

## УРОВЕНЬ РЕЗИСТЕНТНОСТИ СЛОВЕВИЦА ЛИШАЙНИКА *HYPOGYMNIА PHYSODES* (L.) NYL. К ВОЗДЕЙСТВИЮ ОКИСЛОВ АЗОТА

А.Ф. Мейсурова, С.Д. Хижняк, П.М. Пахомов

Тверской государственной университет

*Предложена ИК спектроскопическая методика оценки воздействия окислов азота на слоевище лишайника. Выявлена динамика накопления экотоксиканта в слоевище лишайника *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. при различной концентрации в течение одной недели, оценен уровень (характер) трансформации химического состава лишайника. Определено пороговое значение концентрации паров азотной кислоты для *Hypogymnia physodes*, вызывающее у лишайника стрессовое состояние и глубокие необратимые нарушения физиологии и структуры. Дана интерпретация изменений основных полос поглощения в ИК спектре образца *Hypogymnia physodes*.*

**Введение.** Интерес к лишайникам возрастает в связи с развитием и широким использованием лишеноиндикационного подхода в мониторинговых исследованиях [15]. С помощью лишайников проводится оценка состояния воздушной среды как в городских условиях [1; 4–6; 11; 18], так и в зоне воздействия техногенного загрязнения [2; 7; 8; 12; 16; 19]. Широкое использование эпифитных лишайников при оценке степени чистоты воздуха связано с тем, что видовой состав лишенофлоры чутко реагирует на изменение химического состава воздуха. Последняя особенность лежит в основе многих методик лишенологической индикации. Среди лишайников есть виды с разной степенью токситолерантности – гемерофильные, гемерофобные, среднеустойчивые. На чувствительность вида к тому или иному вредному воздействию, наряду с морфологическими и анатомическими особенностями строения слоевища, оказывают влияние тип размножения лишайника, скорость роста, скорость расселения, т.е. «жизненная стратегия» в целом [25]. В связи с тем что лишайники адсорбируют загрязняющие вещества всей поверхностью, они способны накапливать в талломе значительные количества экотоксиканта и сохранять их на протяжении всей жизни. Поглощенные из окружающей среды растворы и газы проходят длинный путь между грибными гифами к чувствительным водорослевым клеткам, что частично ослабляет токсичность поллютантов.

Ставший уже традиционным, лишеноиндикационный анализ сопряжен с определенными сложностями. Например, не все лишайники просто определяются. В основе определения лишайников с помощью химических реактивов лежит положение об устойчивости химического состава видов лишайников. Тем не менее до настоящего времени в лишенологической литературе ведется оживленная дискуссия о том, что некоторые виды лишайников являются вовсе не видами, а экобиоморфами, меняющимися по химическому составу, цвету и некоторым морфологическим признакам в зависимости от условий их местообитания. Не всегда образуются и органы спороношения, которые являются важным систематическим признаком, положенным в основу многих определителей лишайников. Разработанный метод электрофоретического фракционирования белков, используемый для решения спорных вопросов хемосистематики [3] не всегда является доступным.

Для преодоления трудностей, которые возникают при лишеноиндикационном анализе, применяют различные физико-химические методы. Например, Фурье-ИК спектроскопию уже успешно применяют при анализе химического состава лишайников для решения спорных вопросов хемосистематики и в работах по их практическому использованию [27]. Возможность точной идентификации типов функциональных групп соединений с помощью Фурье-ИК спектроскопии определяет интерес к использованию этого метода в лишеноиндикации. Использование

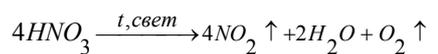
спектроскопических данных о поглощенных слоевищами лишайников химических веществах в целях биоиндикации значительно расширяет возможность лишайноиндикационных исследований, поскольку метод не только отражает химический состав изучаемого объекта, но и фиксирует основные тенденции изменения химического состава в слоевище, которые могут быть вызваны влиянием экотоксикантов [22]. Появляется возможность получать интегральную информацию о состоянии атмосферы в городских районах, характере влияния загрязнения на природные системы, быстро и объективно оценивать содержание различных загрязнителей, порог их концентрации и степень воздействия, разрабатывать методы ранней диагностики направлений трансформации природных систем, находящихся под влиянием техногенной нагрузки.

