

DOI 10.17516/1997-1389-0389

EDN: CITDOK

УДК 58.071:579.222

Plant Growth Promoting Activity and Metal Tolerance of Bacteria Isolated from Rhizosphere of the Orchid *Epipactis atrorubens* Growing on Serpentine Substrates of the Middle Urals

**Olga V. Voropaeva^a,
Galina G. Borisova^a, Maria G. Maleva^{*a},
Anastasia V. Podstavkina^a, Alexander A. Ermoshin^{a,b},
Anastasia S. Tugbaeva^a and Elena I. Filimonova^a**

*^aUral Federal University
named after the first President of Russia B. N. Yeltsin
Ekaterinburg, Russian Federation*

*^bInner Mongolia Academy of Agriculture
and Animal Husbandry Science
Hohhot, China*

Received 17.05.2022, received in revised form 14.07.2022, accepted 16.08.2022

Abstract. The article presents data obtained in the study of bacteria isolated from the rhizosphere of the orchid *Epipactis atrorubens* (Hoffm.) Besser. Analysis was carried out to compare some morphological, physiological, and biochemical characteristics of plant rhizobacteria growing on serpentine rocks in two biotopes: in the natural forest community (control habitat) and on the asbestos mine dump (the Sverdlovsk region, Middle Urals). An assessment of the plant growth promoting (PGP) activity of the isolated strains did not show significant differences in the ability of rhizobacteria to synthesize indol-3-acetic acid (IAA) and solubilize phosphates between the study sites. However, the proportion of isolates capable of nitrogen fixation was higher in the rhizosphere of *E. atrorubens* growing on the dump compared to the control habitat. The tolerance of isolates to heavy metals was assessed by the maximum metal concentration (400, 600, and 1000 mg/L, respectively, for Ni, Cu,

© Siberian Federal University. All rights reserved

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).

* Corresponding author E-mail address: maria.maleva@mail.ru

ORCID: 0000-0002-5055-797X (Voropaeva O.); 0000-0001-6663-9948 (Borisova G.); 0000-0003-1686-6071 (Maleva M.); 0000-0002-1530-5291 (Podstavkina A.); 0000-0003-2784-4898 (Ermoshin A.); 0000-0001-9231-3650 (Tugbaeva A.); 0000-0001-6937-0139 (Filimonova E.)

and Zn) at which bacterial growth was observed. Rhizobacteria from the dump were found to be more resistant to elevated concentrations of metals compared to their counterparts from the natural forest community. The molecular genetic analysis of isolates with the highest PGP-activity (IAA >1.0 mg/L; PO₄³⁻ >50.0 mg/L) revealed that most of the *E. atrorubens* rhizobacteria in both habitats belonged to the genera *Buttiauxella* and *Pseudomonas*. In model experiments, the PGP ability of four selected strains was tested on zinnia seeds. Seed inoculation with *Pseudomonas* sp. and *Buttiauxella* sp. did not have any significant effect on their germination; however, *Buttiauxella* sp. contributed to the increase in the length of seedlings compared with the control (by 25 %, on average). It has been suggested that the selected isolates of *E. atrorubens* rhizobacteria, due to their growth promoting activity and metal tolerance, can facilitate naturalization of the orchid in an industrially disturbed area.

Keywords: Orchidaceae, dark-red helleborine, rhizospheric bacteria, serpentine dumps, technogenic substrates, heavy metals, plant growth promoting activity, 16S rRNA gene sequencing

Acknowledgments: The reported study was funded by RFBR and the Government of the Sverdlovsk Region (Project number 20-44-660011) and the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation as part of state task of the Ural Federal University (FEUZ-2020-0057).

