

DE NATUURLIJKE PRODUKTIE VAN ORGANOHALOGENEN DOOR BASIDIOMYCETEN

Frank J.M. Verhagen, Sectie Industriële Microbiologie,
Landbouwniversiteit, Postbus 8129, 6700 EV Wageningen

Recently several species of basidiomycetes were shown to produce de novo high concentrations of chloroaromatic metabolites. Since these lignocellulose-degrading fungi play a major role in the ecosphere, a study was undertaken to determine the ubiquity of organohalogen production among basidiomycetes and to identify new metabolites. A total of 191 fungal strains were monitored for adsorbable organic halogen (AOX) production when grown on defined liquid media. Approximately 50% of the strains tested and 55% of the genera tested produced AOX. A low production of 0.1-0.5 mg AOX/l was observed among 25% of the strains, a moderate production of 0.5-5.0 mg AOX/l was found among 16% of the strains and 9% of the strains produced high levels of AOX (5-67 mg AOX/l). The last group was dominated by species belonging to the genera *Psilocybe*, *Mycena* and *Bjerkandera*, showing specific AOX productions in the range 1.074-30.893 mg AOX/kg dry weight of mycelial biomass. Many highly ecologically significant fungal species were identified among the moderate to high producers. These species were also able to produce AOX when cultivated on natural lignocellulosic substrates. *Psilocybe fascicularis* and *Mycena metata*, respectively, produced up to 132 mg and 193 mg AOX/kg dry weight of forest litter substrate in 6 weeks of incubation.

CAM were detected in further research, four new chlorinated anisyl metabolites (CAM) producing genera and three new CAM producing species were identified. In the ethyl acetate extracts from the extracellular fluid of the mycelium of species belonging to seven different genera of basidiomycetes. CAM production by species belonging to the genera *Mycena*, *Peniophora*, *Phellinus* and *Phylloporia* was observed for the first time. Although it is known that some species of the genera *Bjerkandera*, *Psilocybe* and *Pholiota* are able to produce CAM, the ability of *B. fumosa*, *Ps. elongata* and *Ph. adiposa* to do this has not been reported before. The selective and high-yield production of 3,5-dichloro-*p*-anisyl alcohol by *Ps. elongata* was remarkable.

Moreover, in the culture fluids of *Bjerkandera* spp. novel chlorinated aromatic derivatives could be demonstrated. The ethyl acetate extracts from the extracellular fluid of the mycelium of *Bjerkandera* sp. BOS55 contained four new chlorinated benzoic acid derivatives, i.e. 3-chloro-4-hydroxy benzoic acid, 3,5-dichloro-4-hydroxy benzoic acid, methyl 3,5-dichloro-4-hydroxy benzoate and methyl 3,5-dichloro-*p*-anisate. 3-Chloro-4-hydroxy benzoic acid was also produced by *B. adusta*.

Inleiding

Door menselijke activiteit wordt een groot aantal chemische verbindingen gemaakt en in het milieu gebracht. Sommige daarvan worden als schadelijk beschouwd. Berucht daarbij zijn de zogenaamde organohalogenen (dit zijn organische verbindingen met een of meerdere halogeen-atomen fluor, chloor of broom in het molecuul), waartoe bijvoorbeeld ook de voor de mens uiterst gevaarlijke dioxinen behoren. Het is dan ook niet verwonderlijk dat er wettelijk scherpe normen worden gesteld aan de aanvaardbare concentraties van zulke stoffen in het milieu. Aangezien veel van deze organohalogeen-verbindingen in uiterst lage concentraties worden aangetroffen, wordt vaak de totale concentratie aan adsorbeerbare organohalogenen (kortweg AOX genoemd) van een bepaalde grond gemeten. De door de overheid vastgestelde grenswaarden voor AOX (als

maat voor de totale milieubelasting door al deze stoffen) kunnen grote invloed hebben op de gebruiksmogelijkheid van de grond (bijv. verplichte sanering vóór woningbouw).

