



УДК: 198:577.151.042:632.15(665.61)

РОЛЬ ОБМІНУ НІТРОГЕНУ В АДАПТАЦІЇ РОСЛИН КОНЮШИНИ ЛУЧНОЇ ДО УМОВ НАФТОЗАБРУДНЕНОГО ҐРУНТУ

О. І. Величко 

Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна

e-mail: oksana.welychko@lnu.edu.ua

Velychko O. The role of nitrogen metabolism in red clover adaptation to the conditions of oil polluted soil. *Studia Biologica*, 2020; 14(1); 105–118 • DOI: <https://doi.org/10.30970/sbi.1401.612>

Проаналізовано й узагальнено отримані раніше дані стосовно особливостей обміну Нітрогену в рослинах конюшини лучної на початкових етапах росту у забрудненому нафтою (5 %) дерново-підзолистому суглинковому ґрунті. Виявлено, що на досліджуваних стадіях росту рослин (сім'ядольних листків, першого справжнього листка і першого трійчастого листка) у коренях і листках конюшини лучної небілкових форм Нітрогену було більше, порівняно з білковими, що свідчить про адаптивну роль низькомолекулярних нітрогеновмісних сполук за умов забруднення ґрунту нафтою. Виявлено зміни вмісту різних низькомолекулярних сполук Нітрогену й активності основних ферментів асиміляції амонію у рослинах конюшини лучної на початкових стадіях росту в нафтозабрудненому ґрунті. Встановлено, що особливостями метаболізму Нітрогену в рослинах конюшини лучної за умов нафтозабрудненого ґрунту **на стадії сім'ядольних листків** є: 1) перерозподіл вмісту нітратів і амонію в органах рослин, який свідчить на користь того, що відновлення нітратів у нормі відбувається в листках, а за умов забрудненого ґрунту – в коренях рослин; 2) зміни активності ферментів глутаматсинтазного (ГС-ГОГАТ) циклу – зростання глутамінсинтазної та зниження глутаматсинтазної активності, спрямовані на нагромадження глутаміну в коренях і глутамату – в листках рослин; 3) нагромадження амідів, особливо – у коренях рослин; 4) збільшення кількості проліну: усемеро в листках і утричі – в коренях рослин; 5) збільшення сумарної кількості вільних амінокислот, максимально – у листках рослин. **На стадіях першого справжнього і першого трійчастого листка** обмін Нітрогену в рослинах конюшини лучної із нафтозабрудненого ґрунту мав іншу спрямованість: 1) інгібувались ферменти ГС-ГОГАТ циклу, особливо – глутаматсинтазна активність у листках рослин на стадії першого трійчастого листка; 2) нагромадження проліну поступово ставало менш вираженим:

його вміст у листках був більшим ушестеро на стадії першого справжнього листка і лише утричі – на стадії першого трійчастого листка; 3) збільшення сумарної кількості вільних амінокислот у листках було неістотним; 4) на 20 % у листках і на 60 % у коренях рослин зростала активність глутаматдегідрогенази; 5) у листках і коренях рослин нагромаджувались аміди й аргінін; 6) синтезувалися стресові білки, зокрема, білок із молекулярною масою 120 кД у листках рослин.

Загалом, обмін Нітрогену в рослинах конюшини лучної із нафтозабрудненого ґрунту **на стадії сім'ядольних листків** був спрямований на швидке включення мінерального Нітрогену в транспортні форми й утворення протекторних сполук, а на **стадії першого трійчастого листка** – на реутилізацію Нітрогену, зокрема, у сполуки із високим відношенням С/Ν.

Ключові слова: нафтозабруднений ґрунт, рослини конюшини лучної, обмін Нітрогену

ВСТУП

Рослина – живий організм, частина якого закріплена у ґрунті. У тому, що вона існує відразу у двох середовищах (повітрі та ґрунті) – її фундаментальна відмінність від інших живих організмів. А умови існування для всіх жителів на Землі – однакові, тобто для усіх вони однаково постійно змінюються. Це пов'язано з обертанням планети, переміщенням повітряних мас, опадами тощо. Якщо умови існування відхиляються від оптимальних – метаболізм організму перебудовується настільки, наскільки потрібно, щоби зберегти цілісність і функціонувати у нових умовах. Якщо нові умови стають критичними, більшість організмів успішно використовують стратегію “втечі”: одні перезимовують у норах, інші відлітають у теплі краї і т.п. Рослини ж через свою жорстку статичність не можуть уникнути екстремальних умов, а змушені в них існувати. Тому їхній метаболізм є високоорганізованою реактивною і адаптивною системою.

У процесі еволюції в рослин сформувалася генетична стійкість до умов, які формувалися історично (посухостійкість, холодо- і морозостійкість, стійкість до радіаційного випромінювання тощо). В останні 200 років науково-технічний прогрес додає нові види умов, які стають новими випробуваннями для рослин. Забруднення ґрунтового покриву нафтою і продуктами її переробки є таким прикладом. Проблема не обмежується регіоном чи навіть країною. Не буде перебільшенням сказати, що це – явище загальнопланетарного масштабу, бо якщо видобування нафти є більш-менш локальним, то мережа транспортування нафти і нафтопродуктів обплітає практично всю планету. А внаслідок транспортування (як і під час видобування й переробки) відбувається системне потрапляння забруднювача до ґрунту.

ґрунт для забезпечення життя рослини повинен містити вологу, кисень і доступні елементи живлення. Якщо у ґрунт потрапляє нафта, всі ці якості до певної міри втрачаються.

По-перше, чи не найхарактерніша ознака нафтозабрудненого ґрунту – гідрофобність. Вона є наслідком ефекту цементування ґрунту високомолекулярними смолисто-асфальтоновими сполуками, що наявні у складі нафти і нафтопродуктів. Залежно від типу ґрунту, ці сполуки або сорбуються у верхньому гумусовому горизонті ґрунту,

або проникають по тріщинах уздовж кореневих систем рослин (у важких суглинках), або рухаються вертикально суцільним фронтом (у піщаних ґрунтах) [15, 24]. Ґрунтові частинки, покриті нафтовою плівкою, втрачають здатність поглинати й утримувати вологу. Через це знижуються гігроскопічна вологість, водопроникність і вологоємність ґрунту [5, 13, 24, 26, 30].

Унаслідок цементування із ґрунту витісняється повітря, тому в ґрунті настає кисневе голодування [5, 45].

