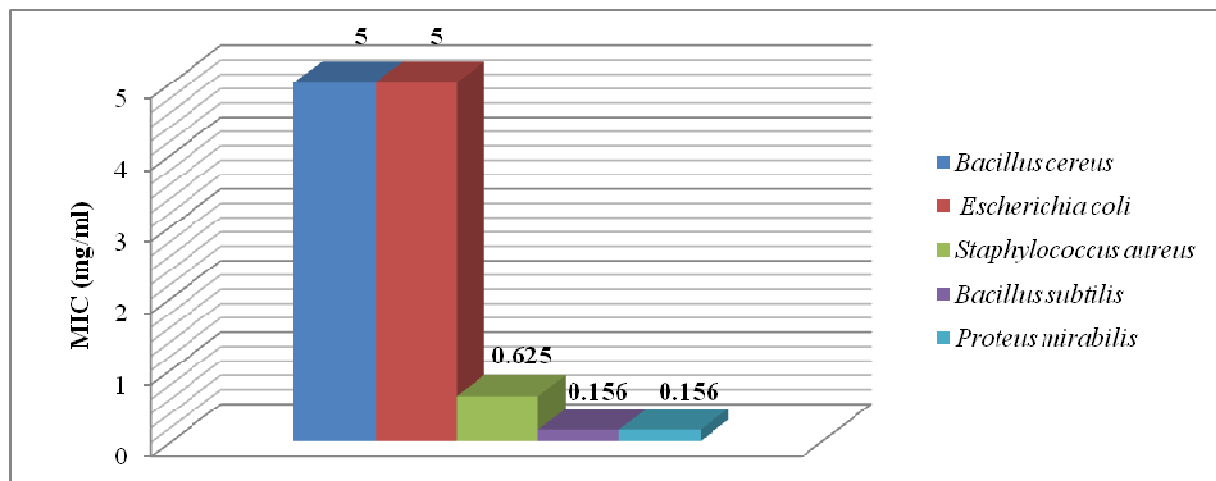
За испитивање биомедицинског потенцијала коришћене су следеће врсте лишаја: *Cladonia coniocraea* (Flörke) Spreng., *C. fimbriata* (L.) Fr., *C. foliacea* (Huds.) Willd., *C. furcata* (Huds.) Schrad., *C. ramulosa* (With.) J.R. Laundon, *C. rangiferina* (L.) Weber ex F.H. Wigg., *C. subulata* (L.) Weber ex F.H. Wigg., *Lepraria incana* (L.) Ach., *Melanelixia fuliginosa* (Fr. ex Duby) O. Blanco, A. Crespo, Divakar, Essl., D. Hawksw. & Lumbsch, *M. glabra* (Schaer.) O. Blanco, A. Crespo, Divakar, Essl., D. Hawksw. & Lumbsch, *M. subaurifera* (Nyl.) O. Blanco, A. Crespo, Divakar, Essl., D. Hawksw. & Lumbsch, *Peltigera rufescens* (Weiss) Humb., *Pertusaria amara* (Ach.) Nyl., *Physcia semipinnata* (Leers ex J.F. Gmel.) Moberg, *Platismatia glauca* (L.) W.L. Culb. & C.F. Culb., *Pleurosticta acetabulum* (Neck.) Elix & Lumbsch, *Ramalina fastigiata* (Pers.) Ach. и *R. fraxinea* (L.) Ach..

Антибактеријска и антифунгална активност екстракта и изолованих компоненти испитиваних врста лишаја

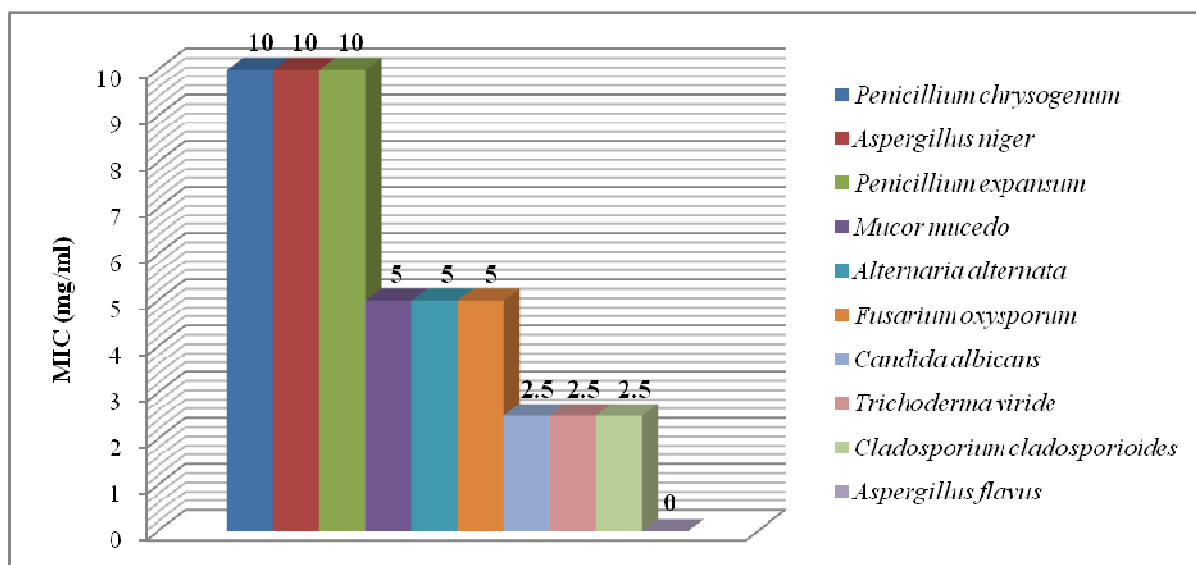
Антимикробна активност ацетонских екстракта испитиваних врста лишаја и њихових метаболита, у односу на тест организме приказана је на сл. 47-94.

Антибактеријска и антифунгална активност екстракта врсте *Cladonia coniocraea*

МИС вредности екстракта врсте *C. coniocraea* кретале су се од 0.156 до 5 mg/ml за бактерије (сл. 47) и од 5 до 20 mg/ml за гљиве (сл. 48). Најнижа вредност МИС (0.156 mg/ml) измерена је према врстама *Bacillus subtilis* и *Proteus mirabilis*.



Сл. 47. Антибактеријска активност екстракта врсте *Cladonia coniocraea*



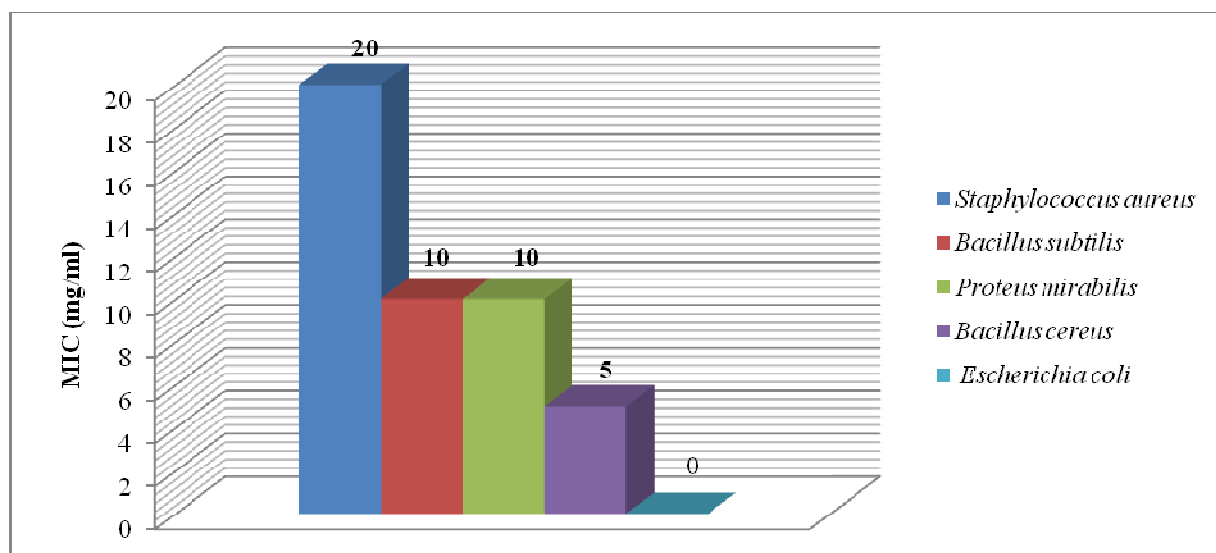
Сл. 50. Антифунгална активност екстракта врсте *Cladonia fimbriata*

Антибактеријска и антифунгална активност екстракта врсте Cladonia foliacea

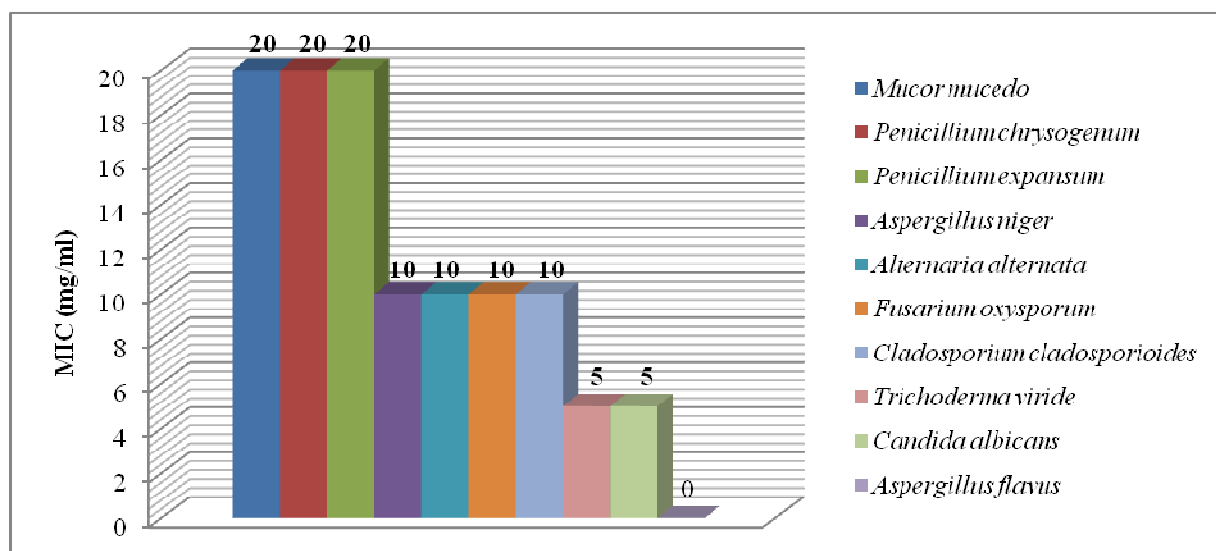
Вредности МИС за испитивани екстракт варирале су од 5 до 20 mg/ml.

Инхибиторно својство екстракта није испољено према бактерији *Escherichia coli*, док је према осталим тестираним бактеријама уочено инхибиторно дејство (сл. 51).

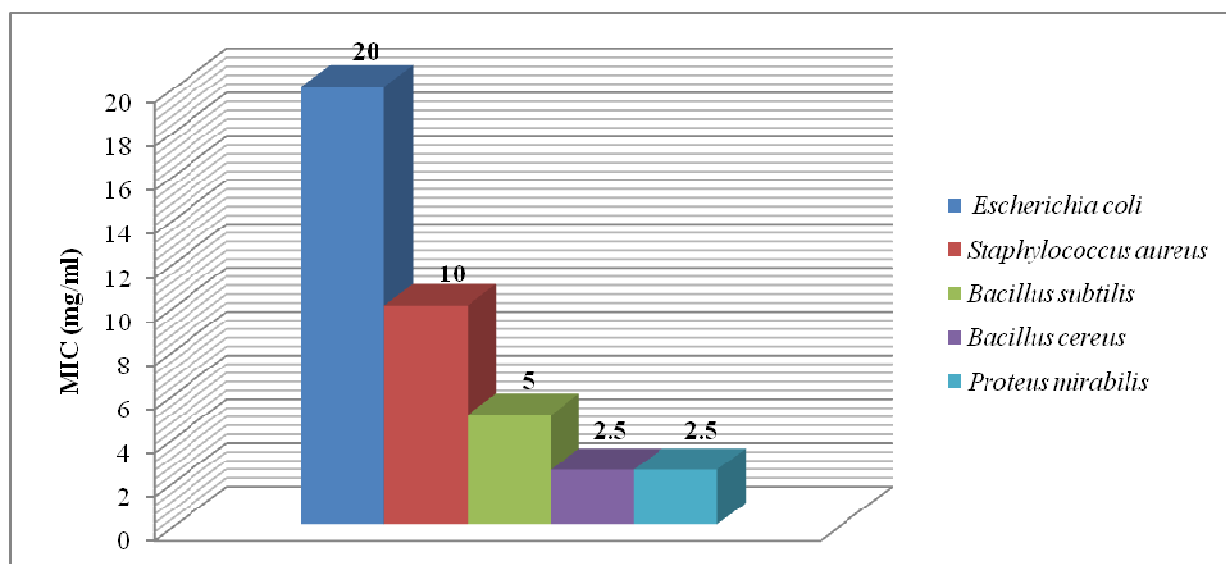
Антифунгална активност измерена је код свих тестираних гљива, изузев врсте *Aspergillus flavus*, према којој није испољено антифунгално дејство екстракта (сл. 52).

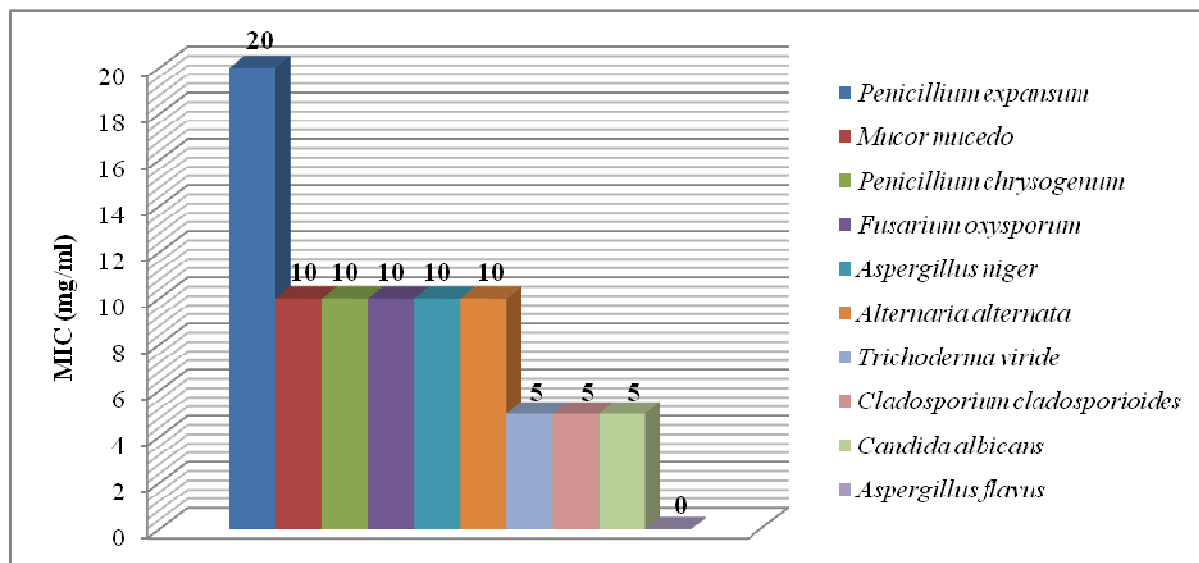


Сл. 51. Антибактеријска активност екстракта врсте *Cladonia foliacea*

Сл. 52. Антифунгална активност екстракта врсте *Cladonia foliacea*Антибактеријска и антифунгална активност екстракта врсте *Cladonia furcata*

Ацетонски екстракт врсте *C. furcata* испољио је релативно јаку антимикробну активност. Тестиране врсте бактерија инхибиране су у концентрацијама од 2.5 до 20 mg/ml (сл. 53). Све тестиране врсте гљива инхибиране су у концентрацијама од 5 до 20 mg/ml, изузев врсте *Aspergillus flavus* која је испољила резистентност на екстракт лишаја *C. furcata* (сл. 54).

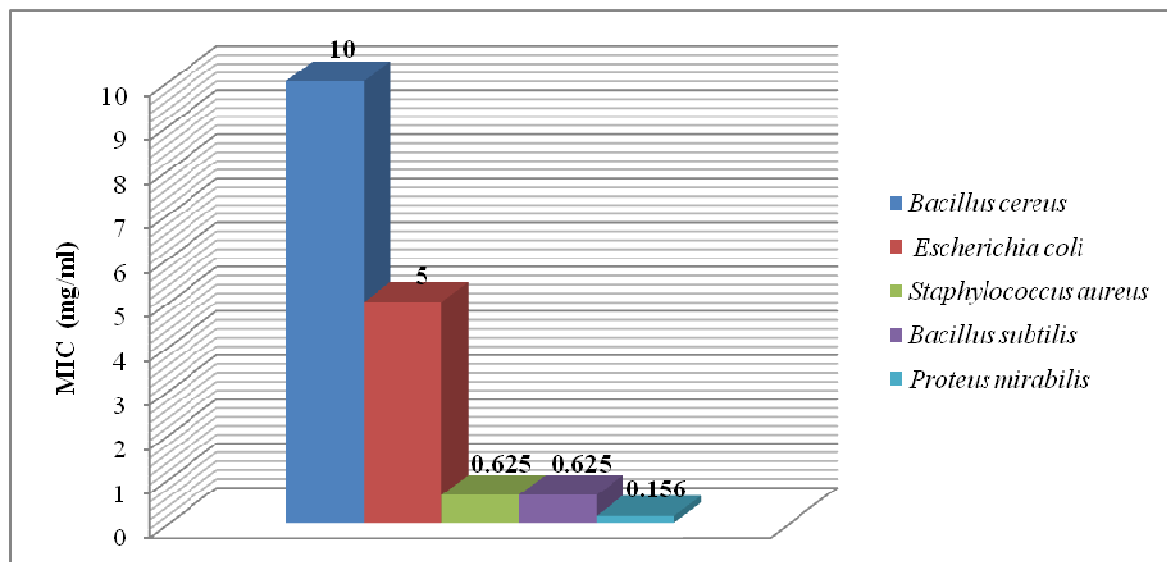
Сл. 53. Антибактеријска активност екстракта врсте *Cladonia furcata*



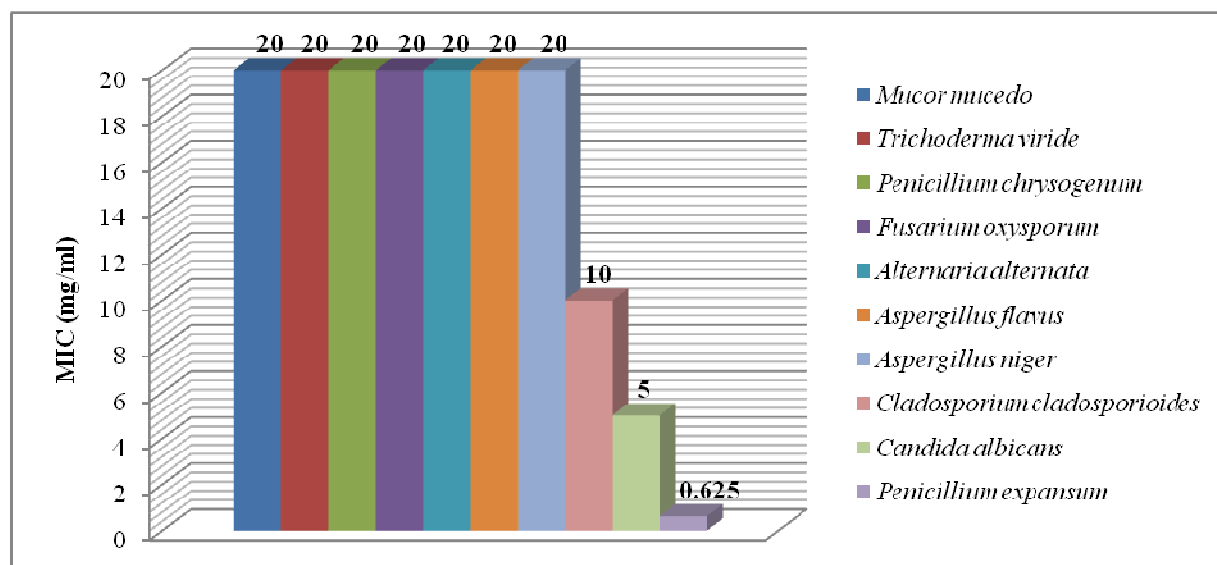
Сл. 54. Антифунгална активност екстракта врсте *Cladonia furcata*

Антибактеријска и антифунгална активност екстракта врсте *Cladonia ramulosa*

Екстракт врсте *Cladonia ramulosa* испољио је снажну антибактеријску активност. Пронађена је инхибиција раста свих тестираних врста бактерија, а измерене МИС вредности биле су изузетно ниске и кретале су се од 0.156 до 10 mg/ml (сл. 55). Испитивањем антифунгалне активности екстракта уочена је инхибиција свих тестираних врста гљива, а МИС вредности кретале су се од 0.625 до 20 mg/ml (сл. 56).



Сл. 55. Антибактеријска активност екстракта врсте *Cladonia ramulosa*

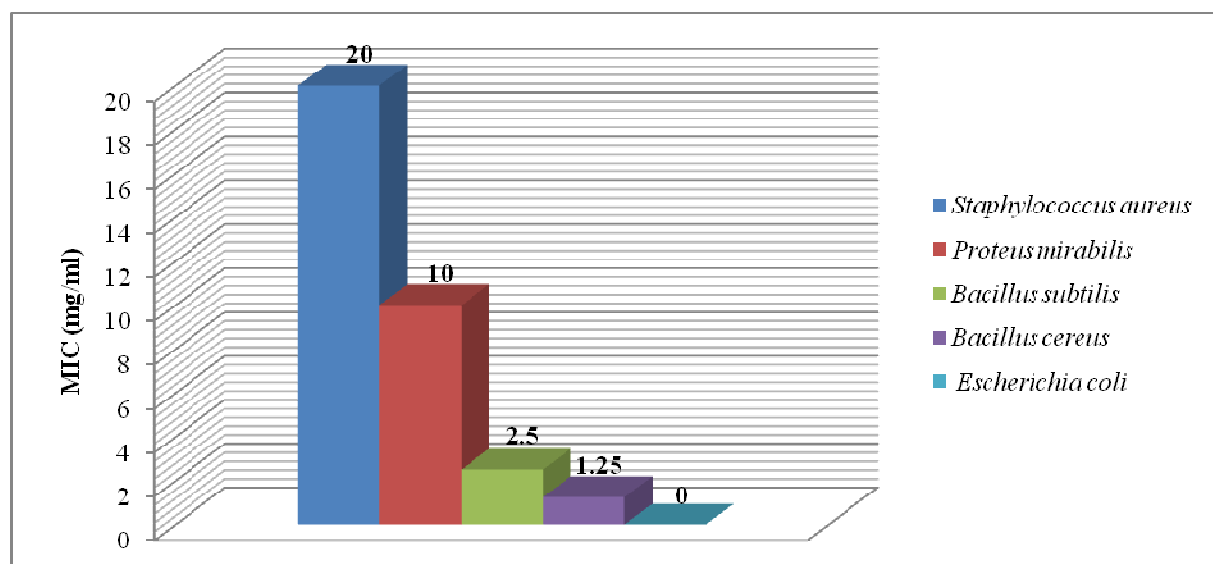


Сл. 56. Антифунгална активност екстракта врсте *Cladonia ramulosa*

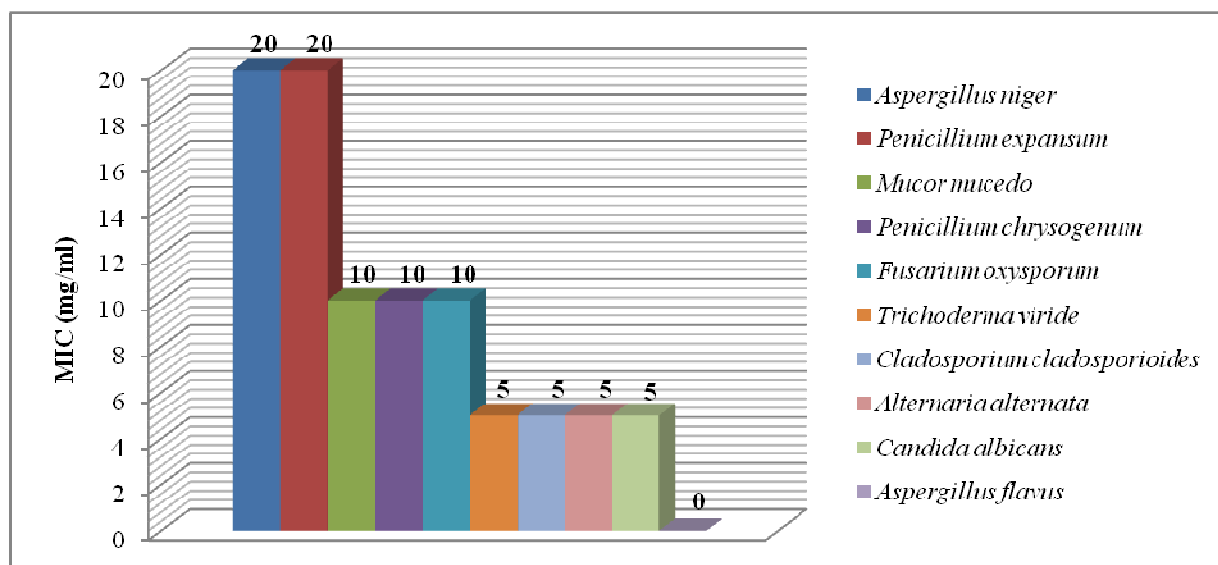
Антибактеријска и антифунгална активност екстракта врсте *Cladonia rangiferina*

Измерене МИС вредности екстракта у односу на тестиране бактерије кретале су се од 1.25 до 20 mg/ml (сл. 57). *Escherichia coli* је једина тестирана врста бактерије која је испојила резистентност на деловање екстракта.

Антифунгална активност екстракта била је релативно слаба. Резистентност је испојила врста *Aspergillus flavus*, чији раст није инхибиран чак ни при највећим концентрацијама екстракта. Раст осталих тестираних врста гљива је инхибиран од стране екстракта, а измерене МИС вредности варирале су од 5 до 20 mg/ml (сл. 58).



Сл. 57. Антибактеријска активност екстракта врсте *Cladonia rangiferina*

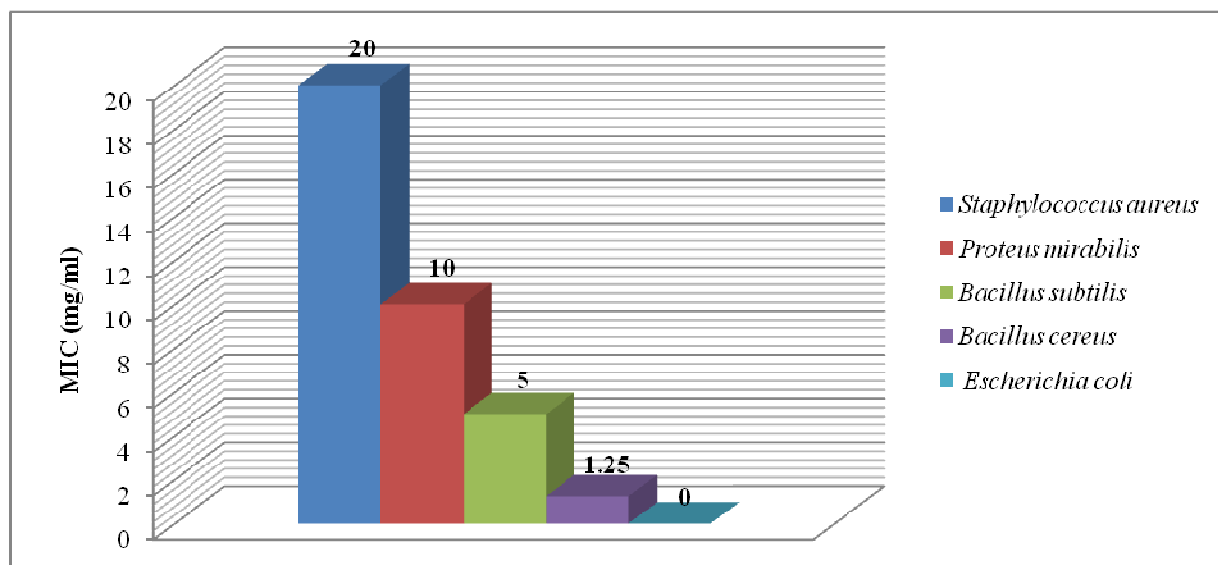


Сл. 58. Антифунгална активност екстракта врсте *Cladonia rangiferina*

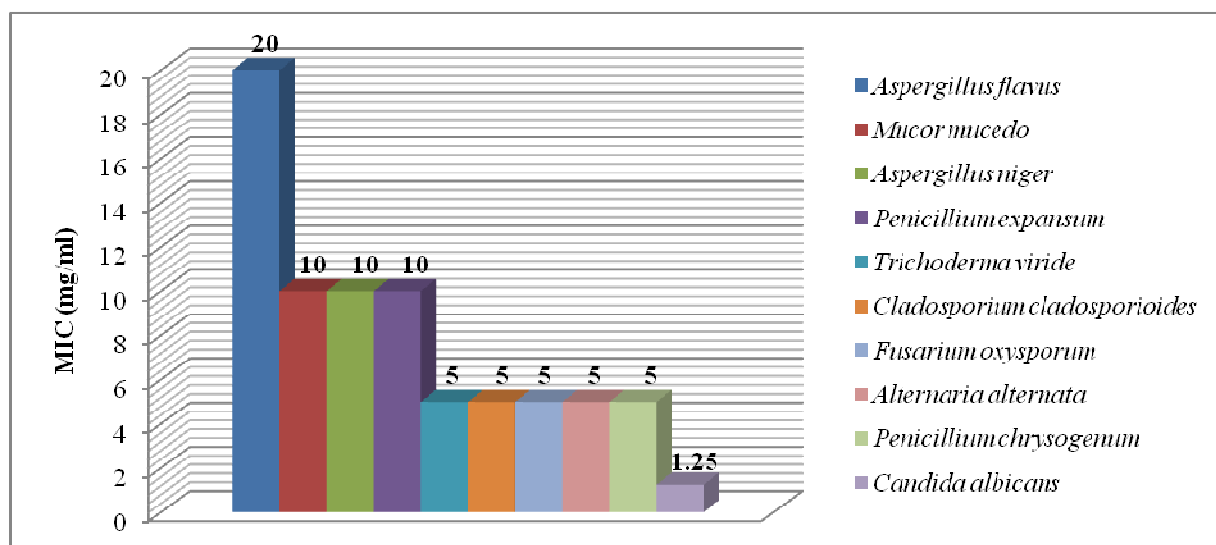
Антибактеријска и антифунгална активност екстракта врсте Cladonia subulata

Вредности МИС варираше од 1.25 до 20 mg/ml за тестиране врсте бактерија и гљива. Екстракт је испољио антибактеријску активност на четири од пет тестираних врста бактерија (сл. 59). Резистентна на деловање екстракта је једино врста *Escherichia coli*.

Све тестиране врсте гљива инхибиране су деловањем екстракта.



Сл. 59. Антибактеријска активност екстракта врсте *Cladonia subulata*

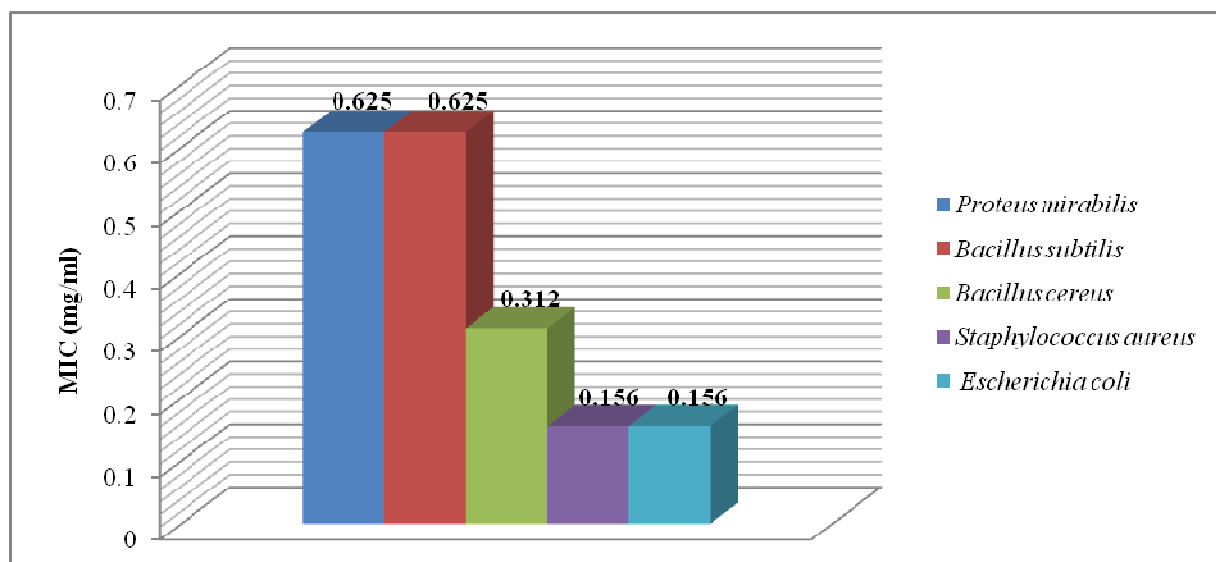


Сл. 60. Антифунгална активност екстракта врсте *Cladonia subulata*

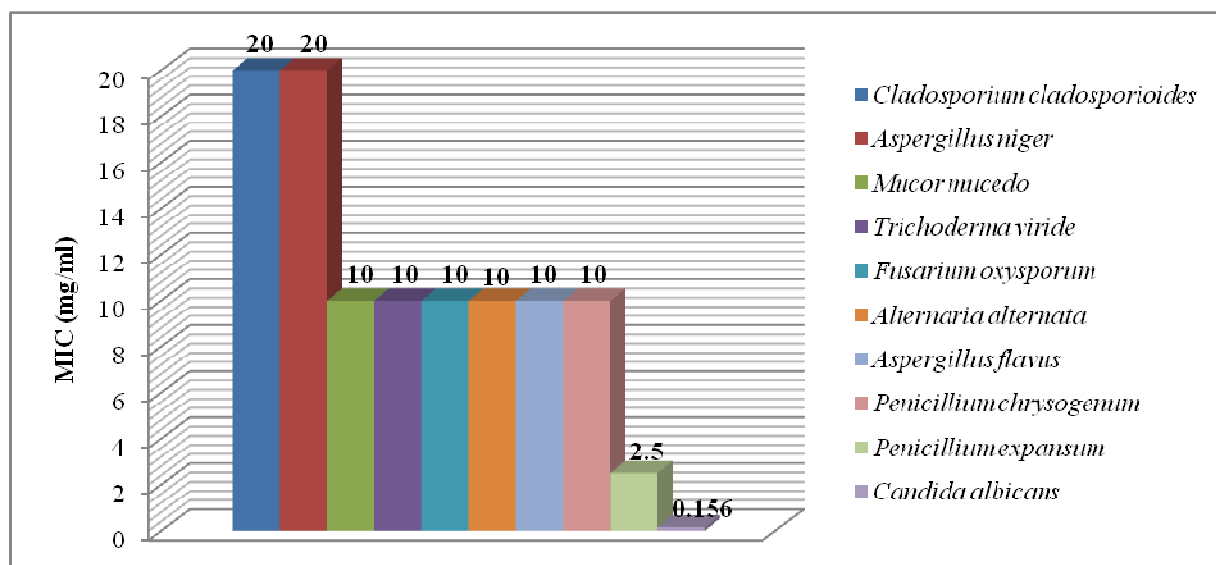
Антибактеријска и антифунгална активност екстракта врсте *Lepraria incana*

Ацетонски екстракт врсте *Lepraria incana* испољио је снажну антибактеријску активност. Забележена је инхибиција свих тестираних врста бактерија, а измерене вредности МИС биле су изузетно ниске и кретале су се од 0.156 до 0.625 mg/ml (сл. 61).

Антифунгална активност је такође уочена. Инхибиран је раст свих тестираних врста гљива, са измереним МИС вредностима од 0.156 до 20 mg/ml (сл. 62).



