

Ответ антиоксидантной системы растений подсолнечника на применение комбинаций биопрепаратов при их росте на нефтезагрязненной земле

**Григориади А. С.^А, Федяев В. В.^А, Сотникова Ю. М.^А,
Морозова А. А.^А, Фархутдинов Р. Г.^А**

^А Уфимский университет науки и технологий, кафедра биохимии и биотехнологии,
Уфа, Россия

Известно, что применение микробных препаратов на основе разных видов микроорганизмов, может повышать устойчивость растений, стимулировать рост в неблагоприятных условиях, за счет синтеза ими фитогормонов (ауксинов и цитокининов) (Архипова и др., 2006; Бакаева и др., 2021). Следовательно, при оценке эффективности микробиологических препаратов, предназначенных для биodeградации нефтепродуктов, необходимо изучать комплекс анатомических и физиологических параметров растений-ремедиантов, который будет свидетельствовать о наличии или отсутствии микробно-растительного взаимодействия (Пинчук и др., 2018). Ранее нами была проведена оценка изменений морфометрических показателей, содержания фитогормонов и особенностей морфологии корней растений ржи посевной в условиях нефтяного загрязнения серой лесной почвы (Sotnikova et al., 2023), которая показала на различный характер влияния микробных препаратов и их комбинаций на ростовые показатели и состояние антиоксидантной системы. Учет данных показателей необходим для формирования технологии применения биопрепаратов и растений ремедиантов (Сотникова, Григориади, Фархутдинов, 2022). Целью настоящей работы стало определение ответа антиоксидантной системы растений подсолнечника на применение комбинаций биопрепаратов при их росте на нефтезагрязненной земле.

В качестве объектов исследования были выбраны сорта подсолнечника однолетнего (*Helianthus ánnuus*, сорт Бомбардир). Растения выращивали с применением универсальной опоры, которая позволяла поддерживать растения в вертикальном состоянии (Федяев и др. 2021).

Лабораторные модельные опыты проводили на черноземах, в месте отбора проб почвы, мощность гумусового горизонта 55-60 см и содержанием гумуса 8-9 % тёмно-серой окраски, структура пылевато-зернистая или комковато-крупнозернистая, присутствуют карбонаты, механический состав тяжелосуглинистый и глинистый, реакция слабокислая (рН 6,2-6,5).

В почву вносили товарную нефть в концентрации 4% от сухой массы почвы (Сотникова и др., 2021). После распределения поллютанта в почве,

в неё вносили биопрепарат «Ленойл» в виде суспензии с титром $1 \cdot 10^9$ КОЕ/мл (колониеобразующих единиц в 1 мл), из расчета 0,3 мл на 100 г сухой почвы. Спустя 30 суток биodeградации нефти, содержащейся в почве с помощью биопрепарата «Ленойл», в часть добавляли препараты (Азолен или Агробиолог или Новый) в виде суспензии с титром $1 \cdot 10^9$ КОЕ/мл (колониеобразующих единиц в 1 мл), из расчета 0,3 мл на 100 г сухой почвы. В почву вносили семена исследуемых растений в соответствии с рекомендациями для каждой культуры с учетом требований ГОСТ Р ИСО 18769-2019 и ГОСТ Р ИСО 22030-2009. В контрольном варианте эксперимента растения выращивали без внесения нефти. Сравнительную оценку влияния устойчивости проводили через 30 суток. Растения в течение 30 дней выращивали в сосудах объемом 0,5 л, при 14-часовом светопериоде, интенсивности освещения 30 клк и температуре воздуха 22-25 °С.

