

МЕЖДИСЦИПЛИНАРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 582.29:543.42

РЕЗУЛЬТАТЫ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ИЗМЕНЕНИЙ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА СЛОЕВИЩА *HYPOGYMNINGIA PHYSODES* (L.) NYL. ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ СОЛЕЙ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

А.Ф. Мейсурова¹, Е.И. Антонова¹, С.Д. Хижняк¹,
В.А. Рыжов², П.М. Пахомов¹

¹Тверской государственной университет

²Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН

Различными физико-химическими методами осуществлен анализ химических изменений слоевища лишайников под воздействием солей тяжелых металлов $HgSO_4$, $ZnSO_4$, $CdSO_4$. Рентгенофлуоресцентный анализ и атомно-абсорбционная спектроскопия эффективны при оценке содержания металлов в слоевище. ИК спектроскопия позволяет обнаружить химические изменения слоевища, связанные с накоплением SO_4^{2-} – аниона и образованием в нем сульфонов. Менее информативна ИК спектроскопия при выявлении в слоевище катионов металлов.

Ключевые слова: тяжелые металлы, ИК спектроскопия, атомно-абсорбционная спектроскопия, рентгенофлуоресцентная спектроскопия, *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl.

Для оценки состояния атмосферы все чаще используют информацию об изменении химического состава слоевища лишайников. При этом анализируют данные о содержании хлорофилла [16], лишайниковых кислот [10; 19], пигментов [13]. Проведено много исследований по накоплению лишайниками поллютантов, особенно металлов. Используют некоторые накипные (*Umbilicaria decussata* (Vill.) Zahlbr.), листоватые (*Hypogymnia physodes* (L.) Nyl., *Parmelia sulcata* Taylor), а также кустистые лишайники (*Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf, *Usnea hirta* (L.) F.H. Wigg.). Расширяется спектр физико-химических методов исследования лишайников. Например, в работе L.J.R. Voileau с соавторами [12] методом рентгенофлуоресцентного анализа исследовали образцы на содержание пяти металлов (Ti, Fe, Ni, Pb и U) в 109 лишайниках, собранных в окрестностях производства урана в Канаде. Тот же метод использовали для определения микроэлементного состава лишайника (Cu, Pb и Zn) [23]. Группой ученых из Польши для анализа 800 образцов лишайников был применен метод электронного парамагнитного резонанса [18]. Нейтронным анализом активации (INAA), а также электротермической атомно-адсорбционной спектроскопии. В 2007 г. L. Bergamaschi с соавторами [9] проанализировали 4 эпифитных лишайника *Hypogymnia physodes*, *Parmelia sulcata*, *Pseudevernia furfuracea* и *Usnea hirta* на содержание 29 элементов (Al, As, Br, Ca, Cd, Ce, Cl, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, Hg, I, K,

La, Mg, Mn, Ni, Pb, Rb, Sb, Sc, Se, Sm, Th, Ti, V, Zn). Для оценки наличия и содержания металлов в лишайниках часто применяется метод плазменной масс-спектрометрии, например в работе [11]. При этом предварительно авторы предлагают проводить микроволновое кислотное вываривание тканей лишайника при атмосферном давлении. Содержание Fe, Mn, Co, Cr, Zn и Cu в лишайниках было исследовано методом поглощательной спектроскопии [22]. В то же время в литературе недостаточно данные о ИК спектроскопических исследованиях химических изменений лишайников в результате воздушного загрязнения металлами.

В этой связи цель нашей работы – исследование возможностей, некоторых физико-химических методов оценки изменения химического состава слоевища *Hypogymnia physodes* в результате воздействия солей тяжелых металлов.

В качестве методов исследования были выбраны методы ИК спектроскопии в среднем (СИК) и дальнем (ДИК) диапазоне, а также рентгенофлуоресцентный анализ (РФА) и атомно-абсорбционная спектроскопия (ААС). Выбор ИК спектроскопического метода в работе обусловлен тем, что средний ИК диапазон $400 - 4000 \text{ см}^{-1}$ получил наибольшее применение при расшифровке химического строения органических соединений, реже при идентификации следов металлизации в биологических системах. Использование в нашей работе ДИК ($10 - 400 \text{ см}^{-1}$) определено неуклонным ростом интереса к данной области, поскольку с помощью этого метода можно получить ценную информацию о металлорганических соединениях [4]. Предпочтение РФА и ААС отдано в связи с тем, что последние информативны, хорошо зарекомендовали себя при элементном анализе и наиболее часто применяются при оценке содержания металлов в природных объектах.