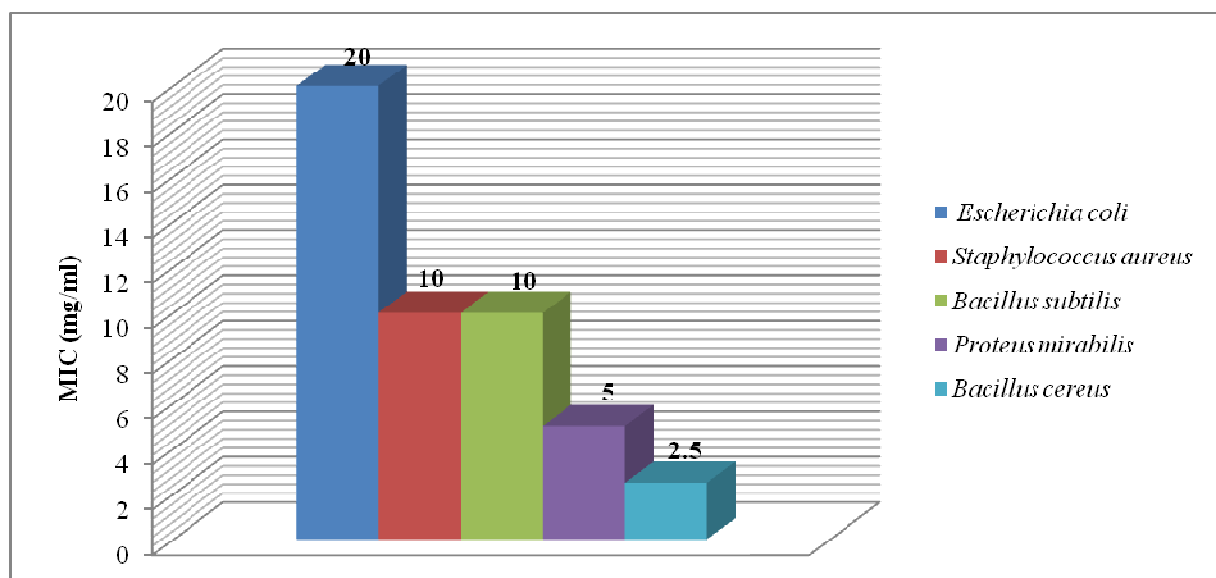
Сл. 61. Антибактеријска активност екстракта врсте *Lepraria incana*



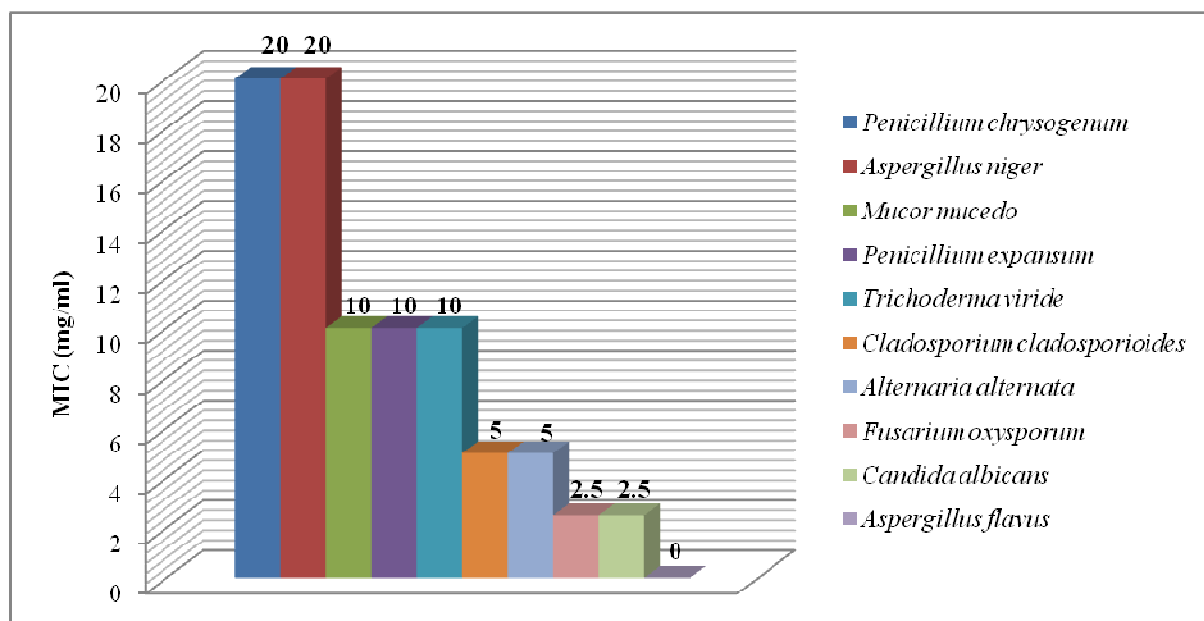
Сл. 62. Антифунгална активност екстракта врсте *Lepraria incana*

Антибактеријска и антифунгална активност екстракта врсте *Melanelixia fuliginosa*

Екстракт врсте *Melanelixia fuliginosa* показао је релативно јаку антимицробну активност. Наиме, инхибиран је раст свих пет тестираних врста бактерија, при чему су измерене вредности МИС варирале од 2.5 до 20 mg/ml (сл. 63). Најрезистентнија врста била је *Escherichia coli*, док се као најосетљивија показала врста *Bacillus cereus*. Осим антибактеријске, пронађена је и антифунгална активност екстракта. Једина врста која је остала резистентна на деловање екстракта била је *Aspergillus flavus*. Све остале тестиране врсте гљива инхибиране су у концентрацијама од 2.5 до 20 mg/ml (сл. 64).



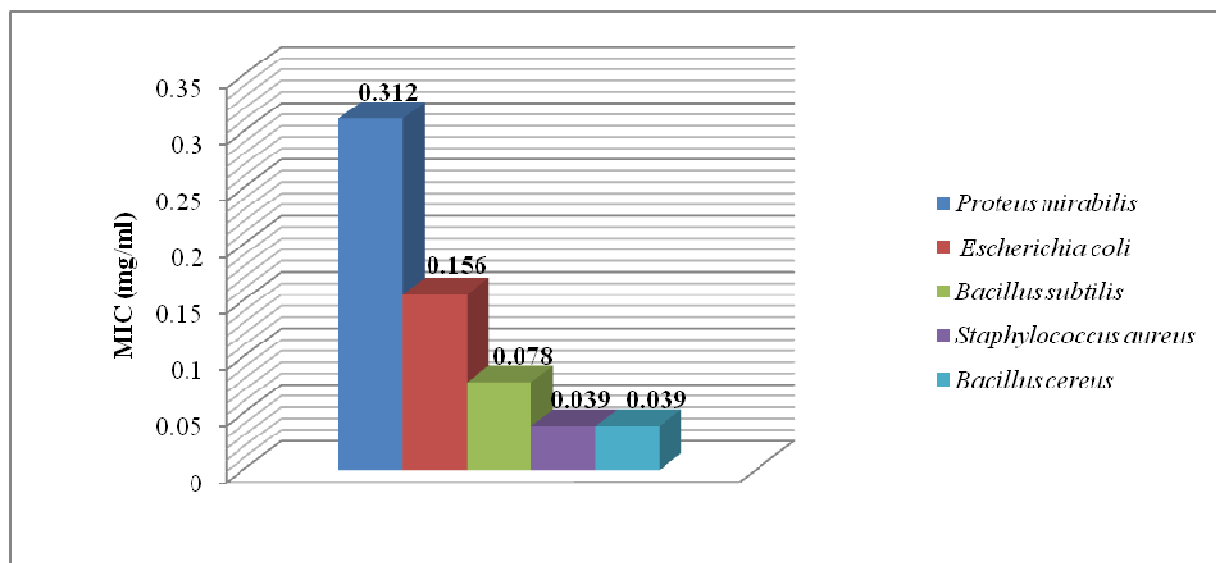
Сл. 63. Антибактеријска активност екстракта врсте *Melanelixia fuliginosa*



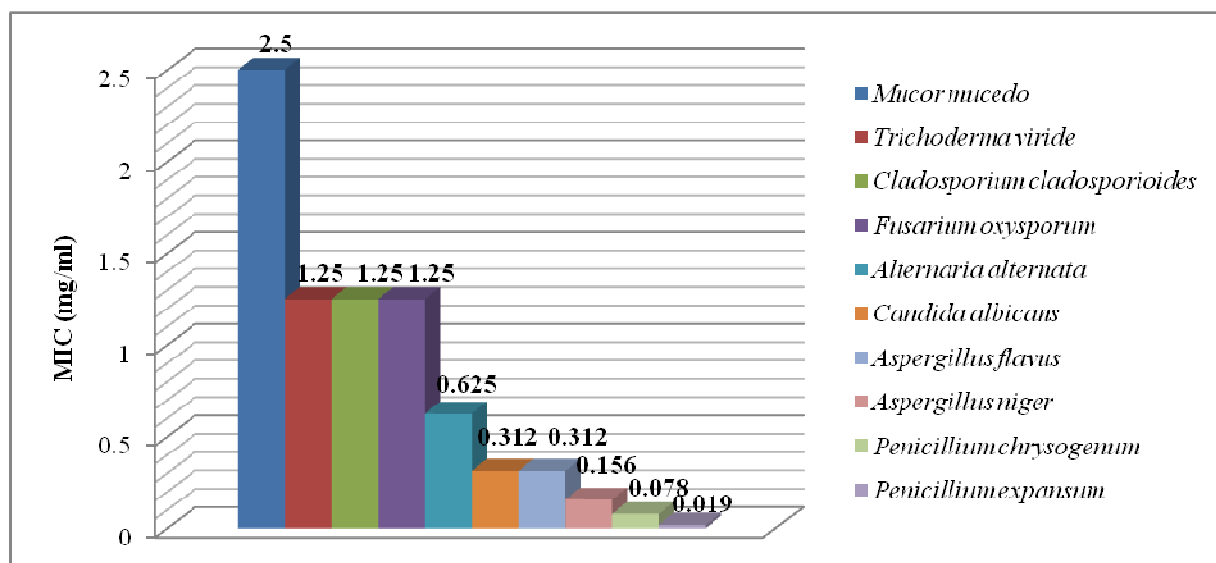
Сл. 64. Антифунгална активност екстракта врсте *Melanelixia fuliginosa*

Антибактеријска и антифунгална активност екстракта врсте *Melanelixia glabra*

Ацетонски екстракт врсте *Melanelixia glabra* испољио је снажно антимикуробно дејство. Инхибиран је раст свих тестираних врста бактерија. Вредности МИС биле су изузетно ниске и кретале су се од 0.039 до 0.312 mg/ml, што указује на јаку антибактеријску активност екстракта (сл. 65). Антифунгална активност је такође уочена. Екстракт је деловао инхибиторно на све тестиране врсте гљива, а измерене МИС вредности кретале су се од 0.019 до 2.5 mg/ml (сл. 66). Највећу осетљивост на тестиран екстракт испољила је врста *Penicillium expansum*.

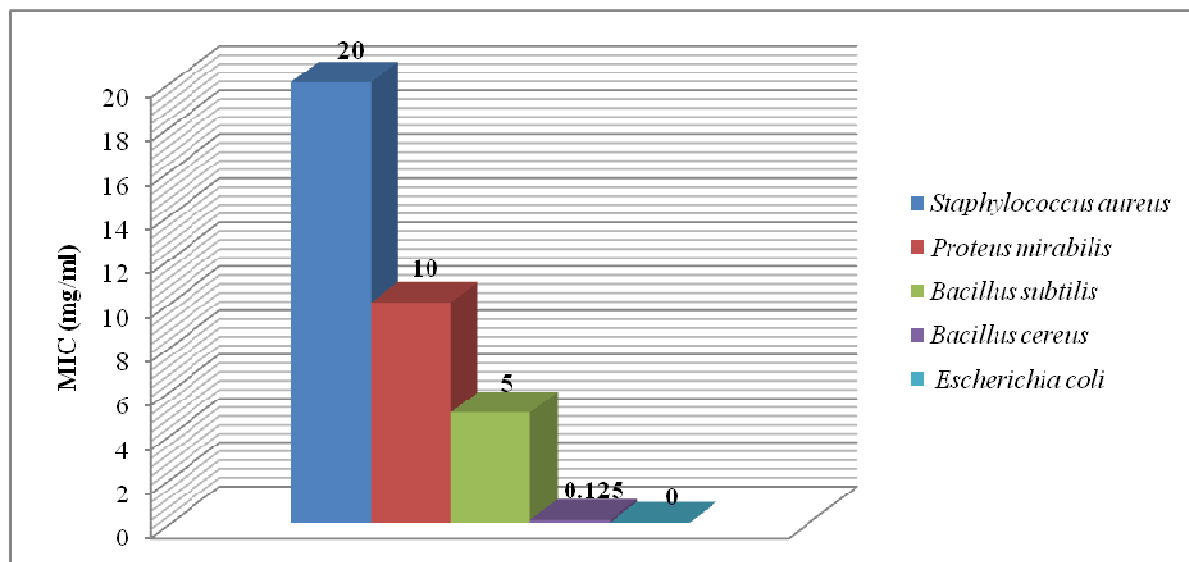


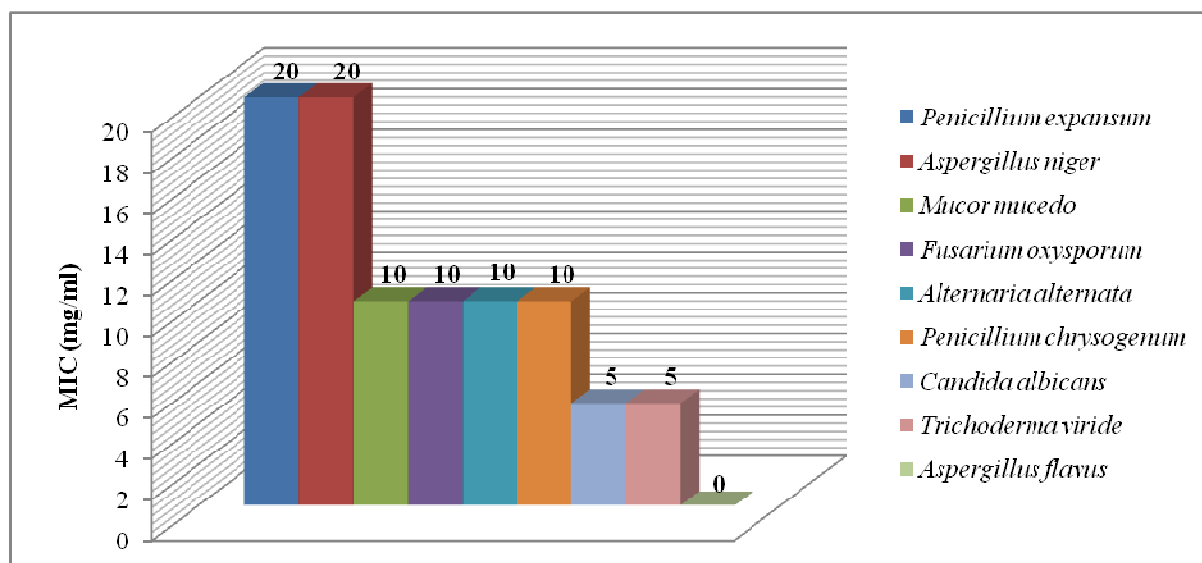
Сл. 65. Антибактеријска активност екстракта врсте *Melanelixia glabra*

Сл. 66. Антифунгална активност екстракта врсте *Melanelixia glabra*Антибактеријска и антифунгална активност екстракта врсте *Melanelixia subaurifera*

Испитивани екстракт је показао антибактеријску активност у концентрацији од 0.125 mg/ml према врсти *Bacillus cereus*, док су остале тестиране врсте бактерија биле резистентније на деловање екстракта. Највећу резистентност испољила је *Escherichia coli*, која није инхибарана деловањем екстракта (сл. 67).

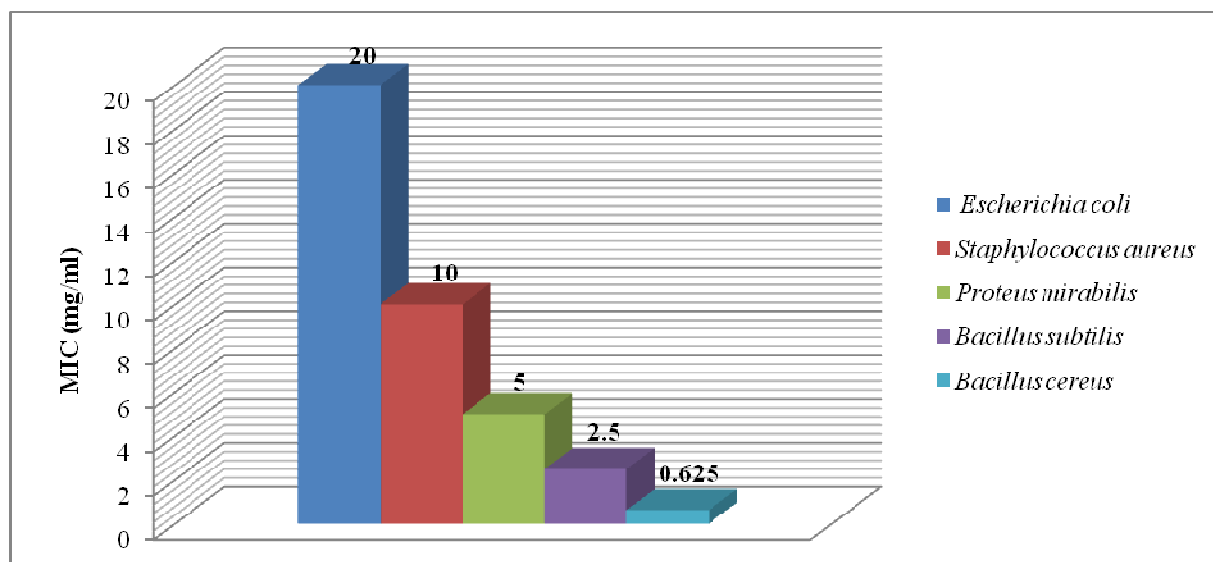
Антифунгална активност екстракта била је релативно слаба. MIC вредности варирале су од 5 до 20 mg/ml (сл. 68). На деловање овог екстракта резистентност је испољила *Aspergillus flavus*.

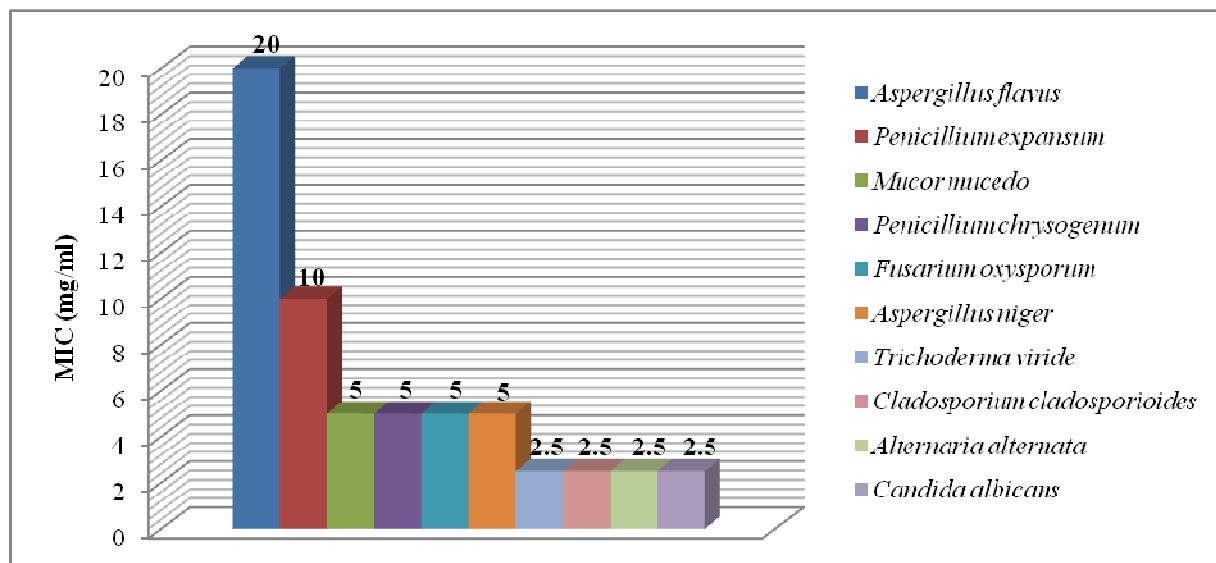
Сл. 67. Антибактеријска активност екстракта врсте *Melanelixia subaurifera*

Сл. 68. Антифунгална активност екстракта врсте *Melanelixia subaurifera*

Антибактеријска и антифунгална активност екстракта врсте *Peltigera rufescens*

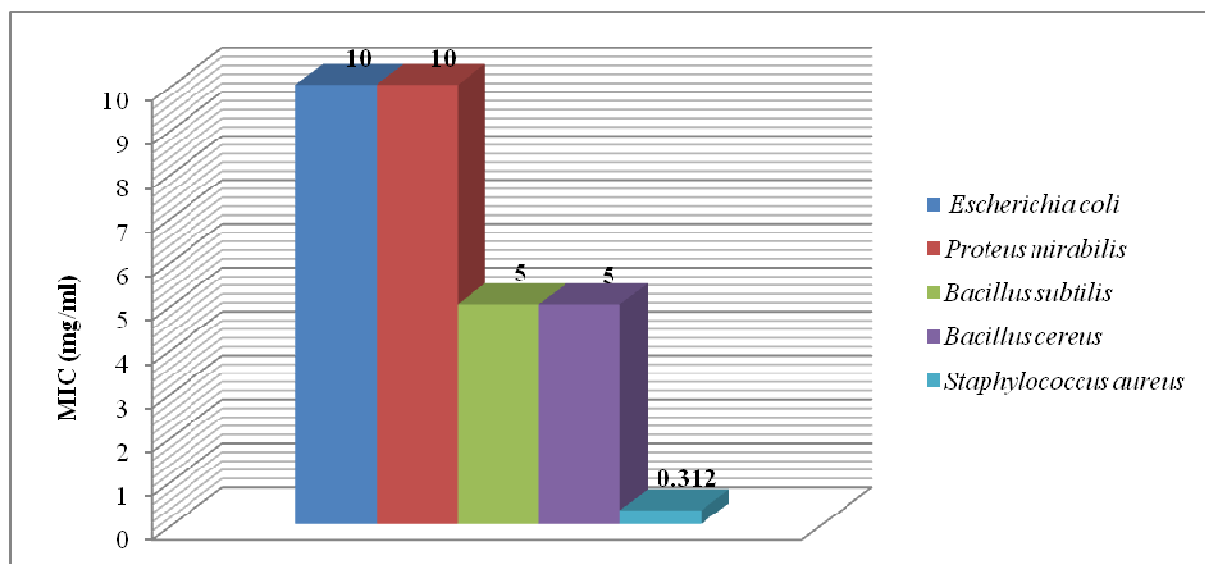
Антимикробна активност екстракта врсте *Peltigera rufescens* била је релативно јака. Деловањем екстракта инхибиран је раст свих тестираних врста бактерија. Измерене су МИС вредности од 0.625 до 20 mg/ml (сл. 69). Екстракт је инхибирао раст свих тестираних врста гљива у концентрацијама од 2.5 до 20 mg/ml (сл. 70). Међу тестираним врстама гљива највећу резистентност испољила је врста *Aspergillus flavus*.

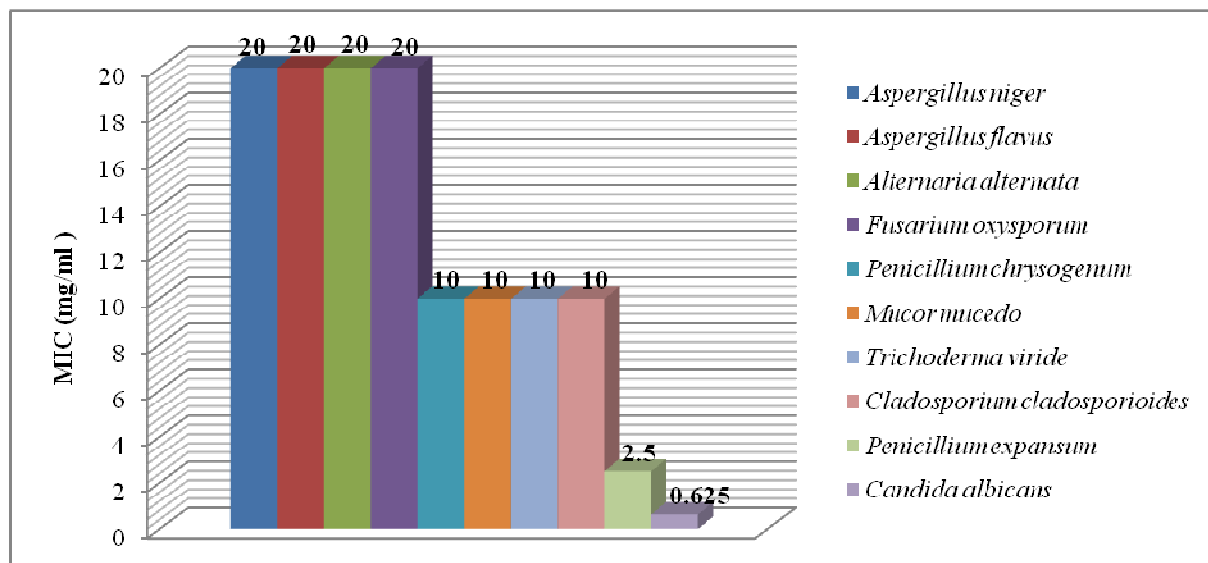
Сл. 69. Антибактеријска активност екстракта врсте *Peltigera rufescens*

Сл. 70. Антифунгална активност екстракта врсте *Peltigera rufescens*

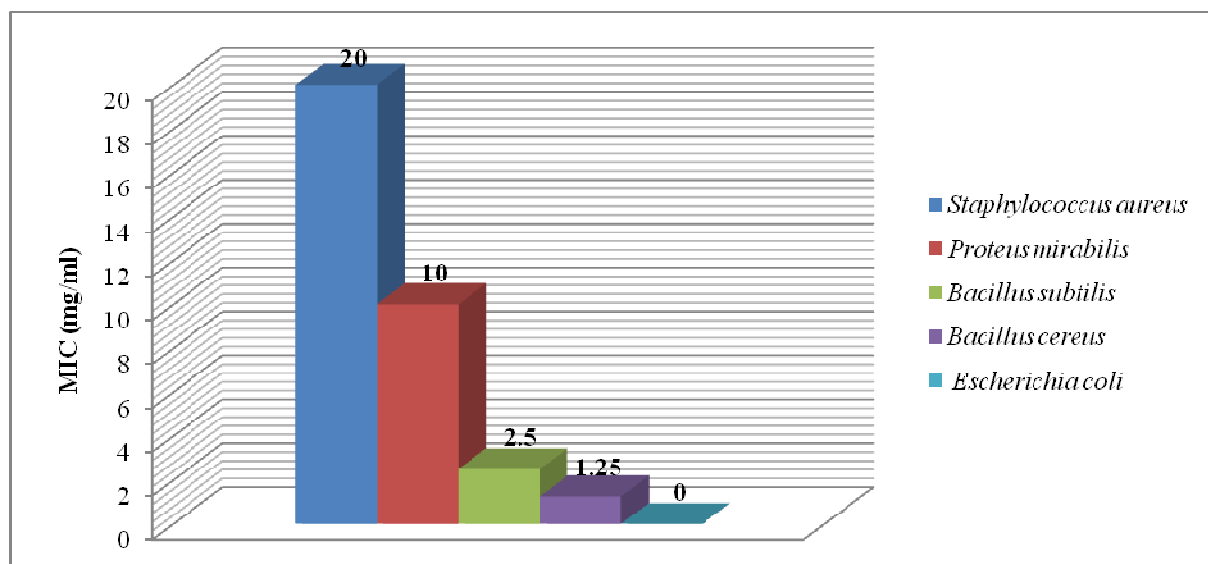
Антибактеријска и антифунгална активност екстракта врсте *Pertusaria amara*

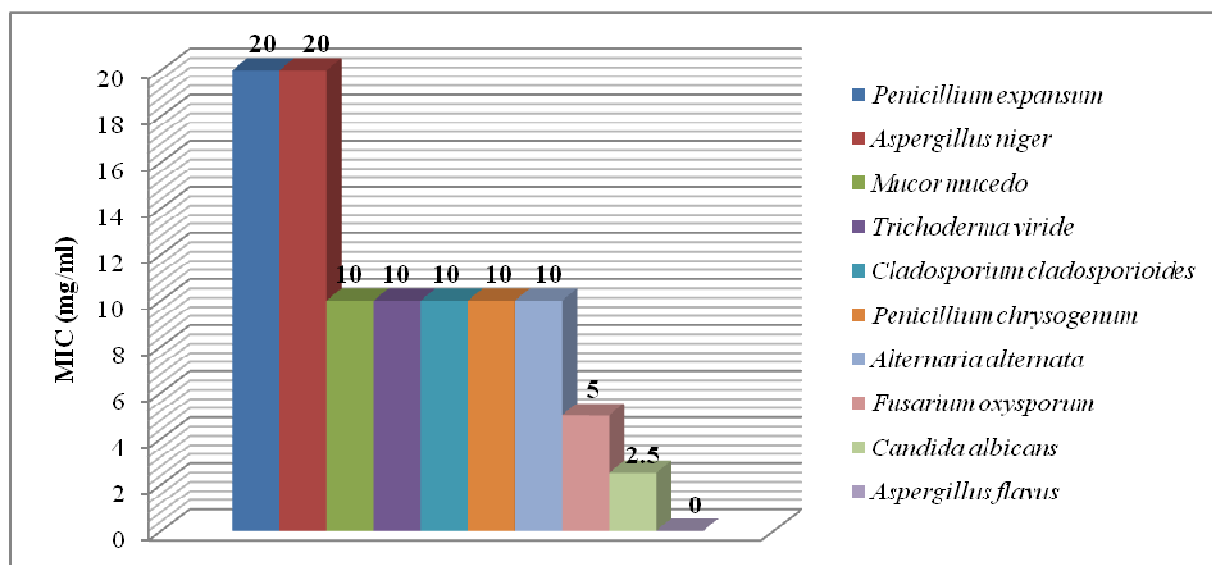
MIC за екстракт у односу на тестиране врсте бактерија и гљива кретала се од 0.312 до 20 mg/ml. Антибактеријска активност испољена је у концентрацијама од 0.312 до 10 mg/ml (сл. 71). Екстракт је имао најјаче инхибиторно дејство на врсту *Staphylococcus aureus*. Антифунгална активност испољена је у концентрацијама од 0.625 до 20 mg/ml (сл. 72). Најосетљивија је била врста *Candida albicans*.

Сл. 71. Антибактеријска активност екстракта врсте *Pertusaria amara*

Сл. 72. Антифунгална активност екстракта врсте *Pertusaria amara*Антибактеријска и антифунгална активност екстракта врсте *Physcia semipinnata*

Антибактеријска активност екстракта испољена је у концентрацијама од 1.25 до 20 mg/ml (сл. 73). Резистентна је била врста *Escherichia coli*, чији раст није инхибиран деловањем екстракта. Антифунгална активност забележена је у концентрацијама од 2.5 до 20 mg/ml, изузев према врсти *Aspergillus flavus* која се показала као резистентна на деловање екстракта (сл. 74).

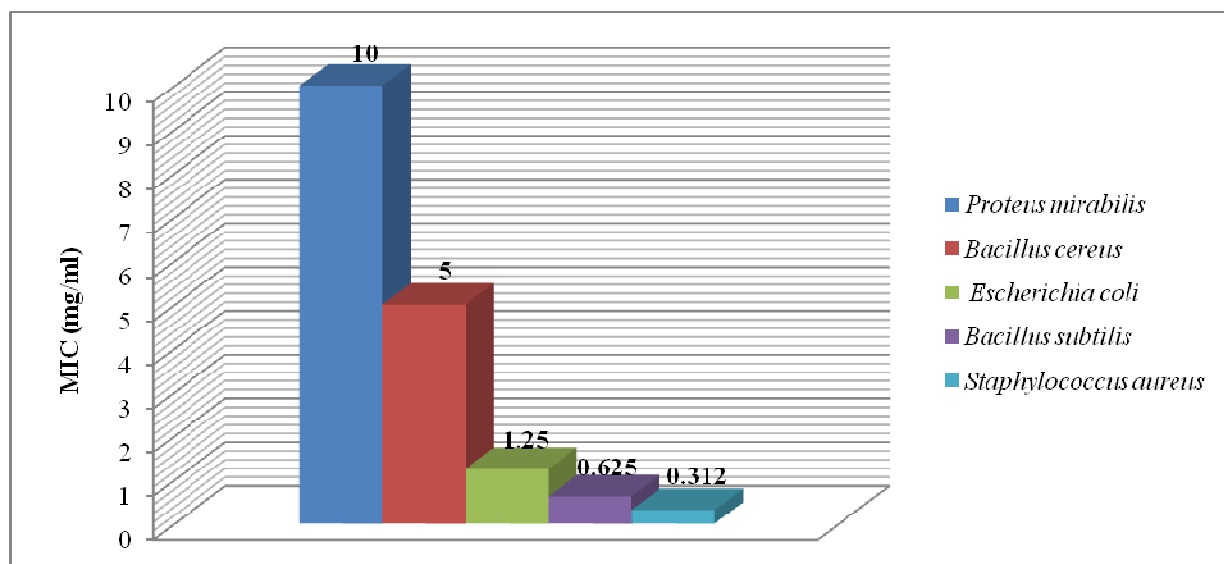
Сл. 73. Антибактеријска активност екстракта врсте *Physcia semipinnata*

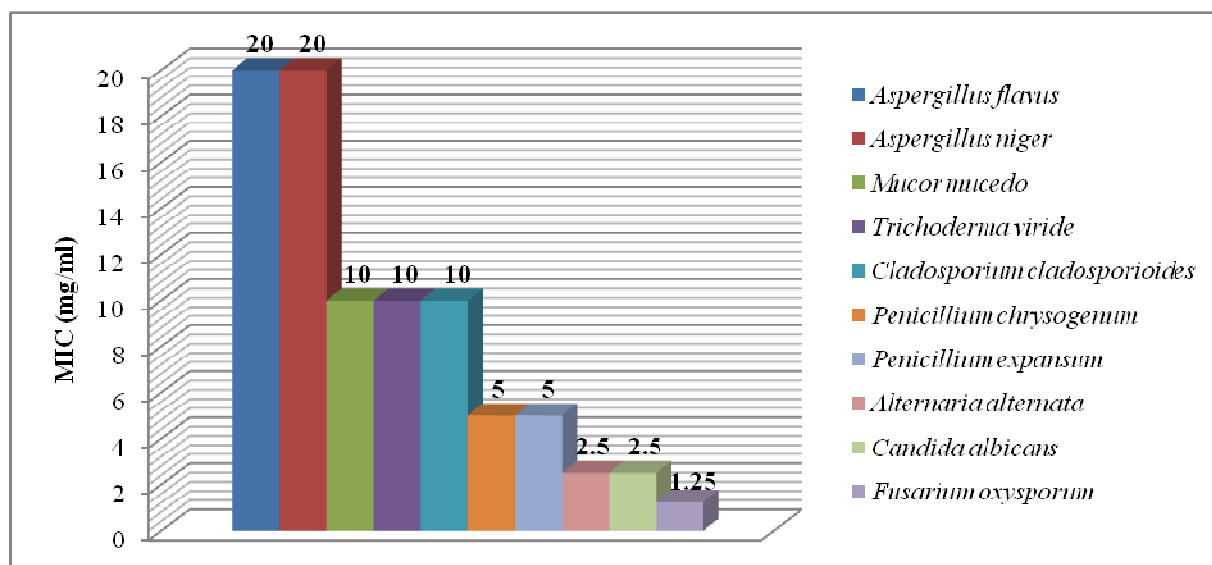
Сл. 74. Антифунгална активност екстракта врсте *Physcia semipinnata*

Антибактеријска и антифунгална активност екстракта врсте *Platismatia glauca*

Екстракт врсте *Platismatia glauca* испољио је јаку антимицробну активност, делујући инхибиторно на све тестиране врсте бактерија и гљива. МИС вредности приликом тестирања антибактеријске активности, кретале су се од 0.312 до 10 mg/ml (сл. 75).

Екстракт је све тестиране врсте гљива инхибирао у концентрацијама од 1.25 до 20 mg/ml (сл. 76). Најмању резистентност испољила је врста *Fusarium oxysporum*.