Echter, bij recent onderzoek bleken de concentraties aan AOX in onaangetaste milieus (bijvoorbeeld ongerepte naaldbossen in de taiga, oerbossen) op zijn minst 300 maal hoger dan de concentraties die kunnen worden verklaard door menselijke activiteiten (Asplund & Grimvall, 1991)! Het lijkt er dus op dat zulke verbindingen ook in de natuur geproduceerd kunnen worden. En omdat de produktie van AOX optrad tijdens de afbraak van bosstrooisel (Asplund, 1995), werden micro-organismen die bij de strooiselafbraak betrokken zijn (wit- en bruinrotters) beschouwd als mogelijke producenten van zulke verbindingen.

Bij de afbraak van strooisel (mengsel van bladeren, naalden en hout) spelen basidiomyceten een zeer grote rol (Swift, 1982). Door hun activiteiten worden de koolstof- en nutriëntenkringloop gesloten. Immers, alleen basidiomyceten zijn in staat om lignine (houtstof) af te breken, terwijl het grootste deel van de cellulose (celstof) alleen beschikbaar is voor die schimmels die in staat zijn de lignine af te breken. Uit onderzoek was bovendien bekend dat een aantal soorten basidiomyceten in staat waren om uit eenvoudige verbindingen complexe organohalogeene metabolieten te synthetiseren (Harper, 1985; De Jong & al., 1994; Hsu & al., 1971; Dominguez & al., 1972; Van Eijk, 1975; Takahashi & al., 1993).

In de studie die hier wordt beschreven werd de algemeenheid van produktie van AOX door basidiomyceten onderzocht. Algemeen voorkomende soorten die AOX produceren werden tevens getest op AOX-produktie wanneer ze op natuurlijke substraten werden gekweekt. Tevens werd er naar nieuwe AOX producerende schimmelsoorten gezocht, alsmede werd getracht een aantal nieuwe schimmelmetabolieten te identificeren.

Materiaal en methoden

Het screenen van schimmelstammen voor AOX-produktie.

Schimmelstammen werden gekweekt in een vloeibaar peptonmedium met een hoog stikstofgehalte (50 mM N) en in een vloeibaar mineraal medium met een laag stikstofgehalte (2 mM N). Het kweekmedium werd geïnoculeerd met een plug (diameter 5 mm), die werd gestoken uit een agarplaat bedekt met mycelium. Duplo schimmelcultures werden weggezet in het donker bij 25°C met de doppen losjes op de flessen. Een duplo set met steriel medium werd geïnoculeerd met steriele agarhpluggen en deze werden gebruikt als controles tijdens de AOX-bepalingen. Zodra het oppervlak van het kweekmedium was bedekt met mycelium (2-6 weken), werd de cultuurvloeistof opgewerkt voor de bepaling van organohalogeene-concentratie (Verhagen & al., 1996).

AOX-produktie op natuurlijke substraten.

Naast de kunstmatige pepton- en glucosemedia werden ook natuurlijke media gebruikt. Geselecteerde schimmelcultures werden gekweekt op media, die de volgende natuurlijke substraten bevatten (alle 30 g/l): beukehout, dennenhout, bosstrooisel (beukeblad, beuketwigg, eikeblad en eiketwigg), hennepstam of tarwestro. Schimmelcultures werden weggezet in viervoud in het donker bij 25°C met de doppen losjes aangedraaid. Wederom werden sets met steriele media gelijktijdig weggezet en deze werden gebruikt als controles tijdens de AOX-bepalingen. Na 6 weken werden de schimmelcultures opgewerkt voor de bepaling van de AOX-concentraties.

Identificatie van nieuwe schimmelmetabolieten.