Материалы и методы исследования. Объектом исследования служили образцы индифферентного вида лишайника *Hypogymnia physodes*. 4 образца лишайника были собраны весной 2008 г. в экологически чистой зоне, расположенной в 60 км от г. Твери (окрестности дер. Ферязкино Калининского р-на Тверской обл.), которую можно считать фоновой [8]. Влажный образец 1 использовали в качестве контроля. Влажные образцы 2 – 4 опрыскивали в течение 5 дней 5% растворами сульфата ртути (II), цинка (II) и кадмия (II) (HgSO_4 , ZnSO_4 , CdSO_4) (табл. 1).

Спустя 5 дней, каждый образец лишайника (1 – 4) промывали 100 мл дистиллированной воды, затем сушили в сушильном шкафу при температуре $25 - 30^\circ\text{C}$.

Схема эксперимента

№ образца	Экотоксиканты	Варианты анализы			
		СИК	ДИК	РФА	ААС
1	-	+	+	+	+
2	HgSO ₄	+	+	+	-
3	ZnSO ₄	+	+	+	+
4	CdSO ₄	+	+	+	+

Примечание. + – анализы проведены; - – анализы не проведены в связи с техническими ограничениями прибора.

ИК спектры образцов 1 – 4 получали в среднем (400 – 4000 см⁻¹) и длинном ИК (100 – 400 см⁻¹) диапазоне. Для записи спектров образцов в среднем ИК диапазоне использовали стандартную методику приготовления таблетки с бромидом калия (KBr) [7]. ИК спектры образцов записывали на Фурье-ИК спектрометре «Equinox 55» немецкой фирмы Bruker.

Для записи спектров образцов в длинном ИК диапазоне готовили таблетки из смеси образца со сверхвысокомолекулярным полиэтиленом (СВМПЭ) в соотношении 1:30. Толщина таблетки составляла 2 мм. ИК спектры в длинноволновом диапазоне записывали на спектрометре «FIS» японской фирмы Hitachi.

При интерпретации ИК спектров образцов лишайника ориентировались на основные зарубежные руководства [5; 14; 17; 20; 21]. Характер отнесения некоторых полос был уточнен в ходе наших экспериментальных исследований [1 – 3].





Кроме того, в отделе аналитических исследований центра коллективного пользования Санкт-Петербургского государственного горного института (ОАИ ЦКП СПбГИ) на содержание тяжелых металлов РФА и ААС были проанализированы образцы 1 – 4. Определение цинка, кадмия и ртути в образцах 1 – 4 осуществляли с помощью последовательного волнодисперсионного рентгенофлуоресцентного спектрометра XRF-1800 японской фирмы Shimadzu. Для каждого анализа было взято 10 мг образца.

Определение цинка и кадмия в образцах лишайника было осуществлено методом ААС на приборе AA-6300 (Shimadzu). Предварительно каждую навеску образца массой 5 мг обрабатывали при нагревании смесью HNO₃ и H₂O₂. После растворения разводили до объема 100 мл, дополнительно разбавляли в 25 раз (2/50).

Кроме изменений химического состава слоевища лишайника были оценены морфологические изменения – окраска, появление некротических пятен, усыхание лишайникового слоевища.

Таблица 2

Морфологические изменения слоевища *Hypogymnia physodes* в результате воздействия солей тяжелых металлов

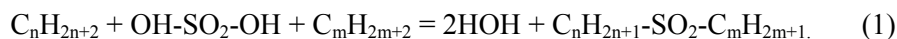
Образец из фоновой зоны	Образцы, обработанные солями тяжелых металлов	
	экотоксикант, внешний вид слоевища	признаки
	<p>HgSO₄</p> 	<p>коричневый цвет, некротические пятна</p>
	<p>ZnSO₄</p> 	<p>бежевый цвет, некротические пятна, сильное усыхание, уменьшение толщины лопастей, поперечная исчерченность</p>
	<p>CdSO₄</p> 	<p>оливковый цвет, слабая поперечная исчерченность</p>

