Ukrainian Journal of Ecology

Ukrainian Journal of Ecology, 2017, 7(3), 234–238, doi: 10.15421/2017_73

ORIGINAL ARTICLE *UDC 599:574.4+577.15*

Effect of mammals' digging function on alanine aminotransferase enzyme activity in leaves of *Glechoma hederacea* under cadmium pollution

O.M. Vasilyuk, A.Y. Pakhomov

Oles Honchar Dnipropetrovs'k National University
Gagarin Ave, 72, Dnipro, 49000, Ukraine, Tel.: (+380)933580745. E-mail: olenavasilyuk@gmail.com
Submitted: 08.08.2017. Accepted: 28.09.2017

The paper reflects analyzes of *Cd* impact on the total activity (nM pyruvic acid/ml s) of Alanine aminotransferase (ALT, EC 2.6.1.2) nitrogen metabolism in *Glechoma hederacea* L. leaves subject (as model) which dominated in the research area (in natural floodplain oak with *Stellaria holostea* L.) in conditions of *Cd* pollution (as anthropogenic press) and digging activity by Mammalia (as biotic action, with *Talpa europaea* L., European mole, as model), and their combine action. The *Cd* was introduced in the form of salts $Cd(NO_3)_2$ in the concentrations: 0.25, 1.25, and 2,5 g/m2, equivalent to the inclusion of *Cd* in 1,5 and 10 doses of MAC. The content of doses of MAC of *Cd* (5 mg/kg soil) adding took into account.

It was found the increasing of the ALT activity on 88% (with adding the *Cd* salts at a dose of 1 MAC) and digging activity by *Talpa europaea* L. which proved the non-specific reaction on stress. We observed the repression of the enzymes according to controls (5 and 10 MAC *Cd*) with *Cd* concentration 5 and 10 MAC. The protective properties by *T. europaea* L. hadn't positive results. The transferase enzyme activity according to another control (area without pollution of *Cd* and digging activity by *T. europaea* L.) reflected the inhibition of ALT on 78% to 53% (in presence *Cd* 1 and 5 MAC). The digging activity by *T. europaea* L. promoted the toxic metal level and the normalisation of the nitrate metabolism from 25% to 47% (ALT, 1 MAC *Cd*). The digging activity by Mammalia did not contribute the metal toxic effect and restoration of the natural functions of the plant organism under the *Cd* 10 MAC.

The advisability for using the representatives of zoocenosis for the complex regulation of environmental changes in the conditions of the Ukrainian Steppe, if the antropogenic factor does not exceeds the maximum permissible significance have been founded.

Key words: heavy metal; mammals; maximum allowable concentration; anthropogenic stress; aspartate aminotransferase; enzymes

Вплив рийної функції Mammalia на активність аланінамінотрансферази в листках *Glechoma hederacea* в умовах кадмієвого забруднення

О.М. Василюк, О.Є. Пахомов

Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара
пр. Гагаріна, 72, м. Дніпропетровськ, Україна, Тел.:+38093-358-07-45. E-mail: olenavasilyuk@gmail.com

