

УДК 577.3.001.57:579.64

**А.П. Колбас<sup>1</sup>, Н.Ю. Колбас<sup>2</sup>**<sup>1</sup>канд. биол. наук, доц., доц. каф. ботаники и экологии,  
начальник Центра экологии*Брестского государственного университета имени А.С. Пушкина*<sup>2</sup>канд. биол. наук, доц., зав. каф. химии*Брестского государственного университета имени А.С. Пушкина*e-mail: kolbas77@mail.ru

## **ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭНДОФИТНЫХ БАКТЕРИЙ ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ ФИТОЭКСТРАКЦИИ МЕДИ ПОДСОЛНЕЧНИКОМ: 2. ВЛИЯНИЕ НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПАРАМЕТРЫ**

*Микроорганизмы могут повышать устойчивость растений к потенциально токсичным элементам в загрязненной среде, а также эффективность фитоэкстракции. Эндوفитные бактерии, полученные из корней и семян, устойчивых к меди популяций *Agrostis capillaris* L., были введены в растения мутантной линии подсолнечника. При использовании серии загрязненных медью почв было оценено влияние инокулянтов на функциональные параметры. Было определено влияние четырех видов обработки на следующие параметры растений: общее содержание хлорофилла, содержание меди в корнях и побегах, а также на фитоэкстракцию меди надземными органами. Полезное влияние семенного нефилтрованного экстракта и экстракта без бактериальных клеток на содержание фотосинтетических пигментов при низких и средних уровнях загрязнения медью объясняется как действием эндوفитных бактерий, так и растворимыми биоактивными веществами, содержащимися в семенах и околоплоднике, такими как процианидины. Эти же экстракты значительно повышали эффективность фитоэкстракции меди при низких и умеренных экспозициях меди в почве. Предлагается практическое использование данной обработки подсолнечника для повышения устойчивости растений и эффективности фиторемедиационных мероприятий, а также проведение детального биохимического анализа.*

### **Введение**

В предыдущей работе [1] нами были рассмотрены аспекты повышения эффективности фиторемедиационных мероприятий за счет повышения биометрических показателей мутантной линии подсолнечника при инокуляции их семян эндوفитными бактериями, полученными как из семян, так и из корней устойчивых к меди популяций *Agrostis capillaris* L.

В последнее время для оценки устойчивости растений к меди и эффективности фиторемедиации загрязненных этим элементом субстратов используется ряд функциональных параметров, которые характеризуются ранними фенотипическими ответами [2].

Избыточное содержание меди в субстратах и тканях может быть помехой для биосинтеза фотосинтетических пигментов, а также может модифицировать пигменты и белковые компоненты фотосинтетических мембран [3].

При субнормальных и умеренных концентрациях меди, когда реакции корня уже заметны, а рост надземных органов еще не изменяется, в последних наблюдается снижение общего содержания хлорофилла и соотношения хлорофилла а (Хл а) к хлорофиллу b (Хл b), однако общая продуктивность фотосинтеза остается той же [4].

При высоких концентрациях меди, когда рост растений угнетается, низкое содержание хлорофилла приводит к снижению интенсивности фотосинтеза [5]. В результате ингибирования фотосистемы II и более активного разрушения Хл b происходит увеличение соотношения Хл а / Хл b. Также, хотя и в меньшей степени, наблюдается усиление распада каротиноидов [5].

Побочным эффектом ингибирования фотосинтеза медью является усиление образования свободных радикалов, что влечет увеличение скорости старения листьев вследствие окислительного стресса [5]. Возможной причиной окислительного стресса может

быть снижение эффективности антиоксидантной защиты под действием ионов меди, что, в свою очередь, приводит к вовлечению фотосистемы II в фотоингибирование.

Однако в экспериментах [6] не было найдено никаких четких подтверждений, что медь может индуцировать изменения биофизики фотосинтеза у *Haumaniastrum kantangense* (S. Moore) P.A. Duvign & Plancke.