Результаты эксперимента. Под воздействием различных солей тяжелых металлов в течение 5 дней в образцах 2 произошли морфологические изменения. Сравнение образцов 2 с контрольными, выявило наибольшие отклонения от нормы у лишайников, обработанных растворами сульфата цинка и ртути (табл. 2). Внешними симптомами цинковой интоксикации являются поперечная исчерченность, уменьшение толщины лопастей лишайника, а также побледнение. Последнее обусловлено уменьшением

содержания пигментов, связанного с разрушением хлорофилла. Кроме того, известно, что ртуть индуцирует интенсивный выход калия при низких концентрациях (10^{-3} – 2М). Потери калия связаны с замещением калийных ионов ионами тяжелых металлов, при этом происходит нарушением мембранной целостности.

В отличие от действия солей ртути и цинка воздействие интоксикации кадмием, по-видимому, незначительно. Об этом свидетельствуют слабо выраженные внешние изменения. Однако с учетом кумулятивного характера накопления лишайником металлов более длительное его экспонирование в растворах солей металлов приведет, по-видимому, к более значительным морфологическим изменениям.

Внешние изменения слоевищ лишайника, обработанных растворами солей тяжелых металлов, сопряжены с химическими изменениями. Так СИК, показал химические изменения в образцах 2 – 4, которые, в первую очередь, связаны с накоплением слоевищем лишайника экотоксикантов. При сравнении ИК спектра контрольного образца с ИК спектрами образцов 2 – 4 обнаружены полосы поглощения на частотах $1316 - \nu_a(\text{SO}_2)$, 781, 666 и $518 \text{ см}^{-1} - \nu(\text{S-O-C})$ (рис. 1 а, б, в). Их появление указывает на взаимодействие SO_4^{2-} – анионов присутствующих в растворах солей металлов с компонентами лишайника приводящего к образованию сульфонов ($\text{R-SO}_2\text{R}$) [1; 2; 5]. Появление в сульфонов может происходить в результате следующей реакции:



Кроме того, в ИК спектре образца 3, обработанного водным раствором ZnSO_4 , обнаружено поглощение на частоте $470 \text{ см}^{-1} \nu(\text{C-Zn-C})$, возможно указывающее на поглощение лишайником катиона Zn (рис. 1б) [6]. Однако в длинноволновой области ИК спектра образца 3 ожидаемого изменения на частоте $144 \text{ см}^{-1} \delta(\text{C-Zn-C})$ не выявлено. Изменения, указывающие на поглощение лишайником других катионов металлов, в средневолновом диапазоне ИК спектра образцов 2, 4 не выявлены. В том числе, ожидаемое поглощение на частоте $515 \text{ см}^{-1} \nu(\text{C-Hg-C})$ в образце 2, связанное с усвоением лишайником катиона ртути не обнаружили.

В длинноволновой области ИК спектра образцов, обработанных солями HgSO_4 и CdSO_4 , не были обнаружены ожидаемые полосы поглощения в диапазоне $100 - 400 \text{ см}^{-1}$, которые можно было бы считать характерными для ионов металлов (рис. 2 а, б, в). Ртуть и кадмий имеют большой молекулярный вес, их присутствие в лишайнике можно идентифицировать по наличию ИК полос поглощения в области колебаний $156 \nu \text{ Cd-Cd}$, $515 \nu(\text{C-Hg-C})$ и $183 \text{ см}^{-1} \delta(\text{C-Hg-C})$ соответственно. Отсутствие в длинноволновой области ИК спектра образцов 2 – 4 полос поглощения отвечающих металлам, вероятно связано с низким содержанием металлов или их соединений в лишайниках. Или возможно, происходит наложение многочисленных полос, относящихся к функциональным группам разных компонентов лишайника, в том числе полос связанных с усвоением лишайником катионов металлов.

Наличие тяжелых металлов в лишайнике достоверно удалось определить другими методами – РФА и ААС. В спектре образца обработанного 5% раствором HgSO_4 , полученного РФА обнаружены 2 полосы при 30,1 и 35,85 мА (рис. 3а). В спектре образца 3 отмечены изменения, связанные с усвоением лишайником цинк-катиона – 37,5 и 40,65 мА (рис. 3б). На присутствие в лишайниковом слоевище кадмия указывает наличие полос при 13,5 и 15,3 мА (рис. 3в). Чрезвычайно высокая чувствительность метода ААС, также позволила подтвердить наличие цинка и кадмия в лишайнике.