Naast onderzoek naar de totale hoeveelheid AOX werd er ook gekeken naar nieuwe metabolieten die door schimmels worden geproduceerd. Schimmelcultures werden gekweekt in vloeibaar medium met een hoog stikstofgehalte (zie hierboven). Na een kweekperiode van 3 tot 6 weken werd de cultuurvloeistof opgewerkt voor de bepaling van de aanwezige gechloreerde anisylmetabolieten (zogenaamde CAM-verbindingen). Na filtratie en aanzuren van de extracellulaire vloeistof werd het filtraat driemaal geëxtraheerd met ethylacetaat. De organische fracties werden gewassen met water, geconcentreerd en gefiltreerd over silicagel. Het residu werd opnieuw opgelost in 50 µl ethylacetaat, dat 4-bromo-anisol als interne standaard bevatte. Identificatie vond plaats door middel van GC-MSD (gaschromatograaf uitgerust met massa-spectrometer detector). Alle bepalingen werden in duplo gedaan aan een duplo set van schimmelcultures.

Resultaten

In totaal werden 191 verschillende schimmelsoorten getest voor de productie van AOX, nadat ze waren gekweekt in gedefinieerde vloeibare media. Maar liefst 49,7% van de geteste soorten en 55% van de geteste genera produceerden AOX. Een lage AOX-concentratie tussen 0,1 en 0,5 mg AOX per liter werd gevonden bij 24,6% van alle geteste soorten, een matige concentratie tussen 0,5 en 5,0 mg AOX per liter werd gevonden bij 15,7% van alle geteste soorten en 9,4% van de soorten produceerden hoge AOX-niveaus (tussen 5 en 67 mg AOX per liter). Een complete lijst met alle 95 AOX-positieve schimmelsoorten is weergegeven in Verhagen & al. (1996). De 10 schimmelsoorten met de hoogste AOX-productie zijn weergegeven in tabel 1. De hoogste AOX-producenten worden gedomineerd door soorten die behoren tot de genera *Psilocybe*, *Mycena* en *Bjerkandera*.

Onder de hoge en matige producenten van AOX bevonden zich vele soorten met een frequentieklasse 5 of hoger en relatief hoge aantallen per uurhok. Deze soorten bleken ook in staat tot AOX-productie wanneer ze werden gekweekt op natuurlijke lignocellulose-houdende substraten. Op elk natuurlijk substraat werden enkele voor dat substraat specifieke schimmels gekweekt. *Psilocybe fascicularis* (Gewone zwavelkop;

TABEL 1

Basidiomyceten met de hoogste concentraties aan organohalogenen (AOX) na kweek in vloeibare media met een hoog stikstofgehalte (HN) en met een laag stikstofgehalte (LN). FK = frequentieklasse in Nederland, gebaseerd op aanwezigheid in uurhokken: 0 = onbekend; 1 = <0,2%; 2 = 0,2-0,6%; 3 = 0,6-2%; 4 = 2-5%; 5 = 5-10%; 6 = 10-25%; 7 = 25-45%; 8 = 45-75%; 9 = 75-100% van onderzochte uurhokken (Arnolds & al., 1995). - = geen FK gegeven omdat soortnaam onbekend is. N.D. betekent niet-detecteerbare concentratie (detectielimiet bedraagt $\pm 0,1$ mg per liter).

Soort	Stam	FK	AOX-concentratie (mg/l)	
			HN	LN
<i>Psilocybe elongata</i>	WIJS94.28	6	66,95	32,35
<i>Mycena metata</i>	RHEN93.1	7	54,13	1,91
<i>Psilocybe capnoides</i>	ONO93.7	7	28,53	22,12
<i>Bjerkandera adusta</i>	WAG91.2	9	27,45	9,21
<i>Psilocybe fascicularis</i>	RHEN93.5	9	16,46	10,36
<i>Mycena epipterygia</i>	ITAL94.3	7	15,36	2,51
<i>Psilocybe sublateralitia</i>	WIJS94.27	8	14,49	5,05
<i>Phylloporia ribis</i>	IJFM(B7)	4	12,91	N.D.
<i>Bjerkandera</i> sp. BOS55	CIMW91.1	-	12,30	4,79
<i>Peniophora pseudopini</i>	CBS162.65	0	10,87	4,14

en *Mycena metata* (Dennemycena) produceerden tijdens 6 weken incubatie respectievelijk maar liefst 132 en 193 mg AOX per kg droog gewicht aan strooisel (tabel 2).