Концентрации микроэлементов в растительных тканях могут использоваться для быстрого определения качества почвы с учетом пищевых цепей, оценки эффективности различных ремедиационных мероприятий для почв, загрязненных металлами [7]. Однако зачастую достоверные корреляции между химическим составом листьев и почвы не являются достаточным условием для использования этого параметра в биомониторинге качества почв. Концентрация меди в растении зависит обычно от ее содержания в питательном растворе или почве (в отличие от большинства других элементов), однако характер этой зависимости различается у видов и органов растений.

В предыдущих исследованиях были получены разные результаты по изменению поглотительной способности растений под действием эндофитов. Так, при обработке семян *Brassica juncea* L. штаммами устойчивых к меди бактерий (*Achromobacter xylosoxidans* A × 10), изолированных из почвы медных рудников [8] поступление меди в растение возрастало. Также было показано, что добавление в почву *Pseudomonas aspleni* способствует поступлению меди у *Brassica napus* L. и увеличению ее биомассы [9].

Штамм бактерий (MS2), изолированный из ризосферы *Elsholtzia splendens* Nakai ex F. Maek, произрастающей на медных рудниках Tonglu Mountain, повышает водорастворимость меди, а также аккумуляцию меди в корнях и побегах [10]. Три вида медь-устойчивых эндофитных бактерий, изолированных из медь-толерантных растений, произрастающих на заброшенных медных рудниках, а именно: *Ralstonia* sp. J1-22-2, *Pantoea agglomerans* Jp3-3 и *Pseudomonas thivervalensis* Y1-3-9, – повышают биомассу и содержание меди в надземных частях рапса [11].

С другой стороны, инокуляция семян с помощью *Proteus vulgaris* Hauser снижала аккумуляцию меди в корнях и побегах *Cajanus cajan* L. при одновременном положительном воздействии на всхожесть, биомассу и содержание хлорофилла [12]. Схожие результаты по уменьшению поступления металлов наблюдались у *Nicotiana tabacum* L. для Cd, *Elsholtzia splendens* L. для Cu. При этом растения, инокулированные бактериями, имеют большую биомассу и устойчивость к металлам, что является результатом усиления синтеза биоактивных веществ [13].

Анализ отечественных и зарубежных работ показал, что, при оценке эффективности фиторемедиационных мероприятий весьма показательными являются следующие параметры: содержание фотосинтетических пигментов, концентрация контаминанта в надземных и подземных органах, а также вынос элемента надземными органами.

*Цель* данной работы – исследование влияние эндофитных бактерий на функциональные параметры растений в широком диапазоне содержания меди в почве.

Для достижения цели были поставлены следующие *задачи*:

- 1) определить содержание хлорофилла в надземных органах, концентрации меди в надземных и подземных органах;
- 2) рассчитать вынос элемента при фитоэкстракции.

## 1. Материалы и методы

Приготовление почвенных смесей, инокулятов; инокуляция семян и последующее выращивание мутантной линии подсолнечника в горшках было подробно описано ранее [1]. Все опыты были проведены в трехкратной повторности, перечень обработок растений и концентраций меди в почве приводится в таблице.

Таблица. – Перечень обработок растений и концентраций меди в почве

| Тип инокулянта                      | Аббревиатура | Соотношение почв                                       | Диапазон содержания меди в почве (мг Cu/кг) |
|-------------------------------------|--------------|--|---|
| Контроль                            | К            | $C_0 - C_{100}$ шаг 10%                                | 13–1020                                     |
| Среда 869 и $MgSO_4$                | КМg          | $C_0 - C_{100}$ шаг 10%                                | 13–1020                                     |
| Корневой экстракт                   | КЭ           | $C_0 - C_{100}$ шаг 10%                                | 13–1020                                     |
| Семенной экстракт (нефильтрованный) | СЭ           | $C_0 - C_{100}$ шаг 10% (исключение $C_{70}, C_{90}$ ) | 13–1020                                     |
| Семенной экстракт (фильтрованный)   | СЭФ          | $C_0 - C_{60}$ шаг 10%                                 | 13–617                                      |

### 1.1 Содержание фотосинтетических пигментов

После месяца выращивания фотосинтетические пигменты были экстрагированы диметилформамидом из второй пары листьев в двух повторностях, после чего была определена оптическая плотность экстрактов хлорофилла а и b при длинах волн 470, 647 нм соответственно. Нами было рассчитано общее содержание хлорофилла [14]. Все измерения были проведены с использованием спектрофотометра CARY 100 Scan (Япония).