Определение катионов тяжелых металлов в лишайнике связано с процессом их накопления из окружающей среды. Например, в образце 2, кроме ртути, обнаружен цинк. Известно, что цинк входит в состав многих ферментов, участвует в биосинтезе аминокислот, например триптофана. Однако, его содержание в образце 2 соответствует концентрации в фоновом образце и примерно в 80 раз ниже, чем в образце 3, который обрабатывался раствором ZnSO_4 . РФА образцов 2 – 4 позволил доказать высокое содержание в лишайнике цинка и ртути, в то время как количество кадмия существенно меньше. Значительное содержание цинка и ртути в слоевище сопряжено с морфологическими изменениями (табл. 2).

Таким образом, применение различных спектроскопических методов при исследовании изменений химического состава слоевища лишайника *Hypogymnia physodes* под воздействием солей тяжелых металлов позволило выявить возможности разных методов. Традиционная ААС обладает чрезвычайно высокой чувствительностью, имеет низкие пределы обнаружения элементов, малый расход пробного материала, позволяет с высокой степенью достоверности определить индивидуальные элементы, например кадмий, цинк. Однако использование метода ограничивает возможность определения только одного элемента.

Перспективный в экологических исследованиях многоэлементный способ, как РФА, позволил одновременно определить много химических элементов в образце, что в перспективе дает возможность проведения качественного обзорного элементного анализа. С помощью данного способа удалось идентифицировать накопленную лишайником ртуть, кадмий, цинк, в том числе присутствие в химическом составе меди, цинка не связанных с аккумулярованием экотоксикантов. Тем не менее, как и в случае с ААС отсутствует информация о типе соединений в талломе лишайника, образуемом в результате накопления поллютанта и его взаимодействия с химическими компонентами лишайника, степени влияния поллютанта на химическую структуру лишайника. В этой связи, информативными могут являться сведения ИК спектроскопического анализа.

ИК спектроскопический анализ позволил определить основные тенденции изменения химического состава в слоевище лишайника, которые вызваны влиянием экотоксикантов. Удалось установить типы функциональных групп соединений, образовавшиеся в результате накопления и взаимодействия анионов солей (сульфонь, $\text{R-SO}_2\text{R}$), предложить механизм их возможного образования. Интересным, однако, остается вопрос связанный с механизмом его взаимодействия с химическими компонентами лишайника, выяснение динамики, характера и степени влияния, образуемых в лишайнике соединений, прогноз состояния лишайника связанного с химической деструкцией слоевища.