В состав биопрепарата «Ленойл»® – NORD, СХП (производитель ЗАО НПП «Биомедхим» ТУ 9291-007-33822935-2014) входят бактерии *Pseudomonas turukhanskensis* ИБ 1.1 (Логинов и др., 2009). Этот биопрепарат предназначен для биологической обработки нефтезагрязненных почв, грунтов, водных поверхностей с целью ускорения биоразложения нефти, восстановления продуктивности рекультивируемых почв. «Азолен» - микробиологическое удобрения (*Azotobacter vinelandii* ИБ 4-8* 10^9 КОЕ/мл) с фунгицидными ростостимулирующими свойствами и азотофиксирующей способностью. Нейтрализатор пестицидного стресса «Агробиолог» представляет собой живые бактерии *Pseudomonas protegens* DA1.2 ($45 \cdot 10^9$ КОЕ/мл), рекомендуется для повышения устойчивости растений к гербицидному воздействию, засухе, способностью к фиксации атмосферного азота, минерализации фосфора. Препарат под условным названием «Новый» (разработка Уфимского ИБ УФИЦ РАН), представляет собой штамм BLK - стимулятор роста кормовых трав, на начальных этапах исследования было выявлено, что штамм BLK, по данным разработчиков, положительно влияет на всхожесть, массу побегов и корней у кормовых трав, имеет определенную нитрогеназную и фосфатмобилизующую активность.

Активность гваяколпероксидазы рассчитывали по методике А.И. Ермакова (1987). Активность каталазы оценивали по методу М.А. Королюк (1988).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 10.0, рассчитывали средние значения, стандартные отклонения и доверительный интервал при $P \leq 0,05$.

Известно, что неблагоприятные условия усиливают создание активных форм кислорода (АФК). АФК могут выступать в качестве вторичных мессенджеров, участвующих в пути передачи сигнала стресса, но их чрезмерная продукция может вызывать окислительный стресс, который повреждает растения, окисляя фотосинтетические пигменты, мембранные липиды, белки и нуклеиновые кислоты. Для контроля за уровнем АФК, растения имеют неферментативные и ферментативные антиоксидантные системы для защиты клеток от окислительного повреждения [Колупаев и др., 2012; Mattos and Moretti, 2015]. Кроме того, растения способны выполнять ферментативную деградацию органических поллютантов путем специфических для растительных клеток метаболических превращений и важную роль в этом играет - пероксидаза [Kvesitadze et al., 2009]. Это может быть связано с тем, что пероксидазы в компонентах растительной клетки очень распространены, имеют низкую субстратную специфичность, сродство к ксенобиотикам разной химической структуры и т.д. [Kvesitadze et al., 2009]. Таким образом, пероксидаза в условиях загрязнения принимают участие в защите растений от окислительного стресса и могут участвовать в деградации органических поллютантов, попадающих внутрь растения. В связи с этим нами детектировалась активность внутриклеточных пероксидаз в побегах и корнях подсолнечника.

Как видно из таблицы 1 применение на контрольных вариантах различных комбинаций микробиологических препаратов из препарата нефтеструктора «Ленойл» и стимуляторов роста «Азолен», «Агробиолог» и биопрепарата под условным названием «Новый», показало, что достоверное повышение активности фермента пероксидазы было в варианте «Ленойл+Агробиолог» и «Ленойл+Азолен» в корнях, по сравнению с «чистым» контролем. В надземной части стимулирующими активность фермента были комбинации «Ленойл+Агробиолог» и «Ленойл+Азолен+Новый». Другие комбинации препаратов снижали активность фермента пероксидазы, относительно контроля. Эти данные позволяют сделать предположение, что микробиологические препараты оказывают влияние разнонаправленное влияние на активность фермента.

Загрязнение черноземной почвы в опытах с подсолнечником приводило к снижению активности пероксидаз в корнях и надземной части подсолнечника. Эта реакция была схожа на установленную нами ранее у ржи и люцерны на серой лесной почве (Сотникова и др, 2021). Применение биопрепаратов на нефтезагрязненных почвах в комбинациях «Ленойл+Новый», «Ленойл+Азолен» и «Ленойл+Агробиолог» приводило к активации фермент каталазы в корнях, а надземной части во всех комбинациях биопрепаратов. Это также говорит в пользу того, что микробиоло-

гические препараты по-разному влияют на активацию фермента АФК системы – каталазу. Наибольшая активация фермента в корнях наблюдалась при применении комбинации «Ленойл+Агробиолог».