### 1.2 Химический состав растений

Растения были собраны после одного месяца выращивания на стадии вторых настоящих листьев. Побеги и корни были собраны и взвешены для определения сырой массы, промыты в дистиллированной воде, высушены при температуре 50 °C в течение 48 часов, после чего была определена сухая масса. Растительные образцы измельчали с помощью шаровой мельницы (Retsch MM200). Взвешенный растительный материал (0,5 г) был подвержен мокрому озолению с использованием СВЧ-минерализатора (Marsxpress, SEM) при 180 °C с добавлением 5 мл сверхчистой 14 М  $HNO_3$  и 2 мл 30%-ной перекиси водорода (не содержащей фосфатов). Сертифицированный образец (V463 VIPEA, Франция) и холостой образец были включены во все серии.

Концентрации меди определены методом ICP-AES (Varian Liberty 200) и проверены согласно стандарту, причем отклонения от нормы в трех повторностях не превышали 5%. В статье все концентрации представлены по отношению к сухой массе.

Вынос элемента надземными органами растения (минералломасса или фитоэкстракционный потенциал) рассчитывали как произведение массы органа и концентрацию исследуемого элемента в нем [15].

### 1.3 Статистический анализ

Статистическая обработка была произведена с использованием программы R версия 2.13.1 (Foundation for Statistical Computing, Вена, Австрия). Для определения достоверной разницы средних значений использовался t-критерий Стьюдента. Средние значения, обозначенные на рисунках звездочками, отличаются менее чем на 5%.

## 2. Результаты

### 2.1 Содержание хлорофилла

Общее содержание хлорофилла в исследованных листьях подсолнечника колеблется в пределах от 75 до 450 мг/м<sup>2</sup>. Все варианты опыта показывают повышенное содержание хлорофилла при низких содержаниях меди в почве, которое постепенно уменьшается при увеличении экспозиции меди (рисунок, а и б).

В целом хлороз не характерен для низкого и умеренного уровня загрязнения медью. При уровне меди в 416 мг/кг почвы КЭ растения показывают значительно боль-

шее содержание хлорофилла по сравнению с контрольными растениями. При высоком уровне содержания меди (1 020 мг Cu/кг почвы) этот параметр после обработки корневыми инокулянтами был ниже контроля. В основном видимый хлороз у растений КЭ наблюдался несколько раньше (416 мг Cu/кг почвы), чем при обработке семенными инокулянтами, что показывает значительное увеличение содержания хлорофилла и ослабление эффекта хормесиса в диапазоне между 13 и 617 мг Cu/кг почвы (исключение составляют 114 и 214 мг Cu/кг почвы).

Максимальный улучшающий эффект (в 2,9 раза) был зафиксирован для семенных эндофитов при содержании меди в почве, равном 517 мг/кг, в то же время различия между СЭ и СЭФ не были подтверждены статистически.

Эффекты снижения содержания хлорофилла могут быть связаны с активизацией перекисного окисления липидов, что влечет за собой разрушение тилакоидных мембран в хлоропласте [16]. Медь способна замещать атомы магния в молекуле хлорофилла [17]. Другой эффект от избытка меди – это развитие дефицита железа. При недостатке железа, необходимого для биосинтеза хлорофилла, могут развиваться следующие симптомы: уменьшение общего содержания хлорофилла в листьях, увеличение соотношения Хл а / Хл b, а также общее снижение фотосинтетической активности. Поэтому для нормального роста растений при медь-индуцированном оксидантном стрессе необходимы подкормки, содержащие железо [18].

