



БИОМИКА/BIOMICS

<http://biomics.ru>



**ВЛИЯНИЕ ГЛИФОСАТА НА ПОГЛОЩЕНИЕ Cu(II) РАСТЕНИЯМИ ЛЮЦЕРНЫ,
ИНОКУЛИРОВАННЫМИ *ENTEROBACTER CLOACAE COMPLEX K7***

Крючкова Е.В., Бурыгин Г.Л., Любунь Е.В., Турковская О.В.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН
410049, Саратов, просп. Энтузиастов 13, e-mail: kryu-lena@yandex.ru

Резюме

В данной работе исследовали процесс поглощения меди Cu(II) и её комплексов с глифосатом (Гл) [Гл–Cu(II)] растениями люцерны посевной (*Medicago sativa* Lam.). Другая задача заключалась в определении протекторной роли ризосферного, деградирующего Гл штамма *E. cloacae complex K7* по отношению к растениям, и его влияния на биодоступность поллютантов. Показано, что Гл значительно повышал поглощение Cu(II) растениями. Концентрация металла в составе комплекса (мкг/мг сухой биомассы) была выше на 50%, чем в вариантах с хелатированной Cu(II). Инокуляция штаммом K7 не привела к статистически достоверному изменению показателя сырой массы растений, кроме варианта с [Гл–Cu(II)]. Сырая масса бактеризованного растения была в 1,5 раза больше, чем не инокулированного. Не зарегистрировано изменение сухой массы растений в ответ на инокуляцию, но установлено повышение степени поглощения металла. В случае присутствия в среде культивирования только меди Cu(II) бактеризованные растения накапливали ее больше, чем не обработанные бактериями: в 1,3 раза при 0,5 мМ и в 2 раза при 1 мМ. Инокуляция не влияла на количество поглощённой Cu(II) в составе комплексов. Наши данные важны для прогнозирования транспорта поллютантов в сельскохозяйственных культурах.

Ключевые слова: глифосат, медь, Гл–Cu комплексы, люцерна (*Medicago sativa*), поглощение поллютантов, PGPB - *E. cloacae complex K7*

Цитирование: Крючкова Е.В., Бурыгин Г.Л., Любунь Е.В., Турковская О.В. Влияние глифосата на поглощение Cu(II) растениями люцерны, инокулированными *Enterobacter cloacae complex K7*. Биомика. 2018. Т.10(3). С. 247-250. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-33

**EFFECT OF GLYPHOSATE ON Cu(II) UPTAKE BY *MEDICAGO SATIVA* LAM.
INOCULATED WITH *ENTEROBACTER CLOACAE COMPLEX K7***

Kryuchkova Ye.V., Burygin G.L., Lyubun' E.V., Turkovskaya O.V.

Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences
13 Prospekt Entuziastov, 410049, Saratov, Russia. e-mail: kryu-lena@yandex.ru

Resume

We examined the uptake of Cu(II) and [Gl–Cu(II)] complexes by alfalfa. Another objective was to determine the protective effect of the plant–growth–promoting, Gl–degrading strain *E. cloacae complex K7* on plants under phytotoxic conditions and the strains influence on the bioavailability of the contaminants. Gl significantly increased the Cu(II) concentration in uninoculated alfalfa (by 50%), as compared with the treatment with the non-chelated metal. Inoculation with strain K7 did not produce statistically significant change in the fresh weight of *M. sativa*, except in the treatment significant with the Gl–Cu complex. Compared with the uninoculated treatment, the fresh weight of the inoculated plants increased by 55%

($p < 0.05$). Inoculation did not produce statistically significant change in the dry weight of plants. However, bacterization influenced the degree of metal accumulation by plants. The amount of non-chelated Cu(II) in the inoculated plants was 1.3-fold greater with 0.5 mM Cu(II) and 2-fold greater with 1 mM Cu(II) than it was in the uninoculated plants. However, inoculation did not affect the degree of uptake of the chelated copper. Our data are important for the prediction of pollutant transport in agricultural crops.