Таблица 1

Изменение активности пероксидазы в побегах и корнях растений подсолнечника (сорт Бомбардир), выращенных в почве с содержанием 4% нефти и внесении биопрепаратов «Азолен», «Ленойл», «Агробиолог», «Новый»

Показатель	Корень	Побег
Контроль (почва без нефти)	42,6±4,48	37,76±3,44
Загрязнение (почва с нефтью)	18,11±1,22	22,81±2,48
Контроль+Ленойл+Азолен+Новый	31,22±3,91	53,89±5,45
Контроль+Ленойл+Азолен	49,50±4,1	40,2±4,98
Контроль+Ленойл+Новый	36,99±1,38	38,74±3,02
Контроль+Ленойл	34,22±3,74	24,58±2,54
Контроль+Ленойл+Агробиолог	52,51±2,91	48,58±4,09
Загрязнение+Ленойл+Новый	30,50±3,09	49,36±4,5
Загрязнение+Ленойл+Азолен+Новый	21,81±3,85	40,71±4,87
Загрязнение+Ленойл	14,90±1,29	43,66±2,31
Загрязнение+Ленойл+Азолен	45,43±4,18	52,90±4,59
Загрязнение+Ленойл+Агробиолог	55,85±5,04	46,38±4,79

Определение активности каталазы показало (табл. 2), что применение на контрольных растениях (выросших на почве без внесения нефти, но с применением определенных биопрепаратов) приводило увеличению активности фермента в 2 – 7 раз. Однако, в корнях не происходило изменения активности каталазы и более того происходило снижение его активности при применении препарата «Ленойл». Также, как и при определении активности пероксидаз (табл. 1), нами было установлено снижение активности фермента каталазы, при росте нефтезагрязненной почве происходило снижение внутриклеточной активности фермента каталазы в корнях и отсутствие реакции в надземной части (табл. 2). Это говорит об органоспецифичности работы фермента. Применение микробиологических препаратов приводило к активации фермента каталазы в корнях при комбинациях «Ленойл+Новый», «+Ленойл», «Ленойл+Азолен» и «Ленойл+Агробиолог», но активация практически отсутствовала в комбинации «Ленойл+Азолен+Новый». Величина активации составила от 203 до 268%. В побегах величина была кратно выше от 8,7 до 9,7 раза, за исключением варианта «+Ленойл», где активация составила 35%.

Наибольшая активация фермента каталаза в корнях и надземной части также, как и при определении активности фермента пероксидаза, наблюдалась при применении комбинации препаратов «Ленойл+Агробиолог» (табл. 2). Это говорит, о том, что при таком сочетании препаратов

у растения формируется наиболее высокая активность ферментов принимающих участие в защите растений от окислительного стресса и возможно в деградации органических поллютантов, попадающих внутрь растения.

В условиях нефтяного загрязнения и обработки почвы биопрепаратами деструктором нефти «Ленойл» и стимуляторами роста, нам удалось установить роль антиоксидантной системы растений в адаптации к разрабатываемой технологии применения подсолнечника в качестве фиторемедианта. Определение уровня активности ферментов антиоксидантной системы растений важно для подбора концентраций биопрепаратов и создания их комбинаций при проведении фиторемедиационных мероприятий на почвах, загрязненных нефтью. Применение углеводородокисляющих микроорганизмов р. *Pseudomonas* способных синтезировать гормоны растений, является большим преимуществом для формирования устойчивости растений-фиторемедиантов к их росту в условиях нефтяного загрязнения почвы.