Тем не менее при использовании метода Фурье-ИК спектроскопии в лишайноиндикации не всегда удается корректно оценить характер отнесения полос поглощения в ИК спектре образцов лишайников урболихенофлор. При работе с природным материалом – лишайником из городской среды – трудно дать точную оценку, поскольку получаемые результаты зависят от многих факторов – степени влажности воздуха, направления и перемещения воздушных масс, температуры и т. д. Возникают сложности при интерпретации ИК спектров, так как наложение полос поглощения разных функциональных групп осложняет их анализ. С целью корректной интерпретации необходимы дополнительные экспериментальные данные по воздействию на лишайники наиболее распространенных загрязнителей атмосферы, источниками которых в городах является автотранспорт и промышленные предприятия. Любое антропогенное воздействие на биологические системы, не вызывающее в организме каких-либо патологических отклонений, возможно до достижения некоторых пороговых концентраций. В этой связи значительный интерес представляют данные о динамике накопления слоевищем лишайника поллютантов, о характере взаимодействия накопленных поллютантов с органическими компонентами слоевища лишайника, а также сведения о воздействии лимитирующих концентрации экотоксиканта на химическую структура лишайника.

Цель работы – изучение методом Фурье-ИК спектроскопии динамики накопления окислов азота слоевищем *Hypogymnia physodes* и характера взаимодействия поллютантов с органическими компонентами лишайника.

**Материалы и методы исследования.** Объектом исследования являлись образцы среднеустойчивого к атмосферному загрязнению лишайника *Hypogymnia physodes*. Этот вид встречается повсеместно в урболихенофлорах, проявляет значительные изменения химического состава слоевищ в условиях атмосферного загрязнения [21]. Образцы лишайника были собраны весной 2005 г. в экологически чистой зоне, расположенной в 60 км от г. Тверь (окрестности д. Ферязкино Калининского р-на Тверской обл.), которую можно считать фоновой [20].

В лабораторных условиях осуществляли моделирование различного уровня антропогенного загрязнения воздуха окислами азота. Диоксид азота является наиболее типичным загрязнителем атмосферы городов. Его содержание в воздухе неуклонно увеличивается, что обусловлено непрерывным ростом парка автомобилей и неудовлетворительным техническим состоянием значительной их части. Высушенные образцы *Hypogymnia physodes* 1–6 помещали в эксикаторы над парами диоксида азота (табл. 1). Для этого предварительно в эксикатор наливали азотную кислоту (HNO<sub>3</sub>) различной концентрации и нагревали до температуры 86<sup>0</sup> С. Последняя, будучи сильным окислителем, при нагревании и под действием света выделяла пары диоксида азота, в которых образцы *Hypogymnia physodes* выдерживали в течение одной недели:



При записи ИК спектров образцов использовали метод приготовления таблетки с бромидом калия (KBr) [17]. Для этого 3 мг образца лишайника сушили при температуре 25–35<sup>0</sup> С, тщательно измельчали в вибрмельнице, смешивали с порошком KBr (0,7 г). Затем смесь прессовали под давлением 20 атм. в специальной пресс-форме при комнатной температуре в вакууме и получали прозрачную таблетку.

ИК спектры образцов записывали на Фурье-ИК спектрометре «Equinox 55» фирмы Bruker.

Таблица 1

Схема проведенных экспериментов						
Время экспозиции	Номер образца					
	1	2	3	4	5	6
	Концентрация HNO <sub>3</sub> , в %					
	2	4	8	16	32	65
1 неделя	+	+	+	+	+	+

Примечание. + ИК спектр образца *Hypogymnia physodes* записан.