В общем, редукция фотосинтетического аппарата и уменьшение содержания пигментов приводит к снижению эффективности фотосинтеза и, следовательно, снижает накопление пластических веществ и, в конечном итоге, продуктивность (биомассу) растений.

## **2.2 Содержание меди в растениях и фитоэкстракция меди надземными органами**

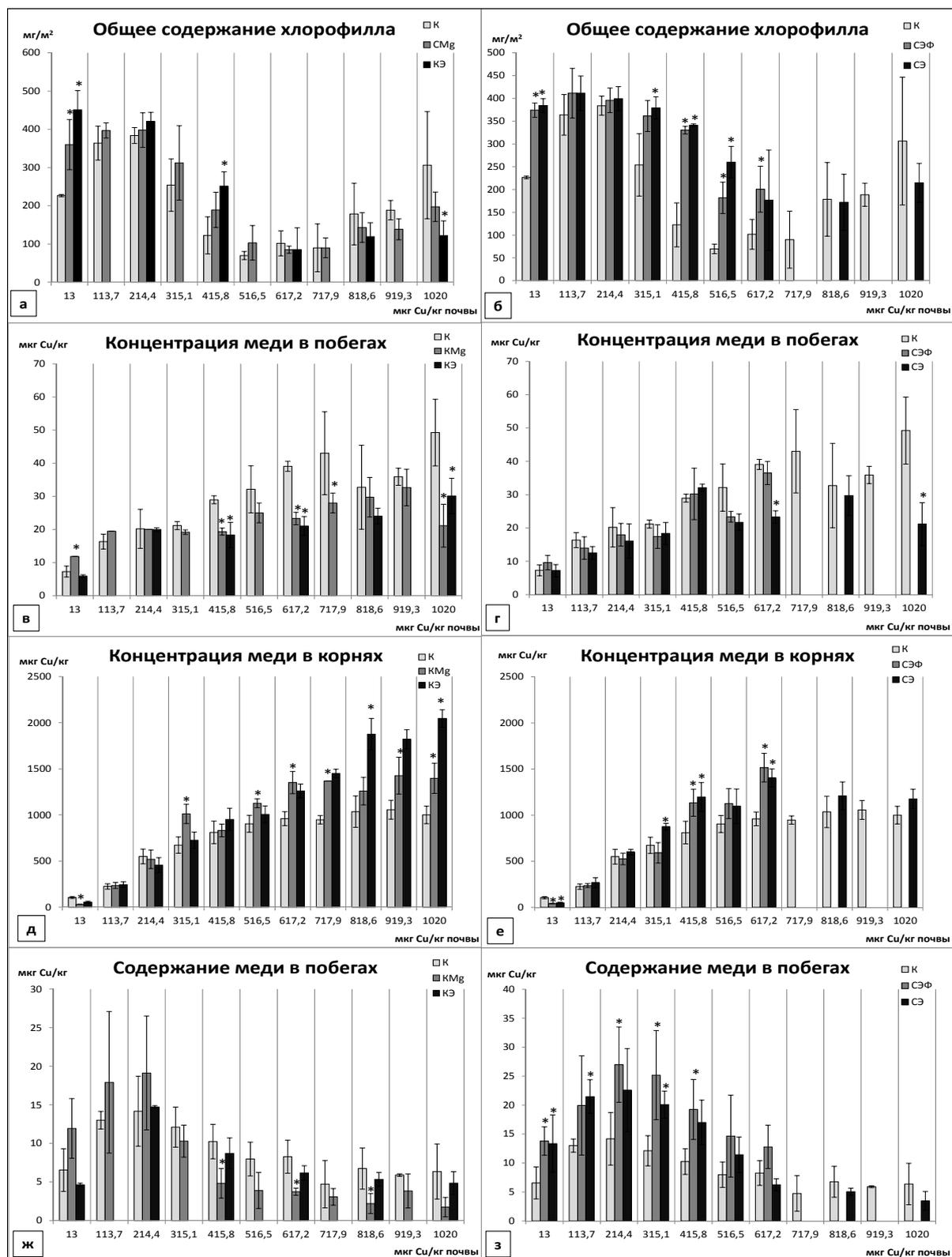
### **2.2.1 Концентрация меди в побегах**

