

МЕЖДИСЦИПЛИНАРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 582.29:543.42

ХАРАКТЕР ВОЗДЕЙСТВИЯ АЗОТСОДЕРЖАЩИХ ПОЛЛЮТАНТОВ  
НА ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ *HYPOGYMNIA PHYSODES*\*

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

Тверской государственной университет

С помощью метода Фурье-ИК спектроскопии в лабораторных условиях исследовано воздействие азотной кислоты, гидроксида и хлорида аммония на лишайник *Hypogymnia physodes*. Установлено, что под воздействием азотной кислоты образуются алкилнитраты. Этот процесс сопровождается изменением окраски слоевища. В отличие от азотной кислоты аммонийные соединения приводят к деструкции слоевища.

Ключевые слова: эпифитные лишайники, биоиндикация, поллютант, азотная кислота, аммоний, кислотные осадки, эмиссии аммиака, спектроскопия.

**Введение.** Эпифитные лишайники поглощают различные поллютанты, в том числе некоторые азотсодержащие соединения. В связи с чем лишайники используют в качестве эффективных биоиндикаторов азотного загрязнения. Например, в сельскохозяйственных районах Италии, специализирующихся на животноводстве, с помощью эпифитных лишайников, удалось выявить два очага эмиссий аммиака ( $\text{NH}_3$ ) [14]. Французские ученые, используя два эпифитных лишайника (нитрофильный вид – *Physcia adscendens* (Fr.) H. Oliver и ацидофильный – *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl.), выявили положительную корреляцию между концентрацией азота в лишайниках и плотностью движения автотранспорта в городской среде [11]. Однако переменная валентность азота определяет достаточно широкий спектр азотсодержащих соединений в воздухе ( $\text{NO}$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{NH}_3$  и т.д.). Они отличаются по физико-химическим свойствам, взаимодействуют с разными компонентами окружающей среды, различаются по характеру воздействия на лишайники, обладают разной степенью токсичности. Например, диоксид азота ( $\text{NO}_2$ ) при определенной влажности воздуха вступает в реакцию с водой, образуя более опасные экотоксиканты – азотистую ( $\text{HNO}_2$ ) и азотную кислоты ( $\text{HNO}_3$ ) приводят к выпадению кислотных осадков [2]. К ним особенно чувствительны эпифитные лишайники. Туманы, содержащие выбросы аммиака ( $\text{NH}_3$ ), обуславливают образование гидроксида аммония ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ). Такие осадки имеют щелочную реакцию. В этой связи актуально изучение характера влияния некоторых азотсодержащих соединений на лишайники.

Цель работы – изучение характера воздействия  $\text{HNO}_3$ , водных

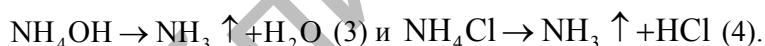
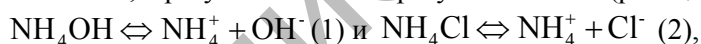
\* Работа выполнена при поддержке Гранта Президента РФ № 02.120.11.1385-МК от 28.06.2010.

растворов  $\text{NH}_4\text{OH}$  и  $\text{NH}_4\text{Cl}$  на лишайник *H. physodes* методом Фурье-ИК спектроскопии. Выбор поллютантов обусловлен тем, что большинство газообразных экотоксикантов ( $\text{NO}$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{NH}_3$ ) попадают на поверхность слоевища лишайников преимущественно в жидком и растворенном состоянии (с туманом, росой, дождями). При этом осадки имеют кислую или щелочную реакцию.

**Материал и методика.** Объектом исследования были образцы индифферентного вида лишайника *H. physodes*. Материал собран в фоновой (относительно чистой экологической зоне), в окрестностях дер. Ферязкино (Калининский р-н Тверской обл.) [8]. Образцы снимали со стволов деревьев острым скальпелем вместе с тонким слоем субстрата, не нарушая целостности коры.