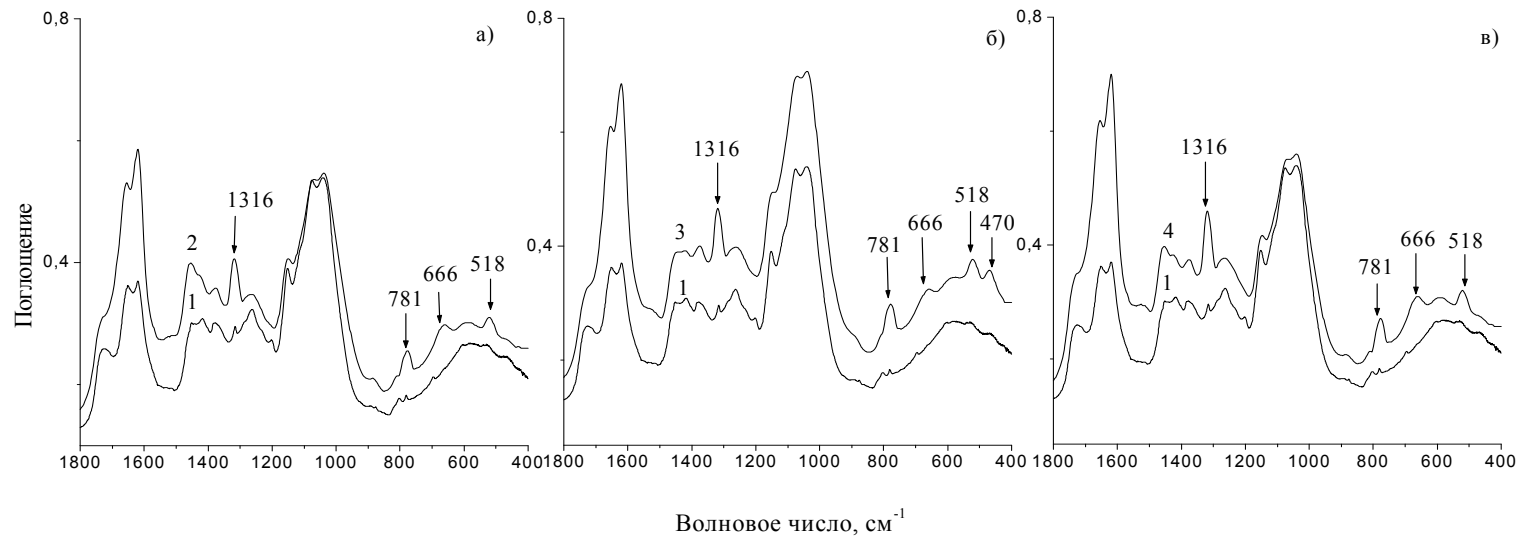


Рис. 1. ИК спектры поглощения образцов *Hypogymnia physodes* из фоновой зоны (спектр 1) и обработанных растворами солей тяжелых металлов: HgSO₄ (2, а), ZnSO₄ (3, б) и CdSO₄ (4, в) в среднем диапазоне длин волн

