

УДК 581.198:577.151.042:632.15(665.61)

АКТИВНІСТЬ ФЕРМЕНТІВ ГЛУТАМАТСИНТАЗНОГО ШЛЯХУ В РОСЛИНАХ *TRIFOLIUM PRATENSE* L. ЗА УМОВ НАФТОВОГО ЗАБРУДНЕННЯ ҐРУНТУ

М.В. ДОВГАЮК-СЕМЕНЮК, О.І. ВЕЛИЧКО, О.І. ТЕРЕК

Львівський національний університет імені Івана Франка
79005 Львів, вул. Грушевського, 4
e-mail: maria.dovgauk28@gmail.com

Розглянуто проблему техногенного забруднення ґрунтів нафтою і механізми адаптації рослинних організмів до змінених ґрунтових умов. Досліджено вплив нафтового забруднення ґрунту на активність ферментів глутаматсинтазного шляху в рослинах *Trifolium pratense* L. Встановлено, що глутамінсинтазна (ГС) активність за умов забрудненого нафтою ґрунту на початкових етапах росту підвищується як у листках, так і в коренях конюшини лучної. Таке зростання глутамінсинтазної активності в рослин на ранній стадії розвитку (фаза сім'ядольних листків) може бути пов'язане з необхідністю забезпечення клітин глутаматом, зокрема для синтезу проліну. На наступних стадіях — першого справжнього та першого трійчастого листка — пригнічувалась глутамінсинтазна і ще істотніше — глутаматсинтазна активність рослин. Інгібування активності ферментів ГС/ГОГАТ шляху в рослинах конюшини лучної в умовах забрудненого нафтою ґрунту з настанням подальших фенологічних фаз може бути пов'язане з нестачею вуглеводів. Зниження активності ферментів ГС/ГОГАТ шляху розглянуто не лише як результат негативної дії умов забрудненого нафтою ґрунту, а й як один із механізмів регуляції процесів асиміляції амонію.

Ключові слова: *Trifolium pratense* L., глутаматсинтазна активність, глутамінсинтазна активність, нафтове забруднення ґрунту.

Техногенне забруднення ґрунтів нафтою та пошук шляхів їхнього відновлення є актуальною проблемою в усьому світі. Одним із дієвих методів відновлення забруднених нафтою ґрунтів є методи фітореMediaції, які полягають у використанні вищих рослин. Рослини поліпшують фізичні властивості ґрунту, що, у свою чергу, сприяє розвитку мікроорганізмів — деструкторів нафти — та пришвидшує біодеградацію вуглеводнів. ФітореMediaнтами можуть бути рослини, стійкі до забрудненого нафтою ґрунту. Максимальне використання реMediaційного потенціалу рослин можливе за умови з'ясування природи їхньої адаптації до змінених ґрунтових умов. Відомо, що високий адаптаційний потенціал в умовах нафтового забруднення мають бобові [1—3, 18]. У роботах досліджено адаптивні перебудови рослин конюшини лучної (*Trifolium pratense* L.) за умов забрудненого нафтою ґрунту. Природа адаптації рослинних організмів до таких умов на сьогодні є маловивченою. Передбачалось, що необхідною умовою пристосування рослин конюшини лучної до умов забрудненого нафтою ґрунту є пластичність метаболізму нітрогену, що

входить до складу таких функціонально важливих компонентів клітини, як білки, ферменти, нуклеїнові кислоти, хлорофіли та ін.

У попередніх дослідженнях встановлено, що нафтове забруднення ґрунту призводить до накопичення вільних амінокислот, зокрема проліну та аргініну в рослинах конюшини лучної [2]. Відомо, що за стресових умов кількості проліну та аргініну зростають унаслідок їх синтезу *de novo* із глутамату [7, 9, 13, 14, 19].

Метою нашої роботи було дослідження впливу нафтового забруднення на активність ферментів глутаматсинтазного шляху в органах рослин конюшини лучної.

Методика

Для проведення досліджень використовували дерново-підзолистий суглинковий ґрунт з околиць м. Борислав Львівської області. Повітряно-сухий ґрунт забруднювали сирою нафтою в кількості 5 %. Через 30 діб, потрібних для вивітрювання ароматичних вуглеводнів, у ґрунт висівали насіння конюшини лучної сорту Передкарпатська 6. Контролем слугували рослини, вирощені в незабрудненому нафтою ґрунті.

