

МЕЖДИСЦИПЛИНАРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 582.29:543.42

АНАЛИЗ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА ЛИШАЙНИКОВ МЕТОДОМ ФУРЬЕ-ИК СПЕКТРОСКОПИИ: ВОЗМОЖНОСТИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ *

А.Ф. Мейсунова

Тверской государственный университет, Тверь

С использованием Фурье-ИК спектрального анализа слоевищ лишайников из фоновой зоны идентифицированы функциональные группы лишайника – структурного компонента клеточных оболочек. Выявлены основные функциональные группы, относящиеся к белкам, жирам, простым редуцированным сахарам. Определены возможности и перспективы использования метода Фурье-ИК спектроскопии при анализе химического состава лишайников.

Ключевые слова: Фурье-ИК спектроскопия; индикаторные виды; химический состав лишайников; эпифитный лишайник; лишайник; белки; жиры, гемицеллюлоза.

Введение. Эпифитные лишайники являются удобным модельным объектом для оценки состояния окружающей среды. Они чутко реагируют на химическое загрязнение воздуха. При этом возможны преобразования на морфологическом уровне, а в результате поглощения экотоксикантов изменяется химический состав слоевища. В этой связи при индикации загрязнения атмосферы нередко изучают химический состав лишайников [6; 15]. Методы исследования динамики изменения химического состава лишайников различны и во многом зависят от химической природы накапливаемых слоевищем экотоксикантов [8].

Особого внимания заслуживают ИК спектральный анализ химического состава лишайников. Работы по этой проблеме стали появляться с середины XX в. [30]. Серия статей опубликована учеными из Бредфордского университета M.R.D. Seaward, H.G.M. Edwards и их учениками. С помощью метода Фурье-ИК Раман спектроскопии ими изучена динамика пигментного состава лишайников под воздействием ультрафиолетового излучения [19], проведен анализ лишайниковых кислот [20]. Есть работы по определению оксалата кальция ($\text{Ca}_2\text{C}_2\text{O}_4$)

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

[18; 21] и гипса ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) [28] в слоевищах лишайников методом Фурье-ИК Раман спектроскопией. При идентификации в воздухе аэрозолей HNO_3 , H_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 использован метод Фурье-ИК спектроскопии [6; 7; 24; 25]. Он близок к Фурье-ИК Раман спектроскопии и отличается методикой пробоподготовки образцов к анализу.

Лишайники имеют сложный химический состав. Около 80% сухого вещества слоевища составляют углеводы, близкие по составу к целлюлозе, среди которых особую роль играет лишенин [1]. В незначительном количестве присутствуют простые редуцированные сахара, жиры, белки, ферменты и витамины, зольные вещества, лишайниковые вещества. Из-за сложности химического состава, при изучении воздействия поллютантов на лишайники методом Фурье-ИК спектроскопии возникают проблемы, связанные с интерпретацией спектров. В спектрах выявляются многочисленные полосы поглощения, относящиеся к разным химическим компонентам. Иногда полосы перекрываются. В результате этого трудно соотнести сходные функциональные группы с определенными химическими компонентами. Все это осложняет изучение механизмов взаимодействия экотоксикантов с компонентами слоевищ лишайников.

Цель работы – определение возможностей и перспектив использования метода Фурье-ИК спектроскопии при исследовании общего химического состава лишайников.

Материал и методика. Изучены 4 индикаторных вида лишайников, которые широко распространены в урболихенофлорах: *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl., *Parmelia sulcata* Taylor, *Evernia mesomorpha* Nyl., *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. Образцы лишайников (1–4) были собраны в зоне с наименьшим уровнем загрязнения атмосферы (окрестности дер. Большие Борки Калининский р-н Тверской обл.). Слоевище снимали со стволов деревьев острым скальпелем вместе с тонким слоем субстрата, не нарушая целостности коры деревьев. Для записи ИК спектров прессовали таблетки исследуемых образцов (24 мг) с бромидом калия (0,7 г) по стандартной методике [13]. Спектры регистрировали на Фурье-ИК спектрометре «Equinox 55» фирмы «Bruker» в диапазоне $400\text{--}4000\text{ см}^{-1}$, разрешение составляло 4 см^{-1} , количество сканов – 32.