Citation: Voropaeva O. V., Borisova G. G., Maleva M. G., Podstavkina A. V., Ermoshin A. A., Tugbaeva A. S., Filimonova E. I. Plant growth promoting activity and metal tolerance of bacteria isolated from rhizosphere of the orchid *Epipactis atrorubens* growing on serpentine substrates of the Middle Urals. J. Sib. Fed. Univ. Biol., 2022, 15(3), 297–313. DOI: 10.17516/1997-1389-0389



Ростстимулирующая активность и металлоустойчивость изолятов бактерий из ризосферы орхидеи *Epipactis atrorubens*, произрастающей на серпентинитовых субстратах Среднего Урала

**О. В. Воропаева^а, Г. Г. Борисова^а,
М. Г. Малева^а, А. В. Подставкина^а,
А. А. Ермошин^{а, б}, А. С. Тугбаева^а, Е. И. Филимонова^а**
*^аУральский федеральный университет
им. первого Президента России Б. Н. Ельцина
Российская Федерация, Екатеринбург
^бАкадемия сельского хозяйства
и животноводства Внутренней Монголии
Китай, Хух-Хото*

Аннотация. В статье представлены данные, полученные при изучении бактерий, выделенных из ризосферы орхидеи *Epipactis atrorubens* (Hoffm.) Besser. Проведен сравнительный анализ некоторых морфологических, физиологических и биохимических характеристик ризобактерий

растений, произрастающих в двух биотопах на серпентинитовых породах: в естественном лесном фитоценозе (фоновый участок) и на отвале после добычи асбеста (Свердловская область, Средний Урал). Оценка ростстимулирующей (PGP) активности выделенных штаммов не показала достоверных различий между исследованными участками по способности ризобактерий к синтезу индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) и солюбилизации фосфатов. Однако доля изолятов, способных к азотфиксации, была выше в ризосфере *E. atrorubens*, произрастающего на отвале, по сравнению с фоновым местообитанием. Устойчивость изолятов к тяжелым металлам оценивали по максимальной концентрации металла (400, 600 и 1000 мг/л соответственно для Ni, Cu и Zn), при которой отмечался рост бактерий. Показано, что ризобактерии с отвала оказались более устойчивыми к повышенным концентрациям металлов по сравнению с естественным лесным фитоценозом. На основе молекулярно-генетического анализа изолятов с наиболее выраженной PGP-активностью (ИУК >1,0 мг/л; PO₄³⁻ >50,0 мг/л) обнаружено сходство между изученными местообитаниями по родовой принадлежности ризобактерий *E. atrorubens*: выделенные штаммы принадлежали преимущественно к родам *Buttiauxella* и *Pseudomonas*. В модельных экспериментах протестирована ростстимулирующая способность четырех отобранных штаммов на семенах циннии. Инокуляция семян *Pseudomonas* sp. и *Buttiauxella* sp. не оказывала значимого влияния на их всхожесть, однако *Buttiauxella* sp. способствовала увеличению длины проростков в сравнении с контролем (в среднем на 25 %). Сделано предположение, что отобранные изоляты ризобактерий *E. atrorubens*, благодаря их ростстимулирующей активности и металлоустойчивости, могут способствовать натурализации орхидеи на техногенно нарушенной территории.

Ключевые слова: Orchidaceae, дремлик темно-красный, ризосферные бактерии, серпентинитовые отвалы, техногенные субстраты, тяжелые металлы, ростстимулирующая активность, секвенирование гена 16S рРНК.

Благодарности: Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ и Правительства Свердловской области (научный проект номер 20-44-660011) и Министерства науки и высшего образования РФ в рамках Государственного задания Уральского федерального университета (FEUZ-2020-0057).

Цитирование: Воропаева, О.В. Ростстимулирующая активность и металлоустойчивость изолятов бактерий из ризосферы орхидеи *Epipactis atrorubens*, произрастающей на серпентинитовых субстратах Среднего Урала / О.В. Воропаева, Г.Г. Борисова, М.Г. Малева, А.В. Подставкаина, А.А. Ермошин, А.С. Тугбаева, Е.И. Филимонова // Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология, 2022. 15(3). С. 297–313. DOI: 10.17516/1997-1389-0389

Введение

Изменение естественных местообитаний и сокращение ареалов многих представителей семейства Orchidaceae Juss. влечет за собой уменьшение их численности, а порой и полное уничтожение (Swarts, Dixon, 2009). Как правило, виды этого семейства представлены

малочисленными популяциями, приуроченными к определенным экологическим нишам, характеризуются длительным циклом возобновления, низкой конкурентоспособностью (Мамаев и др., 2004; Vakhrameeva et al., 2008). Сокращению численности популяций орхидей также способствует сбор высококоде-

коративных растений на букеты и заготовка подземных и надземных органов в качестве лекарственного сырья (Перебора, 2011).