Таблица 2

Изменение активности каталазы в побегах и корнях растений подсолнечника (сорт Бомбардир), выращенных в почве с содержанием 4% нефти и внесении биопрепаратов «Азолен», «Ленойл», «Агробиолог», «Новый»

Показатель	Корень	Побег
Контроль (почва без нефти)	203,76±18,83	75,58±7,08
Загрязнение (почва с нефтью)	72,49±7,36	72,12±8,91
Контроль+Ленойл+Азолен+Новый	217,02±20,8	591,4±54,81
Контроль+Ленойл+Азолен	198,24±20,29	574,16±51,61
Контроль+Ленойл+Новый	198,02±18,57	523,33±52,04
Контроль+Ленойл	82,21±9,67	144,98±14,57
Контроль+Ленойл+Агробиолог	206,86±20,15	261,66±24,1
Загрязнение+Ленойл+Новый	147,63±13,13	655,04±62,03
Загрязнение+Ленойл+Азолен+Новый	96,36±6,15	693,94±28,52
Загрязнение+Ленойл	160,89±15,85	97,68±9,91
Загрязнение+Ленойл+Азолен	148,51±14,25	626,31±27,92
Загрязнение+Ленойл+Агробиолог	194,48±17,02	700,57±25,03

Проведенные исследования показали, также, что при применении биопрепаратов «Ленойл», «Азолен», «Агробиолог» и «Новый» в определенных комбинациях улучшаются ростовые показатели растений подсолнечника и всхожесть семян, изменяется активность ферментов антиоксидантной системы. Так достоверное повышение активности фермента пероксидазы было в варианте «Ленойл+Агробиолог» и «Ленойл+Азолен» в корнях, а в надземной части активность фермента была выше в комбинации «Ленойл+Агробиолог» и «Ленойл+Азолен+Новый». Другие комбинации препаратов снижали активность фермента пероксидазы. Активации

фермента каталазы в корнях наблюдалась при комбинациях «Ленойл+Новый», «+Ленойл», «Ленойл+Азолен» и «Ленойл+Агробиолог». Это говорит о том, что данные композиции биопрепаратов создают благоприятные условия для роста проростков подсолнечника на нефтезагрязненной почве.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 23-24-00358, <https://rscf.ru/project/23-24-00358/>.

Библиографические ссылки

1. Архипова Т.Н., Веселов С.Ю., Мелентьев А.И., Мартыненко Е.В., Кудоярова Г.Р. Влияние микроорганизмов, продуцирующих цитокинины, на рост растений. Биотехнология. 2006. № 4. С. 50-55.
2. Бакаева М.Д., Коршунова Т.Ю., Столярова Е.А. Влияние микроорганизмов с разным набором свойств на содержание нефтепродуктов в почве и морфометрические показатели растений. Известия Уфимского Научного Центра РАН. 2021. № 2. С. 74–78.
3. Пинчук И.П., Полянская Л.М., Кириллова Н.П., Степанов А.Л. Особенности формирования микробного сообщества дерново-подзолистой почвы в процессе вегетации ячменя (*Hordeum vulgare* L.) // Почвоведение. - 2018. - № 12. - С. 1498-1505.
4. Sotnikova, Y.; Grigoriadi, A.; Fedyaev, V.; Garipova, M.; Galin, I.; Sharipova, G.; Yamaleeva, A.; Chetverikov, S.; Veselov, D.; Kudoyarova, G.; Farkhutdinov R. Influence of a Hydrocarbon Biodestructor on the Growth and Content of Phytohormones in *Secale cereale* L. Plants under Petroleum Pollution of the Soil. Agriculture 2023, 13, 1640. <https://doi.org/10.3390/agriculture13081640>
5. Сотникова Ю.М., Григориади А.С., Фархутдинов Р.Г. Технология фиторемедиации нефтезагрязненных серых лесных почв: монография /, – Уфа: РИЦ БашГУ, 2022. – 160 с.
6. Федяев В.В., Кулуев Б.Р., Сотникова Ю.М., Фархутдинов Р.Г., Хаматдинова Г.И., Гарипова М.И., Веселов С.Ю. Универсальная опора для растений. Патент РФ № 198397, опубликовано 03.07.2020 г. Бюллетень изобретений № 19.
7. Сотникова Ю.М., Федяев В.В., Григориади А.С., Гарипова М.И., Махмутов А.Р., Галин И.Р., Новоселова Е.И., Ямалеева А.А., Фархутдинов Р.Г. Оценка фиторемедиационного потенциала сельскохозяйственных растений при нефтяном загрязнении почвы. "Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Естественные науки" №3, 2021 С. 99-109. DOI: 10.21685/2307-9150-2021-3-9
8. Королюк, М.А. Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы. Лабораторное дело. - 1988. - №1. - С.16-19.
9. Ермаков, А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П., Перуанский Ю.В., Луковникова Г.А., Иконникова М.И. Методы биохимического исследования растений. Л.: Агропромиздат, 1987. – 430 с.
10. Логинов О.Н. Силищев Н.Н., Бойко Т.Ф., Галимзянова Н.Ф. Биорекультивация: микробиологические технологии очистки нефтезагрязненных почв и техногенных отходов - М.: Наука, 2009. - 112 с.
11. Колупаев, Ю.Е. Карпец Ю.В. Активные формы кислорода и стрессовый сигнал у растений. Ukr. Biochem. J. - 2014. - V. 86. - № 4. - Р. 18-35.