Досліджено активність (нМ піровиноградної кислоти/мл·с) ферментів азотного метаболізму аланінамінотрансфераза (ALT, EC 2.6.1.2) в листках *Glechoma hederacea* L., яка домінувала на дослідній території (липово-ясенева діброва зі *Stellaria holostea* L.) на фоні солей *Cd* (як антропогенний чинник), рийної активності ґрунтоиів (як біотичний чинник), на прикладі *Talpa europaea* L., та їх сумісна дія. На дослідних ділянках додавали *Cd* у вигляді солі $Cd(NO_3)_2$ у концентраціях 0,25, 1,25, та 2,5 г/м^2, що еквівалентно 1, 5 та 10 ГДК *Cd*. При внесенні враховувалась кількість ГДК для *Cd* (5 мг/кг ґрунту). Виявлено достовірне підвищення активності ALT на 88% відповідно (на фоні 1 ГДК *Cd*) за умов рийної активності *Talpa europaea* L., що доводить не специфічність реакції на стрес. При збільшенні концентрації кадмію *Cd* у 5 та 10 разів спостерігали репресію активності ALT відносно відповідних контролів (5 та 10 ГДК *Cd*). За даних умов протекторні характеристики ґрунтоиів не мали позитивних результатів Визначення трансферазної активності відносно іншого контролю (ділянка без *Cd* та рийної активності *T. europaea* L.) дало змогу однозначно виявити інгібіюванням активності ензиму ALT від 78% до 53% (на фоні 1 та 5 ГДК). Рийна активність сприяла нівелюванню токсичності металу та нормалізації нітратного метаболізму з 25% до 47% (ALT, 1 ГДК *Cd*). При концентрації 10 ГДК рийні функції не сприяли нівелюванню токсичної дії чинника та відновленню природних функції рослинного організму.
З'ясовано доцільність використання представників зооценозу для комплексного урегулювання змін навколишнього середовища в умовах Степу України, якщо дія чинника не перевищує гранично допустимі значення.
Ключові слова: важкі метали; ссавці; гранично допустима концентрація; аланінамінотрансфераза; ензими

Дослідження впливу екологічних та екзогенних антропогенних чинників на організми (Dzyubak, Vasilyuk, 2009; Vasilyuk, Dzyubak, 2009; Naji, Devaraj, 2011) надає можливість прогнозування механізмів пристосування (Kupka et. al., 2013) з метою залучення нівелюючих та протекторних заходів щодо ослаблення дії негативних чинників на об'єкти для підтримки стану гомеостазу у змінених умовах існування (Vasilyuk, Pakhomov, 2012; Pakhomov, Vasilyuk, 2011, 2012a, 2012b). Вивчення впливу важких металів (ВМ) на усі складові біоти, моніторинг їх накопичення (Azcón et. al., 2009; Tsvetkova et. al., 2016), поглинання, виділення, розповсюдження, з'ясування фітотоксичності (Kopittke et. al., 2010) та порівнювання екотоксичності на досліджуваних територіях (Martí et al., 2013; Martín et al., 2013) має велике біологічне та загально екологічне значення.
Так, науковці визначили вплив іонів *Cd* на вміст фенольних сполук та вільного проліну у кукурудзі (Kobyletska, Terek, 2002), зясована наявність *Cd* індукованого оксидантного стресу та формування антиоксидантного ензиматичного відгуку у гіацинтів (Vestena et. al., 2011). Досліджено генетико-морфологічне різноманіття *Viola reichenbachiana* та *V. Riviniana* на ґрунтах із різним насиченням ВМ (Kuta et. al., 2014; Wąsowicz et. al., 2014). Науковими працями виявлено інгібування фото системи I та II у *Arabidopsis thaliana* L. під дією *Mn* (Millaleo et. al., 2013) та флуоресценція як індикатор сольового стресу (Bacarin, et. al., 2011); з'ясовані механізми формування чутливості та протидії *Co* як стресу у різних сортів томату на базі фотосинтетичних та антиоксидантних ензимів (Hasan et al., 2011). Подібні дослідження торкалися також об'єктів тваринного походження: було досліджено пуголовки *Gobiocypris rarus* як потенційні біомаркери за умов дії *Hg*, що спричинив оксидативну генну експресію (Li, et al., 2014); представники устриць *Crassostrea corteziensis* та *Crassostrea palmula* за присутності *Cd, Cu, Hg, Pb* та *Zn* (Páez-Osuna, 2015). Ми визначали вплив *Cd* через його велике розповсюдження на даній території та високу токсичність.

Матеріал і методи досліджень

Експеримент проводили в умовах Присамарського міжнародного біосферного стаціонару ім. О.Л. Бельгарда у селі Андріївка Новомосковського району Дніпропетровської області (рис. 1a, b), географічні координати дослідної території 48°46'01" пн. ш. та 35°27'14" сх. д).



