Ukrainian Journal of Ecology

Ukrainian Journal of Ecology, 2018, 8(1), 483–486 doi: 10.15421/2017_239

ORIGINAL ARTICLE *UDC 599:574.4+577.15*

The nitrate metabolism enzyme indicator role in the environment state changes conditions

O.M. Vasilyuk, A.Y. Pakhomov

Oles Honchar Dnipro National University
Gagarin Ave., 72, Dnipro, 49000, Ukraine
E-mail: olena.vasilyuk@gmail.com

The paper reflects analyzes of *Cd* impact on the total activity (nM pyruvic acid/ml s) of aspartate aminotransferase (AST, EC 2.6.1.1) 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 on experimental sites. When adding *Cd*, the content of doses (5 mg/kg soil MAC of *Cd*) was taken into account. It was founded the increasing of the AST activity on 26% (with adding the *Cd* salts at a dose of 1 MAC and digging activity by *Talpa europaea* L) according to control (1 MAC *Cd*), witch it proved the non-specific reaction on stress. With *Cd* concentration 5 and 10 MAC we observed the repression of the enzymes activity according to controls (5 and 10 MAC *Cd*) on 10% and 50% in accordance. The protective properties by *T. europaea* L. hadn't positive results. The transferase enzyme activity according to another control (the area, is without pollution of *Cd* and digging activity by *T. europaea* L.) reflected the increasing AST enzyme activity from 166% to 218% (in presence 1 and 5 MAC *Cd*) and reduction around 46% (in presence 10 MAC *Cd*). The digging activity by *T. europaea* L. lowered the toxic metal effect and the normalisation of the nitrogen metabolism by increasing the activity of AST from 55% to 266%, from 318% to 291% (AST, 1 та 5 MAC *Cd*). The digging activity by Mammalia did not contribute the metal toxic effect under the *Cd* 10 MAC. Thus, using the different representatives of zoocoenosis promotes improvement in the Steppe Dnieper at low concentrations of the factor has been revealed.

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

---

Індикаторна роль ферментів нітратного обміну в умовах екологічних змін стану навколишнього середовища

О.М. Василюк, О.Є. Пахомов

Дніпровський національний університет ім. Олеся Гончара
пр. Гагаріна, 72, м. Дніпро, Україна.
E-mail: olena.vasilyuk@gmail.com

Досліджено активність (нМ піровиноградної кислоти/мл·с) ферментів азотного метаболізму аспартатамінотрансфераза (AST, ЕС 2.6.1.1) 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 сумісної дії. 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 підвищення активності ензиму АСТ на 26% на фоні додавання солі *Cd* у концентрації 1 ГДК та рийної активності (відносно контролю 1 ГДК *Cd*), що пояснюється наявністю неспецифічної реакції на стрес. При додаванні концентрації

солі *Cd* 5 ГДК та 10 ГДК відбулося інгібіювання активності ензиму відносно контролів (5 та 10 ГДК *Cd*) на 10% та 50% відповідно. Протекторні властивості рийної активності *T. europaea* L. не виявили позитивних результатів за даних умов. Трансферазна активність, визначена відносно іншого контролю (без додавання солей кадмію та рийної активності *T. europaea* L., виявила достовірне підвищення активності AST від 166% до 218% (на фоні *Cd* 1 та 5 ГДК) та зниження до 46% (на фоні 10 ГДК *Cd*). Рийна активність *T. europaea* L., знижувала токсичний ефект та нормалізувала нітратний обмін за рахунок підвищення активності АСТ з 55% до 266%, з 318% до 291% (AST, 1 та 5 ГДК *Cd*). Рийна функція на фоні концентрації *Cd* 10 ГДК не сприяли нівелюванню токсичної дії чинника та відновленню природних функції рослинного організму. Використання зооценотичного блоку сприяє покращенню навколишнього середовища в умовах Степу України при невисоких концентраціях чинника.
Ключові слова: важкі метали; ссавці; гранично допустима концентрація; аспартатамінотрансфераза; ензими

Вступ

За умов дії екологічних (Dzyubak and Vasilyuk, 2009; Vasilyuk and Dzyubak, 2009) та антропогенних чинників (Naji and Devaraj, 2011) активуються наукові дослідження на різних рівнях організації об'єктів дослідження, як то організменному, клітинному, геномному тощо (Bilanich, 2008; Douchiche et. al., 2010; Mohammadian et. al., 2011), що забезпечує комплексті дослідження з метою пошуку екологічних механіхмів збереження та відновлення природних біогелценозів через нівелювання наслідків екзогенних токсикантів (Vasilyuk, Pakhomov, 2012; Vasilyuk, 2013a; 2013b; 2013c). також шляхи акумуляції ВМ гіперакумуляторами *Potentilla griffithii* (Hu, et al., 2009). Негативний вплив важких металів (ВМ) та виявлення шляхів їх впливу (Kopittke et. al., 2010; Martí et al., 2013; Martín et al., 2013), набуває актуальності при дослідженні урбанізованих територій (Tsvetkova et. al., 2016).