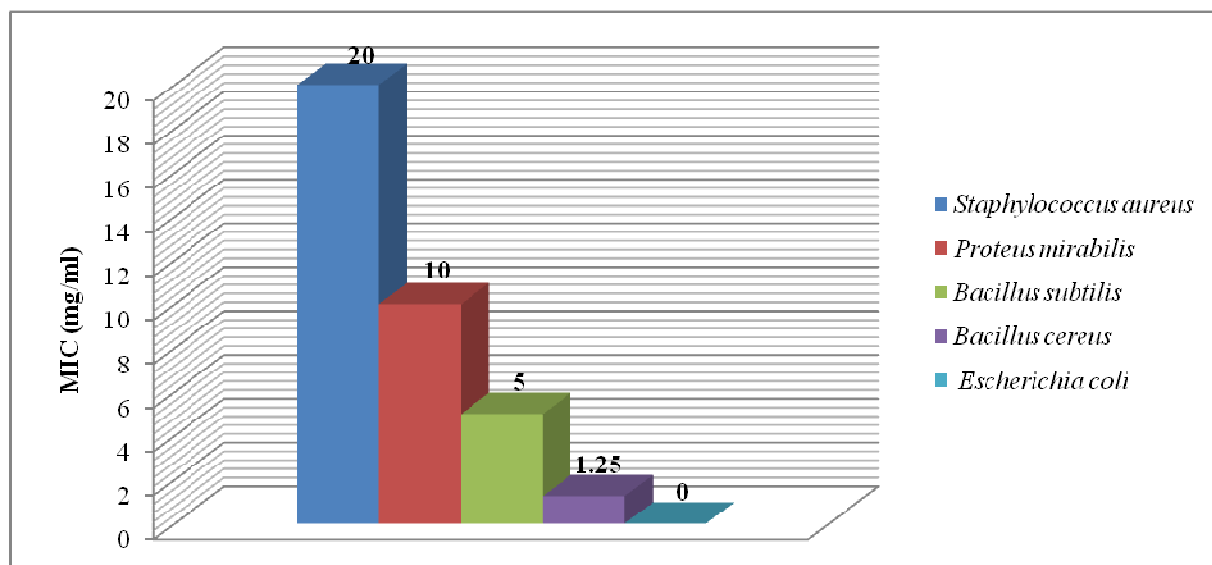
Сл. 75. Антибактеријска активност екстракта врсте *Platismatia glauca*

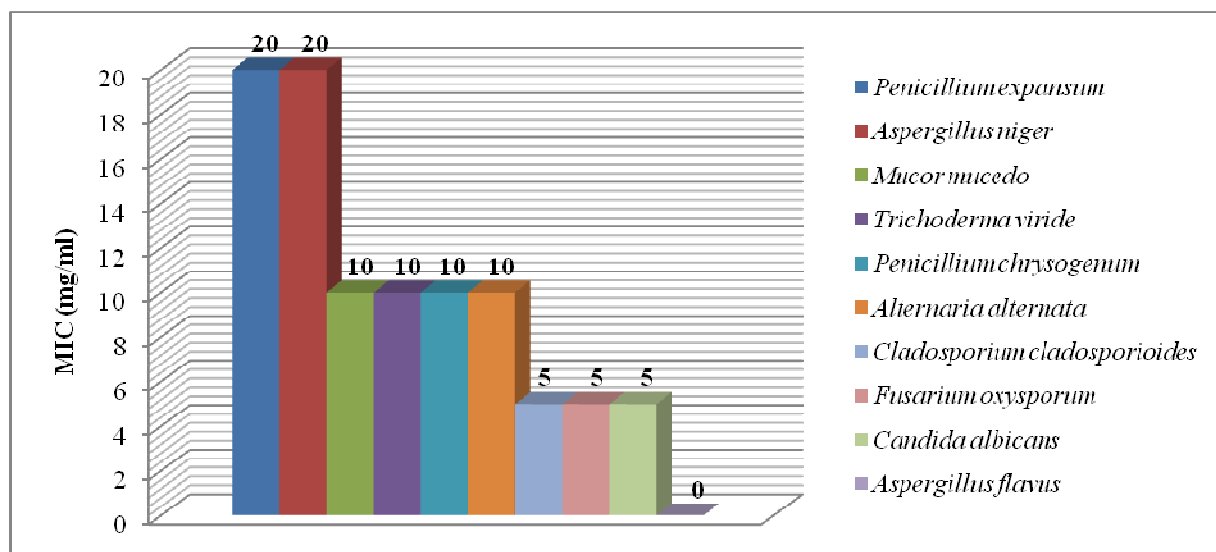
Сл. 76. Антифунгална активност екстракта врсте *Platismatia glauca*

Антибактеријска и антифунгална активност екстракта врсте *Pleurosticta acetabulum*

Екстракт врсте *Pleurosticta acetabulum* је антибактеријску активност испољио у концентрацији од 1.25 до 20 mg/ml (сл. 77). Врста *Escherichia coli* показала се као резистентна на деловање екстракта.

Инхибиторна активност је уочена у односу на девет тестираних врста гљива. Резистентна на деловање екстракта била је врста *Aspergillus flavus*. MIC вредности кретале су се од 5 до 20 mg/ml (сл. 78). Међу тестираним врстама гљива највећу осетљивост показале су врсте *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium oxysporum* и *Candida albicans*.

Сл. 77. Антибактеријска активност екстракта врсте *Pleurosticta acetabulum*

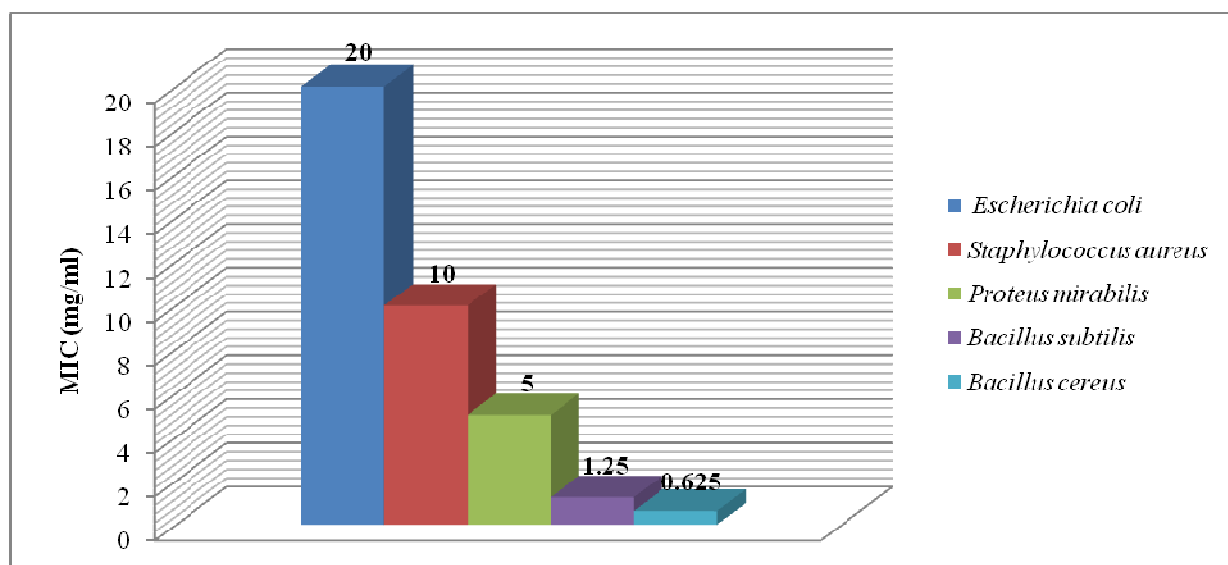


Сл. 78. Антифунгална активност екстракта врсте *Pleurosticta acetabulum*

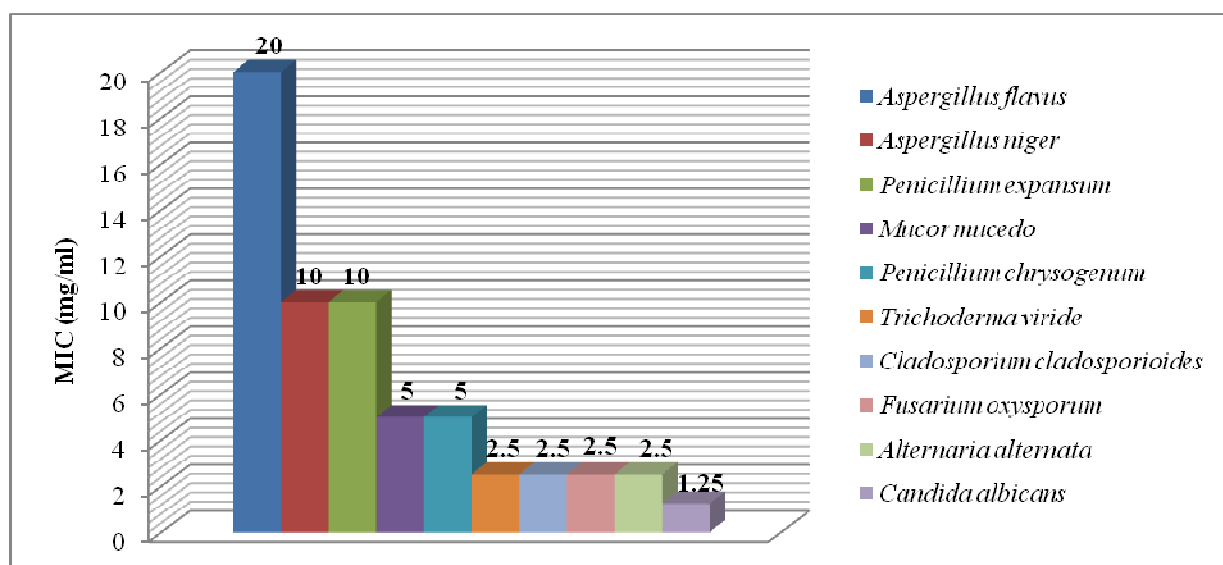
Антибактеријска и антифунгална активност екстракта врсте *Ramalina fastigiata*

Антибактеријска активност екстракта испољена је у концентрацијама од 0.625 до 20 mg/ml (сл. 79). Инхибиран је раст свих тестираних врста бактерија. Међу тестираним бактеријама најосетљивија је била врста *Bacillus cereus*.

Ацетонски екстракт врсте *Ramalina fastigiata* инхибирао је и раст свих тестираних врста гљива у концентрацијама од 1.25 до 20 mg/ml (сл. 80). Најмање резистентна врста гљива била је *Candida albicans*.



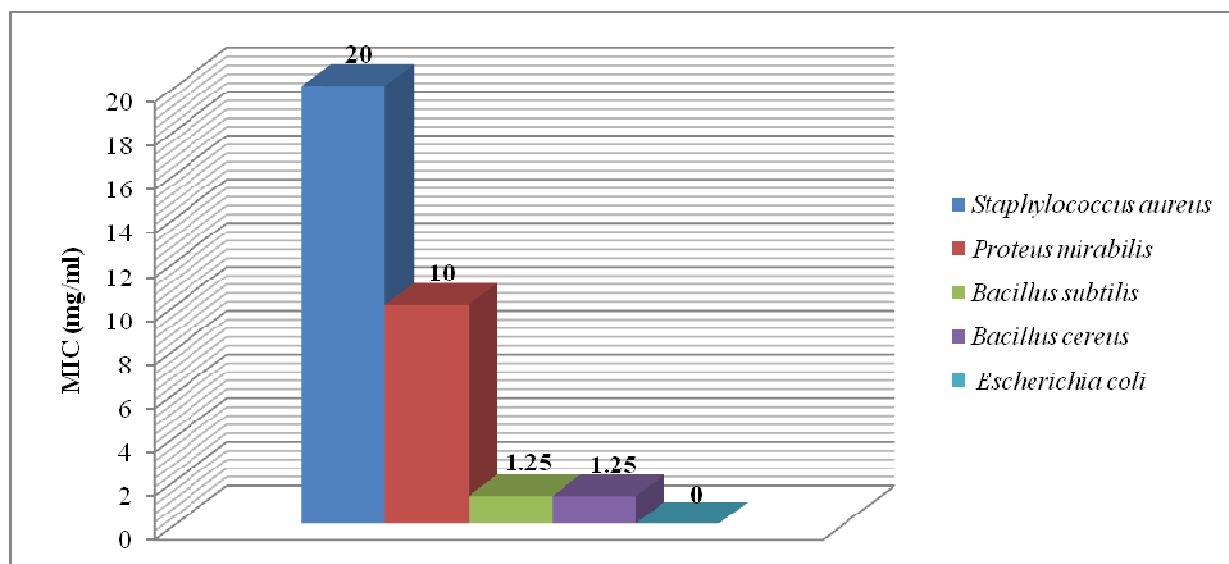
Сл. 79. Антибактеријска активност екстракта врсте *Ramalina fastigiata*



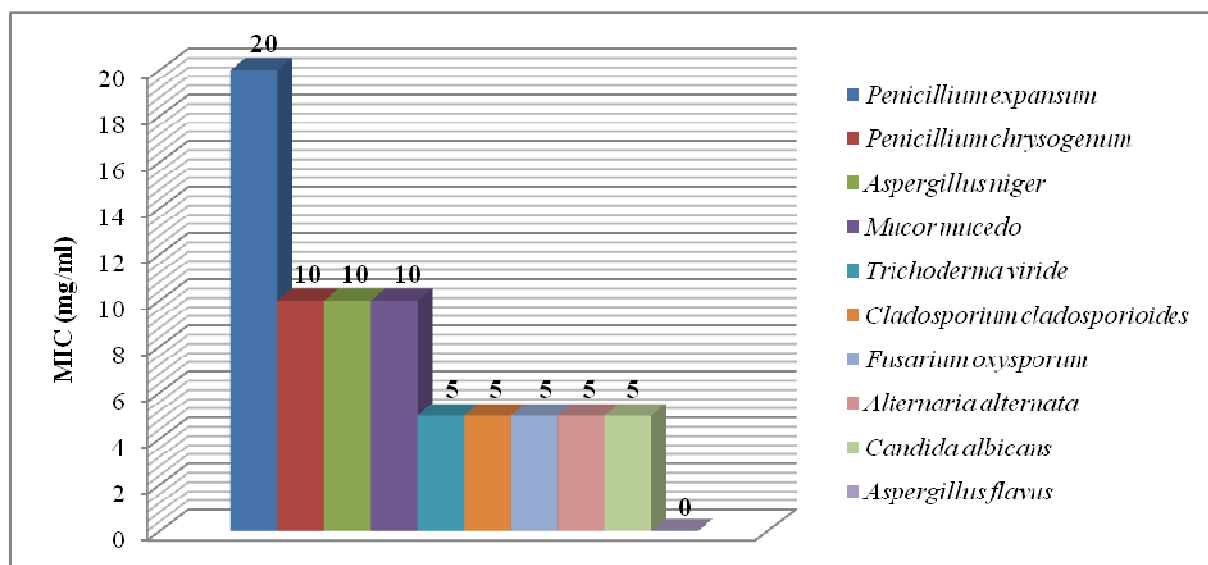
Сл. 80. Антифунгална активност екстракта врсте *Ramalina fastigiata*

Антибактеријска и антифунгална активност екстракта врсте *Ramalina fraxinea*

Екстракт врсте *Ramalina fraxinea* испољио је антибактеријску активност на четири врсте бактерија, изузев према врсти *Escherichia coli*, која је била резистентна на деловање екстракта. Измерене МИС вредности кретале су се од 1.25 до 20 mg/ml (сл. 81). Антифунгална активност била је слабија. МИС вредности варирале су од 5 до 20 mg/ml (сл. 82).

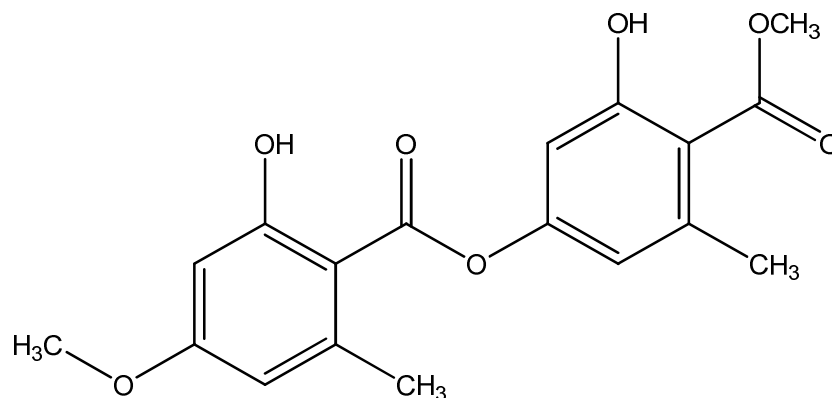


Сл. 81. Антибактеријска активност екстракта врсте *Ramalina fraxinea*



Сл. 82. Антифунгална активност екстракта врсте *Ramalina fraxinea*

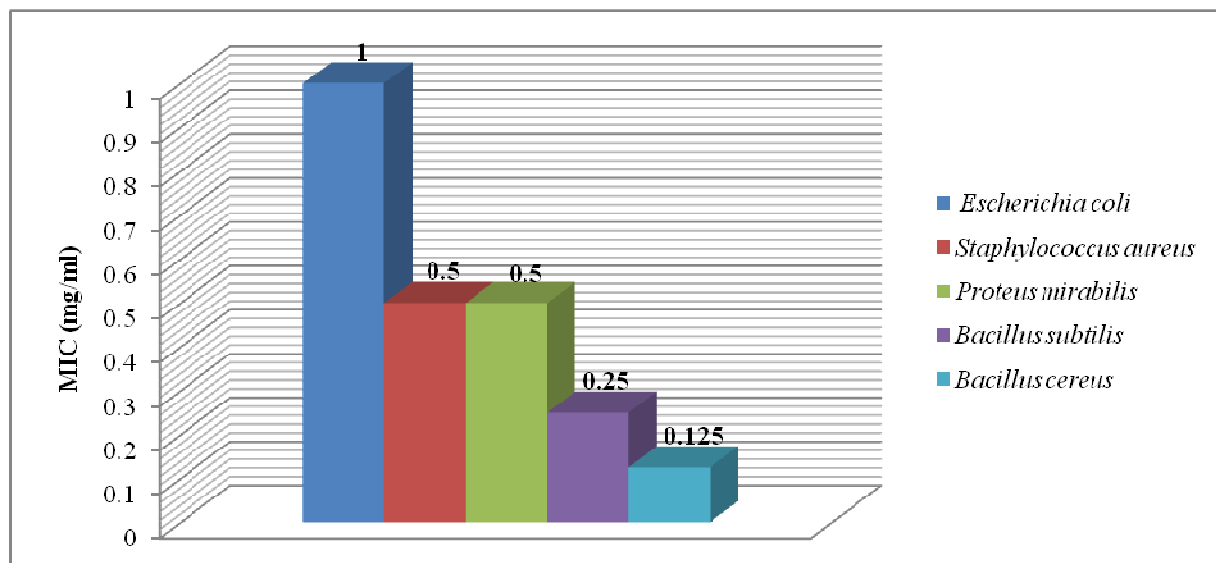
Антибактеријска и антифунгална активност супстанце methyl evernate изоловане из врсте *Ramalina fastigiata*



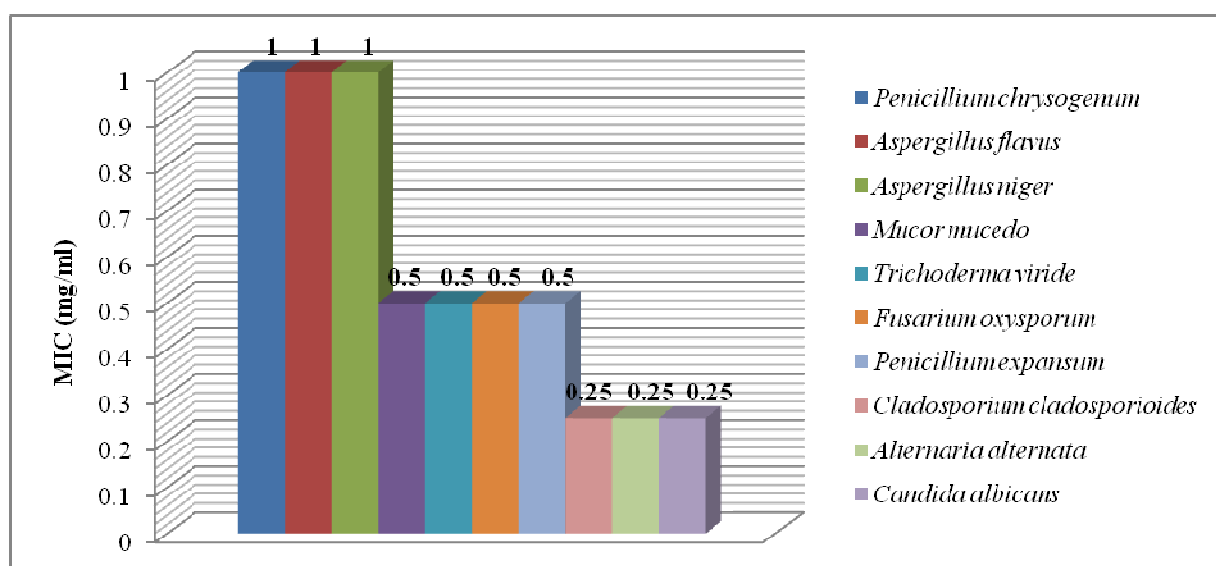
Сл. 83. Структурна формула супстанце methyl evernate

Молекулска формула: $C_{18}H_{18}O_7$

Супстанца methyl evernate изолована је из лишаја *Ramalina fastigiata* и спада у депсидоне. Ова супстанца испољила је снажну антибактеријску активност према свим тестираним врстама бактерија, инхибирајући њихов раст у концентрацијама од 0.125 до 1 mg/ml (сл. 84). Антифунгална активност супстанце је изражена измереним вредностима MIC, које су варирале од 0.25 до 1 mg/ml (сл. 85).

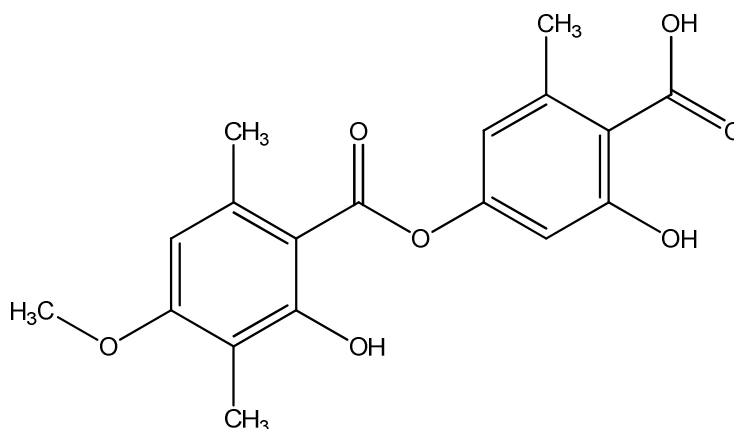


Сл. 84. Антибактеријска активност супстанце methyl evernate



Сл. 85. Антифунгална активност супстанце methyl evernate

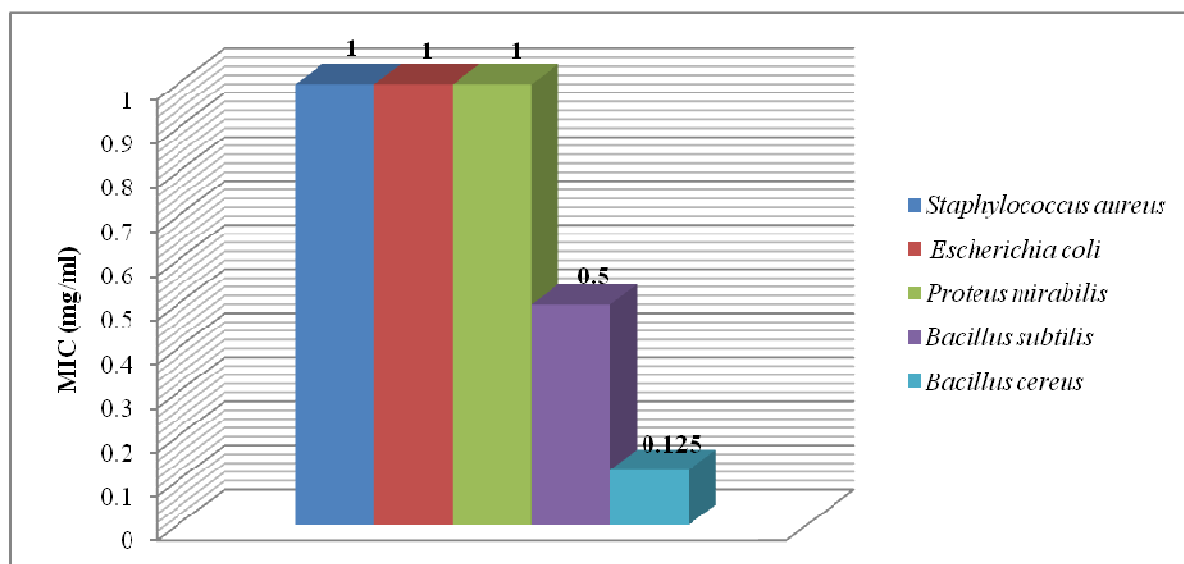
Антибактеријска и антифунгална активност супстанце *obtusis acid* изоловане из врсте *Ramalina fraxinea*



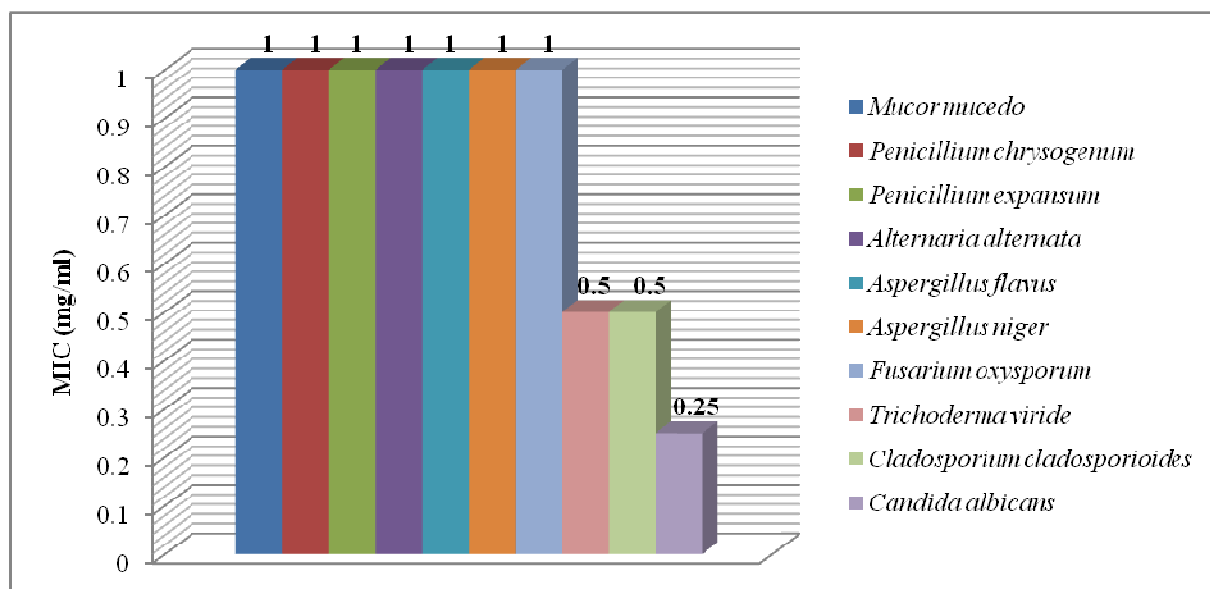
Сл. 86. Структурна формула супстанце *obtusis acid*

Молекулска формула: $C_{18}H_{18}O_7$

Obtusis acid је депсид изолован из лишаја врсте *Ramalina fraxinea*. Ова супстанца показала је антимикробну активност. Измерене МИС вредности према свим тестираним врстама бактерија варирале су од 0.125 до 1 mg/ml (сл. 87). Антифунгална активност супстанце изражена је инхибицијом свих тестираних врста гљива у концентрацијама од 0.25 до 1 mg/ml (сл. 88). Најосетљивија врста била је *Candida albicans*.

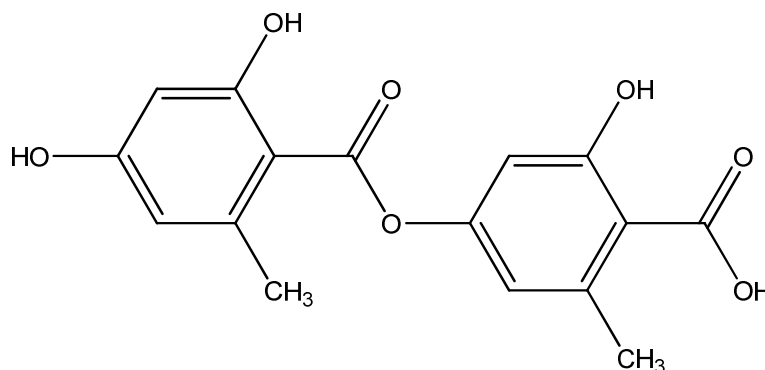


Сл. 87. Антибактеријска активност супстанце *obtusis acid*



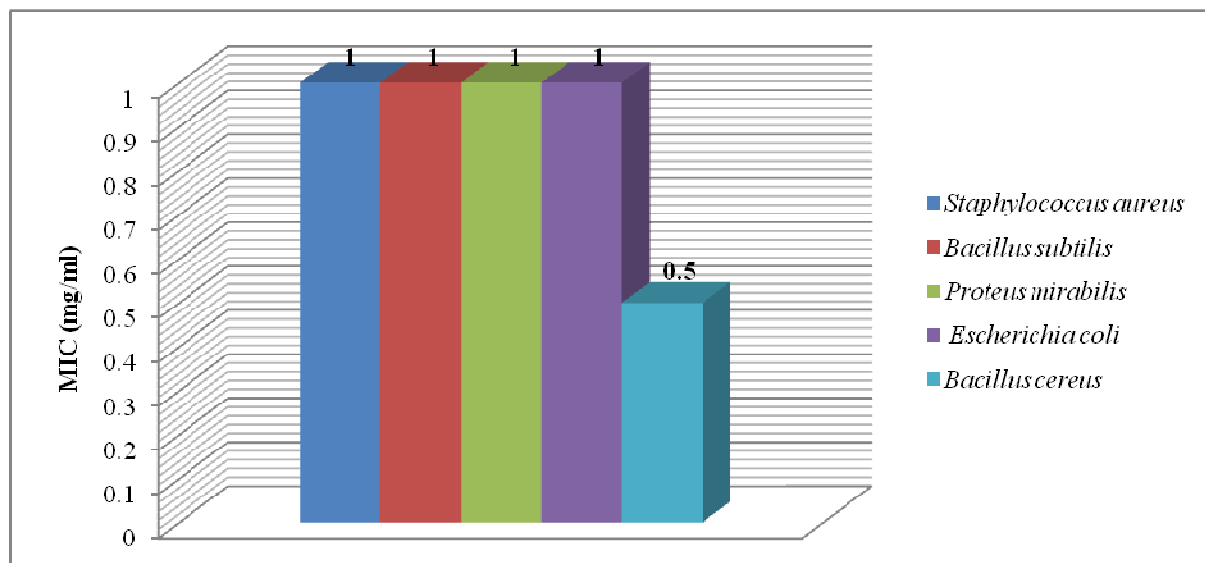
Сл. 88. Антифунгална активност супстанце obtusic acid

Антибактеријска и антифунгална активност супстанце *lesanoric acid* изоловане из врсте *Melanelixia subaurifera*

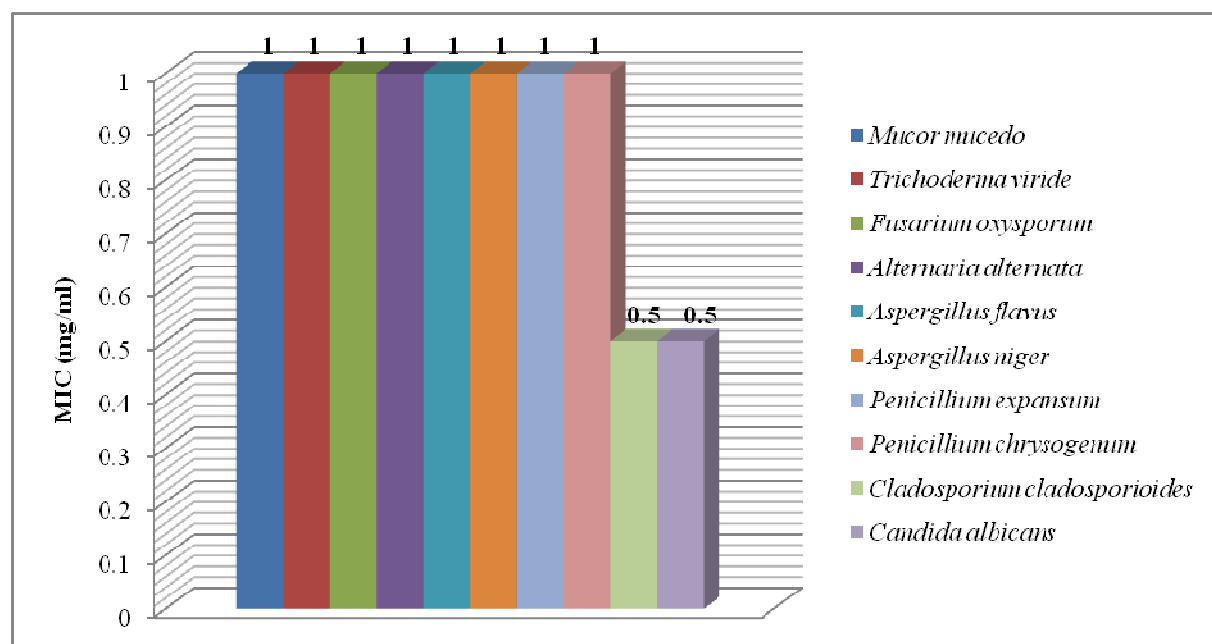
Сл. 89. Структурна формула супстанце *lesanoric acid*

Молекулска формула: $C_{16}H_{14}O_7$

Супстанца *lesanoric acid* изолована је из врсте *Melanelixia subaurifera*. Спада у депсиде. Ова супстанца карактерише се антимикуробном активношћу. Инхибиторно дејство испољила је према свим тестираним врстама бактерија и гљива, у концентрацијама које су се кретале од 0.5 до 1 mg/ml. МИС вредности према свим тестираним врстама бактерија износиле су 1 mg/ml, изузев врсте *Bacillus cereus* која је инхибирана концентрацијом 0.5 mg/ml (сл. 90). Највећу осетљивост међу тестираним врстама гљива показале су врсте *Candida albicans* и *Cladosporium cladosporioides* (сл. 91).

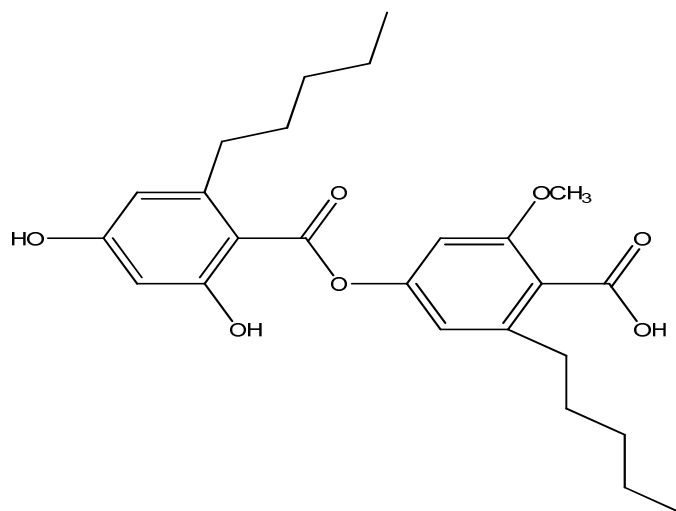


Сл. 90. Антибактеријска активност супстанце lecanoric acid



Сл. 91. Антифунгална активност супстанце lecanoric acid

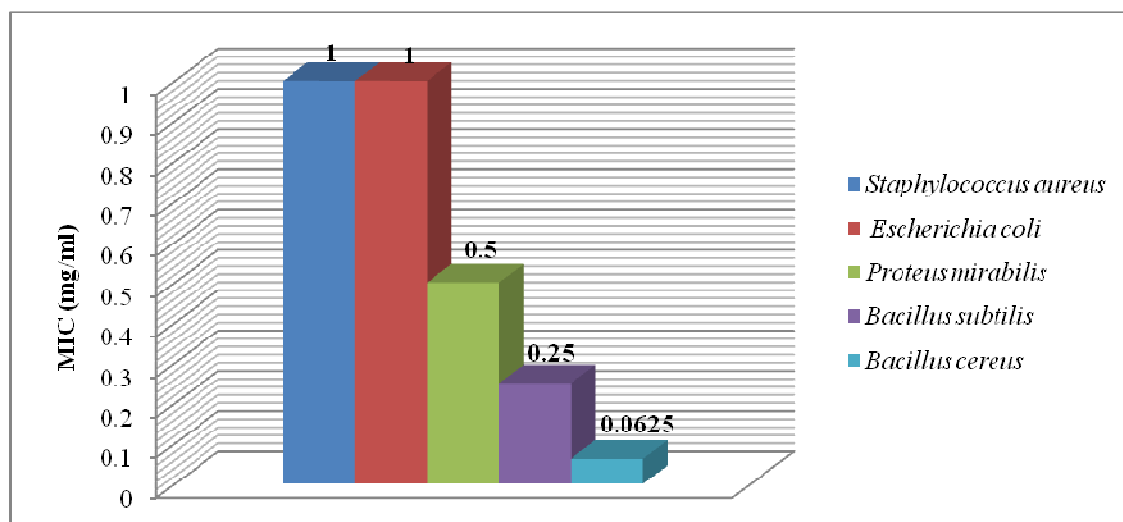
Антибактеријска и антифунгална активност супстанце 2'-O-methylaniziaic acid изоловане из врсте *Melanelixia fuliginosa*



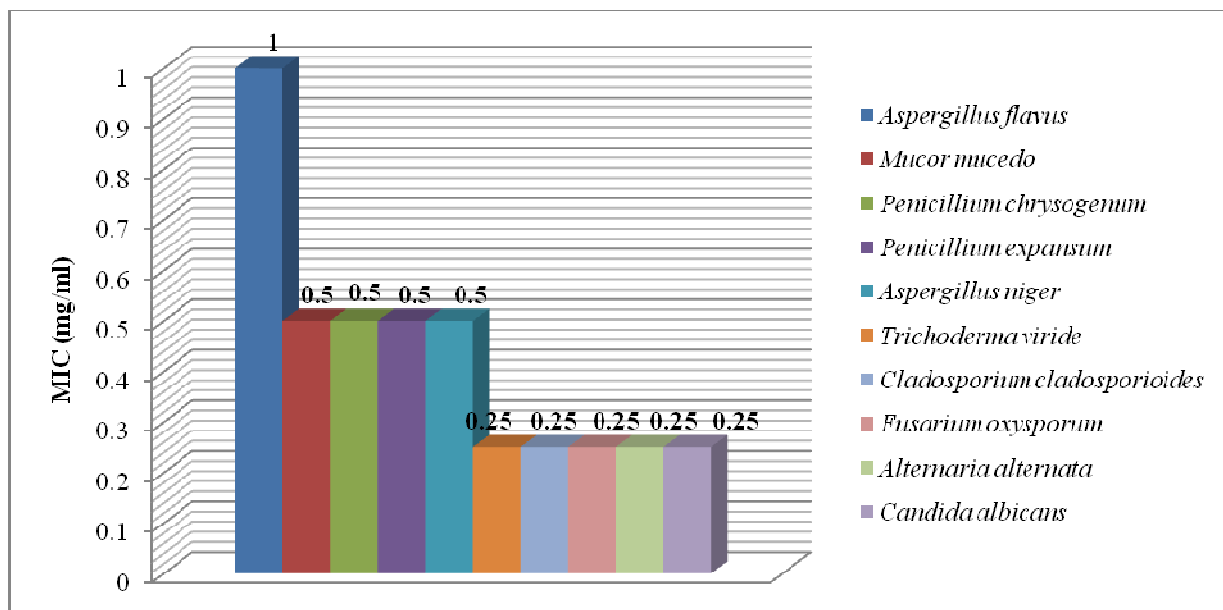
Сл. 92. Структурна формула супстанце 2'-O-methylaniziaic acid

Молекулска формула: $C_{25}H_{32}O_7$

Супстанца изолована из врсте *Melanelixia fuliginosa* испољила је снажно антибактеријско дејство. Деловањем супстанце инхибиран је раст свих тестираних врста бактерија у концентрацијама од 0.0625 до 1 mg/ml. Најосетљивија врста на дејство супстанце била је *Bacillus cereus* (сл. 93). Запажена је и јака антифунгална активност. Изолована супстанца деловала је инхибиторно на раст свих тестираних врста гљива. Вредности МИС кретале су се од 0.25 до 1 mg/ml (сл. 94).