В диапазоне 13–315 мг Cu/кг почвы содержание меди в побегах контрольных и обработанных растений схоже возрастает (исключение составляет КМg при 13 мг Cu/кг почвы, который значительно выше остальных) и выравнивается на уровне содержания в 20 мг Cu/кг сухой растительной массы (рисунок, в и г).

Когда общее содержание меди в почве достигает 414 мг/кг, содержание меди в побегах контрольных растений превышает критическое пороговое значение (а именно 25–30 мг Cu/кг растительного материала), затем достигает значения в 40 мг Cu/кг растения при содержании меди в почве 718 мг/кг и после этого снижается. По литературным данным, средние концентрации меди в тканях сформированного побега растения в норме находятся в пределах 5–30 мг/кг [19].

В диапазоне между 416 и 819 мг Cu/кг почвы модельности КЭ и КМg характеризовались более низкой концентрацией меди в побегах по сравнению с СЭ, СЭФ (рисунок, г) и контрольными растениями (рисунок, в).

При сравнении с контрольными растениями обе модельности с семенным экстрактом (СЭ и СЭФ) снижают концентрацию меди в побегах при 517 мг/кг почвы, в то время как при более высоких экспозициях меди только у СЭ инокулянтов происходит снижение содержания меди в побегах. Содержание меди в побегах КЭ растений прогрессивно возрастает и достигает порогового значения только при высоком ее содержании в почве (819–1 020 мг/кг). Во всех случаях инокулированные растения не показывали значения содержания меди в побегах выше контрольных.



(а, б) – общее содержание хлорофилла; (в, г) – концентрация меди в побегах;  
 (д, е) – концентрация меди в корнях; (ж, з) – содержание меди в побегах (фитоэкстракция).  
 Т-тест < 0.05

**Рисунок. – Ответы растений на увеличение концентрации меди с использованием модальностей КМg и СЭФ или инокулянтов СЭ и КЭ (К–контроль)**

### 2.2.2 Концентрация меди в корнях

В диапазоне 13–315 мг Cu/кг почвы все растения показывали постепенное линейное увеличение концентрации меди в корнях (рисунок, д и е). Увеличенное содержание меди в корнях по сравнению с побегами отражает тенденцию к преимущественному аккумулярованию ее в корнях подсолнечника, описанную ранее [20]. При концентрации меди в почве в 416 мг/кг этот показатель в корнях выше в обеих семенных модальностях (СЭ и СЭФ) (рисунок, е). При более высоких концентрациях корни контрольных растений накапливали до 1 000 мг Cu/кг сухого веса растения.

Напротив, концентрации меди в корнях инокулированных растений превышают это значение уже при содержании меди в почве, равном 614 мг/кг, и достигают стабильного уровня в 1 500 мг Cu/кг растения. Исключение КЭ растения, которые продолжают увеличивать концентрацию меди вплоть до 2 000 мг Cu/кг сухого веса корней.

В диапазоне 416–617 мг Cu/кг почвы в модальностях СЭ и СЭФ увеличивается концентрация меди с одновременным увеличением биомассы корней и стеблей [1], поэтому эффект разбавления не присутствовал. При высоких экспозициях меди инокулянты КЭ и КМg обеспечивают увеличение концентрации меди в корнях (рисунок, д), которые могут способствовать фитостабилизации меди. Магний в сочетании с компонентами среды 869 может улучшать связывание меди через включение защитных механизмов. Усиление накопления меди в корнях эндофитными бактериями было описано ранее. Например, микробы из ризосферы *Elsholtzia splendens* Nakai ex F. Maek. являются ключевыми факторами в повышении растворимости меди в загрязненной почве и накоплении ее в корнях (в 2,5 раза) [10].