Рис. 1a. Andriyivka (Ukraine scale
Retrieved from https://uk.wikipedia.org/



Рис. 1b. Andriyivka (Dnipropetrovsk region scale)

Як контроль обрано територію незабруднену *Cd* (липово-ясенева діброва із зірочником ланцетолистим *Stellaria holostea* L.). На дослідних ділянках *Cd* вносили у ґрунт у вигляді $Cd(NO_3)_2$ у концентраціях 0,25, 1,25 та 2,5 г/м^2), що еквівалентно *Cd* в 1, 5 та 10 доз ГДК).

Для запобігання забруднення шарів дослідних ґрунтів *кадмієм* були використані ізольовані ґрунтові блоки на глибину 20 см. При внесенні враховувалась кількість ГДК для *Cd* (5 мг/кг ґрунту).

Визначено загальну (Polevoy, Maximov, 1978) активність аланінамінотрансферази (ALT, ЕС 2.6.1.2; нМ піровиноградної кислоти/мл·с) як індикатору екологічного стану довкілля в листках *Glechoma hederacea* L., що розповсюджена на даній території.

Ферменти ALT аспартатамінотрансфераза (AST, ЕС 2.6.1.1; нМ піровиноградної кислоти/мл·с) є частиною ферментативної системи, за допомогою якої утилізується первинний продукт фотосинтезу C_4 групи рослин – аспартат, який синтезується у мезофілі листка та направляється до клітин обкладинки судинних пучків (Polevoy, Maximov, 1978).

За допомогою АСТ у клітинах обкладинки судинних пучків листка відбувається декарбоксилування аспартату, що утворився у мезофілі листка, до піровиноградної кислоти та диоксиду карбону. Піруват амінується за допомогою ALT до аланіну і повертається до мезофілу листка, де дезамінується за участю того ж самого ALT.

Дані біохімічні показникибцло досліджено за такою схемою:

1) монодія: контроль (ділянка без забруднення *Cd* та без рийної діяльності *T. europaea*), дослід 1 ГДК *Cd*, дослід 5 ГДК *Cd;* дослід 10 ГДК *Cd*

2) комбінована дія солей *Cd* та рийної діяльності ссавців: контроль 1 ГДК *Cd*; вплив 1 ГДК *Cd* на фоні рийної діяльності *T. europaea* L.; контроль 5 ГДК *Cd*; вплив 5 ГДК *Cd* на фоні рийної діяльності *T. europaea*.; контроль 10 ГДК *Cd*; вплив 10 ГДК *Cd* на фоні рийної діяльності *T. europaea*.

Дані в таблицях наведено як середні значення та стандартні відхилення. У роботі достовірною вважали відмінність між дослідним варіантом та контролем за $P < 0.05$. Гарантію надійності висновку про суттєвість або несуттєвість відмінностей (різниць) між середніми незалежних вибірок розраховувати за *t*- критерієм Стьюдента (Dospekhov, 1985).

Результати та їх обговорення

Згідно отриманих даних видно, що рийна активність *T. europaea* на фоні 1 ГДК *Cd* сприяє достовірному ($t_{0.05}$ = 1,05) підвищенню активності ALT на 88% у порівнянні із контролем по металу (1 ГДК *Cd*), що пов'язано із здатністю систем до зміни/пристосування до метаболічних процесів для усунення антропогенного навантаження за даних умов. Підвищення концентрації екзогенного чинника у 5 разів (5 ГДК *Cd*) унеможливлює ($t_{0.05}$ = 1,09) відновлення метаболічних процесів для нормалізації діяльності нітратного обміну за допомогою рийної діяльності *T. europaea*.: активність аланінамінотрансферази пригнічена у 2 рази відносно відповідного контролю (5 ГДК *Cd*).

На фоні 10 ГДК *Cd* активність ферменту інгібована ($t_{0.05}$ = 0,54) на 20%, що доводить токсичний ефект *Cd* та нездатність рийних функцій *T. europaea* до протекторних характеристик за високих концентрацій *Cd* (табл. 1).

Співвідношення дослід/контроль (%) потрібно у таблиці для з'ясування величини впливу (активація, інгібіювання) того чи іншого досліджуємого показника відносно контролю, що є додатковим критерієм для визначення суттєвості / несуттєвості різниць між дослідом та контролем за t- критерієм Стьюдента за $P < 0.05$.