Для проведения количественного спектрального анализа использовали английскую версию пакета OPUS-NT спектрометра «Equinox 55», с помощью которой можно рассчитать оптическую плотность (D). Значение D позволяет судить об относительной концентрации исследуемого вещества.

**Результаты экспериментов.** При сравнении ИК спектров образцов *Hypogymnia physodes* 1–6, выдержанных в течение одной недели над парами соответствующего загрязнителя, и образцов этого вида из фоновой зоны обнаружены существенные изменения интенсивности полосы поглощения на частоте 1381 см<sup>-1</sup>, которая соответствует симметричным валентным колебаниям группы -NO<sub>2</sub> (алкилнитраты) [9,14] (рис. 1, табл. 2). Анализ значений оптической плотности полосы 1381 см<sup>-1</sup> показал, что с увеличением концентрации кислоты в эксикаторе происходит рост ее величины в образцах 1–4, причем максимальное значение D<sub>1381</sub> соответствует концентрации азотной кислоты 16% (рис. 2, 3). Например, величина D<sub>1381</sub> в образце 1 составляет 0,333, 2 – 0,546, 3 – 0,609, 4 – 0,852. Дальнейшее увеличение концентрации HNO<sub>3</sub> в эксикаторе приводит к снижению величины D<sub>1381</sub> в образцах 5–6. Вероятно, данная концентрация кислоты является пороговой или предельно допустимой. В спектрах образцов 1–4 происходит изменение полосы 779 см<sup>-1</sup>, образцов 3–5 обнаруживается новая полоса поглощения 874 см<sup>-1</sup>. Изменения в спектрах данных образцов вызвано деформационными колебаниями группы O-N-O [14].

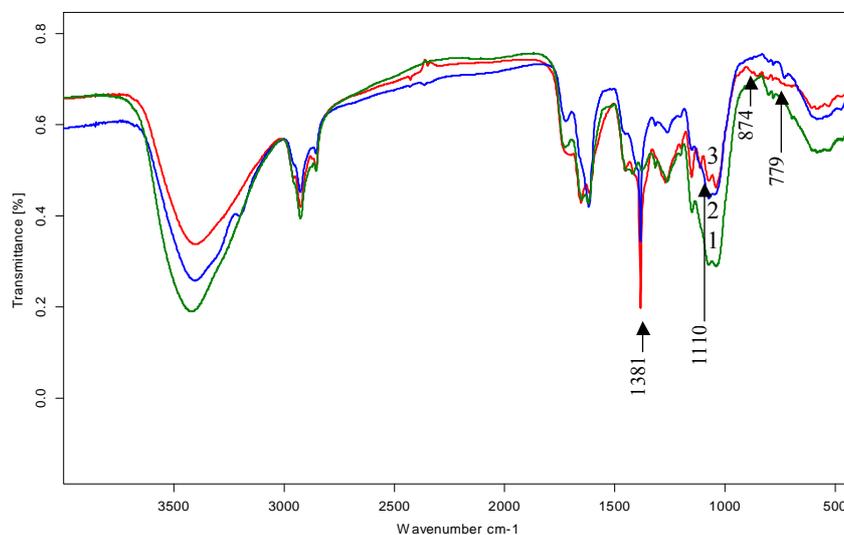


Рис.1. ИК-спектры образцов *Hypogymnia physodes* из фоновой зоны (спектр 1) и выдержанных над 2 и 65% азотной кислотой (спектры 2 и 3 соответственно)

Таблица 2

Значения оптической плотности (D) для различных полос поглощения в ИК спектрах образцов 1–6

Время	Волновое	Номер образца
-------	----------	---------------

экспозици и	число, см <sup>-1</sup>	1	2	3	4	5	6
1 неделя	1542	-	0,120	0,129	0,144	-	-
	1314	0,094	0,253	0,261	0,266	-	-
	1381	0,333	0,546	0,609	0,852	0,425	0,328
	1110	-	-	-	-	-	0,159
	874	-	-	0,035	0,045	0,008	-
	779	0,007	0,017	0,021	0,043	-	-
	467	-	-	0,098	0,108	-	-

Примечание.