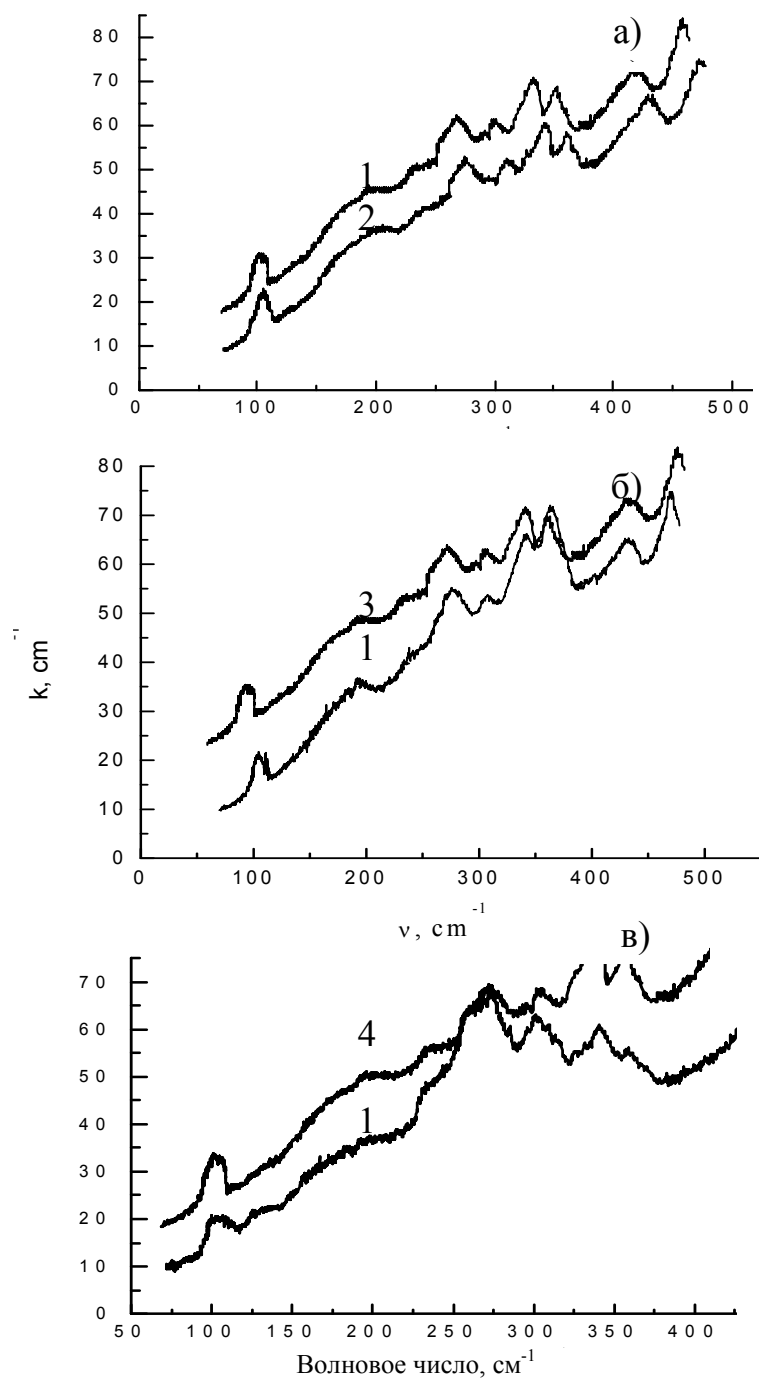


Рис. 2. ИК спектры поглощения образцов *Hypogymnia physodes* из фоновой зоны (спектр 1) и обработанных растворами солей тяжелых металлов: HgSO_4 (2, а), ZnSO_4 (3, б) и CdSO_4 (4, в) в дальней области длин волн