De organohalogenen die in deze studie worden gevonden bestaan voor een groot deel uit methyl-esters van chloorfenolen. Om deze resultaten te relateren aan overheidsnormen kan ik dus het best de normen voor chloorfenolen hanteren. De normen die de overheid hanteert voor chloorfenolen, bedragen 0 tot 1 mg per kg droge grond (deze grond is schoon), 1 tot 10 mg per kg droge grond (nader onderzoek van deze grond is verplicht) en meer dan 10 mg per kg droge grond (noodzaak tot sanering). Tabel 2 laat zien dat slechts in 4 cultures de saneringsdrempel niet werd overschreden, terwijl *Mycena metata* op strooisel de saneringsnorm met een factor 19 oversteeg!

In het vervolgonderzoek werden vier nieuwe gechloreerde anisylmetabolieten (CAM)-producerende genera en drie nieuwe CAM-producerende soorten gevonden (tabel 3). In de ethylacetaatextracten van de extracellulaire vloeistof van het mycelium van soorten die behoren tot zeven verschillende genera van basidiomyceten, werden CAM-verbindingen gevonden. Voor het eerst werd CAM-productie waargenomen door soorten die behoren tot de genera *Mycena*, *Peniophora*, *Phellinus* en *Phylloporia*. Hoewel bekend

TABEL 2

Concentraties aan AOX geproduceerd door geselecteerde schimmels in 10 ml medium, dat 300 mg droog natuurlijk substraat bevatte. Incubatietijd en -temperatuur bedroegen respectievelijk 6 weken en 25°C.

Substraat	Soort	Stam	AOX-concentratie ^a ± S.D. ^b (mg/kg droog substraat) ^c
Dennehout	<i>Psilocybe fascicularis</i>	RHEN93.5	60,7 ± 3,3
	<i>Psilocybe capnoides</i>	ONO93.7	20,2 ± 3,9
	<i>Peniophora pseudopini</i>	CBS162.65	13,5 ± 1,7
	<i>Mycena epipterygia</i>	ITAL94.3	12,7 ± 2,2
	<i>Gymnopilus sapineus</i>	WIJS94.10	10,0 ± 2,3
	<i>Stropharia aeruginosa</i>	CBS839.87	2,9 ± 2,3
Beukehout	<i>Psilocybe sublaterita</i>	WIJS94.27	41,3 ± 2,7
	<i>Psilocybe fascicularis</i>	RHEN93.5	40,8 ± 3,5
	<i>Mycena galericulata</i>	WIJS94.23	5,6 ± 0,9
	<i>Megacollybia platyphilla</i>	WIJS94.11	4,6 ± 1,1
	<i>Gymnopilus sapineus</i>	WIJS94.10	3,9 ± 1,0
Strooisel	<i>Mycena metata</i>	RHEN93.1	192,9 ± 17,2
	<i>Psilocybe fascicularis</i>	RHEN93.5	132,4 ± 3,3
	<i>Mycena galopus</i>	ITAL94.4	28,4 ± 5,5
	<i>Collybia butyracea</i>	OUDES93.1	21,9 ± 4,6
	<i>Collybia dryophila</i>	WIJS94.3	17,0 ± 2,0
	<i>Megacollybia platyphilla</i>	WIJS94.11	13,2 ± 3,2
Hennep stam	<i>Psilocybe fascicularis</i>	RHEN93.5	75,9 ± 8,5
Tarwestro	<i>Psilocybe fascicularis</i>	RHEN93.5	115,2 ± 8,6

^a Netto AOX-concentratie na correctie voor AOX-waarden in tegelijkertijd geïncubeerde controleflesjes. Controle AOX-waarden (mg AOX per kg droog gewicht): dennehout 2,5; beukehout 1,9; strooisel 6,2; hennep stam 7,7 en tarwestro 7,2.

^b S.D. = standaarddeviatie.