Для приготування витяжки ферментів рослинний матеріал гомогенізували в охолоджену середовищі (4 °С), яке містило: 0,05 М *трис*-HCl буфер (pH 7,5) з 0,5 мМ цистеїну, 1,0 мМ MgSO₄, 2,0 мМ ЕДТА, 1 мМ дитіотреїтолу. Співвідношення маси рослинної тканини до об'єму середовища становило 1 : 4 (мг/мкл). Гомогенат центрифугували за 13 000 g упродовж 5 хв. Надосадову рідину зберігали при 4 °С й використовували для визначення активності ферментів і вмісту білка.

Активність глутамінсинтетази (КФ 6.3.1.2) в органах рослин конюшини лучної визначали фосфатним методом [15]. Реакційна суміш містила: 110 мМ *трис*-HCl, 110 мМ глутамату натрію, 44 мМ NH₄Cl, 44 мМ MgSO₄, 25 мМ АТФNa₂ і 0,2 мл екстракту. Реакцію зупиняли додаванням 1 мл 1 %-го розчину FeSO₄ у 0,3 н H₂SO₄ та 0,5 мл 6,6 %-го розчину (NH₄)₆Mo₇O₂₄ у 7,5 н H₂SO₄, отриману суміш фотометрували за λ = 800 нм і визначали концентрацію фосфору у пробі. Ферментативну активність обчислювали у мікромолях Р на 1 мг білка за 1 хв (мкмоль Р/(мг білка · хв)).

Для визначення активності глутаматсинтази (КФ 1.4.1.13) реєстрували зміну оптичної густини внаслідок окиснення НАДФ за довжини хвилі 340 нм [15]. Для цього 0,1 мл екстракту ферменту вміщували в інкубаційну суміш, яка містила: 5 мМ глутаміну, 5 мМ 2-оксоглутарату, 0,25 мМ НАДФ. Оптичну густину вимірювали за λ = 340 нм, розчином порівняння слугував розчин у який замість 2-оксоглутарату добавляли воду. Активність ферменту обчислювали в наномолях окисненого НАДФН на 1 мг білка за 1 хв (нмоль НАДФН/(мг білка · хв)).

Вміст білка визначали за методом Лоурі [8]. Реакційна суміш складалася з 0,1 мл екстракту, 2 мл реактиву А (15 мл 2 %-го розчину Na₂CO₃ у 0,1 н розчині NaOH + 0,3 мл 0,5 %-го розчину CuSO₄ · 5H₂O в 1 %-му К-Na-гартраті) та 0,2 мл реактиву Фоліна. Оптичну густину розчину вимірювали за λ = 750 нм. Розчином порівняння була суміш 1 мл 0,5 н NaOH, 5 мл розчину А і 0,5 мл реактиву Фоліна. Концентрацію білка в екстракті розраховували за калібрувальним графіком, побудованим за бичачим сироватковим альбуміном (Merck).

Отримані дані оброблено статистично. Вірогідність різниці між середньоарифметичними значеннями показників встановлювали за критерієм Стьюдента. Відмінності вважали істотними за $p \leq 0,05$.

Результати та обговорення

Глутаматсинтазний шлях забезпечує асиміляцію амонію. Первинна асиміляція амонію внаслідок приєднання іона амонію до глутамату з утворенням глутаміну пов'язана з глутамінсинтетазою [12]. Далі глутамін під дією глутаматсинтази перетворюється на дві молекули глутамату в результаті передачі аміногрупи глутаміну на 2-оксоглутарат (глутаматсинтаза відома також під назвою глутамін 2-оксоглутарат амінотрансферази (ГОГАТ)). Каталітична активність глутамінсинтетази та глутаматсинтази в ході онтогенезу змінюється і залежить від умов навколишнього середовища [6, 10, 11].

Ми встановили, що нафтове забруднення ґрунту призводить до зростання активності ферментів ГС/ГОГАТ шляху в рослинах конюшини лучної на початкових етапах росту, а в більш віддалені періоди вона пригнічується (рис. 1).

З рис. 1 видно, що активність глутамінсинтетази за умов забрудненого нафтою ґрунту на початкових етапах росту підвищувалась як у листках, так і в коренях конюшини лучної. В останні роки виявлено, що індукція глутамінсинтетазної активності на початкових етапах росту рослин за стресових умов пов'язана з їх потребою у глутаматі як попереднику поліфункціонального протектора — проліну [4]. Автори праці [5] встановили зростання активності глутамінсинтетази для забезпечення утворення глутамату як субстрату для синтезу проліну в рослинах лотося за умов дефіциту води, автори праці [10] — у листках *Sporobolus stapfanus* за умов дегідратації. Виявлене нами зростання глутамінсинтетазної активності у коренях і листках конюшини лучної, вирощеної на забрудненому нафтою ґрунті, на стадії сім'ядольних листків може бути пов'язане з потребою забезпечення клітин глутаматом для синтезу проліну на ранніх стадіях розвитку.