### 2.2.3. Фитоэкстракция меди побегами

При всех типах обработки содержание меди в побегах, рассчитанное как произведение массы побегов и концентрации меди в них, было максимальным в диапазоне между 114 и 214 мг Cu/кг почвы (рисунок, ж и з). Разница вызвана главным образом изменениями в биомассе побегов, связанными с усиленным ростом корней и метаболизмом растений. В диапазоне 13–517 мг Cu/кг почвы обе модальности СЭ и СЭФ повышали фитоэкстракцию меди в 1,3–2,2 раза по сравнению с контрольными растениями. Абиотический раствор КМg оказывал незначительный позитивный эффект, статистически не подтвержденный при малом содержании меди в почве (13–114 мг Cu/кг почвы). Напротив, растения КЭ не увеличивали фитоэкстракцию меди побегами. Таким образом, семенной экстракт с бактериальными клетками или без них имел наибольшее улучшающее влияние на фитоэкстракцию меди.

Влияние ЭБ на извлечение металлов (металлоидов) зависит как от вида растений, так и от происхождения бактерий. Например, инокуляция повышает содержание Cu в *Brassica juncea* L., но уменьшает содержание As в *Helianthus annuus* L. [21]. Изоляты из ризосферы уменьшают концентрацию металлов в корнях, в то время как эндофитные бактерии повышают концентрацию металла в листьях, не оказывая значительного влияния на рост растений. Корневые эндофиты могут улучшать функции корня и экстракцию металла за счет высвобождения протонов, сидерофоров, органических кислот, фенольных соединений и полиаминов [22]. В нашем случае все штаммы КЭ были классифицированы как производящие сидерофоры, в то время как по отношению к синтезу органических кислот, растворимости неорганического фосфора, активности АЦК (аминоциклопропановая кислота)-дезаминаза выделялись только отдельные штаммы [1].

Эндофитные бактерии могут усиливать устойчивость растений к меди и улучшать рост посредством различных биологических механизмов. Бактериальная АЦК-дезаминаза может ограничивать синтез этилена у растений в состоянии стресса [23].

Четыре штамма из инокулята КЭ проявляют такую активность [1]. Синтез фитогормонов, особенно ИУК, может приводить к образованию АЦК его выделению корнями и абсорбцией эндофитными бактериями, которые переводят его в соли аммония и  $\alpha$ -кетобутирата. В этом случае не только КЭ являются поставщиками ИУК [1]. Растворимые биоактивные вещества, содержащиеся в семенах и околоплоднике, например, соединения, обладающие антимикробными и антиоксидантными свойствами, процианидины, заслуживают большего внимания.

Чтобы получить дополнительную информацию для интерпретации полученных данных, будущие исследования должны проводиться в следующих направлениях:

- 1) определение ЭБ, представленных в семенах металлустойчивых популяций *Agrostis capillaris*, наличие растворимых биоактивных соединений, в частности, элиситоров в семенном экстракте, лишённом бактериальных клеток;
- 2) характеристика потенциальной роли для каждого штамма СЭ и тестирование консорциума, наиболее эффективного для биоаугментации;
- 3) подтверждение присутствия ЭБ в тканях инокулированного подсолнечника;
- 4) полевые испытания коммерческих сортов и мутантных линий подсолнечника, потенциально пригодных для фитоэкстракции [15] с наиболее эффективными ЭБ-консорциумами.

### **Заключение**

Инокуляция проросших, поверхностно стерилизованных семян подсолнечника с помощью фильтрованных и нефилтрованных экстрактов семян *Agrostis capillaris*, устойчивых к меди, может улучшать рост и развитие данной мутантной линии через изменение функциональных параметров растений в диапазоне содержания меди в почве от 14 до 517 мг/кг. Максимальный улучшающий эффект для фотосинтетических пигментов был зафиксирован при использовании семенных экстрактов и концентрации меди в почве 517 мг/кг.