12. Mattos L. M., Moretti C. L. oxidative stress in plants under drought conditions and the role of different enzymes. 2015.–Enzyme Engineering, 5: 1.

13. Kvesitadze E., Sadunishvili T., Kvesitadze G. Mechanisms of organic contaminants uptake and degradation in plants //World Acad Sci Eng Technol. – 2009. – Т. 55. – №. 6. – С. 458-468.

14. Сотникова Ю.М., Федяев В.В., Григориади А.С., Гарипова М.И., Галин И.Р., Габидуллина Г.Ф., Фархутдинов Р.Г. Роль фитогормонов в формировании устойчивости растений-фиторемедиантов в условиях почвенного нефтяного загрязнения на фоне комплексного применения биопрепаратов. Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2021. № 4. С. 52- 60.

Редокс-регулируемые K^+ -каналы GORK и анионные каналы ALMT1 вовлечены в отток электролитов из клеток корня *Arabidopsis thaliana*

**Гриусевич П. В.^A, Толкачева Ю. В.^A, Новосельский И. Ю.^A,
Демидчик В. В.^{A*}**

^A Белорусский государственный университет, кафедра клеточной биологии и биоинженерии растений, Минск, Беларусь. *E-mail: dzemidchyk@bsu.by

Отток электролитов из тканей растений – это реакция, наблюдающаяся в ходе стресса, и в ряде процессов нормальной физиологии. Интенсивность и обратимость выхода электролитов рассматривается в качестве генерализованного индикатора устойчивости растений к неблагоприятным факторам среды [1]. На сегодняшний день природа оттока электролитов остается малоизученной, неясны первичные мембранные механизмы данного явления и не идентифицированы молекулярные мишени, запускающие выход электролитов из клеток. В последние годы показано, что при умеренном стрессе отток электролитов – явление обратимое, то есть регулируемое и не приводящее к гибели клеток растения, что указывает на вероятное вовлечение ион-транспортных систем в данную реакцию. Стресс-индуцированный выход электролитов из растительных клеток практически всегда сопровождается генерацией активных форм кислорода (АФК). Данные явления регистрируются одновременно и практически сразу с момента воздействия стрессоров, приводя к потере K^+ и выходу анионов, а также к активации редокс-зависимых сигнальных процессов [2; 3]. В последние годы также установлено, что генетическое нокаутирование редокс-регулируемого K^+ -канала наружного выпрямления «Guard cell Outward-Rectifying K^+ channel» (GORK) многократно снижает отток K^+ при стрессе [3; 4]. При этом неясно, каким образом активируется данный канал при развитии стрессовой реакции. Исследования на близком GORK канале «Stelar K^+ Outward-Rectifying channel» (SKOR), обеспечивающем загрузку K^+ в ксилему, показали наличие в его структуре уникального