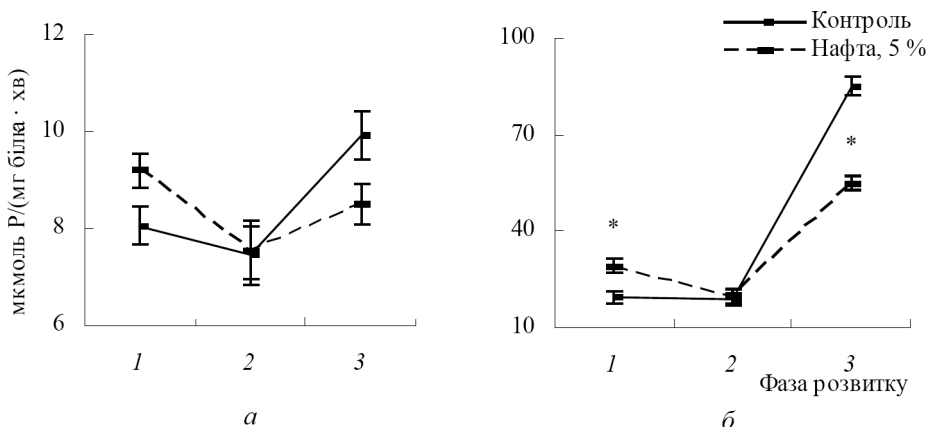


Рис. 1. Вплив нафтового забруднення на активність глутамінсинтетази (мкмоль Р/(мг білка · хв)) в листках (а) і коренях (б) конюшини лучної. Тут і на рис. 2:

фази розвитку: сім'ядольних листків (1); першого справжнього листка (2); першого трійчастого листка (3); * — відмінності показників щодо контролю вірогідні за $p \leq 0,05$

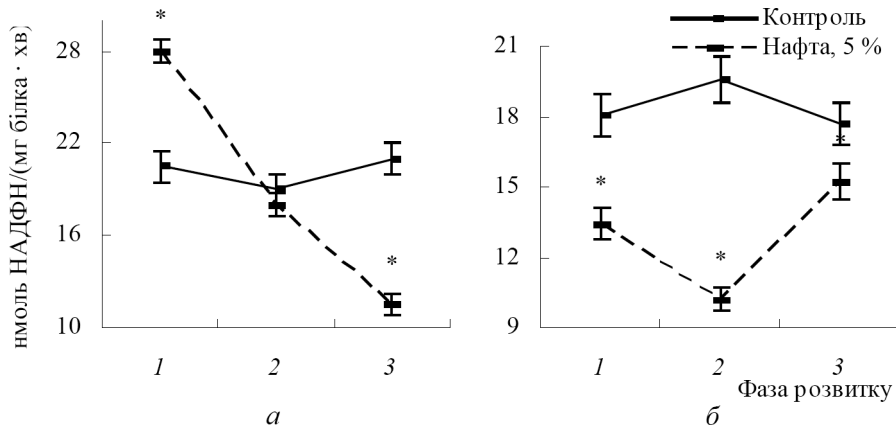


Рис. 2. Вплив нафтового забруднення на активність глутаматсинтази (нмоль НАДФН/(мг білка · хв)) в листках (а) і коренях (б) конюшини лучної

Тоді як на початкових етапах росту активність ГС за умов забрудненого нафтою ґрунту в листках і коренях конюшини лучної зростала, активність ГОГАТ у коренях рослин на 25 % спадала (рис. 2).

Індуковане умовами забрудненого нафтою ґрунту зростання глутамінсинтетазної та зниження глутаматсинтазної активності в коренях рослин конюшини лучної на початковому етапі росту могло спричинити накопичення глутаміну — основної транспортної форми нітрогену. Ймовірно, що глутамін транспортувався в листки, де дезамінувався глутаматсинтазою з утворенням глутамату. Глутамат необхідний рослині для синтезу проліну, кількість якого за умов нафтового забруднення ґрунту в органах рослин конюшини лучної істотно зростала [2]. Крім того, глутамат, утворений за дії глутаматсинтази, виконує роль сигнальної молекули. Вміст глутамату в клітинах підтримується у вузьких межах, що регулюється інтенсивністю його синтезу глутаматсинтазою та інтенсивністю перетворення іншими ферментами [6]. Так, відомо, що в результаті діяльності амінотрансфераз аміногрупа глутамату переноситься на 2-оксокислоти з утворенням амінокислот, під впливом глутамінсинтетази до глутамату приєднується амоній з утворенням глутаміну, а під впливом глутаматдегідрогенази глутамат перетворюється на 2-оксоглутарат. Глутамат також є вуглецевим скелетом для синтезу γ -аміномасляної кислоти, аргініну і проліну [7, 10].