Виявлено розподіл ВМ (*As, Cd, Cu*, *Pb* та *Zn)* у травах (*Agrostis* sp. та *Poa* sp.), в *Urtica dioica* та сформувано моделі трансформування ВМ по системі рослина-ґрунт (Ghavri and Singh, 2010; Boshoff et al., 2014). У літературі надана інформація стосовно активації антиоксидантних ензимів у *Abelmoschus esculentus* L. під впливом хлоридів *Cd* та *Hg* (Hameed, et al., 2011). Надано інформацію стосовно транспорту тонопласт-локалізованого Abc2 посередника акумуляції фітохелатину до вакуолей та визначення толерантності до *Cd* (Becerril et. al., 2013). Надані дані стосовно розподілу та специфікації коренів різних видів тютюну за експозицією *Zn* (Straczek, et. al., 2008). На тваринних обєктах (равлики) визначали механізми уникання ними стресу в наслідок дії ВМ (Lefcort et al., 2013).

Наукова значимість у визначенні нами впливу *Cd* на рослинний організм пов'язана з його токсичністю та екзогенним пресом урбоекосисем.

Матеріал і методи досліджень

Експеримент проводили в умовах Присамарського міжнародного біосферного стаціонару ім. О.Л. Бельгарда у селі Андріївка Новомосковського району Дніпропетровської області (рис.1, 2), географічні координати дослідної території 48°46'01" пн. ш. та 35°27'14" сх. д).



Рис. 1. Андріївка на карті України



Рис. 2. Андріївка в Дніпропетровській області (https://uk.wikipedia.org)

Як контроль обрано територію незабруднену *Cd* (липово-ясенева діброва із зірочником ланцетолистим, *Stellaria holostea* L.) та в умовах забруднення ґрунтів солями *Cd* (*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 ґрунту *Cd* були використані ізольовані ґрунтові блоки на глибину 20 см. При внесенні враховувалась кількість ГДК для *Cd* (5 мг/кг ґрунту).

Визначено загальну (Polevoy and Maximov, 1978) активність аспартатамінотрансферази (AST, EC 2.6.1.1; нМ піровиноградної кислоти/мл·с) як індикатору екологічного стану довкілля в листках *Glechoma hederacea* L., що розповсюджена на даній території. Ферменти аланінамінотрансфераза (ALT, EC 2.6.1.2; нМ піровиноградної кислоти/мл·с) та AST 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 and 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. У роботі достовірною вважали відмінність між дослідним варіантом та контролем за $P < 0.05$. Гарантія надійності висновку про суттєвість або несуттєвість відмінностей (різниць) між середніми незалежних вибірок розраховувати за *t*- критерієм Стьюдента (Dospekhov, 1985).

Рийна функція ссавців була визначена на прикладі рийної активності *Talpa europaea* L., що розповсюджений на даній території. Дані біохімічні показники визначали через місяць в листках *Glechoma hederacea* L., що домінувала на даній території, за такою схемою:

1) монодія: контроль (ділянка без забруднення *Cd* та без рийної діяльності *T. europaea* L), 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* L.; контроль 10 ГДК *Cd*; вплив 10 ГДК *Cd* на фоні рийної діяльності *T. europaea* L.

Результати та їх обговорення

При дослідженні роботи ензиму AST видно, що рийна активність *T. europaea* L. сприяла достовірній (26%) активації та відновленню нітратного метаболізму в листках *G. Hederacea* L. тільки на стадії мінімальної концентрації *Cd* (1 ГДК). На фоні *Cd* 5 та 10 ГДК активність AST була недостовірно інгібована на 10% ($t_{0.05}$ = 0,31) та достовірно на 50% ($t_{0.05}$ = 1,89) відносно контролів з відповідною концентрацією *Cd* (табл. 1).