Сл. 93. Антибактеријска активност супстанце 2'-O-methylaniziaic acid



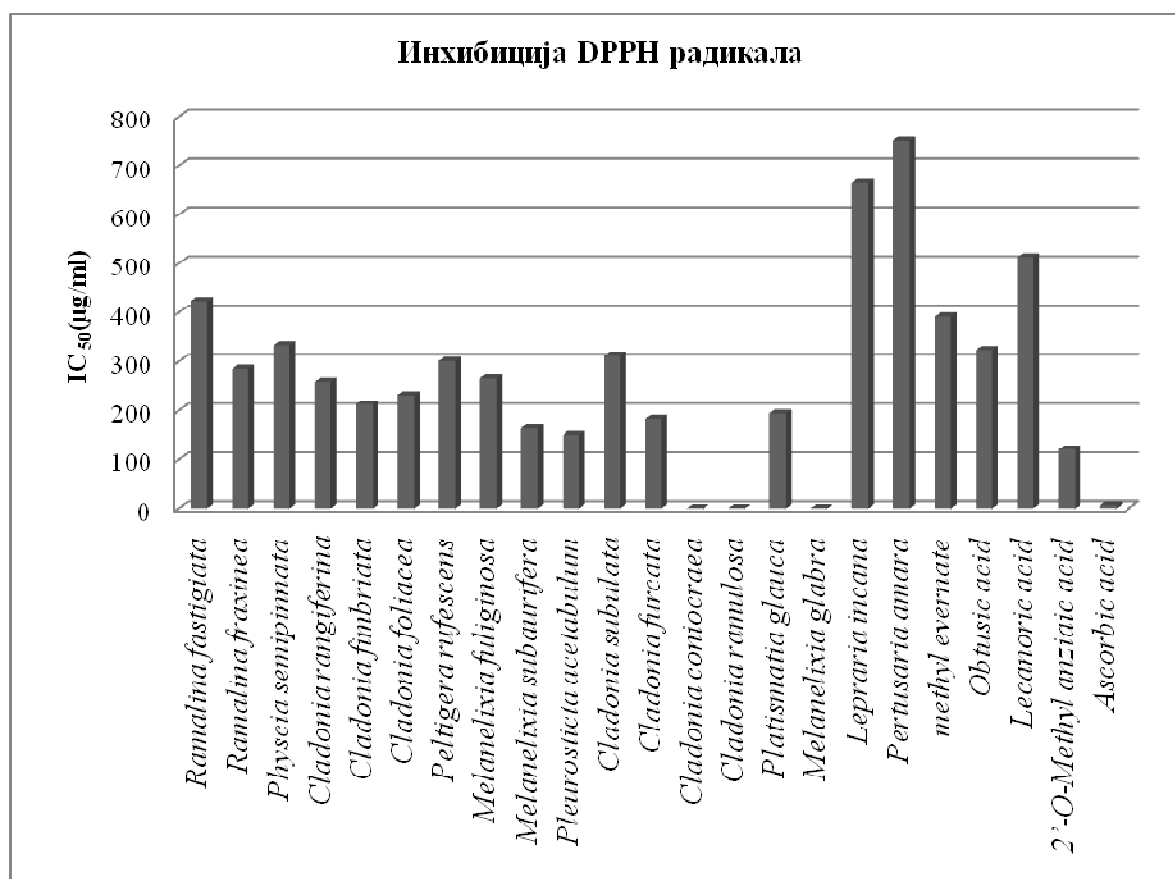
Сл. 94. Антифунгална активност супстанце 2'-O-methylanziaic acid

Антиоксидативна активност екстракта и изолованих компоненти испитиваних врста лишаја

Антиоксидативна способност испитиваних узорака одређивана је мерењем њихове ефикасности на стабилне 1,1-difenil-2pikrilhidrazil радикале (DPPH•); мерењем редукционог капацитета екстракта и одређивањем укупне количине фенола и флавоноида у екстрактима.

Утицај екстракта и изолованих компоненти на DPPH радикале

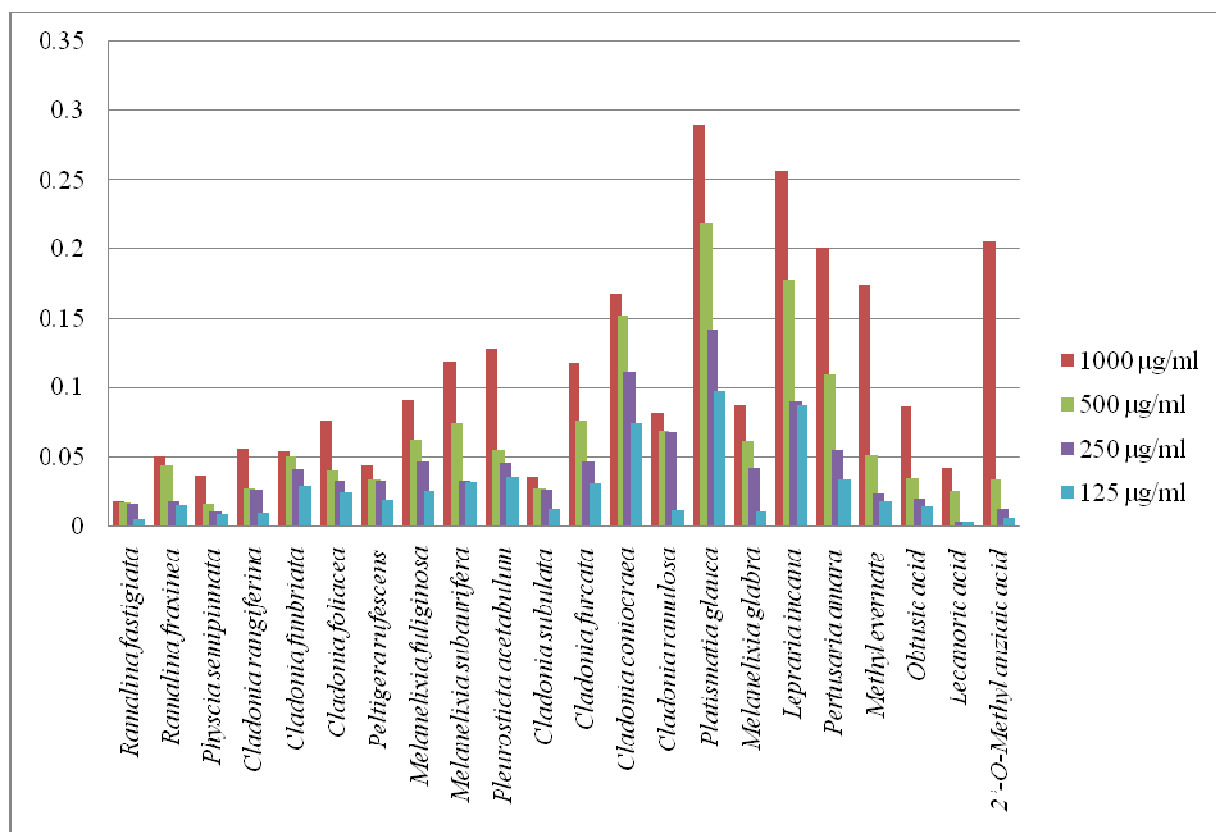
Екстракти лишаја и изолованих компоненти испољили су антирадикалску активност на стабилне DPPH радикале (таб. 16 и 17). Резултати су изражени као IC₅₀ вредност која представља концентрацију узорка која је потребна за неутрализацију 50% DPPH радикала. Супстанца 2'-O-methylanizic acid изолована из ацетонског екстракта врсте *Melanelixia fuliginosa*, испољила је најснажнији инхибиторни ефекат на DPPH радикале (IC₅₀ = 121.52 µg/ml) (таб. 17). Екстракти врста *Cladonia coniocraea*, *C. ramulosa* и *Melanelixia glabra* показали су најслабији утицај на DPPH радикале, јер су све тестиране концентрације инхибирале мање од 50% радикала (сл. 95).



Сл. 95. Утицај испитиваних узорака на инхибицију DPPH радикала

Редукциони капацитет екстраката испитиваних врста лишаја и њихових изолованих компоненти

Измерене вредности абсорбанце редукционог капацитета за ацетонске екстракте испитиваних врста лишаја и њихових изолованих компоненти кретале су се у опсегу од 0.2894 до 0.0043 (сл. 96). Најјачи редукциони капацитет показао је екстракт врсте *Platismatia glauca* у концентрацији од 1000 $\mu\text{g/ml}$.

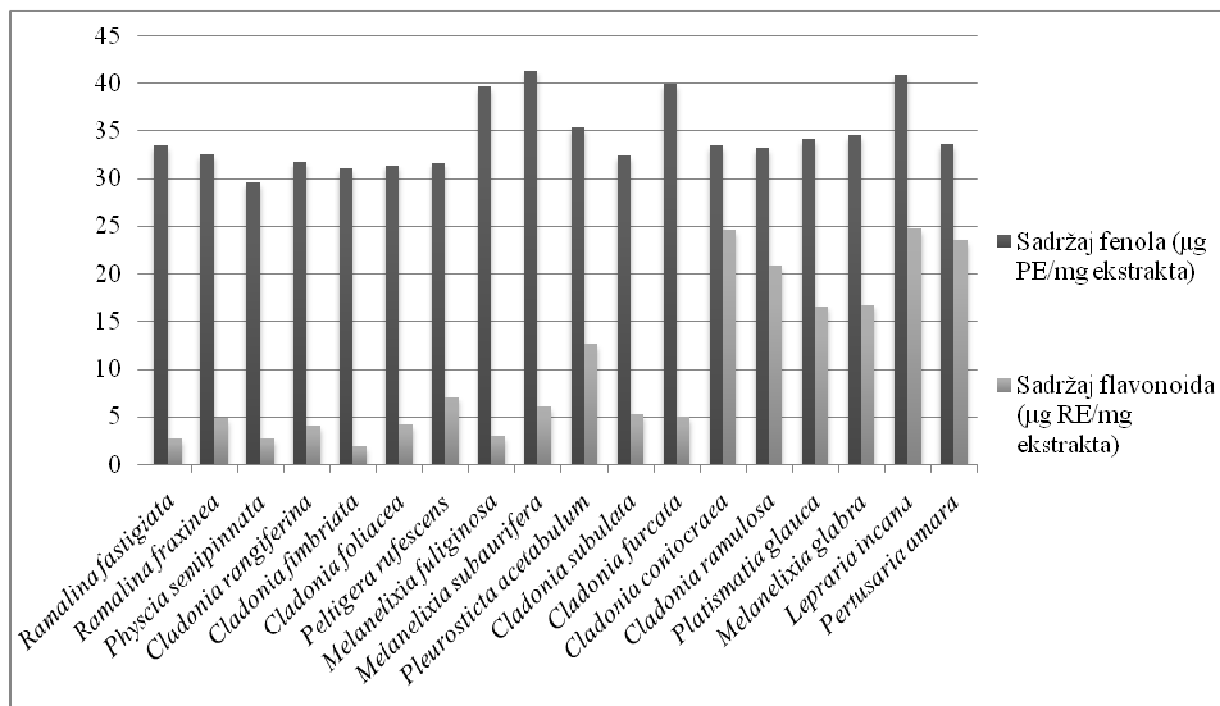


Сл. 96. Редукциони капацитет екстраката испитиваних врста лишаја и изолованих компоненти

Укупна количина фенола и флавоноида у екстрактима

Укупан садржај фенолних компоненти у испитиваним екстрактима варирао је од 29.54 до 41.33 $\mu\text{g RE/mg}$ екстракта (сл. 97). Највећи садржај фенолних компоненти забележен је код екстракта врсте *Melanelixia subaurifera* (41.33 $\mu\text{g RE/mg}$ екстракта) (таб. 16).

Садржај укупних флавоноидних једињења у екстрактима варирао је у опсегу од 1.89 до 24.74 $\mu\text{g RE/mg}$ екстракта (сл. 97). Највећи садржај флавоноида имао је ацетонски екстракт врсте *Lepraria incana* (24.74 $\mu\text{g RE/mg}$ екстракта).



Сл. 97. Садржај укупних фенола и флавоноида у екстрактима испитиваних врста лишаја

Таб. 16. Анализа антиоксидативне активности екстракта тестираних врста лишаја

Екстракти лишаја	Инхибиција DPPH радикала IC ₅₀ (µg/ml)	Редукциони капацитет (nm)				Садржај укупних фенола (µg)	Садржај укупних флавоноида (µg)
		1000 µg/ml	500 µg/ml	250 µg/ml	125 µg/ml		
<i>Cladonia coniocraea</i>	>1000	0.1675	0.1521	0.1118	0.0734	33.53	24.54
<i>Cladonia fimbriata</i>	213.48	0.0543	0.0507	0.0403	0.0284	31.03	1.89
<i>Cladonia foliacea</i>	232.21	0.0763	0.0394	0.0321	0.0239	31.46	4.21
<i>Cladonia furcata</i>	183.41	0.1178	0.0764	0.0465	0.0307	39.86	4.93
<i>Cladonia ramulosa</i>	>1000	0.0815	0.0683	0.0672	0.0118	33.19	20.86
<i>Cladonia rangiferina</i>	259.26	0.0558	0.0267	0.0258	0.0100	31.74	4.08
<i>Cladonia subulata</i>	312.56	0.0347	0.0273	0.0258	0.0130	32.39	5.20
<i>Lepraria incana</i>	664.23	0.2562	0.178	0.0904	0.0875	40.81	24.74
<i>Melanelixia fuliginosa</i>	266.32	0.0905	0.0623	0.0468	0.0252	39.68	2.97
<i>Melanelixia glabra</i>	>1000	0.0873	0.0612	0.0421	0.0105	34.60	16.70
<i>Melanelixia subaurifera</i>	165.13	0.1189	0.0744	0.0327	0.0316	41.33	6.02
<i>Peltigera rufescens</i>	301.42	0.0444	0.0336	0.0324	0.0188	31.68	7.07
<i>Pertusaria amara</i>	750.50	0.2010	0.1101	0.0552	0.0336	33.67	23.60
<i>Physcia semipinnata</i>	334.28	0.0359	0.0166	0.0111	0.0089	29.54	2.70
<i>Platismatia glauca</i>	194.30	0.2894	0.2183	0.1422	0.0972	34.11	16.58
<i>Pleurosticta acetabulum</i>	151.01	0.1274	0.0552	0.0462	0.0353	35.39	12.74
<i>Ramalina fastigiata</i>	423.51	0.0180	0.0174	0.0163	0.0043	33.49	2.76
<i>Ramalina fraxinea</i>	285.45	0.0501	0.0444	0.0180	0.0149	32.63	4.82

Таб. 17. Анализа антиоксидативне активности супстанци изолованих из тестираних врста лишаја

Активне супстанце	Инхибиција DPPH радикала IC ₅₀ (µg/ml)	Редукциони капацитет (nm)			
		1000 µg/ml	500 µg/ml	250 µg/ml	125 µg/ml
Methyl evernate	391.57	0.1747	0.0513	0.0233	0.0177
Obtusic acid	324.61	0.0860	0.0344	0.0198	0.0142
Lecanoric acid	513.48	0.0426	0.0248	0.0026	0.0023
2'-O-Methylanziatic acid	121.52	0.2048	0.0335	0.0128	0.0056
*Ascorbic acid	6.42	2.113	1.654	0.0957	0.0478

*Ascorbic acid је коришћена као позитивна контрола

Антиканцерогена активност екстракта и изолованих компоненти испитиваних врста лишаја

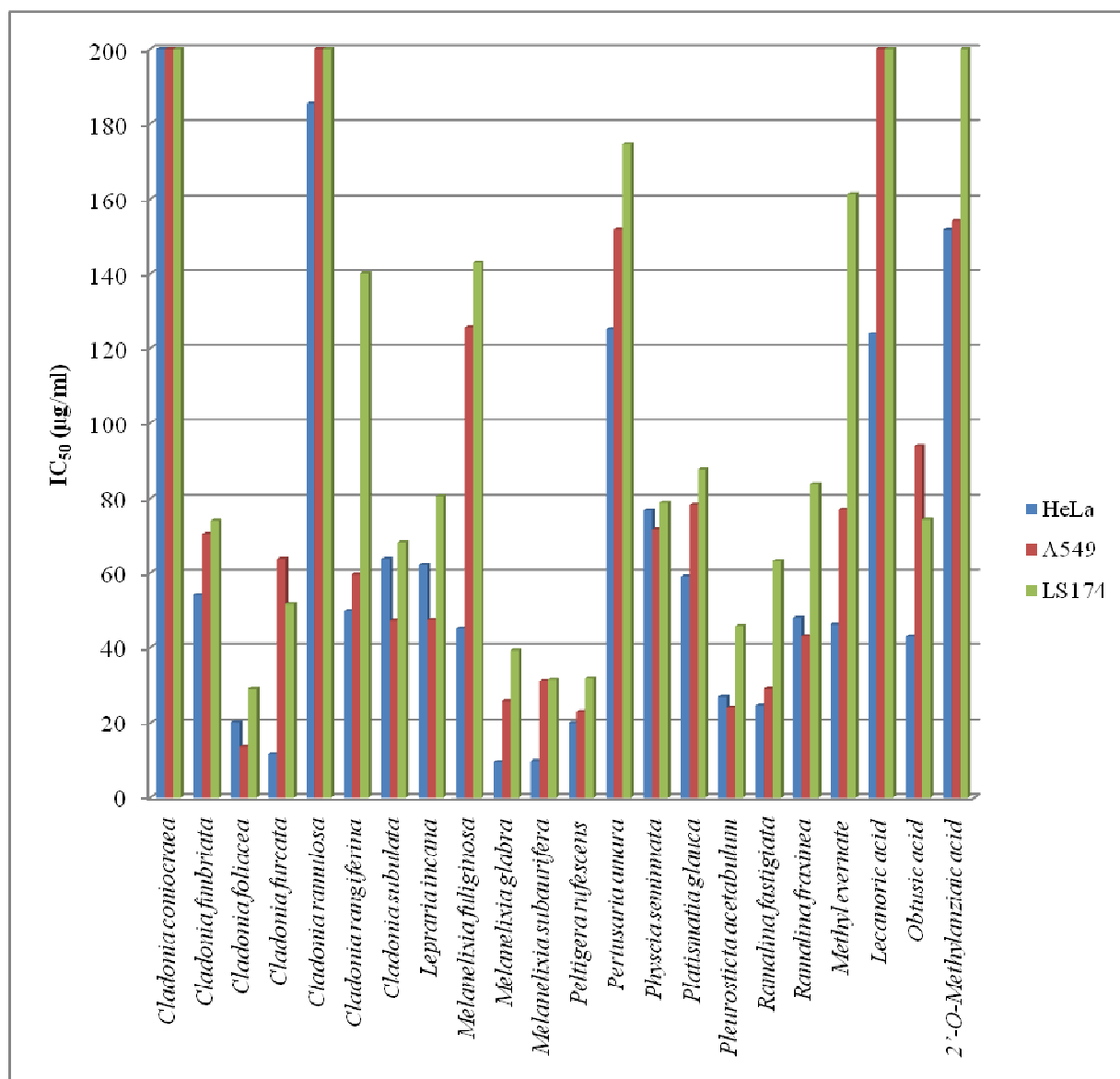
Антиканцерогена активност тестираних екстракта лишаја као и њихових изолованих супстанци испитивана је у односу на ћелије епителијалног карцинома цервикса (HeLa), ћелије хуманог карцинома плућа (A549) и ћелије хуманог карцинома колоне (LS174), након чега су израчунате IC₅₀ вредности (концентрације испитиваних узорака које инхибирају 50% ћелијског раста).

Тестирани ацетонски екстракти и изоловане компоненте показали су релативно јаку антиканцерогену активност према циљним ћелијским линијама (таб. 18). Израчунате IC₅₀ вредности показале су да је најизраженија антиканцерогена активност пронађена код екстракта врсте *Melanelixia glabra* према HeLa ћелијским линијама (9.61 µg/ml) (сл. 98). Према A549 и LS174 ћелијским линијама најснажнији ефекат имао је екстракт врсте *Cladonia foliacea* (13.58 µg/ml и 28.98 µg/ml). Најслабије антиканцерогено дејство, према свим тестираним ћелијским линијама, испољио је екстракт врсте *Cladonia coniocraea*. Компонента lecanoric acid, изолована из екстракта врсте *Melanelixia subaurifera*, показала је најслабију антиканцерогену активност према A549 и LS174 ћелијским линијама, као и екстракт врсте *Cladonia ramulosa*.

Таб. 18. IC₅₀ (µg/ml) вредности екстраката и њихових изолованих супстанци у односу на HeLa, A549 и LS174 малигне ћелије
(Тестирани узорци су инкубирани са ћелијама током 72 h)

Тестирани узорци	IC ₅₀ (µg/ml)*		
	HeLa	A549	LS174
<i>Cladonia coniocraea</i>	>200	>200	>200
<i>Cladonia fimbriata</i>	54.08 ± 0.81	70.45 ± 1.84	73.96 ± 1.11
<i>Cladonia foliacea</i>	20.27 ± 1.25	13.58 ± 0.39	28.98 ± 1.65
<i>Cladonia furcata</i>	11.69 ± 0.45	63.67 ± 0.58	51.61 ± 0.37
<i>Cladonia ramulosa</i>	185.59 ± 1.27	>200	>200
<i>Cladonia rangiferina</i>	49.83 ± 2.16	59.62 ± 0.67	140.13 ± 2.61
<i>Cladonia subulata</i>	63.68 ± 2.05	47.33 ± 2.71	68.29 ± 2.43
<i>Lepraria incana</i>	62.15 ± 0.73	47.53 ± 0.86	80.57 ± 0.28
<i>Melanelixia fuliginosa</i>	45.24 ± 1.23	125.76 ± 2.11	142.87 ± 2.07
<i>Melanelixia glabra</i>	9.61 ± 0.29	25.77 ± 1.34	39.28 ± 0.71
<i>Melanelixia subaurifera</i>	9.88 ± 0.56	31.25 ± 1.02	31.64 ± 1.55
<i>Peltigera rufescens</i>	20.07 ± 1.52	22.99 ± 2.19	32.01 ± 0.69
<i>Pertusaria amara</i>	125.29 ± 1.56	151.91 ± 1.79	174.69 ± 2.04
<i>Physcia seminnata</i>	76.62 ± 1.18	71.71 ± 1.92	78.93 ± 0.53
<i>Platismatia glauca</i>	59.10 ± 0.46	78.38 ± 1.52	87.63 ± 1.03
<i>Pleurosticta acetabulum</i>	26.94 ± 1.54	24.09 ± 0.36	45.94 ± 1.28
<i>Ramalina fastigiata</i>	24.63 ± 0.39	29.01 ± 1.16	63.13 ± 1.25
<i>Ramalina fraxinea</i>	48.08 ± 1.75	43.31 ± 0.38	83.77 ± 1.11
Methyl evernate	46.35 ± 1.15	76.84 ± 0.92	161.37 ± 2.54
Lecanoric acid	123.97 ± 2.06	>200	>200
Obtusic acid	43.24 ± 0.51	93.98 ± 2.97	74.28 ± 2.57
2'-O-Methylanziaic acid	151.79 ± 2.72	154.11 ± 3.58	>200
cis-DDP	0.83 ± 0.19	3.56 ± 0.23	2.58 ± 0.16

*IC₅₀ вредности су приказане као средња вредност ± стандарна грешка, одређене МТТ тестом три независна експеримента.



Сл. 98. Вредности IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) за 72 h деловања испитиваних узорaka на HeLa, A549 и LS174 ћелије, одређене MTT тестом.

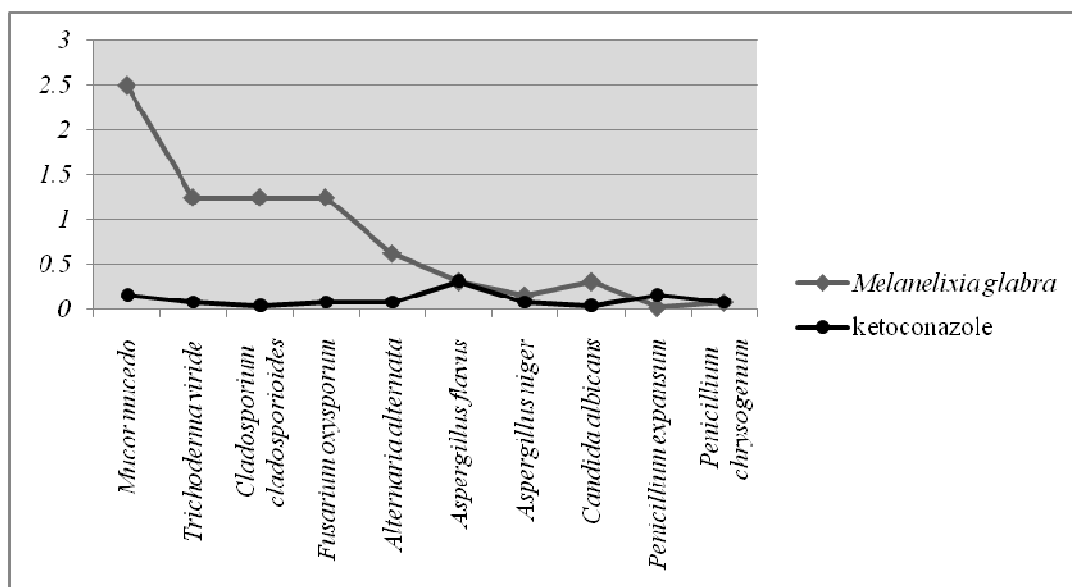
Компаративна анализа биомедицинског потенцијала испитиваних узорака

У овом раду најснажнију антибактеријску активност према тестираним врстама бактерија испољио је ацетонски екстракт врсте *Melanelixia glabra*. Основни критеријуми за одређивање јачине антибактеријског ефекта представљају МИС вредности, као и број тестираних врста бактерија на које је константован антибактеријски ефекат. Јако антибактеријско дејство испољили су и екстракти врста *Lepraria incana* и *Cladonia coniocraea*. Насупрот томе, најслабију антибактеријску активност испољили су екстракти врста *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *M. subaurifera*.

Највећу осетљивост на дејство екстраката лишаја и изолованих биоактивних супстанци, показала је бактеријска врста *Bacillus cereus* чији је раст инхибиран екстрактима свих врста лишаја, као и изолованим супстанцама, са измереним изузетно ниским МИС вредностима које су варирале од 0.125 до 10 mg/ml.

Најотпорнија на деловање екстраката лишаја и изолованих биоактивних супстанци била је врста *Escherichia coli* која је показала резистентност према седам врста лишаја: *Cladonia foliacea*, *C. rangiferina*, *C. subulata*, *Melanelixia subaurifera*, *Physcia semipinnata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Ramalina fraxinea*.

Антифунгална активност тестираних узорака такође је уочена. Најјачу антифунгалну активност показао је екстракт врсте *Melanelixia glabra*. Важно је нагласити да је екстракт ове врсте лишаја одреаговао инхибиторно на гљиве *Aspergillus flavus* и *Penicillium chrysogenum* једнако добро, као и стандардни антимицотик кетоконазол, који је у овом раду коришћен као позитивна контрола. Наиме, ради се о измереним једнаким вредностима МИС стандардног антимицотика и екстракта лишаја. Осим тога, још је од веће важности да је екстракт врсте *M. glabra* одреаговао инхибиторно на гљиву *Penicillium expansum* при чему је измерена вредност МИС екстракта нижа у односу на вредност МИС стандардног антимицотика кетоконазол (сл. 99).



Сл. 99. Компаративни приказ антифунгалне активности екстракта врсте *Melanelixia glabra* и стандардног антимицотика-кетоконазол

Најосетљивија на дејство екстраката лишаја била је врста *Candida albicans*, чији је раст инхибиран под утицајем екстраката свих тестираних врста лишаја у концентрацијама од 0.156 до 5 mg/ml. Најснажније инхибиторно дејство на раст врсте *Candida albicans*, испољио је екстракт лишаја *Lepraria incana* (МИС вредност је износила 0.156 mg/ml).

Насупрот томе, најрезистентнија врста гљиве била је *Aspergillus flavus* која се показала као резистентна на дејство највише тестиране концентрације следећих врста лишаја: *Cladonia fimbriata*, *C. foliacea*, *C. furcata*, *C. rangiferina*, *Melanelixia subaurifera*, *Physcia semipinnata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Ramalina fraxinea*.

5. ДИСКУСИЈА

Лишаји су широко распрострањени организми који имају велики значај. У овом истраживању лишаји су посматрани са аспекта биоиндикације квалитета ваздуха као организми индикатори и са аспекта потенцијалних извора биоактивних супстанци.

Процена стања квалитета ваздуха вршена је на истраживаним подручјима која припадају Топличком региону, прецизније на подручјима Луковске, Куршумлијске и Пролом бање, Радан планине и града Куршумлије. Анализиран је и биомедицински потенцијал изабраних врста лишаја чије је присуство константовано на истраживаном подручју.

Анализа добијених резултата и компарација са резултатима ранијих истраживања биоиндикације

Представљени резултати указују на податак да је испитивањем обухваћено укупно 75 истраживаних тачака, по 15 истраживаних тачака на сваком подручју (**таб. 1**).

Анализом константованих лишаја на истраживаним подручјима уочено је присуство 88 таксона лишаја представника 34 рода (**таб. 8**). На основу тога можемо закључити да се ради о територији која се одликује богатим диверзитетом лишаја. Томе у прилог говоре и раније спроведена истраживања. Наиме, ранијим истраживањем лишаја планине Радан спроведеним са циљем прикупљања података о диверзитету лишаја евидентирано је 65 врста лишаја из 37 родова (Dimović, 2001). С обзиром да је поменуто истраживање било временски ограничено на шест дана, истиче се значај добијених података. Међутим, поређењем са резултатима овог рада где је на планини Радан забележено присуство 76 врста лишаја из 34 рода, уочавају се промене у саставу и броју врста. Stamenković (1997) износи да је на урбаном подручју града Прокупља, забележено присуство 29 врсте лишаја из 17 родова. Поређењем са бројем врста константованих у граду Куршумлији где је евидентирано 42 врсте лишаја из 23 рода, запажамо да се урбаном подручје града Куршумлије одликује већим диверзитетом лишаја.

Константовано је присуство саксиколних, териколних и епифитних врста лишаја. Најбројније су биле епифитне врсте које чине 76% од укупног броја врста. Половина константованих епифитних врста одликује се листовитим типом талуса. Забележено је и присуство 27 врста лишаја које имају корасте тип талуса и седам врста лишаја са жбунастим типом талуса.

Stamenković (2004) у свом раду истиче да су врсте лишаја са жбунастим типом талуса најосетљивије на аерозагађење. Ове лишајске врсте у урбаним срединама прве нестају јер имају велику површину изложу спљошним утицајима. Однос површине талуса према запремини је већи, тј. што је површина талуса већа у односу на његову запремину, лишај је осетљивији. Лишаји листовитог типа талуса су интермедијалног карактера, док су лишаји са корастим типом талуса најотпорнији на аерозагађење (Stamenković, 2004). Резултати овог истраживања приказују да је забележено присуство лишаја свих основних морфолошких типова талуса, односно лишаја са корастим, листовитим и жбунастим типом талуса (**таб. 8**) на свим истраживаним подручјима, али је број и фреквентност врста на истраживаним тачкама у граду Куршумлији знатно нижи у односу на број и фреквентност врста константованих на тачкама у осталим подручјима (**таб. 9-13-прилог**). Ови подаци могу дати индикације о слабијем квалитету ваздуха у истраживаном подручју града Куршумлије у односу на остала истраживана подручја, што свакако захтева детаљнија и темељнија истраживања.

Подлога је унификована колико су то дозвољавале могућности. Иако је истоврсна подлога један од пожељних предуслова за спровођење истраживања биоиндикације квалитета ваздуха коришћењем лишаја, то у овом случају није могло бити сасвим задовољено с обзиром да су постојећи супстрати у истраживаним насељима релативно хетерогени. У истраживању су коришћени лишаји са више различитих супстрата ради добијања комплетнијих података о распрострањености и разноврсности врста, па на тај начин и потпунијег приказа процене стања квалитета ваздуха. Осим тога, истраживања лишаја у Луковској, Куршумлијској, Пролом бањи и у граду Куршумлији спроведена су први пут, па се евидентирањем присуства таксона на различитим супстратима даје допринос проширивању знања о биогеографији и диверзитету лишаја.

Евидентирано је присуство различитих врста и вредности њихових покровности на свакој истраживаној тачки на основу чега су добијене веома високе IAP вредности, које су се кретале од 10 до 75 (**таб. 9-13-прилог**). Ради добијања комплетније слике о стању истраживаних подручја израчунате су и вредности индекса антропогеног утицаја-ИИ. На основу резултата компаративне анализе забележено је да су вредности ова два индекса обрнуто пропорционалне (**сл. 37**). На истраживаним тачкама које се карактеришу вишим ИИ вредностима већи је ниво антропогеног утицаја док је квалитет ваздуха лошији. Ове тачке углавном припадају граду Куршумлији односно урбаном, антропогено измењеном подручју. Супротно, на истраживаним тачкама које се одликују нижим ИИ вредностима мањи је антропогени утицај, па се подручје у оквиру кога се налазе поменуте истраживане тачке одликује квалитетнијим ваздухом. Компаративна анализа варирања вредности IAP и ИИ, спроведена је раније од стране Gombert et al. (2004) у чијем истраживању није уочена јасна корелација између вредности ова два индекса.

Вредности ИИ на територији Луковске бање кретале су се од 5 до 24 (**таб. 14-прилог**). Најнижа ИИ вредност израчуната је на тачки 6, док је највиша ИИ вредност израчуната на тачки 1. Овакви резултати су и очекивани сходно локацији истраживаних тачака. На мапи се јасно уочава да се тачка 1 налази у централном делу бањског насеља непосредно поред хотела „Копаник”, где је већи степен урбанизације, али и интензитет саобраћаја.

На основу израчунатих вредности ИИ за подручје Куршумлијске бање закључујемо да на овом подручју нема значајног антропогеног утицаја. Томе говори у прилог и податак да је ово подручје веома слабо насељено. Према последњем попису у Куршумлијској бањи живи само 106 становника (Републички завод за статистику). Један од разлога овако слабе насељености могу бити интензивне миграције становништва, услед престанка са радом некада туристички најатрактивнијег рехабилитационог центра и лечилишта (**сл. 11**).

Најнижа вредност ИИ израчуната је на тачки 39, док је највиша вредност израчуната на тачки 33 (**таб. 14-прилог**). Од пресудног значаја за добијање оваквих резултата јесу разлике у вредностима параметра који приказује степен локалног развоја. Тачка 39 налази се у оквиру зелене површине, док насупрот томе, тачка 33 налази се у оквиру паркинга хотела „Радан”.

За подручје Радан планине нису израчунате вредности ИИ, имајући у виду да се ради о веома ретко насељеном подручју, па не можемо употребити параметре који воде до израчунавања вредности индекса антропогеног утицаја: степен урбанизације, интензитет саобраћаја, локални развој и експозиција. Међутим, важно је напоменути да антропогени утицај има важну улогу и на овом подручју.

