


Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Влияние ионов меди на ассоциации бактерий рода *Azospirillum* с проростками пшеницы (*Triticum aestivum* L.)

А.Ю. Муратова , Е.В. Любунь, С.Н. Голубев, О.В. Турковская

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленное структурное подразделение
Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук», Саратов, Россия
 muratova_a@ibppm.ru


Аннотация. Растительно-микробные ассоциации в результате своей физиолого-биохимической активности способны определять подвижность, биодоступность и накопление в растительных тканях тяжелых металлов. Указанные способности являются основой для использования растений и ассоциированных с ними микроорганизмов в разработке подходов, обеспечивающих как предотвращение попадания токсичных металлов в пищевые культуры, так и извлечение загрязнителей из загрязненных земель с помощью технологий фиторемедиации. Успешное применение растительно-микробных комплексов в той или иной области зависит от изученности механизмов взаимодействий в системе конкретных организмов с тяжелыми металлами. Целью представленных исследований была оценка влияния ионов меди на эффекты бактериализации растений пшеницы мягкой (*Triticum aestivum* L.) тремя штаммами *Azospirillum*, обладающими свойствами стимуляции роста растений (PGPR). В ходе эксперимента анализировали ростовые параметры 14-суточных проростков пшеницы, содержание пигментов фотосинтеза, активность растительных оксидоредуктаз и аккумуляцию металла растительными тканями. Все штаммы в той или иной степени компенсировали фитотоксическое воздействие меди на развитие проростков и увеличивали ее аккумуляцию в корнях и побегах. Показано отчетливое усиление воздействия меди на фотосинтетический аппарат бактериализованных растений, выражающееся в изменении содержания основных пигментов, в первую очередь уменьшении хлорофилла *b*. Анализ активности растительных оксидоредуктаз (пероксидаз и фенолоксидаз) как участников физиологических ответов растений на стрессовые воздействия выявил их штаммоспецифичный характер и существенное влияние меди на бактериализованные растения. В целом полученные результаты показали отчетливое разноплановое влияние исследованных штаммов азоспирилл на физиолого-биохимический статус растений пшеницы. Выявленный компенсаторный эффект бактерий на фитотоксическое воздействие меди и одновременно повышение ее накопления в растительных тканях могут рассматриваться как взаимоисключающие аспекты растениеводства, связанные с выращиванием пищевых растений на загрязненных тяжелыми металлами площадях.

Ключевые слова: *Azospirillum*; *Triticum aestivum*; медь; проростки; фотосинтетические пигменты; пероксидаза; лакказа; тирозиназа.

Для цитирования: Муратова А.Ю., Любунь Е.В., Голубев С.Н., Турковская О.В. Влияние ионов меди на ассоциации бактерий рода *Azospirillum* с проростками пшеницы (*Triticum aestivum* L.). *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(5):477-485. DOI 10.18699/VJGB-22-58

Effect of copper ions on the associations of *Azospirillum* bacteria with wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.)

A.Yu. Muratova , E.V. Lyubun, S.N. Golubev, O.V. Turkovskaya

Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms – Subdivision of the Saratov Federal Scientific Centre
of the Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia
 muratova_a@ibppm.ru

Abstract. The physiological and biochemical activity of plant–microbial associations enables them to determine the mobility, bioavailability, and accumulation of heavy metals in plant tissues. These abilities are the basis for the use of plants and their associated microorganisms in the development of approaches that ensure both the prevention of the ingress of toxic metals into food crops and the extraction of pollutants from polluted soils by using phytoremediation technologies. Whether plant–microbial complexes are used successfully depends on the knowledge of how specific organisms interact with heavy metals. We evaluated the effect of copper ions on common wheat (*Triticum aestivum* L.) inoculated with three plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) of the genus *Azospirillum*. We analyzed the growth variables of 14-day-old wheat seedlings, the content of photosynthesis pigments, the activity of plant oxidoreductases, and the accumulation of copper by plant tissues. All strains more or less compensated for copper toxicity to seedling development and increased metal accumulation in roots and shoots. Copper affected the photosynthetic apparatus of the inoculated plants, primarily by decreasing the content of chlorophyll *b*. An analysis of the activity of plant oxidoreductases (peroxidases and phenoloxidases), which are involved in the physiological responses of plants to pollutant stress, showed strain-specific dependence and a significant effect of copper on the inoculated plants. Overall, the

obtained results clearly show that the effect of *Azospirillum* on the physiological and biochemical status of wheat is diverse. The compensatory effect of bacteria on copper toxicity and the simultaneous increase in metal accumulation in plant tissues can be considered as mutually exclusive crop-production aspects associated with the growing of food plants in heavy-metal-polluted areas.

Key words: *Azospirillum*; *Triticum aestivum*; copper; seedlings; photosynthetic pigments; peroxidase; laccase; tyrosinase.

For citation: Muratova A.Yu., Lyubun E.V., Golubev S.N., Turkovskaya O.V. Effect of copper ions on the associations of *Azospirillum* bacteria with wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(5):477-485. DOI 10.18699/VJGB-22-58

Введение

Антропогенное загрязнение почв тяжелыми металлами – серьезная экологическая проблема. Накопление в экосистемах этих опасных токсикантов приводит к увеличению их поглощения растениями и миграции по пищевым цепям вплоть до человека (Ларионов М.В., Ларионов Н.В., 2010). Важнейшую роль в превращении, транслокации и аккумуляции тяжелых металлов в природе играют растительно-микробные комплексы. В результате своей физиолого-биохимической активности микроорганизмы и растения способны преобразовывать соединения тяжелых металлов, определяя их подвижность, биодоступность и накопление иногда в значительных количествах (Nadeem et al., 2015). Указанные способности являются основой для использования растительно-микробных ассоциаций, с одной стороны, в разработке подходов, предотвращающих попадание токсичных металлов в пищевые культуры, а с другой – в создании технологий очистки агроландшафтов от загрязнения (фиторемедиации). Успешное применение растительно-микробных комплексов в той или иной области зависит от изученности механизмов взаимодействий в системе конкретных организмов с тяжелыми металлами.

Бактерии рода *Azospirillum* – типичные представители ассоциативной микрофлоры растений, их жизнедеятельность тесно связана с корневой системой преимущественно злаков (Reis et al., 2015). Азоспириллы являются факультативными дiazотрофами, способными к фиксации атмосферного азота в микроаэрофильных условиях, и характеризуются продукцией фитогормонов, таких как ауксины, гиббереллины и цитокинины, а также других фитоактивных веществ, что делает их яркими представителями группы стимулирующих рост растений ризобактерий (plant-growth-promoting rhizobacteria, PGPR) (Bashan, De-Bashan, 2010; Fukami et al., 2018). Для азоспирилл выявлены различия в стратегии колонизации корней растений, что позволило охарактеризовать эпифитные (колонизирующие только поверхность корня) и эндофитные (способные проникать во внутренние ткани корня) штаммы (Rothballer et al., 2003). Вступая во взаимодействие с растениями, азоспириллы активно участвуют в стимуляции их роста и способны снижать фитостресс, вызванный экологическими факторами, за счет различных механизмов, в том числе с помощью повышения поглощения и мобилизации минералов (Bashan, De-Bashan, 2010). Одним из типичных растений-ассоциантов для азоспирилл является пшеница. Положительный эффект от инокуляции азоспириллами значимых сельскохозяйственных культур, включая пшеницы, неоднократно описан исследователями (Teixeira Filho et al., 2017; Galindo et al., 2019; Boleta et al., 2020).