В лабораторных условиях влажные образцы из фоновой зоны (1 – 12) помещали в эксикаторы над парами азотсодержащих соединений (табл. 1). Образцы 1 – 5 прикрепляли к внутренней поверхности крышки эксикатора объемом 1 л, содержащего 40 мл  $\text{HNO}_3$  различной концентрации. Эксперимент проводили при комнатной температуре (22 – 25°C). Время экспозиции составило 10 дней.

Аналогичным образом проводили эксперименты с водными растворами  $\text{NH}_4\text{OH}$  и  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (табл. 1). Влажные образцы *H. physodes* (6 – 12) из фоновой зоны помещали в эксикаторы, содержащие 40 мл  $\text{NH}_4\text{OH}$  и  $\text{NH}_4\text{Cl}$  различных концентраций. В водных растворах  $\text{NH}_4\text{OH}$  и  $\text{NH}_4\text{Cl}$  диссоциируют согласно схемам 1 и 2, в результате чего образуется аммиак (реакции 3, 4):



В течение 10-ти дней образцы 6 – 10 экспонировались в эксикаторах в парах равновесной смеси, где находились три компонента –  $\text{NH}_3$ ,  $\text{NH}_4^+$  и  $\text{OH}^-$ , образцы 11 – 12 –  $\text{NH}_3$ ,  $\text{NH}_4^+$  и  $\text{Cl}^-$ .

Для контроля образец из фоновой зоны выдержали в пустом герметично закрытом эксикаторе при тех же условиях, что и образцы 1 – 12. При этом видимых изменений слоевища по истечении 10 дней экспонирования не наблюдалось.

Таблица 1

Схема проведения эксперимента

№ образца	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Поллютант	$\text{HNO}_3$					$\text{NH}_4\text{OH}$					$\text{NH}_4\text{Cl}$	
Концентрация, %	3,0	6,0	9,0	12,0	15,0	0,1	0,5	1,0	3,0	5,0	10,0	20,0

Для записи ИК спектров образцов 1 – 12 использовали стандартную методику приготовления таблетки с бромидом калия (KBr) [7]. ИК спектры образцов записывали на Фурье-ИК спектрометре «Equinox 55» фирмы Bruker.

Количественный спектральный анализ провели с помощью программы OPUS-NT, которая позволяет рассчитать оптическую плотность

анализируемой полосы ( $D_v$ ). С целью исключения влияния толщины таблетки на результаты расчетов, использовали отношение  $D_v/D_c$ , где  $D_c$  - оптическая плотность полосы стандарта. В качестве полосы стандарта выбрали полосу  $2925 \text{ см}^{-1}$ , которая характеризует валентные колебания  $\text{CH}_2$ -группы и является структурно-нечувствительной [3; 4; 13]. Отношение  $D_v/D_{2925}$  количественно характеризует изменение анализируемой полосы в процессе антропогенного воздействия.

При интерпретации ИК спектров образцов лишайника ориентировались на основные источники [5; 12] и результаты модельных экспериментов по изучению воздействия кислотных экотоксикантов на лишайник [4].

**Результаты и обсуждение.** При спектральном анализе образцов *H. physodes* (1 – 5), выдержанных в эксикаторе с  $\text{HNO}_3$ , обнаружены изменения в химическом составе лишайника, вызванные взаимодействием экотоксиканта с компонентами слоевища (рис. 1). Полосы в спектрах образцов *H. physodes* при  $1381 \text{ (} \nu_s \text{ (-O -NO}_2\text{))}$  и  $874, 779 \text{ см}^{-1}$  ( $\delta(\text{O-N-O})$ ) [4,12] свидетельствуют об образовании алкилнитратов.