Наявність елементів живлення визначається діяльністю ґрунтової мікрофлори, а тому прямо залежить як від вологості, так і від аерованості ґрунту. В анаеробному гідрофобному нафтозабрудненому ґрунті різко зменшується кількість і знижується фізіологічна активність аеробних мікроорганізмів, задіяних у мінералізації органічних решток, найпомітніше – целюлозоруйнівних і нітрифікуючих бактерій [3, 4, 20, 24]. Зокрема, кількість нітрифікуючих бактерій у нафтозабрудненому ґрунті може зменшуватися на 83 % [20]. З'ясовано зниження у забрудненому ґрунті активності гідролітичних ензимів, що беруть участь у колообігу Карбону (карбогідрози, інвертази, целюлази, амілази), Нітрогену (нітрит- і нітратредуктази) та Фосфору (фосфогідролаз) [3, 24]. Це спричинює сповільнення процесів трансформації органічних сполук, тому в нафтозабрудненому ґрунті є виразний дефіцит основних елементів живлення.

Крім цих трьох характерних набутих властивостей, у ґрунті після забруднення нафтою виникають й інші негативні зміни (потрапляють токсичні елементи, порушується структура ґрунту, відбувається підлучнення ґрунтового розчину, знижується окисно-відновний потенціал, порушується співвідношення Карбону до Нітрогену та ін.), які детально досліджені на різних типах ґрунтів із різних кліматичних зон і досить повно представлені у літературі [3, 5, 15, 30, 33].

Отже, нафтозабруднений ґрунт – приклад технозему із цілим каскадом нових умов, адаптуватися до яких можуть далеко не всі рослини. У більшості випадків, порівняно з деревними формами і чагарниками, більш нафтоотолерантними є багаторічні трав'янисті рослини. О. М. Шульга зі співавторами [31] ідентифікували рослини, характерні для п'яти нафтозабруднених ділянок на заході України (Львівська та Івано-Франківська області). Після зіставлення власних результатів із даними, отриманими на найрізноманітніших ґрунтах (піщаному, торф'яному, заболоченому) та в різних кліматичних зонах, автори наводять перелік видів рослин, які найчастіше трапляються на нафтозабруднених територіях. Це пирій повзучий (*Elytrigia repens* L.), підбіл (*Tussilago farfara* L.), кульбаба лікарська (*Taraxacum officinale* Wigg.), лядвенець рогатий (*Lotus corniculatus* L.), конюшина біла повзуча (*Trifolium repens* L.), хвощ польовий (*Equisetum arvense* L.), верболізя лучне (*Lysimachia nummularia* L.). Ідентифікація толерантних рослин і дослідження механізмів, що забезпечують їхню адаптацію до цих умов, є важливим завданням, оскільки його вирішення розширить уявлення про потенційні адаптивні можливості рослин, а також дасть змогу використати ці рослини для очищення й відновлення нафтозабруднених ґрунтів.

З огляду на наслідки нафтового забруднення, щоб повернути втрачені властивості ґрунту, потрібні різнопланові заходи. Ми ставимо конкретне завдання – засобами фіторемедіації оптимізувати режим Нітрогену в нафтозабрудненому ґрунті. Це дасть змогу усунути дефіцит цього елемента живлення у забрудненому ґрунті та сприятиме відновленню співвідношення Карбону до Нітрогену в ґрунті. З цієї

метою найдоцільніше використати бобові рослини, оскільки для них, крім нітратної й амонійної форм Нітрогену, доступний також Нітроген азоту атмосфери (N_2), бо вони утворюють симбіози з азотофіксуючими бульбочковими бактеріями.

Бобові є нафтоотолерантними рослинами [7; 14; 31; 35]. Нами виявлено толерантність до умов нафтозабрудненого ґрунту рослин люцерни хмелеподібної (*Medicago lupulina* L.) [42; 44], сої щетинистої (*Glycine max* Moench.) [37; 41; 43], конюшини лучної (*Trifolium pratense* L.) [8; 12; 34].

Встановлено, що молекулярний азот може фіксуватись у нафтозабрудненому ґрунті, оскільки в ньому формувалися функціональні бобово-ризобіальні симбіози. Виявлено формування у нафтозабрудненому ґрунті симбіозів між рослинами люцерни округлої й аборигенними бульбочковими бактеріями [42]. З'ясовано формування і функціонування бобово-ризобіальних симбіозів рослинами сої щетинистої за умови бактеризації насіння сої бульбочковими бактеріями *Bradyrhizobium japonicum* [40]. Симбіотичні системи сої щетинистої з *B. japonicum* формувалися за 5 і 8 % нафти у ґрунті. За 5 % нафти у ґрунті кореневих бульбочок утворювалося менше, але вони були більших розмірів порівняно з бульбочками, що утворювалися в нормі. За 8 % нафти у ґрунті меншими були і кількість, і розміри утворених бульбочок. Інтенсивність азотофіксації у симбіозі сої з *B. japonicum* за наявності 5 % нафти у ґрунті була навіть вищою, ніж у ґрунті без нафти (1,82 мкмоль C_2H_4 / рослину · год проти 0,62 мкмоль C_2H_4 / рослину · год відповідно). Функціональне симбіотичне партнерство у нафтозабрудненому ґрунті виникало також у рослин конюшини лучної та *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* унаслідок бактеризації насіння штамом-стандартом 348а й активними штамми BN9 та A91 *Rh. leguminosarum* bv. *trifolii* (з колекції *Rhizobium* Інституту фізіології рослин і генетики НАН України) [38, 39].

Адаптація бобових рослин до умов нафтозабрудненого ґрунту й виникнення у ньому бобово-ризобіальних симбіозів потребує реагування і змін на всіх рівнях – від генетичної регуляції до анатомо-морфологічних проявів. Дослідження механізмів адаптації бобових до умов нафтозабрудненого ґрунту нами розпочато із вивчення обміну Нітрогену, оскільки його роль у метаболізмі є визначальною, бо цей елемент необхідний для синтезу білків і нуклеїнових кислот.

Вміст нітратного і амонійного Нітрогену у ґрунті й рослинах. Дослідження проведено на рослинах конюшини лучної (*Trifolium pratense* L.) сорту Передкарпатська 6 селекції Інституту сільського господарства Карпатського регіону НААН України (сmt Оброшино Львівської обл.), вирощуваних у забрудненому сирію нафтою (5 %) дерново-підзолистому суглинковому ґрунті за контрольованих умов освітлення (1200 лк), температури (22 °C) та 16-годинного світлового періоду.

