



**ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ БЕЛКА У РАСТЕНИЙ ЛЮЦЕРНЫ ПОСЕВНОЙ
MEDICAGO SATIVA L. ПОД ВЛИЯНИЕМ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ПОЧВЫ НЕФТЬЮ
И РЕКУЛЬТИВАЦИИ С ПРИМЕНЕНИЕМ ПРЕПАРАТА «ЕЛЕНА»**

Сотникова Ю.М., Григориади А.С., Фархутдинов Р.Г.

Башкирский государственный университет, Россия, 450076, Уфа, Заки Валиди, 32,
E-mail: sotnikova-bashedu@mail.ru

Резюме

Исследование адаптационных механизмов растений в ответ на действие нефти делает возможным выявление признаков, обеспечивающих устойчивость растений в условиях нефтяного загрязнения, с целью их использования в процессе разработки методов рекультивации и подборки для неё устойчивых к нефтяному загрязнению растений. Имеющиеся данные в отношении действия углеводородов нефти на растения весьма противоречивы. Недостаточно изучено видовое разнообразие растений, способных произрастать на нефтезагрязненных почвах. Фиторемедиация является наиболее подходящим для сельскохозяйственных территорий средством очистки почвы из-за большой протяженности угодий и относительной дешевизны метода. Важными показателями устойчивости растений к углеводородным загрязнителям являются физиолого-биохимические и морфометрические параметры. Большой научный и практический интерес представляет выявление устойчивости высших растений к экзогенным нефтяным углеводородам и выявление эффекта фиторемедиации и эффекта внесения биопрепаратов при углеводородном загрязнении почвы. Синтез белка зависит от условий внешней среды и является определенным маркером адаптивного потенциала растения к неблагоприятным факторам. Целью работы являлась оценка изменения содержания белка у растений *Medicago sativa* L. в условиях загрязнения почвы нефтью и рекультивации с помощью биопрепарата «Елена». Определение содержания белка в листьях позволяет судить о статусе азотного обмена у растений. Установлено, что нефтяное загрязнение почвы привело к снижению содержания белка растения *Medicago sativa* L. Внесение биопрепарата «Елена» в загрязненную почву привело к восстановлению уровня содержания белка.

Ключевые слова: нефтяное загрязнение почвы, фиторемедиация, люцерна посевная *Medicago sativa* L., биопрепарат «Елена».

Цитирование: Сотникова Ю.М., Григориади А.С., Фархутдинов Р.Г. Изменение содержания белка у растений люцерны посевной *Medicago sativa* L. под влиянием загрязнения почвы нефтью и рекультивации с применением препарата «Елена» // Биомика. 2020. Т.12(3). С. 324-328. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-19

© Авторы

**CHANGE OF PROTEIN CONTENT IN PLANTS OF *MEDICAGO SATIVA* L.
UNDER THE INFLUENCE OF SOIL CONTAMINATION WITH OIL AND RECLAMATION
WITH THE APPLICATION OF THE PREPARATION "ELENA"**

Sotnikova Yu.M., Grigoriadi A.S., Farkhutdinov R.G.

Bashkir State University, Russia, 450076, Ufa, Zaki Validi, 32, e-mail: sotnikova-bashedu@mail.ru

Resume

The study of the adaptive mechanisms of plants in response to the action of oil makes it possible to identify signs that ensure the resistance of plants in conditions of oil pollution, with the aim of using them in the development of methods of reclamation and selection of plants resistant to oil pollution for it. The available data on the effects of petroleum hydrocarbons on plants are highly controversial. The species diversity of

plants capable of growing on oil-contaminated soils has not been sufficiently studied. Phytoremediation is the most suitable soil purification tool for agricultural areas due to the large extent of the land and the relative cheapness of the method. Physiological, biochemical and morphometric parameters are important indicators of plant resistance to hydrocarbon pollutants. Of great scientific and practical interest is the identification of the resistance of higher plants to exogenous petroleum hydrocarbons (HC) and the identification of the effect of phytoremediation and the effect of the introduction of biological products in case of hydrocarbon pollution of the soil. The aim of the work was to assess changes in the biochemical and morphometric parameters of *Medicago sativa* L. plants under conditions of soil pollution with oil and reclamation using the biological product "Elena". Determination of the protein content in leaves makes it possible to judge the status of nitrogen metabolism in plants. It was revealed that oil pollution led to a decrease in the protein content of the plant *Medicago sativa* L. The use of the biological product "Elena" led to the restoration of this parameter. The results showed that the positive effect of the studied biological product depends on the concentration of the pollutant.