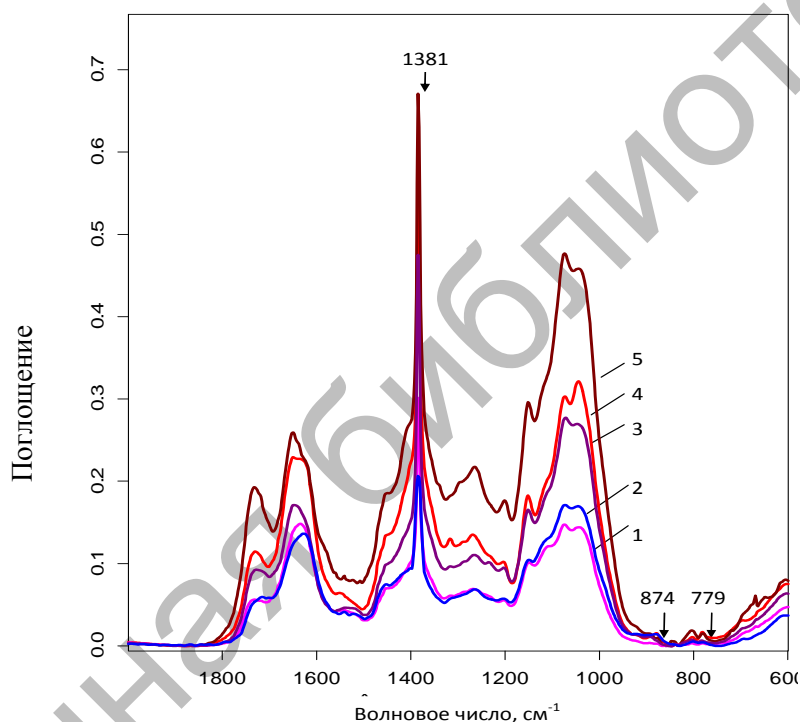
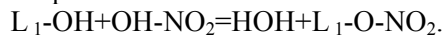


Рис. 1. ИК спектры образцов *Hypogymnia physodes*, выдержанных в парах  $\text{HNO}_3$  различной концентрации: 1 – 3%, 2 – 6%, 3 – 9%, 4 – 12%, 5 – 15 %

Образование алкилнитратов в слоевище лишайника, вероятнее всего, происходит в результате взаимодействия  $\text{HNO}_3$  со свободными гидроксильными группами лишайнана (L), который является основным компонентом грибных гиф:



Изменения в химическом составе лишайника сопряжены с изменениями окраски (от бледно зеленого до интенсивного желтого цвета), а также уплотнением корового слоя. Появление характерного желтого окрашивания слоевища является следствием прямого действия экотоксиканта, вызывающего изменение пигментного состава, соотношения хлорофилла а и b, каратиноидов [9], денатурацию белка. Известно, что для белков существует ряд качественных реакций на различные кислоты – при воздействии  $\text{HNO}_3$  появляется характерное желтое окрашивание [6]. Изменения плотности корового слоя – адаптивная реакция, позволяющая уменьшить токсичность воздействия стрессора, снизить уровень поступления поллютанта в клетки [9].

По мере повышения концентрации  $\text{HNO}_3$  в эксикаторах величина  $D_{1381}/D_{2925}$  в образцах 1 – 5 увеличивается (табл. 2) Кроме того, количественный анализ показал, что к действию паров кислоты чувствительным оказывается белковый компонент образцов *H. physodes* ( $1654 \text{ см}^{-1}$  – Амид I,  $\nu \text{ C=O}$ ;  $1266 \text{ см}^{-1}$  – Амид III,  $\delta \text{ N-H}$ ). Значение отношений  $D_{1654}/D_{2925}$  и  $D_{1266}/D_{2925}$  в ИК спектрах образцов 1 – 5 увеличивается от 0,65 до 1,68 и от 0,41 до 0,74 соответственно. В ИК спектрах образцов 4 – 5 появляется слабое поглощение с максимумом  $1542 \text{ см}^{-1}$  (Амид II,  $\nu \text{ O-C-N}$ ). Увеличение содержания белкового компонента может быть связано с усилением процессов его синтеза, в котором может участвовать экзогенный азот.