Результаты и обсуждение. ИК спектры индикаторных видов лишайников (1–4) представляют совокупность полос поглощения отдельных его компонентов, а также полосы, характеризующие существующие связи между макромолекулами (рисунок) [9]. В первую очередь, с помощью метода Фурье-ИК спектроскопии идентифицируются функциональные группы основного компонента лишайников – высокополимерного углевода лишенина $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$, который является характерной составной частью клеточных оболочек

гиф микобионта. Его содержание в слоевище может достигать 80% от сухой массы (табл. 1). Макромолекула лишенина построена из глюкозидных остатков $C_6H_{10}O_5$, соединенных между собой ацетальной (гликозидной) связью в положении $\beta(1\rightarrow3)(1\rightarrow4)$, в соотношении 3:1 [1].

Таблица 1
Общий химический состав слоевища лишайников

Компоненты	Количество, %	Источник
Углеводы: полисахариды: – из мономеров глюкозы (лихенин, изолихенан, пустулан и др.) – из мономеров галактозы, манозы, глюкозы (подобны гемицеллюлозе) простые редуцированные сахара: – моно- и дисахариды (глюкоза, маноза, галактоза, фруктоза, арабиноза, ксилозы, рибозы, сахарозы и трегалозы) – многоатомные спирты и сахароспирты (маннит, арабит, рибит, волемит, эритрит и сорбит)	≈80 3–4 0,3–1,9 зависит от сезона	[1; 3; 4; 10; 23]
Белки: с аминокислотами аланин, аспарагиновая кислота, глютаминовая кислота, лизин, валин, тирозин, триптофан и др.	3	[10; 14; 16; 17]
Жиры	1–2	[10; 14]
Ферменты: инвертаза, каталаза, уреазы, зимазы, лишениназа и др.	0,5–1	[3]
Лишайниковые вещества: атранорин, вульпининовая, алекторовая, леканоровая, эверновская, барбатовая усниновая и др. кислоты	0,1–2,0 реже 2–36 зависит от сезона,	[1; 10; 11; 12; 14; 16; 17]
Зольные вещества: Si, S, P, Na, Cl, Al, Ba, Ca, Cu, Cr, Fe, K, Mg, Mn, Na, Sn, Ti, Zr. Ag, Ni, Pb, Va и др.	1–2 иногда до 10–16	[2; 3; 5; 10]
Витамины: аскорбиновая кислота (C), биотин (H) кобаламин (B ₁₂), никотиновая кислота (B ₅ или PP) и др.	0,3–1	[14]
Хитин	0,5–1	[14]

В ИК спектрах лишайников лишенин определяется в первую очередь по полосам поглощения, связанными с тремя гидроксильными группами, находящимися в составе каждого глюкопиранозного кольца (первичная – у 6-го атома углерода и две вторичных – у 2- и 3-го атомов углерода). Водородные связи между глюкопиранозными кольцами, образованные кислородными атомами глюкозидных звеньев и

кислородными мостиками, обуславливают сильное расширение полос поглощения [9]. Ниже приведены комментарии по другим частям ИК спектров образцов индикаторных видов. Выявлены следующие области.

Валентные колебания ОН-групп. В ИК области спектров 3600–3100 см^{-1} индикаторных видов лишайников (1–4) проявляются $\nu(\text{OH})$ [9; 22] (рисунок, табл. 2). В ИК спектре образца 1 выявлена полоса при 3419, 2 – 3374, 3 – 3388 и 4 – 3381 см^{-1} (рисунок).

Валентные колебания С-Н-связей. В диапазоне 3000–2800 см^{-1} для образцов 1–4 обнаружены две полосы поглощения, характеризующиеся $\nu_{\text{ас}}(\text{CH}_2)$ и $\nu_{\text{с}}(\text{CH}_3)$ [9; 19]. В спектре образца 1 это полосы при 2926 и 2855, 2 – 2925 и 2855, 3 – 2926 и 2865, 4 – 2923 и 2854 см^{-1} .