Утицај неадекватног коришћења природних ресурса у оквиру подручја Радан планине може имати вишеструке негативне ефекте на подручје и огледа се у активностима непланске сече шума, нерационалног и неадекватног коришћења пољопривредног земљишта, експлоатације минералних сировина и угрожавања зона санитарне заштите вода. Интензивно крчење шума на подручју Радан планине ради добијања пољопривредног земљишта, а пре свега ораница и пашњака, и ради продаје дрвета започело је у XX веку. Степен деградације, односно степен очуваности ових шума произлази из претходно дате анализе (сл. 13) која се огледа у високом проценту изданаких шума, као и у проценту шикара и шибљика, који представљају још један вид регресивне сукцесије, чиме је истовремено процент високих шума као најквалитетнијих, најочуванијих и најпродуктивнијих смањен. Након поређења података по појединачним шумским газдинствима за шумска газдинства Лесковац и Куршумлија, могло би се закључити да територија Лесковца иако у укупној површини заштићених државних шума за планину Радан учествује са 3.2 пута мањом површином, по вредности шума, њиховом квалитету и производним могућностима ове шуме су очуваније од шума са територије Куршумлије (Jakšić i sar., 2002). На основу свега наведеног може се константовати да су шуме које се налазе на територији Топличког шумског подручја у лошијем стању и већем степену деградације у односу на шуме са територије Јабланичког шумског подручја.

Вредности ИИ су, очекивано, највеће у Куршумлији као урбаном екосистему (таб. 14-прилог). Кретале су се од 15 колико је израчунато на тачкама 72 и 73, до 36 колико је израчунато на тачкама 63 и 67. На мапи овог урбаног екосистема јасно се види да се тачке 72 и 73 налазе на самој периферији града, па је и очекивано да су на тим истраживаним тачкама и вредности индекса антропогеног утицаја најниже, јер се ради о нижем степену урбанизације. Када се говори о локалној развојености доминирају зелене површине, при чему су у погледу експозиције доминантне груписане дрвенасте биљне врсте које су у највећем броју случајева чиниле основни супстрат на коме су пронађени лишаци. Насупрот томе тачке 63 и 67 обухватају центар града, где је релативно јак интензитет саобраћаја, виши степен урбанизације, у погледу локалне развојености доминирају градски паркинзи и стамбена насеља, а када разматрамо параметар експозиције, приметно је да овде преовладавају индивидуално распоређене дрвенасте биљне врсте. Дакле, вредности свих параметара су видљиво увећане, па одатле и веће вредности ИИ. Добијени резултати били су очекивани, с обзиром да и друга раније спроведена истраживања указују на идентичну ситуацију у другим земљама (Pacheco et al., 2008; Larsen et al., 2007).

Многа истраживања квалитета ваздуха заснована су на испитивању лишцаја, од чега је у већем броју радова описан степен квалитета ваздуха тј. ниво квалитета ваздуха у урбаним подручјима (Blasco et al., 2008; Calvelo et al., 2009; Kaeffer et al., 2011; Lisowska, 2011; Kirschbaum et al., 2012; Gerdol et al., 2014).

Conti and Cecchetti, (2001) у оквиру својих истраживања приказују скалу различитих нивоа загађења ваздуха на основу варирања вредности IAP. Аутори наводе да постоји пет нивоа загађења: веома високи, високи, умерен, низак и веома низак. У вези са тим и у овом истраживању примењена је иста скала (сл. 4).

Треба нагласити да нема претходних података о индикацији квалитета ваздуха коришћењем лишцаја као биоиндикатора, на подручју Луковске, Пролом, Куршумлијске бање, Радан планине и града Куршумлије, тако да су изложени резултати пионирски, а истраживања је неопходно наставити.

Индикација и зонација различитог степена аерозагађења коришћењем лишаја као биоиндикатора дата је у виду основних зона означених као „нормална зона”; зона „борбе” и зона „лишајске пустиње”. Свеобухватним општим приказом јасно се виде разлике у квалитету ваздуха на различитим истраживаним подручјима (сл. 38).

„Нормална зона” (А) која указује на висок степен квалитета ваздуха заузима знатан део скоро свих истраживаних подручја. Изузетак је истраживано подручје града Куршумлије на коме није евидентирано присуство „нормалне зоне”. Вредности $IAP \geq 37.5$ карактеришу ову зону.

Зона „борбе” (В) заузима ужи централни део Куршумлијске бање и већи део површине истраживаног подручја града Куршумлије. Ова зона указује на нешто лошији квалитет ваздуха у односу на „нормалну зону”, па су вредности IAP знатно ниже, кретале су се од 14 до 37.

Зона „лишајске пустиње” (Р) није забележена у руралним ређе насељеним деловима истраживаних насеља. Присуство ове зоне забележено је само у урбаном екосистему тј. у Куршумлији. Наиме, ова зона обухвата ужи центар града и у овом истраживању окарактерисана је вредностима 10 и 11.

Детаљнијом анализом сваког истраживаног подручја приметно је нијансирање и подела основних зона на подзоне.

„Нормалну зону” (А) карактеришу тачке са високим IAP вредностима, па формиране подзоне A_1 , A_2 и A_3 у оквиру „нормалне зоне” приказују фино нијансирање делова подручја према вредностима IAP . Све ове подзоне и даље укузују на изузетан квалитет ваздуха, међутим формиране су превасходно због тога што „нормална зона” заузима релативно велику површину истраживаних подручја, па је овај параметар био од велике важности за могућност детектовања разлика у квалитету.

Због изражених разлика у погледу вредности IAP , састава врста лишаја, њихове бројности и покровности на различитим истраживаним тачкама, а које нису могле да се сврстају ни у једну од поменутих основних зона, уочено је да би таква хетерогеност најбоље могла да се артикулише кроз формирање две подзоне у оквиру зоне „борбе” - „спољашња зона борбе” (B_1) и „унутрашња зона борбе” (B_2). Оваква подела зоне „борбе” на подзоне (B_1) и (B_2), у оквиру овог истраживања, приказана је само у граду Куршумлији. Зона „борбе” заузима и један мали део површине Куршумлијске бање, али је тај део подручја окарактерисан само једном истраживаном тачком, па није уочена потреба за даљим зонирањем, о чему ће у даљем тексту бити дискутовано.

Зонирање са више од три основне зоне забележено је у више радова (Lorpi, 1992, 2002; Bartholmess, 1993; Stamenković, 1997; Kirschbaum, 2006, 2012).

Треба имати у виду да су наведене зоне различитог степена квалитета ваздуха одраз његовог стања на одређеном простору у дужем временском периоду (Mayer et al., 2013; Suetoviene, 2015). У том смислу једна од најранијих и најреспектабилнијих процена наведеног стања је скала квалитативне процене осетљивости епифитних лишаја за подручје Енглеске и Велса (Hawksworth and Rose, 1970).

Луковска бања одликује се релативно добрим квалитетом ваздуха. Након картирања уочава се присуство „нормалне зоне” (сл. 38). Прецизнијом зонацијом подручја основна „нормална зона” подељена је на три подзоне на основу различитих вредности IAP (сл. 39). У првој подзони налазе се тачке са најнижим IAP вредностима. Карактеристично је да ова подзона обухвата социјално активни део подручја, изузев тачке 2. Ова тачка се налази у непосредној близини регионалног пута Куршумлија- Луковска бања, што може

бити разлог слабије покровности лишаја па су свихднo томе за ову тачку израчунате незнатно ниже вредности IAP. Другу подзону чине само две тачке 5 и 7. Ова подзона заузима периферне делове подручја. Трећа подзона се одликује тачкама са највишим IAP вредностима, ова зона обухвата саму периферију подручја. Највећа вредност IAP израчуната је за тачку 8 која се налази у овој подзони на самој периферији бање (сл. 39). Оваква ситуација је очекивана јер се ради о туристичком насељу, слабо насељеном, без развијене индустрије, са слабијим интензитетом моторног саобраћаја. Једини могући извор загађења могу представљати индивидуална ложишта домаћинства, крчење шума ради изградње нових смештајних капацитета за туристе, као и недовољно регулисано питање одлагања отпада.

За подручје Куршумлијске бање карактеристично је присуство „нормалне зоне” која обухвата све истраживане тачке изузев тачке 22 која се налази у зони „борбе”. Према израчунатим вредностима IAP истраживана тачка 22 је у рангу зоне „борбе”, међутим ово треба прихватити врло условно имајући у виду да се ради о малој површини, тачније само једној тачки па је дискутабилно да ли једна тачка може бити репрезентативна за формирање зоне. Поред тога, вредност IAP на овој тачки је гранична (IAP=37), а према коришћеној скали (таб. 4) тачке које се одликују вредностима $IAP \geq 37.5$ спадају у „нормалну зону”. Из свега наведеног можемо закључити да је на овом простору неопходно наставити са истраживањем и праћем стања. Већи део површине подручја налази се у „нормалној зони” која је подељена на три подзоне или три дела „нормалне зоне” која су се формирала на основу вредности IAP. Највише вредности IAP и самим тим и високим квалитетом ваздуха одликују се тачке које су лоциране на југоистоку подручја. Константован је врло диверзификован састав лишаја са учешћем врста лишаја осетљивих на аерозагађење. Разлог оваквих резултата можемо наћи вероватно у ниском степену урбанизације и слабом интензитету саобраћаја. На важност ових параметара по квалитет ваздуха указује и истраживање које су спровели Coffey and Fahrig (2012).

Пролом бања представља подручје које се одликује веома богатим диверзитетом лишаја и високим степеном квалитета ваздуха. Налази се на обронцима Радан планине па је на општој карти приказана у оквиру планине Радан (сл. 38). Читаво истраживано подручје се налази у „нормалној зони” (сл. 41). Одликује се високим вредностима IAP и према примењеној скали (таб. 4) већи део овог подручја је окарактерисан врло slabим загађењем. „Нормална зона” је подељена на три формиране подзоне. Прва подзона обухвата социјално активни центар подручја, па су очекивано, вредности IAP на тачкама у овој подзони најниже. Друга подзона је формирана према периферији подручја. Издвојена је на основу виших вредности IAP у односу на IAP вредности тачака у првој подзони. Обухвата делове истраживаног подручја који су слабије насељени. Трећа подзона није континуираног облика. Обухвата југоисточни део подручја, а њени фрагменти се налазе на северозападу и окарактерисани су истраживаном тачком 34. Ова тачка иако се налази у насељеном делу подручја што није био случај са положајем осталих тачака у овој подзони, одликује се релативно добро развијеним зеленим површинама које по дефиницији амортизују минималне негативне ефекте аерозагађења.

На основу зонације види се да се читаво истраживано подручје Радан планине налази у „нормалној зони”, што указује на висок ниво квалитета ваздуха (сл. 38). Ово подручје издваја се у односу на остале по томе што представља природни, неантропогени екосистем. Наиме, истражен је само део Радан планине, па је неопходно наставити истраживања. Вредности IAP на овом истраживаном подручју биле су изузетно високе и

варирају од 58 до 73. Загађење на овом подручју је окарактерисано као слабо или врло слабо. Основна „нормална зона” је изнијансирана на три подзоне односно три дела „нормалне зоне”. Прва подзона састоји се из три истраживане тачке које се одликују најнижим IAP вредностима. Могући разлог дисконтинуалног карактера ове подзоне огледа се у томе да се на северном делу подручја Радан планине налази се Пролом бања која се одликује вишим степеном урбанизације и нижим IAP вредностима (сл. 38) у односу на IAP вредности на истраживаним тачкама Радан планине. Друга формирана подзона одликује се вишим IAP вредностима у односу на претходну подзону. Трећа подзона у оквиру „нормалне зоне” карактерише највећи број истраживаних тачака. Све три подзоне су дисконтинуалног карактера. Могући разлог оваквог распореда нијансираности односи се на извесна ограничења у поступку евидентирања присуства лишаја и прикупљања узорака, што се огледа кроз немогућност обиласка неприступачних терена, као и постојање младих и неразвијених стабала као и крчење шума на одређеним деловима подручја чиме је велики број потенцијалних супстрата изгубило предиспозицију подлоге за насељавање лишаја.

На основу овог истраживања могло би да се закључи да се најслабијим квалитетом ваздуха одликује истраживано подручје града Куршумлије (сл. 38). На карти града Куршумлије уочавамо присуство две основне зоне лишајске индикације (сл. 43). „Зона пустиње” заузима мањи део подручја, преваходно социјално активни центар града. Ово је очекивано јер је под интензивнијим антропогеним утицајем. У оквиру ове зоне налазе се истраживане тачке 63 и 64 са карактеристичним, релативно ниским IAP вредностима. Међутим, ова зона показује тенденције ка могућем преласку у зону „борбе” јер је на поменути тачкама евидентирано и присуство врста које су умерено толерантне на загађење ваздуха, као што је *Lecidella elaeochroma*. Зона „борбе” обухвата тачке које су имале више вредности IAP па се закључује да се овај део подручја одликује вишим степеном квалитета ваздуха. Зона „борбе” је подељена на две подзоне. „Спољашња зона борбе” наставља се на зону „лишајске пустиње” и простире на југоисточни део подручја. Ова зона захвата претежно периферне делове града. „Унутрашња зона борбе” обухвата мањи број тачака, међутим састав лишаја евидентиран на тачкама овог дела показује нешто већи диверзитет врста и степен покривности што је вероватно последица благо побољшаног квалитета ваздуха. Оваква ситуација је очекивана с обзиром да је идентична слика забележена и на другим подручјима врло сличних величина, степена развијености индустрије и интензитета моторног саобраћаја као што су Прокупље и Димитровград (Stamenković, 2002).

Компарацијом са ранијим истраживањима примећујемо да су на истраживаним тачкама у Прокупљу израчунате сличне вредности IAP као на истраживаним тачкама у Куршумлији (Stamenković, 1997). Релативно велики део површине Прокупља је у зони „лишајске пустиње”. Готово идентично као и у Куршумлији, забележено је да ова зона заузима социјално активни центар, мада по својој величини, развијености индустрије и моторног саобраћаја не би требало да је тако. Наводи се да су неповољне околности као што су позиционираност насеља у односу на рељеф, врло лоша позиција индустрије (на западном крају) у односу на владајуће ветрове, експанзија моторног саобраћаја у последњих неколико година, лош биланс зелених површина, главни су разлози за овако релативно велико подручје са високим степеном аерозагађења. Забележено је и присуство зоне „борбе” у којој се налазио део истраживаног подручја у Прокупљу. Идентично као у Куршумлији, ова зона је на основу IAP вредности подељена у две подзоне. „Спољашња

зона борбе” у Прокупљу заузима доње делове града на југозападу, југу и истоку док ка северу то није констатовано што је последица чињенице да је вегетација у том делу изузетно оскудна па је тај простор остао неистражен. „Унутрашња зона борбе” на овом подручју заузима положај у вршним деловима брда Хисар на југозападној страни као и један део на врху брда Стражава. Наглашено је да је на врху брда Боровњак, у врло осиромашеној вегетацији, на неколико стабала констатована врло диверзификована заједница лишaja са учешћем неких веома осетљивих врста (*Evernia prunastri*, *Flavoparmelia caperata*, *Melanelia exasperatula*, *M. subaurifera* и *Parmelia tiliacea*) што указује на реалну могућност да се овај простор налази у лишajaјској „нормалној зони” због чега се истиче потреба за даљим и детаљнијим истраживањима да би се потврдило евентуално присуство ове зоне (Stamenković, 2002).

Слична ситуација као и у овом истраживању забележена је и током истраживања индикације квалитета ваздуха у Димитровграду где се највећи део насеља налази у зони „борбе” (око 95%), а врло мали део у виду танког појаса у зони „лишajaјске пустиње” (Stamenković, 2002). Међутим, у истраживању спроведеном на истом подручју осам година касније забележено је и присуство „нормалне зоне” индикације квалитета ваздуха. Аутори наводе да су резултати последица загађења ваздуха, па је Димитровград окарактерисан као подручје са умереним загађењем ваздуха (Stamenković et al., 2010).

Slaby and Lisowska (2012) у оквиру својих истраживања спроведених у Кракову бележе идентичне резултате. Предмет њиховог истраживања био је реколонизација епифитних лишaja у урбаном екосистему, као последица побољшања квалитета ваздуха. Осим тога, Duque et al. (2016), у оквиру својих истраживања представљају евалуације стратегија за смањење аерозагађења у урбаним екосистемима. Према Llop et al. (2012), на квалитет ваздуха и смањење диверзитета лишaja, велики утицај имају интензитет саобраћаја, зелене површине и индивидуална ложишта домаћинства. Идентичне резултате приказала су и ранија истраживања (Conti and Cecchetti, 2001; Loppi et al., 2002; Washburn and Cullen, 2006; Perlmutter, 2010; Munzi et al., 2014; Sujetoviene and Galinyte, 2016).

Према резултатима SOM анализе заснованој на дистрибуцији истраживаних тачака и зона различитог степена квалитета ваздуха на SOM мапи формиране су три групе – А, В и С (сл. 44). Група А је окарактерисана највећим бројем истраживаних тачака које се одликују веома добрим квалитетом ваздухом. Судећи по IndVal анализи иако вредности врста које су се издвојиле показују јасну уједначеност, највишим IndVal вредностима карактеришу се врсте *Pertusaria amara*, *Ramalina fraxinea* и *Lepraria incana*, па се сматра да су ове врсте најбољи индикатори групе А (таб. 15). У групи В, такође, све присутне истраживане тачке окарактерисане су релативно добрим квалитетом ваздуха. IndVal анализа указала је на велики број врста које описују ову групу (21) са високим и статистички значајним вредностима IndVal. На основу ове анализе можемо закључити да ову групу најбоље описује врста *Pleurosticta acetabulum* са изузетно високом индикаторском вредношћу (80.2). У групи С примећено је највеће одступање. У овој групи поред тачака које се налазе у „нормалној зони” присутне су и истраживане тачке које се налазе у зони „борбе” и у „лишajaјској пустињи”, дакле налазе се на подручјима са најслабијим квалитетом ваздуха. У групи С налазе се углавном све истраживане тачке које се карактеришу најслабијим квалитетом ваздуха (сл. 44). Индикатори ове групе су две репрезентативне врсте – *Xanthoria parietina* и *Candelariella xanthostigma* (таб. 15), које су и у раније спроведеним истраживањима окарактерисане као толерантне или умерено толерантне на загађење ваздуха (Sairunkaew et al., 2005; Davies et al., 2007).

У поглављу Резултати представљена је и слика визуализације дистрибуције IAP и IH1 на дводимензионалној SOM мапи (сл. 45). Оба индекса показала су јасан градијент у промени својих вредности на SOM мапи. Крећући се кроз SOM мапу од групе А, преко групе В до групе С вредности IAP опадају. Насупрот томе, IH1 вредности крећући се кроз SOM мапу од групе С, преко групе В до групе А расту (сл. 45). Антропогени утицај је посебно уочљив на истраживаним тачкама које припаду групи С. Резултати су били очекивани с обзиром да вредности IAP приказују ниво квалитета ваздуха, док вредности IH1 указују на степен антропогеног утицаја.

Како се ова техника сматра посебно погодном за примену над великим скуповима података (Chon, 2011), избор методе је у потпуности оправдан, с обзиром на то да је количина података у овој студији обимна.

Највећи проблем када је реч о квалитету ваздуха представља загађење које потиче из производних погона ШИК „Копаоник” где се за загревање радних просторија и за потребе парних котлова у процесу производње користе мазут и отпад од дрвета. Сагоревањем ових материја константно се ослобађа густи дим, са великом количином инертне прашине. Упоредјујући измерене вредности емисије (угљен-моноксида, сумпор-диоксида, азотних оксида, прашкастих материја и гасовитих неорганских једињења флуора и хлора са граничним вредностима емисије може се закључити да котларнице на мазут и котларница РЈ „Пилана” не доводе до прекорачења граничних вредности емисије наведених загађујућих материја. Котларница РЈ „Шперана” доводи до прекорачења граничних вредности емисије угљен-моноксида и прашкастих материја, а разлог тога је непотпуно сагоревање горива у ложном уређају и неадекватан начин дозирања горива. Изградњом нове котларнице на чврсто гориво смањиће се потрошња мазута за 30 – 40 %, а самим тим доћи ће до смањења аерозагађења. Поред ШИК „Копаоника” као потенцијални извори аерозагађења у граду јављају се и котларнице других радних организација и установа лоцираних углавном у самом центру града. У зимским месецима ту су и ложишта домаћинства која као огрев користе дрво и угаљ. Загађивачи ваздуха су и издувни гасови аутомобила, јер највише оксида азота, угљен-моноксида, угљеводоника и једињења олова избацују се у атмосферу из аутомобила (Стратегија одрживог развоја општине Куршумлија 2010-2020. године. <http://tokursumlija.rs/wp-content/uploads/2016/06/strategija-2010-2020.pdf>).

Анализа добијених резултата биолошких активности испитиваних лишајских екстраката и метаболита

Екстракти и секундарни метаболити лишаја испољавају многе биолошке и фармаколошке особине. Иако је дуго владало мишљење да су секундарни метаболити споредни продукти метаболизма без значаја за лишаје, данас се зна да они остварују неке физиолошке и еколошке функције у самим лишајима (нпр. заштита лишаја од јаке инсолације). Управо биолошка активност екстраката последица је различитих активности појединачних супстанци. Активност екстраката зависи од сложених интеракција њихових супстанци, што може испољити разноврсне утицаје на биолошко дејство екстраката (Agboke and Esimone, 2011).

Испитивани екстракти лишаја и њихове изоловане супстанце показале су различите биолошке активности, пре свега релативно јаку антимикуробну, антиоксидативну и антиканцерогену активност. Разлике у добијеним вредностима зависиле су пре свега од испитиване врсте лишаја.

Познато је да су бактерије способне да развију различите механизме одбране и постану резистентне. Неконтролисана употреба антибиотика у медицини и ветерини у сврхе превенције и терапије бактеријских обољења, као и употреба у сточарству у сврху промоције раста животиња довела је до све учесталије појаве антибиотске резистенције, тј. отпорности бактерија на антибиотике, што у данашње време представља озбиљан терапијски проблем.

Антимикробни лек треба да има неколико основних особина: да је селективно токсичан, да спектром деловања покрије више микроорганизама (због мешовитих инфекција), да отежа микро organizmu да брзо развије механизме резистенције на тај лек и да лек остане довољно дуго у активном облику. Све ове услове испуњавају једино природни антимикробни агенси.

Антимикробна активност испитиваних екстраката лишаја и изолованих супстанци варирала је у зависности од врсте микроба и састава ћелијског зида који се разликује код грам-позитивних и грам-негативних микроорганизама и гљива (Madigan et al., 2011). Осетљивост појединих микроорганизама на различите антимикробне агенсе значајно варира, па се тако осетљивост грам-позитивних и грам-негативних бактерија на екстракте различитих врста лишаја разликује. На већину сојева грам-позитивних бактерија уочава се инхибиторно дејство, док су већина сојева грам-негативних бактерија природно отпорне. Ћелијски зид грам-позитивних бактерија је релативно дебео (од 15 до 80 nm) и највећим делом састављен од пептидогликана, али се у његовом саставу налазе и следеће компоненте: теихоична и теихуронска киселина, полисахариди и протеини (Madigan et al., 2011). Ћелијски зид грам-негативних бактерија је тањи (од 10 до 15 nm), мање компактан, али знатно комплекснијег хемијског састава. Садржи танак слој пептидогликана изнад кога се налазе три компоненте: липопротеин, спољашња мембрана и липополисахарид. Ћелије већине различитих врста гљива имају јасно диференциран и слојевит ћелијски зид. У њихов састав улазе полисахариди као што су хитин и глукан (Griffin, 1994).

Све тестиране врсте гљива показале су већу резистентност на дејство тестираних узорака у односу тестиране врсте бактерија. Управо већа резистентност гљива у односу на бактерије, као и већа резистентност грам-негативних бактерија у односу на грам-позитивне потврђена је више пута до сада о чему сведоче бројни литературни подаци (Karagoz et al., 2009; Ranković et al., 2012; Javeria et al., 2013; Srivastava et al., 2013; Pompilio et al., 2013; Ramos et al., 2014; Ranković et al., 2014; Ranković et al., 2015; Ristić et al., 2016).

У овом раду применом микро-дилуционе методе утврђена је минимална инхибиторна концентрација, за све испитиване узорке. На овај начин утврђене су најниже концентрације екстраката испитиваних врста лишаја и изолованих супстанци које спречавају раст тестираних микроорганизама. На основу тога одређена је антимикробна активност испитиваних узорака.

Све тестиране врсте лишаја и изоловане супстанце у овом раду, испољиле су антимикробну активност. Изоловане супстанце су показале снажнију антимикробну активност у односу на екстракте већине тестираних врста лишаја, реагујући инхибиторно на све тестиране врсте бактерија и гљива и то у ниским концентрацијама. Антимикробна активност екстраката неких изабраних врста лишаја је, међутим, испољила чак и снажније антимикробно дејство од неких изолованих супстанци.

Релативно јака антимикробна активност ацетонских екстраката тестираних врста лишаја може се приписати растворљивости активних супстанци у органским

растварачима. Утврђено је многобројним истраживањима да су антимикуробне супстанце које продукују лишаци добро растворљиве у органским растварачима, међу којима се као један од најбољих показао ацетон (Vasudeo and Lew, 2012).

Сви екстракти тестираних врста лишаци као и њихове изоловане супстанце показали су релативно јаку антимикуробну активност што је у сагласности са раније публикованим радовима. Антимикуробна активност забележена је код различитих екстраката врсте *Cladonia foliacea* (Yilmaz et al., 2004). Ranković et al. (2010b) константовали су антимикуробно дејство метанолног екстракта врсте *C. fimbriata*.

Механизми антимикуробног деловања екстраката и њихових секундарних метаболита огледају се у инхибицији функције ћелијске мембране, инхибицији синтезе ћелијског зида микроорганизама, инхибицији синтезе протеина или инхибицији синтезе нуклеинских киселина (Guilhelmelli et al., 2013). Међутим, механизам деловања испитиваних екстраката и њихових изолованих биоактивних компоненти на тестиране врсте микроорганизама још увек није познат и захтева додатна истраживања.

Мерење ефикасности екстраката и изолованих супстанци на неутрализацију стабилних DPPH радикала, мерење редукиционог капацитета екстраката и одређивање укупне количине фенола и флавоноида у екстрактима често су употребљаване методе за одређивање антиоксидантног капацитета. Када се антиоксидант нађе у комплексном окружењу он реагује у зависности од своје хемијске природе што за резултат има различите бројне вредности резултата за сваку од наведених метода. Добијене вредности могу бити у слабој корелацији и зато је потребно извести више ових тестова да би се са сигурношћу могла проценити антиоксидантна активност испитиване супстанце, односно екстракта (Bernaert et al., 2012).

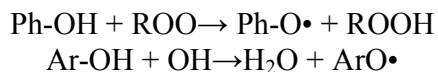
Антиоксиданси се користе у прехранбеној, козметичкој и фармацеутској индустрији, али и у производњи гуме и горива (бензин и биодизел), како би се спречили процеси оксидативне деградације. Синтетички антиоксиданси као што су бутиловани хидроксианисол (ВНА), бутиловани хидрокситолуен (ВНТ), пропил галат (РГ) и терцијарни-бутил хидрохинон (ТВНҚ) имају велику примену као додатак природним антиоксидансима у циљу побољшања њихове ефикасности. Међутим и поред доказане велике ефикасности, постоје индикације да неки од синтетичких антиоксиданаса испољавају нежељене, токсичне ефекте. Последњих година расте интересовање за употребу природних антиоксиданаса у циљу очувања здравља због њихове особине да могу да заштите ћелије и организам од оштећења која су изазвана оксидативним стресом (Štefan et al., 2007; Sarahroodi et al., 2012).

Редукициони капацитет екстраката представља једну од општеприхваћених метода којима се може изразити антиоксидативни потенцијал екстраката. Тест који је примењен у овом раду заснива се на редукицији феријона Fe^{3+} у Fe^{2+} феријон у киселој средини при чему се развија интензивно плава боја.

Полифенолна једињења спадају заједно са α -токоферолом и β -каротеном у групу неензимских антиоксиданата. Антиоксидативна активност ових једињења резултат је њихове способности да се понашају као донори водоника уз формирање стабилног феноксил радикала (Tandon et al., 1995). Антиоксидативна активност расте са повећањем броја хидроксилних група, па деривати дихидроксибензојеве киселине имају већу антиоксидативну активност у односу на деривате хидроксибензојеве киселине.

Полифенолна једињења се сматрају најзначајнијим једињењима који поседују антиоксидативну активност као резултат њихове способности да буду донори водоника

слободним радикалима, након чега настају мање реактивни феноксил радикали (Halliwell and Gutteridge, 1999):



Фенолна једињења представљају широко распрострањену хетерогену групу секундарних метаболита и једну од најважнијих класа природних антиоксиданаса. То су супстанце које у структури имају један или више ароматичних прстенова са једном или више хидроксилних група (Vermeris and Nicholson, 2006).

Велики број аутора истиче да су фенолна једињења главне компоненте које испољавају антиоксидативну активност и указују на директну корелацију између укупног садржаја фенола и антиоксидативне активности (Poornima et al., 2012; Rekha et al., 2012). Ипак, неки аутори су својим истраживањима доказали да антиоксидативна активност екстракта различитих врста лишаја не мора увек да буде у корелацији са садржајем полифенолних једињења (Odabasoglu et al., 2005; Stanly et al., 2011). Антиоксидативна активност фенолних једињења је последица њиховог редокс потенцијала, са могућношћу хелатизације метала или „хватања” радикалног кисеоника (Xu et al., 2010).

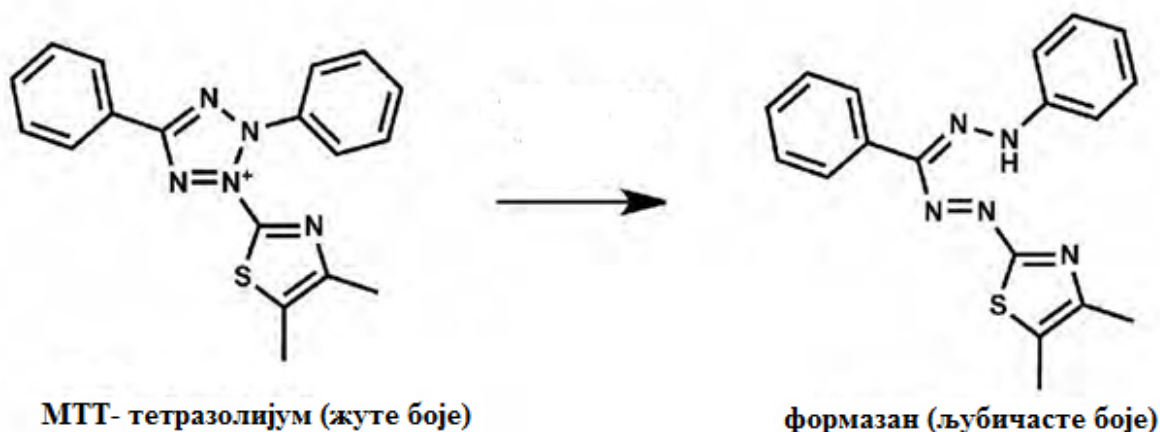
Најзаступљенија група фенолних једињења у лишајима су флавоноиди (флавоноли, изофлавоноли, флаванони, флавоноли, флаванолни, флавоноли, флавоноли, катехини, антоцијанидини, леукоантоцијанидини, халкони, дихидрохалкони и аурони).

Испитивани екстракти лишаја и њихове изоловане супстанце у овом раду показали су релативно јаку антиоксидативну активност. Најјачи инхибиторни ефекат на DPPH радикале испољио је ацетонски екстракт врсте *Pleurosticta acetabulum*. Екстракти врста *Cladonia coniocraea*, *C. ramulosa* и *Melanelixia glabra* показали су најслабији утицај на DPPH радикале, јер су све тестиране концентрације инхибирале мање од 50% DPPH радикала. Најјачи редукциони капацитет показао је екстракт врсте *Platismatia glauca*. Највећи садржај фенолних компоненти забележен је код екстракта врсте *Melanelixia subaurifera*, док је највећи садржај флавоноида испољио ацетонски екстракт врсте *Lepraria incana*.

У ранијим истраживањима је ацетонски екстракт врсте *Cladonia furcata* пронађено да испољава релативно јаку антиоксидативну активност (Ranković et al., 2011). Осим тога, Mitrović et al. (2014) су доказали да ацетонски, етил-ацетатни и метанолни екстракти врсте *Platismatia glauca* испољавају снажну антиоксидативну активност. Јак антиоксидативни ефекат екстракта три различите врсте рода *Cladonia*: *Cladonia furcata*, *C. pyxidata* и *C. rangiferina* забележен је и у раду Kosanić et al. (2014a). Аутори рада забележили су и изражена корелацију антиоксидативне активности ацетонских екстраката са садржајем полифенолних једињења. Антиоксидативна активност ацетонских, етанолних и метанолних екстраката врста *Ramalina fastigiata*, *R. farinacea* и *R. fraxinea* забележена је у раду Şahin S. et al. (2015). Међутим, аутори су испитивање антиоксидативног потенцијала екстраката одредили помоћу ABTS методе (Sariburun et al., 2010).

Антиканцерогена активност ацетонских екстраката тестираних врста лишаја и њихових изолованих супстанци изражена је преко IC₅₀ вредности (концентрација екстракта или супстанце која изазива инхибицију 50% ћелијског раста). Испитивано је антиканцерогено дејство екстраката лишаја и изолованих супстанци према HeLa, A549 и LS174 ћелијским линијама.

У спроведеним експериментима за испитивање антиканцерогене активности екстракта различитих врста лишаја и њихових изолованих супстанци, коришћен је колориметријски МТТ тест, којим се одређује број живих, метаболички активних ћелија. Том приликом употребљен је реагенс МТТ [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide], који се у присуству животно способне ћелије конвертује у липосолубилни плавољубичасто обојен производ формазан, редуктивним отварањем



тетразолијум прстена (Gharavi et al., 2007).

Сл. 99. Промена структуре и редукција тетразолијумске соли и стварање љубичастиг формаза

Редукција МТТ реагенса, која се уочава путем промене боје, пропорционална је броју живих, метаболички активних ћелија у току експоненцијалне фазе раста ћелија у култури (Mosmann, 1983). Након редукције тетразолијумски прстен се отвара и квартернарни амин се конвертује у терцијарни амини, при чему се један од амина везује за атом водоника (**сл. 99**).

За растварање кристала формаза у ћелијама користе се органски растварачи (изопропанол), 10% sodium dodecyl sulfate (SDS) у 0,01 mol HCl, комбинације пропанол/етанол и dimethylformamid/SDS; метанска (мравља) киселина у изопропанолу и dimethyl sulfoxide (DMSO).

У овом раду цитотоксични ефекти одређени су коришћењем методе коју су дали Ohno and Abe (1991) а која представља модификацију методе Mosmann-а (1983). Модификација се заснива на употреби sodium dodecyl sulfate (SDS) за растварање формазањског продукта, уместо DMSO. Ohno and Abe су својом модификацијом побољшали осетљивост методе али и омогућили превазилажење проблема код одливања узорака што може довести до губитка ћелија у митози.

Доказана је корелација резултата МТТ теста са резултатима $^3\text{H-TdR}$ теста и ^{51}Cr теста, чиме је МТТ тест представљен као успешна замена конвенционалних радиоактивних техника и у имунолошким истраживањима. Међутим, ограничавајући фактор у коришћењу ове методе може представљати чињеница да се тетразолијумска со метаболише од стране митохондријалне дехидрогеназе па је самим тим у директној вези са бројем митохондрија.

На основу IC_{50} вредности измерена је јака антиканцерогена активност ацетонских екстраката свих тестираних врста лишаја као и изолованих супстанци. Карактеристично је да су тестирани узорци лишаја и супстанци реаговали различито према различитим ћелијским линијама на које су били тестирани. Најизраженија антиканцерогена активност константована је код ацетонских екстраката врста *Melanelixia glabra* и *M. subaurifera* према HeLa ћелијским линијама. Према A549 и LS174 ћелијским линијама најснажнији ефекат имао је екстракт врсте *Cladonia foliacea* (13.58 $\mu\text{g/ml}$ и 28.98 $\mu\text{g/ml}$). Најслабије антиканцерогено дејство према свим тестираним ћелијским линијама, испољио је екстракт врсте *Cladonia coniocraea*. Разлике у антиканцерогеном деловању екстраката различитих врста лишаја могу се тумачити присуством различитих супстанци и њиховом антиканцерогеном потенцијалу. Компонента licanoric acid изолована из екстракта врсте *M. subaurifera*, показала је најслабију антиканцерогену активност према A549 и LS174 ћелијским линијама, као и екстракт врсте *Cladonia ramulosa*.