Спрямованість обміну Нітрогену в рослині залежить від кількості доступного N у ґрунті. На момент посіву насіння конюшини лучної вміст амонійного Нітрогену в забрудненому нафтою ґрунті був меншим на 23 %, а нітратного N було менше на 30 % (див. таблицю).

Очевидно, забруднення нафтою пригнічувало процеси амоніфікації та нітрифікації у ґрунті. Також можлива інтенсифікація процесів денітрифікації, бо кількість денітрифікаторів у забрудненому ґрунті може зростати [20]. Отже, насіння висівали у ґрунт зі суттєвим дефіцитом Нітрогену.

Після 30 діб росту конюшини лучної кількість нітратного Нітрогену в нафтозабрудненому ґрунті зменшилася майже на порядок, а амонійного – на 65 %, тоді як

у ґрунті в нормі кількість нітратного й амонійного Нітрогену зменшувалася приблизно на 50 % кожного [37, 12]. Тобто із забрудненого ґрунту за час росту рослин виносилось більше мінерального Нітрогену, а особливо – нітратного, ніж із контрольного ґрунту. Причиною цього може бути використання мінерального Нітрогену нафтоокиснювальними мікроорганізмами, кількість яких у забрудненому ґрунті зростає [7]. Не виключено також, що це може бути пов'язано з посиленням поглинання іонів NH_4^+ , особливо NO_3^- , із ґрунту коренями для задоволення потреб рослин у нітрогеномісних сполуках за дефіциту Нітрогену в нафтозабрудненому ґрунті. Проте для таких висновків треба досліджувати активність транспортних насосів рослин.

Агрохімічні властивості ґрунту на момент посіву насіння (мг / кг сухого ґрунту)

Soil agrochemical properties at the moment of seeding (mg / kg of dry soil)

Варіант	pH _{KCl}	NH_4^+	NO_3^-
Ґрунт у нормі	5,2	3,01 ± 0,21	13,86 ± 1,22
Забруднений нафтою ґрунт (5%)	5,4	2,16 ± 0,16*	9,70 ± 1,06*

Примітка: * – відмінності показників щодо контролю вірогідні за $p \leq 0,05$

Comment: * – indicators deviations in comparison to control are possible at $p \leq 0.05$

Поглинаний NO_3^- може відновлюватися до NH_4^+ відразу в коренях рослин, а може транспортуватися до листків і відновлюватися там. У рослинах конюшини лучної у нормі на всіх досліджуваних стадіях – стадії сім'ядольних листків, стадії першого справжнього та першого трійчастого листка – був наявний пул NO_3^- у листках. До того ж на останній досліджуваній стадії – стадії першого трійчастого листка – він був навіть більшим, ніж у коренях рослин [9]. Тобто у нормі в рослинах конюшини лучної поглинутий NO_3^- транспортується до листків і там відновлюється. У рослинах із нафтозабрудненого ґрунту вміст нітратного Нітрогену як у коренях, так і в листках на всіх досліджуваних стадіях розвитку був у середньому на порядок нижчим, ніж в органах рослин у нормі. Якщо взяти до уваги, що із нафтозабрудненого ґрунту (з дефіцитом мінерального Нітрогену) виносилось більше нітратного Нітрогену, ніж із незабрудненого, а в органах рослин за умов нафтового забруднення цієї форми Нітрогену було вкрай мало, то це свідчить про те, що поглинуті нітрати могли швидко відновлюватися до амонію відразу в коренях рослин.

Визначенням кількості амонійного Нітрогену встановлено, що у нормі на стадії сім'ядольних листків і стадії першого справжнього листка його вміст був більшим у коренях, однак на наступній стадії – стадії першого трійчастого листка – відбувся перерозподіл: вміст амонію в коренях зменшився, а в листках – утричі збільшився. На перших двох стадіях кількості NH_4^+ були більшими в коренях порівняно з листками і в рослинах із нафтозабрудненого ґрунту. Проте на стадії першого справжнього листка перерозподіл не відбувся, а навпаки, кількість амонійного Нітрогену в коренях рослин істотно зростає.

Тобто в нормі на час, коли уже починають формуватися справжні трійчасті листки, відновлення нітратів, імовірно, відбувається переважно в листках рослин. Що ж стосується рослин із нафтозабрудненого ґрунту, то відновлення нітратів до NH_4^+ , імовірно, продовжує відбуватися у коренях.

Включення амонію в метаболізм рослин конюшини лучної на стадії сім'ядольних листків. Акцептором NH_4^+ є глутамат (глутамінова кислота). Включення амонію в метаболізм здійснює глутамінсинтетаза (ГС) у глутаматсинтазному циклі [23]. Глутамінсинтетаза забезпечує приєднання амонію до глутамату з утворенням глутаміну (аміду) (див. рисунок).

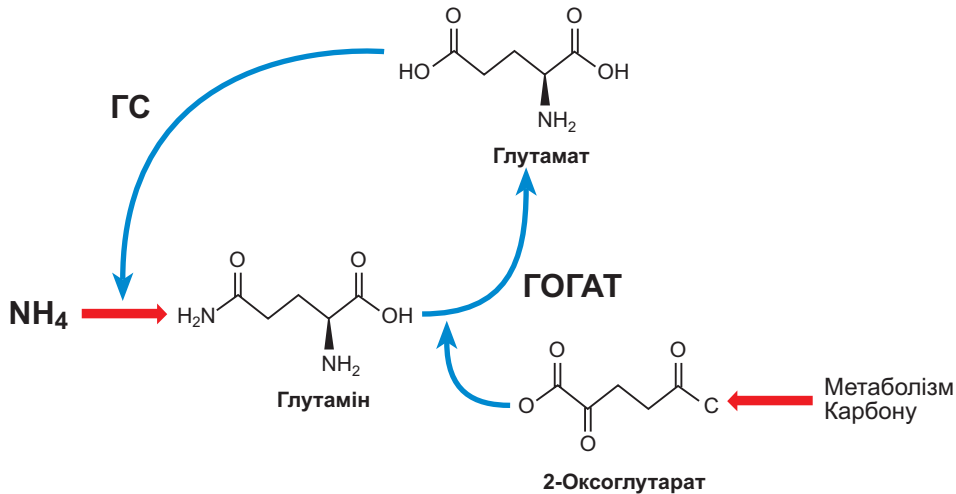


Схема асиміляції амонію ГС-ГОГАТ шляхом (за [23])

Scheme of ammonium assimilation by the glutamate synthase (GS/GOGAT) pathway (by [23])

Глутаматсинтаза (або глутамін 2-оксоглутарат амінотрансфераза (ГОГАТ)) перетворює утворений глутамінсинтетазою глутамін на 2 молекули глутамату завдяки перенесенню групи NH_3 глутаміну на 2-оксоглутарат. Утворювані глутамін і глутамат є джерелом Нітрогену для амінокислот, азотистих основ, нуклеїнових кислот і ін. [23].