Область 1800–1400 см^{-1} . Эту область называют областью «отпечатков пальцев». Она характеризует различные колебания С–Н-, С–О- и О–Н-связей, колебания гликозидной связи и глюкопиранозного кольца лишайника для индикаторных видов лишайников. По данным литературы [9] полосы при 1620 (1), 1624 (2), 1618 (3) и 1628 см^{-1} (4) могут быть вызваны поглощением адсорбированной воды. Полосы 1417 (1), 1434 (2), 1425 (3) и 1418 (4) см^{-1} отвечают за плоскостные колебания $\delta(\text{OH})$. Результаты модельных экспериментов по воздействию HNO_3 на лишайники [7; 25] позволяют отнести полосу при $\sim 1375 \text{ см}^{-1}$ к $\delta(\text{OH})$, в то время как некоторые авторы [21] связывают эту полосу с $\delta(\text{CH}_2)$. Полосы поглощения при 1315 (1), 1323 (2), 1318 (3) и 1319 см^{-1} (4) в ИК спектрах лишайников характеризуют веерные $\delta(\text{CH}_2)$ [9; 19; 22]. В ИК спектрах образцов 1–4 полосы при $\sim 1074 \text{ см}^{-1}$, вызваны колебаниями моста С–О–С глюкопиранозного кольца, а полосы при $\sim 1039 \text{ см}^{-1}$ соотносят с колебаниями $\nu\text{C–O}$ -связи в первичной спиртовой группе [9; 22; 27].

Область 860–400 см^{-1} В ИК спектрах образцов (1–4) наблюдается широкое размытое поглощение, на фоне которого проявляется ряд слабых полос поглощения, относящихся к колебаниям глюкопиранозного кольца и $\delta(\text{OH})$. Колебания глюкопиранозного кольца, связанного с маятниковыми колебаниями СН- и CH_2 - групп обнаружены в ИК спектре образца 1 при 802 см^{-1} , 2 – 799, 3 – 842 и 4 – 774. Полоса при 606 см^{-1} вызвана $\delta(\text{ССO})$ глюкопиранозного кольца [19]. Внеплоскостные $\delta(\text{OH})$ обнаружены в ИК спектрах образцов 1–2 проявляются около 780 см^{-1} , 3 – 801, 4 – 760, а также полосы при 583(± 10) см^{-1} в спектрах образцов 2–4.

При интерпретации полос поглощения в диапазоне 1800–400 см^{-1} могут возникать трудности. Появляются полосы поглощения функциональных групп других компонентов, которые часто перекрываются. Сложно отнести полосы поглощения сходных функциональных групп с определенным химическим компонентом слоевища, что приводит к противоречивым описаниям спектров. Такие ситуации связаны с компонентами низкого уровня содержания.