Таблиця 1. Вплив комбінованої дії рийної функції *T. europaea* L. та *Cd* на загальну активність ALT в листках *Glechoma hederacea*.

Варіанти досліду	X ± SD	Співвідношення дослід/контроль, %
Контроль 1 ГДК *Cd*	6,04 ± 0,616	-
Рийна активність *T. europaea* L. + 1 ГДК *Cd*	11,38 ± 2,684*	188
Контроль 5 ГДК *Cd*	9,24 ± 1,630	-
Рийна активність *T. europaea* L.+ 5 ГДК *Cd*	5,33 ± 1,007*	58
Контроль 10 ГДК *Cd*	29,5111 ±4,311	-
Рийна активність *T. europaea* L.+ 10 ГДК *Cd*	23,4667 ± 4,267	80

тут і надалі * – достовірність відмінності між дослідним варіантом та контролем

При дослідженні активності ALT відносно іншого контролю (ділянка без *Cd* та рийної активності *T. europaea*), нами було встановлено, що ферментативна активність була інгібована достовірно ($t_{0.05}$ = 1,84; 3,55) при комплексній дії рийної функції *T. europaea* та внесенні *Cd* (1 та 5 ГДК відповідно); проте недостовірно ($t_{0.05}$ = 0,08) за умов 10 ГДК *Cd*.

Подібна тенденція зниження активності спостерігається і при монодії (додавання тільки солей металу) у концентрації *Cd* 1 та 5 ГДК ($t_{0.05}$ = 3,59; 2,59) відповідно та недостовірно ($t_{0.05}$ = 0,57) підвищення активності ензиму на фоні 10 ГДК *Cd*.

При монодії (вплив рийної активності *T. europaea* L.) відбулось інгібіювання активності ALT на 74% ($t_{0.05}$ = 3, 35), що пояснюється як токсичним впливом *Cd* на біологічні системи, так і незначним терміном для відновлення ґрунтів після порию.

Проте, рийна активність *T. europaea* сприяла відновленню функцій азотного обміну з 25% до 47% (при концентрації *Cd* 1 ГДК), тоді як за більших концентрацій *Cd* здатність систем до відновлення не спостерігали у зв'язку із високою токсичністю *Cd* (табл. 2).

Таблиця 2. Вплив комбінованої дії рийної функції *T. europaea* та *Cd* на загальну активність ALT в листках *Glechoma hederacea*

Варіанти досліду	X ± SD	Співвідношення дослід/контроль, %
Контроль (ділянка без *Cd* та рийної активності *T. europaea*)	24,18 ± 2,684	-
Рийна активність *T. Europaea*	6,41 ± 1,067*	26
Контроль 1 ГДК *Cd*	6,04 ± 0,616*	25
Рийна активність *T. europaea* + 1 ГДК *Cd*	11,38 ± ,684*	47
Контроль 5 ГДК *Cd*	9,24 ± 1,629*	38
Рийна активність *T. europaea* + 5 ГДК *Cd*	5,33 ± 1,067*	22
Контроль 10 ГДК *Cd*	29,51 ± 4,310	122
Рийна активність *T. europaea* + 10 ГДК *Cd*	23,47 ± 4,267	97

Висновки

Кадмій у концентраціях 1, 5 та 10 ГДК достовірно інгібує ензиматичну активність ALT в листках *Glechoma hederacea* через його високу токсичність.

Нами встановлено, що рийна активність *T. europaea* сприяла достовірній активації ALT в листках *G. hederacea* за низьких концентрацій *Cd* (1 ГДК) на 88% відносно відповідного контролю (*Cd* 1 ГДК) та виявила протекторну функцію при низьких концентраціях кадмію Високі та середні концентрації *Cd* (5 та 10 ГДК) інгібують активність ALT на фоні рийної активності *T. europaea* відносно відповідних контролів по *Cd* (5 та 10 ГДК), що за даних умов вказує на відсутність нівелюючої дії зооценотичного блоку.