У стресових умовах, як правило, спостерігається інгібування активності ензимів ГС-ГОГАТ циклу, що проявляється у зменшенні кількості амінокислот і білків, а отже – в інгібуванні росту рослин. Проте глутамат є попередником сполук із протекторними властивостями, тому за їх потреби у стресових умовах активність ензимів глутаматсинтазного циклу може зростати.

У рослинах конюшини лучної на досліджуваних стадіях онтогенезу процеси асиміляції амонію інтенсивніше відбувались у коренях, що засвідчила вища у коренях глутамінсинтетазна активність [11, 36]. У нормі глутамінсинтетазна активність у коренях на двох перших стадіях розвитку залишалася на рівні 15,3 мкМ Р / мг білка · хв і надалі (на стадії першого справжнього листка) зростала до 84,5 мкМ Р / мг білка · хв. За умов нафтового забруднення ґрунту глутамінсинтетазна активність у коренях рослин конюшини лучної становила 30,1 мкМ Р / мг білка · хв на найпершій стадії розвитку та 56 мкМ Р / мг білка · хв – на стадії першого справжнього листка. Тобто на найпершій стадії росту в нафтозабрудненому ґрунті у коренях рослин відбувається інтенсивніший синтез глутаміну. Та подальшої інтенсифікації синтезу глутамату з глутаміну не відбувалось, оскільки глутаматсинтазна активність у коренях рослин у цей час знижувалась. Як наслідок, у коренях рослин конюшини лучної

на найпершій стадії – стадії сім'ядольних листків – мав би нагромаджуватися глутамін. Це і відбувалося, бо встановлено істотне зростання вмісту амідів у коренях і листках рослин конюшини лучної на всіх трьох досліджуваних стадіях, а особливо (у три рази) – у коренях на стадії сім'ядольних листків [36]. Говорячи про зростання кількості амідів, можемо припускати зростання кількості саме глутаміну, бо інший амід – аспарагін – зазвичай утворюється у результаті розпаду білків (у насінні чи у старих листках), а у молодих рослинах переважно синтезується глутамін. Водночас на стадії сім'ядольних листків у *листках* конюшини лучної за умов нафтозабрудненого ґрунту зростала і глутамінсинтезна, і глутаматсинтезна активність. Тому, ймовірно, зростала інтенсивність синтезу глутамату в листках, однак тільки на стадії сім'ядольних листків. Надалі активність ензимів ГС-ГОГАТ циклу за умов нафтозабрудненого ґрунту знижувалась.

Отож, на найпершій стадії росту конюшини лучної у нафтозабрудненому ґрунті відбуваються зміни активності ензимів ГС-ГОГАТ шляху, потрібні для отримання підвищених кількостей амідів у коренях і глутамату в листках рослин. Наявність глутаміну важлива для реакцій переамінування, оскільки глутамін віддає амідну групу для утворення амінокислот та інших сполук (глюкозамінів, азотистих основ та ін.). Також глутамін – основна транспортна форма Нітрогену. Утворюваний у коренях, він може транспортуватися до листків, аби покривати там потреби у глутаматі (після дезамінування глутаматсинтазою). Глутамат є попередником протекторної сполуки – проліну. Ключовим ензимом синтезу проліну є $\Delta 1$ -піролін-5-карбоксилатсинтаза, що каталізує подвійну реакцію перетворення глутамату у $\Delta 1$ -піролін-5-карбоксилат за участю АТФ і НАДФ⁺ [19]. Тому, щоби синтезувати кількості проліну, достатні для виконання захисних функцій за стресових умов, необхідна активація біосинтезу глутамату [6]. Пролін може синтезуватися й іншим (орнітиновим) шляхом, проте велика частина пулу проліну в стресових умовах синтезується саме цим шляхом [17].

Тож індукція активності ензимів ГС-ГОГАТ шляху та ймовірне нагромадження глутамату в рослинах конюшини лучної за умов нафтозабрудненого ґрунту можуть бути спричинені потребою у збільшенні кількості проліну. Як з'ясувалося, вміст проліну в рослинах конюшини лучної на найпершій стадії росту в нафтозабрудненому ґрунті зростав усемеро в листках і втричі – у коренях рослин [10, 36]. Тому його значення в адаптації рослин конюшини лучної до умов нафтозабрудненого ґрунту не викликає жодних сумнівів. З огляду на особливості водного режиму нафтозабрудненого ґрунту, найімовірніше, є потреба у проліні як осморегуляторі. Проте пролін може виконувати й інші функції, а саме: стабілізувати білки, брати участь у підтримці потоку електронів у електрон-транспортних ланцюгах хлоропластів, стабілізувати окисно-відновний баланс, слугувати джерелом запасного Нітрогену, запобігати пошкодженню фотосинтетичного апарату, стабілізувати полірибосоми й ін. [16, 17]. Оскільки з'ясовано, що за дії нафтового забруднення індукуються реакції окисдативного стресу в рослинах бобів і люцерни [44, 14, 34], то пролін може бути використаний і як антиоксидант. Антиоксидантну дію проліну пов'язують із його здатністю захищати білки й білково-ліпідні комплекси мембран інактивацією гідроксильних радикалів та інших АФК [29]. Пролін, який синтезується на початкових етапах онтогенезу рослин, може слугувати як джерело енергії (гідроліз 1 молекули проліну забезпечує утворення 30 молекул АТФ) [19].

Крім проліну, на найпершій стадії росту конюшини лучної за умов нафтозабрудненого ґрунту в коренях і листках рослин достовірно збільшувалася також сумарна кількість амінокислот [11]. Амінокислоти – не лише основа для синтезу білків, вони можуть також впливати на роботу білоксинтезуючого апарату: аланін і орнітин можуть збільшувати агрегацію полірибосом, а під дією аланіну може зменшуватися час елонгації синтезованих поліпептидних ланцюгів [16]. Вільні амінокислоти задіяні у формуванні осмотичного потенціалу клітин і здійснюють регуляторні функції, впливаючи на активність фітогормонів; окремі амінокислоти можуть проявляти антиоксидантні властивості [16].