Keywords: glyphosate, copper, Gl–Cu complexes, alfalfa (*Medicago sativa*), uptake of pollution, PGPB - *E. cloacae* complex K7

Citation: Kryuchkova Ye.V., Burygin G.L., Lyubun' E.V., Turkovskaya O.V. Effect of glyphosate on Cu(II) uptake by *Medicago sativa* Lam. inoculated with *Enterobacter Cloacae* complex K7. *Biomics*. 2018. V.10(3). P. 247-250. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-33 [In Russian]

Исследуя процессы биодegradации и биоремедиации токсичных абиогенных загрязнений, необходимо понимать совокупность физико-химических взаимодействий, которые происходят между поллютантами и другими компонентами в объектах окружающей среды. Процессы сорбции и комплексообразования значительно влияют на транспорт, транслокацию, биодоступность и, как следствие, на токсичность и персистентность загрязнений. Данная работа посвящена оценке токсичности и биодоступности меди Cu(II), а также комплексных соединений [Гл–Cu(II)], образованных глифосатом (Гл) и катионами меди Cu(II) по отношению к растениям и растительно-бактериальным ассоциациям. Молекула Гл содержит три полярные функциональные группы (фосфонатную, карбоксильную и аминогруппы), имеющие разную степень протонирования в зависимости от значений pH [Sheals et al., 2001]. По сравнению с другими гербицидами Гл относят к сильно хелатируемым агентам, способным связываться с микро- и макроэлементами, и влиять на биодоступность последних [Mertens et al., 2018]. Ряд работ демонстрируют, что связывание гербицидом металлов приводит к нарушению полноценного минерального питания растений, и опосредованно негативно влияет на процессы растительно-микробных взаимодействий [Eker et al., 2006; Sakmak et al., 2009; Serra et al., 2011; Mertens et al., 2018]. С другой стороны, показано, что присутствие хелатирующих агентов в почве повышает мобильность металлов, и соответственно индуцирует их аккумуляцию растениями [Nowack et al., 2006]. При определённых условиях в прикорневой зоне растений хелаты микробного метаболизма, такие как сидерофоры и органические кислоты, могут конкурировать с Гл за сайты связывания с последующей ремобилизацией металла из Гл-металлического комплекса. Эти свойства природных хелаторов легли в основу фиторемедиации металл-загрязнённых почв [Evangelou et al., 2007]. Необходимо отметить, что ризосферным

бактериальным сообществам отводят ключевую роль в процессах биоминерализации и биотрансформации различных классов абиогенных химических соединений [Gadd, 2010]. Кроме того, ризобактерии способствуют увеличению площади корневой поверхности, повышая количество поглощаемых химических веществ [Sessitsch et al., 2013].

В данном исследовании мы попытались выяснить какова способность растений люцерны поглощать комплексные загрязнения, добавленные в среду культивирования в виде [Гл – Cu(II)] комплекса, какова токсичность комплексных соединений, и влияет ли инокуляция ризосферными бактериями – деструкторами Гл [Kryuchkova et al., 2014] на степень поглощения как катионов Cu(II) отдельно, так и в составе комплекса.

Для 30 суточных растений регистрировали показатели накопления сырой и сухой массы, количество боковых корней. Концентрацию поглощённого растениями металла оценивали методом атомно-абсорбционной спектроскопии (ААС). Полученные данные обрабатывались с применением двухфакторного дисперсионного анализа в модуле Factorial ANOVA программы STATISTICA 6, учитывающего как влияние на исследуемый параметр каждого из факторов (*загрязнитель, инокуляция*) отдельно, так и их совместное действие.

Наибольшее статистически достоверное ингибирующее влияние на показатель сырой биомассы не инокулированных растений оказало комплексное загрязнение ($p=0,0001$). Средняя сырая масса растения, выращенного на [Гл – Cu(II)] была в 2,25 раза меньше, чем в контроле (*без загрязнений*) (рис.1). Инокуляция штаммом K7 не привела к достоверному изменению показателей массы растения (по сырому весу) как в чистом контроле, так и в вариантах с медью ($p=0,231$). Однако аннулировала токсический эффект в вариантах с комплексами. Масса бактеризованного растения была в 1,5 раза больше, чем не обработанного бактериями (рис.1).

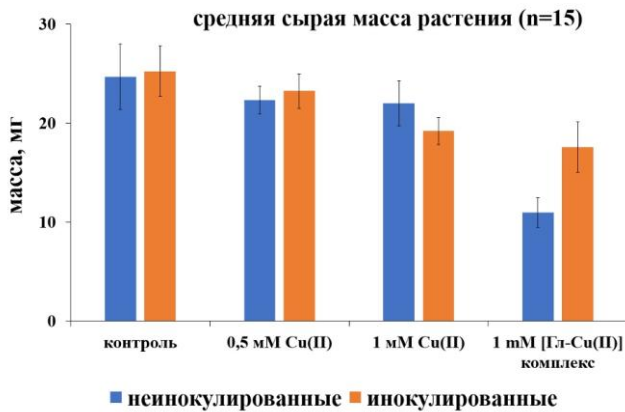


Рис. 1. Влияние загрязнений и инокуляции *E. cloacae complex K7* на накопление сырой биомассы растений. Доверительные интервалы представлены для 5% уровня значимости.