- наблюдается изменение цвета (пожелтение) и частичное ослизнение
- отсутствие полос поглощения в ИК спектрах образца.

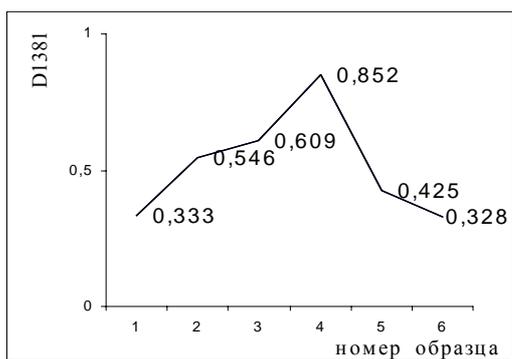


Рис.2 Оптическая плотность (D 1381) образцов 1-6 с временем экспозиции 1 неделя

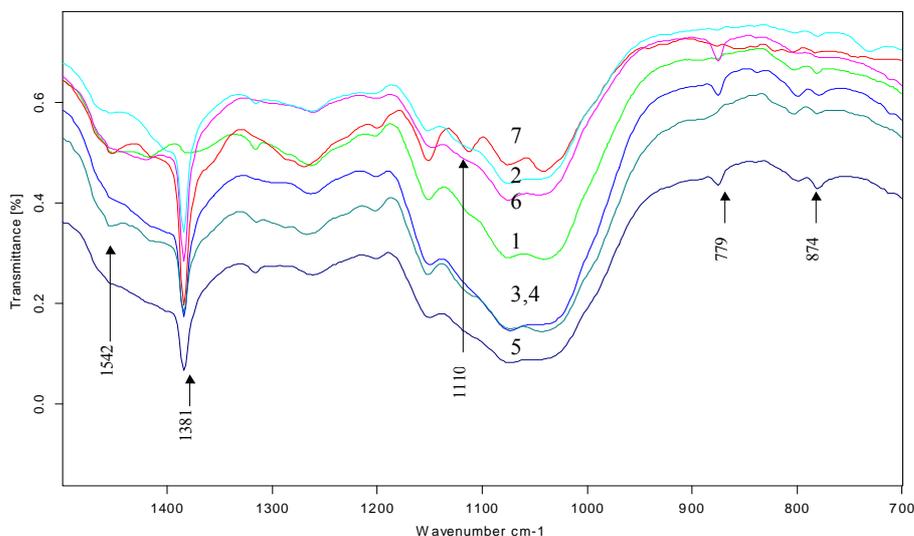


Рис. 3. ИК спектры образцов *Hypogymnia physodes* из фоновой зоны (спектр 1) и выдержанные над азотной кислотой разной концентрации (спектры 2-7 соответственно)  
 Экотоксикант не только накапливается в слоевище лишайника, но и активно реагирует с его органическими компонентами (например с белковыми молекулами). Лишайники способны накапливать небольшое, но постоянное количество азота, не менее 70% которого участвует в построение белковых молекул. Более того, лишайники могут образовывать небольшие, но устойчивые запасы белка, помогающие им переживать стрессовые условия существования. При этом одна часть аминокислотного состава белков слоевищ имеет четкую стабильность (например, по

треонину, серину, пролину, глицину, валину, тирозину, фенилаланину) и является наиболее консервативной [10]. Такие же аминокислоты, как лизин, аргенин, аспарагин и изолейцин, оказались более лабильными и являлись первопричиной количественных изменений. В этой связи вероятно изменение в ИК спектрах образцов *Hypogymnia physodes* 2-4 с временем экспозиции 1 неделя на частоте 1542 см<sup>-1</sup> (Амид II) [26], что связано с синтезом и запасом белка за счет поступления азота. Незначительные изменения на частоте 1542 см<sup>-1</sup>, которые демонстрируют ИК спектры образцов 2-4, объясняется в целом низким содержанием общего и белкового азота в слоевище лишайника. Медленный синтез и распад – необходимые условия существования симбиотического организма лишайника [23]. Избыток азота вызывает распад лишайникового слоевища. Наряду с изменениями на частоте 1542 см<sup>-1</sup>, в ИК спектрах образцов *Hypogymnia physodes* 1-4 с временем экспозиции 1 неделя отмечены также изменения на частоте 1314 см<sup>-1</sup> ( $-\text{SO}_2\text{N}-$ ) [13].