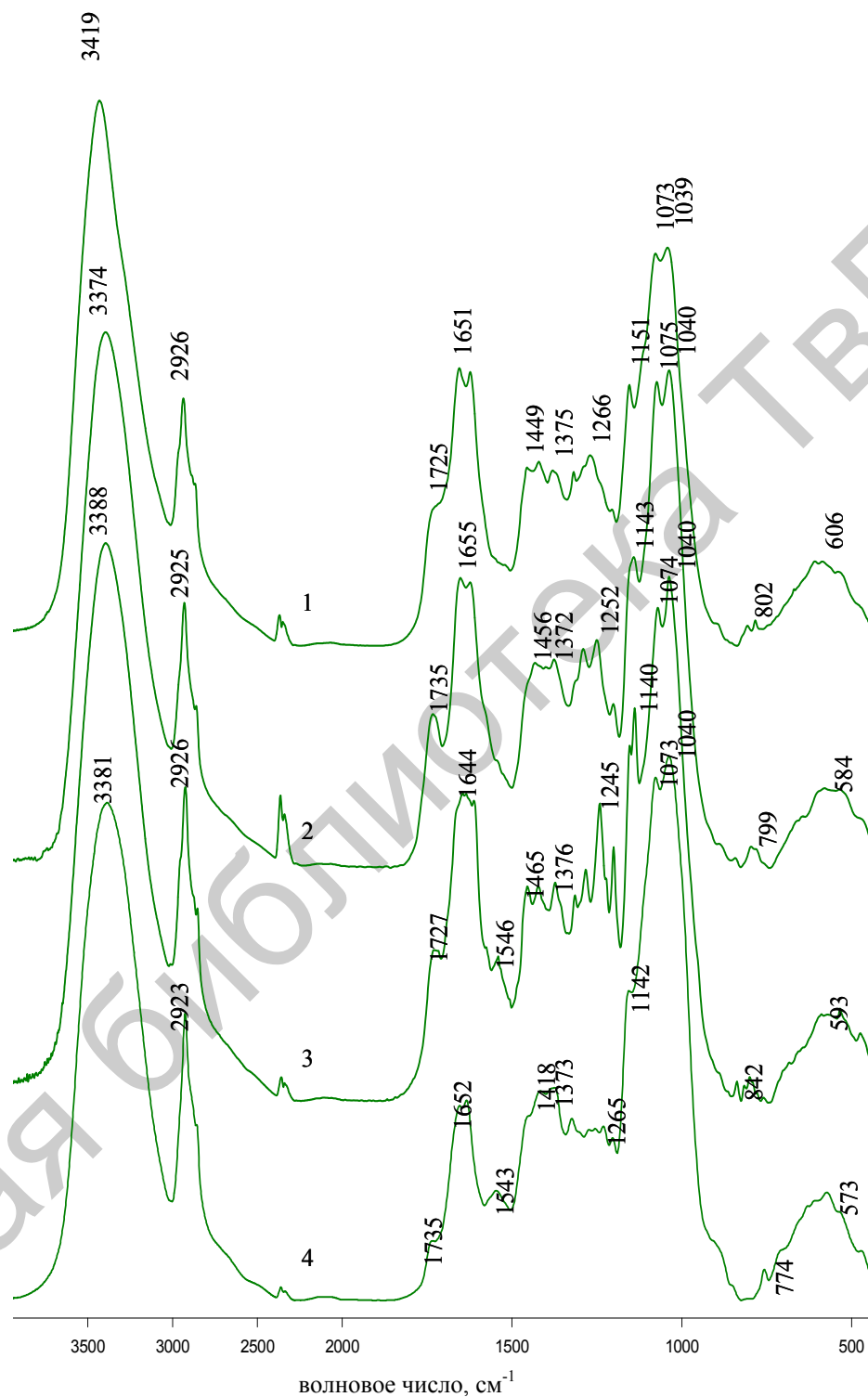


Рисунок. ИК спектры образцов индикаторных видов лишайников:
1 – *Hypogymnia physodes*, 2 – *Parmelia sulcata*,
3 – *Evernia mesomorpha*, 4 – *Xanthoria parietina*

Таблица 2

Полосы поглощения в ИК спектрах образцов лишайников

Положение полосы, см ⁻¹				Отнесение полосы поглощения	Источник
<i>Hypogymnia physodes</i>	<i>Parmelia sulcata</i>	<i>Evernia mesomorpha</i>	<i>Xanthoria parietina</i>		
3419	3374	3388	3381	$\nu(\text{OH})$	[9; 22]
2926	2925	2926	2923	$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$	[19; 22]
2855	2855	2865	2854	$\nu_{\text{s}}(\text{CH}_3)$	
1725	1735	1727	1735	$\nu(\text{C}=\text{O})$	[9; 29]
1651	1655	1644	1652	Амид I $\nu(\text{C}=\text{O})$	[22; 26; 31]
1620	1624	1618	1628	$\delta(\text{OH})$	[9]
–	1542	1546	1543	Амид II $\nu(\text{O}-\text{C}-\text{N})$	[22; 26; 31]
1449	1456	1465	1454	$\delta(\text{CH}_2)$	[22; 27; 32]
1417	1434	1425	1418	$\delta(\text{OH})$	[9; 22]
1375	1372	1376	1373	$\delta(\text{OH})$	[9; 27]
1315	1323	1318	1319	$\delta(\text{CH}_2)$	[9; 19; 22]
1266	1252	1245	1265	Амид III $\delta(\text{N}-\text{H})$	[22; 26; 31]
1201	1198	1203	1204	$\nu(\text{C}-\text{O})$ $\delta(\text{OH})$	[9; 22; 29; 32]
1151	1143	1155 1140	1142	$\nu(\text{C}-\text{O})$ $\nu_{\text{as}}(\text{COC})$	[9; 22; 29; 32]
1073	1075	1074	1073	$\nu_{\text{as}}(\text{COC})$ мостик	[9; 22; 27]
1039	1040	1040	1040	$\nu(\text{OH})$	
802	799	842	774	$\delta(\text{CH}_2)$	[9; 22]
780	781	801	760	$\delta(\text{OH})$	[9; 22]
606	–	–	606	$\delta(\text{CCO})$	[19]
–	584	593	573	$\delta(\text{OH})$	[9]