Вместе с тем в последние десятилетия обнаружено, что субстраты, сформировавшиеся в результате деятельности предприятий добывающей и перерабатывающей промышленности, на ранних стадиях сукцессии могут заселяться некоторыми редкими видами орхидей (Jurkiewicz et al., 2001; Adamowski, 2006; Филимонова и др., 2014; Chibrik et al., 2016; Rewicz et al., 2017; Filimonova et al., 2019).

Особый интерес представляет популяция редкой на Урале орхидеи *Epipactis atrorubens* (Hoffm.) Besser (дремлик темно-красный), обнаруженная на серпентинитовом отвале после добычи асбеста (Filimonova et al., 2019; 2020). Дремлик темно-красный – европейско-западно-сибирский вид, занесенный в Красные книги 35 регионов России, включая Красную книгу Свердловской области (Красная книга..., 2018). Эта орхидея встречается преимущественно на известняковых скальных обнажениях по берегам рек и на сухих облепленных каменистых (известняковых, доломитовых, реже гранитных) склонах в хребтовой части Урала (Мамаев и др., 2004). Как ксеромезофит и кальцефил *E. atrorubens* оказался способным заселять различные каменистые промышленные отвалы и карьеры, образованные при разработке месторождений асбеста, бурого угля, талька, известняка и др. (Filimonova et al., 2020).

Субстраты, сформированные на серпентинитовых породах, обычно неблагоприятны для роста растений из-за своих физических и химических свойств. Они отличаются низким содержанием азота, фосфора, калия, кальция, высоким содержанием магния (Djordjevic et al., 2016). Сдвиг соотношения Mg: Ca в пользу Mg негативно сказывается на растениях, особенно в условиях избытка

ионов таких тяжелых металлов (ТМ), как железо, никель, хром и кобальт (Rajakaruna, Boyd, 2014).

Особую актуальность для разработки эффективных мер по сохранению локальных популяций редких видов орхидей представляет изучение их консортивных связей с почвенными микроорганизмами. К настоящему времени доказана положительная роль микоризы в адаптации орхидных к малопродуктивным субстратам, почвам с избыточным количеством металлов и другим неблагоприятным эдафическим условиям (Jurkiewicz et al., 2001; Kulikov, Filippov, 2001; Rasmussen, 2002; Smith, Read, 2008).

Почвенные бактерии, наряду с микромицетами, являются важнейшими компонентами системы симбиотических отношений растений сем. Orchidaceae с микроорганизмами (Herrera et al., 2022). Известно, что многие эндофитные и ризосферные бактерии обладают способностью стимулировать рост растений (PGP – от англ. «Plant Growth Promoting») с помощью различных механизмов, таких как производство фитогормонов, хелатирование железа сидерофорами, образование органических кислот, солубилизация фосфатов, индукция антиоксидантных ферментов и др. (Боронин, 1998; Vessey, 2003; Lugtenberg, Kamilova, 2009; Rana et al., 2011; Rajkumar et al., 2017; Kumar et al., 2021a; 2021b).

К настоящему времени бактериальная микрофлора орхидей, которая, возможно, наряду с микоризой способствует их адаптации к неблагоприятным условиям, изучена недостаточно. Встречаются отдельные работы (Bayman, Otero, 2006; Шеховцова и др., 2010; Перебора, 2011; Herrera et al., 2022), где приводятся сведения о сообществах почвенных микроорганизмов в местообитаниях орхидных и показано их функциональное и таксономическое разнообразие. Доказана

способность ассоциированных с орхидеями бактерий синтезировать ауксины и проявлять другие PGP-свойства (Wilkinson et al., 1994; Tsavkelova et al., 2005; 2007; Faria et al., 2013; Jakubska-Busse et al., 2021; Herrera et al., 2022). Однако данные о способности ризосферных бактерий улучшать рост орхидных и повышать их жизнеспособность в условиях абиотического стресса являются фрагментарными. Между тем изучение этих аспектов является научной основой для понимания механизмов устойчивости орхидей в техногенно нарушенных местообитаниях.