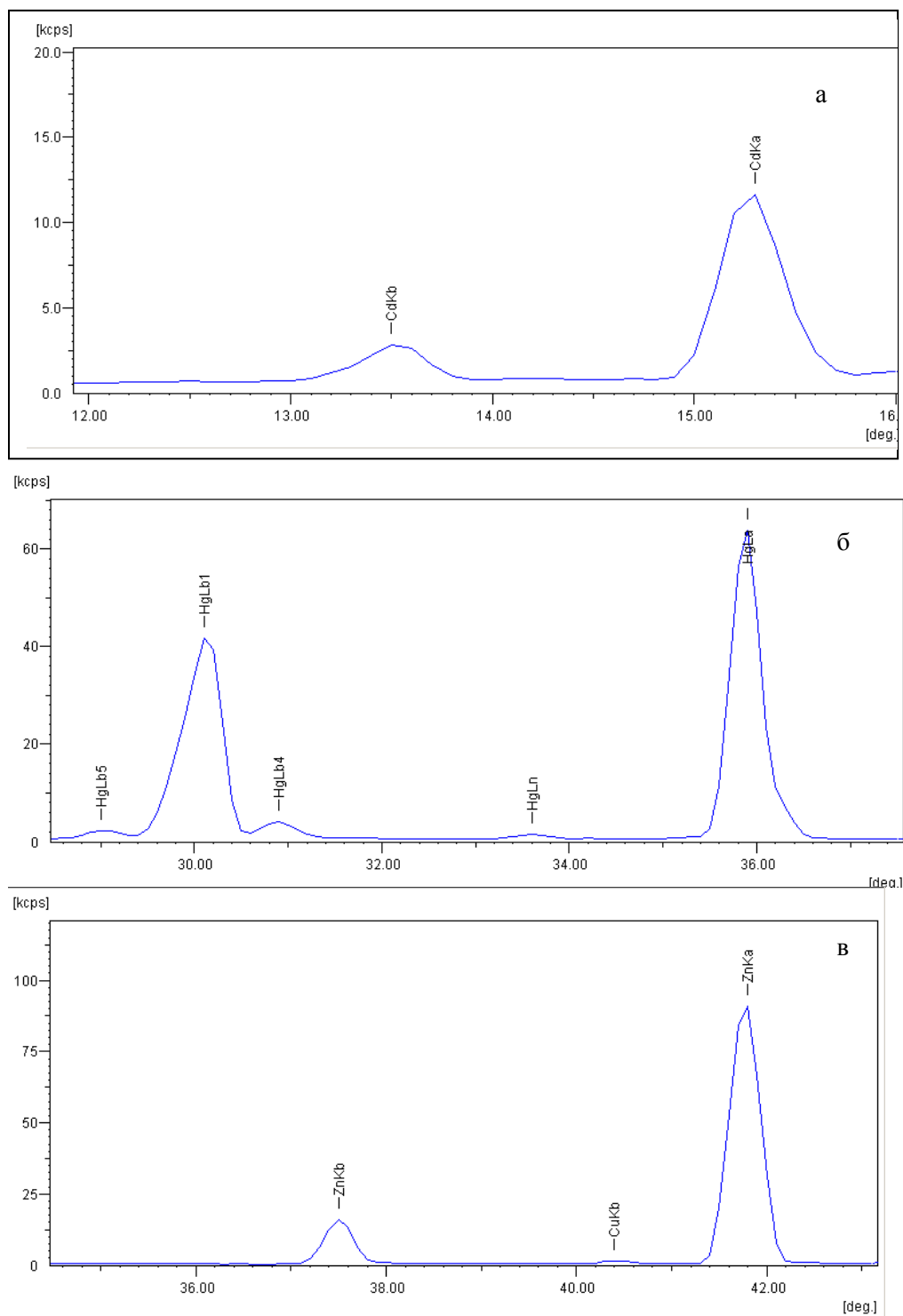


Рис. 3. РФА спектры образцов *Nyrogymnia physodes*, обработанных растворами солей тяжелых металлов: HgSO₄ (а), ZnSO₄ (б) и CdSO₄ (в)

К сожалению, СИК оказался менее эффективен при обнаружении металлов в следовых количествах. В настоящей работе удалось только в одном ИК спектре образца выявить поглощение на частоте 470 см^{-1} $\nu(\text{C-Zn-C})$, возможно указывающее на поглощение лишайником катиона Zn. Ожидаемое изменение в ИК спектра образца 2 на частоте 515 см^{-1} $\nu(\text{C-Hg-C})$ не подтвердилось. По-видимому, гетерогенность химического состава лишайника, а также низкая интенсивность полос поглощения затрудняет интерпретацию спектра. Скорее всего, это относится и к длинноволновой области ИК спектра, где нам не удалось обнаружить полосы, связанные с накоплением тяжелых металлов. В дальнейшем целесообразно применять новые методы разделения, такие как экстракция и хроматография, которые облегчат исследования сложного химического состава слоевища, а комбинирование их с методами ИК спектроскопии дает новую информацию в мониторинговых исследованиях.

Таким образом, возможности методов спектроскопии – СИК, ДИК, РФА и ААС при анализе химических изменений лишайника в результате воздействия солей тяжелых металлов различны. Эффективными при оценке следов металлов в лишайниковом слоевище являются данные РФА и ААС. Однако эти методы не позволяют установить тип образуемого при накоплении поллютанта соединения, механизмы его образования, характер и уровень воздействия. Такую информацию можно получить при использовании ИК спектроскопии. Точная идентификация функциональных групп разных соединений при оценке содержания некоторых тяжелых металлов с помощью ИК спектроскопии мало эффективна.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мейсунова А.Ф. Оценка токсичного действия диоксида серы на химический состав *Hurogymnia physodes* (L.) Nyl. // Вестник ТвГУ. Сер. Биология и экология. 2008. Вып. 7, № 7(67). С. 68 – 75.
2. Мейсунова А.Ф., Дементьева С.М. Мониторинг окружающей среды. Ч.1. Применение ИК спектроскопии в лишайноиндикационных исследованиях. Тверь, 2005.
3. Мейсунова А.Ф., Хижняк С.Д., Пахомов П.М. Спектроскопическое изучение воздействия окислов азота на слоевище лишайника *Hurogymnia physodes* (L.) Nyl. // Экологическая химия. 2007. Т. 16, вып. 4. С. 27 – 35.
4. Миронов В.А., Янковский С.А. Спектроскопия в органической химии. М., 1985.
5. Наканиси К. Инфракрасные спектры и строение органических соединений. М., 1965.
6. Плюснина И.И. Инфракрасные спектры минералов. М., 1977.
7. Смит А. Прикладная ИК спектроскопия. М. 1982.
8. Уразбахтина А.Ф., Катаускайте Л.А. Некоторые итоги лишайноиндикационного анализа рекреационных зон г. Твери // Ботанические исследования в Тверском регионе. Тверь, 2003. С. 130 – 136.