На основу досадашњих истраживања нема велики број података о антиканцерогеној активности екстраката лишаја и њихових секундарних метаболита. Међутим, Burlando et al. (2009) указује на значајну антиканцерогену активност супстанци usnic, salazinic, vulpinic, gyrophoric и evernic acid према различитим ћелијским линијама. Касније Mitrović i dr. (2011) проналазе значајну антиканцерогену активност метанолних екстраката врста *Parmelia sulcata*, *Flavoparmelia caperata*, *Evernia prunastri*, *Hypogymnia physodes* и *Cladonia foliacea*. Brisdelli et al. (2013) наводе да шест изолованих лишајних супстанци: diffractaic acid, lobaric acid, usnic acid, vicanicin, variolaric acid и protolichesterinic acid, показују значајне резултате приликом тестирања на пролиферацију и вијабилност према MCF-7, HeLa и HCT-116 ћелијским линијама. Shrestha et al. (2015) указују на антиканцерогену активност екстраката 14 од тестираних 17 врста лишаја према ћелијама Burkitt-овог лимфома (Раји ћелије).

У новије време све већи број научних радова потврђује значај употребе лишаја као антиканцерогених агенаса. Иако су додатна испитивања неопходна да би се што прецизније расветлио механизам дејства испитиваних екстраката лишаја и изолованих појединачних супстанци на инхибицију пролиферације и индукцију апоптозе канцерогених ћелијских линија, јасно је да испитивани лишаји и њихови секундарни метаболити имају обећавајућу улогу као будући хемотерапеутици и цитостатици. Резултати наших досадашњих истраживања свакако отварају могућности за нова испитивања у циљу утврђивања могућности појачавања активности и утицаја на побољшање селективности деловања.

6. ЗАКЉУЧЦИ

На основу спроведеног истраживања које је заснивано на употреби лишаја као биоиндикатора са циљем испитивања квалитета ваздуха на подручју дела Топличког региона, као и тестирању биолошких активности екстраката изабраних врста лишаја и њихових изолованих супстанци може се закључити следеће:

- Истраживање биолошке индикације квалитета ваздуха по први пут је спроведено на делу подручја Топличког региона методама израчунавања вредности IAP и INI, које су широко прихваћене као најпогодније методе за анализу квалитета ваздуха;
- Израчунате вредности INI кретале су се од 5 до 36. Израчунате вредности IAP кретале су се од 10 до 75.
- Резултати биоиндикације различитог степена аерозагађења на истраживаним подручјима приказани су картирањем;
- Испитивањем диверзитета лишаја у Луковској бањи константовано је присуство 76 врста из 34 рода. Израчунате вредности IAP кретале су се од 39 до 75. Читаво истраживано подручје налази се у „нормалној зони”. Све истраживане тачке имале су вредности $IAP \geq 37.5$ па се може закључити да се ово подручје одликује високим степеном квалитета ваздуха. Вредности INI за подручје Луковске бање кретале су се од 5 до 24;
- У Куршумлијској бањи забележено је присуство 65 врста лишаја из 32 рода. Вредности IAP варирале су у опсегу од 37 до 52. Већи део површине истраживаног подручја Куршумлијске бање налази се у „нормалној зони”, док се само мањи централни део налази у зони „борбе”. Вредности INI кретале су се од 5 до 14.
- На подручју Пролом бање забележено је присуство 72 врсте лишаја из 33 рода. Приметно је варирање вредности IAP од 40 до 56. Уочавамо дефинисану „нормалну зону” на читавом истраживаном подручју. Вредности INI у оквиру овог истраживаног насеља, варирале су од 8 до 24;
- Анализом диверзитета лишаја Радан планине константовано је присуство 76 врста лишаја из 34 рода. Вредности IAP на овом истраживаном подручју биле су изузетно високе и кретале су се од 58 до 73. Све истраживане тачке на подручју Радан планине, које припада Топличком региону налазе се у „нормалној зони”. Вредности INI нису рачунате за подручје Радан планине;
- У Куршумлији је забележено присуство 42 врсте лишаја из 23 рода. На подручју овог урбаног екосистема вредности IAP варирале су од 10 до 28. Истраживано подручје Куршумлије налазе се у зони „борбе”, која је подељена на две подзоне „спољашњу зону борбе” и „унутрашњу зону борбе”. Мањи, социјално активни део Куршумлије налази се у зони „лишајске пустиње”. INI вредности за ово истраживано насеље кретале су се од 15 до 36;
- Статистичком анализом података представљена је визуализација дистрибуције истраживаних тачака и зона индикације квалитета ваздуха. Том приликом формиране су три групе А, В и С. Група А је окарактерисана највећим бројем истраживаних тачака које се одликују најквалитетнијим ваздухом. Врсте *Pertusaria amara*, *Ramalina fraxinea* и *Lepraria incana*, приказане су као најбољи индикатори групе А. У групи В, такође, све

- присутне истраживане тачке окarakterисане су релативно добрим квалитетом ваздуха. Ову групу најбоље описује врста *Pleurosticta acetabulum* са изузетно високом индикаторском вредношћу (80.2). У групи С примећено је највеће одступање. У овој групи налазе се истраживане тачке које се одликују најнижим IAP вредностима. Ове тачке налазе се у зони „борбе” и у „лишајској пустињи”, дакле налазе се на подручјима са најслабијим квалитетом ваздуха. Индикатори ове групе су две репрезентативне врсте – *Xanthoria parietina* и *Candelariella xanthostigma*;
- Осим примене у биоиндикацији квалитета ваздуха, лишаји са овог истраживаног подручја испољили су и релативно јаку антимикуробну, антиоксидативну и антиканцерогену активност;
 - Измерене MIC вредности супстанци биле су знатно ниже у односу на MIC вредности екстраката, а самим тим је и антибактеријско дејство супстанци било много јаче, у односу на антибактеријско дејство екстраката;
 - Најосетљивији на деловање тестираних узорака био је бактеријски сој *Bacillus cereus*, док се као најрезистентнији показао бактеријски сој *Escherichia coli*;
 - Антифунгална активност екстраката је приказана у односу на све тестиране врсте гљива;
 - Најјачу антифунгалну активност испољио је екстракт врсте *Melanelixia glabra*, делујући једнако добро на *Aspergillus flavus* (MIC = 0.312 mg/ml) и *Penicillium chrysogenum* (MIC = 0.078 mg/ml), а на *P. expansum* (MIC = 0.019 mg/ml) снажније него стандардни антимикуротик кетоконазол (MIC = 0.156 mg/ml), који је у овом раду коришћен као позитивна контрола;
 - Јаку антифунгалну активност испољиле су и изоловане супстанце, делујући инхибиторно на све тестиране врсте гљива са измереним MIC вредностима које су се кретале од 0.25 до 1 mg/ml;
 - Најрезистентнија на дејство тестираних екстраката лишаја и изолованих супстанци била је гљива *Aspergillus flavus*, док се као најосетљивија показала врста *Candida albicans*;
 - Антимикуробна активност тестираних узорака забележена је на основу измерених MIC вредности које су се кретале од 0.039 до 20 mg/ml приликом тестирања на различите врсте бактерија, док су се измерене MIC вредности кретале од 0.019 до 20 mg/ml, приликом тестирања дејства екстраката и супстанци на одређене врсте гљива;
 - Антиоксидативна активност екстраката тестираних врста лишаја и изолованих супстанци је била уочљива, с обзиром да су сви тестирани узорци испољили релативно јак капацитет неутралисања DPPH радикала, висок редукциони капацитет, као и висок садржај фенола и флавоноида;
 - Најјачу антирадикалску активност показала је супстанца 2'-O-methylanziaic acid (IC₅₀ = 121.52 µg/ml). Екстракти врста *Cladonia coniocraea*, *C. ramulosa* и *Melanelixia glabra* показали су најслабији утицај на DPPH радикале, јер су све тестиране концентрације инхибирале мање од 50% радикала;
 - Измерене вредности абсорбанце редукционог капацитета екстраката и изолованих компоненти кретале су се од 0.2894 до 0.0043 nm. Најјачи редукциони капацитет показао је екстракт врсте *Platismatia glauca* у

- концентрацији од 1000 $\mu\text{g/ml}$, док је најслабији испољила супстанца l-ascorbic acid у концентрацији од 125 $\mu\text{g/ml}$;
- Укупан садржај фенолних компоненти у испитиваним екстрактима варирао је од 29.54 до 41.33 $\mu\text{g RE/mg}$ екстракта. Највећи садржај фенолних компоненти забележен је код екстракта врсте *Melanelixia subaurifera* (41.33 $\mu\text{g RE/mg}$ екстракта). Најмањи садржај фенола измерен је код екстракта врсте *Physcia semipinnata*.
Садржај укупних флавоноидних једињења у екстрактима варирао је у опсегу од 1.89 до 24.74 $\mu\text{g RE/mg}$ екстракта. Највећи садржај флавоноида имао је ацетонски екстракт врсте *Lepraria incana* (24.74 $\mu\text{g RE/mg}$ екстракта). Најмањи садржај флавоноида измерен је код екстракта врсте *Cladonia fimbriata*;
 - Најизраженија антиканцерогена активност у односу на HeLa ћелијске линије константована је код екстракта врста *Melanelixia glabra* и *M. subaurifera*;
 - Према A549 и LS174 ћелијским линијама најснажнији ефекат имао је екстракт врсте *Cladonia foliacea* (13.58 $\mu\text{g/ml}$ и 28.98 $\mu\text{g/ml}$);
 - Најслабије антиканцерогено дејство, према свим тестираним ћелијским линијама, испољио је екстракт врсте *Cladonia coniocraea*;
 - На основу целокупних резултата истраживања може се закључити да су могућности примене лишаја многобројне. Примена лишаја у циљу индикације квалитета ваздуха показала је да је ваздух истраживаног подручја релативно доброг квалитета. Међутим, пожељно је поновити овакво истраживање, имајући у виду да се објективни и оптимални резултати постижу континуитетом сукцесивних детекција тј. мониторингом;
Осим тога, значајна је и примена лишаја као природних биолошких агенаса у циљу замене синтетских антибиотика, антиоксиданата и цитостатика. Екстракти тестираних врста лишаја и њихови секундарни метаболити имају обећавајућу улогу у примени као природни антимицробни лекови, антиоксиданси хемотерапеутици и цитостатици. Препорука за даља истраживања односи се на утврђивање могућности појачавања активности и побољшање селективности деловања.

7. ЛИТЕРАТУРА

Agboke, A. A., Esimone, C. O. (2011). Antimicrobial evaluation of the interaction between methanol extract of the lichen, *Ramalina farinacea* (*Ramalinaceae*) and ampicilin against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5, 644-648.

Amo de Paz, G., Raggio, J., Gomez-Serranillos, M. P., Palomino, O. M., Gonzales-Burgos, E., Carretero, M. E., Crespo, A. (2010). HPLC isolation of antioxidant constituents from *Xanthoparmelia* spp. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 53, 165-171.

Архива ТО Куршумлија.

Ari, F., Celikler, S., Oran, S., Balikci, N., Ozturk, S., Ozel, M. Z., Ozyurt, D., Ulukaya, E. (2012). Genotoxic, cytotoxic, and apoptotic effects of *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. on breast cancer cells, *Environmental Toxicology*, 29, 804-813.

Asahina, Y., Shibata, S. (1954). Chemistry of Lichen Substances, Tokyo: Japan Society for the Promotion of Science.

Asta, J., Erhardt, W., Ferretti, M., Fornasier, F., Kirschbaum, U., Nimis, P. L., Purvis, O. W., Pirintsos, S., Scheidegger, C., van Haluwyn, C., Wirth, V. (2002). Mapping lichen diversity as an indicator of environmental quality. In: Nimis, P. L., Scheidegger, C., Wolseley, P. A. (Eds.), *Monitoring with Lichens – Monitoring Lichens*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 273-279.

Baltz, R. H. (2008). Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes. *Current Opinion in Pharmacology*, 8, 557-563.

Barbalić, Lj. (1952). Epifitska vegetacija kao biološko mjerilo čistoće vazduha. *Higijena*, 7, 39-44.

Barbalić, Lj. (1978). Epifitski lišaji starijeg južnog dela Zagreba. *Acta biologica Jugoslavica*, ser. G, 4, 23-27.

Bartels, S. F., Chen, H.Y. H. (2012). Mechanisms regulating epiphytic plant diversity. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 31, 391-400.

Bartholmess, H. (1993). Epiphytische flechten als bioindikatoren in der Luftreinhaltestrategie, Staub. *Reinhaltung Der Luft*, 53, 31-35.

Batič, F., Lišajska flora na drvenastih deblih. (1978/79). *Proteus*, 6, 219-222.

Batič, F., Smerdy, N., Martinčič, A., Vrhovšek, D. (1979). Epifitska flora in onesnaževanje zraka na području mesta Ljubljana. Zbornik radova Drugog kongresa ekologa Jugoslavije, 116-124.

Batič, F. (1979/80). Onesnaženje zraka in lišaj. *Proteus*, 42, 318-321.

Batič, F. (1984). Ugotavljanje onesnazenosti zraka s pomocjo epifitskih lišajev in lisajska karta Slovenije kot rezultata dela. - In: Raziskovanje onesnazenosti zraka v Sloveniji, Ljubljana, Prirodoslovno društvo Slovenije, pp. 20-26.

Bačkorova, M., Bačkor, M., Mikes, J., Jendzelovskya, R., Fedoročko, P. (2011). Variable responses of different human cancer cells to the lichen compounds parietin, atranorin, usnic acid and gyrophoric acid. *Toxicology In Vitro*, 25, 37-44.

Bernaert, N., Paepe, D., Bouten, C., Clercq, H., Stewart, D., Bockstaele, E., Loose, M., Droogenbroeck, B. (2012). Antioxidant capacity, total phenolic and ascorbate content as a function of the genetic diversity of leek (*Allium ampeloprasum* var. *porrum*). *Food Chemistry*, 2, 669-677.

Bezivin, C., Tomasi, S., Lohezic-Le Devehat, F., Boustie, C. (2003). Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. *Phytomedicine*, 10, 499-503.

Blasco, M., Domeno, C., Nerin, C. (2008). Lichens biomonitoring as feasible methodology to assess air pollution in natural ecosystems: combined study of quantitative PAHs

analyses and lichen biodiversity in the Pyrenees Mountains. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391, 759-771.

Blasco, M., Domeno, C., Lopez, P., Nerin, C. (2011). Behaviour of different lichen species as biomonitors of air pollution by PAHs in natural ecosystems. *Journal of Environmental Monitoring*, 13, 2588-2596.

Bogo, D., de Matos, M. F., Honda, N. K., Pontes, E. C., Oguma, P. M., da Santos, E. C., de Carvalho, J. E., Nomizo, A. (2010). *In vitro* antitumour activity of orsellinates. *Zeitschrift Naturforschung*, 65c, 43-48.

Bojović, G. (2012). Kopaonik i banje u podgorini. Srpsko geografsko društvo. Beograd.

Boltersdorf, S., Werner, W. (2013). Source attribution of agriculture-related deposition by using total nitrogen and N-15 in epiphytic lichen tissue, bark and deposition water samples in Germany. *Isotopes in Environmental and Health Studies*, 49, 197-218.

Boustie, J., Grube, M. (2005). Lichens – a promising source of bioactive secondary metabolites. *Plant genetic resources: characterization and utilization*, 3 (02), 273-287.

Burkholder, P. R., Evans, A. W., Mc Veigh, I., Thornton, H. K. (1944). Antibiotic activity of lichens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.*, 30, 250-255.

Burlando, B., Ranzato, E., Volante, A., Appendino, G., Pollastro, F., Verotta, L. (2009). Antiproliferative effects on tumour cells and promotion of keratinocytewound healing by different lichen compounds. *Planta Medica*, 75, 607–613.

Bračko, B. (1975/76). Med ključkarji (*Parmeliaceae*) najmočnejšo družino naših lističastih lišajev. *Proteus*, 1, 1-14; 3, 85-90.

Brisdelli, F., Perilli, M., Sellitri, D., Piovano, M., Garbarino, J. A., Nicoletti, M., Bozzi, A., Amicosante, G., Celenza, G. (2013). Cytotoxic activity and antioxidant capacity of purified lichen metabolites: an *in vitro* study. *Phytotherapy Research*, 27, 431-437.

Byazrov, L. G. (2002). Lichens in ecological monitoring. Scientific World, Moscow, pp. 336.

Calvelo, S., Baccala, N., Liberatore, S. (2009). Lichens as bioindicators of air quality in distant areas in Patagonia (Argentina). *Environmental Bioindicators*, 4, 123-135.

Cansaran, D., Kahya, D., Yurdakulol, E., Atakol, O. (2006). Identification and Quantitation of Usnic Acid from the Lichen *Usnea* Species of Anatolia and Antimicrobial Activity. *Zeitschrift Naturforschung*, 61c, 773-776.

Chauhan, R., Abraham, J. (2013). *In vitro* antimicrobial potential of the lichen *Parmotrema* sp. extracts against various pathogens. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 16, 882-885.

Chon, T. (2011). Self-organizing maps applied to ecological sciences. *Ecological Informatics*, 6, 50-61.

Coffey, H. M. P., Fahrig, L. (2012). Relative effects of vehicle pollution, moisture and colonization sources on urban lichens. *Journal of Applied Ecology*, 49, 1467-1474.

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. (1969). Chemical and Botanical Guide to Lichen products, University of North Carolina Press, Chapel Hill, N.C.

Culberson, C. F., Elix, J. A. (1989). Lichen substances. In: Methods in plant biochemistry, Vol. 1, Plant Phenolics (Dey P. M. and Harborne J. B., eds.), Academic Press, London, pp. 509-535.

- Cvijan, M., Stamenković, S. (1996a). Lignicolous lichens in the urban area of Niš town. *Archives of Biological Sciences*, 48, 115-118, Belgrade.
- Cvijan, M., Stamenković, S. (1996b). Bioindication of air pollution in Niš area by use of lichens. *Ekologija*, 31, 151-157.
- Cvijan, M., Savić, S., Szabados, K. (1997). Lichens as bioindicators of air pollution in Belgrade area. *Ekologija*, 32, 99-106.
- Cvijan, M., Subakov-Simić, G., Krizmanić, J. (2008). Monitoring of the «lichen desert» in the Belgrade area (1980/81, 1991 and 2007). *Archives of Biological Sciences*, 60, 215-222.
- Das, P., Joshi, S., Rout, J., Upreti, D. K. (2013). Lichen diversity for environmental stress study: Application of index of atmospheric purity (IAP) and mapping around a paper mill in Barak Valley, Assam, northeast India. *Journal of Tropical Ecology*, 54, 355-364.
- Davis, J.C. (1986): *Statistic and Data Analysis in Geology* – Willey in Sons, New York, 651 p.
- Davies, L., Bates, J. W., Bell, J. N. B., James, P. W. & Purvis, O. W. 2007. Diversity and sensitivity of epiphytes to oxides of nitrogen in London. *Environmental Pollution* 146: 299–310.
- Dimović, D., Jokić, M. (2000). Kontrola kvaliteta vazduha i mogućnost primene lišaja kao bioindikatora stanja životne sredine na području N.P. "Kopaonik". Zbornik radova XXVIII Savetovanja "Zaštita vazduha 2000", 265-268, Društvo za čistoću vazduha Srbije, Beograd.
- Dimović, D. (2001). Lišaji planine Radana i okoline - preliminarni rezultati. *Zaštita prirode*, 52, 107-113.
- Dobson, F. (2000). *Lichens An Illustrated Guide*, The Richmond publishing Co. Ltd., England.
- Dorman, H. J., Bachmayer, O., Kosar, M., Hiltunen, R. (2004). Antioxidant properties of aqueous extracts from selected *Lamiaceae* species grown in Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 762-770.
- Dufrêne, M., Legendre, P. (1997). Species assemblages and indicator species: the need for a flexible asymmetrical approach. *Ecological monographs*, 67, 345-366.
- Duque, L., Relvas, H., Silveira, C., Ferreira, J., Monteiro, A., Gama, C., Rafael, S., Freitas, S., Borrego, C., Miranda, A. I. (2016). Evaluating strategies to reduce urban air pollution. *Atmospheric Environment*, 127, 196-204.
- Durazo, F. A., Lassman, C., Han, S. H. B., Saab, S., Lee, N. P., Kawano, M., Saggi, B., Gordon, S., Farmer, D. G., Yersiz, H., Goldstein, R. L., Ghobrial, M., Busuttill, R. W. (2004). Fulminant liver failure due to usnic acid for weight loss. *The American Journal of Gastroenterology*, 99, 950-952.
- Einarsdóttir, E., Groeneweg, J., Bjornsdóttir, G. G., Harðardóttir, G., Omarsdóttir, S., Ingólfssdóttir, K. (2010). Cellular mechanisms of the anticancer effects of the lichen compound usnic acid. *Planta Medica*, 76, 969-974.
- Ekong, U. S., Mgbii, A. I., Adikwu, M. U. (2008). Evaluation of the in vitro combination effect of colloidal silver concentrate on the antifungal activity of ethanolic extract of the lichen *Usnea subfloridans*. *Nigerian Annals of Natural Sciences*, 8, 1-5.
- Evju, M., Bruteig, I. E. (2013). Lichen community change over a 15-year time period: effects of climate and pollution. *Lichenologist*, 45, 35-50.
- Frank, A. (2016). Razvoj metodologije za procenu indikatora u cilju unapređenja prognoze klimatološke suše. Doktorska disertacija. Fakultet tehničkih nauka. Univerzitet u Novom Sadu.

- Gadd, G. M. (2011). Geomycology. In: Reitner J, Thiel V (eds) Encyclopedia of Geobiology, Part 7. Springer, Heidelberg, 416-432.
- Gajić, M., Korać, M. (1991). Pregled lišajeva u Srbiji. Zbornik radova „Nedeljko Košanin i botaničke nauke“ Beograd – Ivanjica, 394-399.
- Gerdol, R., Marchesini, R., Iacumin, P., Brancaloni, L. (2014). Monitoring temporal trends of air pollution in an urban area using mosses and lichens as biomonitors. *Chemosphere*, 108, 388-395.
- Gharavi, N., Haggarty, S., El-kadi, A. O. S. (2007). Chemoprotective and carcinogenic effects of tertbutylhydroquinone and its metabolites. *Current Drug Metabolism*, 8, 1-7.
- Gombert, S., Asta, J., Seaward, M. R. D. (2004). Assessment of lichen diversity by index of atmospheric purity (IAP), index of human impact (IHI) and other environmental factors in an urban area (Grenoble, southeast France). *Science of the Total Environment*, 324, 183-199.
- Guilhelmelli, F., Vilela, N., Albuquerque, P., Derengowski, Lda S., Silva-Pereira, I., Kyaw, C. M. (2013). Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Frontiers in Microbiology*, 4, 353.
- Gulcin, I., Huyut, Z., Elmastas, M., Aboul-Enein, H. Y. (2010). Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry*, 3, 43-53.
- Griffin, D. H. (1994). Molecular architecture, Fungal Physiology, 2th edition, Wiley Liss, New York.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (1999). Free Radicals in Biology and Medicine 3rd ed. New York: Oxford University Press, 140-184.
- Hauck, M., de Bruyn, U., Leuschner, C. (2013). Dramatic diversity losses in epiphytic lichens in temperate broad-leaved forests during the last 150 years. *Biological Conservation*, 157, 136-145.
- Hawksworth, D. L., Rose, F. (1970). Qualitative scale for estimating sulphur dioxide air pollution in England and Wales using epiphytic lichens. *Nature*, 227, 145-148.
- Hawksworth, D. L. (1976). Lichen chemotaxonomy. In: Brown DH, Hawksworth DL, Bailey RH (eds) Lichenology: progress and problems. Academic Press, London.
- Hawksworth, D. L. (1991). The fungal dimension of biodiversity : magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research*, 95, 641-655.
- Ibanez, E., Kubatova, A., Senorans, F. J., Cavero, S., Reglero, G., Hawthorne, S. B. (2003). Subcritical water extraction of antioxidant compounds from rosemary plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 375-382.
- Ingólfssdóttir, K., Lee, S. K., Bhat, K. P. L., Lee, K., Chai, H. B., Kristinsson, H., Song, L. L., Gills, J., Gudmundsdóttir, J. T., Mata-Greenwood, E., Jang, M. S., Pezzuto, J. M. (2000). Evaluation of selected lichens from Iceland for cancer chemopreventive and cytotoxic activity. *Pharmaceutical Biology*, 38, 313-317.
- Ingólfssdóttir, K. (2002). Usnic acid. *Phytochemistry*, 61, 729-736.
- Javeria, S., Shahi, S. K., Shahi, M. P., Uperti, D. K. (2013). *Parmotrema nilgherrense*: potential antimicrobial activity against drug resistant pathogens. *International Journal of Microbial Resource Technology*, 2, 36-40.
- Jakšić, P. i saradnici. (2002). Predeo izuzetnih odlika „Radan“, predlog za stavljanje pod zaštitu kao prirodnog dobra od velikog značaja, studija, Beograd.
- Jayaprakasha, G. K., Jaganmohan, R. L. (2000). Phenolic constituents from lichen *Parmotrema stuppeum* (Nyl.) Hale and their antioxidant activity. *Zeitschrift für Naturforschung*, 55c, 1018-1022.

Kaeffer, M. I., de Azevedo Martins, S. M., Alves, C., Pereira, V. C., Fachel, J., Ferrao Vargas, V. M. (2011). Corticolous lichens as environmental indicators in urban areas in southern Brazil, *Ecological indicators*, 11, 1319-1332.

Katić, D. Prilog građi za floru lišaja u Srbiji i sitniji prilozi flori Srbije, *Nastavnik*, 18(3-4), 95-98; 18(5-6), 184-189, 1907.

Karagoz, A., Dogruoz, N., Zeybek, Z., Aslan, A. (2009). Antibacterial activity of some lichen extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3, 1034-1039.

Karthikaidevi, G. G., Thirumaran, K., Manivannan, P., Anantharaman, K., Kathiresan, Balasubramanian, T. (2009). Screening of the antibacterial properties of lichen *Roccella belangeriana* (Awasthi) from Pichavaram mangrove (*Rhizophora* Sp.). *Advances in Biological Research*, 3, 127-131.

Kirschbaum, U., Windisch, U., Vorbeck, A., Hanewald, K. (2006) Mapping lichen diversity in Wetzlar and Giessen as indicator of air quality. (Comparison between the surveys of 1970, 1985, 1995 and 2005). *Gefahrstoffe - Reinhaltung der Luft*, 66, 272-280.

Kirschbaum, U., Cezanne, R., Eichler, M., Hanewald, K., Windisch, U. (2012). Long-term monitoring of environmental change in German towns through the use of lichens as biological indicators: comparison between the surveys of 1970 (1980), 1985, 1995, 2005 and 2010 in Wetzlar and Giessen. *Environmental Science Europe*, 24, 1-19.

Knop, W. (1844). Chemisch-physiologische Untersuchung über die Flechten, *Ann. Chemical Pharmaceutic*, 49, 103-124.

Kohonen, T. (1982). Self-organized formation of topologically correct feature maps. *Biological cybernetics*, 43, 59-69.

Kohonen, T. (2001). *Self-organizing maps*, Springer, Berlin.

Kosanić, M., Ranković, B., Vukojević, J. (2011). Antioxidant properties of some lichen species. *Journal of Food Science and Technology*, 48, 584-590.

Kosanić, M., Ranković, B., Stanojković, T. (2012). Antioxidant, Antimicrobial, and Anticancer Activity of 3 *Umbilicaria* Species. *Journal of Food Science*, 77, T20-T25.

Kosanić, M., Manojlović, N., Janković, S., Stanojković, T., Ranković, B. (2013). *Evernia prunastri* and *Pseudoevernia furfuraceae* lichens and their major metabolites as antioxidant, antimicrobial and anticancer agents. *Food and Chemical Toxicology*, 53, 112-118.

Kosanić, M., Ranković, B., Stanojković, T., Rančić, A., Manojlović, N. (2014a). *Cladonia* lichens and their major metabolites as possible natural antioxidant, antimicrobial and anticancer agents, *LWT - Food Science and Technology*, 59, 518-525.

Kosanić, M., Šeklić, D., Marković, S., Ranković, B. (2014b). Evaluation of antioxidant, antimicrobial and anticancer properties of selected lichens from Serbia, *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 9, 273-287.

Kricke, R., Loppi, S. (2002). Bioindication: the IAP approach. In Nimis P, Scheidegger C, Wolseley, P. (Eds.) *Monitoring with lichens-Monitoring lichens*. Dordrecht, Kluwer Academic.

Kumar, K. C. S., Banskota, A. H., Manandhar, M. D. (1996). Isolation and identification of some chemical constituents of *Parmelia nepalensis*. *Planta Medica*, 62, 93-94.

Kušan, F. (1953). *Prodromus flore lišajeva Jugoslavije*, Jugoslavenska Akademija znanosti i umetnosti, Zagreb. 595 pp.

Larsen, R. S., Bell, J. N. B., James, P. W., Chimonides, P. J., Rumsey, F. J., Tremper, A., Purvis, O. W. (2007). Lichen and bryophyte distribution on oak in London in relation to air pollution and bark acidity. *Environmental Pollution*, 146, 332-340.

- Lawrey, J. D. (1986). Biological role of lichen substances. *Bryologist*, 89, 111-122.
- Launert, E. (1981). Edible and Medicinal Plants. *Hamlyn*.
- Lebail, JBEF. (1853). Des lichens, consideres sous le point de vue economique, medical, et physiologique (nutrition). M.D. thesis, Faculte de Me decine de Paris, France.
- Lin, J., Opoku, A. R., Geheeb-Keller, M., Hutchings, A. D., Terblanche, S. E., Jäger, A. K., Van Staden, J. (1999). Preliminary screening of some traditional zulu medical plants for anti-inflammatory and anti-microbial activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 68, 267-274.
- Lisowska, M. (2011). Lichen recolonisation in an urban-industrial area of southern Poland as a result of air quality improvement. *Environmental Monitoring and Assessment*, 179, 177-190.
- Loppi, S., Giovannelli, L., Pirintsos, S., Putorti, E., Corsini, A. (1997). Lichens as bioindicators of recent changes in air quality (Montecatini Terme, Italy). *Ecologia mediterranea*, 23, 53-56.
- Loppi, S., Ivanov, D., Boccardi, R. (2002). Biodiversity of epiphytic lichens and air pollution in the town of Siena (central Italy). *Environmental Pollution*, 116, 123-128.
- Loppi, S. (2014). Lichens as sentinels for air pollution at remote alpine areas (Italy). *Environmental Science and Pollution Research*, 41, 2563-2571.
- Llop, E., Pinho, P., Matos, P., Pereira, M. J., Branquinho, C. (2012). The use of lichen functional groups as indicators of air quality in a Mediterranean urban environment. *Ecological Indicators*, 13, 215-221.
- Madigan, M., Martinko, J., Stahl, D., Clark, D. (2011). Brock biology of microorganisms, 13th edition, Pearson/Benjamin Cummings, San Francisco.
- Malhotra, S., Subban, R., Singh, A. P. (2008). Lichens- role in traditional medicine and drug discovery. *The Internet Journal of Alternative Medicine*, 5, 1-5.
- Manojlović, N., Vasiljević, P., Gritsanapan, W., Supabphol, R., Manojlović, I. (2010). Phytochemical and antioxidant studies of *Laurera benguelensis* growing in Thailand. *Biological Research*, 43, 169-176.
- Manojlović, N., Vasiljević, P., Masković, P., Jušković, M., Bogdanović-Dušanović, G. (2012). Chemical composition, antioxidant, and antimicrobial activities of Lichen *Umbilicaria cylindrica* (L.) Delise (Umbilicariaceae). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-8.
- Marcilio, I., Gouveia, N. (2007). Quantifying the impact of air pollution on the urban population of Brazil. *Cadernos de Saude Publica*, 23, 529-536.
- Maćejka, M., Tanasković, R. (2008). Opština Kuršumlija – turistička monografija i vodič. Turistička organizacija opštine Kuršumlija.
- Marinović, R. (1988). Osnovi mikologije i lihenologije. Naučna knjiga, Beograd.
- Mayer, A. L., Vihermaa, L., Nieminen, N., Luomi, A., Posch, M. (2009). Epiphytic macrolichen community correlates with modeled air pollutants and forest conditions. *Ecological Indicators*, 9, 992-1000.
- Mayer, M., O'Neill, M. A., Murray, K. E., Santos-Magalhaes, N. S., Carneiro-Leao, A. M. A., Thompson, A. M., Appleyard, V. C. L. (2005). Usnic acid: a non-genotoxic compound with anti-cancer properties. *Anticancer Drugs*, 16, 805-809.
- Mayer, W., Pfefferkorn-Dellali, V., Tuerk, R., Dullinger, S., Mirtl, M., Dirnboeck, T. (2013). Significant decrease in epiphytic lichen diversity in a remote area in the European Alps, Austria. *Basic and Applied Ecology*, 14, 396-403.

- McCune, B., Mefford, M. (1999). PC-ORD: multivariate analysis of ecological data, Version 4 for Windows (User's Guide), MjM Software Design.
- Meda, A., Lamien, C. E., Romito, M., Millogo, J., Nacoulma, O. G. (2005). Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in burkina fasan honey, as well as their radical scavenging activity, *Food Chemistry*, 91, 571–577.
- Miao, V., Coëffet-LeGal, M. F., Brown, D., Sinnemann, S., Donaldson, G., Davies, J. (2001). Genetic approaches to harvesting lichen products. *Trends in biotechnology*, 19, 349-355.
- Milić, M. (1981). Epifitski lišaji užeg područja Beograda, Diplomski rad, Prirodno-matematički fakultet u Beogradu.
- Milić, M., Blaženčić, J. (1993). Epifitski lišajevi grada Beograda. *Glasnik Instituta za botaniku i botaničke bašte Univerziteta u Beogradu*, 24-25, 83-96.
- Mitrović, T., Stamenković, S., Cvetković, V., Tošić, S., Stanković, M., Radojević, I., Stefanović, O., Čomić, Lj., Đačić, D., Ćurčić, M., Marković, S. (2011). Antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of five lichen species. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 5428-5448.
- Mitrović, T., Stamenković, S., Cvetković, V., Radulović, N., Mladenović, M., Stanković, M., Topuzović, M., Radojević, I., Stefanović, O., Vasić, S., Čomić, Lj. (2014). *Platismatia glauca* and *Pseudevernia furfuracea* lichens as sources of antioxidant, antimicrobial and antibiofilm agents. *Experimental and Clinical Sciences*, 13, 938-953.
- Molnár, K., Farkas, E. (2010). Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review. *Zeitschrift Naturforsch*, 65c, 157-173.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63.
- Munzi, S., Ravera, S., Caneva, G. (2007). Epiphytic lichens as indicators of environmental quality in Rome. *Environmental Pollution*, 146, 350–358.
- Munzi, S., Triggiani, D., Ceccarelli, D., Climati, E., Tiezzi, A., Pisani, T., Paoli, L., Loppi, S. (2014). Antiproliferative activity of three lichen species belonging to the genus *Peltigera*. *Plant Biosystems*, 148, 83–87.
- Murati, M. (1992). Flora lišajeva I, Univerzitet u Prištini, Priština.
- Nash, T. H. (1996). Lichen biology, III ed.; Cambridge University Press, New York, 88-180 pp.
- Nash, T. H. (2008). Lichen Biology, 2nd ed.; Cambridge University Press: Cambridge, UK.
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). (1998). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Conidium-forming Filamentous Fungi, Proposed Standard p. 38.
- Nishikawa, Y., Takeda, T., Shibata, S., Fukuoka, F. (1910) Polysaccharides in lichens and fungi. Further investigation on the structures and the antitumor activity of the polysaccharides from *Gyrophora esculenta* Miyoshi and *Lasallia papulosa* Llano. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 17.
- Nylander, W. (1866). Les lichens du Jardin du Luxembourg, B. Soc. Bot. Fr.- Lett., 13, 364-372.
- Odabasoglu, F., Aslan, A., Cakir, A., Suleyman, H., Karagoz, Y., Bayir, Y., Halici, M. (2005). Antioxidant activity, reducing power and total phenolic content of some lichen species. *Fitoterapia*, 76, 216-219.

Ohno, M., Abe, T. (1991). Rapid colorimetric assay for the quantification of leukemia inhibitory factor (LIF) and interleukin-6 (IL-6). *Journal of Immunological Methods*, 145, 199-203.

Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction prepared from glucoseamine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, 44, 307-314.

Øvstedal, D. O., Lewis Smith, R. I. (2001). Lichens of Antarctica and South Georgia. A guide to their identification and ecology, Cambridge University Press, Cambridge.

Pacheco, A. M. G., Freitas, M. C., Baptista, M. S., Vasconcelos, M. T. S. D., Cabral, J. P. (2008). Elemental levels in tree-bark and epiphytic-lichen transplants at a mixed environment in mainland Portugal, and comparisons with an in situ lichen. *Environmental Pollution*, 151, 326-333.

Pančić, J. (1859). Die flora der serpetinebergein mittal Serbien, Verhandlungen der kaiserlich-koniglichen zoologisch-botanischen Gesellschaft in Wien, 9, 139-150.

Paoli, L., Munzi, S., Guttová A., Senko, D., Sardella, G., Loppi, S. (2015). Lichens as suitable indicators of the biological effects of atmospheric pollutants around a municipal solid waste incinerator (S Italy). *Ecological Indicators*, 52, 362-370.

Paudel, B., Bhattarai, H. D., Lee, J. S., Hong, S. G., Shin, H. W., Yim, J. H. (2008a). Antibacterial potential of antarctic lichens against human pathogenic Grampositive bacteria. *Phytotherapy Research*, 22, 1269-1271.

Paudel, B., Bhattarai, H. D., Lee, J. S., Hong, S. G., Shin, H. W., Yim, J. H. (2008b). Antioxidant activity of polar lichens from King George Island (Antarctica). *Polar Biology*, 31, 605-608.