Цель исследования – оценка морфологических характеристик, PGP-активности и металлотолерантности культивируемых изолятов бактерий из ризосферы орхидеи *E. atrorubens*, произрастающей на серпентинитовых породах (естественный лесной фитоценоз и отвал после добычи асбеста), и определение таксономической принадлежности наиболее эффективных штаммов.

Материал и методы

Объектами исследования были бактерии, выделенные из ризосферы *E. atrorubens*. Для исследования было выбрано два участка, субстраты которых сформированы на серпентинитовых породах: S-1 (57°45'42.93"N, 60°12'52.82"E), представленный естественным лесным массивом (сосновый лес между селом Шиловка и поселком Новоасбест, Горноуральский городской округ), и S-2 (57°44'54.78"N, 60°12'37.55"E) – отвал вскрышных пород после добычи асбеста (Шиловское месторождение асбеста, п. Новоасбест).

В выбранных участках проводили отбор материала (почва ризосферы вместе с растениями) для выделения штаммов ризобактерий, их тестирования на PGP-активность и металлотолерантность и проведения молекулярно-генетической идентификации бактериальных

изолятов с наиболее выраженными PGP-свойствами. Растения *E. atrorubens* (по 3 генеративных особи из каждого биотопа) выкапывали вместе с субстратом в период цветения (середина июля 2020 г.), помещали в стерильные зип-пакеты и доставляли в лабораторию. Параллельно с микробиологическими исследованиями проводили оценку физико-химических свойств ризосферной почвы.

Величину pH и удельную электропроводность определяли в почвенно-водной суспензии в соотношении 1:2,5 (почва: деионизированная вода) с помощью портативного pH-метра/кондуктометра (Hanna Instruments GmbH, Graz, Австрия). Гранулометрический анализ субстратов выполняли с использованием сит стандартным методом (Вадюнина, Корчагина, 1986). Содержание ТМ в субстратах определяли при помощи атомно-абсорбционной спектроскопии на Varian AA240FS (Varian Australia Pty Ltd, Австралия) после озонирования 70 %-ной азотной кислотой.

Количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ) в образцах ризосферной почвы определяли высевом на твердую питательную среду Лурия-Бертани (LB) и выражали в колониеобразующих единицах (КОЕ) на 1 г сухого веса (Нетрусов и др., 2005).

Оценку способности культивируемых изолятов ризобактерий стимулировать рост растений проводили путем их тестирования на способность к азотфиксации, синтезу индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) и солиubilизации фосфатов.

Для определения способности выделенных ризобактерий к фиксации молекулярного азота изоляты инкубировали на плотной среде Эшби в течение 3–5 суток при температуре 28 °C. В качестве контроля использовали среду Эшби с добавлением нитратного азота (Kumar et al., 2013).

Для оценки продукции ИУК использовали методику Bric et al. (1991) с модифицированным бульоном LB. Культуру бактерий (10^8 КОЕ/мл) инокулировали в бульон LB с добавлением L-триптофана (200 мкг/мл) и культивировали при 28 °С при 160 об./мин. Через 7 суток из культуры отбирали 1 мл, переносили в пробирку типа Eppendorf и центрифугировали при 10000 g в течение 6 мин. К 100 мкл супернатанта добавляли 100 мкл реактива Сальковского (20 мл 35 % HClO_4 и 10 мл 0,5 М FeCl_3), инкубировали в темноте в течение 30 мин и измеряли оптическую плотность при 530 нм на планшетном спектрофотометре (Infinite M200 PRO, Tecan, Австрия). Способность к синтезу ИУК из L-триптофана определяли по калибровочной кривой, построенной на основе стандартного раствора данного гормона (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Германия).