Концентрация меди в побегах контрольных и обработанных растений схоже возрастает в диапазоне 13–315 мг Cu/кг почвы, а в интервале между 416 и 819 мг Cu/кг данный параметр характеризовался более низкой величиной по сравнению с контролем. При этом фитотоксические максимумы в тканях побегов не были превышены

При высоких экспозициях меди корневые инокулянты КЭ обеспечивают увеличение концентрации элемента в корнях, что способствует фитостабилизации металла. В диапазоне 13–517 мг Cu/кг почвы обе модальности СЭ и СЭФ повышали фитоэкстракцию меди в 1,3–2,2 раза. Улучшающий эффект обеспечивался повышением массы растений при этих экспозициях и сохранением концентрации металла в тканях, схожими с контрольными.

Выявлено улучшающее влияние эндофитных бактерий, обитающих в семенах, а также дополнительное влияние растворимых биоактивных веществ из нефилтрованного экстракта. Напротив, культивируемые ЭБ, полученные из поверхностно стерилизованных корней Cu-устойчивых *Agrostis capillaris* L., повышают урожайность подземных и надземных частей подсолнечника при высоких уровнях содержания меди в почве.

Предлагается дальнейшее детальное изучение биохимического состава семенного экстракта и изучение в перспективе молекулярных механизмов ответов растений.

### **СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Колбас, А. П. Использование эндофитных бактерий для улучшения фитоэкстракции меди подсолнечником: 1. Влияние на структурные параметры / А. П. Кол-

бас, Н. Ю. Колбас, М. Менш // Весн. Брэсц. ун-та. Сер. 5, Хімія. Біялогія. Навукі аб зямлі. – 2016. – № 2. – С. 34–42.

2. Phenotypic seedling responses of a metal-tolerant mutant line of sunflower growing on a Cu-contaminated soil series: potential uses for biomonitoring of Cu exposure and phytoremediation / A. Kolbas [et al.] // *Plant and Soil*. – 2014. – Vol. 376. – P. 377–397.

3. Maksymiec, W. Effect of copper on cellular processes in higher plants / W. Maksymiec // *Photosynthetica*. – 1997. – Vol. 34. – P. 321–342.

4. Rousos, P. A. Physiological-responses of cabbage to incipient copper toxicity / P. A. Rousos, H. C. Harrison, K. L. Steffen // *J. American Society for Horticultural Sci.* – 1989. – Vol. 114. – P. 149–152.

5. Luna, C. M. Oxidative damage caused by an excess of copper in oat leaves / C. M. Luna, C. A. Gonzalez, V. S. Trippi // *Plant and Cell Physiology*. – 1994. – Vol. 35. – P. 11–15.

6. Differences in copper accumulation and copper stress between eight populations of *Haumaniastrum katangense* / H. Peng [et al.] // *Environmental and Experimental Botany*. – 2012. – Vol. 79. – P. 58–65.

7. A critical review on the bio-removal of hazardous heavy metals from contaminated soils: Issues, progress, eco-environmental concerns and opportunities / G. Wu [et al.] // *J. Hazardous Materials*. – 2010. – Vol. 174. – P. 1–8.

8. Ma, Y. Inoculation of plant growth promoting bacterium *Achromobacter xylosoxidans* strain Ax10 for the improvement of copper phytoextraction by *Brassica juncea* / Y. Ma, M. Rajkumar, H. Freitas // *J. Environmental Management*. – 2009. – Vol. 90. – P. 831–837.

9. Reed, M. L. E. Growth of canola (*Brassica napus*) in the presence of plant growth-promoting bacteria and either copper or polycyclic aromatic hydrocarbons / M. L. E. Reed, B. R. Glick // *Canadian Journal of Microbiology*. – 2005. – Vol. 51. – P. 1061–1069.

10. Effect of copper-tolerant rhizosphere bacteria on mobility of copper in soil and copper accumulation by *Elsholtzia splendens* / Y. X. Chen [et al.] // *Environment International*. – 2005. – Vol. 31. – P. 861–866.