В отличие от действия паров  $\text{HNO}_3$ , влияние паров  $\text{NH}_4\text{OH}$  и  $\text{NH}_4\text{Cl}$  не вызвало серьезных изменений химического состава слоевища (рис. 2а). В ИК спектрах образцов 6 – 10 не обнаружены полосы, связанные с поглощением ионов  $\text{NH}_4^+$  в области  $3300 - 3030 \text{ (}\nu_s \text{ NH}_4^+)$ ,  $1430 - 1390 \text{ см}^{-1}$  ( $\delta \text{ N-H}$ ) [12]. Различия в спектрах сводятся к сглаживанию отдельных пиков – на частоте  $1725 \text{ см}^{-1}$  ( $\nu \text{ C=O}$  в жирах), или изменению интенсивностей полос поглощения ответственных за общий состав.

Количественный спектральный анализ образцов 6 – 10 показал изменения в содержании белкового компонента. Величины отношений  $D_{1654}/D_{2925}$  и  $D_{1266}/D_{2925}$  в ИК спектрах образцов 6 – 10 по сравнению с контрольным образцом уменьшились. Причем снижение содержания белкового компонента прямо пропорционально повышению концентрации  $\text{NH}_4^+$  в эксикаторах (табл. 2). Воздействие аммония, который является конечным продуктом реакции, вызывает репрессию синтеза белковых компонентов ферментного комплекса нитрогеназы [9], замедляя скорость азотфиксации. Незначительные различия в химическом составе образцов 6 – 10, испытавших воздействие аммония, сопряжены с явными внешними поверхностями слоевища. При высоких концентрациях поллютанта окраска слоевища становилась бурой. При низких концентрациях на 10-й день экспонирования слоевище приобретало светло-розовую окраску. Кроме того, повреждалась поверхность верхнего корового слоя – трещины, разрывы и т.д.