Fig.1. Effect of pollution and of *E. cloacae complex K7* inoculation on fresh weight of plants. Confidence intervals are presented for 5% significance level.

Анализ сухой массы растительных образцов показал, что значительным токсическим эффектом, обладали все исследуемые варианты загрязнений как у неинокулированных ($p=0,000$), так и у бактеризованных растений ($p=0,0254$). Наибольшее ингибирование накопления сухой биомассы в 1,7 раза у неинокулированных растений также показано для комплексов (рис.2).

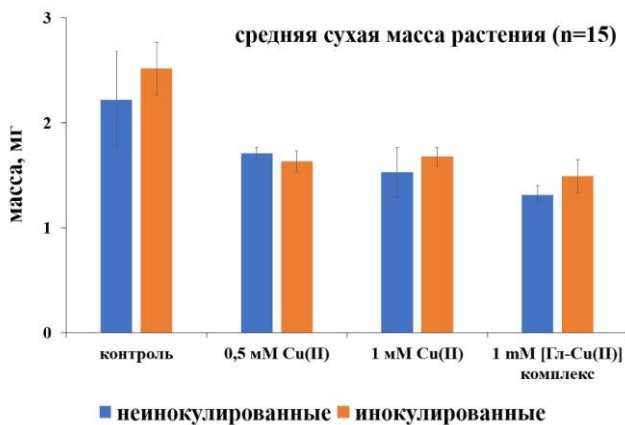


Рис. 2. Влияние загрязнений и инокуляции *E. cloacae complex K7* на накопление сухой биомассы растений. Доверительные интервалы представлены для 5% уровня значимости.

Fig.2. Effect of pollution and of *E. cloacae complex K7* inoculation on dry weight of plants. Confidence intervals are presented for 5% significance level.

Нам не удалось зафиксировать положительного влияния от инокуляции на показатели сухой биомассы ($p=0,1287$). Однако, у инокулированных растений наблюдался более высокий процент приживаемости проростков и более интенсивное развитие боковых корней, что свидетельствует об увеличении корневой поверхности и может быть причиной увеличения интенсивности поглощения загрязнителей. Исключением были растения, выращенные на комплексах, у которых не зафиксировано наличия боковых корней.

Результаты ААС, отражающие количество $Cu(II)$, поглощённой растениями, представлены на (рис. 3). В случае присутствия в среде культивирования только меди бактеризованные растения накапливали ее больше, чем не обработанные бактериями: в $1,3 \pm 0,2$ раза при 0,5 мМ и в 2 – при 1 мМ. Очевидно, это объясняет, почему инокуляция *E. cloacae complex K7* не привела к отчётливому стимулированию прироста биомассы. Установлено, что хелатирование меди Гл не нарушает транслокацию металла из среды культивирования в растения, как это было показано для катионов (Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} и Fe^{2+}) [Cakmak et al., 2009]. В случае с [Гл – $Cu(II)$] комплексами количество поглощённого металла было в 2,25 раза выше по сравнению с чистой $Cu(II)$ в концентрации 1 мМ у неинокулированных растений.

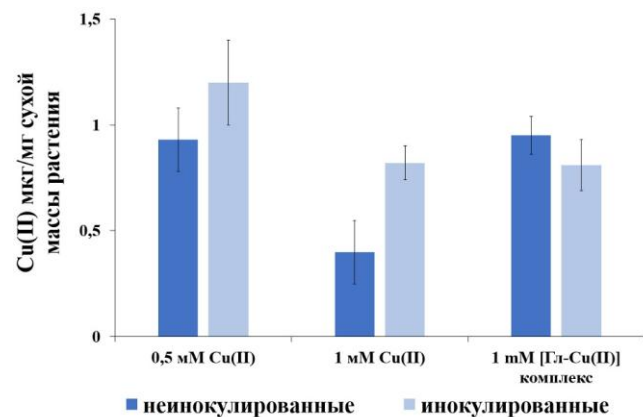


Рис. 3. Влияние инокуляции *E. cloacae complex K7* на поглощение $Cu(II)$ растениями, выращенными с различными концентрациями загрязнений.

Fig.3. Effect of *E. cloacae complex K7* inoculation on uptake of $Cu(II)$ by plants cultivated in different concentrations of pollutants.