Отже, на найпершій стадії росту рослин конюшини лучної у нафтозабрудненому ґрунті виявлено таку адаптивну спрямованість метаболізму Нітрогену: імовірно переважання відновлення нітратів у коренях, а не у листках; зміни активності ензимів ГС-ГОГАТ циклу – зростання глутамінсинтетазної та зниження глутаматсинтетазної активності, спрямовані на швидке включення амонію у глутамін у коренях і на синтез глутамату в листках; нагромадження у коренях і листках амідів, проліну та сумарної кількості вільних амінокислот.

Спрямованість обміну Нітрогену в рослинах конюшини лучної на стадіях першого справжнього і першого трійчастого листків. У наступні періоди росту рослин конюшини лучної у нафтозабрудненому ґрунті відбулося зниження активності ензимів ГС-ГОГАТ циклу, особливо – глутаматсинтази в листках рослин конюшини лучної на стадії першого трійчастого листка. У цей час і проліну в органах рослин синтезувалося вже не так багато, а збільшення сумарної кількості вільних амінокислот узагалі було неістотним. Проте продовжували утворюватися більші кількості іншої амінокислоти – аргініну, особливо у коренях рослин.

Аргінін є амінокислотою, яка містить N більше, ніж будь-яка інша амінокислота (32 % аргініну становить Нітроген). Нагромадження аргініну відбувається за стресових умов, коли вичерпується глюкоза і за дефіциту карбоновмісних субстратів аміак не може зв'язуватися для біосинтезу амінокислот, а тому нагромаджується у формі сполук із високим відношенням N/C. Тоді аргінін виконує функцію депо Нітрогену [21, 27].

На цій стадії росту в рослинах конюшини лучної за умов нафтозабрудненого ґрунту спектральним аналізом білків виявлено зменшення (утричі) кількості рибулособіфосфаткарбоксилази (РУБІСКО) – ключового ензиму темної стадії фотосинтезу, що каталізує реакцію фіксації CO₂ до рибулособіфосфату [38, 41]. Цей факт переконливо вказує на те, що інтенсивність фотосинтетичних процесів у рослинах конюшини лучної за дії умов нафтозабрудненого ґрунту знижується, а отже, меншими будуть кількості утворюваних фотоасимілятів. Тому може нагромаджуватися амоній, а отже, виникає потреба у його зв'язуванні. Це може бути однією із причин встановленого зростання кількості аргініну в органах рослин за умов нафтозабрудненого ґрунту на всіх досліджуваних стадіях. Нагромаджений аргінін може слугувати не лише як депо Нітрогену. Його можна використати і для біосинтезу поліамінів, таких як путресин, спермідин і спермін, які відіграють важливу роль у формуванні адаптації рослин до стресових умов [1].

Зменшення у листках конюшини лучної за умов нафтозабрудненого ґрунту кількості РУБІСКО може пояснювати і встановлене зниження активності ензимів ГС-ГОГАТ циклу: для роботи глутаматсинтази необхідний 2-оксоглутарат, який

є результатом метаболізму Карбону. Інгібувати активність глутамінсинтетази можуть також нагромаджені аміди за принципом негативного зворотного зв'язку [32].

За дефіциту фотоасимілятів виникає потреба у субстратах для дихання. З цією метою у клітинах може відбуватися дезамінування амінокислот: вивільнені NH_3 використовуються на синтез амідів, а отримувані кетокислоти надходять у ЦТК. Прикладом цього є дезамінування глутамату до 2-оксоглутарату завдяки глутаматдегідрогеназі (ГДГ). Зростання глутаматдегідрогеназної активності було характерне для рослин конюшини лучної із нафтозабрудненого ґрунту: починаючи зі стадії першого справжнього листка, особливо на наступній стадії (першого трійчастого листка) глутаматдегідрогеназна активність зростала майже на 20 % у листках і на 60 % – у коренях рослин [36].

Дезамінування глутамату – основна роль глутаматдегідрогенази [2, 28]. Асиміляція амонію в рослинах відбувається через ГС-ГОГАТ шлях. Проте ГДГ також може працювати в напрямі асиміляції амонію: з'ясовано, що мітохондріальна НАД(Н)-ГДГ забезпечує синтез глутамату завдяки приєднанню амонію до 2-оксоглутарату [18, 22, 23, 25]. У напрямі асиміляції амонію глутаматдегідрогеназа і глутамінсинтетаза не можуть працювати одночасно. Це пов'язано з тим, що вони мають різну спорідненість до амонію: глутамінсинтетаза активується за концентрації амонію 3–5 мкМ, а глутаматдегідрогеназа – 10–80 мМ. Високі концентрації амонію блокують роботу глутамінсинтетази, тому за цих умов асиміляція амонію відбувається завдяки роботі глутаматдегідрогенази. Активність ГДГ залежить також від кількості Карбону в рослині. Високий рівень вуглеводів може інгібувати активність глутаматдегідрогенази [23]. З огляду на це, вважають, що рівень активності ГДГ є індикатором співвідношення Карбону / Нітрогену в рослині та виконує сигнальну роль у рості й розвитку рослин. За цим показником встановлене зростання ГДГ активності в органах конюшини лучної за умов нафтозабрудненого ґрунту свідчить про низький рівень вуглеводів у рослинах.

Індуковане умовами нафтозабрудненого ґрунту зниження активності ензимів ГС-ГОГАТ шляху в коренях і листках конюшини лучної, особливо активності ГОГАТ у листках на стадії першого трійчастого листка означає, що в рослинах утворюються малі кількості глутамату. Тому зростання активності ГДГ може бути пов'язане як із потребою в альтернативних субстратах дихання, так і з потребою у глутаматі.

Асиміляція амонію та синтез глутамату – необхідна умова для синтезу білків. Характерно, що за умов нафтозабрудненого ґрунту в коренях і листках конюшини лучної на всіх досліджуваних стадіях росту кількості білків були меншими, а вміст небілкових форм Нітрогену зростав [8, 36]. Найменше білків за умов нафтозабрудненого ґрунту було в коренях рослин на стадії першого трійчастого листка.