Есть данные, согласно которым представители вида *A. brasilense* демонстрируют устойчивость к ряду токсичных тяжелых металлов (Co, Cu, Zn, Cd). При этом отмечаются различия в проявлении толерантности к металлам у эндофитных и эпифитных азоспирилл (Камнев et al., 2005; Камнев и др., 2007).

В организме растения один из важнейших микроэлементов, участвующих в различных физиологических процессах, таких как транспорт электронов при фотосинтезе, митохондриальное дыхание, ответ на окислительный стресс, гормональный сигналинг, это медь. В качестве кофактора медь входит в состав многих растительных ферментов и белков: супероксиддисмутазу, цитохром *c*-оксидазу, аминоксидазу, лакказу, тирозиназу, полифенолоксидазу, пластоцианин (Yruela, 2005; Pichhode, Nikhil, 2015). Однако медь в высоких концентрациях фитотоксична. Избыточное содержание этого металла вызывает различные повреждения в растениях, в том числе в пшенице (Quartacci et al., 2000; Michaud et al., 2007; Dang et al., 2009). Инокуляция бактериями *A. brasilense* может увеличивать устойчивость пшеницы к стрессу, вызванному присутствием в среде ионов Cu^{2+} (El-Samad, 2017). При этом эффект от инокуляции штаммами, характеризующимися различными стратегиями взаимодействия с растениями, может различаться, что требует дополнительного изучения. На основании ранее проведенных исследований (Камнев и др., 2007), показавших различия между эпифитным и эндофитным штаммами *A. brasilense* в механизмах устойчивости к металлам, связанным с накоплением поли-3-гидроксибутирата как фактора, способствующего выживанию в неблагоприятных условиях, мы предполагаем, что различия могут наблюдаться и во взаимодействии таких штаммов с растениями в условиях стресса, вызванного присутствием в среде тяжелых металлов.

Целью представленных исследований была оценка влияния ионов меди на эффекты бактериализации растений пшеницы мягкой (*Triticum aestivum* L.) различными штаммами *A. brasilense*, обладающими свойствами стимуляции роста растений.

Материалы и методы

В работе использовали штаммы бактерий *Azospirillum brasilense* Sp7 (IBPPM 150), *A. brasilense* Cd (IBPPM 288) и *A. baldaniorum* Sp245 (IBPPM 219, ранее отнесенный к виду *A. brasilense* и переописанный dos Santos Ferreira с коллегами (dos Santos Ferreira et al., 2020)) из Коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (<http://collection.ibppm.ru>).

Микроорганизмы культивировали в жидкой или агаризованной (1.5 %) среде следующего состава, г/л:

K_2HPO_4 – 0.1; KH_2PO_4 – 0.4; $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ – 0.2; $NaCl$ – 0.1; $CaCl_2$ – 0.02; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 2.0; $NTA-3Na$ – 5.6; $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ – 0.002; малат натрия – 3.8; NH_4Cl – 1.0; рН 7.0. Медь вносили в виде сульфата меди в количестве, соответствующем минимальной ингибирующей рост бактерий концентрации, которая составила 0.5 ммоль/л по результатам предварительных исследований.

Семена мягкой яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Саратовская 29 были получены из ФГБНУ «НИИСХ Юго-Востока», г. Саратов. Перед использованием их калибровали, промывали детергентом 10 мин при встряхивании для удаления гидрофобных загрязнений и стерилизовали, обрабатывая сначала 70 % (об./об.) этанолом в течение 3 мин, затем диацидом (1:1000; 666 мг/л хлорида цетилпиридина и 333 мг/л этанола хлорида ртути) 5 мин, затем смесью рифампицина (4 мкг/мл) и амфотерицина Б (20 мкг/мл) при комнатной температуре и встряхивании (120 об/мин) 24 ч и вновь диацидом (1:1000) в течение 2.5 мин. После каждого этапа семена многократно промывали стерильной дистиллированной водой. Стерильные семена пшеницы помещали по одному в стерильные биологические пробирки (20 × 300 мм), содержащие 15 см³ стеклянных бус диаметром 2 мм (SiLibeads, Sigmund Lindner, Германия) и 6 мл раствора Хогланда для культивирования растений (Hoagland, Arnon, 1950). В среду для выращивания растений добавляли 0.5 ммоль/л Cu^{2+} в виде $CuSO_4 \cdot 5H_2O$. Контроль был представлен чистой средой. Опытные растения бактериализовали внесением микробной суспензии в каждую пробирку.

Для получения биомассы инокулянта микроорганизмы выращивали в жидкой малатной среде в течение 18 ч, клетки из среды осаждали центрифугированием (11 000 g, 5 мин), отмывали и ресуспендировали в стерильной среде. В каждую пробирку с 3-суточным проростком пшеницы вносили по 30 мкл выделенной бактериальной суспензии до получения исходной концентрации инокулянта в среде 10^7 клеток/мл. Небактеризованные растения использовали как контроль. Растения выращивали в фитокамере при 24 °С в течение 14 дней с периодом освещения день/ночь 13/11 ч. Освещение обеспечивали комплектом люминесцентных ламп Fluora (Osram, Германия).

По окончании культивирования анализировали ростовые параметры 14-суточных проростков пшеницы, содержание пигментов фотосинтеза, активность растительных оксидоредуктаз и аккумуляцию металла растительными тканями. Морфологические параметры (длину корня и побега) измеряли калиброванной линейкой из нержавеющей стали. Затем корни и побеги высушивали до постоянной массы и взвешивали.

Биохимические анализы проростков включали измерение содержания фотосинтетических пигментов и оценку ферментной активности корней и побегов. Содержание хлорофиллов *a* и *b* (Хл *a* и Хл *b*) и каротиноидов определяли спектрофотометрически в этанольных экстрактах листьев, как описано ранее (Lyubun et al., 2020).

Для определения активности растительных оксидоредуктаз (пероксидазы, лакказы и тирозиназы) навески побегов и корней (0.2–0.3 г) растирали в ступке с кварцевым песком и ресуспендировали в 2 мл 0.2 М Na/K-фосфатного буфера, рН 6.0. Гомогенат центрифугировали при 5000 g

в течение 10 мин, осадок дополнительно отмывали фосфатным буфером и повторно центрифугировали. В полученных супернатантах определяли активность ферментов и содержание белка с помощью спектрометра Evolution 60 (Thermo Scientific, США). Содержание белка находили методом Брэдфорд (Bradford, 1976).