11. Characterization of ACC deaminase-producing endophytic bacteria isolated from copper-tolerant plants and their potential in promoting the growth and copper accumulation of *Brassica napus* / Y. Zhang [et al.] // *Chemosphere*. – 2011. – Vol. 83. – P. 57–62.

12. Rani, A. Declination of copper toxicity in pigeon pea and soil system by growth-promoting *Proteus vulgaris* KNP3 strain / A. Rani, Y. S. Shouche, R. Goel // *Current Microbiology*. – 2008. – Vol. 57. – P. 78–82.

13. Endophytic bacteria from seeds of *Nicotiana tabacum* can reduce cadmium phytotoxicity / C. Mastretta [et al.] // *International Journal of Phytoremediation*. – 2009. – Vol. 11. – P. 251–267.

14. Cadmium toxicity effects on growth, mineral and chlorophyll contents, and activities of stress related enzymes in young maize plants (*Zea mays* L.) / A. Lagriffoul [et al.] // *Plant and Soil*. – 1998. – Vol. 200. – P. 241–250.

15. Copper phytoextraction in tandem with oilseed production using commercial cultivars and mutant lines of sunflower / A. Kolbas [et al.] // *International Journal of Phytoremediation*. – 2011. – Vol. 13, suppl. 1. – P. 55–76.

16. Yruela, I. Copper in plants / I. Yruela // *Brazilian Journal of Plant Physiology*. – 2005. – Vol. 17. – P. 145–156.

17. Copper-induced inhibition of photosynthesis: limiting steps of in vivo copper chlorophyll formation in *Scenedesmus quadricauda* / H. Kupper [et al.] // *Functional Plant Biology*. – 2003. – Vol. 30. – P. 1187–1196.

18. RHIZO-test: A plant-based biotest to account for rhizosphere processes when assessing copper bioavailability / M. N. Bravin [et al.] // *Environmental Pollution*. – 2010. – Vol. 158. – P. 3330–3337.
19. Kabata-Pendias, A. Soil-plant transfer of trace elements - an environmental issue / A. Kabata-Pendias // *Geoderma*. – 2004. – Vol. 122. – P. 143–149.
20. Copper excess triggers phospholipase D activity in wheat roots / F. Navari-Izzo [et al.] // *Phytochemistry*. – 2006. – Vol. 67. – P. 1232–1242.
21. Lyubun, Y. Use of rhizobacteria to inoculate agricultural crops grown on arsenic-polluted soil / Y. Lyubun, M. Chernyshova // *J. Biotechnology*. – 2010. – Vol. 150. – P. 247–255.
22. Rajkumar, M. Effects of inoculation of plant-growth promoting bacteria on Ni uptake by Indian mustard / M. Rajkumar, H. Freitas // *Bioresource Technology*. – 2008. – Vol. 99. – P. 3491–3498.
23. Genetic diversity and characterization of heavy metal-resistant-endophytic bacteria from two copper-tolerant plant species on copper mine wasteland / L.-N. Sun [et al.] // *Bioresource Technology*. – 2010. – Vol. 101. – P. 501–509.

Рукапіс паступіў у рэдакцыю 14.04.2016

**Kolbas A., Kolbas N. Endophytic Bacteria Use to Improve Copper Phytoextraction by Sunflower:  
2. Effect on Biochemical Parameters**

*Microorganisms can enhance biomass production and tolerance of plants to trace elements in stress environment, and improve the efficiency of phytoextraction. Endophytic bacteria from roots and crude seed extracts of a Cu-tolerant population of *Agrostis capillaris* L. were inoculated to a sunflower mutant line and their influence on biochemical parameters and Cu phytoextraction was assessed using a Cu-contaminated soil series. The beneficial influence of crude and bacterial cell-free seed extracts, likely related, respectively, to seed endophytic bacteria and soluble bioactive compounds and elicitors in seeds and bran, such as procyanidins. The same extracts significantly increased the efficiency of copper phytoextraction at low and moderate exposures. We suggests practical applications using inoculated sunflower for Cu phytoextraction.*