Key words: oil pollution, phytoremediation, *Medicago sativa* L., biological product "Elena".

Citation: Sotnikova Yu.M., Grigoriadi A.S., Farkhutdinov R.G. Change of protein content in plants of *Medicago sativa* L. under the influence of soil contamination with oil and reclamation with the application of the preparation "Elena". *Biomics*. 2020. Vol. 12(3). P. 324-328. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-19 (In Russian)

© The Authors

Введение

Основным антропогенным фактором, оказывающим стрессовое воздействие на растения, является нефтяное загрязнение. Исследование адаптационных механизмов растений в ответ на действие нефти делает возможным выявление признаков, обеспечивающих устойчивость растений в условиях нефтяного загрязнения, с целью их использования в процессе разработки методов рекультивации и подбора для неё устойчивых к нефтяному загрязнению растений. Одним из физиолого-биохимических показателей, который можно использовать как индикатор адаптационного состояния растения при нефтяном загрязнении почвы является активность синтеза белков растением. Изменения в активности биохимического синтеза биологически важного вещества проявляются в появлении механизмов адаптации к новым факторам окружающей среды на разных уровнях организации растений [Швец, 2009 (Shvets, 2009)]. Большой научный и практический интерес представляет выявление механизмов устойчивости высших растений к нефтяным углеводородам в почве и выявление способностей растений к фиторемедиации и выяснение протективного эффекта применения биопрепаратов при углеводородном загрязнении почвы [Сотникова, и др., 2020 (Sotnikova, et al., 2020)]. Изменение уровня содержания белка в листьях при изменении условий среды позволяет в определенной степени судить об активности азотного обмена у растений.

Материалы и методы исследования

Для проведения данного исследования использовали следующие материалы: семена растения-

фиторемедианта люцерны посевной (*Medicago sativa* L.); биопрепарат Елена (основу которого составляет штамм бактерий *Pseudomonas aureofaciens*, ИБ 51 (титр микроорганизмов биопрепарата 10^6 КОЕ/мл), производитель – ООО «Биомедхим»). Известно, что бактерии рода *Pseudomonas* могут разлагать широкий круг углеводов и их производных и могут применяться для очистки экосистем от нефтяного загрязнения [Коршунова и др., 2020 (Korshunova et al., 2020)].

В качестве загрязнителя выступала товарная нефть в концентрации 3 и 6% от массы сухой почвы. Через месяц после загрязнения производился посев семян люцерны, обработанных биопрепаратом Елена. Растения люцерны посевной (*Medicago sativa* L.) выращивали в вегетационных сосудах. Заделка семян осуществлялась на глубину 1,5 – 2,0 см. Норма высева семян составляла 20 шт на сосуд. Отбор проб проводился через 30 сут. после посадки растений. В качестве контроля выступали растения, выращенные на незагрязнённой почве без предпосевной обработки. Предпосевную обработку семян проводили в день посева, норма расхода рабочей жидкости в виде суспензии составляла из расчета 1 кг на 1 га. При закладке опытов за основу были взяты методы, приводимые Б.А. Доспеховым [Доспехов, 1985 (Dospikhov, 1985)].

Определение содержания белка проводили по Брэдфорду. Для определения общего содержания белка предварительно проводился ряд процедур: приготовление реактива, построение калибровочного графика с использованием раствора с известной концентрацией. Калибровочный график строили по БСА (бычий сывороточный альбумин). Для определения содержания белка использовали

замороженный растительный материал, 100 мг которого растирали, а затем экстрагировали в 3 мл дистиллированной воды в течение 1 ч. В пробирку вносили 100 мкл экстракта и 1900 мкл реактива Bradford и перемешивали. Через 10 минут определяли оптическую плотность пробы при длине волны 590 нм относительно холостой пробы. В качестве раствора сравнения вместо образца служило аналогичное количество буфера. Концентрацию белка (мкг/мл) определяли по калибровочной кривой. Содержание белка в образце вычисляли по формуле [Веселевский, и др., 1988 (Veselevsky, et al., 1988): $C_6 = C_1 \times K_{\text{разб}} \times V_{\text{экстр}} / m \times 1000$ (мг/г массы), где C_6 – количество белка в навеске (мг/г); C_1 – количество белка в аликвоте (мкг/мл); $K_{\text{разб}}$ – коэффициент разбавления экстракта; $V_{\text{экстр}}$ – объем экстракта (мл); m – масса навески (г); 1000 – коэффициент пересчета (1000 = 1 мг).