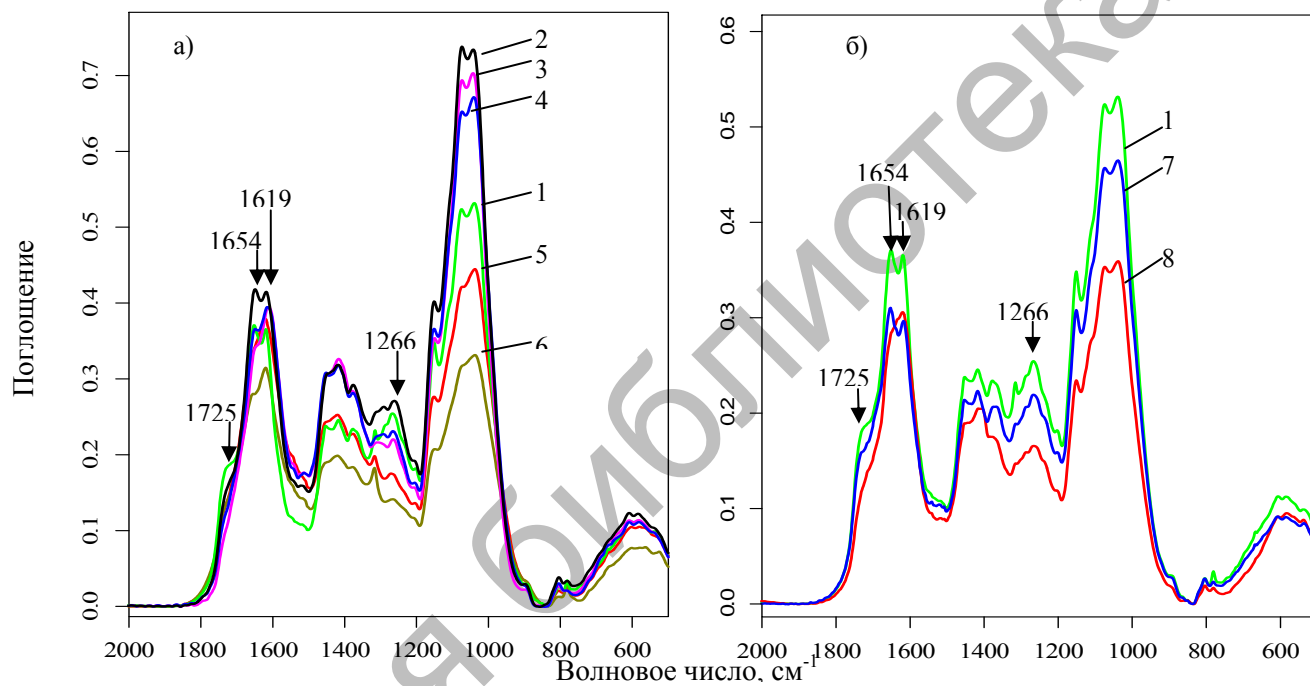


Рис. 2. ИК спектры образцов *Hurogymnia physodes* из фоновой зоны (1) и испытавших воздействие паров  $\text{NH}_4\text{OH}$  (а) и  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (б) различной концентрации: 2 – 0,1%; 3 – 0,5%; 4 – 1,0; 5 – 3%; 6 – 5 %; 7 – 10%; 8 – 20 %

Реакция на воздействие хлорида аммония оказалась менее выраженной. Сравнение ИК спектров образцов 11 – 12 с контрольным не выявило никаких изменений в химическом составе, в том числе и в количественном содержании белка. Несмотря на отсутствие изменений в ИК спектрах образцов 1 – 12 к 10-му дню экспонирования, под действием паров  $\text{NH}_4\text{Cl}$  произошло изменение окраски слоевища – от серо-зеленого до светло-розового цвета по краям лопастей. Не обнаружены разрывы корового слоя.

Таблица 2  
Значение отношений  $D_v / D_{2925}$  ИК спектров образцов *Hypogymnia physodes*

$\nu, \text{cm}^{-1}$	№ образца											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1654	1,09	1,13	1,51	1,64	1,52	0,98	0,96	0,92	0,87	0,82	0,96	0,97
1542	-	-	-	0,22	0,47	-	-	-	-	-	-	-
1381	2,65	3,00	3,20	3,52	3,96	-	-	-	-	-	-	-
1266	0,71	0,76	0,79	0,83	0,87	0,69	0,65	0,61	0,56	0,48	0,69	0,68
884	-	0,06	-	0,04	-	-	-	-	-	-	-	-
879	0,06	0,06	0,10	0,11	0,10	-	-	-	-	-	-	-

**Заключение.** С помощью метода Фурье-ИК спектроскопии удалось выявить некоторые особенности воздействия азотсодержащих поллютантов на слоевище индифферентного вида – *H. physodes*. Азотная кислота, образующаяся при загрязнении атмосферы в результате взаимодействия  $\text{NO}_2$  во влажном воздухе с водой, быстро адсорбируется слоевищем лишайника, с образованием алкилнитратов. Низкие концентрации кислоты оказываются в некоторой степени полезными. Экзогенный азот может участвовать в процессах синтеза белка. Высокие концентрации токсиканта вызывают химическую деструкцию слоевища. Увеличение содержания алкилнитратов в слоевище сопровождается изменениями пигментного состава, которые сопряжены с появлением характерного желтого окрашивания. В дальнейшем этот внешний признак можно использовать при экспресс-диагностике присутствия в атмосфере азотной кислоты.