Важно отметить, что для всех проанализированных полос поглощения (1542, 1381, 1314, 874, 779, 467 см<sup>-1</sup>) образцов 1-4, которые были выдержаны над парами азотной кислоты в течение 1 недели, наблюдается увеличение значения оптической плотности при повышении концентрации кислоты до 16 % (табл. 2). Дальнейший рост концентрации кислоты вызывает резкое падение D. Наибольшие изменения обнаружены в ИК спектрах образцов 3-4. По-видимому, концентрация кислоты в 16 % является критической для образцов *Hypogymnia physodes* в первую неделю эксперимента, однако она не вызывает необратимых превращений в лишайнике. Визуально различимых признаков деформации и уродств, которые могли бы свидетельствовать о воздействии на лишайник загрязняющего вещества, нет. При дальнейшем повышении концентрации азотной кислоты количество изменений в ИК спектрах становится меньше, что свидетельствует о снижении процессов жизнедеятельности, сопровождающихся видимыми морфологическими изменениями. При выдерживании образцов *Hypogymnia physodes* 5-6 в азотной кислоте 32 и 65% наблюдается обратная зависимость: чем выше концентрация экотоксиканта, тем меньше величина D<sub>1381</sub> – 0,425 и 0,328 соответственно. В ИК спектрах образцов *Hypogymnia physodes* 5-6 со временем экспозиции 1 неделя не обнаружены следы активного взаимодействия накопленного поллютанта с органическими компонентами лишайника, нет полос поглощения на частоте 1542, 1314, 779 и 467 см<sup>-1</sup>. Наряду с полосой поглощения на частоте 1381 см<sup>-1</sup> в ИК спектрах образцов *Hypogymnia physodes* 5-6 обнаружена полоса поглощения 874 (с деформационными колебаниями группы O-N-O). ИК спектр образца 6, помимо основного изменения на частоте 1381 см<sup>-1</sup>, демонстрирует различия на частоте 1110 см<sup>-1</sup> (C-O). Вероятно, воздействие азотной кислоты высокой концентрации не приводит к активной адсорбции поллютанта слоевищем лишайника, а наоборот, вызывает стрессовое состояние, так как превышена способность ткани к ее детоксикации при нормальном метаболизме. Стрессовое состояние может сопровождаться разбалансировкой тонких симбиотических взаимоотношений, глубоким нарушением физиологии и биохимическими изменениями [24]. Сам образец лишайника демонстрирует изменение окраски таллома – пожелтение и частичное ослизнение.

Таким образом с помощью метода Фурье-ИК спектроскопии при моделировании различного уровня загрязнения воздуха поллютантом в лабораторных условиях удалось выявить, что лишайники активно реагируют на изменения химического состава воздуха. Изменения в ИК спектрах образцов *Hypogymnia physodes* на частотах 1381, 874 и 779 см<sup>-1</sup> свидетельствуют о накоплении слоевищем окислов азота. Увеличение интенсивности полос 1542 см<sup>-1</sup> (Амид II) и 1314 см<sup>-1</sup> (валентные колебания SO<sub>2</sub>-группы) связано с изменением содержания серосодержащих белков соответственно. Появление полосы поглощения 1110 см<sup>-1</sup> (C-O) указывает на процессы деструкции лишайникового слоевища. Наиболее активно процесс взаимодействия накопленного поллютанта с органическими компонентами слоевища лишайника идет в первую неделю экспозиции, при концентрации кислоты не превышающей порогового значения. ИК спектры данных образцов демонстрируют наибольшее число изменений. Пороговая концентрация азотной кислоты для