^c Berekeningen op basis van drooggewicht ten tijde van inoculatie.

is dat enkele soorten uit de genera *Bjerkandera*, *Psilocybe* en *Pholiota* AOX produceren, was het vermogen van *Bjerkandera fumosa* (Rookzwam), *Psilocybe elongata* (Bleke moeraszwavelkop) en *Pholiota adiposa* (Slijmsteelbundelzwam) om dit te doen niet eerder bekend. De selectieve productie met hoge opbrengst van 3,5-dichloro-*p*-anisyl alcohol door *Psilocybe elongata* is opmerkelijk. In de cultuurvloeistof van *Bjerkandera*-soorten konden nieuwe gechloreerde aromatische verbindingen worden aangetoond (tabel 4). De ethylacetaatextracten van de extracellulaire vloeistof van het mycelium van *Bjerkandera* sp. BOS55 bevatten vier nieuwe verbindingen die waren afgeleid van gechloreerd benzoëzuur, te weten 3-chloro-4-hydroxy benzoëzuur, 3,5-dichloro-4-hydroxy

benzoëzuur, methyl 3,5-dichloro-4-hydroxy benzoaat en methyl 3,5-dichloro-*p*-anisate. Ook *Bjerkandera adusta* (Grijze buisjeszwam) produceerde 3-chloro-4-hydroxy benzoëzuur.

Met behulp van de produktiegegevens uit dit onderzoek en biomassagegegevens uit de literatuur heb ik berekend hoeveel AOX per hectare per jaar gevormd kan worden (tabel 5).

Het blijkt inderdaad dat er jaarlijks enorme hoeveelheden organohalogenen worden geproduceerd in de Nederlandse bossen. En zelfs deze berekeningen van de jaarlijkse produkties zijn volgens mij nog te laag om de navolgende redenen:

1. Niet alle AOX producerende schimmels zijn in de berekeningen meegenomen.
2. Mycelium kan vele jaren ondergronds leven zonder paddestoelen te vormen. Zodoende zijn deze soorten niet meegenomen in de biomassabepalingen en dus ook niet in bovenstaande berekeningen.
3. De berekeningen houden geen rekening met verhoogde produkties van AOX als gevolg van antagonistische interacties tussen twee of meerdere schimmelsoorten, zoals reeds werd beschreven door Sonnenbichler & al. (1994).

Conclusies

1. Het vermogen om organohalogenen te produceren is alom verspreid onder zeer algemeen voorkomende basidiomyceten.

TABEL 3

Produktie van gechloreerde anisylmetabolieten (CAM's) door reinkultures van basidiomyceten gekweekt in vloeibaar peptonmedium. De waarden zijn gemiddelden van tweevoudige bepalingen.

Cald = 3-chloro-*p*-anisyl-aldehyde; DCAld = 3,5-dichloro-*p*-anisyl-aldehyde; DCAlc = 3,5-dichloro-*p*-anisyl-alcohol.

Soort	CAlc (mg/l)	DCAld (mg/l)	DCAlc (mg/l)
<i>Bjerkandera fumosa</i>	2,0	-	-
<i>Psilocybe elongatum</i>	-	0,4	108,0
<i>Mycena epipterygia</i>	2,4	11,5	-
<i>Peniophora pseudopini</i>	13,0	0,5	-
<i>Phellinus torulosus</i>	-	-	2,4
<i>Pholiota adiposa</i>	-	0,2	5,3
<i>Phylloporia ribis</i>	-	-	11,1

2. Het vermogen om organohalogenen te produceren werd niet alleen gevonden op

kunstmatige vloeibare laboratoriumsubstraten maar ook op natuurlijke substraten zoals beukehout, dennehout en bosstrooisel. Op deze natuurlijke substraten werd de norm voor noodzakelijke sanering in bijna alle gevallen overschreden.