Несмотря на то, что в литературе отмечен факт использования лишайником аммония ( $\text{NH}_4^+$ ) [1], спектроскопические исследования характера влияния  $\text{NH}_4\text{OH}$  и  $\text{NH}_4\text{Cl}$  данных концентраций на лишайник методом Фурье-ИК спектроскопии не выявили химических изменений, связанных с поглощением экотоксиканта. Не происходит внеклеточного, связанного с компонентами клеточных стенок, и внутриклеточного поглощения поллютанта. Возможной причиной является отсутствие так называемых «точек адсорбции», которыми являются кислородные и кислородо-азотные доноры [1]. В этой связи в дальнейшем интересно исследовать характер воздействия углекислого аммония ( $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ ), образующегося при разложении богатых мочевиной

продуктов животного происхождения или нитратного удобрения – аммиачной селитры  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . По-видимому, данные соединения будут адсорбироваться слоевищем, оказывать значительные изменения в химическом составе лишайников. Дополнительные исследования с использованием Фурье-ИК спектроскопии позволят выявить специфику кислородсодержащих аммонийных соединений.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бязров Л.Г. Лишайники – индикаторы радиоактивного загрязнения. М., 2005.
2. Гольдовская Л.Ф. Химия окружающей среды: Учебник для вузов. М., 2005.
3. Мейсунова А.Ф. Оценка токсичного действия диоксида серы на химический состав *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. // Вестн. ТвГУ. Сер. Биология и экология. 2007. Вып. 5, №21(49). С. 68 – 75.
4. Мейсунова А.Ф., Хижняк С.Д., Пахомов П.М. Спектроскопическое изучения воздействия окислов азота на слоевище лишайника *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. // Экологическая химия. 2007. Т. 16. Вып. 4. С. 27–35.
5. Наканиси К. Инфракрасные спектры и строение органических соединений. М., 1965.
6. Пособие по химии для поступающих в вузы / М.А.Володина, О.Г. Немкова, Л.П. Решетникова. М., 1971.
7. Смит А. Прикладная ИК спектроскопия. М., 1982.
8. Уразбахтина А.Ф., Катаускайте Л.А. Некоторые итоги лишеноиндикационного анализа рекреационных зон г. Твери // Ботанические исследования в Тверском регионе. Тверь, 2003. С. 130 – 136.
9. Шатило И.А. Физиолого-биохимические изменения у лишайников под влиянием атмосферного загрязнения // Успехи соврем. биологии. 1996. Т. 116, №2. С. 158 – 171.
10. Экология города. М., 2004.
11. Gombert S., Asta J., Seaward M.R.D. Correlation between the nitrogen concentration of two epiphytic lichens and the traffic density in an urban area // Environ. pollution. 2003. V. 123, №2. P. 281 –290.
12. Infrared characteristic group frequencies: Tables and Charts / Ed. G. Socrates. London, 1994.
13. Meisurova A.F., Khizhnyak S.D., Pakhomov P.M. IR spectral analysis of the chemical composition of the lichen *Hypogymnia physodes* to assess atmospheric pollution // J. of Applied Spectroscopy. 2009. V. 76, is. 3. P. 420 – 426.
14. Ruisi L., Zucconi L., Fornasier F., Paoli L., Frati L, Loppi S. Mapping environmental effects of agriculture with epiphytic lichens // Israel J. of Plant Sciences. 2005. V. 53, №2. P. 115 – -124.

**EFFECT OF NITROGEN CONTAINING POLLUTANTS  
ON CHEMICAL COMPOSITION OF *HYPOGYMNA PHYSODES***

**A.F. Meysurova, S.D. Khizhnyak, P.M. Pakhomov**

Tver State University

*Interaction of nitric acid, ammonium hydroxide and nitrate with Hypogymnia physodes (L.) Nyl. lichen in laboratory conditions is studied by help of IR spectroscopy. It is established that nitric acid affects the lichen thallus forming alkyl nitrates. This process is accompanied by morphological changes, in particular, by transition of the lichen's color. Unlike nitric acid, ammonium compounds cause essential damages of the thallus that can be connected with the destruction processes.*

*Key words: Epiphytic lichens, bioindication, pollutant, nitric acid, ammonium, acidic rains, emission of ammonia, spectroscopy.*