*Hypogymnia physodes* составляет 16%. При более высоких концентрациях паров азотной кислоты (32 и 65%) в ИК спектрах образцов *Hypogymnia physodes* следов активного взаимодействия накопленного поллютанта с химическими компонентами лишайника нет. Вероятно, превышение порогового значения концентрации кислоты вызывает у лишайника стрессовое состояние, приводящее к глубокому необратимому нарушению физиологии и структуры. Разбалансировка тонких симбиотических взаимоотношений между грибным и водорослевым компонентами сопровождается видимыми морфологическими изменениями. Небольшие концентрации экотоксиканта, по-видимому, менее опасны для лишайника по крайней мере в первые недели, он постепенно усваивается слоевищем лишайника, не вызывая его мгновенной гибели.

Целесообразно проведение дополнительных исследований, которые позволят выяснить характер отнесения полос поглощения в ИК спектре образцов *Hypogymnia physodes*, других загрязнителей атмосферы (например, диоксида серы). Полученная информация об изменениях в ИК спектрах образцов лишайников при их выдерживании в парах азотной кислоты разной концентрации может быть использована для ранней диагностики уровня жизнедеятельности лишайникового таллома, а также качественного и количественного состава атмосферного загрязнения.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Байбаков Э.И. Оценка экологического состояния урбанизированных территорий с помощью методов лишеноиндикации (на примере г. Казани): Автореф. дисс. ... канд. биол. Наук. Ижевск, 2003.
2. Баумгертнер М.В. Лишайники – биоиндикаторы загрязнения окружающей среды юга кемеровской области // Сибирский экологический журнал. 1998. Т.5, № 2. С. 191–196.
3. Блюм О.Б., Брунь Г.А., Каишевров Г.Г. Методы электрофоретического фракционирования белков и молекулярной гибридизации ДНК в хемосистематике лишайников родов *Evernia* и *Pseudevernia* // Актуальные проблемы экспериментальной лишенологии в СССР. Л., 1991. С. 30-40. (Тр. Ботан. ин-та им. В.Л.Комарова; Вып. 1).
4. Бязров Л.Г. Индекс развития эпифитных лишайников и оценка состояния воздушного бассейна территории г. Москвы // Бюл. МОИП. Отд. биол. 1999. Т. 104, № 6. С. 30–40.
5. Гагарина Л.В., Шкраба Е.М. Биоразнообразие и экология лишайников урбанизированных территорий Пермского края // Флора лишайников России: состояние и перспективы исследований: Тр. междунар. совещ., посвящ. 120-летию со дня рожд. В.П. Савича. СПб., 2005. С. 61–66.
6. Голубкова Н.С., Малышева Н.В. Влияние роста города на лишайники и лишеноиндикация атмосферного загрязнения г. Казани // Бот. журн. 1978. Т. 63, № 8. С. 1145–1154.
7. Жидков А.Н. Эпифитные лишайники зоны широколиственных лесов в условиях промышленного загрязнения. М., 1994.
8. Жидков А.Н. Эпифитные лишайники как показатель состояния сосновых насаждений в условиях промышленного загрязнения: Автореф. дис. ... канд. биол. Наук. М., 1991.
9. Казицына Л.А., Куплетская Н.Б. Применение УФ-, ИК- и ЯМР-спектроскопии в органической химии. М., 1971.
10. Криворотов С.Б. Лишайники и лишайниковые группировки Северо-западного Кавказа и Предкавказья: Флористический и экологический анализ: Автор. дис. ... д-ра биол. Наук. Краснодар, 2001.
11. Малышева Н.В. О субурбанофлорах лишайников городов // Флора лишайников России: состояние и перспективы исследований: Тр. междунар. совещ., посвящ. 120-летию со дня рожд. В.П. Савича. СПб., 2005. С. 147–148.
12. Мейсурова (Уразбахтина) А.Ф. Эпифитная лишенофлора промышленных районов Тверской области. Автореф. дис. ... канд. биол. Наук. М., 2004.
13. Мейсурова А.Ф., Деметьева С.М. Мониторинг окружающей среды. Тверь, 2005. 29 Ч.1. Применение ИК спектроскопии в лишеноиндикационных исследованиях.