Для оценки способности бактерий к солюбилизации фосфатов был модифицирован метод, предложенный ранее Ribeiro, Cardoso (2012). Молодые культуры бактерий (10^8 КОЕ/мл) инокулировали в среду NBRIP ("National Botanical Research Institute's phosphate growth medium") с pH $7,1 \pm 0,2$ и инкубировали при 28 °С в течение 192 ч при 160 об./мин. Для определения количества растворенных фосфатов из культуры отбирали 1 мл, переносили в пробирку типа Eppendorf и центрифугировали при 10000 g в течение 6 мин. В каждую лунку планшета вносили 29 мкл супернатанта вместе с 114 мкл деионизированной воды Millipore (система Milli-Q, Millipore, Франция) и 57 мкл ванадий-молибденового реагента. Образцы инкубировали в течение 10 мин и измеряли оптическую плотность при 420 нм. Параллельно культивировали контрольные образцы (без добавления бактерий). Способность к солюбилизации фосфатов оценивали по калибровочной кривой, построен-

ной с использованием стандартного раствора дигидроортофосфата калия (KH_2PO_4).

Для определения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) изоляты выращивали с возрастающими концентрациями ТМ (для Cu: от 200 до 600; Ni: от 300 до 400; Zn: от 100 до 2000 мг/л) на жидкой среде LB в течение 5 дней при 28 °С (Rajkumar et al., 2013). Все используемые растворы ТМ готовили с использованием деионизированной воды Millipore. Контрольные пробирки были подготовлены без добавления металлов.

В целях определения родовой принадлежности изолятов проводили их молекулярно-генетическую идентификацию. ДНК из жидких культур изолированных колоний выделяли с помощью набора для экстрагирования бактериальной геномной ДНК фирмы ООО «Диаэм» (3318.0250) на спин-колонках согласно инструкции производителя. Концентрацию и наличие примесей в выделенной ДНК определяли спектрофотометрическим методом при 260 и 280 нм (Infinite M200 PRO, Tecan, Австрия). Для амплификации генов 16S рРНК использовали в качестве матрицы 10 нг тотальной ДНК, набор 16S Barcoding Kit (SQK-16S 024, Oxford Nanopore Technologies, Великобритания) и LongAmp Hot Start Taq 2 × Master Mix (NEB, Великобритания), следуя протоколу производителя. Условия амплификации: начальная денатурация при 95 °С в течение 1 мин; 25 циклов: денатурация при 95 °С в течение 20 сек, отжиг праймеров при 55 °С в течение 30 сек и синтез цепи при 65 °С в течение 2 мин; окончательное удлинение цепи при 65 °С в течение 5 мин (T100 Thermal Cycler, Bio-Rad, США). ПЦР-продукт очищали с помощью AMPure XP (Beckman Coulter, США) и использовали для подготовки библиотеки для секвенирования (SQK-16S 024, Oxford Nanopore Technologies, Великобритания). Секвенирование проводили на приборе

GridION Mk1 (Oxford Nanopore Technologies, Великобритания) в проточной кювете R 9.4 (FLO-MIN 106D; Oxford Nanopore Technologies, Великобритания). Первичную обработку данных проводили в программном обеспечении MINKNOW ver. 21.05.8 (Oxford Nanopore Technologies, Великобритания). Данные последовательностей в формате FAST5 были преобразованы в файлы формата FASTQ с помощью программного обеспечения Guppy ver. 5.0.11 (Oxford Nanopore Technologies, Великобритания) со средним показателем качества прочтения >7 . Систематическую принадлежность бактерий определяли на основе таксономической базы данных NCBI с использованием программного обеспечения EPI2ME Fastq 16S ver. 3.3.0 (Oxford Nanopore Technologies, Великобритания). В процессе анализа из прочтений были удалены последовательности адаптера и штрих-кода, минимальная длина идентифицированных фрагментов составляла 1400 п.н.