Активность пероксидаз (КФ 1.11.1.7) измеряли с использованием 23 мкМ 2,7-диаминофлуорена (ДАФ) в 0.05 М Na/K-фосфатном буфере, рН 6.0, при 600 нм (Criquet et al., 2000); 1 мМ 2,2-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфонат) аммония (АБТС) в 0.05 М Na-тарtratном буфере, рН 3.5, при 436 нм (Yang et al., 2007); 0.3 мМ *o*-дианизида (ДАЗ) в 0.05 М Na/K-фосфатном буфере, рН 6.0, при 460 нм в присутствии 0.5 мМ H_2O_2 . Активность лакказы (КФ 1.10.3.2) устанавливали по образованию продуктов окисления 7.5 мкМ сиригальдазина (СГЗ) в 0.05 М Na/K-фосфатном буфере, рН 6.0, при 525 нм (Leonowicz, 1981) и 23 мкМ ДАФ в 0.05 М Na/K-фосфатном буфере, рН 6.0, при 600 нм (Criquet et al., 2000). Активность тирозиназы (КФ 1.10.3.3) определяли в 4 мМ растворе 3,4-дигидроксибензил-L-аланина (ДОФА) в 50 мМ трис-HCl буфере, рН 7.5, при 475 нм (Criquet et al., 2000). Активность ферментов выражали в микромолях окисленного субстрата в минуту на 1 мг белка.

Общее количество меди в растениях анализировали с помощью системы атомно-абсорбционной спектроскопии с графитовой печью (Thermo Scientific iCE 3500 Solaar). В тефлоновые контейнеры с 200 мг высушенного до постоянной массы растительного материала добавляли 3 мл HNO_3 (Suprapur, Merck, Германия) и 2 мл H_2O_2 (30 %, чда; JT Baker Chemical Co., США). Затем образцы обрабатывали в микроволновой печи SEM MARS Xpress (Matthews, США) с помощью оптимизированной программы для сжигания растительного материала. После обработки объем образцов доводили до 20 мл ультрачистой деионизированной водой и анализировали на содержание металлов на спектрометре.

Все эксперименты и анализы проводили не менее чем в трехкратной повторности, в каждой повторности использовали от 5 до 8 растений. Для полученных данных вычисляли средние значения, которые сравнивали, применяя *t*-критерий ($p \leq 0.05$). Корреляционный анализ выполняли с использованием ранговых корреляций Спирмена. Обработку и анализ данных осуществляли в программе Excel 2007 (Microsoft Office, США) и пакете Statistica 13.0 (TIBCO Software Inc. 2017, Statsoft Russia).

Результаты

Рост и развитие растений

Присутствие в среде ионов меди оказывало значительный токсический эффект на развитие проростков пшеницы сорта Саратовская 29, что выражалось в уменьшении как длины, так и массы корней и побегов. При этом ингибирование корневой системы было более выраженным (длина корней уменьшилась на 58 %, масса – на 13 %), тогда как сокращение длины побегов составило лишь 8 %, а их масса достоверно не изменилась (табл. 1).

Эффект бактериализации на развитие проростков пшеницы в течение 14 сут в чистых условиях был различным

Таблица 1. Показатели длины и массы проростков пшеницы сорта Саратовская 29 при культивировании в присутствии меди и различных штаммов азоспирилл

Вариант опыта	Корни		Побеги	
	Без Cu ²⁺	Cu ²⁺	Без Cu ²⁺	Cu ²⁺
Длина, см				
Без бактерий	18.8±2.2	7.8±0.9 [#]	38.3±4.5	35.3±6.2
Sp245	14.9±3.7*	14.7±1.7*	31.5±7.9	37.5±6.9
Cd	20.9±1.6	13.7±3.9 ^{#*}	41.2±1.7	35.2±5.2 [#]
Sp7	18.2±3.6	18.6±1.9*	36.0±4.9	39.1±6.1
Масса, мг				
Без бактерий	117.0±14.2	101.3±6.6 [#]	227.4±15.7	237.9±15.9
Sp245	142.4±13.6*	132.1±11.7*	242.6±27.1	270.2±26.7 ^{#*}
Cd	178.1±16.6*	163.7±23.4*	347.3±21.2*	285.5±23.2 ^{#*}
Sp7	127.5±13.4	169.8±11.4 ^{#*}	263.4±24.5*	257.1±16.2*

Примечание. Приведены средние значения ($n \geq 6$) ± стандартное отклонение. Здесь и в табл. 2–4: * значения достоверно отличаются от небактеризованного контроля, $p \leq 0.05$; # значения достоверно отличаются от варианта без Cu²⁺; $p \leq 0.05$.

Таблица 2. Содержание фотосинтетических пигментов в проростках пшеницы сорта Саратовская 29 при культивировании в присутствии меди и различных штаммов азоспирилл

Вариант опыта	Хл a	Хл b	Хл a+b	Хл a/Хл b	Каротиноиды, мг/г
	мг/г				
Без Cu ²⁺					
Без бактерий	0.99±0.05	0.76±0.05	1.75±0.11	1.31±0.14	0.35±0.04
Sp245	1.10±0.03*	0.82±0.03*	1.91±0.09*	1.34±0.14	0.38±0.29
Cd	1.08±0.12	0.80±0.02	1.88±0.15	1.34±0.12	0.38±0.19
Sp7	1.11±0.09*	0.82±0.11	1.92±0.12*	1.33±0.15	0.38±0.21
Cu ²⁺					
Без бактерий	1.09±0.11	0.87±0.08 [#]	1.96±0.22	1.24±0.32	0.36±0.03
Sp245	1.00±0.03 [#]	0.50±0.04 ^{#*}	1.50±0.12 ^{#*}	2.00±0.51 ^{#*}	0.19±0.06*
Cd	0.88±0.02 ^{#*}	0.34±0.02 ^{#*}	1.22±0.05 ^{#*}	2.55±0.12 ^{#*}	0.15±0.09 ^{#*}
Sp7	1.06±0.04	0.53±0.06 ^{#*}	1.60±0.12 ^{#*}	1.99±0.11 ^{#*}	0.20±0.02*

Примечание. Приведены средние значения ($n \geq 6$) ± стандартное отклонение.

и зависел от используемого штамма (см. табл. 1). *Azospirillum brasilense* Sp7 оказывал достоверное воздействие только на массу побегов, увеличивая ее относительно небактеризованного контроля на 16%. *Azospirillum baldaniorum* Sp245 достоверно уменьшал длину корней (на 20%), существенно увеличивая их массу (на 22%). Штамм *A. brasilense* Cd оказывал наибольшее воздействие на проростки, достоверно повышая массу корней и побегов – на 52 и 53% соответственно.

Присутствие меди по-разному влияло на эффект бактериализации в отношении как длины корней и побегов, так и их массы. У растений, бактеризованных штаммом Cd, наблюдалась тенденция к снижению биомассы корней, их длина уменьшалась на 34%, а длина и масса побегов уменьшались на 14 и 18% соответственно. Влияние меди на длину корней и побегов растений, бактеризованных штаммами Sp245 и Sp7, не было достоверным. При этом штамм Sp245 снижал биомассу корней, но увеличивал на 11% биомассу побегов, а штамм Sp7, напротив, уве-

личивал на 33% биомассу корней и слегка снижал массу побегов.

