

МЕЖДИСЦИПЛИНАРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 574.2: 582.34 (470.331)

DOI: 10.26456/vtbio352

УСТОЙЧИВОСТЬ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА *NYHOLMIELLA* *OBTUSIFOLIA* К ВОЗДЕЙСТВИЮ ДИОКСИДА АЗОТА

А.А. Колонтаева¹, У.Н. Спирина^{1,2}

¹Тверской государственный университет, Тверь

²Главный Ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН, Москва

При помощи метода Фурье-ИК спектроскопии осуществлена оценка устойчивости химического состава эпифитного мха *Nyholmia obtusifolia*, который применяется для биоиндикации состояния атмосферного воздуха в городе Тверь, к воздействию диоксида азота в лабораторных условиях. Установлено, что модельный вид *in vitro* обладает высокой чувствительностью к данному поллютанту, что выражается в появлении химических и морфологических изменений во всех образцах. Проведён количественный анализ изменений в химическом составе экспериментальных образцов мха. Наибольшее количество алкилнитратов обнаружено в образцах *N. obtusifolia*, испытавших воздействие 16% азотной кислоты на протяжении 2 недель и 32% азотной кислоты на протяжении 1–2 недель. Пороговой концентрацией азотной кислоты для данного вида в условиях эксперимента является 32%. Проанализированы основные тенденции изменения состава белкового компонента под воздействием поллютанта. Наиболее подверженной изменениям в связи с накоплением экзогенного азота полосой, связанной с наличием белка в растительном материале, является полоса Амид III. Выявлено, что интенсивность полосы Амид II начинает возрастать вследствие влияния высоких концентраций азотной кислоты, в отличие от лишайников.

Ключевые слова: биоиндикация, брйоиндикация, *Nyholmia obtusifolia*, биотестирование, загрязнение воздуха, Фурье-ИК спектроскопия, диоксид азота.

Введение. Деятельность человека непрерывно оказывает трансформирующее влияние на естественные экосистемы и их отдельные компоненты. По этой причине, состояние атмосферного воздуха в связи с его загрязнением подлежит тщательному и регулярному мониторингу (Справка., 2023). На территории города Твери проводятся исследования, направленные на оптимизацию системы биоиндикации состояния атмосферного воздуха с помощью

эпифитных мхов, или бриоиндикации, которая имеет достаточно большой потенциал (Бревдо, Мейсунова, 2022; Мейсунова и др., 2022; Колонтаева, Спирина, 2023; Мейсунова, Бревдо, 2023). Доказано, что химический состав мха *Nyholmiella obtusifolia* (Brid.) Holmen et E. Warncke при произрастании на антропогенно-трансформированных территориях претерпевает изменения, связанные с накоплением диоксида азота (NO_2), который представляет собой одно из основных загрязняющих воздуха веществ в пределах Твери (Бревдо, Мейсунова, 2022; Справка..., 2023). В связи с этим целесообразно выяснить степень устойчивости модельного вида к данному поллютанту и выяснить особенности его аккумуляции растительным материалом в зависимости от концентрации и времени воздействия.

Цель исследования — оценить устойчивость химического состава растительного материала *Nyholmiella obtusifolia* (Brid.) Holmen et E. Warncke к воздействию диоксида азота.

Методика. Исследования проводились в летне-осенний период 2023 года в лаборатории ЦКП ФГБОУ ВПО «Тверской государственный университет». Отбор образцов эпифитного мха *N. obtusifolia* был произведен в фоновой зоне, расположенной в 60 км от города Твери (д. Ферязкино, Калининский район Тверской области), которая признана экологически чистой (Мейсунова и др., 2011).

Следующим этапом был модельный эксперимент *in vitro* по воздействию азотной кислоты (HNO_3) на химический состав и состояние побегов *N. obtusifolia*. Выбор используемого поллютанта обусловлен тем, что в естественных условиях во влажном воздухе NO_2 способен превращаться в аэрозоль азотной кислоты (Мейсунова и др., 2016). Эксперименты по моделированию атмосферного загрязнения *in vitro* проводились на основе ранее разработанной методики с использованием эпифитных лишайников (Мейсунова и др., 2011, 2016). Образцы при помощи двусторонней клейкой ленты прикреплялись к крышкам и стенкам эксикаторов объемом 0,5 л, после чего туда наливалось 20 мл HNO_3 в разных концентрациях (табл. 1, 2). Экспонирование происходило на протяжении 3 недель, при этом еженедельно часть образца изымалась из эксикаторов и высушивалась, а оставшаяся часть опрыскивалась водой из пульверизатора.