Результаты и обсуждение

Загрязнения сырой нефтью и нефтепродуктами представляют большую опасность для нормального состояния почв. Оно проявляется в изменении их физико-химических свойств, в торможении интенсивности биологических процессов, снижении растворимости большинства микроэлементов, резком увеличении соотношения между углеродом и азотом [Киреева и др. (Kireeva et al.), 2007; 2010]. При высоких дозах механические элементы и структурные агрегаты почвы покрываются нефтяной пленкой, которая изолирует питательные вещества от корневых систем растений. Почвенные частицы слипаются, а при старении и частичном окислении компонентов нефти последняя загустевает, и почвенный слой превращается в асфальтоподобную массу, которая совершенно не пригодна для роста растений [Хазиев, и др. (Khaziev et al.) 1981]. До полного исчезновения изменяется содержание нитратов, что свидетельствует о подавлении нитрификационных процессов в почве. Нефть оказывает не только отрицательное влияние на

рост и развитие растений, но и в значительной степени снижает их метаболизм и в первую очередь азотный [Зильберман, 2005 (Silberman, 2005)].

В полевых условиях влияние нефти на длину побегов оказалось незначительным. Для концентраций 1 и 6% отличия не были достоверными, при содержании нефти в почве в дозе 3% длина побегов снижалась на 33%. Использование препарата «Елена» дало положительный результат. При концентрации загрязнителя 1-3% длина растений не отличалась от контрольных, а при максимальной степени загрязнения, доступной для применения фиторемедиации (6%), параметр был выше на 31% по сравнению с контрольными растениями.

Аналогичное влияние нефтяного загрязнения оказало и на длину корневой системы растений люцерны посевной. Минимальное значение отмечалось при 3%-ном загрязнении почвы. Использование «Елены» стимулировало рост корневой системы (таблица 1). При минимальном загрязнении почвы показатель в 1,5 превышал контрольные значения. По сравнению с образцами, произрастающими в сильнозагрязненной почве, длина корней увеличилась на 30%, при среднем уровне загрязнения – в 1,8 раз. Именно использование препарата «Елена» приводило не только к увеличению длины, но и к увеличению количества корней. В зависимости от степени загрязнения почвы прирост массы корней составлял от 30 до 50%. Также были определены такие дополнительные параметры как ширина листьев, количество корней и масса надземной и подземной части растений. Использование препарата «Елена» не привело к возникновению существенных отличий между растениями, произрастающими в загрязненной и контрольной почве. Это может быть связано с тем, что такая низкая концентрация не дает токсический эффект и растения успешно адаптируется к стрессу (таблица 1).

Таблица 1

Морфометрические данные растений люцерны посевной, произрастающих в нефтезагрязненной почве и при биоремедиации
Morphometric data of alfalfa plants growing in oil-contaminated soil and during bioremediation

Параметр Parameter	Нефть 1%	Нефть 3%	Нефть 6%
	Нефть 1%+«Елена» Oil 1% Oil 1% + "Elena"	Нефть 3%+«Елена» Oil 3% Oil 3% + "Elena"	Нефть 6%+«Елена» Oil 6% Oil 6% + "Elena"
Ширина листьев, см Leaf width, cm	0,5±0,03 0,76±0,04	0,73±0,04 0,63±0,03	0,83±0,04 0,66±0,03
Количество корней, шт Number of roots, pcs	37±2 54±3	75±4 113±6	47±2 62±3
Масса надземной части, г Above ground weight, g	0,5±0,03 0,74±0,03	6,97±0,34 11,67±0,58	0,58±0,03 4,14±0,21
Масса корневой системы, г Root system weight, g	0,53±0,02 0,5±0,02	1,83±0,09 1,43±0,07	0,42±0,02 1,13±0,07

В листьях люцерны, загрязненной нефтью в концентрации 3%, содержание белка достоверно не отличалось от контроля (рис. 1). Применение биопрепарата «Елена» привело к увеличению изучаемого параметра на 80% по сравнению с контролем произрастающем на незагрязненной почве (рис. 1). При росте растений в почве содержащей 6% нефти, содержание белка на 40% было ниже, по сравнению с контрольным вариантом, что могло быть обусловлено проявлением негативного влияния

поллютанта на синтез белка. Рост растений люцерны в почве, в которую был внесен препарат «Елена» оказало стимулирующее влияние на синтез белка в листьях, и его концентрация увеличилась до контрольных значений (рис. 1).