Следует также отметить, что бактеризация в случае всех штаммов уменьшала токсическое влияние меди на проростки, что наиболее отчетливо выражалось по увеличению таких показателей, как длина корней (в 1.7–2.4 раза) и их масса (на 30–68%). Полное нивелирование негативного влияния меди на длину корня достигалось только в случае штамма Sp7, тогда как инокуляция всеми штаммами не только компенсировала воздействие меди по показателю массы корней, но и существенно повышала его относительно небактеризованного контроля в чистых условиях.

Содержание пигментов фотосинтеза

Присутствие меди в случае небактеризованных проростков пшеницы не оказывало выраженного воздействия на содержание и соотношение фотосинтетических пигментов (табл. 2).

Бактеризация растений, культивируемых в чистой среде, способствовала увеличению содержания хлорофиллов *a* и *b* и их суммы на 11, 8 и 9 % соответственно для штамма Sp245 и на 12, 8 и 10 % соответственно для штамма Sp7, но соотношение этих пигментов и содержание каротиноидов в данных вариантах опыта менялись незначительно.

Влияние меди на эффекты бактеризации для штаммов Sp245, Cd и Sp7 выразилось в значительном снижении содержания хлорофилла *b* (на 43, 58 и 39 % соответственно), суммарного содержания хлорофиллов *a* и *b* (на 23, 38 и 18 %), каротиноидов (на 47, 58 и 44 %) и в увеличении соотношения хлорофиллов *a* и *b* (на 61, 105 и 60 % соответственно).

Аккумуляция меди в тканях проростков

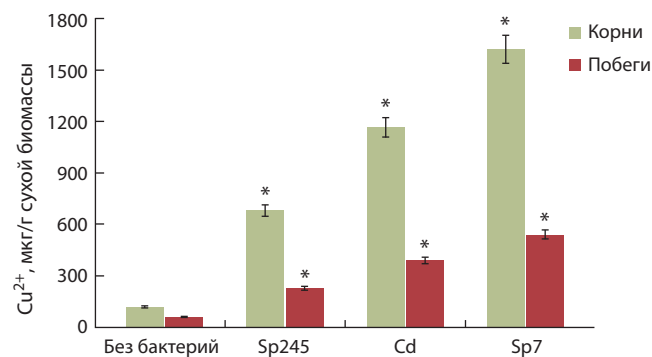
В нашем исследовании содержание ионов меди в тканях пшеницы, выращенной в чистой среде, варьировало от 17 до 28 мкг/г сухой биомассы. Содержание ионов Cu^{2+} в растениях, выращенных в присутствии меди в концентрации 0.5 ммоль/л, представлено на рисунке.

В небактеризованных проростках накопление металла в корнях и побегах составило 116 и 59 мкг/г соответственно. Бактеризация приводила к значительному увеличению этих показателей. При обработке штаммами Sp245, Cd и Sp7 накопление меди корнями растений увеличивалось в 6, 10 и 14 раз, а побегами – в 4, 7 и 9 раз соответственно.

Активность окислительных ферментов пшеницы

Активность общей пероксидазы растений пшеницы определяли с использованием ряда субстратов, которые позволяли учитывать разные изоформы этого фермента. В целом, согласно полученным данным (табл. 3), активность пероксидазы в корнях была значительно выше, чем в побегах растений.

Присутствие в среде культивирования Cu^{2+} в исследуемой концентрации не вызывало значительного изменения активности пероксидазы в корнях, но в побегах наблюдалась тенденция к ее снижению.



Содержание меди в сухой биомассе проростков пшеницы сорта Саратовская 29, выращенных в присутствии металла и различных штаммов азоспирилл.

* значения достоверно отличаются от небактеризованного контроля, $p \leq 0.05$.

Инокуляция проростков штаммами Sp245 и Cd вызывала увеличение ДАЗ- и АБТС-пероксидазной активности более чем в 1.5 и 5 раз соответственно в корнях, но не в побегах. Иной ферментативный ответ растения на бактеризацию наблюдался в случае штамма Sp7: активность ДАЗ- и АБТС-пероксидаз в корнях значимо не изменялась, а в побегах увеличивалась в 7.0, 5.8 и 7.5 раза для ДАЗ, АБТС и ДАФ соответственно. Под влиянием бактеризации штаммами Cd и Sp7 отмечалось снижение активности ДАФ-пероксидазы в корнях растений.

Присутствие Cu^{2+} вызывало резкое увеличение активности пероксидазы в корнях пшеницы, инокулированной штаммом Sp7, – в 6.3, 5.7 и 7 раз для ДАЗ, АБТС и ДАФ соответственно, и менее выраженное увеличение в побегах – в 1.6, 1.6 и 2.5 раза. Следует отметить, что наличие Cu^{2+} при бактеризации штаммами Cd и Sp245 повышало пероксидазную активность в побегах пшеницы в 2–3 раза.

Результаты определения активности растительных медьсодержащих фенолоксидаз – лакказы и тирозиназы – представлены в табл. 4. Показано, что добавление в среду Cu^{2+} повышало лакказную активность в корнях

Таблица 3. Активность пероксидаз (Ед./мг белка) в проростках пшеницы сорта Саратовская 29 при культивировании в присутствии меди и различных штаммов азоспирилл

Вариант опыта	ДАЗ		АБТС		ДАФ	
	Без Cu^{2+}	Cu^{2+}	Без Cu^{2+}	Cu^{2+}	Без Cu^{2+}	Cu^{2+}
Корни						
Без бактерий	66.1 ± 6.5	65.5 ± 12.8	21.8 ± 9.5	24.4 ± 9.1	59.0 ± 6.3	55.2 ± 21.3
Sp245	96.3 ± 11.2*	41.4 ± 10.0*#	33.1 ± 8.2*	15.9 ± 4.2#	72.7 ± 10.5*	28.5 ± 11.1*#
Cd	359.0 ± 93.4*	75.4 ± 8.3#	111.4 ± 13.2*	25.7 ± 11.4#	37.3 ± 18.5*	53.9 ± 17.3
Sp7	71.6 ± 6.7	412.1 ± 23.8*#	20.3 ± 6.1	139.9 ± 14.1*#	45.7 ± 11.3*	388.6 ± 43.7*#
Побеги						
Без бактерий	15.6 ± 5.8	11.4 ± 2.7	4.2 ± 0.6	2.9 ± 0.8#	9.1 ± 2.3	5.9 ± 2.6#
Sp245	17.2 ± 8.1	30.3 ± 12.1*#	4.3 ± 1.1	5.2 ± 2.7*	10.9 ± 3.8	18.6 ± 7.1*#
Cd	15.7 ± 6.5	23.6 ± 7.1*#	4.3 ± 1.7	5.8 ± 1.3*	9.9 ± 2.6	15.8 ± 3.4*#
Sp7	109.9 ± 31.0*	18.5 ± 4.3*#	24.5 ± 6.2*	4.7 ± 1.5*#	68.3 ± 15.0*	14.7 ± 5.1*#

Примечание. Тестовые субстраты: ДАЗ – о-дианизидин; АБТС – 2,2-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфонат) аммония; ДАФ – 2,7-диаминофлуорен.