На основе количественного определения у изолятов способности к синтезу ИУК и солюбилизации фосфатов было отобрано 4 штамма с наиболее выраженной ростстимулирующей активностью для тестирования на растениях. Для оценки их влияния на всхожесть семян и длину проростков был проведен эксперимент, в котором использовали семена циннии изящной (*Zinnia elegans* Jacq.), сорт «крупноцветковая винно-красная», агрофирма «Аэлита». Семена стерилизовали стандартным методом, выдерживая 1 мин в 70%-ном этаноле, после чего в течение 15 мин обрабатывали раствором гипохлорита натрия (0,2 % активного хлора) и трижды отмывали стерильной дистиллированной водой. Далее стерильные семена раскладывали в ламинар-боксе в чашки Петри (диаметр 10 см), в которые предварительно было помещено два слоя стерильной фильтровальной бумаги и добав-

лены тестируемые растворы в объеме 10 мл. Контролем служила дистиллированная вода. В опытных вариантах использовали суспензии культур бактерий, которые выращивали на питательной среде LB в течение 3 суток при температуре 27 °С и постоянном перемешивании (160 об/мин.). Выросшие культуры бактерий центрифугировали, после чего осадок промывали дистиллированной водой и повторно центрифугировали. После промывки бактерии доводили до концентрации $(1-7) \times 10^7$ клеток/мл и добавляли к семенам циннии. Чашки инкубировали при фотопериоде 16:8 (день: ночь), интенсивности светового потока 250 мкМ фотонов/(м² сек), относительной влажности 60 % и температуре 27 °С. В каждую чашку помещали по 20 семян; каждый вариант опыта проводили в 3-кратной повторности. На 7 сутки определяли всхожесть семян и измеряли длину растений (от кончика корня до верхушки проростка).

Измерения морфологических и физиологических параметров выделенных изолятов ризобактерий проводили в 3–11-кратной биологической повторности. Статистическую обработку результатов выполняли с помощью программ MS Excel'2016 и Statistica'8. Для оценки достоверности различий между исследуемыми участками использовали непараметрический критерий Манна–Уитни при $p < 0,05$. В таблицах и на рис. 3 представлены средние арифметические значения и их стандартные ошибки (SE); разными латинскими буквами отмечены достоверные различия между вариантами.

Результаты и обсуждение

Эдафические факторы оказывают значительное влияние на сообщества ассоциативных микроорганизмов (Белимов, 2012; Herrera et al., 2022), поэтому представляется целесообразным охарактеризовать основные

физико-химические свойства изученных субстратов.

Субстраты изученных участков отличались по гранулометрическому и химическому составу. Почвы на S-1 – горные лесные бурые, легкосуглинистые. В гранулометрическом составе преобладала фракция мелкозема, включающая песок, пыль и др. В составе скелетной части почти равные доли имели гравий и щебень. Субстрат отвала серпентинитовых пород (S-2) содержал меньше мелкозема, но больше гравия и щебня (табл. 1). Кроме того, он характеризовался большей щелочностью по сравнению с S-1. При этом удельная электропроводность почвенного субстрата на участке S-1 почти в 1,5 раза превышала соответствующие значения для S-2 (табл. 1).

Количественная оценка микроорганизмов в субстратах из ризосферы *E. atrorubens* показала, что КМАФАНМ на изученных участках было примерно одинаковым (табл. 1). По отношению к молекулярному кислороду на обоих участках аэробные бактерии доминировали над факультативными анаэробами.

Исследования показали, что субстрат отвала серпентинитовых пород (S-2) отличался повышенным валовым содержанием магния, никеля, хрома, меди и кобальта (205405, 1618, 1263, 120 и 60 мг/кг соответственно). В почве

естественного лесного массива (S-1) концентрация этих металлов была в среднем в 3 раза ниже. При этом содержание доступных форм кальция и таких важных для растений микроэлементов, как марганец, цинк и медь, на отвале было ниже, чем в естественном фитоценозе. Соотношение валового содержания Mg к Ca в субстрате отвала составляло почти 15, в то время как в лесном фитоценозе – около 4.