Зниження активності глутаматсинтази може бути пов'язане з недостатньою кількістю вуглеводів унаслідок сповільнення фотосинтетичних процесів [11]. Оскільки вуглеводи слугують акцепторами амонію, то з метою економії вуглецевих скелетів у рослинах накопичуються сполуки з високим співвідношенням N/C — глутамін (2N/5C), аспарагін (2N/4C), аргінін (4N/6C) [9], а зниження активності ГОГАТ регулює швидкість асиміляції амонію внаслідок накопичення глутаміну [6]. Інакше кажучи, внаслідок зниження активності глутаматсинтази глутамін, що утворився під впливом глутамінсинтетази, не використовується ГОГАТ, а накопичується в клітинах і йде на синтез аспарагіну та аргініну [17]. Встановлене в наших дослідженнях інгібування активності ГОГАТ зумовлює утворення таких низькомолекулярних нітрогеновмісних сполук, які містять більш як одну аміногрупу — амідів та аргініну і забезпечує пристосування рослин до стресових умов.

Отримані експериментальні дані дають підставу дійти висновку, що елементами адаптації конюшини лучної до умов забрудненого нафтою ґрунту є зростання активності ГС/ГОГАТ на початкових етапах росту рослин, що зумовлено потребою в синтезі захисних сполук. Встановлене зниження за умов забрудненого нафтою ґрунту активності ГОГАТ у рослинах конюшини лучної у більш віддалені періоди росту може бути пов'язане з нестачею вуглеводів та утворенням сполук із високим співвідношенням нітроген/карбон.

1. *Величко О.* Вплив умов нафтозабрудненого ґрунту на спектральний склад білків рослин конюшини лучної // *Наук. вісн. Нац. лісо-тех. ун-ту України.* — 2014. — **24**, №9. — С. 115—117.
2. *Довгаюк-Семенюк М., Величко О., Терек О.* Вміст вільних амінокислот у рослинах конюшини лучної за дії умов нафтозабрудненого ґрунту // *Біологічні студії/Studia Biologica.* — 2016. — **10**, № 2. — С. 115—122.
3. *Довгаюк-Семенюк М.В., Величко О.І., Терек О.І.* Вміст амонійного та нітратного нітрогену у рослинах конюшини лучної за дії нафтового забруднення ґрунту та підживлення фосфорно-калійними добривами // *Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біологія.* — 2015. — № 1 (62). — С. 94—99.
4. *Колупаев Ю.Е., Вайнер А.А., Ястреб Т.О.* Пролін: физиологические функции и регуляция содержания в растениях в стрессовых условиях // *Вісн. Харків. нац. аграр. ун-ту. Сер. Біологія.* — 2014. — № 2 (32). — С. 6—22.
5. *Diaz P., Betti M., Sanchez D.H. et al.* Deficiency in plastidic glutamine synthetase alters proline metabolism and transcriptomic response in *Lotus japonicus* under drought stress // *New Phytol.* — 2010. — **188**. — P. 1001—1013.
6. *Forde B.G., Lea P.J.* Glutamate in plants: metabolism, regulation and signaling // *J. Exp. Bot.* — 2007. — **58**, N 9. — P. 2339—2358.
7. *Liang X., Zhang L., Natarajan S.K. et al.* Proline mechanisms of stress survival // *Antioxid. Redox Signal.* — 2013. — **19**, N 9. — P. 998—1011.
8. *Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. et al.* Protein measurement with Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* — 1951. — **193**, N 1. — P. 265—275.
9. *Marschner P.* Mineral nutrition of higher plants. — London: Acad. press, 2012. — С. 138—160.
10. *Martinelli T., Whittaker A., Bochicchio A. et al.* Amino acid pattern and glutamate metabolism during dehydration stress in the 'resurrection' plant *Sporobolus stapfianus*: a comparison between desiccation-sensitive and desiccation-tolerant leaves // *J. Exp. Bot.* — 2007. — **58**. — N 11. — P. 3037—3046.
11. *Masclaux-Daubresse C., Reisdorf-Cren M., Pageau K. et al.* Glutamine synthetase-glutamate synthase pathway and glutamate dehydrogenase play distinct roles in the sink source nitrogen cycle in tobacco // *Plant Physiol.* — 2006. — **140**. — P. 444—456.
12. *Mifflin B.J., Habash D.Z.* The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in nitrogen utilization of crops // *J. Exp. Bot.* — 2002. — **53**, N 370. — P. 979—987.
13. *Rabe E.* Altered nitrogen metabolism under environmental stress condition // *Handbook of plant and crop stress.* — New York: Marcel Dekker, 1999. — P. 349—365.
14. *Rabe E., Lovatt C.J.* De novo arginine biosynthesis in leaves of phosphorus-deficient *Citrus* and *Poncirus* species // *Plant Physiol.* — 1984. — **76**. — P. 747—752.
15. *Sadasivam S., Manickam A.* Biochemical methods. — New Delhi: New Age International, 1996. — P. 56—140.
16. *Suominen L.* Evaluation of the *Galega-Rhizobium galegae* system for the bioremediation of oil-contaminated soil // *Environ. Pollut.* — 2000. — **107**, N 2. — P. 239—244.
17. *Suzuki A., Knaff D.B.* Glutamate synthase: structural, mechanistic and regulatory properties, and role in the amino acid metabolism // *Photosynth. Res.* — 2005. — **83**. — P. 191—217.
18. *Terek O., Lapshyna O., Velychko O. et al.* Grude oil contamination and plants // *J. Central European Green Innovat.* — 2015. — **3**. — P. 175—184.
19. *Verma D.P., Zhang C.S.* Regulation of proline and arginine biosynthesis in plants // *Plant Amino Acids.* — New York: Marcel Dekker, 1999. — P. 249—265.