Таблица 4. Активность медьсодержащих фенолоксидаз (Ед./мг белка) в проростках пшеницы сорта Саратовская 29 при культивировании в присутствии меди и различных штаммов азоспирилл

Вариант опыта	Лакказа		СГЗ		Тирозиназа	
	ДАФ		ДОФА			
	Без Cu ²⁺	Cu ²⁺	Без Cu ²⁺	Cu ²⁺	Без Cu ²⁺	Cu ²⁺
	Корни					
Без бактерий	1.7±0.4	2.5±0.8	2.1±0.6	2.4±0.7	4.5±1.7	7.6±2.4 [#]
Sp245	2.6±0.8*	1.4±0.7 [#]	3.2±0.9*	2.4±0.4 [#]	6.9±2.1*	4.0±1.5 [#]
Cd	10.4±2.3*	3.5±1.8*	9.6±1.4*	2.4±0.8 [#]	25.2±3.5*	7.6±1.6 [#]
Sp7	1.7±0.1	11.2±2.4 ^{**#}	2.3±0.5	16.1±4.2 ^{**#}	4.0±1.1	28.6±2.2 ^{**#}
	Побеги					
Без бактерий	0.4±0.1	0.4±0.1	0.7±0.2	0.4±0.3	1.1±0.1	0.6±0.1 [#]
Sp245	0.5±0.0*	0.5±0.0*	0.7±0.3	0.5±0.0*	1.2±0.1	1.5±0.7 ^{**#}
Cd	0.5±0.1	0.9±0.2*	0.7±0.2	0.5±0.1	1.1±0.1	1.6±0.2 ^{**#}
Sp7	2.5±0.6*	2.7±1.0*	5.3±1.3*	2.5±0.2*	7.4±1.3*	1.5±0.0 ^{**#}

Примечание. ДАФ – 2,7-диаминофлуорен; СГЗ – сирингальдазин; ДОФА – 3,4-дигидроксифенил-L-аланин.

небактеризованных растений в 1.5 раза (в тесте с ДАФ), а в побегах, наоборот, понижало в 1.75 раза (с СГЗ).

Бактеризация более существенно меняла этот показатель в зависимости от штамма-инокулянта. Наиболее значительное повышение лакказной активности в корнях вызывал штамм Cd – в 6 раз (в тесте с ДАФ), а в побегах – штамм Sp7 – в 7.5 раза (с СГЗ). Присутствие меди снижало эффект бактериализации: в случае штаммов Sp245 и Cd лакказная активность корней была сопоставима с небактеризованными растениями (с СГЗ). Напротив, штамм Sp7 повышал этот показатель почти в 7 раз. Лакказная активность в побегах бактеризованных растений менялась в присутствии меди разнопланово в зависимости от штамма и тестового субстрата, наиболее заметно повышаясь в случае Cd (с ДАФ) – в 1.8 раза, и понижаясь в случае Sp7 (с СГЗ) – в 2 раза.

Аналогично с лакказой, активность тирозиназы в присутствии меди повышалась в корнях и понижалась в побегах (в 1.7 раза). В отсутствие меди штаммы Sp245 и Cd стимулировали тирозиназную активность в корнях (в 1.5 и 5.6 раза), но не в побегах пшеницы, тогда как бактериализация штаммом Sp7, напротив, стимулировала тирозиназу побегов (в 6.7 раза), но не корней растений. Добавление меди снижало эффект бактериализации штаммами Sp245 и Cd по активности тирозиназы в корнях в 1.7 и 3.3 раза, несколько повышая ее в побегах. В случае штамма Sp7 активность тирозиназы в присутствии меди увеличилась в 7 раз в корнях и снизилась в 5 раз в побегах.

Обсуждение

Несмотря на то что медь является эссенциальным микроэлементом, ее избыток в среде негативно влияет на растения, что выражается в угнетении их роста и нарушении метаболизма (Yruela, 2005; Michaud et al., 2007; Wang H. et al., 2011; Pichhode, Nikhil, 2015). Учитывая широкую вовлеченность этого элемента в различные физиологические процессы (фотосинтез, дыхание, антиоксидантный ответ, гормональный сигналинг), нарушение баланса меди может приводить к множественным повреждениям в рас-

тении. Механизм токсического действия меди связан с ее способностью прочно связываться с атомами кислорода, азота, серы, что в условиях избыточного содержания приводит к образованию дополнительных связей и/или замещению медью других металлов в структуре различных биомолекул, включая активные центры многих ферментов (Yruela, 2005; Wang H. et al., 2011). Фитотоксический эффект меди проявляется торможением роста, признаками хлороза и сопровождается развитием окислительного стресса у растений. При этом поглощение и содержание меди в растениях зависят от ряда факторов, в том числе от сортовых особенностей (Медведев, Деревягин, 2017).

В представленной работе все эксперименты проводили с одним сортом мягкой яровой пшеницы. Это означает, что эффекты бактериализации и воздействия меди, обнаруженные нами для сорта Саратовская 29, могут не проявиться на других сортах пшеницы, что требует дальнейших аналогичных исследований с использованием различных генотипов этого растения.

В данном исследовании токсический эффект меди в концентрации 0.05 ммоль/л на проростки пшеницы проявлялся главным образом на корневой системе, непосредственно контактирующей с токсикантом. Об уменьшении длины и массы корней пшеницы, выращенной в гидропонной культуре в присутствии 0.05 ммоль/л меди, сообщалось также в работе (Wang H. et al., 2011). Авторы наблюдали сокращение длины побегов растений, тенденция к чему имела место и в нашем исследовании. Вместе с тем важно подчеркнуть, что используемая концентрация меди не оказывала заметного воздействия на фотосинтетический аппарат пшеницы. Об этом свидетельствует отсутствие значимых изменений содержания хлорофиллов и каротиноидов в листьях растений под влиянием этого металла (см. табл. 2). Следовательно, выявленное токсическое воздействие меди на корневую систему пшеницы осуществлялось без нарушения процесса фотосинтеза.

Нормальная физиологическая концентрация меди в растениях составляет от 3 до 30 мг/кг (Wang H. et al., 2011). Пшеница способна аккумулировать медь из почвы, при-

чем накопление металла в корнях больше, чем в наземной биомассе (Sayyad et al., 2009). Повышенное содержание металлов – нежелательное свойство пищевых злаков. Возможность отбора сортов, наименее склонных к накоплению токсичных элементов, рассмотрена в исследовании генетических механизмов аккумуляции в растениях различных металлов на примере Cu^{2+} и Zn^{2+} с использованием 246 сортов пшеницы (Liu et al., 2021). Среди факторов, влияющих на поглощение металлов растениями из почвы, наряду с многочисленными органическими и неорганическими соединениями, выделяемыми корнями и присутствующими в почвенном растворе, следует выделить деятельность микроорганизмов (Wang S. et al., 2017). Микробы продуцируют внеклеточные полимерные соединения, которые могут адсорбировать или хелатировать ионы металлов (Янева, 2009), что может приводить как к осаждению их в среде, так и к увеличению поглощения корнями (Wang S. et al., 2017).