Спектральним аналізом білків рослин конюшини лучної на стадії першого справжнього листка встановлено, що умови нафтозабрудненого ґрунту індукували синтез стресових білків. У *листяках* рослин, вирощених у забрудненому ґрунті, синтезувався білок із молекулярною масою, близькою 120 кД, якого не виявлено у листках рослин із контролю. І за умов нафтового забруднення ґрунту, і в нормі у *листяках* конюшини лучної синтезувалися білки з Mr 75 і 110 кД, але у рослинах зі забрудненого ґрунту кількості цих білків були більшими (у середньому на 75 %). У *коренях* рослин конюшини лучної за умов нафтозабрудненого ґрунту більшими (майже утричі) були кількості білків із молекулярними масами 90, 50, 39 та 37 кД, тоді як у нормі білки з Mr 90 і 37 кД у білковому спектрі коренів рослин були мінорними [38, 41].

Тож на стадіях першого справжнього і першого трійчастого листків у рослинах конюшини лучної за умов нафтозабрудненого ґрунту інгібувалась активність ензимів асиміляції амонію, проте зростала глутаматдегідрогеназна активність; нагромаджувались амідни й аргінін, синтезувалися стресові білки.

ВИСНОВКИ

Узагальнюючи представлені дані, можна стверджувати, що обмін Нітрогену в рослинах конюшини лучної є важливою ланкою адаптації рослин до умов ґрунту, забрудненого нафтою. Адаптивні перебудови метаболізму Нітрогену забезпечують: 1) відновлення нітратів у коренях рослин; 2) швидке включення амонію у транспортні форми (глутамін) у коренях рослин; 3) забезпечення рослин низькомолекулярними нітрогеновмісними протекторними сполуками (проліном та іншими вільними амінокислотами); 4) забезпечення рослин глутаматом для підтримки синтезу білків і, зокрема, стресових; 5) зв'язування неасимільованого амонію у сполуки з високим співвідношенням Нітроген / Карбон (амідни, аргінін).

На найпершій стадії росту рослин конюшини лучної у нафтозабрудненому ґрунті – стадії сім'ядольних листків індукуються зміни активності ензимів глутаматсинтазного циклу, спрямовані на нагромадження глутаміну в коренях і глутамату – в листках рослин; зростає кількість проліну і сумарний вміст вільних амінокислот, особливо у листках; у коренях і листках рослин нагромаджуються амідни.

На стадії першого трійчастого листка у рослинах конюшини лучної за умов нафтозабрудненого ґрунту знижується активність ензимів глутаматсинтазного циклу, особливо глутаматсинтази у листках рослин; зростає глутаматдегідрогеназна активність у коренях і листках, яка на тлі низьких кількостей глутамату і вуглеводів (бо встановлено зменшення кількості рибулозобіфосфаткарбоксилази) може активуватись як для синтезу глутамату, так і для його дезамінування з метою постачання кислот у цикл трикарбонових кислот; у коренях і листках рослин нагромаджуються сполуки з високим співвідношенням Нітроген / Карбон – амідни й аргінін, також – синтезуються стресові білки.

Виявлені особливості обміну Нітрогену в органах конюшини лучної мають важливе значення для розуміння механізмів адаптації рослин до умов нафтозабрудненого ґрунту.

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Animal Rights: This article does not contain any studies with animal subjects performed by the any of the authors.

1. Alcazar R., Altabella T., Marco F., Bortolotti C., Reymond M., Koncz C., Carrasco P., Tiburcio A.F. Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta*, 2010; 231: 1237–1249.
[DOI: <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1130-0>; PMID: 20221631; Google Scholar]
2. Aubert S., Bligny R., Douce R., Gout E., Ratcliffe Rg., Roberts J. Contribution of glutamate dehydrogenase to mitochondrial glutamate metabolism studied by ¹³C and ³¹P nuclear magnetic resonance. *Journal of Experimental Botany*, 2001; 52: 37–45.
[DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/52.354.37>; PMID: 11181711; Google Scholar]

3. Borowik A., Wyszowska J., Kucharski M., Kucharski J. Implications of Soil Pollution with Diesel Oil and BP Petroleum with active Technology for Soil Health. **Int J Environ Res Public Health**, 2019; 16(14): 2474. [DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph16142474>; PMID: 31336741; Google Scholar]
4. Bunio L.V., Tsvilynyuk O.M., Mykiyevych I.M., Velychko O.I., Terek O.I. Microflora activity of crude oil contaminated soil in rhizosphere of *Carex hirta* L. plants. **Studia Biologica**, 2010; 4(3): 55–62. (In Ukrainian) [DOI: <https://doi.org/10.30970/sbi.0403.109>; Google Scholar]
5. Devatha C.P., Vishnu Vishal A., Purna Chandra Rao J. Investigation of physical and chemical characteristics on soil due to crude oil contamination and its remediation. **Appl Water Sci**, 2019; 9: 89. [DOI: <https://doi.org/10.1007/s13201-019-0970-4>; Google Scholar]
6. Diaz P., Betti M., Sanchez D., Udvardi M. Deficiency in plastidic glutamine synthetase alters proline metabolism and trans-scriptomic response in *Lotus japonicus* under drought stress. **New Phytol**, 2010; 188: 1001–1013. [DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03440.x>; PMID: 20796214; Google Scholar]
7. Dzhura N.M., Moroz O.M., Rusyn I.B., Kulachkovsky O.R., Tsvilynyuk O.M., Terek O. Influence of the fodder beans (*Vicia faba* var. Minor) on the nitrogen metabolism of the microbe associations in the oil-polluted soil I. **Soil Science**, 2010; 11(3–4): 105–112. (In Ukrainian) [Google Scholar]
8. Dovgajuk-Semenuk M., Velychko O., Terek O. The content nitrogen in the red clover plants (*Trifolium pratense* L.) for the actions of oil polluted soil and provided with fertilizers dressing. **Visnyk of the Lviv University. Series Biology**, 2014; 65: 365–371. (In Ukrainian) [Google Scholar]
9. Dovgajuk-Semenuk M.V., Velychko O.I., Terek O.I. The content of ammonium and nitrate nitrogen in the red clover plants under the influence of oil polluted soil and fertalization with phosphorus-potassium fertilizers. **Scientific Issue TNP. Series: Biology**, 2015; 1(62): 94–99. (In Ukrainian) [Google Scholar]
10. Dovgajuk-Semenuk M.V., Velychko O.I., Terek O.I. The content of free amino acids in the red clover plants under the influence of oil polluted soil. **Studia Biologica**, 2016; 10(2): 115–122. (In Ukrainian) [DOI: <https://doi.org/10.30970/sbi.0403.109>; Google Scholar]
11. Dovgajuk-Semenuk M.V., Velychko O.I., Terek O.I. The activity of the glutamate synthase pathway enzymes in *Trifolium pratense* L. plants under the conditions of oil polluted soil. **Fiziol. Rast. Genet.**, 2018; 50(1): 77–82. (In Ukrainian) [DOI: <https://doi.org/10.15407/frg2018.01.077>; Google Scholar]
12. Dovgajuk-Semenuk M.V., Velychko O.I., Terek O.I. The content of basic nutrients and growth the red clover plants in oil polluted soil fertilized with Micro-Vital bacterial fertilizer. **Scientific Bulletin of UNFU**, 2014; 24.9: 128–131. (In Ukrainian)
13. Kachala T.B. Monitoring of soil depleted oil and gas fields. **Ecological Safety and Balanced Use of Resources**, 2016; 2: 40–44. (In Ukrainian)
14. Karpyn O., Djura N., Terek O., Tsvilynyuk O. Influence of oil pollution on growth parameters, hydrogen peroxide amount and peroxidase activity of bean plants (*Vicia faba* L.). **Visnyk of the Lviv University. Series Biology**, 2008; 47: 160–165. (In Ukrainian)
15. Kireeva N.A., Kuzyakhmetov G.G., Miftakhova A.M., Vodopyanov V.V. **Phytotoxicity of anthropogenically contaminated soils**. Ufa, 2003. 266 p. (In Russian)
16. Kolupaev Yu.Ye., Karpets Yu.V. Participation of soluble carbohydrates and low-molecular nitrogen compounds in adaptive reactions of plants. **Journal of V. N. Karazin Kharkiv National University. Series Biology**, 2010; 2(20): 36–53. (In Russian)
17. Kolupaev Yu.E., Vayner A.A., Yastreb T.O. Proline: physiological functions and regulation of its content in plants under stress conditions. **Journal of V. N. Karazin Kharkiv National University. Series Biology**, 2014; 2(32): 6–22. (In Russian)