Таким образом, применение микробного препарата «Елена» оказывало положительное влияние на уровень содержания белка в листьях растения-фиторемедианта при содержании нефти в почве в концентрации 3 и 6 %.

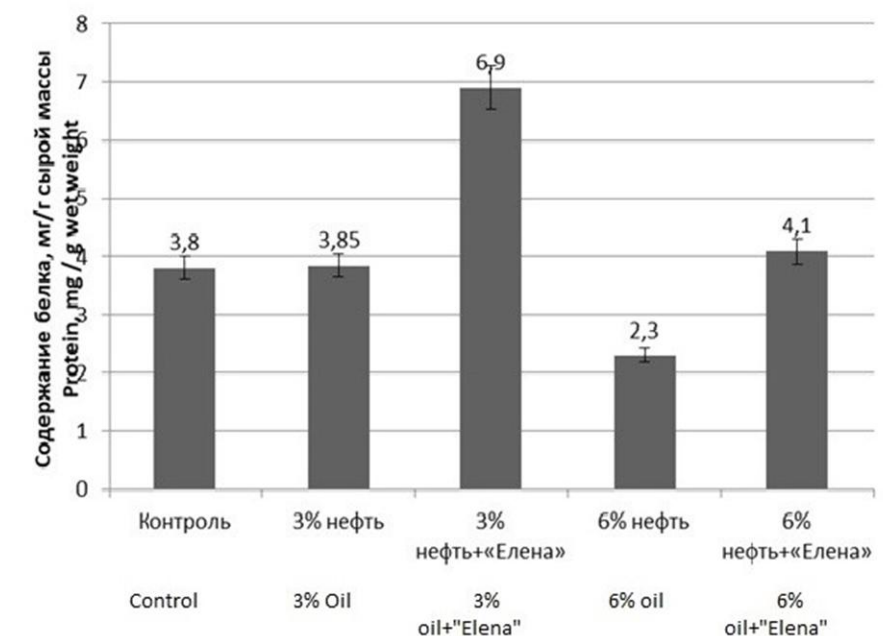


Рис. 1. Содержание белка в листьях люцерны посевной под влиянием нефтяного стресса и после внесения биопрепарата

Figure: 1. Protein content in alfalfa leaves under the influence of oil stress and after the introduction of a biological product

Похожие результаты были получены в работе А.М. Мифтаховой, в которой установлено, что фитотоксические свойства нефтезагрязненных почв при слабом и среднем уровнях загрязнения проявляются в угнетении прорастания семян, ухудшении развития молодых растений, изменении некоторых морфологических показателей тест-растений. Фитотоксичность почв, загрязненных нефтью, определяется прямым (непосредственным) действием поллютанта на растения в первый период и трансбиотическим (опосредованным) действием в дальнейшем [Мифтахова (Miftakhova), 2002].

Заключение

Таким образом, при оценке негативного влияния нефтяного загрязнения на морфометрические показатели растения люцерны посевной было

отмечено, что в большей степени токсическое действие нефти проявилось в снижении длины и количества корней из-за прямого контакта с растением. При изучении влияния биопрепарата «Елена» на уровень содержания белка в листьях растений люцерны посевной было установлено, что происходило снижение белка в листьях при наличии нефтяного загрязнения у растений которые не были обработаны, а применение биопрепарата при концентрации нефти 3% и 6% в почве приводило к активации синтеза белка или его поддержанию на уровне необработанного контроля. Неспецифическое действие биопрепарата «Елена», используемого для рекультивации загрязненной почвы оказалось достаточно эффективным и улучшало биохимические показатели люцерны, что является проявлением адаптации растений к условиям нефтяного стресса.