Впоследствии проводился Фурье-ИК спектральный анализ образцов *N. obtusifolia*, собранных в фоновой зоне, а также образцов, экспонированных в парах азотной кислоты, по стандартной методике (Мейсунова и др., 2011). За высушиванием побегов следовало изготовление из них таблеток с бромидом калия. Растительный материал *N. obtusifolia* массой от 0,0022 до 0,0025 г растирался в ступке. Затем в ступку добавлялись кристаллы KBr массой 0,32 г, которые так же измельчались вперемешку с уже растертым образцом

мха до состояния мелкодисперсного порошка, который спрессовывался в пресс-форме под давлением 4000 — 11000 кгс/см². Каждая таблетка изготавливалась повторно для достоверности результатов.

Таблица 1

Схема эксперимента по воздействию HNO₃

№ образца	С*, %	Объем реактивов	
		V** _{КК} , мл	Vводы, мл
1	2	0,61	19,39
2	4	1,23	18,77
3	8	2,46	17,54
4	16	4,92	15,08
5	32	9,85	10,15
6	65	20	0

Примечание: *С – концентрация поллютанта; **V_{КК} – объем концентрированной кислоты.

Таблица 2

Схема проведения эксперимента *in vitro*

№ образца	Концентрация HNO ₃ , %	Время экспонирования, нед.		
		1	2	3
1	2	+	+	+
2	4	+	+	+
3	8	+	+	+
4	16	+	+	+
5	32	+	+	–
6	65	–	–	–

Примечания: «+» — ИК-спектр образца зарегистрирован; «–» — ИК-спектр образца не зарегистрирован в связи с деструкцией побега

ИК-спектры образцов регистрировались в компьютерной программе FSpec на Фурье-ИК спектрометре ФМС-1202 фирмы Инфраспек в диапазоне 450 — 4000 см⁻¹, разрешение составляло 4 см⁻¹. При каждом измерении было осуществлено 35 сканов. Полученные ИК-спектры обрабатывались при помощи программы Origin 8 (OriginLab Corp.). Интерпретация осуществлялась в структурно-чувствительной области «отпечатков пальцев» (1800 — 500 см⁻¹). Учитывались результаты ИК-анализа лишайников и других видов мхов (Hu et al., 2011; Мейсунова и др., 2011, 2016; Колонтаева, Спирина, 2023).

При обработке спектров осуществлялся количественный анализ азотсодержащих веществ с помощью метода базовой линии (Ильичев и

др., 2010). Построение касательной и перпендикуляра к пику на анализируемой полосе поглощения и расчёт единиц поглощения (оптическая плотность, D_A) производились вручную в программе Origin 8. Для исключения влияния толщины образца на величину оптической плотности рассчитывалось отношение D_A / D_{2925} , так как в качестве полосы стандарта использовалась структурно-нечувствительная и, следовательно, неизменная полоса примерно на 2925 см^{-1} (валентные колебания CH_2 -групп) (Мейсурова и др., 2011).

Результаты и обсуждение. При расшифровке полученных ИК-спектров растительного материала было выявлено появление в образцах алкилнитратов (R-O-NO_2), что подтверждается наличием полос поглощения при $\sim 1385, 875\text{-}874 \text{ см}^{-1}$ после воздействия азотной кислоты во всех используемых концентрациях, а также при $\sim 780 \text{ см}^{-1}$ в результате влияния паров HNO_3 (32%) (рис. 1). Количественный анализ содержания алкилнитратов осуществлялся для полосы на частоте 1385 см^{-1} , так как она является основным показателем образования данных веществ в растительном материале (Мейсурова и др., 2016).

Наибольшее количество алкилнитратов зафиксировано в ИК-спектрах образцов модельного вида, выдержанных в эксикаторах с 16% HNO_3 в течение 2 недель ($D_{1385} / D_{2925} = 2,44$) и с 32% HNO_3 на протяжении 1 и 2 недель ($D_{1385} / D_{2925} = 2,69$ и $2,915$ соответственно) (табл. 3).