Таблиця 1. Вплив комбінованої дії рийної функції T. europaea L. та Cd на загальну активність AST в листках G. Hederacea L.

Варіанти досліду	X ± SD	Співвідношення дослід/контроль, %
Контроль 1 ГДК *Cd*	35,02 ± 5,850	-
Рийна активність *T. europaea* L. + 1 ГДК *Cd*	44,27 ± 7,390	126
Контроль 5 ГДК *Cd*	41,78 ± 5,395	-
Рийна активність *T. europaea* L.+ 5 ГДК *Cd*	38,22 ± 3,125	91
Контроль 10 ГДК *Cd*	12,09 ± 1,714	-
Рийна активність *T. europaea* L.+ 10 ГДК *Cd*	6,04 ± 0,308	50

Тут і надалі: X – середнє; SD – стандартне відхилення;* – достовірність відмінності між дослідним варіантом та контролем; $P < 0.05$.

При дослідженні активності AST відносно контролю без *Cd* та рийної активності *T. europaea* L. спостерігали ефект ініціації нітратного обміну при варіантах досліду на фоні концентрації *Cd* 1 ГДК та 5 ГДК як при комбінованій (в 2-3 рази) дії чинників (біотичних та антропогенних, $t_{0.05}$ = 2,80; 4,01), так і монодії (антропогенний чинник, $t_{0.05}$ = 1,98; 2,80) в 2-3 рази, тоді як концентрація *Cd* 10 ГДК інгібіювала недостовірно ($t_{0.05}$ = 0,27) активність AST на 8% (10 ГДК), а рийна активність *T. europaea* L. достовірно ($t_{0.05}$ = 2,81) не сприяла відновленню даної функції через високу токсичність *Cd*! (табл. 2).

Таблиця 2. Вплив комбінованої дії рийної функції T. europaea L. та Cd на загальну активність AST в листках G. Hederacea L.

Варіанти досліду	X ± SD	Співвідношення дослід/контроль, %
Контроль (ділянка без *Cd* та рийної активності *T. europaea* L.)	13,16 ± 1,342	-
Рийна активність *T. europaea* L.	7,29 ± 2,937	55
Контроль 1 ГДК *Cd*	35,02 ± 5,850	266
Рийна активність *T. europaea* L. + 1 ГДК *Cd*	41,78 ± 5,395	318
Контроль 5 ГДК *Cd*	41,78 ± 5,395	318
Рийна активність *T. europaea* L. + 5 ГДК *Cd*	38,22 ± 3,125	291
Контроль 10 ГДК *Cd*	12,09 ± 1,714	92
Рийна активність *T. europaea* L. + 10 ГДК *Cd*	6,04 ± 0,308	46

Висновки

Рийна функція *T. europaea* L. сприяла достовірній активації метаболічних процесів нітратного обміну AST в листках *G. hederacea* L. за низьких концентрацій *Cd* (1 ГДК) до 26% відносно контролю, що доводить захисну роль ґрунтоpиїв при незначних концентраціях чинника. Високі та середні концентрації *Cd* (5 та 10 ГДК) інгібують від 10% до 50% активність ензиму і на фоні рийної активності *T. europaea* L. відносно відповідних контролів (5 та 10 ГДК *Cd*). За даних умов протекторна роль зооценотичного блоку не виявилась.

Вплив рийної активності *T. europaea* L. та *Cd* (відносно контролю без *Cd* та рийної активності *T. europaea* L.) супроводжувався підвищенням активності ензиму AST в 2-3 рази при концентрації металу 1 та 5 ГДК, що формує захисні протекторні механізми із економією ресурсів рослинного організму через збалансований ланцюжок ферментативної активності ALT та AST.

Доведена нівелююча дія, а отже і середовищетвірна роль деяких представників Mammalia (на прикладі *T. europaea* L.) у підтримці стану гомеостазу рослинного організму (на прикладі *G. hederacea* L.) за умов антропогенного навантаження на біоту, якщо дія чинника не перевищує гранично допустимі значення.

References

Becerril, F.R., Juárez-Vázquez, L.V., Hernández-Cervantes, S.C., Acevedo-Sandoval, O.A., Vela-Correa, G., Cruz-Chávez, E., Moreno-Espíndola, I.P., Esquivel-Herrera, A., de León-González, F. (2013). Impacts of manganese mining activity on the environment: Interactions among soil, plants and arbuscular Mycorrhiza. Environ. Contam. Toxicol. 64(2), 219–227.