3. Vele van de sterk en matig AOX producerende soorten zijn algemeen. Basidiomyceten zijn daarom hoogstwaarschijnlijk een belangrijke bron van natuurlijke AOX in bosesystemen. De resultaten van deze studie wijzen erop dat de hoge concentraties aan AOX in ongestoorde milieus inderdaad het gevolg zijn van de activiteit van saprotrofe schimmels op strooisel en hout.
4. De bevinding dat AOX kunnen worden geproduceerd door vele algemeen voorkomende schimmels en dat de concentraties kunnen oplopen tot ver boven de saneringsnorm heeft mogelijk en hopelijk gevolgen voor de normstelling voor deze verbindingen.

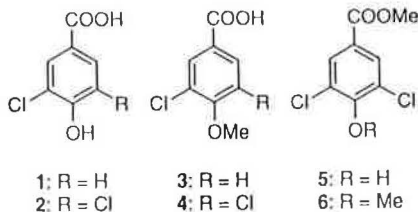
TABEL 4

Nieuwe gechloreerde verbindingen geproduceerd door *Bjerkandera* spp. gekweekt in gedefinieerd vloeibaar medium.

Verbindingen 3 en 4 waren niet afzonderlijk kwantificeerbaar. CALd= 3-chloro-*p*-anisyl-aldehyde; DCAld= 3,5-dichloro-*p*-anisyl-aldehyde.

Symbolen: - niet gedetecteerd; + $\leq 1\%$; ++ $\leq 5\%$; +++ $\leq 10\%$; ++++ $> 50\%$. Deze percentages bevatten totaal gedetecteerde gechloreerde en niet-gechloreerde metabolieten.

	<i>Bjerkandera</i> sp.-isolaat	
	BOS55	BEUK47
verbinding 1	+	+
verbinding 2	+	-
verbinding 3 + 4 ¹	+++	+++++
verbinding 5	++	-
verbinding 6	+	-
Cald ²	+++	++
DCAld ²	+	+



Structuren van de verbindingen 1 t/m 6 uit tabel 4.

TABEL 5

Geschatte jaarlijkse biomassaproduktie (kg drooggewicht per ha per jaar) en berekende totale AOX-produktie door geselecteerde saprotrofe schimmels in bossen in Nederland, die werden gedomineerd door drie verschillende boomtypen.

	Geschatte jaarlijkse biomassa (kg drooggewicht/ha/jaar)		
	<i>Pinus sylvestris</i> ^a	<i>Quercus robur</i> ^b	<i>Fagus sylvatica</i> ^c
<i>Psilocybe</i> spp. ^d	5,0	7,0	10,0
<i>Psilocybe elongatum</i>	0,2	0,0	0,0
<i>Megacollihya platyphylla</i>	0,1	7,0	10,0
<i>Mycena galericulata</i>	0,1	3,0	1,0
<i>Gymnopilus sapineus</i>	2,0	1,0	0,5
<i>Collybia butyracea</i>	1,2	0,5	1,5
<i>Collybia dryophila</i>	0,5	1,0	0,7
<i>Mycena</i> spp. ^e	0,7	0,2	0,7
<i>Bjerkandera adusta</i>	0,0	0,0	1,0
Totale AOX-produktie (in g AOX/ha/jaar)	105	130	190

^a Volgens B.W.L. de Vries, Biologisch Station Wijster.

^b Volgens E. Arnolds, Biologisch Station Wijster.

^c Zie Arnolds & al. (1994).

^d Voornamelijk *Ps. fascicularis*, deels ook *Ps. capnoides* en *Ps. sublateralitia*.

^e Voornamelijk *M. epipterygia*, *M. galopus* en *M. metata*.

- De organohalogenen die in deze studie werden gemeten, werden geproduceerd door het mycelium van de geteste schimmelsoorten. Dit betekent dus niet dat deze verbindingen ook voorkomen in de vruchtlichamen van deze schimmelsoorten.
- Nog maar van een beperkt aantal soorten basidiomyceten is op dit moment bekend welke gechloroerde verbindingen geproduceerd worden en in het milieu worden uitgescheiden.
- De reden waarom schimmels deze stoffen produceren en de eventuele functionele rol(len) van deze stoffen in het schimmelmetabolisme zijn in deze studie niet onderzocht en zijn tot op heden grote vraagtekens.
- Over het lot van het door schimmels geproduceerde AOX (afbraak of ophoping in het milieu) is op dit moment nog niets bekend.