Таблица 3

Отношение D_{1385} / D_{2925}					
C_{HNO_3} , %	№ образца	Контроль	1 неделя	2 неделя	3 неделя
2	1	0,487	0,64	0,348	0,538
4	2		0,438	0,899	1,38
8	3		0,949	0,845	1,05
16	4		1,79	2,44	1,728
32	5		2,69	2,915	–

При сравнении ИК-спектров образцов наблюдается общая тенденция возрастания количества алкилнитратов в растительном материале модельного объекта соответственно повышению концентрации азотной кислоты. Значение D_{1385} / D_{2925} увеличивается пропорционально времени экспонирования только при воздействии паров HNO_3 (4%) (образец 2).

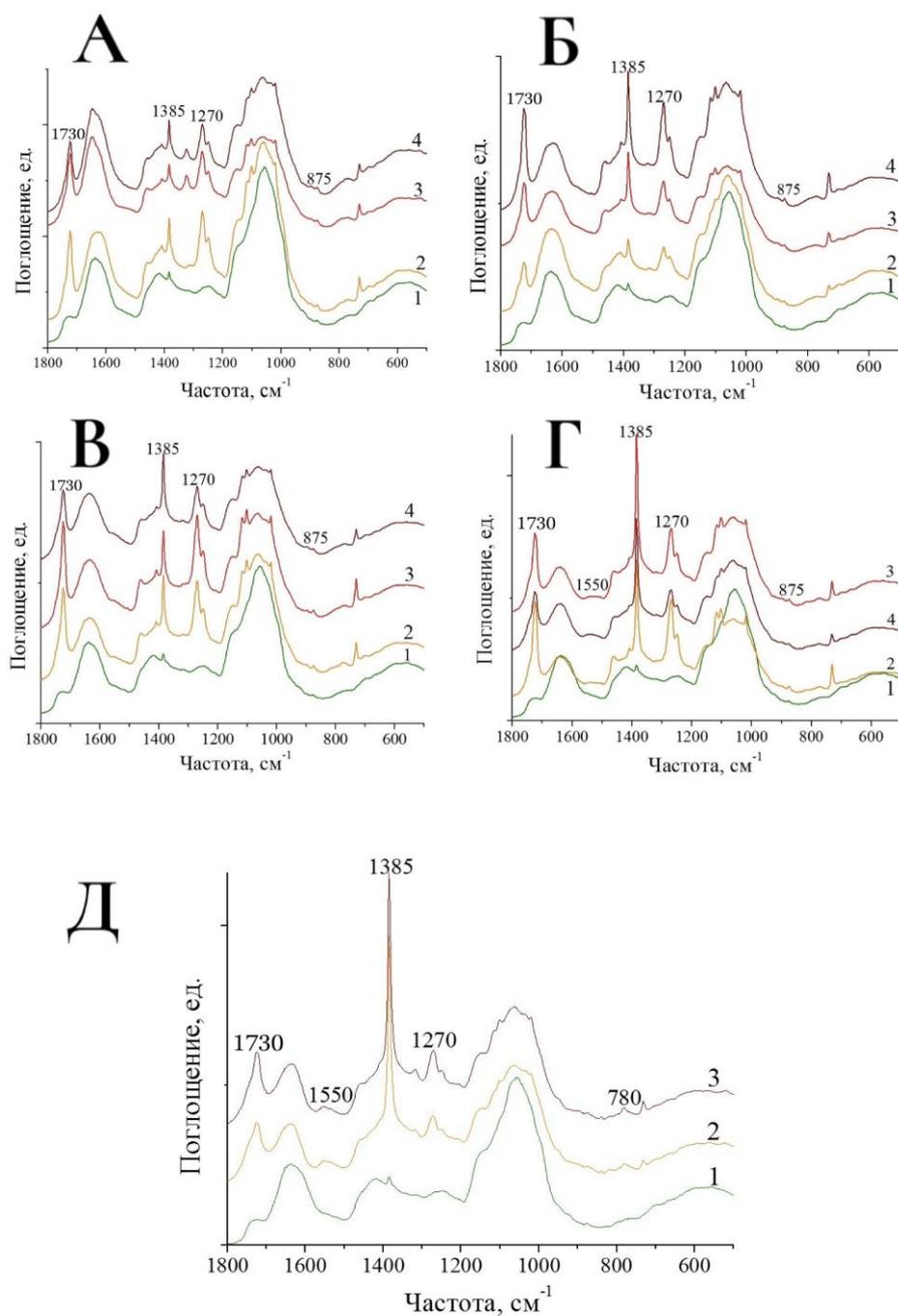


Рис. 1. ИК-спектры образцов *N. obtusifolia*:

А – после воздействия HNO₃ (2%), 4% (Б), 8% (В), 16% (Г), 32% (Д);
1 – контроль, 2 – спустя 1 неделю экспонирования, 2 недели (3), 3 недели (4)

В результате воздействия азотной кислоты в концентрациях 2 и 8% (образцы 1, 3) интенсивность полосы на 1385 см^{-1} снижается после 14 дней выдержки в парах поллютанта, а после снова восстанавливается, о чем свидетельствует увеличение значения D_{1385} / D_{2925} в ИК-спектрах образцов спустя 3 недели экспериментального воздействия. В образцах, экспонированных в парах 16% HNO_3 , обнаруживается рост количества алкилнитратов на 2 неделю по сравнению с 1 (образец 4), однако по истечении 3 недель значение достаточно сильно снижается (табл. 3).

Таблица 4

Отношение D_{1270} / D_{2925}					
C_{HNO_3} , %	№ образца	Контроль	1 неделя	2 неделя	3 неделя
2	1	0,429	0,92	0,656	0,608
4	2		0,487	0,627	1,089
8	3		1,014	1,204	0,679
16	4		1,243	0,81	0,67
32	5		0,456	0,6	–

Отмечается увеличение содержания белкового компонента в растительном материале (1270 см^{-1} — Амид III, $\nu\text{C-N}$; после воздействия HNO_3 (16 и 32%) – 1550 см^{-1} – Амид II, $\delta\text{N-H}$) (рис. 1). Наиболее чувствительной к воздействию экзогенного азота полосой, отвечающей за присутствие белка в химическом составе мха, оказывается полоса Амид III. Повышение её интенсивности наблюдается во всех спектрах образцов, подвергшихся воздействию поллютанта (табл. 4).

Значительные изменения в области поглощения 1730 см^{-1} ($\nu\text{C=O}$), вероятно, вызваны деструкцией тканей побегов.

Снижение количества алкилнитратов в химическом составе *N. obtusifolia* на 2 неделю воздействия азотной кислоты (2, 8%) и повышение его на 3 неделю воздействия (образцы 1, 3) может быть вызвано тем, что после 7 дней воздействия метаболизм мха, аналогично таковому у лишайника (Мейсунова и др., 2011), начинает адаптироваться к накоплению поллютанта. При этом запускается механизм детоксикации, однако при дальнейшей выдержке образцов в эксикаторах (после 2 недель) этот процесс прекращается, и аккумуляция производится беспрепятственно.

Предположительно, детоксикация начинается позднее у образцов, подвергшихся влиянию паров HNO_3 в более высокой концентрации (16%), на что указывает постепенное увеличение

значения D_{1385} / D_{2925} ко 2 неделе экспозиции и его уменьшение только спустя 3 недели.

Наиболее стабильная сорбция поллютанта происходит при его концентрации, равной 4%. Величины D_{1385} / D_{2925} и D_{1270} / D_{2925} возрастают пропорционально времени экспозиции (табл. 3, 4).

Небольшие концентрации диоксида азота, вероятно, могут оказывать благоприятный эффект на побеги мха, так как накопление экзогенного азота активизирует процесс синтеза белка (Мейсурова и др., 2011). Этим может быть обусловлено стимулирование, а затем снижение роста мхов вследствие превышения пороговой концентрации в результате экспериментального воздействия NO_2 в течение нескольких недель (Bell et al., 1992).

Пороговой концентрацией азотной кислоты для модельного вида в рамках эксперимента является, по-видимому, 32%, в отличие от лишайников, для которых это значение составляет 16% (Мейсурова и др., 2011). Количество алкилнитратов, накопленных в тканях мха при выдержке в парах HNO_3 (32%) на протяжении 7 дней (D_{1385} / D_{2925} — 2,69), превышает таковое после воздействия HNO_3 (16%) (D_{1385} / D_{2925} — 1,79), а пары азотной кислоты (65%) уже приводят к разрушению структуры побегов (рис. 2).