Bilanich, M.M. (2008). The current state of research of influence of heavy metals on plant life [Suchasnij stan doslidzhennja vplivu vazhkih metaliv na roslinnij svit]. Visn. Prikarpatsky Univ. Biol. 12, 161–176 (in Ukrainian).

Boshoff,ʹM., Jonge, M.De., Scheifler, R., Bervoets, L. (2014). Predicting As, Cd, Cu, Pb and Zn levels in grasses (Agrostis sp. and Poa sp.) and stinging nettle (Urtica dioica) applying soil–plant transfer models. Sci. Total. Environ. 493(15), 862–871.

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

Douchiche, O., Driouich, A., Morvan, C. (2010). Spatial regulation of cell-wall structure in response to heavy metal stress: Cadmium-induced alteration of the methyl-etherification pattern of homogalacturonans. Ann. Bot. (Lond.) 105, 481–491

Dzyubak, O.I., Vasilyuk, O.M. (2009). Vplyv hlorydnogo zasolennja na morfometrychni ta biohimichni pokaznyky roslyn u dynamici rostu ta rozvytku [Effect of chloride salinity on morphometric and biochemical indices in the dynamics of plant growth and development]. 'Materialy I Mizhnarodnoi' Naukovoi' Konferencii'. Veber, Donets'k, 2, 231–232 (in Ukraine).

Ghavri, S.V., Singh, R.P. (2010). Phytotranslocation of Fe by biodiesel plant Jatropha curcas L. grown on iron rich waste-land soil. Braz. J. Plant Physiol. 22(4), 235–243

Hameed, A., Mahmooduzzafar, T.N.Q, Siddiqi, T.O., Iqbal, M. (2011). Differential activation of the enzymatic antioxidant system of Abelmoschus esculentus L. under $CdCl_2$ and $HgCl_2$ exposure. Braz. J. Plant Physiol. 23(1), 46–54.

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

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.

Lefcort, H., Wehner, E.A., Cocco, P.L. (2013). Look inside get access pre-exposure to heavy metal pollution and the odor of predation decrease the ability of snails to avoid stressors. Arch. Environ. Contam. Toxicol, 64(2), 273–280.

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. Envi-ron. Contam. Toxicol, 64(1), 171–179.

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.

Naji, K.M., Devaraj, V. R. (2011). Antioxidant and other biochemical defense responses of Macrotyloma uniflorum (Lam.) Verdc. (Horse gram) induced by high temperature and salt stress. Braz. J. Plant Physiol, 23(3), 187-195.

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. Dnipropetrovsk: Dnipro National University Press.

Polevoy, V., V., Maximov, G.B. (1978). Methods of biochemical analysis of plants. Leningrad, Leningrad Univ. Press.

Straczek, A., Sarret, G., Manceau, A., Hinsinger, P., Geoffroy, N., Jaillard, B. (2008). Zinc distribution and speciation in roots of various genotypes of tobacco exposed to Zn.Environ. Exp. Bot, 63, 80–90.

Vasilyuk O.M. (2013a). Effect of Nickel on Aspartate Aminotransferase activity in Glechoma hederacea L. leaves subject to excretory function of Mammalia. . Zprávy vědecké ideje–2013. Proceed. IX mezinárodní vědecko - praktická conference. Praha: Education and Science.

Vasilyuk O.M. (2013b). Effect of Nickel on Alanine Aminotransferase activity in Glechoma hederacea L. leaves subject to excretory function of Mammalia. Ptoceed. Conf. Perspektywiczne opracowania sa Nauka I technikami 2013. Przemysl: Nauka I studia.

Vasilyuk, O.M., (2013c). Effect of lead on Alanine Aminotransferase activity in Glechoma hederacea L. leaves subject to digging function of Mammalia. Proceed. Conf. «Vědecky Prumysl Evropskeho kontinentu 2013». Praha.

Vasilyuk O.M., Dzyubak O.I. (2009). Physiological and biochemical parameters of plants as markers of a condition of environment. Proceed. I Int. Conf. Veber, Donets'k.

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. Proceed. VIII Conf. “Achievement of High school – 2012”. Bjalgrad, Sofija, Bolgarija (in Ukrainian).

Citation:

Vasilyuk, O.M., Pakhomov, A.Y. (2018). The nitrate metabolism enzyme indicator role in the environment state changes conditions. *Ukrainian Journal of Ecology, 8*(1), 483-486.

(cc) BY This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0. License