18. Kwinta J., Bielawski W. Glutamate dehydrogenase in higher plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, 1998; 20: 453–463.
[DOI: <https://doi.org/10.1007/s11738-998-0033-1>; Google Scholar]
19. Liang X., Zhang L., Natarajan SK., Becker DF. Proline mechanisms of stress survival. **Antioxidants and Redox Signaling**, 2013; 19(9): 998–1011.
[DOI: <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5074>; PMID: 23581681; Google Scholar]
20. Malynovska I.M., Zinovieva N.A. Microbiological processes in the rhizosphere of the plants in the contaminated soil with oil products. **Microbiology & Biotechnology**, 2011; 2: 83–91. (In Ukrainian)
[DOI: <https://doi.org/10.18524/2307-4663>]
21. Martinelli T., Whittaker A., Bochicchio A., Vazzana C., Suzuki A., Masclau-Daubresse C. Amino acid pattern and glutamate metabolism during dehydration stress in the ‘resurrection’ plant *Sporobolus stapfianus*: a comparison between desiccation-sensitive and desiccation-tolerant leaves. **Journal of Experimental Botany**, 2007; 58(11): 3037–3046.
[DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/erm161>; PMID: 17901195; Google Scholar]
22. Masclaux-Daubresse C., Valadier M., Carrayol E., Reisdorf-Cren M., Hirel B. Diurnal changes in the expression of glutamate dehydrogenase and nitrate reductase are involved in the C/N balance of tobacco source leaves. **Plant Cell Environ**, 2002; 25: 1451–1462.
[DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2002.00925.x>; Google Scholar]
23. Masclaux-Daubresse C., Reisdorf-Cren M., Pageau K., Lelandais M., Grandjean O., Kronenberger J. Glutamine synthetase-glutamate synthase pathway and glutamate dehydrogenase play distinct roles in the sink source nitrogen cycle in tobacco. **Plant Physiology**, 2006; 140: 444–456.
[DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.105.071910>; PMID: 16407450; Google Scholar]
24. Miroshnichenko M.M., Fateev A.I., Panasenko E.V., Yakushko V.I. Changes of the soil fertility in hydrocarbon contamination. **Bulletin of Agricultural Science**, 2002; 10: 52–54. (In Ukrainian)
25. Oaks A. Evidence for deamination by glutamate dehydrogenase in higher plants: reply. **Can J Bot**, 1995; 73: 1116–1117.
[DOI: <https://doi.org/10.1139/b95-121>; Google Scholar]
26. Pisarenko P.V., Kolesnikova L.A. Features of influence polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental objects. **Bulletin of Poltava State Agrarian Academy**, 2004; 1: 107–112. (In Ukrainian)
27. Rabe E. Altered nitrogen metabolism under environmental stress condition. **Handbook of plant and crop stress**. Marcel Dekker, 1999: 349–365.
[DOI: <https://doi.org/10.1201/9780824746728.ch15>; Google Scholar]
28. Robinson S.A., Stewart G.R., Phillips R.A. Regulation of glutamate dehydrogenase activity in relation to carbon limitation and protein catabolism in carrot cell suspension cultures. **Plant Physiol**, 1992; 98: 1190–1195.
[DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.98.3.1190>; PMID: 16668745; Google Scholar]
29. Saradhi P.P., Arora S., Prasad V.V. Proline accumulation in plants exposed to UV radiation protects them against induced peroxidation. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, 1995; 290: 1–5.
[DOI: <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.1461>; PMID: 7726821; Google Scholar]
30. Shuguang W., Yan Xu, Zhaofeng Lin, Zhaofeng Lin, Jishi Z., Namkha N., Wei L. The harm of petroleum-polluted soil and its remediation research. **AIP Conference Proceedings**, 1864; 2017: 020222.
[DOI: <https://doi.org/10.1063/1.4993039>; Google Scholar]
31. Shulga O.M., Vildanova-Martshishin R.I., Shcheglova N.S., Karpenko O.V., Martyniuk N.B., Novikov V.P. Study of plant diversity of contaminated sites in the western region of Ukraine for use in phytoremediation methods. **Journal of National University “Lviv Polytechnic”**, 2008; 622: 120–124. (In Ukrainian)
32. Suzuki A., Knaff D. Glutamate synthase: structural, mechanistic and regulatory properties, and role in the amino acid metabolism. **Photosynthesis Research**, 2005; 83: 191–217.
[DOI: <https://doi.org/10.1007/s11120-004-3478-0>; PMID: 16143852; Google Scholar]