Литература

1. Веселевский В.А., Вшивцев В.С. Биотестирование загрязнения среды нефтью по реакции фотосинтетического аппарата растений // Восстановление нефтезагрязненных почвенных экосистем. М.: Наука, 1988. С. 99-112.
2. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). 5-е изд., доп. и перераб. М.: Агропромиздат, 1985. 351 с.
3. Зильберман М. В., Порошина Е. А., Зырянова Е. В. Биотестирование почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами. ФГУ УралНИИ «Экология», Пермь, 2005. 111 с.
4. Киреева Н. А. Водопьянов В. В. Мониторинг растений, используемых для фиторемедиации нефтезагрязненных почв // Экология и промышленность России. 2007. №9. С. 46-47.
5. Киреева, Н. А., Водопьянов, В. В., Григориади, А. С., Новоселова, Е. И., Багаутдинова, Г. Г., Гареева, А. Р., & Лобастова, Е. Ю. Эффективность применения биопрепаратов для восстановления плодородия техногенно-загрязненных почв. Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2010. Т.12 (1-4), С. 1023-1026.
6. Коршунова Т.Ю., Кузина Е.В., Рафикова Г.Ф., Логинов О.Н. Бактерии рода *Pseudomonas* для очистки окружающей среды от нефтяного загрязнения. Экобиотех. 2020. Т. 3. № 1. С. 18-32.
7. Мифтахова А.М. Прямое и трансбиотическое влияние нефтяного загрязнения почвыв на высшие растения: автореф. на соискание степени кандидата биол. наук. Уфа, ИБГ, 2002. - 18с.
8. Сотникова Ю.М., Григориади А.С., Хисамов Р.Р., Фархутдинов Р.Г. Влияние предпосевной обработки семян люцерны посевной препаратом «Елена» на повышение её устойчивости к загрязнению почвы нефтепродуктами // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2020. № 5 (85). С. 79-84
9. Хазиев Ф.Х., Фатхиев Ф.Ф. Изменение биохимических процессов в почвах при нефтяном загрязнении и активация разложения нефти // Агрохимия. 1981. № 10. С. 102-111.

10. Швец А.А. Фиторемедиация нефтезагрязненных нефтью почв. Краснодар, 2009. 23 с.

References

1. Veselevsky V.A., Vshivtsev B.C. Biotesting of environmental pollution with oil by the reaction of the photosynthetic apparatus of plants // Restoration of oil-contaminated soil ecosystems. M.: Nauka, 1988. S. 99-112.
2. Dospekhov B.A. Field experiment technique (with the basics of statistical processing of research results). - 5th ed., Add. and revised. M. : Agropromizdat, 1985. 351 p.
3. Zilberman MV, Poroshina EA, Zyryanova EV Biotesting of soils contaminated with oil and oil products. - FGU UralNII "Ecology", Perm, 2005. - 111 p.
4. Kireeva NA Vodopyanov VV Monitoring of plants used for phytoremediation of oil-contaminated soils. *Ecology and Industry of Russia*. 2007. No. 9. S. 46-47.
5. Kireeva, N. A., Vodopyanov, V. V., Grigoriadi, A. S., Novoselova, E. I., Bagautdinova, G. G., Gareeva, A. R., & Lobastova, E. Yu . (2010). The effectiveness of the use of biological products to restore the fertility of technogenically contaminated soils. *Bulletin of the Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences*, 12 (1-4), 1023-1026.
6. Korshunova T.Yu., Kuzina E.V., Rafikova G.F., Loginov O.N. Bacteria of the genus *Pseudomonas* for cleaning the environment from oil pollution. *Ecobiotech*. 2020. Vol. 3.No. 1.P. 18-32.
7. Miftakhova A.M. Direct and transbiotic influence of oil pollution of soil on higher plants: author. for the degree of candidate of biol. sciences. Ufa, IBG, 2002. 18p.
8. Sotnikova Yu.M., Grigoriadi A.S., Khisamov R.R., Farkhutdinov R.G. Influence of pre-sowing treatment of alfalfa seeds with the sowing preparation Elena on increasing its resistance to soil contamination with oil products. *Bulletin of the Orenburg State Agrarian University*. 2020. No. 5 (85). S. 79-84
9. Khaziev F.Kh., Fathiev F.F. Changes in biochemical processes in soils under oil pollution and activation of oil decomposition. *Agrochemistry*. 1981. No. 10. S. 102-111.
10. Shvets A.A. Phytoremediation of oil-contaminated soils. Krasnodar, 2009. 23 p.