Dankwoord

Het in dit artikel beschreven onderzoek werd mede uitgevoerd door Jim Field, Henk

Swarts en Hans Wijnberg, die evenals de auteur werkzaam zijn bij de Landbouwniversiteit Wageningen. De opmerkingen van Thom Kuyper, Biologisch Station Wijster, op de eerste versie van dit artikel werden bijzonder op prijs gesteld en zijn grotendeels in deze versie verwerkt. Financiële ondersteuning voor het onderzoek werd verleend door de Stichting voor de Technische Wetenschappen te Utrecht binnen een project getiteld: "Gechloroerde aromatische metabolieten van schimmels: natuurlijke zwarte lijst stoffen en dioxine-precursors in het milieu" en door de Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen.

Referenties

- Arnolds, E., Kuyper, Th.W., Noordeloos, M.E. (eds.), 1995. Overzicht van de paddestoelen in Nederland. Uitgave Nederlandse Mycologische Vereniging.
- Arnolds, E., Opdam, A., Van Steenis, W., De Vries, B.W.L., 1994. Mycocoenology of stands of *Fagus sylvatica* L. in The Netherlands. *Phytocoenologia* 24: 507-530.
- Asplund, G., Grimvall, A., 1991. Organohalogenes in nature, more widespread than previously assumed. *Environment, Science & Technology* 25: 1346-1350.
- Asplund, G., 1995. Origin and occurrence of halogenated organic matter in soil. pp. 35-48 in: Grimvall, A., De Leer, E.W.B. (eds.), *Naturally produced organohalogenes*. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands.
- Dominguez, X.A., Butruille, S.D., Gomez Parra, F., Reyes, C., 1972. Aislamiento del 1,4-dimethoxy-2,3,5,6-tetrachlorobenceno y una lactona del *Fomes robiniae*. *Anales de Quimica* 68: 917-920.
- van Eijk, G.W., 1975. Drosophilin, a methyl ether from *Mycena megaspora*. *Phytochemistry* 14: 2506.
- Harper, D.B., 1985. Halomethane from halide ion - a highly efficient fungal conversion of environmental significance. *Nature* 315: 55-57.
- Hsu, C.S., Suzuki, M., Yamada, Y., 1971. Chemical constituents of fungi. I. 1,4-Dimethoxy-2,3,5,6-tetrachlorobenzene (*O*-methyl-drosophilin A) from *Phellinus yucatensis*. *Chemical Abstracts* 75: 115864a.
- de Jong, E., Field, J.A., Spinnler, H.E., Wijnberg, J.B.P.A., De Bont, J.A.M., 1994. Significant biogenesis of chlorinated aromatics by fungi in natural environments. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 264-270.
- Sonnenbichler, J., Dietrich, J., Peipp, H., 1994. Secondary fungal metabolites and their biological activities. V. Investigations concerning the induction of the biosynthesis of toxic secondary metabolites. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* 375: 71-79.
- Swift, M.J., 1982. Basidiomycetes as components of forest ecosystems. pp. 307-337 in: Frankland, J.C., Hedger, N.J., Swift, M.J. (eds.), *Decomposer basidiomycetes: their biology and ecology*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Takahashi, A., Agatsuma, T., Ohta, T., Nunozawa, T., Endo, T., Nozoe, S., 1993. Russuphelins B, C, D, E, and F, new cytotoxic substances from the mushroom *Russula subnigricans* HONGO. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* 41: 1726-1729.
- Verhagen, F.J.M., Swarts, H.J., Kuyper, Th.W., Wijnberg, J.B.P.A., Field, J.A., 1996. The ubiquity of natural adsorbable organic halogen production among basidiomycetes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 45: 710-718.