Вплив рийної активності *T. europaea* L. та *Cd* відносно контролю (без *Cd* та рийної активності *T. europaea*) супроводжувався інгібіюванням ALT, що доводить наявність на даний момент стресового стану та необхідності відповідного часу для налагоджнння роботи механізмів адаптації: корегування, відновлення та нормалізації процесів нітратного обміну.

Визначено нівелюючу функцію представників Mammalia (на прикладі рийної функції *T. europaea*) по зниженню негативного впливу кадмію (у невисокій концентрації), що опосередковано сприяє підтримці природного існування рослинного організму (на прикладі *G. hederacea*), що має середовище твірне значення при збереженні, відновленні та збагаченні природного біорізноманіття навколишнього середовища.

References

Azcón, R., Perálvarez, M.C., Biró, B., Roldan, A., Ruíz-Lozano, J.M. (2009). Antioxidant activities and metal acquisition in mycorrhizal plants growing in a heavy-metal multicontami-nated soil amended with treated lignocellulosic agrowaste. Appl. Soil Ecol, 41, 168–177.

Bacarin, M.A., Deuner, S., Paulino da Silva, F.S., Cassol, D., Silva, D.M. (2011). Chlorophyll a fluorescence as indicative of the salt stress on *Brassica napus* L. Braz. J. Plant Physiol, 23(4), 245–253.

Dospekhov, B. A. (1985). Methods of field experience. Moscow. AgropromPress. (in Russian).

Dzyubak, O.I., Vasilyuk, O.M. (2009). Effect of chloride salinity on morphometric and biochemical indices in the dynamics of plant growth and development. The influence of chloride salinity on morphometric and biochemical parameters in the dynamics of plant growth and development. Proceed. I international scientific conference of students and young scientists 'Fundamental and applied research in biology' 'Veber', Donet'sk (in Ukrainian).

Hasan, S.A., Hayat, S., Wani, A.S, Ahmad, A. (2011). Establishment of sensitive and resistant variety of tomato on the basis of photosynthesis and antioxidative enzymes in the presence of cobalt applied as shotgun approach. Braz. J. Plant Physiol, 23(3), 175–185.

Kobyletska, M., Terek, O. (2002). The impact of cadmium ions on the content of phenolic compounds and free proline in maize plants. Visn. Lviv. Univ. Ser. Biol., 28, 311–316 (in Ukrainian).

Kupka, I., Podrázský, V., Kubeček, J. (2013). Soil-forming effect of *Duoglas fir* at lower altitudes – a case study. J. For. Sci, 59, 345–35

Kopittke, P.M, Blamey, F.P.C., Asher, C.J., Menzies, N.W. (2010). Trace metal phytotoxicity in solution culture: a review. J Exp Bot, 61, 945–954.

Kuta, E., Jędrzejczyk-Korycińska, M., Cieślak, E., Rostański, A, Szczepaniak, M., Migdałek, G, Li, Z.H., Chen, L., Wu, Y.H., Li, P. (2014). Effects of *mercury* on oxidative sand gene expression of potential biomarkers in larvae of the Chinese rare minnow *Gobiocypris rarus*. Environ. Contam. Toxicol, 67(2), 245–251.

Hu, P.J., Qiu, R.L., Senthilkumar, P. et al. (2009). Tolerance, accumulation and distribution of *Zinc* and *Cadmium* in hyperaccumulator *Potentilla griffithii*. Environ. Exp. Bot., 66, 317–325.

Li, Zh.-H., Chen., L., Wu, Y-H., Li., P., Li, Y.-F., Ni, Zh.-H. (2014). Effects of Mercury on Oxidative Stress and Gene Expression of Potential Biomarkers in Larvae of the Chinese Rare Minnow Gobiocypris Rarus. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 67(2), 245–251.