33. Tang D., Angela J. Phytoremediation of crude oil-contaminated soil with local plant species. **IOP Conf. Series: Mater. Sci. Eng.**, 2019; 495 012054. [DOI: <https://doi.org/10.1088/1757-899X/495/1/012054>; [Google Scholar](#)]
34. Terek O.I., Velychko O.I., Dzhura N.M. Physiological aspects of plant adaptation to oil-contaminated soil. **Plant Physiology: Problems and Prospects for Development: collection of scientific works**. Kyiv: Logos, 2009; 1: 217–225. (In Ukrainian)
35. Terek O., Lapshyna O., Velychko O., Bunyo L., Dovgaiuk-Semeniuk M. Crude oil contamination and plants. **Journal of Central European Green Innovation**, 2015; 3(2): 175–184. [[Google Scholar](#)]
36. Velychko O., Dovgaiuk-Semeniuk M., Terek O. Nitrogen metabolism in the red clover plants (*Trifolium pratense* L.) under the influence of oil polluted soil. **Tanulmány kötetek Báthory-Brassainemzet közti multidiszcipl. konf. “Kárpát-medencei versenyképesség”**, május 19–20, 2016. Budapest, Óbudai Egyetem, 2016; 2: 429–434.
37. Velychko O. I. Nitrate Nitrogen content in soul and soybeans plants organs under oil soil pollution. **Scientific Bulletin of UNFU**, 2011; 21: 351–354. (In Ukrainian) [[Google Scholar](#)]
38. Velychko O.I. Role of proteins in the adaptation of red clover plants inoculated with *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* to the condition of oil polluted soil. **Scientific Issue TNP. Series: Biology**, 2014; 3(60): 58–61. (In Ukrainian)
39. Velychko O.I. The influence of seeds bacterization with active strains of *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* on the nodulation ability of red clover in the oil polluted soil. **Scientific Bulletin of UNFU**, 2013; 32: 24–31. (In Ukrainian) [[Google Scholar](#)]
40. Velychko O.I. Effectiveness of symbiotic system *Bradyrhizobium japonicum* – soy plants in the oil polluted soil. **Visnyk of the Lviv University. Series Biology**, 2012; 58: 150–157. (In Ukrainian)
41. Velychko O.I. Fractional composition of proteins in the organs of soybean plants adapted to oil polluted soil. **Scientific Bulletin of UNFU**, 2012; 22.04: 91–96. (In Ukrainian)
42. Velychko O.I. Morphological structure of *Medicago lupulina* L. roots and ability to forming of root nodules in oil polluted soils. **Scientific Herald of Chernivtsi University. Biology (Biological System)**, 2011; 3(4): 45–49. (In Ukrainian)
43. Velychko O., Sokol O., Terek O. The suction force of root cells of soya plants at the extrem water terms of oil pollution soil. **Visnyk of the Lviv University. Series Biology**, 2009; 49: 203–207. (In Ukrainian) [[Google Scholar](#)]
44. Velychko O., Terek O. The influence of oil polluted soil on the contents of ascorbic acid and ascorbate oxydase activity in organs of alfalfa plants. **Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences**, 2008; 10(3): 144–148. (In Ukrainian)
45. Zhuravel N.E., Naydyonova O.E., Yaremenko V.V. Assessment of soils' reclamation quality in the location of oil- and gas-wells using microbial communities as indicator. **AgroChemistry and Soil Science**, 2017; 86: 107–115. (In Ukrainian) [DOI: <https://doi.org/10.31073/acss86-16>; [Google Scholar](#)]

THE ROLE OF NITROGEN METABOLISM IN RED CLOVER ADAPTATION TO THE CONDITIONS OF OIL POLLUTED SOIL

O. I. Velychko

Ivan Franko National University of Lviv, 4, Hrushevskyyi St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: oksana.welychko@lnu.edu.ua

Previously obtained data concerning nitrogen metabolism features in red clover plants on the primary stages of growth in the oil polluted (5 %) sod-podzolic loamy soil

were analyzed. It was revealed that on all investigated stages of plant growth (stage of cotyledon leaves, stage of first true leaf and stage of first trifoliolate leaf) in both red clover roots and leaves there were more non-protein nitrogen forms than protein ones. That indicates an adaptive role of low molecular nitrogen-containing compounds under the conditions of oil polluted soil. Changes of different low molecular Nitrogen compounds content and the activity of main enzymes of ammonium assimilation were detected in red clover plants on primary stages of growth in the oil polluted soil. The peculiarities of nitrogen metabolism in red clover plants under the condition of oil polluted soil **on the stage of cotyledon leaves** are as following: 1) redistribution of nitrates and ammonium content in the red clover organs that testifies to the fact that nitrates restoration normally takes place in leaves, while under the conditions of oil polluted soil – in plant roots; 2) changes in activity of enzymes of glutamate synthase pathway, namely an increase of glutamine synthetase and inhibition of glutamate synthase activities aimed at accumulation of glutamine in roots of the plant and of glutamate – in leaves; 3) amides accumulation, especially, in roots; 4) an increase in proline amount: 7 times in leaves and 3 times – in plant roots; 5) an increase in total amount of free amino acids, most by in leaves. **On the stages of first true and first trifoliolate leaf**, nitrogen metabolism in red clover plants under the conditions of oil polluted soil had different role: 1) inhibited enzymes of glutamate synthase pathway, especially – the glutamate synthase activity in the leaves on the stage of first trifoliolate leaf; 2) gradually proline accumulation has been less expressed: its content in leaves was 6 times higher at the stage of first true leaf and just 3 times higher at the stage of first trifoliolate leaf; 3) an increase in total amount of free amino acids was not that significant; 4) glutamate dehydrogenase had been increasing by 20 % in the leaves and 60 % in plant roots; 5) amides and arginine were accumulated in both leaves and roots; 6) stress proteins were synthesized, in particular, of the 120 kD protein in plant leaves.

In general, the Nitrogen metabolism in red clover plants at the oil polluted soil on the stage of cotyledon leaves was aimed at quick inclusion of mineral Nitrogen in the transport forms and creation of protective compounds on the stage of the cotyledon leaves, while **on the stage of first trifoliolate leaf** – it aimed at nitrogen re-utilization in the compounds with high C/N ratio.

Keywords: oil polluted soil, red clover plants, Nitrogen metabolism