Pavletić, Z., Murati, M. (1980). The effect of air pollution in the lichens growth in the area of town Skopje. *Acta Biologiae et Medicinae Experimentalis*, 5, 33-36.

Perez- Llano, G. A. (1944). Economic uses of lichens. *Economic Botany*, 2, 15-45.

Perlmutter, G. B. (2010). Bioassessing air pollution effects with epiphytic lichens in Raleigh, North Carolina, USA. *Bryologist*, 113, 39-50.

Phillips, R. (1978). Trees in Britain, Europe and North America, Word Lock Limited, 287, London.

Pinho, P., Branquinho, C., Cruz, C., Sim Tang, Y., Dias, T., Rosa, A. P., Máguas, C., Martins- Loução, M. A. (2009). Assessment of critical levels of atmospheric ammonia for lichen diversity in cork-oak woodland Portugal. In: Sutton, M., Reis, S., Baker, S. (Eds.), Atmospheric Ammonia. Springer Science + Business Media, New York- Heidelberg, 109-120.

Pinho, P., Bergamini, A., Carvalho, P., Branquinho, C., Stofer, S., Scheidegger, C., Maguas, C. (2012). Lichen functional groups as ecological indicators of the effects of land-use in Mediterranean ecosystems. *Ecological indicators*, 15, 36-42.

Podterob, A. (2008). Chemical composition of lichens and their medical applications. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 42, 582-588.

Pompilio, A., Pomponio, S., Vincenzo, V., Crocetta, V., Nicoletti, M., Piovani, M., Garbarino, J., Bonaventura, G. (2013). Antimicrobial and antibiofilm activity of secondary metabolites of lichens against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from cystic fibrosis patients. *Future Microbiology*, 8, 281-292.

Poornima, G., Kekuda, T. R. P., Vinayaka, K. S. (2012). Antioxidant efficacy of *Olea dioica* Roxb (Oleaceae) leaves. *Biomedicine*, 4, 506-510.

Purvis, W. (2000). Lichens. London: Natural History Museum, London.

Ramos, D. B. M., Gomes, F. S., Napoleão, T. H., Paiva, P. M., Correia da Silva, M. D., Barroso Coelho, L. C. (2014). Antimicrobial Activity of *Cladonia verticillaris* Lichen Preparations on Bacteria and Fungi of Medical Importance, *Chinese Journal of Biology*, 7.

Ranković, B., Mišić, M. (2008). The antimicrobial activity of the lichen substances of the lichens *Cladonia furcata*, *Ochrolechia androgyna*, *Parmelia caperata* and *Parmelia conspersa*, *Biotechnol. Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 22, 1013-1016.

Ranković, B., Ranković, D., Kosanić, M., Marić, D. (2010a.) Antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Anaptychia ciliaris*, *Nephroma parile*, *Ochrolechia tartarea* and *Parmelia centrifuga*. *Central European Journal of biology*, 5, 649-655.

Ranković, B., Ranković, D., Marić, D. (2010b). Antioxidant and antimicrobial activity of some lichen species. *Mikrobiologija*, 79, 812-818.

Ranković, B., Kosanić, M., Stanojković, T. (2011). Antioxidant, antimicrobial and anticancer activity of the lichens *Cladonia furcata*, *Lecanora atra* and *Lecanora muralis*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11, 97.

Ranković, B., Kosanić, M., Stanojković, T., Vasiljević, P., Manojlović, N. (2012). Biological activities of *Toninia candida* and *Usnea barbata* together with their norstictic acid and usnic acid constituents. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 14707–14722.

Ranković, B., Kosanić, M., Manojlović, N., Rančić, A., Stanojković, T. (2014). Chemical composition of *Hypogymnia physodes* lichen and biological activities of some its major metabolites. *Medicinal Chemistry Research*, 23, 408-416.

Ranković, B. (2015). Lichen Secondary Metabolites Bioactive Properties and Pharmaceutical Potential. Springer International Publishing, 105-125.

Rekha, C., Poornima, G., Manasa, M., Abhipsa, V., Devi, P. J., Kumar, V. H. T., Kekuda, P. T. R. (2012). Ascorbic Acid, total phenol content and antioxidant activity of fresh juices of four ripe and unripe Citrus fruits. *Chemical Science Transactions*, 2, 303-310.

Ren, M. R., Hur, J. S., Kim, J. Y., Park, K. W., Park, S. C., Seong, C. N., Jeong, I. Y., Byun, M. W., Lee, M. K., Seo, K. I. (2009). Anti-proliferative effects of *Lethariella zahlbruckneri* extracts in human HT-29 human colon cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 2157-2162.

Републички завод за статистику. <http://popis2011.stat.rs>.

Републички хидрометеоролошки завод Србије. Годишњи извештаји. http://www.hidmet.gov.rs/ciril/meteorologija/klimatologija_godisnjaci.php

Ristić, S., Ranković, B., Kosanić, M., Stanojković, T., Stamenković, S., Vasiljević, P., Manojlović, I., Manojlović, N. (2016a). Phytochemical study and antioxidant, antimicrobial and anticancer activities of *Melanelia subaurifera* and *Melanelia fuliginosa* lichens. *Journal of food science and technology*, 53, 2804-2816.

Ristić, S., Ranković, B., Kosanić, M., Stamenković, S., Stanojković, T., Sovrlić, M., Manojlović, N. (2016b). Biopharmaceutical potential of two Ramalina lichens and their metabolites. *Current pharmaceutical biotechnology*, 17, 651-658.

Rose, F. (1990). The epiphytic (corticolous and lignicolous) lichen flora of the Foret de Fontainebleau. *Bulletin Societe Botanique de France*, 137, 197-209.

Russo, A., Piovano, M., Lombardo, L., Vanella, L., Cardile, V., Garbarino, J. (2006). Pannarin inhibits cell growth and induces cell death in human prostate carcinoma DU-145 cells. *Anticancer Drugs*, 17, 1163-1169.

Şahin, S., Oran, S., Şahintürk, P., Demir, C., Öztürk, Ş. (2015). *Ramalina* lichens and their major metabolites as possible natural antioxidant and antimicrobial agents. *Journal of Food Biochemistry*, 39, 471-477.

Saipunkaew W, Wolseley PA, Chimonoidees PJ. (2005). Epiphytic lichens as indicators of environmental health in the vicinity of Chiang Mai city, Thailand. *Lichenologist*, 37, 345-356.

Samanta, S. K., Singh, O. V., Jain, R. K. (2002). Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends in Biotechnology*, 20, 243-248.

Sariburun, E., Şahin, S., Demir, C., Turkben, C., Uylaser, C. (2010). Phenolic content and antioxidant activity of raspberry and blackberry cultivars. *Journal of Food Science*, 75, 328-335.

Sarahroodi, S., Jafari-Najafi, R., Nasri, S., Rahampur, K., Maleki-Jamshid, A., Esmaeili, S. (2012). Effects of *Nepeta menthoides* aqueous extract on retention and retrieval of memory in mice. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 15, 1085-1089.

Sarker, S. D., Nahar, L., Kumarasamy, Y. (2007). Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*, 42, 321-324.

Savić, S. (1995). Diverzitet lišaja (*lichenes*) Jugoslavije sa pregledom vrsta od međunarodnog značaja, In Stevanović, V., Vasić, V. (eds): Biodiverzitet Jugoslavije sa pregledom vrsta od međunarodnog značaja, 562 str., Biološki fakultet, Ecolibri, Beograd.

Savić, S. (1996). Lichen researches in the mountain of Kopaonik (1992-1993). *Ekologija*, 31, 55-62.

Savić, S. (1998a). Changes in the composition of epiphytic lichens in the Belgrade area (1981-1991). *Ekologija*, 33, 65-70.

Savić, S. (1998b). Epiphytic lichens as bioindicators of air pollution in the area of Belgrade. *Sauteria*, 9, 331-340.

Seinfeld, J. H., Pandis, S. N. (1998). Atmospheric chemistry and physics. From air pollution to climate change. John Wiley & Sons, Inc., New York.

Sharma, A., Sharma, M., Dobhal, M. (2013). Phytochemical constituents from different species of *parmelia* genus: A review. *Pelagia Research Library*, 4, 1-11.

Shukla, V., Joshi, G. P., Rawat, M. S. M. (2010). Lichens as a potential natural source of bioactive compounds: a review. *Phytochemistry Reviews*, 9, 303-314.

Shukla, V., Upreti, D. K., Bajpai, R. (2014). Introduction. In: Shukla, V., Upreti, D. K., Bajpai, R. (eds) *Lichen to biomonitor the environment*. Springer, India, pp 1-20.

Shrestha, G., St. Clair, L. L. (2013). Lichens: A promising source of antibiotic and anticancer drugs. *Phytochemistry Reviews*, 12, 229-244.

Shrestha, G., El-Naggar, A., St. Clair, L. L., O'Neill, K. L. (2015). Anticancer Activities of Selected Species of North American Lichen Extracts. *Phytochemistry Reviews*, 29, 100-107.

Sies, H. (1991). Oxidative stress: from basic research to clinical application. *American Journal of Medicine*, 91, 31-38.

Simić, M. (1892). Lišaji u Srbiji. *Nastavnik*, 450-453.

Smith, D. C. (1967). The movement of carbohydrate from alga to fungus in lichens. *Bulletin de la Société Botanique de France*, 129-133.

Skoberne, P. (1974). Angleška mladina in varstvo okolja. *Proteus*, 5, 235-239.

Skoberne, P. (1974/75). Vpliv onesnaženega zraka na lišaje. *Proteus*, 37, 110-113; 424-428, 3, 97-144.

Skoberne, P. (1975). Lišajsko kartiranje Celja in okolice. *Varstvo narave*, 8, 71-80.

- Skoberne, P. (1977). Istraživanje uticaja zagađene atmosfere na lišaje. *Zaštita atmosfere*, 10, 13-16.
- Skoberne, P. (1977/78). Prizadevanje mladih pri raziskavah onesnaženosti zraka. *Proteus*, 1, 32-34.
- Skoberne, P. (1979). Vpliv onesnaženega Celjskega zraka na presajene lišaje. *Gozdarski vestnik*, 37, 15-24.
- Slaby, A., Lisowska, M. (2012). Epiphytic lichen recolonization in the centre of Cracow (southern Poland) as a result of air quality improvement. *Polish Journal of Ecology*, 60, 225-240.
- Slinkard, K., Slingleton, V. L. (1997). Total phenolic analyses: automation and comparison with manual method. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28, 49-55.
- Srivastava, P., Upreti, D., Dhole, T., Srivastava, A., Nayak, M. (2013). Antimicrobial property of extracts of indian lichen against human pathogenic bacteria. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*.
- Stanojević, M. (2001). Turističke vrednosti Topličkog kraja. *Ekonomika*.
- State, G., Popescu, I. V., Radulescu, C., Macris, C., Stihi, C., Gheboianu, A., Dulama, I., Nitescu, O. (2012). Comparative studies of metal air pollution by atomic spectrometry techniques and biomonitoring with moss and lichens. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 89, 580-586.
- Stanly, C., Hag Ali, D. M., Keng, C. L., Boey, P. L., Bhatt, A. (2011). Comparative evaluation of antioxidant activity and total phenolic content of selected lichen species from Malaysia. *Journal of Pharmacy Research*, 4, 2824-2827.
- Stamenković, S. (1995). Lignikolna lišajska flora Prokuplja. *Ekologija*, 30, 41-46.
- Stamenković, S. (1997). Biological indication of air pollution in Prokuplje by means of lignicolous lichens. *Ekologija*, 32, 107-110.
- Stamenković, S. (1998). Biological indication of air pollution in Vlasotince using lignicolous lichens. *Ekologija*, 33, 71-74.
- Stamenković, S. (2002). Indikacija aerozagađenja u urbanim centrima južne i jugoistočne Srbije korišćenjem lišajeva kao bioindikatora. Doktorska disertacija. Biološki fakultet. Beograd, 1-189.
- Stamenković, S. (2004). Bioindikacija stepena zagađenosti vazduha urbanih sredina korišćenjem lišaja kao bioindikatora, seminar, Biološki fakultet u Beogradu. Institut za botaniku i Botanička bašta „Jevremovac“.
- Stamenković, S., Cvijan, M., Arandelović, M. (2010). Lichens as bioindicators of air quality in Dimitrovgrad (South-Eastern Serbia). *Archives of Biological Sciences*, 62, 643-648.
- Stamenković, S., Ristić, S., Đekić, T., Mitrović, T., Baošić, R. (2013). Air quality indication in (Southeastern Serbia) using lichens as bioindicators. *Archives of Biological Sciences*, 65, 893-897.
- Stocker-Worgotter, E., Elix, J. A. (2002). Secondary chemistry of cultured mycobionts: formation of a complete chemosyndrome by the lichen fungus of *Lobaria spathulata*. *Lichenologist*, 34, 351-359.
- Stocker-Worgotter, E. (2008). Metabolic diversity of lichen-forming ascomycetous fungi: culturing, polyketide and shikimate metabolite production, and PKS genes. *Natural Product Reports*, 25, 188-200.
- Stojković, M., Simić, V., Milošević, D., Mančev, D., Penczak, T. (2013). Visualization of fish community distribution patterns using the self-organizing map: A case study of the Great Morava River system (Serbia). *Ecological Modelling*, 248, 20-29.

Стратегија одрживог развоја општине Куршумлија 2010-2020. године.
<http://tokursumljia.rs/wp-content/uploads/2016/06/strategija-2010-2020.pdf>

Sujetoviene, G. (2015). Monitoring lichens as indicators of atmospheric quality. In: Upreti, D. K., Divakar, P. K., Shukla, V., Bajpai, R., (Eds.). Recent Advances in Lichenology, Modern Methods and Approaches in Biomonitoring and Bioprospection, vol. I. Springer, pp. 87-118.

Sujetoviene, G., Galinyte, V. (2016). Effects of the urban environmental conditions on the physiology of lichen and moss. *Atmospheric Pollution Research*, 1-8.

Šilić, Č. (1988). Atlas drveća i grmlja. SP "Svijetlost", 217 str., Sarajevo.

Šilić, Č. (1990). Ukrasno drveće i grmlje. SP "Svijetlost", 221 str., Sarajevo.

Štefan, L., Tepšić, T., Zavidović, T., Urukalo, M., Tota, D., Domitrović, R. (2007). Lipidna peroksidacija uzroci i posledice. *Medicina*, 43, 84-93.

Tandon, S. K., Chandra, S., Gupta, S., Jawahar, L. (1995). Pharmacological effects of alcoholic extract of *Eucalyptus citriodora* leaves. *Indian Veterinary Journal*, 72, 762-764.

Tirzitis, G., Bartosz, G. (2010). Determination of antiradical and antioxidant activity: basic principles and new insights. *Acta Biochimica Polonica*, 57, 139-142.

Vasiljević, P., Najman, S., Manojlović, N., Vukelić, M., Jušković, M. (2009). In vitro cytotoxic activity of lichen *Laurera benguelensis*. *Planta Medica*, 75, 1047-1048.

Vasudeo, P. Z., Lew, P. C. (2012). Biopharmaceutical potential of lichens. *Pharmaceutical Biology*, 50, 778-798.

Washburn, S. J., Cullen, T. M. (2006). Epiphytic macrolichens of the greater Cincinnati metropolitan area – part II: distribution, diversity and urban ecology. *Bryologist*, 109, 516-526.

Wirth, V. (1995). Die Flechten Baden-Württembergs-Teil 1 and 2, Verlag Ulmer, Stuttgart.

Wolterbeek, B. (2002). Biomonitoring of trace element air pollution: principles, possibilities and perspectives. *Environmental Pollution*, 120, 11-21.

Xu, F., Li, L., Huang, X., Cheng, H., Wang, Y., Cheng, S. (2010). Antioxidant and antibacterial properties of the leaves and stems of *Premna microphylla*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 23, 2544-2550.

Yilmaz, M., Türk, A. O., Tay, T., Kivanç, M. (2004). The antimicrobial activity of extracts of the lichen *Cladonia foliacea* and its (-)-usnic acid, atranorin, and fumarprotocetraric acid constituents. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 59, 249-254.

Zeytinoglu, H., Incesu, Z., Tuylu, B. A., Turk, A., Barutca, B. (2008). Determination of genotoxic, antigenotoxic and cytotoxic potential of the extract from lichen *Cetraria aculeata* (Schreb.) Fr. *In vitro. Phytotherapy Research*, 22, 118-123.

Zopf, W. (1907). Die Flechtenstoffe in Chemischer, Botanischer, Pharmakologischer und Technischer Beziehung. G. Fischer, Jena.

8. ПРИЛОГ

Табела 9. Таксони лишaja, вредност коефицијента f , фреквенције (%) и вредности IAP и INI на истраживаним тачкама у Луковској бањи.

Табела 10. Таксони лишaja, вредност коефицијента f , фреквенције (%) и вредности IAP и INI на истраживаним тачкама у Куршумлијској бањи.

Табела 11. Таксони лишaja, вредност коефицијента f , фреквенције (%) и вредности IAP и INI на истраживаним тачкама у Пролом бањи.

Табела 12. Таксони лишaja, вредност коефицијента f , фреквенције (%) и вредности IAP и INI на истраживаним тачкама на Радан планини.

Табела 13. Таксони лишaja, вредност коефицијента f , фреквенције (%) и вредности IAP и INI на истраживаним тачкама у Куршумлији.

Табела 14. Квантитативна процена основних параметара животне средине и вредности индекса антропогеног утицаја-INI на истраживаним тачкама

Таб. 9. Таксони лишјаја, вредност коефицијента f , фреквенције (%) и вредности IAP и INI на истраживаним тачкама у Луковској бањи

Истраживана тачка	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	%
Таксон																
<i>Aparuschia citiaris</i>	0	0	0	0	0	1	1	1	2	0	1	1	0	0	0.4	46.67
<i>Buelia punctata</i>	0	0	0	0.4	2	1	2	1	1	1	0.4	1	0	1	1	73.33
<i>Caloplaca cerina</i>	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	33.33
<i>Candelaria concolor</i>	0	0	0	0.4	0.1	0.1	0	0	0	0.3	0	0	0	0	0	26.67
<i>Candelariella aurella</i>	0	0	0	1	0.3	0.1	0	0	0	0	0	0.4	0	0	0	26.67
<i>Candelariella xanthostigma</i>	2	0	3	1	1	1	0	0	0	2	0	1	0.4	1	0	60.00
<i>Cetraria islandica</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6.67
<i>Cladonia coniocraea</i>	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	40.00
<i>Cladonia convoluta</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0.4	0	20.00
<i>Cladonia fimbriata</i>	0	1	0	0	1	1	1	0.3	1	0	1	1	0	1	0	60.00
<i>Cladonia foliacea</i>	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	53.33
<i>Cladonia furcata</i>	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	1	1	1	0	0	33.33
<i>Cladonia ramulosa</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6.67
<i>Cladonia rangiferina</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6.67
<i>Cladonia rangiformis</i>	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	53.33
<i>Cladonia pyxidata</i>	0	0	0	0	0	0	1	0.4	0	0	0	1	1	0.4	0	33.33
<i>Cladonia subulata</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	13.33
<i>Evernia prunastri</i>	4	5	5	4	4	3	0	5	0	4	4	2	4	4	3	86.67

Таб. 9 (наставак). Таксони лишјаја, вредност коефицијента f , фреквенције (%) и вредности IAR и INI на истраживаним тачкама у Луковској бањи

Истраживана тачка	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	%
Таксон																
<i>Flavoparmelia caperata</i>	3	5	5	1	0	3	0	4	0	3	3	0	1	2	3	73.33
<i>Graphis elegans</i>	0	0	0	0	0	0	0	0.4	0	0	0	0	0	0	0	6.67
<i>Graphis scripta</i>	0	0	0	0	0	2	4	2	2	0	0	0	2	0	1	40.00
<i>Hypogymnia physodes</i>	3	4	4	3	2	1	6	3	2	4	1	1	2	2	3	100.00
<i>Hypogymnia tubulosa</i>	2	0	4	2	0.4	2	1	2	1	2	1	0	0.3	1	1	86.67
<i>Lecanora allophana</i>	0	0	0	1	0.4	1	0	2	0.4	0	0	0	0.4	0	0.3	46.67
<i>Lecanora argentata</i>	0	0	0	0	1	1	0.3	1	0	0	0	0	0	0	0	26.67
<i>Lecanora carpinea</i>	0	0	0	0.3	0.3	0.4	0	0	0	0.4	0	0	1	0	0.3	40.00
<i>Lecanora expallens</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	6.67
<i>Lecanora glabrata</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6.67
<i>Lecanora intumescens</i>	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0.4	0.3	1	0	0.3	1	73.33
<i>Lecanora pulicaris</i>	0	0	0	0.3	1	1	1	1	1	0	0.4	0.3	0	0.3	0	60.00
<i>Lecidella carpathica</i>	0	0	0	0	0	0.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6.67
<i>Lecidella elaeochroma</i>	0	0	0	0.1	1	1	1	1	1	0.3	1	0.4	1	1	1	80.00
<i>Lepraria incana</i>	0	2	4	0	0	2	1	2	1	0	2	2	0	0	1	60.00
<i>Melanohalea exasperata</i>	0	0	1	1	1	1	1	1	0.4	1	0	0	0.4	1	0.4	73.33
<i>Melanohalea exasperatula</i>	0	1	0	0	2	1	0.3	0.4	0	0.4	1	0.3	0.4	1	0	66.67

Таб. 9 (наставак). Таксони лишаја, вредност коефицијента f, фреквенције (%) и вредности IAR и INI на истраживаним тачкама у Луковској бањи

Истраживана тачка	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	%
Таксон																
<i>Melanohalea olivacea</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.4	0	6.67
<i>Melanelixia fuliginosa</i>	0	0	0	0	1	0.4	0	0	0	0	0	1	1	1	1	40.00
<i>Melanelixia glabra</i>	0	0	0	0.3	1	0.1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	73.33
<i>Melanelixia subaurifera</i>	4	3	5	3	3	2	2	3	2	2	2	1	1	0	1	93.33
<i>Melanelixia subargentifera</i>	0	0	0	0	0	0	0	2	1	1	1	1	0	0	0	33.33
<i>Ochrolechia pallescens</i>	0	0	0	1	0.1	1	1	0.1	1	0	1	0.4	0.4	0	0.3	66.67
<i>Parmelia saxatilis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0.4	0	0	0	0	1	0	0	13.33
<i>Parmelia sulcata</i>	4	4	6	4	4	3	2	3	2	3	2	4	2	2	2	100.00
<i>Parmelia tiliacea</i>	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	2	1	0.4	1	1	66.67
<i>Parmelina pastilifera</i>	0	0	1	0	1	0.3	0	1	0	0.4	1	1	2	0.4	1	66.67
<i>Parmelina quercina</i>	0	0	0	0.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	13.33
<i>Parmeliopsis ambigua</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0.4	0	0	20.00
<i>Peltigera canina</i>	0	2	0	1	1	1	1	4	1	0	1	1	1	0	0	66.67
<i>Peltigera collina</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	6.67
<i>Peltigera rufescens</i>	0	0	0	2	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	40.00
<i>Pertusaria albescens</i>	1	1	2	0	0	0	1	0.4	0	0	1	0	2	0	1	53.33

Таб. 9 (наставак). Таксони лишјаја, вредност коефицијента f , фреквенције (%) и вредности IAR и INI на истраживаним тачкама у Луковској бањи

Истраживана тачка Таксон	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	%
<i>Pertusaria amara</i>	0	2	1	0	0	0	0.4	1	0	1	2	0	0	0	1	46.67
<i>Pertusaria pertusa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	6.67
<i>Phaeophyscia orbicularis</i>	3	0	0	2	3	2	1	1	0.4	3	1	4	4	1	3	86.67
<i>Physcia adscendens</i>	3	5	6	2	2	3	1	3	2	2	0.4	4	1	2	1	100.00
<i>Physcia airopolia</i>	2	0	0	0	2	1	1	1	2	1	0	1	0	1	1	66.67
<i>Physcia caesia</i>	0	0	0	0	0	1	0.3	0	1	0	0	0	0	0	0	20.00
<i>Physcia clementi</i>	0	0	0	0	0	0.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6.67
<i>Physcia semipinnata</i>	0	0	0	0	2	1	0	2	0	0	1	0.4	0.4	0	2	46.67
<i>Physcia stellaris</i>	0	0	0	1	0.3	1	2	2	1	1	1	1	1	0.3	0.4	80.00
<i>Physcia tenella</i>	0	0	0	1	1	0.4	1	0.3	1	0.4	1	1	0	1	0	66.67
<i>Physconia distorta</i>	0	0	0	0	0	0	0	0.1	1	0.4	0	0.3	1	0.4	0.4	46.67
<i>Physconia enteroxantha</i>	0	0	0	0	1	0	0	0.3	0	0	0	1	1	1	1	40.00
<i>Physconia grisea</i>	0	2	4	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	2	1	86.67
<i>Platismatia glauca</i>	0	0	0	0	0	0	5	0.1	3	0	0	0	0	0	0.1	26.67
<i>Pleurosticta acetabulum</i>	0	0	0	1	1	0	5	0	3	0	0.4	1	1	2	0.4	60.00
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	3	3	5	2	0	0.4	0	3	0	2	1	0	1	2	1	73.33
<i>Ramalina farinacea</i>	1	0	5	1	0	1	0	2	0	0.4	1	0	1	0	1	60.00

Таб. 9 (наставак). Таксони лишјаја, вредност коефицијента f , фреквенције (%) и вредности IAP и INI на истраживаним тачкама у Луковској бањи

Истраживана тачка	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	%
Таксон																
<i>Ramalina fastigata</i>	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0.4	0	2	40.00
<i>Ramalina fraxinea</i>	0	1	3	0	0	0.3	0	1	0	1	1	0	0	0	0.4	46.67
<i>Rhizocarpon geographicum</i>	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	26.67
<i>Rinodina colobina</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	6.67
<i>Usnea hirta</i>	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0.4	0.4	1	1	0	1	60.00
<i>Usnea subfloridana</i>	0	0	0	0	0	0	0	0.1	0	0	0.1	0	0.4	0	0.1	26.67
<i>Xanthoparmelia somloënsis</i>	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	33.33
<i>Xanthoria parietina</i>	4	0	1	2	4	1	2	3	2	2	0	2	2	2	2	86.67
Индекс атмосферске чистоће (IAP)	39	44	66	46	55	57	55	75	45	44	45	45	48	40	44	
Индекс антропогеног утицаја (INI)	24	12	14	16	7	5	7	14	7	21	14	12	15	18	18	

Таб. 10. Таксони лишаја, вредност коефицијента f , фреквенције (%) и вредности IAP и INI на истраживаним тачкама у Куршумлијској бањи

Истраживана тачка Таксон	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	%
<i>Aparychia ciliaris</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0.4	0	1	26.67
<i>Buelia punctata</i>	0	1	2	1	0	1	1	1	1	1	2	1	1	0	1	80.00
<i>Caloplaca cerina</i>	0.4	1	0	0.4	0	0.3	1	0.3	0.3	0	0	0	0	0	0	46.67
<i>Candelaria concolor</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	6.67
<i>Candelariella aurella</i>	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0.4	0	20.00
<i>Candelariella xanthostigma</i>	0.4	2	1	0	1	1	2	0	1	0.4	1	0	3	0.4	0	73.33
<i>Cetraria islandica</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0.4	0	1	0	0	0	0	13.33
<i>Cladonia coniocraea</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	26.67
<i>Cladonia fimbriata</i>	1	1	0	1	0.4	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	53.33
<i>Cladonia foliacea</i>	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	60.00
<i>Cladonia furcata</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	26.67
<i>Cladonia ramulosa</i>	0.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6.67
<i>Cladonia rangiformis</i>	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	40.00
<i>Cladonia pyxidata</i>	0	0	0	0	0.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6.67
<i>Cladonia subulata</i>	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	20.00
<i>Evernia prunastri</i>	6	3	2	2	4	2	1	2	4	2	3	4	3	4	4	100.00
<i>Flavoparmelia caperata</i>	2	1	1	3	1	1	1	1	3	2	1	3	2	2	4	100.00
<i>Graphis scripta</i>	0	0.4	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	40.00

Таб. 10 (наставак). Таксони лишаја, вредност коефицијента f , фреквенције (%) и вредности IAP и INI на истраживаним тачкама у Куршумлијској бањи

Истраживана тачка	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	%
Таксон																
<i>Hurogymnia physodes</i>	4	2	2	2	3	2	1	2	2	3	2	3	2	4	4	100.00
<i>Hurogymnia tubulosa</i>	1	1	0.3	1	0.4	1	0.4	0	1	1	1	1	1	2	1	93.33
<i>Lecanora allorphana</i>	0.3	0.4	1	0	1	0	0.3	0.3	1	0	1	0.4	0.4	0.4	0.3	80.00
<i>Lecanora argentata</i>	0.4	0	0	0	0.4	0.3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	26.67
<i>Lecanora carpinea</i>	0	0	0	0	0.3	0.3	0	0	0	1	0	0	0	1	0.4	33.33
<i>Lecanora chlorotera</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.3	0	0	6.67
<i>Lecanora intumescens</i>	0.4	1	1	1	0	1	1	0.4	1	1	1	1	1	1	1	93.33
<i>Lecanora pullicaris</i>	0.4	0.4	0.4	1	0	1	0	0	0	1	1	0.4	1	0.4	1	73.33
<i>Lecidella elaeochroma</i>	0.3	1	1	0.3	1	1	0.4	1	0.4	1	1	1	1	1	1	100.00
<i>Lepraria incana</i>	1	0	0	1	0	0.3	0.3	1	1	0	2	2	0	0	2	60.00
<i>Melanohalea exasperata</i>	1	1	0.4	1	1	0	0.4	1	1	0	1	0	0	0.3	0.3	73.33
<i>Melanohalea exasperatula</i>	0.4	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0.4	1	60.00
<i>Melanelixia fuliginosa</i>	0	1	0.4	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	33.33
<i>Melanelixia glabra</i>	0	0.4	1	0.3	0.3	0	0	1	1	0	0.4	1	0	0.3	0.4	66.67
<i>Melanelixia subaurifera</i>	3	2	1	1	1	2	0.4	1	2	4	1	2	1	3	2	100.00
<i>Melanelixia subargentifera</i>	0	0	0.4	2	0	0	0	0.4	1	1	0	0.4	0	0	0	40.00
<i>Ochrolechia pallescens</i>	0	1	0.3	0	0	1	0.4	0	0	0.3	0	1	1	1	1	60.00

Таб. 10 (наставак). Таксони лишаја, вредност коефицијента f , фреквенције (%) и вредности IAP и INI на истраживаним тачкама у Куршумлијској бањи

Истраживана тачка	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	%
<i>Parmelia saxatilis</i>	0.4	0	0	1	0	0	0	0.3	0	0	0	0	0	0	0	20.00
<i>Parmelia sulcata</i>	3	4	2	4	3	4	3	3	2	1	2	4	3	5	4	100.00
<i>Parmelia tiliaea</i>	1	0.4	0.3	0	1	1	0	0.4	1	0	1	1	0.3	0.4	0.4	80.00
<i>Parmelina pastilifera</i>	0.3	1	0	1	0	1	0.3	0	0	0	0	0.4	0	0.4	1	53.33
<i>Parmelina quercina</i>	0	0.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6.67
<i>Parmeliopsis ambigua</i>	0	0	0	0	0	0	0	0.3	0.3	1	0	0	0	0	1	26.67
<i>Peltigera canina</i>	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	60.00
<i>Peltigera rufescens</i>	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	26.67
<i>Pertusaria albescens</i>	2	0	0.3	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	26.67
<i>Pertusaria amara</i>	0.3	0	0	1	0	0	0	0.4	1	0	0	0	0	0	0	26.67
<i>Phaeophyscia orbicularis</i>	1	4	3	1	2	3	4	2	1	6	3	2	6	2	2	100.00
<i>Physcia adscendens</i>	2	4	4	2	4	2	4	3	0	3	4	2	6	3	2	93.33
<i>Physcia aipolia</i>	1	2	2	1	2	2	1	1	0.4	1	2	1	1	2	1	100.00
<i>Physcia semipinnata</i>	1	0	0.3	2	0	0	0	1	2	0	0	2	0	0.4	1	53.33
<i>Physcia stellaris</i>	1	0.4	1	0.3	2	1	0	0	1	2	1	0.4	1	1	1	86.67
<i>Physcia tenella</i>	0.3	0.4	0.3	0.4	1	0.3	1	0.4	1	1	0.4	1	0.4	0.3	1	100.00
<i>Physconia distorta</i>	0.1	0	1	0	0.4	0.3	1	0	0	1	0	0	0	0	0	40.00
<i>Physconia enteroxantha</i>	0	0	0	0	0	0.4	1	1	1	0.3	0	0	0	0	0	33.33

Таб. 10 (наставак). Таксони лишаја, вредност коефицијента f , фреквенције (%) и вредности IAP и INI на истраживаним тачкама у Куршумлијској бањи

Истраживана тачка	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	%
Таксон																
<i>Physconia grisea</i>	1	1	1	1	1	2	1	0.4	1	1	1	1	2	1	1	100.00
<i>Pleurosticta acetabulum</i>	0	0	0	0.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6.67
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	2	1	2	1	1	0.4	1	1	1	2	1	2	1	2	1	100.00
<i>Ramalina canariensis</i>	0	0	0	0.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6.67
<i>Ramalina farinacea</i>	1	0.4	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0.4	1	2	80.00
<i>Ramalina fastigiata</i>	1	0.3	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0.3	0.3	66.67
<i>Ramalina fraxinea</i>	0.3	0	0	1	0.3	0	0	0.3	1	0	1	1	0.4	0	1	60.00
<i>Rhizocarpon geographicum</i>	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	20.00
<i>Usnea hirta</i>	1	0.1	0.4	0	1	0.3	0.3	1	1	1	0.3	1	0.4	1	1	93.33
<i>Usnea subfloridana</i>	0.3	0	0	0	0	0	0	0.1	0.4	0	0	0	0	0	0	20.00
<i>Xanthoparmelia somloënsis</i>	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	33.33
<i>Xanthoria parietina</i>	2	3	3	1	2	3	4	2	1	2	3	1	4	2	0	93.33
Индекс атмосферске чистоће (IAP)	49	47	39	42	40	39	37	43	44	44	49	51	45	49	52	
Индекс антропогеног утицаја (INI)	7	6	12	14	12	10	12	6	7	7	8	5	5	12	8	

Таб. 11. Таксони лишцаја, вредност коефицијента f , фреквенције (%) и вредности IAP и INI на истраживаним тачкама у Пролом бањи

Истраживана тачка	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	%
<i>Аparychia ciliaris</i>	1	0.4	0.4	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	33.33
<i>Buelia punctata</i>	0.4	1	0.3	1	1	1	2	1	0.4	0	0	0	1	0	1	73.33
<i>Candelaria concolor</i>	0.3	0	0.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	20.00
<i>Candelariella aurella</i>	0	0	0.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0.3	26.67
<i>Candelariella xanthostigma</i>	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	33.33
<i>Cetraria islandica</i>	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	20.00
<i>Cladonia coniocraea</i>	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	40.00
<i>Cladonia convoluta</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	13.33
<i>Cladonia fimbriata</i>	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	46.67
<i>Cladonia foliacea</i>	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	33.33
<i>Cladonia furcata</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	26.67
<i>Cladonia rangiformis</i>	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	33.33
<i>Cladonia subulata</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0.4	1	0	0.4	0	0	0	20.00
<i>Evernia prunastri</i>	5	5	2	2	3	4	0	5	3	3	0	2	4	1	3	86.67
<i>Flavoparmelia caperata</i>	4	3	2	3	4	0.4	1	4	4	3	0	3	0.4	1	2	93.33
<i>Graphis scripta</i>	0	0	0	0.3	0	1	1	0	0	0.3	1	0	0	0.3	0	40.00
<i>Hypogymnia physodes</i>	5	4	3	3	5	2	3	4	2	3	3	2	4	1	4	100.00

Таб. 11 (наставак). Таксони лишаја, вредност коефицијента f , фреквенције (%) и вредности IAR и INI на истраживаним тачкама у Пролом бањи

Истраживана тачка	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	%
Таксон																
<i>Hypogymnia tubulosa</i>	2	2	2	2	1	0	4	3	2	1	2	1	1	0.4	1	93.33
<i>Lecanora alporhana</i>	0.3	1	0	0	0.4	0.4	0.3	0.3	0	0	0	0	0	0.3	1	53.33
<i>Lecanora argentata</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0.3	1	0	20.00
<i>Lecanora atra</i>	0	0.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.3	0	0	1	20.00
<i>Lecanora sapinea</i>	0	0	0	0.3	0.3	0	0.4	0.4	0.4	0.3	0.4	0	0	0	0.4	53.33
<i>Lecanora confusa</i>	0	0	0	0	0.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6.67
<i>Lecanora conizaeoides</i>	0	0.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	13.33
<i>Lecanora glabrata</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	6.67
<i>Lecanora intumescens</i>	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0.4	1	1	0	73.33
<i>Lecanora muralis</i>	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	26.67
<i>Lecanora pullicaris</i>	1	0.4	1	1	0.3	1	1	0.4	0	0	1	0.3	2	0.3	0	80.00
<i>Lecidella elaeochroma</i>	1	0.4	1	1	1	1	1	1	0.4	1	1	1	1	1	1	100.00
<i>Leparia incana</i>	3	1	1	2	1	0.4	0	2	2	1	0	1	0	0	1	73.33
<i>Melanohalea elegantula</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0.3	1	0	0	0	0	0	13.33
<i>Melanohalea exasperata</i>	0	0	1	0.4	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	33.33
<i>Melanohalea exasperatula</i>	1	0.3	0.3	0.4	1	2	0	1	1	0	1	0.3	1	1	1	86.67
<i>Melanelixia fuliginosa</i>	0	0	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	1	1	0	26.67