Для изучения особенностей бактериальной микрофлоры из ризосферной почвы *E. atrorubens* в лесном фитоценозе (S-1) было выделено 37 штаммов ризосферных бактерий, представленных преимущественно одиночными грамтрицательными палочками разной длины (81 %). Из ризосферной почвы *E. atrorubens*, произрастающего на отвале (S-2), было выделено 22 штамма ризобактерий, среди которых также преобладали грамтрицательные одиночные, в основном подвижные, палочки (82 %). По культуральным признакам на твердой питательной среде можно было выделить круглые колонии (71 %), а также круглые с фестончатым краем (13 %), с валиком по краю (11 %) и складчатые (5 %) (рис. 1).

Важной характеристикой почвенных микроорганизмов, способствующей росту растений, является способность к фиксации атмосферного азота. Это свойство имеет особую значимость для растений, произрастающих

Таблица 1. Физико-химические характеристики исследованных субстратов и количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАНМ)

Table 1. Physicochemical characteristics of the substrates and the number of mesophilic aerobic and facultative anaerobic microorganisms (QMAFANM)

Участок	рН*	Удельная электропроводность, мкСм/см*	Щебень, %	Гравий, %	Мелкозем: песок, пыль, глина, %	КМАФАНМ, КОЕ/г сухой почвы
			> 10 мм	10–2 мм	< 2 мм	
S-1	7,37 ± 0,01 <i>a</i>	166,80 ± 4,37 <i>a</i>	7–10	8–10	80–83	6,1×10 ⁴
S-2	8,23 ± 0,01 <i>b</i>	117,00 ± 2,63 <i>b</i>	26	30	44	6,8×10 ⁴

Примечание: *приведены средние арифметические значения ± стандартные ошибки (SE); разными буквами отмечены достоверные различия между исследуемыми участками при $p < 0,05$ ($n = 3$).

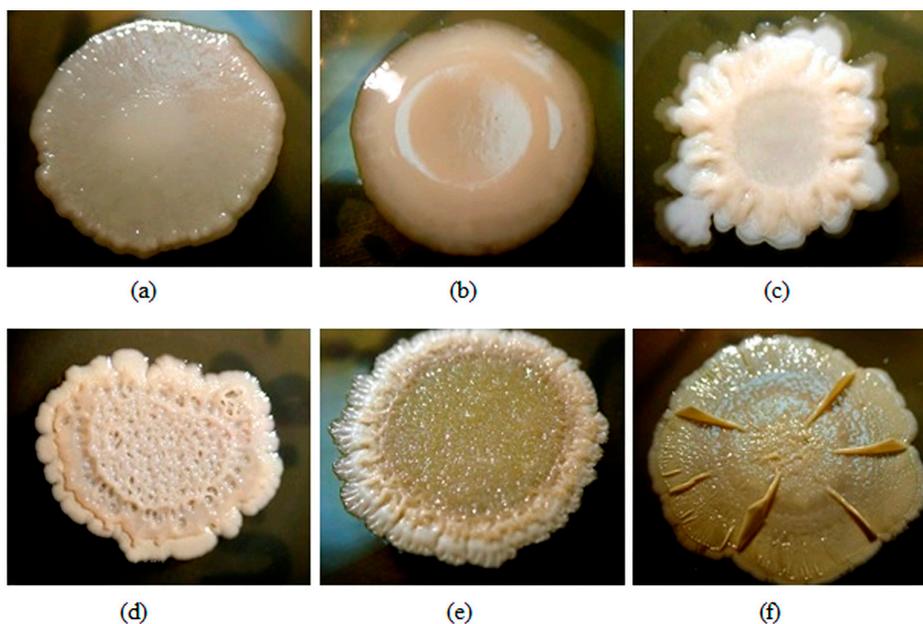


Рис. 1. Формы выделенных колоний: (а) круглая; (b) круглая с валиком по краю; (с–е) круглая с фестончатым краем; (f) круглая, складчатая

Fig. 1. The shapes of the isolated colonies: (a) round; (b) round with a ridge along the edge; (c–e) round with scalloped edge; (f) round, folded

на малоплодородных субстратах с низким содержанием доступного азота. Установлено, что большинство бактерий (около 90 %), выделенных из ризосферы *E. atrorubens* на отвале (S-2), были способны к азотфиксации, в то время как среди ризобактерий, выделенных в естественном фитоценозе (S-1), такой способностью обладали лишь 66 %.