Примечание: «–» – отсутствие полосы поглощения на данной частоте.

Резервные углеводы гемицеллюлозы (табл. 1), присутствующие в клеточных оболочках гиф можно идентифицировать по полосе при 1725 (1), 1735 (2), 1727 (3) и 1735 (4) см⁻¹ ($\nu(\text{C}=\text{O})$ в сложноэфирной группе) [9]. Некоторые авторы по полосе ~1730 см⁻¹ $\nu(\text{C}=\text{O})$ [18], а также ~1200 и ~1150 $\nu(\text{C}-\text{O})$ [22; 32] определяют в лишайниках липиды. Эти же авторы полосу при ~1455 см⁻¹ $\delta(\text{CH}_2)$ связывают с липидами. Полосу при ~1455 см⁻¹, а также полосу 1200 см⁻¹ – плоскостные $\delta(\text{OH})$, ~1150 – $\nu_{\text{as}}(\text{COC})$ между пиранозными единицами связывают с углеводами [9; 27]. Поскольку интенсивность полос поглощения на частотах ~1730, ~1455, ~1200 и ~1150 в ИК спектрах образцов 1-4 низкая, можно предположить, что это липиды. Известно, что жиры в лишайниках составляют всего 2–3% (табл. 1). Содержание белков в лишайниках тоже незначительно (2–3%), о чем свидетельствует низкая интенсивность полос, характеризующих колебание в ИК спектрах образцов 1-4 на частотах ~1650, ~1540 и ~1250 см⁻¹ [22; 26; 31].

Данные спектрального анализа химического состава

лишайников могут быть использованы при индикации загрязнения воздуха. В спектрах слоевищ, испытавших воздействие поллютантов, основные изменения связаны с полосами ОН-групп лишенина [24; 25]. В зависимости от химической природы экотоксиканта происходят разные реакции. Возможны реакции окисления, этерификации и О-алкилирования – синтеза простых эфиров [6; 8; 24; 25]. Фурье-ИК спектроскопический анализ позволяет не только идентифицировать состав поллютантов в воздухе, но и осуществлять мониторинг состояния атмосферы, выяснить механизмы взаимодействия экотоксикантов с компонентами лишайников, характер воздействия поллютантов на лишайники.

Таким образом, методом ИК спектроскопии с Фурье-преобразованием проведено изучение общего состава индикаторных видов лишайников. Четко выявляются функциональные группы основного компонента лишайника – высокополимерного углевода лишенина. Возможна идентификация белков и жиров. Для точного соотнесения функциональных групп с другими компонентами слоевища необходимы дополнительные исследования другими методами (экстракция и хроматография). Их комбинирование с ИК спектроскопией повышает эффективность мониторинговых исследований.