Интенсивность полосы Амид III (1270 см^{-1}) в спектрах образцов, выдержанных в парах 32% HNO_3 (D_{1270} / D_{2925} — 0,456) достаточно низкая по сравнению с таковой в образцах, испытавших влияние поллютанта в меньших концентрациях (табл. 4). Однако только после применения средних и высоких концентраций HNO_3 возрастает интенсивность полосы Амид II (1550 см^{-1}) (образцы 4, 5). В этом заключается отличие мхов от лишайников, при аналогичном эксперименте с которыми этот процесс происходит при влиянии низких и средних концентраций азотной кислоты (Мейсурова и др., 2011).

Изменения в химическом составе растительного материала в условиях *in vitro* сопровождаются морфологическими. Влияние паров HNO_3 (2%) способствует обесцвечиванию побегов на 2 неделю эксперимента. Пары 4%-й азотной кислоты вызывают обесцвечивание побегов на 2 неделю эксперимента и их последующее пожелтение спустя ещё 7 дней выдержки. При воздействии поллютанта в концентрациях 8, 16 и 32% происходит окраска побегов в жёлто-рыжий цвет.

Наиболее высокая концентрация азотной кислоты (65%) вызывает потерю окраски побегами уже к концу 1 недели экспонирования. Также они разрушаются и становятся склизкими, а спустя 14 дней уже превращаются в липкую массу. Побледнение

может быть следствием некроза хлоропластов, а жёлтая окраска проявляется при влиянии HNO_3 на белок (рис. 2) (Мейсурова и др., 2011).



Рис. 2. Внешний вид образцов *N. obtusifolia*:

А – контроль, Б – после 1 недели воздействия, 2 недель (В), 3 недель (Г);
1 – HNO_3 (2%), 4% (2), 8% (3), 16% (4), 32% (5), 65% (6)

Заключение. *Nyholmia obtusifolia* является достаточно восприимчивым к диоксиду азота видом, что подтверждается появлением изменений в химическом составе его образцов после воздействия азотной кислоты всех используемых концентраций. Интенсивность аккумуляционных процессов нестабильна, что может быть обусловлено особенностями обменных процессов. Количественное содержание алкилнитратов ($1385, 875, 780 \text{ см}^{-1}$) возрастает пропорционально времени экспонирования только при концентрации азотной кислоты, равной 4%. Самые высокие значения содержания алкилнитратов отмечены в ИК-спектрах образцов модельного вида, выдержанных в эксикаторах с 16%-й азотной кислотой на протяжении 2 недель и с 32%-й азотной кислотой на протяжении 1 и 2 недель. Предельной концентрацией азотной кислоты для *N. obtusifolia* в условиях данного эксперимента является 32%.

Полоса Амид III (1270 см^{-1}), в первую очередь подвергается изменениям, связанным с активизацией синтеза белка в результате поступления экзогенного азота. Пары высококонцентрированной азотной кислоты (16% и 32%) провоцируют появление полосы Амид II (1550 см^{-1}) в растительном материале мха, в отличие от лишайников. Воздействие паров азотной кислоты вызывает обесцвечивание побегов при низкой концентрации поллютанта (2%), а пожелтение и ослизнение – при более высоких.

Авторы выражают глубокую благодарность инженеру-лаборанту ЦКП «Лаборатория биотехнологических измерений» Тарасовой Екатерине Михайловне за помощь при проведении экспериментов и заведующей лабораторией спектроскопии ЦКП Хижняк Светлане Дмитриевне за помощь при ознакомлении с методикой количественного анализа ИК-спектров.

Список литературы

- Бревдо Е.Ю., Мейсунова А.Ф. 2022. Биоиндикационные возможности мха *Nyholmiella obtusifolia* при оценке состояния воздушной среды // Вестник ТвГУ. Серия «Биология и экология». № 3 (67). С. 145-156.
- Ильичев И.С., Лазарев М.А., Щепалов А.А. 2010. Основы физико-химического анализа продуктов нефтепереработки и нефтехимического синтеза. Электронный учебно-методический комплекс. Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет. 163 с.
- Колонтаева А.А., Спирина У.Н. 2023. Оценка биоиндикационных возможностей *Leskea polycarpa* Hedw. по отношению к атмосферным загрязнителям // Вестник ТвГУ. Серия «Биология и экология». №3(71). С. 111-126.
- Мейсунова А.Ф., Бревдо Е.Ю. 2023. Результаты моделирования воздействия кислотного загрязнения на фотосинтетический аппарат мха *Lewinskya speciosa* // Вестник ТвГУ. Серия «Биология и экология». №1. С. 276-286.
- Мейсунова А.Ф., Суворова А.А., Бревдо Е.Ю. 2022. Сравнительный анализ содержания фотосинтетических пигментов у некоторых видов мхов в рекреационных зонах города Твери // Вестник ТвГУ. Серия «Биология и экология». № 3(67). С. 157-169.
- Мейсунова А. Ф., Хижняк С. Д., Пахомов П. М. 2011. Оценка токсичного воздействия диоксидов азота и серы на химический состав *Nuroguttia physodes* (L.) Nyl. ИК-спектральный анализ // Сибирский экологический журнал. Т. 18. №. 2. С. 251-261.
- Мейсунова А.Ф., Хижняк С.Д., Пахомов П.М. 2016. Фурье-ИК спектральный анализ атмосферного загрязнения с использованием лишайников. Тверь: Твер. гос. ун-т. 155 с.
- Справка о состоянии окружающей среды в Тверской области в мае 2023 г. [Электронный ресурс]. 2023 // Тверской ЦГМС. Режим доступа:

- <http://www.tvermeteo.ru/labor/2023-05.pdf> (дата обращения: 26.11.2023)
- Bell S., Ashenden T.W., Rafarel C.R. 1992. Effects of rural roadside levels of nitrogen dioxide on *Polytrichum formosum* Hedw. Environmental Pollution. V. 76, Is. 1. P. 11-14.
- Hu T., Jin W.Y., Cheng C.G. 2011. Classification of five kinds of moss plants with the use of Fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics // Spectroscopy. 25. P. 271-285.
- Origin. Версия 8: программа. 2007 // OriginLab Corporation, Нортгемптон, Лицензия: пробная версия. Режим доступа: <https://www.originlab.com/>

THE RESISTANCE OF THE CHEMICAL COMPOSITION OF *NYHOLMIELLA OBTUSIFOLIA* TO THE INFLUENCE OF NITROGEN DIOXIDE

A.A. Kolontaeva¹, U.N. Spirina^{1,2}

¹Tver State University, Tver

²Tsitsin Main Botanical Garden, Russian Academy of Sciences, Moscow

Using the Fourier-infrared spectroscopy method, we assessed the stability of the chemical composition of the epiphytic moss *Nyholmiella obtusifolia in vitro* to the influence of nitrogen dioxide. The epiphytic moss *N. obtusifolia* is used as bioindicator of the atmospheric air in Tver. It was found that *N. obtusifolia* has a high sensitivity to nitrogen dioxide, which is expressed in chemical and morphological changes in all samples. Quantitative analysis of changes in the chemical composition of experimental moss samples showed that the largest amount of alkyl nitrates was found in samples exposed to 16% and 32% nitric acid. The threshold concentration of nitric acid for *N. obtusifolia* under experimental conditions was determined to be 32%, which is consistent with previous studies. The main trends of changes in the protein composition under the influence of nitrogen dioxide were analyzed. These results can be used to better understand the impact of air pollution on this species and other epiphytic plants in urban areas. The band most susceptible to changes due to the accumulation of exogenous nitrogen associated with the presence of protein in plant material is the Amide III band. It was revealed that the intensity of the Amide II band begins to increase under the influence of high concentrations of nitric acid, in contrast to lichens. **Keywords:** bioindication, bryoindication, *Nyholmiella obtusifolia*, biotesting, air pollution, Fourier-IR spectroscopy, nitrogen dioxide.

Об авторах:

КОЛОНТАЕВА Анна Аделиновна – магистрант направления 06.04.01 Биология (профиль Экология), ФГБОУ ВО «Тверской государственный университет», 170100, Тверь, ул. Желябова, д. 33, e-mail: annakolontaeva00.com@gmail.com.

СПИРИНА Ульяна Николаевна – кандидат биологических наук, доцент кафедры ботаники, ФГБОУ ВО «Тверской государственный университет», старший научный сотрудник лаборатории Гербарий ГБС РАН, 170100, Тверь, ул. Желябова, д. 33, e-mail: Spirina.UN@tversu.ru.

Колонтаева А.А. Устойчивость химического состава *Nyholmiella obtusifolia* к воздействию диоксида азота / А.А. Колонтаева, У.Н. Спирина // Вестн. ТвГУ. Сер. Биология и экология. 2024. № 1(73). С. 189-199.

Дата поступления рукописи в редакцию: 22.10.23

Дата подписания рукописи в печать: 01.03.24