Таб. 11 (наставак). Таксони лишаја, вредност коефицијента f , фреквенције (%) и вредности IAR и ПН на истраживаним тачкама у Пролом бањи

Истраживана тачка	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	%
Таксон	0	1	1	1	1	1	0.3	1	0.4	0	1	1	1	0.4	1	80.00
<i>Melanelixia glabra</i>																
<i>Melanelixia subaurifera</i>	1	1	2	1	3	2	3	3	1	2	3	2	1	0	1	93.33
<i>Melanelixia subargentifera</i>	0	0	0.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6.67
<i>Ochrolechia pallescens</i>	0.3	1	1	0.4	1	0.3	1	0	0	0	2	0	0.3	1	1	73.33
<i>Parmelia saxatilis</i>	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0.4	0	1	0	0	0	26.67
<i>Parmelia sulcata</i>	4	4	3	5	3	5	4	4	2	3	3	4	6	3	5	100.00
<i>Parmelia tiliacea</i>	1	1	1	1	0.4	3	0	1	0.3	1	0	0.4	0	1	0.3	80.00
<i>Parmelina pasitifera</i>	0.4	0.3	0	1	0.3	1	1	0	0.4	1	2	1	0	0	0	66.67
<i>Parmelina quercina</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.3	0	6.67
<i>Parmeliopsis ambigua</i>	1	0	1	0	0	0	0.4	0	0	0	0	1	0	0	0	26.67
<i>Peltigera canina</i>	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	53.33
<i>Peltigera rufescens</i>	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	33.33
<i>Pertusaria albescens</i>	0	0	0	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	1	20.00
<i>Pertusaria amara</i>	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0.4	0	0	1	46.67
<i>Phaeophyscia orbicularis</i>	1	1	3	1	2	2	2	2	1	3	3	2	3	3	3	100.00
<i>Physcia adscendens</i>	2	2	3	2	2	5	2	1	1	2	3	2	5	3	3	100.00
<i>Physcia aipolia</i>	0.4	1	1	0.4	2	2	1	1	0	1	1	0	2	1	1	86.67

Таб. 11 (наставак). Таксони лишаја, вредност коефицијента f , фреквенције (%) и вредности IAR и INI на истраживаним тачкама у Пролом бањи

Истраживана тачка	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	%
Таксон	2	0	0	1	0	0.4	0	2	1	1	0	2	0	0	1	53.33
<i>Physcia semipinnata</i>																
<i>Physcia stellaris</i>	1	0.4	1	1	1	0.4	2	0.3	0.3	1	1	1	1	2	1	100.00
<i>Physcia tenella</i>	1	0.3	0	0.3	0	1	0.4	0.3	1	0	1	1	1	0	0.4	73.33
<i>Physconia detersa</i>	0	0	0	0.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6.67
<i>Physconia distorta</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	6.67
<i>Physconia enteroxantha</i>	0	0	0.4	0	0	2	1	1	0	0.4	1	1	0	0	0	46.67
<i>Physconia grisea</i>	1	1	1	0	1	2	1	3	1	1	0	1	1	1	0	80.00
<i>Platismatia glauca</i>	0	0	0	0	1	0	5	0	0	0	4	0	0	0	0	20.00
<i>Pleurosticta acetabulum</i>	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	3	0	0	1	0	20.00
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	1	4	1	1	1	1	0	2	0.4	1	0	2	1	1	0	80.00
<i>Ramalina farinacea</i>	1	1	2	2	2	0	0	3	2	1	0	0	1	0	2	66.67
<i>Ramalina fastigiata</i>	2	1	1	2	0.4	0	0	2	1	0	0	2	0	1	1	66.67
<i>Ramalina fraxinea</i>	1	0.3	0.3	1	0.3	0	0	0.3	1	0	0	1	0	0	1	60.00
<i>Rhizocarpon geographicum</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6.67
<i>Rinodina colobina</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	6.67
<i>Rinodina pyrina</i>	0	0	0	0.3	0	0	0	0	0	0	0.3	0	0	0	0	13.33
<i>Usnea hirta</i>	2	1	0	1	1	0.1	0	1	1	1	0	1	0	0	2	66.67

Таб. 11 (наставак). Таксони лишцаја, вредност коефицијента f , фреквенције (%) и вредности IAP и INI на истраживаним тачкама у Пролом бањи

Истраживана тачка	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	%
Таксон																
<i>Usnea subfloridana</i>	0	0.3	0	0	1	0	0	0	0.4	0.3	0	0.3	0	0	0	33.33
<i>Xanthoparmelia conspersa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	6.67
<i>Xanthoparmelia somloënsis</i>	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	26.67
<i>Xanthoria parietina</i>	0.4	0.3	3	2	1	3	2	1	2	2	0	2	3	3	1	93.33
Индекс атмосферске чистоте (IAP)	50	48	43	52	53	55	45	56	43	45	45	49	45	40	43	
Индекс антропогеног утицаја (INI)	14	10	24	14	12	12	12	14	8	16	16	18	14	14	18	

Таб. 12. Таксони лишаја, вредност коефицијента f , фреквенције (%) и вредности IAP и INI на истраживаним тачкама на Радан планини

Истраживана тачка	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	%
Таксон																
<i>Buelia punctata</i>	0	2	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	46.67
<i>Caloplaca cerina</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6.67
<i>Candelaria concolor</i>	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	20.00
<i>Candelariella aurella</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	13.33
<i>Candelariella vitellina</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	6.67
<i>Candelariella xanthostigma</i>	2	0	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	26.67
<i>Cetraria islandica</i>	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	20.00
<i>Cladonia coniocraea</i>	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	26.67
<i>Cladonia convoluta</i>	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	20.00
<i>Cladonia fimbriata</i>	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	53.33
<i>Cladonia foliacea</i>	1	1	1	0	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	33.33
<i>Cladonia furcata</i>	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	33.33
<i>Cladonia ramulosa</i>	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	2	0	0	26.67
<i>Cladonia rangiferina</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	6.67
<i>Cladonia rangiformis</i>	1	0	0	1	1	1	0	0	2	0	2	0	0	0	0	40.00
<i>Cladonia subulata</i>	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	2	1	0	0	40.00
<i>Evernia prunastri</i>	7	6	3	4	4	4	6	4	4	5	0	6	6	5	5	93.33
<i>Flavoparmelia caperata</i>	0	5	2	4	4	3	3	3	2	3	0	4	3	2	3	86.67

Таб. 12 (наставак). Таксони лишјаја, вредност коефицијента f , фреквенције (%) и вредности IAR и INI на истраживаним тачкама на Радан планини

Истраживана тачка	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	%
Таксон																
<i>Graphis scripta</i>	2	0	0	0.4	0	2	1	0	0	1	2	0	0	1	0	46.67
<i>Hypogymnia physodes</i>	0	6	2	4	4	5	6	4	4	4	5	4	5	5	4	93.33
<i>Hypogymnia tubulosa</i>	0	4	1	2	2	0	3	2	1	2	3	3	3	2	3	86.67
<i>Lecanora allophana</i>	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	26.67
<i>Lecanora argentata</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	26.67
<i>Lecanora atra</i>	2	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	26.67
<i>Lecanora carpinea</i>	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	53.33
<i>Lecanora confusa</i>	0	0	0	0	0.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6.67
<i>Lecanora conizaeoides</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	13.33
<i>Lecanora glabrata</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	6.67
<i>Lecanora intumescens</i>	2	0	2	1	2	0	1	0	1	1	2	1	1	1	0	73.33
<i>Lecanora muralis</i>	0	0	0	0	2	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	26.67
<i>Lecanora pulicaris</i>	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	2	0	2	1	0	53.33
<i>Lecidella elaeochroma</i>	2	0	0	0	1	2	2	0	1	2	2	2	1	1	2	73.33
<i>Lepraria incana</i>	0	2	1	2	0	2	0	2	2	2	0	3	0	0	2	60.00
<i>Melanohalea elegantula</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	13.33
<i>Melanohalea exasperata</i>	0	0	2	1	0	0	0	3	0	0	2	0	0	2	0	33.33

Таб. 12 (наставак). Таксони лишаја, вредност коефицијента f , фреквенције (%) и вредности IAR и INI на истраживаним тачкама на Радан планини

Истраживана тачка	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	%
Таксон																
<i>Melanohalea exasperatula</i>	0	3	1	0	1	1	0	2	2	0	1	3	0	2	1	66.67
<i>Melanelixia fuliginosa</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	2	0	26.67
<i>Melanelixia glabra</i>	0	0	2	2	0	1	2	2	2	0	2	2	1	1	0	66.67
<i>Melanelixia subaurifera</i>	4	4	2	3	4	4	5	4	3	2	4	3	4	0	3	93.33
<i>Melanelixia subargentifera</i>	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6.67
<i>Ochrolechia pallescens</i>	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	2	1	1	1	1	53.33
<i>Parmelia saxatilis</i>	3	0	0	0	2	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	26.67
<i>Parmelia sulcata</i>	6	5	5	5	5	5	5	5	5	2	5	5	6	5	6	100.00
<i>Parmelia tiliacea</i>	5	2	2	1	1	3	0	1	1	1	0	1	0	1	2	80.00
<i>Parmelina pastilifera</i>	0	2	0	0	2	1	1	0	1	2	3	1	0	0	0	53.33
<i>Parmelina quercina</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	6.67
<i>Parmeliopsis ambigua</i>	0	0	1	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	20.00
<i>Peltigera canina</i>	2	1	0	1	2	1	0	0	0	2	1	1	2	2	0	66.67
<i>Peltigera rufescens</i>	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	2	0	0	0	33.33
<i>Pertusaria albescens</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	3	20.00
<i>Pertusaria amara</i>	0	1	0	1	2	0	0	2	2	1	0	0	0	0	2	46.67
<i>Pertusaria pertusa</i>	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6.67
<i>Phaeophyscia orbicularis</i>	6	4	3	5	3	5	4	5	4	3	5	4	4	5	5	100.00

Таб. 12 (наставак). Таксони лишаја, вредност коефицијента f , фреквенције (%) и вредности IAR и INI на истраживаним тачкама на Радан планини

Истраживана тачка	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	%
Таксон	5	3	3	2	3	4	4	4	3	3	5	3	5	4	5	100.00
<i>Physcia adscendens</i>	0	2	2	2	0	2	1	1	0	1	0	0	2	2	1	66.67
<i>Physcia aipolia</i>	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	2	0	0	2	40.00
<i>Physcia semipinnata</i>	1	1	1	2	1	1	2	1	0	1	0	0	2	1	2	80.00
<i>Physcia stellaris</i>	1	0	0	2	0	0	1	0	1	0	0	2	2	0	1	46.67
<i>Physcia tenella</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6.67
<i>Physconia deterosa</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	13.33
<i>Physconia distorta</i>	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	2	0	0	0	0	40.00
<i>Physconia enteroxantha</i>	1	3	2	0	2	2	2	2	1	2	0	1	0	1	0	73.33
<i>Physconia grisea</i>	0	0	2	0	2	4	3	0	0	0	5	0	3	0	4	46.67
<i>Platismatia glauca</i>	0	0	1	0	2	3	4	0	0	0	4	0	3	2	4	53.33
<i>Pleurosticta acetabulum</i>	0	2	1	2	2	1	0	2	1	2	0	2	0	1	0	66.67
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	3	0	2	2	1	0	1	2	0	2	0	2	2	0	0	60.00
<i>Ramalina farinacea</i>	0	1	0	0	1	0	0	1	2	0	0	0	0	2	2	40.00
<i>Ramalina fastigiata</i>	2	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	2	1	0	1	53.33
<i>Ramalina fraxinea</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	20.00
<i>Rhizocarpon geographicum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6.67
<i>Rinodina colobina</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	6.67

Таб. 12 (наставак). Таксони лишаја, вредност коефицијента f , фреквенције (%) и вредности IAP и INI на истраживаним тачкама на Радан планини

Истраживана тачка	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	%
Таксон	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	6.67
<i>Rinodina rugina</i>																
<i>Usnea hirta</i>	0	1	0	1	2	1	0	0.4	1	1	0	2	0	0	2	60.00
<i>Usnea subfloridana</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0.4	0	0	0	26.67
<i>Xanthoparmelia conspersa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	6.67
<i>Xanthoparmelia somloënsis</i>	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	33.33
<i>Xanthoria parietina</i>	4	3	2	4	0	0	2	1	2	2	0	0	2	2	0	66.67
Индекс атмосферске чистоће (IAP)	68	71	60	64	68	69	70	58	64	58	67	73	71	63	73	

Таб. 13. Таксони лишаја, вредност коефицијента f , фреквенције (%) и вредности IAR и INI на истраживаним тачкама у Куршумлији

Истраживана тачка	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	%
<i>Buelia punctata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0.3	0	33.33
<i>Candelariella vitellina</i>	0	0	0	0	1	0.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0.4	20.00
<i>Candelariella xanthostigma</i>	1	0.3	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	60.00
<i>Evernia prunastri</i>	2	2	0	0	2	1	0	1	0	2	1	1	1	1	2	73.33
<i>Flavoparmelia caperata</i>	1	1	0	0	0	0.4	0	0.4	0	0	1	0	1	1	1	53.33
<i>Graphis scripta</i>	0	0	0	0	0	1	0	0.3	0	0	0	0	1	0	0.4	26.67
<i>Hypogymnia physodes</i>	3	3	1	1	3	1	1	1	2	1	2	1	1	2	2	100.00
<i>Hypogymnia tubulosa</i>	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0.4	1	0	1	1	1	53.33
<i>Lecanora allophana</i>	0	0	0	0	0	0	0	0.4	1	0	0	0	0	0	0.3	20.00
<i>Lecanora argentata</i>	0	0	0	0	1	0.4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	20.00
<i>Lecanora carpinea</i>	0	1	0	0.3	0	1	0	0	0	0.4	0	0	1	0	0.3	40.00
<i>Lecanora intumescens</i>	0	0	0	0.3	0	1	0	0.3	0	1	1	0.4	0	0.3	1	53.33
<i>Lecanora pullicaris</i>	0	0	0	0	1	0	0.4	0	0	0	0.4	1	0	0.3	0	33.33
<i>Lecidella elaeochroma</i>	0	1	0	0.1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	53.33
<i>Leparia aeruginosa</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6.67
<i>Leparia incana</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	26.67
<i>Melanohalea exasperata</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	20.00

Таб. 13 (наставак). Таксони лишаја, вредност коефицијента f , фреквенције (%) и вредности IAP и INI на истраживаним тачкама у Куршумлији

Истраживана тачка	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	%
<i>Melanohalea exasperatula</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	26.67
<i>Melanelixia fuliginosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	20.00
<i>Melanelixia glabra</i>	0	0	0	0	0	0.4	0	0	1	1	1	1	0	1	0	40.00
<i>Melanelixia subaurifera</i>	2	2	1	1	2	1	1	0	1	1	2	1	1	0	1	86.67
<i>Melanelixia subargentifera</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.4	0.4	1	0	0	0.3	33.33
<i>Ochrolechia palescens</i>	0	0	0	1	0.1	0	1	0.4	1	0	1	1	1	0	0.3	60.00
<i>Parmelia saxatilis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0.4	0	0	0	0	1	0	0	13.33
<i>Parmelia sulcata</i>	3	2	1	0	2	2	1	2	1	3	2	1	2	2	2	93.33
<i>Parmelia tiliacea</i>	0	0	0	0	1	0.3	0	0	0	0	1	1	1	1	1	46.67
<i>Parmetina pastilifera</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.1	1	0.3	1	1	0.4	40.00
<i>Parmetopsis ambigua</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0.4	0	0	20.00
<i>Phaeophyscia orbicularis</i>	0	2	0	2	2	1	1	2	1	1	2	1	2	1	1	86.67
<i>Physcia adscendens</i>	3	2	2	2	2	1	1	2	1	1	2	1	1	1	1	100.00
<i>Physcia aipolia</i>	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	73.33
<i>Physcia semipinnata</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.4	0.4	0	0	13.33
<i>Physcia stellaris</i>	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0.3	0.4	53.33
<i>Physcia tenella</i>	0	1	0	0	1	0.4	0	0	1	0.1	0	0.4	0	0	0	40.00

Таб. 13 (наставак). Таксони лишцаја, вредност коефицијента *f*, фреквенције (%) и вредности IAP и INI на свим истраживаним тачкама у Куршумлији

Истраживана тачка	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	%
Таксон																
<i>Physconia distorta</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.1	0	1	1	0.4	0.4	33.33
<i>Physconia enteroxantha</i>	0	1	0	0	0	0	0	0.3	0	0	0	1	1	1	1	40.00
<i>Physconia grisea</i>	2	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	73.33
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	2	0	0	0	0	0.3	0	0	0	0.3	0	0	0.4	0.3	1	40.00
<i>Ramalina farinacea</i>	0	0	0	0	0	0.4	0	1	0	0.1	0	0	0.4	0	0	26.67
<i>Usnea hirta</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0.1	0	0.4	0	0	0	20.00
<i>Xanthoparmelia somloënsis</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6.67
<i>Xanthoria parietina</i>	4	2	3	1	2	2	2	2	1	1	0	1	2	1	1	93.33
Индекс атмосферске чистоће (IAP)	28	23	10	11	24	21	14	16	18	22	22	24	26	21	22	
Индекс антропогеног утицаја (INI)	18	24	36	32	24	21	36	28	28	21	21	15	15	18	18	

Таб. 14. Квантитативна процена основних параметара животне средине и вредности индекса антропогеног утицаја-ИИ на истраживаним тачкама

Истраживано подручје	Истраживана тачка	Параметри животне средине				ИИ
		Урбанизација (U)	Интензитет саобраћаја (Т)	Локални развој (D)	Експозиција (E)	
Луковска бања	1	3	3	2	3	24
	2	2	2	1	3	12
	3	2	2	2	3	14
	4	2	2	2	4	16
	5	1	2	2	3	7
	6	1	1	1	3	5
	7	1	1	2	4	7
	8	2	2	2	3	14
	9	1	1	2	4	7
	10	3	3	2	2	21
	11	2	3	1	3	14
	12	2	3	1	2	12
	13	3	3	1	1	15
	14	3	3	1	2	18
	15	3	3	1	2	18
Куршумлијска бања	16	1	1	2	4	7
	17	1	2	1	3	6
	18	2	2	1	3	12
	19	2	2	1	4	14
	20	2	2	2	2	12
	21	2	2	1	2	10
	22	2	2	1	3	12
	23	1	1	1	4	6
	24	1	2	2	3	7
	25	1	2	1	4	7
	26	1	2	2	4	8
	27	1	1	1	3	5
	28	1	2	1	2	5
	29	2	2	1	3	12
	30	2	2	1	1	8
Пролом бања	31	2	2	1	4	14
	32	2	1	1	3	10
	33	3	3	2	3	24
	34	2	3	1	3	14
	35	2	1	1	4	12
	36	2	2	1	3	12
	37	2	1	2	3	12
	38	2	2	1	4	14
	39	3	2	1	3	18
	40	2	3	3	2	16
	41	2	2	3	3	16
	42	1	3	2	3	8
	43	2	2	2	3	14

Таб. 14 (Наставак) Квантитативна процена основних параметара животне средине и вредности индекса антропогеног утицаја-ИИ на истраживаним тачкама

Истраживано подручје	Истраживана тачка	Параметри животне средине				ИИ
		Урбанизација (U)	Интензитет саобраћаја (Т)	Локални развој (D)	Експозиција (E)	
Пролом бања	44	2	2	1	4	14
	45	2	3	2	4	18
Град Куршумлија	61	3	3	2	1	18
	62	3	3	3	2	24
	63	4	4	4	1	36
	64	4	4	3	1	32
	65	3	3	3	2	24
	66	3	3	2	2	21
	67	4	4	4	1	36
	68	4	2	3	2	28
	69	4	2	2	1	28
	70	3	2	3	2	21
	71	3	2	3	2	21
	72	3	2	2	1	15
	73	3	2	2	1	15
	74	3	2	2	2	18
75	3	2	2	2	18	

БИБЛИОТЕЧКА ДОКУМЕНТАЦИЈА



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
ИНСТИТУТ ЗА БИОЛОГИЈУ И ЕКОЛОГИЈУ
Радоја Домановића 12, 34000 Крагујевац, Србија



КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈА

Редни број	
Тип записа	Текстуални штампани материјал
Врста рада	Докторска дисертација
Аутор	Светлана Ристић
Ментор	Проф. др Бранислав Ранковић
Наслов рада	Лишаји индикатори квалитета ваздуха Топличког региона и њихов биомедицински потенцијал
Језик публикације	Српски (ћирилица)
Језик извода	Српски
Земља публикавања	Србија
Година публикације	2017.
Издавач	Ауторски репринт
Место и адреса	Радоја Домановића 12, 34000 Крагујевац, Србија
Научна област	Биологија
Научна дисциплина	Алгологија и микологија
Предметна одредница/кључне речи	Лишаји, биоиндикација, антимикробна, антиоксидативна, антиканцерогена активност
Чува се	Библиотека ПМФ-а у Крагујевцу, Радоја Домановића 12, 34000 Крагујевац, Србија
Важна напомена	
Извод	
Лишаји су космополитски организми који се примењују у процени стања квалитета ваздуха као организми индикатори, а осим тога имају изражен биомедицински потенцијал. Управо циљеви овог истраживања били су: индикација квалитета ваздуха коришћењем лишаја као биоиндикатора и биомедицинска	

карактеризација различитих врста лишаја сакупљених у истраживаним подручјима Луковске, Куршумлијске и Пролом бање, Радан планине као и града Куршумлије. Истраживање је спроведено у периоду од 2012. до 2015. године.

Лишајска индикација квалитета ваздуха обухвата испитивање квалитета ваздуха коришћењем лишаја као биоиндикатора дефинисањем зона различитог степена загађења ваздуха у оквиру сваког истраживаног подручја, као и дефинисање потенцијалних индикаторских таксона за процену квалитета ваздуха, коришћењем мултиваријантне методе вештачких неуронских мрежа (самоорганизујуће мапе, енгл. **Self Organizing Map – SOM**). Испитивањем разноврсности лишаја у Луковској бањи константовано је присуство 76 врста лишаја из 34 рода. У Куршумлијској бањи забележено је присуство 65 врста лишаја из 32 рода. На подручју Пролом бање забележено је присуство 72 врсте лишаја из 33 рода. Анализом диверзитета лишаја Радан планине константовано је присуство 76 врста лишаја из 34 рода. У Куршумлији је забележено присуство 42 врсте лишаја из 23 рода. Израчунате вредности индекса антропогеног утицаја (енгл. **Index of Human Impact – ИИ**) кретале су се од 5 до 36. Израчунате вредности индекса атмосферске чистоће (енгл. **Index of Atmospheric Purity – IAP**) кретале су се од 10 до 75. У свим бањским насељима забележено је присуство „нормалне зоне” која обухвата читаву површину истраживаног подручја Луковске бање, Пролом бање и планине Радан, као и већи део површине истраживаног подручја Куршумлијске бање. Детаљнијом анализом је приказано да је ова зона подељена на три подзоне. У зони „борбе” налази се мањи, централни део Куршумлијске бање и већи део града Куршумлије, где је дошло до формирања подзона: „спољашња зона борбе” и „унутрашње зоне борбе”. Зона „лишајске пустиње” обухвата мањи део површине истраживаног подручја града Куршумлије.

Биомедицинска карактеризација обухвата добијање екстракта изабраних врста лишаја, изоловање секундарних метаболита лишаја и испитивање антимикуробне, антиоксидативне и антиканцерогене активности. Испитивани су ацетонски екстракти лишаја *Cladonia coniocraea*, *C. fimbriata*, *C. foliacea*, *C. furcata*, *C. ramulosa*, *C. rangiferina*, *C. subulata*, *Lepraria incana*, *Melanelixia fuliginosa*, *M. glabra*, *M. subaurifera*, *Peltigera rufescens*, *Pertusaria amara*, *Physcia semipinnata*, *Platismatia glauca*, *Pleurosticta acetabulum*, *Ramalina fastigiata* и *R. fraxinea*, као и супстанце methyl evernate (изолована из екстракта лишаја *R. fastigiata*), obtusic acid (изолована из екстракта лишаја *R. fraxinea*), licanogic acid (изолована из екстракта лишаја *M. subaurifera*) и 2'-O-methylanziaic acid (изолована из екстракта лишаја *M. fuliginosa*).

Сви тестирани узорци испољили су снажну антимикуробну, антиоксидативну и антиканцерогену активност, што је од великог значаја због њихове потенцијалне примене у медицини, ветерини и фармацеутској индустрији.

Датум прихватања теме од стране ННВ	
Датум одбране	
Чланови комисије	Проф. др Славиша Стаменковић Проф. др Снежана Симић Доц. др Маријана Косанић



KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number	
Type of record	Textual material, printed
Contents code	PhD thesis
Author	Svetlana Ristić
Mentor	Prof. dr Branislav Ranković
Title	Lichens- indicators of air quality of Toplica district and their biomedical potential
Language of text	Serbian (Roman) (scr)
Language of abstract	Serbian (Roman) / English
Country of publication	Serbia
Publication year	2017.
Publisher	Copyright reprint
Publisher place	Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia
Scientific field	Biology
Scientific discipline	Algology and mycology
Key words	Lichens, bioindication, antimicrobial activity, antioxidant activity, anticancer activity
Holding data	In library of Faculty of Science, Kragujevac 34000 Kragujevac, Serbia, R.Domanovića 12
Note	
Abstract	
<p>Lichens are cosmopolitan organisms which are applied in estimation of air quality condition as indicating organisms and, in addition, they've got a quite clear biomedical potential. The two very goals of this exploration were: indication of air quality by using lichens as bioindicators and the biomedical characterization of various lichen species collected within the area of Lukovska, Prolom and Kursumlijska spas, Radan Mountain and the town of Kursumlija. The exploration was conducted in the period 2012/2015.</p> <p>The lichen air quality indication encompasses exploration of air quality using</p>	

lichens as bioindicators by defining the zones of different degree of air pollution within each of the explored settlements, as well as defining some potential taxa for air quality estimation through a multivariate method of artificial neuronetworks (self organizing maps – SOM). By examining the lichen diversity in Lukovska Spa, 76 lichen species from 34 genera have been ascertained. The presence of 65 lichen species from 32 genera was noted in Kursumlijska Spa. Within the Prolom Spa area, 72 lichen species from 33 genera were recorded. Through the analysis of Radan Mountain lichen diversity, 76 lichen species from 34 genera were entered. In the town of Kursumlija, 42 lichen species from 23 genera were recorded. The calculated values of the Index of Human Impact fluctuated between 5 and 36. The calculated values of the Index of Atmospheric Purity – IAP varied between 10 and 75. The lichen “normal” zone was noted in all spa resorts. The “normal zone” covers entire area of Lukovska spa, Prolom spa and Radan mountain, as well as a major part of investigated area of Kursumlijska spa. A detailed analysis shows this zone divided into 3 subzones. The “struggle zone” encompasses a smaller, central part of Kursumlijska spa and major part of the town of Kursumlija where forming the subzones has taken place - “outer struggle zone” and “inner struggle zone”. The lichen “desert” zone includes a smaller part of the investigated area of the town.

Biomedical characterization encompasses derivation of extracts of chosen lichen species, isolation of secondary lichen metabolites and examination of antimicrobial, anti-oxidative and anti-carcinogenic activities. The following acetone lichen extracts were examined: *Cladonia coniocraea*, *C. fimbriata*, *C. foliacea*, *C. furcata*, *C. ramulosa*, *C. rangiferina*, *C. subulata*, *Lepraria incana*, *Melanelixia fuliginosa*, *M. glabra*, *M. subaurifera*, *Peltigera rufescens*, *Pertusaria amara*, *Physcia semipinnata*, *Platismatia glauca*, *Pleurosticta acetabulum*, *Ramalina fastigiata* and *R. fraxinea* as well as some substances like methyl evernate (isolated from the extract of *R. fastigiata* lichen, obtusic acid (isolated from the extract of *M. subaurifera* lichen) and 2'-O-methylanziaic acid (isolated from the extract of *M. fuliginosa* lichen)

All the tested samples demonstrated a strong antimicrobial, antioxidative and anticarcinogenic activity, which is quite significant for the potential use in medicine, veterinary medicine and pharmaceutical industry.

Accepted by Scientific Board on	
Defended on	
Commission	Prof. dr Slaviša Stamenković Prof. dr Snežana Simić Doc. dr Marijana Kosnić

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Ристић Светлана, изјављујем да докторска дисертација под насловом: **ЛИШАЈИ ИНДИКАТОРИ КВАЛИТЕТА ВАЗДУХА ТОПЛИЧКОГ РЕГИОНА И ЊИХОВ БИОМЕДИЦИНСКИ ПОТЕНЦИЈАЛ**, која је одбрањена на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу, 2017. године,

потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Ристић Светлана,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

ЛИШАЈИ ИНДИКАТОРИ КВАЛИТЕТА ВАЗДУХА ТОПЛИЧКОГ РЕГИОНА И ЊИХОВ БИОМЕДИЦИНСКИ ПОТЕНЦИЈАЛ,

која је одбрањена на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам⁷

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *CreativeCommons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада⁸

У Крагујевцу, 2017. године,

потпис аутора

⁷Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *CreativeCommons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

⁸Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *CreativeCommons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>



Phytochemical study and antioxidant, antimicrobial and anticancer activities of *Melanelia subaurifera* and *Melanelia fuliginosa* lichens

Svetlana Ristić¹ · Branislav Ranković¹ · Marijana Kosanić¹ · Tatjana Stanojković² · Slaviša Stamenković³ · Perica Vasiljević³ · Ivana Manojlović⁴ · Nedeljko Manojlović⁴

Revised: 12 May 2016 / Accepted: 17 May 2016
© Association of Food Scientists & Technologists (India) 2016

Abstract The aim of this study was to investigate antioxidant, antimicrobial and anticancer activity of *Melanelia subaurifera* and *Melanelia fuliginosa*. The phytochemical analysis was determined by HPLC–UV method. Antioxidant activity was evaluated by DPPH and reducing power assay while antimicrobial activity was determined by minimal inhibitory concentration. The cytotoxic activity was tested using MTT method. The method for quantification of 2'-O-methyl anziaic acid and lecanoric acid in these lichens using RF-HPLC was also developed and validated. The depsides (lecanoric acid, gyrophoric acid, atranorin, anziaic acid and 2'-O-methyl anziaic acid), and dibenzofuran (usnic acid) were identified in these lichens. The antioxidant activity (IC₅₀) of lichens extracts ranged from 121.52 to 424.51 µg/ml. 2'-O-Methyl anziaic acid showed the highest antimicrobial activity with MIC ranging from 0.0625 to 1 mg/ml. *M. subaurifera* extract showed the highest cytotoxic activity against the tested cell lines (IC₅₀ = 9.88 to 31.64 µg/ml).

Keywords HPLC analysis · Lichens secondary metabolites · Biological activities

✉ Marijana Kosanić
marjanakosanic@yahoo.com

¹ Department of Biology, Faculty of Science, University of Kragujevac, Kragujevac 34000, Serbia

² Institute of Oncology and Radiology of Serbia, Belgrade 11000, Serbia

³ Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences and Mathematics, University of Niš, Niš 18000, Serbia

⁴ Department of Pharmacy, Faculty of Medicinal Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac 34000, Serbia

Introduction

The global problem of today are uncontrolled and more frequent use of antibiotics and other synthetic or semisynthetic drugs, which leads to resistance, an increasing number of pathogens. These pathogens challenge's different diseases in humans, animals and plants. In order to prevent disease occurrence and spread of resistance, recorded an increase of interest for bioactive natural products, organic foods and natural cosmetics. The reason for popularizing the "natural" product is insecurity and toxicity of newly synthesized compounds to human health and the environment. The study of chemical, biological and pharmacological properties of the used natural products in traditional medicine around the world were obtained by many therapeutic agents that are still used today in modern medicine (Berdy 2012). Looking for new bioactive preparations of natural origin, lichens are the subject of numerous studies.

Lichens are presented as an association of two symbionts: fungal partner, the mycobiont and algae partner, the photobiont. The appearance of lichen thallus is primarily determined by the mycobiont. Lichens have worldwide distribution and produce a wide array of both primary and secondary metabolites (Karagoz et al. 2009). These secondary metabolites are bioactive compounds, which are, often, unique to the organisms and produced primarily by the mycobiont. Secondary metabolites of lichens, so-called lichen substances, are product of metabolic pathways, and many of them originate from acetyl-polymalonyl pathway. Secondary metabolites from lichens can be extracted into organic solvent: benzene, chloroform, acetone, ethanol or methanol. To today, there are 1050 lichens substances identified with different methods (Shukla et al. 2010). They have various biological activities such as antibiotic,

Biopharmaceutical Potential of Two *Ramalina* Lichens and their Metabolites

Svetlana Ristić¹, Branislav Ranković¹, Marijana Kosanić^{1*}, Slaviša Stamenković², Tatjana Stanojković³, Miroslav Sovrlić⁴, Nedeljko Manojlović⁴

¹Department of Biology, Faculty of Science, University of Kragujevac, 34000 Kragujevac, Serbia;

²Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences and Mathematics, University of Niš, 18000

Niš, Serbia; ³Institute of Oncology and Radiology of Serbia, 11000 Belgrade, Serbia; ⁴Department of Pharmacy, Faculty of Medicinal Sciences, University of Kragujevac, 34000 Kragujevac, Serbia

Abstract: This paper studies the phytochemical analysis of the acetone extracts of the *Ramalina fraxinea* and *Ramalina fastigiata* lichens and the antioxidant, antimicrobial and antitumour activities of these species and their constituents. The phytochemical analysis of two *Ramalina* species was evaluated using HPLC-UV test. The depsides (evermic acid, obiusatic acid, sekikaic acid and atranorin), depsidones (protocetraric acid) and dibenzofurane (usnic acid) were identified from these lichens. Antioxidant activity was evaluated by DPPH assay, reducing power assay and by measuring the amounts of total phenolics in extracts. Antimicrobial activity was tested towards five bacterial and 10 fungal species, using broth microdilution method to determine the minimum inhibitory concentration. Cytotoxic activity was tested using MTT method on the human epithelial carcinoma (Hela), human lung carcinoma (A549) and human colon carcinoma (LS174) cells. As a result of the study, tested samples showed strong free radical scavenging activity with IC₅₀ values within the range of 285.45-423.51 µg/mL. Absorbance for reducing power was found to be from 0.0043 to 0.1747. The total amount of phenol concentrations in extracts of *Ramalina fraxinea* and *Ramalina fastigiata* was 32.63 and 33.49 µg PE/mg, respectively. Methyl evermate showed the strongest antimicrobial properties with the least measured MIC value being 0.125 mg/mL. In addition, all samples exhibited strong anticancer activities against tested cells (IC₅₀ values were between 24.63 and 161.37 µg/mL). These results indicate that lichen appears to be a possible natural biopharmaceutical.

Keywords: Lichen extracts, lichen components, antioxidant activity, antimicrobial activity, anticancer activity.

INTRODUCTION

Lichens are a symbiosis between a fungus mycobiont and an alga or cyanobacterium phycobiont [1, 2]. Due to its specificities, lichens can live in conditions where neither the alga nor fungus could live independently. Lichens occur commonly as epiphytes on the bark of various tree species, or on rocks, but they are also present in some of the most extreme environments like arctic tundra, deserts or rocky coasts [3]. In different genera, lichen talus is very different in form. The morphology of the lichenized thallus can be: crustose, filamentose, leprose, foliose and fruticose.

Slow growth, long lifetime and the specific conditions of life are the reasons for the production of numerous metabolites protecting lichens from various negative biological and physical influences [4]. It is known that these unique organisms produce numerous primary and secondary metabolites. Most secondary lichen metabolites, or the "lichen substances" have considerable biological activities and they are derived from the acetyl-polymalonyl pathway,

shikimic acid pathway and mevalonic acid pathway. While these compounds are initially produced within the fungal hyphae [5], they are finally deposited on the hyphal surfaces in the cortex or in the medullary layer, either as crystals or as amorphous deposits [6].

Lichens are organisms present worldwide. More than 18,500 known lichen species live on earth [7]. Lichens play an important role in the food chain since they are used as food for humans and animals. Certain species of lichens are very sensitive to air pollution. Some others species are used in making drugs, poison, perfumes and colors. According to the numerous studies, the most important use of lichens and their constituents lies in their biopharmaceutical effects, including their antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, analgesic, antipyretic and cytotoxic activities [8].

The genus *Ramalina* is cosmopolitan and has over 240 species and some of them are difficult to distinguish due to their similar morphological characteristics. This lichen has been used in traditional medicine for treatment of numerous diseases, such as traumatic injuries, bleeding, swelling, mental disorders, asthma, inflammation [9, 10].

*Address correspondence to this author at the Department of Biology, Faculty of Science, University of Kragujevac, 34000 Kragujevac, Serbia; Tel: + 381 34336223; Fax: + 381 34335040; E-mail: marijanakosanic@yahoo.com