Согласно нашим результатам, инокуляция пшеницы штаммами *A. brasilense* способствовала аккумуляции меди в тканях растения. Степень влияния инокулянтов ($\text{Sp7} > \text{Cd} > \text{Sp245}$) на вышеуказанный параметр, вероятно, связана с их различиями в стратегии колонизации корней. Штамм *Sp245* охарактеризован как эндофитный, а *Sp7* – как эпифитный (Rothballer et al., 2003). Сведения о штамме *Cd* противоречивы: одни исследователи не выявили способность у этого микроорганизма проникать в корни пшеницы (de Oliveira Pinheiro et al., 2002), тогда как другие обнаруживали клетки штамма в тканях корней томатов (Caiola et al., 2004).

В нашем исследовании инокуляция растений штаммами *A. brasilense* усиливала рост пшеницы, что проявлялось главным образом в увеличении длины и массы корней и побегов. При этом рост-стимулирующий эффект различался между используемыми штаммами. Эндофитный штамм *Sp245* ингибировал рост корней в отсутствие загрязнителя, но компенсировал ингибирующий эффект меди в ее присутствии. Штамм *Cd* оказывал максимальный рост-стимулирующий эффект на длину и массу проростков, выращенных как в присутствии меди, так и без нее.

Накопление меди в тканях пшеницы, в свою очередь, привело к развитию фитотоксических реакций: у всех бактериализованных растений наблюдалось резкое снижение (вдвое) содержания хлорофилла *b* и каротиноидов (см. табл. 2), что не могло не вызвать нарушений в работе фотосинтетического аппарата. Известно, что в высоких концентрациях медь способна подавлять процесс фотосинтеза, нарушая архитектуру мембран тилакоидов, изменяя общую ультраструктуру хлоропластов и ингибируя накопление хлорофилла и фотосинтетический транспорт электронов как ФС I, так и ФС II (Rai et al., 2016). Токсическое воздействие меди на фотосинтетический аппарат может быть связано с ингибированием активности ферментов биосинтеза, а также вытеснением Mg^{2+} из молекулы хлорофилла (Prasad M.N.V., Strzalka, 1999; Rai et al., 2016). При снижении содержания основного фотосинтетического пигмента хлорофилла *a*, которое наблюдалось в случае инокуляции пшеницы штаммом *Cd*, могла происходить конверсия вспомогательного хлорофилла *b* в хлорофилл *a*. Тем самым концентрация хлорофилла *b*

снижалась сильнее, чем концентрация хлорофилла *a* (Breckle, 1991; Prasad D.D.K., Prasad A.R.K., 1987), что и привело к увеличению соотношения хлорофиллов *a/b*. В случае со штаммами *Sp245* и *Sp7*, которые не влияли на содержание хлорофилла *a* в листьях инокулируемой ими пшеницы в присутствии меди, вышеуказанный показатель мог повышаться из-за фотохимического окисления светособирающих комплексов, связывающих хлорофилл *b* (Huang et al., 2004).

Экологический стресс, обусловленный действием как биотических, так и абиотических факторов, как правило, приводит к образованию и накоплению в растительных клетках активных форм кислорода, которые оказывают сильное повреждающее воздействие, препятствующее росту и урожайности растений. Известно, что тяжелые металлы могут служить индуктором растительного окислительного стресса, механизмы и ответные реакции на который неоднократно описаны (Титов и др., 2014). Кроме того, существует множество свидетельств способности бактерий вызывать окислительный стресс (Rais et al., 2017). В ответ на окислительный взрыв в растении активируются различные формы антиоксидантов, среди которых важную роль играют ферменты антиоксидантной защиты. Активизация этих ферментов при стрессе, обусловленном тяжелыми металлами, подробно описана в работе (Титов и др., 2014). При стрессе, спровоцированном микробной инфекцией, предполагают, что активация антиоксидантных ферментов происходит в ответ на распознавание иммунной системой микробных молекулярных паттернов, на некоторые вторичные метаболиты микроорганизмов, на измененный под действием микробных сидерофоров статус железа в растениях (Rais et al., 2017). Изменение активности антиоксидантных ферментов у пшеницы в ответ на различные стресс-факторы обобщено в работе (Caverzan et al., 2016).

В настоящем исследовании предпринята попытка показать, как штаммы азоспирилл, имеющие различные стратегии колонизации корневой системы пшеницы, в присутствии меди могут влиять на активность пероксидазы, которая благодаря своим специфическим свойствам и многочисленному разнообразию молекулярных форм представляет собой одну из ключевых защитных систем клетки при действии на растение любых стресс-факторов (Стаценко и др., 2008). Нами установлено, что активность пероксидазы в корнях проростков пшеницы была значительно выше, чем в побегах. В исследуемой концентрации медь не влияла на активность пероксидазы в корнях и лишь немного снижала ее в побегах небактериализованных растений. В свою очередь бактериализация существенно изменяла активность этого фермента как в отсутствие тяжелого металла, так и в его присутствии. Эффект бактериализации был штаммоспецифичен. У растений, выращенных без меди, пероксидазная активность значительно увеличивалась под влиянием штаммов *Sp245* и *Cd* в корнях, а под влиянием штамма *Sp7* – в побегах. В присутствии меди, напротив, штамм *Sp7* вызывал выраженную индукцию пероксидазы в корнях проростков и в меньшей степени в побегах, тогда как штаммы *Sp245* и *Cd* стимулировали пероксидазную активность преимущественно в побегах. Таким образом, бактериализация

вызывала выраженный антиоксидантный стресс-ответ в растениях пшеницы, в котором, вероятно, участвовали различные изоформы пероксидазы. Увеличение поглощения меди растениями под влиянием микроорганизмов дополнительно стимулировало активность пероксидазы, демонстрируя потенцированное действие абиотического и биотического стресс-факторов.

Помимо пероксидаз, важную роль в защитных реакциях растений играют фенолоксидазы – ферменты, почти повсеместно присутствующие в растениях и часто индуцирующиеся при стрессовых условиях, вызванных повреждением растений или атакой патогена (Sullivan, 2015). По данным (Yang et al., 2007), в ответ на биотический и абиотический стресс в растениях происходит активация синтеза лигнина, в котором участвуют фенолоксидазы и пероксидаза. Согласно нашим результатам, на активность этих ферментов оказывал влияние не столько стресс, вызванный присутствием меди в среде культивирования, сколько бактериализация растений. Бактериализация способствовала увеличению концентрации меди в тканях растений, что, как правило, стимулировало активность исследуемых фенолоксидаз и как медь-зависимых, и как стресс-ферментов.

Поиск корреляционных зависимостей между вариантами обработки растений и анализируемыми параметрами показал достоверную тесную корреляцию между изменением активности исследованных ферментов и бактериализацией растений азоспириллами ($r_s = 0.76$, $p < 0.05$). Примечательно, что из изученных штаммов повышал влияние на ферментативную активность корней в присутствии меди только эпифитный штамм *A. brasilense* Sp7.

Все исследованные штаммы способствовали поглощению меди растениями. При этом следует подчеркнуть различия в наблюдаемых эффектах, вызванных разными штаммами. Так, в отсутствие меди эндофитный штамм *A. baldaniorum* Sp245 уменьшал длину, но увеличивал массу корней проростков, в наименьшей степени способствовал поглощению меди и вызывал наименьшую индукцию антиоксидантных ферментов и фенолоксидаз. Бактериализация растений эпифитным штаммом *A. brasilense* Sp7 в отсутствие металла вызывала максимальную активность пероксидаз и оксидаз в побегах растений, а в присутствии металла в наибольшей степени способствовала поглощению меди и максимальной активизации пероксидаз и оксидаз в корнях. Занимающий промежуточное положение штамм *A. brasilense* Cd характеризовался максимальным рост-стимулирующим эффектом по отношению к пшенице: в отсутствие металла вызывал максимальную активность пероксидаз и оксидаз в корнях, а в присутствии меди оказывал максимальный ингибирующий эффект на фотосинтетический аппарат растения.