Список литературы

1. *Вайнштейн А.О.* О лишайниковых углеводах // *Новости сист. низш. раст.* Т. 29. СПб.: Наука, 1993. С. 72–83.
2. *Вайнштейн Е.А.* Некоторые вопросы физиологии лишайников III. Минеральное питание // *Ботан. журн.* 1982. Т. 67, № 5. С. 561–571.
3. *Вайнштейн Е.А.* Физиолого-биохимические исследования лишайников в Ботаническом институте АН СССР // *Актуальные проблемы экспериментальной лишенологии в СССР* / под ред. Н.С. Голубковой. Л., 1991. С. 6–12. (Тр. Ботан. ин-та им. В.Л.Комарова; Вып. 1).
4. *Курсанов А.Л., Дьячков Н.Н.* Лишайники и их практическое использование. М., Л.: Изд. АН СССР, 1945. 56 с.
5. *Локинская М.А.* О содержании зольных элементов в лишайниках // *Матер. III Закавказской конф. по спорным растениям.* Тбилиси, 1968. С. 246–249.
6. *Мейсурова А.Ф., Хижняк С.Д., Пахомов П.М.* Оценка токсичного воздействия диоксидов азота и серы на химический состав *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. ИК спектральный анализ // *Сиб. экол. журн.* 2011. Т. 18, № 2. С. 251–261.
7. *Мейсурова 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.
8. *Мейсурова А.Ф., Хижняк С.Д., Пахомов П.М.* Методы исследования химического состава слоевища эпифитных лишайников в условиях

- аэротехногенного загрязнения // Вестн. Твер. гос. ун-та. Сер. Биология и экология. 2009. Вып. 15, № 34. С. 199–209.
9. Методы исследования древесины и ее производных / под ред. Н.Г. Базарновой. Барнаул: Изд. Алт. гос. ун-та, 2002. 160 с.
 10. *Моисеева Е.Н.* Биохимические свойства лишайников и их практическое значение. М., Л.: АН СССР. 1961. 82 с.
 11. *Равинская А.П.* Лишайниковые кислоты и их биологическая роль // Новости сист. низш. раст. Л., 1984. Т. 21. С. 160–179.
 12. *Равинская А.П., Вайнштейн Е.А.* Влияние некоторых экологических факторов на содержание лишайниковых веществ // Экология, 1975. № 3. С. 82–85.
 13. *Смит А.* Прикладная ИК спектроскопия. М.: Мир 1982. 328 с.
 14. *Трасс Х.Х.* Химический состав лишайников // Жизнь растений. Т. 3. Л., 1977. С. 423–425.
 15. *Уразбахтина А.Ф., Хижняк С.Д., Дементьева С.М., Нотов А.А., Пахомов П.М.* Применение метода Фурье-ИК спектроскопии для лишеноиндикации атмосферного загрязнения в городских районах // Растительные ресурсы. 2005. Т. 41, вып. 2. С. 139–147.
 16. *Шапиро И.А.* Адаптация лишайников к экстремальным условиям существования в связи с их азотным обменом: автореф. дис. ... д-ра. биол. наук. Л., 1991б. 32 с.
 17. *Шапиро И.А.* Загадки растений-сфинкса. Л., 1991а. 79 с.
 18. *De Oliveira L.F.C., Edwards H.G.M., Feo-Manga J.C., Seaward M.R.D., Lucking R.* FT-Raman spectroscopy of three foliicolous lichens from Costa Rican rainforests // Lichenologist. 2002. Vol. 34, Iss. 3. P. 259–266.
 19. *Edwards H.G.M., Holder J.M., Wynn-Williams D.D.* Comparative FT-Raman spectroscopy of *Xanthoria* lichen-substratum systems from temperate and Antarctic habitats // Soil biol. biochem. 1998. Vol. 30, № 14. P. 1947–1953.
 20. *Howell B., Edwards H.G.M., De Oliveira L.F.C., Seaward M.R.D.* FT-Raman spectroscopy of the Christmas wreath lichen, *Cryptothecia rubrocincta* (Ehrenb., Fr.) // The Lichenologist. 2005. Vol. 37. P. 181–189.
 21. *Howell G.M., Edwards H.G.M., Seaward M.R.D., Attwood S.J., Little S.J., De Oliveira L.F.C., Tretiach M.* FT-Raman spectroscopy of lichens on dolomitic rocks: an assessment of metal oxalate formation // Analyst. 2003. Vol. 128. P. 1218–1221.
 22. Infrared characteristic group frequencies. Tables and Charts / Ed. by G. Socrates. London: John Wiley & Sons, 1994. 256 p.
 23. *Kramer P., Wincierz U., Grubler G., Tschakert J.* Rational approach to fractionation, isolation and characterization from the lichen *Cetraria islandica* // Drug. Res. 1995. Vol. 45 (1), № 6. P. 726–731.
 24. *Meysurova A.F., Khizhnyak S.D., Pakhomov P.M.* IR spectral analysis of the chemical composition of the lichen *Hypogymnia physodes* to assess atmospheric pollution // Jour. of Applied spectroscopy. 2009. Vol. 76, Iss. 3. P. 420–426.
 25. *Meysurova A.F., Khizhnyak S.D., Pakhomov P.M.* IR spectroscopic study on indicator species of lichens for detection of nitrogen dioxide in atmosphere // Book of abstracts / 11th European Meeting on Environmental Chemistry – EMEC, Portooz, Slovenia, Dec. 8–11. Nova Gorica: University, 2010. P. 30.
 26. *Neumann G., Massonneau A., Martinoia E., Rohmeld V.* Physiological