Отримано 11.01.2018

АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ГЛУТАМАТСИНТАЗНОГО ПУТИ В РАСТЕНИЯХ
TRIFOLIUM PRATENSE L. В УСЛОВИЯХ НЕФТЯНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ПОЧВЫ

М.В. Довгаюк-Семенюк, О.И. Величко, О.И. Терек

Львовский национальный университет имени Ивана Франко

Рассмотрена проблема техногенного загрязнения почв нефтью и механизмы адаптации растительных организмов к измененным грунтовым условиям. Исследовано влияние нефтяного загрязнения почвы на активность ферментов глутаматсинтазного пути в растениях *Trifolium pratense* L. Установлено, что глутаминсинтазная (ГС) активность в условиях загрязненной нефтью почвы на начальных этапах роста повышается как в листьях, так и в корнях клевера лугового. Такое возрастание глутаминсинтазной активности в растениях на ранней стадии развития (фаза семядольных листьев) может быть связано с необходимостью обеспечения клеток глутаматом, в частности для синтеза пролина. На следующих стадиях — первого настоящего и первого тройчатого листа — угнеталась глутаминсинтазная и еще существеннее — глутаматсинтазная активность растений. Ингибирование активности ферментов ГС/ГОГАТ пути в растениях клевера лугового в условиях загрязненной нефтью почвы с наступлением следующих фенологических фаз может быть связано с недостатком углеводов. Снижение активности ферментов ГС/ГОГАТ пути рассмотрено не только как результат негативного воздействия условий загрязненной нефтью почвы, но и как один из механизмов регуляции процессов ассимиляции аммония.

THE ACTIVITY OF THE GLUTAMATE SYNTHASE PATHWAY ENZYMES IN
TRIFOLIUM PRATENSE L. PLANTS UNDER THE CONDITIONS OF OIL
POLLUTED SOIL

M.V. Dovgajuk-Semenuk, O.I. Velychko, O.I. Terek

Ivan Franko Lviv National University
4 Hrushevsky St., Lviv, 79005, Ukraine

The problem of soil industrial pollution with oil and mechanisms of plant organisms' adaptation to modified soil conditions are considered. The effect of oil polluted soil on the glutamate synthase pathway enzymes' activity in the *Trifolium pratense* L. plants was investigated. It was revealed that under the influence of oil polluted soil conditions the glutamine synthetase activity had grown on the primary stages of growth both in leaves and roots of red clover plants. Increase of glutamine synthetase activity under the influence of oil polluted soil conditions in the plants on the early stage of development (stage of cotyledon leaves) can be related to the need in cell provision with glutamate, in particular for the proline synthesis. On the following stages of first true and first trifoliolate leaf the glutamine synthetase activity was inhibited and even more significant inhibition shows the glutamate synthase activity. Inhibition of GS/GOGAT pathway enzymes activity in the red clover plants under the influence of oil polluted soil conditions with upcoming of following phenological stages can be related with lack of carbohydrates. The decreased activity of enzymes of GS/GOGAT pathway is considered not only as a result of negative effect of oil polluted soil conditions, but also as one of the mechanisms of ammonia assimilation processes regulation.

Key words: *Trifolium pratense* L., glutamate synthase activity, glutamine synthetase activity, oil polluted soil.