9. Bergamaschi L., Rizzio E., Giaveri G., Loppi S., Gallorini M. Comparison between the accumulation capacity of four lichen species transplanted to a urban site // Environ. pollution. 2007. V.148, №2. P. 468 – 476.
10. Bialonska D., Dayane F. E. Chemistry of the lichen *Hypogymnia physodes* transplanted to an industrial region // Chemical Ecology. 2005. V. 31, №12. P. 131 – 139.
11. Bocca B., Conti M.E., Pino A., Mattei D., Forte G., Alimonti A. Simple, fast, and low-contamination microwave-assisted digestion procedures for the determination of chemical elements in biological and environmental matrices by sector field ICP-MS // Environmental analyt. chem. 2007. V. 87, №15. P. 1111 – 1123.
12. Boileau L.J.R., Beckett P.J., Lavoie P., Richardson D.H.S., Nieboer E. Lichens and mosses as monitors of industrial activity associated with uranium mining in northern Ontario, Canada — Part 1: Field procedures, chemical analysis and interspecies comparisons // Environmental Pollution Series B, Chemical and Physical. 1982. V. 4, Is.1. P. 69 – 84.
13. Chu F. J., Seaward M. R. D., Edwards H. G. M. Application of FT-Raman spectroscopy to an ecological study of the lichen *Xanthoparmelia scabrosa* in the supralittoral zone, Hong Kong // Spectrochimica Acta. Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 1998. V. 54, A, №7. P. 967 – 982.
14. Dinkelaker B., Rohmheld V., Marschner H. Citric acid excretion and precipitation of calcium citrate in the rhizosphere of white lupin (*Lupinus albus* L.) // Plant Cell Environ. 1989. V. 12. P. 285 – 292.
15. Falandysz J., Ishihashi H., Dembowska A., Danisiewicz D. Comparison of three procedures of sample digestion for the determination of mercury in lichen // Bromatologia i Chemia Toksykol. 1998. V. 31, №2. P. 191 – 195.
16. Hauck M., Paul A., Gross Sh., Raubuch M. Manganese toxicity in epiphytic lichens: chlorophyll degradation and interaction with iron and phosphorus // Environmental and Experimental Botany. 2003. V. 49, №2. P. 181 – 191.
17. Infrared characteristic group frequencies. Tables and Charts / Ed. G. Socrates. London, 1994.
18. Jezierski A., Bylinska E., Seaward M.R.D. Electron paramagnetic resonance (EPR) investigations of lichens – 1: effects of air pollution // Atmospheric Environment. 1999. V. 33 №28. P. 4629 – 4635.
19. MacGillivray, T.; Helleur, R. Analysis of lichens under environmental stress using TMAH thermochemolysis-gas chromatography // Analytical and Applied Pyrolysis. 2001. V. 58 – 59. P. 465 – 480.
20. Marshner H., Rohmheld H. In vivo measurement of root-induced pH changes at the soil-root interface: effect of plant species and nitrogen source // Pflanzenphysiol. 1983. P. 241 – 251.
21. Neumann G., Massonneau A., Martinoia E., Rohmheld H. Physiological adaptations to phosphorus deficiency during proteoid root development in white lupin // Planta. 1999. V. 208, № 4. P. 373 – 382.
22. Raposo J.L., Re-Poppi N., Honda N. Evaluation of the concentration of some metal ions in different lichen species of the Sul-Mato-Grossense Cerrado // Departamento de Quimica, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande-MS, Brazil. Quimica Nova. 2007. V. 30, №3. P. 582 – 587.

23. Richardson D.H. S., Shore M., Hartree R., Richardson R.M. The use of X-ray fluorescence spectrometry for the analysis of plants, especially lichens, employed in biological monitoring // Science of The Total Environment. 1995. V. 176, №1 – 3. P. 97 – 105.

RESULTS OF PHYSICAL AND CHEMICAL ANALYSIS OF CHEMICAL CHANGES IN A THALLUS OF *HYPOGYMNA PHYSOIDES* (L.) NYL. UNDER THE INFLUENCE OF HEAVY METALS' SALTS

**A.F. Meisurova¹, E.I. Antonova¹, S.D. Khizhnyak¹,
V.A. Ryzhov², P.M. Pakhomov¹**

¹Tver State University

²Ioffe Physical Technical Institute, Russian Academy of Sciences

Analysis of chemical changes in lichen under the influence of heavy metals' salts HgSO₄, ZnSO₄, CdSO₄ has been carried out by various physical and chemical methods. It has been revealed, that data of X-Ray fluorescent and nuclear absorption spectroscopy is informative in evaluation of thallus metallization. Infra-red microscopy allows to determine chemical changes in thallus, related to the accumulation of SO₄²⁻ anions and appearance of sulphons.