Полученные результаты согласуются с работами [Cakmak et al., 2009; Eker et al., 2006], в которых показано, что обработка растений

глифосатом приводит к значительному повышению концентрации Cu(II) по сравнению с необработанными. Количество поглощённого металла в наших исследованиях не зависело от бактериализации. Концентрация хелатирующей Cu(II) и меди в составе [Гл – Cu(II)] у инокулированных растений достоверно не отличалась между собой (Рис. 3). Наибольшее количество поглощённой Cu(II)/мг сухой биомассы было зарегистрировано в варианте с несвязанным металлом в концентрации 0,5мМ, очевидно из-за более низкого уровня токсичности.

Таким образом, впервые проведена оценка токсичности и биодоступности [Гл – Cu(II)] комплексов по отношению к растениям в долгосрочном эксперименте. В доступных нам публикациях подобные работы проводили либо в течение 24 часов на гидропонике, либо, обрабатывая комплексами уже взрослые растения [Sundaram and Sundaram, 1997; Cakmak et al., 2009]. Более длительное воздействие загрязнителей на растения позволило нам объективно оценить их уровень токсичности. Показано, что исследуемый [Гл – Cu(II)] комплекс обладает высокой биодоступностью по отношению к растениям, хелатирующая медь накапливается в 2 раза больше, чем свободная. Это важно учитывать при выращивании хозяйственно-полезных культур и создании технологий очистки объектов окружающей среды от сложных поллютантов. Штамм *E. cloacae complex* K7 оказывал положительное влияние на приживаемость и развитие боковых корней проростков *M. sativa* Lam., и как следствие на фитоэкстракцию катионов меди, однако не влиял на количество поглощённых растениями комплексов.

References

1. Cakmak I., Yazici A., Tutus Y., Ozturk L. Glyphosate reduced seed and leaf concentrations of calcium, manganese, magnesium, and iron in non-glyphosate resistant soybean. *Eur. J. Agron.* 2009. V. 31(3). P. 114-119. DOI: 10.1016/j.eja.2009.07.001
2. Eker S., Ozturk L., Yazici A., Erenoglu B., Romheld V., Cakmak I. Foliar-applied glyphosate substantially reduced uptake and transport of iron and manganese in sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants. *J. Agric. Food Chem.* 2006. V. 54(26). P. 10019-10025. DOI: 10.1021/jf0625196
3. Evangelou M.W.H., Ebel M., Schaeffer A. Chelate assisted phytoextraction of heavy metals from soil. Effect, mechanism, toxicity, and fate of chelating agents. *Chemosphere.* 2007. V. 68(6). P. 989-1003. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2007.01.062
4. Gadd G.M. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology.* 2010. V.156(3). P.609-643. DOI: 10.1099/mic.0.037143-0
5. Kryuchkova Y. V., Burygin G. L., Gogoleva N. E., Gogolev Y. V., Chernyshova M. P., Makarov O. E., Turkovskaya O. V Isolation and characterization of a glyphosate-degrading rhizosphere strain, *Enterobacter cloacae* K7. *Microbiol. Res.* 2014. V. 169(1). P. 99-105. DOI: 10.1016/j.micres.2013.03.002
6. Mertens M., Höss S., Neumann G., Afzal J., Reichenbecher W. Glyphosate, a chelating agent – relevant for ecological risk assessment. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2018. V. 25(6). P. 5298-5317. DOI: 10.1007/s11356-017-1080-1
7. Nowack B., Schulin R., Robinson B. H. Critical assessment of chelant-enhanced metal phytoextraction. *Environ. Sci. Technol.* 2006. V. 40(17). P. 5225-5232. DOI: 10.1021/es0604919
8. Serra A. P. Glyphosate herbicide reduces nutritional efficiency of glyphosate-resistant soybean. *Ciência Rural.* 2011. V. 41(1). P. 77-84. DOI: 10.1590/S0103-84782011000100013
9. Sessitsch A., Kuffner M., Kidd P., Vangronsveld J., Wenzel W.W., Fallmann K., Puschenreiter M. The role of plant-associated bacteria in the mobilization and phytoextraction of trace elements in contaminated soils. *Soil Biol. Biochem.* 2013. V. 60. P. 182-194. DOI: 10.1016/j.soilbio.2013.01.012
10. Sheals J., Persson P., Hedman B. IR and EXAFS spectroscopic studies of glyphosate protonation and copper (II) complexes of glyphosate in aqueous solution. *Inorg. Chem.* 2001. V. 40(17). P. 4302-4309. DOI: 10.1021/ic000849g
11. Sundaram A., Sundaram K. M. S. Solubility products of six metal-glyphosate complexes in water and forestry soils, and their influence on glyphosate toxicity to plants. *J. Environ. Sci. Health Part B.* 1997. V. 32(4). P. 583-598. DOI: 10.1080/03601239709373104