- adaptations to phosphorus deficiency during proteoid root development in white lupin // *Planta*. 1999. Vol. 208, № 4. P. 373–382.
27. *Petibois C., Rigalleau V., Melin A.M., Perromat A., Cazorla G., Gin H., Deleris G.* Determination of glucose in dried serum samples by Fourier-Transform Infrared Spectroscopy // *Clinical chemistry*. 1999. Vol. 45, Iss. 9. P. 1530–1535.
 28. *Prieto H.G.M. Edwards M.R.D. Seaward M.R.D.* Fourier Transform-Raman Spectroscopic study of lichen strategies on granite monuments // *Geomicrobiology Journal*. 2000. Vol. 17, Iss. 1. P. 55–60.
 29. *Raab T.K., Martin M.C.* Visualizing rhizosphere chemistry of legumes with mid-infrared synchrotron radiation // *Planta*. 2001. Vol. 213, № 5. P. 881–887.
 30. *Rao, K.G. Sarma K.G., Seshadri S.T.R.* The ultraviolet and infrared spectra of some lichen depsides and depsidones roceedings // *Mathematical Sciences*. 1966. Vol. 66, № 1. P. 1–14.
 31. *Sokolowski F., Modler A.J., Masuch R., Zirwer D., Baier M., Lutsch G., Moss D.A., Gast K., Naumann D.* Formation of critical oligomers is a key event during conformational transition of recombinant syrian hamster // *Jour. of Biol. Chemistry*. 2003. Vol. 278, No. 42. P. 40481–40492.
 32. *Stehfest K., Boese M., Kerns G., Piry A., Wilhelm C.* Fourier transform infrared spectroscopy as a new tool to determine rosmarinic acid in situ // *Jour. plant physiol*. 2003. Vol. 9. P. 78–86.

ANALYSIS OF THE CHEMICAL COMPOSITION OF THE LICHEN BY MEANS OF FTIR SPECTROSCOPIC: OPPORTUNITIES AND PROSPECTS OF USE

A.F. Meysurova

Tver State University, Tver

Functional groups of structural components of cell's membranes – lichenin are identified by means of FTIR spectroscopic analysis of lichens from an environmental background. Main functional groups attributed to proteins, fats, simple reduced sucrose are found. Opportunities and perspectives of application of FTIR spectroscopy to analyze chemical composition of lichens are determined.

Keywords: *FTIR-spectroscopy; indicator species; chemical compound of lichens; epiphytic lichen; lichenan; squirrels; fats; hemicelluloses.*

Об авторах:

МЕЙСУРОВА Александра Федоровна – кандидат биологических наук, доцент кафедры ботаники, заместитель по учебной работе декана биологического факультета, ГОУ ВПО «Тверской государственный университет», e-mail: alexandrauraz@mail.ru