Заключение

В целом полученные результаты показали отчетливое разноплановое влияние различных штаммов азоспирилл на физиолого-биохимический статус растений пшеницы. Выявленный компенсаторный эффект исследуемых бактерий на фитотоксическое воздействие меди и одновременно повышение ее накопления в растительных тканях могут рассматриваться как взаимоисключающие аспекты

проблемы растениеводства, связанной с выращиванием пищевых растений на загрязненных тяжелыми металлами площадях.

Список литературы / References

- Камнев А.А., Тугарова А.В., Антонюк Л.П. Эндофитный и эпифитный штаммы *Azospirillum brasilense* по-разному отвечают на стресс, вызываемый тяжелыми металлами. *Микробиология*. 2007;76(6):908-911.
- [Kamnev A.A., Tugarova A.V., Antonyuk L.P. Endophytic and epiphytic strains of *Azospirillum brasilense* respond differently to heavy metal stress. *Microbiology*. 2007;76(6):809-811. DOI 10.1134/S0026261707060239.]
- Ларионов М.В., Ларионов Н.В. Особенности накопления тяжелых металлов в почвенных экосистемах Саратовского Поволжья. *Вестн. Оренб. гос. ун-та*. 2010;1(107):110-114.
- [Larionov M.V., Larionov N.V. Characteristics of accumulation of heavy metals in soil ecosystems of Saratov Volga river region. *Vestnik Orenburgskogo Gosudarstvennogo Universiteta = Vestnik of the Orenburg State University*. 2010;1(107):110-114. (in Russian)]
- Медведев И.Ф., Деревягин С.С. Тяжелые металлы в экосистемах. Саратов: Ракурс, 2017.
- [Medvedev I.F., Derevyagin S.S. Heavy Metals in Ecosystems. Saratov: Rakurs Publ., 2017. (in Russian)]
- Стаценко А.П., Тужилова Л.И., Вьюговский А.А. Растительные пероксидазы – маркеры химического загрязнения природных сред. *Вестн. Оренб. гос. ун-та*. 2008;10(92):188-191.
- [Statsenko A.P., Tuzhilova L.I., Vyugovsky A.A. Plant peroxidases – markers of chemical pollution of natural environments. *Vestnik Orenburgskogo Gosudarstvennogo Universiteta = Vestnik of the Orenburg State University*. 2008;10(92):188-191. (in Russian)]
- Титов А.Ф., Казнина Н.М., Таланова В.В. Тяжелые металлы и растения. Петрозаводск: КНЦ РАН, 2014.
- [Titov A.F., Kaznina N.M., Talanova V.V. Heavy Metals and Plants. Petrozavodsk: Karelian Research Centre of RAS, 2014. (in Russian)]
- Янева О.Д. Механизмы устойчивости бактерий к ионам тяжелых металлов. *Микробиол. журн*. 2009;71(6):54-65.
- [Yaneva O.D. Mechanisms of bacterial resistance to heavy metal ions. *Mikrobiologichnyi Zhurnal = Microbiological Journal*. 2009; 71(6):54-65. (in Ukrainian)]
- Bashan Y., de-Bashan L.E. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth – a critical assessment. *Adv. Agron*. 2010;108:77-136. DOI 10.1016/S0065-2113(10)08002-8.
- Boleta E.H.M., Shitate Galindo F., Jalal A., Santini J.M.K., Rodrigues W.L., Lima B.H.D., Arf O., da Silva M.R., Buzetti S., Teixeira Filho M.C.M. Inoculation with growth-promoting bacteria *Azospirillum brasilense* and its effects on productivity and nutritional accumulation of wheat cultivars. *Front. Sustain. Food Syst*. 2020;4:607262. DOI 10.3389/fsufs.2020.607262.
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 1976;72(1-2):248-254. DOI 10.1006/abio.1976.9999.
- Breckle S.W. Growth under stress: heavy metals. In: Waisel Y., Kafkafi U. (Eds.) *Plant Roots: The Hidden Half*. N.Y.: Marsel Dekker Inc., 1991;351-373.
- Caiola M.G., Canini A., Botta A.L., Del Gallo M. Localization of *Azospirillum brasilense* Cd in inoculated tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) roots. *Ann. Microbiol*. 2004;54(4):365-380.
- Caverzan A., Casassola A., Brammer S.P. Antioxidant responses of wheat plants under stress. *Genet. Mol. Biol*. 2016;39(1):1-6. DOI 10.1590/1678-4685-GMB-2015-0109.
- Criquet S., Joner E., Leglize P., Leyval C. Anthracene and mycorrhiza affect the activity of oxidoreductases in the roots and the rhizosphere of lucerne (*Medicago sativa* L.). *Biotechnol. Lett*. 2000;22:1733-1737. DOI 10.1023/A:1005604719909.