14. Наканиси К. Инфракрасные спектры и строение органических соединений. М., 1965.
15. Отнюкова Т.Н. Новые подходы в использовании лишайников для оценки состояния воздушной среды // Флора лишайников России: состояние и перспективы исследований: Тр. междунар. совещ., посвящ. 120-летию со дня рожд. В.П. Савича. СПб., 2005. С. 182 – 189.
16. Скирина И.Ф., Коженкова С.И. Лихеноиндикация загрязнения приземного воздуха города Находка (Приморский край) // Бот. журн. 2005. Т. 90, № 8. С. 1184–1196.
17. Смит А. Прикладная ИК спектроскопия. М., 1982.
18. Суетина Ю.Г. Изменение эпифитной лишайнофлоры и структура популяций *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. в городской среде: Автореф. дисс. ... канд. биол. Наук. Йошкар-Ола. 1999.
19. Трасс Х.Х., Пярн А.Й., Цобель К.Р. Лихеноиндикационная оценка степени загрязненности атмосферной среды Южного Прибайкалья // Региональный мониторинг состояния озера Байкал. Л., 1987. С. 54–63.
20. Уразбахтина (Мейсурова) А.Ф., Катаускайте Л.А. Некоторые итоги лишеноиндикационного анализа рекреационных зон г. Твери // Ботанические исследования в Тверском регионе. Тверь, 2003. С. 130–136.
21. Уразбахтина А.Ф., Дементьева С.М., Хижняк С.Д., Сурикова Е.И., Пахомов П.М. ИК спектроскопическое изучение некоторых видов эпифитных лишайников // Физика и химия полимеров. Сб. науч. тр. ТвГУ. Тверь, 2003. Вып. 9. С. 141–145.
22. Уразбахтина А.Ф., Хижняк С.Д., Дементьева С.М., Нотов А.А., Пахомов П.М. Фурье-ИК спектральный анализ некоторых эпифитных видов лишайников в рекреационных зонах города // Растительные ресурсы. 2004. Вып. 2. С. 42–51.
23. Шапиро И.А. Адаптация лишайников к экстремальным условиям существования в связи с их азотным обменом: Автореф. дисс. ... д-ра биол. наук. Л., 1991. (АН СССР, Бот. ин-т им. Комарова).
24. Шапиро И.А. Влияние сернистого ангидрида на содержание азота и пероксидазную активность у лишайников // Бот. журн. 1993. Т. 78, № 5. С. 66–71.
25. Шапиро И.А. Физиолого-биохимические изменения у лишайников под влиянием атмосферного загрязнения // Успехи соврем. биологии. 1996. Т. 116, № 2. С. 158–171.
26. Infrared characteristic group frequencies. Tables and Charts / The ed. G. Socrates. London, 1994.
27. Raab T.K., Martin M.C. Visualizing rhizosphere chemistry of legumes with mid-infrared synchrotron radiation // Planta. 2001. Vol. 213, № 5. P. 881–887.

#### THE RESISTANCE LEVEL OF LICHEN'S THALLOME OF *HYPOGYMNINGIA PHYSODES* (L.) NYL. TO NITRIC OXIDE

A.F. Meysurova, S.D. Khizhniyak, P.M. Pakhomov

Tver State University

*Infra-red spectroscopic methodic of evaluation of the nitric oxide's pressure on lichen's thallome is proposed. The dynamics of ecotoxicant accumulation of different concentration in Hypogymnia physodes (L.) Nyl. thallome during one week was revealed. The level of transformation of lichen's chemical composition was evaluated. Threshold concentration of nitric acid, which stresses lichens and leads to deep irreversible disturbances of physiology and structure of Hypogymnia physodes(L.) Nyl. was defined. The interpretation of changes of basic absorption strips of Hypogymnia physodes(L.) Nyl. in infra-red spectrum was given.*