Martí, E., Sierra, J., Cáliz, J., Montserrat, G., Vila, X., Garou, M.A., Cruañas, R. (2013). Ecotoxicity of Cr, Cd, and Pb on two mediterranean soils. Arch. Environ. Contam. Toxicol, 64(3), 377–387.
Martín, J.A.R., Carbonell, G., Nanos, N., Gutiérrez, S.C. (2013). Identification of soil mercury in the Spanish Islands. Environ. Contam. Toxicol, 64(1), 171–179.
Millaleo, R., Reyes-Díaz, M., Alberdi, M., Ivanov, A.G., Krol, M., Hüner, N.P.A. (2013). Excess manganese differentially inhibits photo system I versus II in *Arabidopsis thaliana* L. J. Exp. Bot, 64(91), 343–354
Mohammadian, M.A., Mobrami, Z., Sajedi, R.H. (2011). Bioactive compounds and antioxidant capacities in the flavedo tissue of two citrus cultivars under low temperature. Braz. J. Plant Physiol., 23(3), 203-208.
Najl, K. M., Devaraj, V.R. (2011). Antioxidant and other biochemical defense responses of Macrotyloma uniflorum (Lam.) Verdc. (Horsegram) induced by high temperature and salt stress. Braz. J. Plant Physiol, 23(3), 187–195.
Páez-Osuna, F. (2015). Bioavailability of *cadmium*, *copper*, *mercury, lead,* and *zinc* in subtropical coastal lagoons from the southeast Gulf of California osing mangrove oysters (*Crassostrea corteziensis* and *Crassostrea palmula*). Environ. Contam. Toxicol, 68(2), 305–316.
Polevoy, V., V., Maximov, G.B. (1978). Methods of biochemical analysis of plants. Leningrad, 1978. Leningrad Univ. Press (in Russian).
Pakhomov, O.E., Vasilyuk, O.M. (2011). Activity of Trans-Amimation enzymes as the indicator of biological revegetation of soils Mammalia in transformed ecosystems. The Abstracts NATO Advanced Research Workshop (ARW): "Environmental and food security in South-East Europe and Ukraine", NATO Science Series book. Dnipropetrovs'k.
Pakhomov, O.E., Vasilyuk, O.M. (2012a). Activity of Transamination enzymes as the indicator of environmental forming function of Mammalia representatives in the transformed anthropogenic ecosystem. Scientific Herald of Chernivtsy University. Biology (Biological System), 4(4), 456-461 (in Ukrainian).
Pakhomov, O.E., Vasilyuk, O.M. (2012b). Anthropogenic influence on the transamination enzymes activity under the environmental forming mammals activity. Visn. Dniepropetr. Univ. Ser. Biol. Ekol., 20(2), 64–70.
Tsvetkova, N.M.., Pakhomov, A.Ye., Serdyuk, S.M., Yakyba, M.S, (2016). Biological Diversity of Ukraine. The Dnipropetrovsk region. Soils. Metalls in the soils: monogr. Dnipropetrovsk: Dnipropetrovsk National University Press (in Ukrainian).
Vasilyuk, O.M., Dzyubak, O.I. (2009). Physiological and biochemical parameters of plants as markers of a condition of environment. Proceed. I international scientific conference of students and young scientists 'Fundamental and applied research in biology'. Donet'sk, Veber (in Russian).
Vasilyuk, O.M., Pakhomov, O.Y. (2012). Effect of nickel ions on the functional activity of enzymes in the leaves of *Glechoma hederatia* L. under conditions of Mammalia digging activity. Achievement of High school – 2012. Proceed. VIII Int. Conf. Bjalgrad, Sofija, Bolgarija (in Ukrainian).
Vestena, S., Cambraia, J., Ribeiro, C., Oliveira, J.A., Oliva, M.A. (2011). Cadmium induced oxidative stress and antioxidative enzyme response in water hyacinth and salvinia. Braz. J. Plant Physiol, 23(2), 131–139.
Wąsowicz, P., Suda, J., Combik, M., Słomka, A. (2014). Morphological versus genetic diversity of *Viola reichenbachiana* and *V. riviniana* (sect. *Viola*, Violaceae) from soils differing in heavy metal content. Plant Biol, 16(5), 924–934.

Citation:
Vasilyuk, O.M., Pakhomov, A.Y. (2017). Effect of mammals' digging function on alanine aminotransferase enzyme activity in leaves of Glechoma hederacea under cadmium pollution. *Ukrainian Journal of Ecology, 7*(3), 234–238.
This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0. License