- Dang V.B.H., Doan H.D., Dang-Vu T., Lohi A. Equilibrium and kinetics of biosorption of cadmium (II) and copper (II) ions by wheat straw. *Biores. Technol.* 2009;100(1):211-219. DOI 10.1080/19443994.2012.691745.
- de Oliveira Pinheiro R., Boddey L.H., James E.K., Sprent J., Boddey R. Adsorption and anchoring of *Azospirillum* strains to roots of wheat seedlings. *Plant Soil.* 2002;246(2):151-166. DOI 10.1023/A:1020645203084.
- Dos Santos F.N., Hayashi Sant' A.F., Massena R.V., Ambrosini A., Gazolla V.C., Rothballer M., Schwab S., Baura V.A., Balsanelli E., Pedrosa F.O., Pereira P.L.M., de Souza E.M., Hartmann A., Casan F., Zilli J.E. Genome-based reclassification of *Azospirillum brasilense* Sp245 as the type strain of *Azospirillum baldaniorum* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2020;70:6203-6212. DOI 10.1099/ijsem.0.004517.
- El-Samad A.H.M. The biphasic role of copper and counteraction with *Azospirillum brasilense* application on growth, metabolites, osmotic pressure and mineral of wheat plant. *Am. J. Plant Sci.* 2017;8: 1182-1195. DOI 10.4236/AJPS.2017.85078.
- Fukami J., Cerezini P., Hungria M. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. *AMB Express.* 2018;8(1):73. DOI 10.1186/s13568-018-0608-1.
- Galindo F.S., Rodrigues W.L., Biagini A.L.C., Fernandes G.C., Barattella E.B., da Silva C.A., Jr, Buzetti S., Teixeira Filho M.C.M. Assessing forms of application of *Azospirillum brasilense* associated with silicon use on wheat. *Agronomy.* 2019;9(11):678. DOI 10.3390/agronomy9110678.
- Hoagland D.R., Arnon D.I. The Water-Culture Method for Growing Plants without Soil. Berkeley: Univ. of California, 1950;347:8.
- Huang X.D., El-Alawi Y., Penrose D.M., Glick B.R., Greenberg B.M. Responses of three grass species to creosote during phytoremediation. *Environ. Pollut.* 2004;130(3):453-463. DOI 10.1016/j.envpol.2003.12.018.
- Kamnev A.A., Tugarova A.V., Antonyuk L.P., Tarantilis P.A., Polissiou M.G., Gardiner P.H.E. Effects of heavy metals on plant-associated rhizobacteria: comparison of endophytic and non-endophytic strains of *Azospirillum brasilense*. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2005; 19(1):91-95. DOI 10.1016/j.jtemb.2005.03.002.
- Leonowicz A., Grzywnowicz K. Quantitative estimation of laccase forms in somewhite-rot fungi using syringaldazine as a substrate. *Enzyme Microb. Technol.* 1981;3:55-58. DOI 10.1016/0141-0229(81)90036-3.
- Liu Y., Chen Y., Yang Y., Zhang Q., Fu B., Cai J., Guo W., Shi L., Wu J., Chen Y. A thorough screening based on QTLs controlling zinc and copper accumulation in the grain of different wheat genotypes. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2021;28:15043-15054. DOI 10.1007/s11356-020-11690-3.
- Lyubun Y., Muratova A., Dubrovskaya E., Sungurtseva I., Turkovskaya O. Combined effects of cadmium and oil sludge on sorghum: growth, physiology, and contaminant removal. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2020;27:22720-22734. DOI 10.1007/s11356-020-08789-y.
- Michaud A.M., Bravin M.N., Galleguillos M., Hinsinger P. Copper uptake and phytotoxicity as assessed in situ for durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.) cultivated in Cu-contaminated, former vineyard soils. *Plant Soil.* 2007;298(1-2):99-111. DOI 10.1007/s11104-007-9343-0.
- Nadeem S.M., Naveed M., Ahmad M., Zahir Z.A. Rhizosphere bacteria for crop production and improvement of stress tolerance: mechanisms of action, applications, and future prospects. In: *Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets*. India: Springer, 2015;1-36. DOI 10.1007/978-81-322-2068-8_1.
- Pichhoda M., Nikhil K. Effect of copper mining dust on the soil and vegetation in India: a critical review. *Int. J. Mod. Sci. Eng. Technol.* 2015;2(2):73-76.
- Prasad D.D.K., Prasad A.R.K. Altered 5-aminolevulinic acid metabolism by lead and mercury in germinating seedlings of Bajra (*Pennisetum typhoideum*). *J. Plant Physiol.* 1987;127:241-249. DOI 10.1007/BF02702668.
- Prasad M.N.V., Strzalka K. Impact of heavy metals on photosynthesis. In: Prasad M.N.V., Hagemeyer J. (Eds.) *Heavy Metal Stress in Plants: From Molecules to Ecosystems*. Berlin: Springer, 1999;117-138. DOI 10.1007/978-3-662-07745-0_6.
- Quartacci M.F., Pinzino C., Sgherri C.L.M., Dalla Vecchia F., Navari-Izzo F. Growth in excess copper induces changes in the lipid composition and fluidity of PSII-enriched membranes in wheat. *Physiol. Plantarum.* 2000;108:87-93. DOI 10.1034/j.1399-3054.2000.108001087.x.
- Rai R., Agrawal M., Agrawal S.B. Impact of heavy metals on physiological processes of plants: with special reference to photosynthetic system. Ch. 6. In: Singh A., Prasad S.M., Singh R.P. (Eds.) *Plant Responses to Xenobiotics*. Singapore: Springer Nature, 2016;127-140. DOI 10.1007/978-981-10-2860-1_6.
- Rais A., Jabeen Z., Shair F., Hafeez F.Y., Hassan M.N. *Bacillus* spp., a bio-control agent enhances the activity of antioxidant defense enzymes in rice against *Pyricularia oryzae*. *PLoS One.* 2017;12(11): e0187412. DOI 10.1371/journal.pone.0187412.
- Reis V., Baldani V.L.D., Baldani J.I. Isolation, identification and biochemical characterization of *Azospirillum* spp. and other nitrogen-fixing bacteria. In: Cassán F., Okon Y., Creus C. (Eds.) *Handbook for Azospirillum*. Basel: Springer, 2015;10:978-983. DOI 10.1007/978-3-319-06542-7_1.
- Rothballer M., Schmid M., Hartmann A. *In situ* localization and PGPR-effect of *Azospirillum brasilense* strains colonizing roots of different wheat varieties. *Symbiosis.* 2003;34:261-279.
- Sayyad G., Afyuni M., Mousavi S.-F., Abbaspour K.C., Hajababasi M.A., Richards B.K., Schulin R. Effects of cadmium, copper, lead, and zinc contamination on metal accumulation by safflower and wheat. *Soil Sediment Contam. Int. J.* 2009;18(2):216-228. DOI 10.1080/15320380802660248.
- Sullivan M.L. Beyond brown: polyphenol oxidases as enzymes of plant specialized metabolism. *Front. Plant Sci.* 2015;5:783. DOI 10.3389/fpls.2014.00783.
- Teixeira Filho M.C.M.T., Galindo F.S., Buzetti S., Santini J.M.K. Inoculation with *Azospirillum brasilense* improves nutrition and increases wheat yield in association with nitrogen fertilization. Ch. 6. In: Wanyera R., Owuochi J. (Eds.) *Wheat Improvement, Management and Utilization*. IntechOpen, 2017;99-114. DOI 10.5772/67638.
- Wang H., Zhong G., Shi G., Pan F. Toxicity of Cu, Pb, and Zn on seed germination and young seedlings of wheat (*Triticum aestivum* L.). In: Li D., Liu Y., Chen Y. (Eds.) *Computer and Computing Technologies in Agriculture IV*. CCTA 2010. IFIP Advances in Information and Communication Technology. Vol. 346. Berlin; Heidelberg: Springer, 2011;231-240. DOI 10.1007/978-3-642-18354-6_29.
- Wang S., Wu W., Liu F., Liao R., Hu Y. Accumulation of heavy metals in soil-crop systems: a review for wheat and corn. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2017;24(18):15209-15225. DOI 10.1007/s11356-017-8909-5.
- Yang Y.-J., Cheng L.-M., Liu Z.-H. Rapid effect of cadmium on lignin biosynthesis in soybean roots. *Plant Sci.* 2007;172:632-639. DOI 10.1016/j.plantsci.2006.11.018.
- Yruela I. Copper in plants. *Braz. J. Plant Physiol.* 2005;17(1):145-156. DOI 10.1590/S1677-04202005000100012.

ORCID ID

A.Yu. Muratova orcid.org/0000-0003-1927-918X
E.V. Lyubun orcid.org/0000-0002-8814-6949

S.N. Golubev orcid.org/0000-0002-0021-4936
O.V. Turkovskaya orcid.org/0000-0003-4501-4046

Благодарности. Работа выполнена по теме № ГР 121031700141-7.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 30.03.2022. После доработки 19.05.2022. Принята к публикации 24.05.2022.