Большинство выделенных штаммов ризобактерий в той или иной степени продемонстрировало способность к синтезу ИУК. На жидкой питательной среде, содержащей *L*-триптофан, бактерии на обоих участках синтезировали ИУК примерно в равных долях: 92 % на S-1 и 96 % на S-2. Как известно, ауксины влияют на деление и дифференцировку клеток, прорастание семян и способствуют образованию боковых и придаточных корней. Удлинение корней увеличивает площадь поверхности корня, тем самым увеличивая поглощение питательных веществ,

а, следовательно, способствует обеспечению растений необходимыми нутриентами (Tsavkelova et al., 2007; Sokolova et al., 2011). Способность некоторых бактерий, ассоциированных с орхидеями, к синтезу ИУК была отмечена и другими авторами (Wilkinson et al., 1994; Tsavkelova et al., 2005; 2007; Altinkaynak, Ozkoc, 2020; Jakubaska-Busse et al., 2021).

Одним из важнейших макроэлементов для растений является фосфор. Он присутствует в почве в форме минералов, органических соединений и неорганических солей. Значительная часть фосфатов недоступна для растений, поэтому способность некоторых почвенных микроорганизмов солиubilizировать фосфаты является важной характеристикой, способствующей росту и жизнедеятельности растений (Herrera et al., 2022). Обычно процесс солиubilизации является результатом действия низкомолекулярных органических кислот, которые выделяются бактериями

и способны растворять минеральные соединения фосфора. Увеличение количества доступных фосфатов может также наблюдаться вследствие активности бактериальных гидролитических ферментов (фосфатаз), ускоряющих расщепление органических соединений фосфора (Боронин, 1998; Herrera et al., 2022).

Способность к солибилизации фосфатов была характерна для подавляющего числа штаммов, выделенных из почвенной ризосферы *E. atrorubens*, что, очевидно, благоприятствовало натурализации этой орхидеи на малоплодородных субстратах. Высокая фосфат-солибилизирующая способность ассоциированных с орхидеями ризобактерий отмечена и другими авторами: из 111 изолятов, выделенных из ризосферы разных видов орхидей Турции, 65 обладали способностью солибилизировать фосфаты (Altinkaynak, Ozkoc, 2020).

Тем не менее к одновременному синтезу ИУК >1,0 мг/л и солибилизации фосфатов (PO_4^{3-}) >50 мг/л оказались способны лишь 41 % изолятов ризобактерий на S-1 и 50 % – на S-2.

Устойчивость изолятов к ТМ оценивали по максимальной концентрации металла, при которой отмечался рост бактерий. Наиболее устойчивы бактерии оказались к цинку, он ингибировал рост выделенных бактерий с обоих участков лишь при концентрации 1000 мг/л, в то время как медь и никель подавляли рост при концентрациях 600 и 400 мг/л соответственно (рис. 2).

Концентрации никеля выше 300 мг/л выдерживало 31 % изолятов из естественного фитоценоза (S-1) и 35 % – из ризосферы *E. atrorubens*, произрастающего на отвале (S-2) (рис. 2а, б). К концентрациям меди более 400 мг/л были устойчивы 27 % бактерий, изолированных на S-1, и 39 % – на S-2 (рис. 2с, d). При концентрациях цинка выше 600 мг/л не прекращался рост у 25 % изолятов

из естественного фитоценоза и 43 % – с отвала (рис. 2е, f).

На основании этого можно сделать заключение о том, что изоляты из ризосферы *E. atrorubens*, произрастающего на отвале, оказались более устойчивы к повышенным концентрациям ТМ, чем в естественном фитоценозе. Вероятно, это связано с хроническим «металлическим» стрессом и выживанием тех видов ризобактерий, которые способны переносить неблагоприятные условия среды.

Выборочные изоляты ризобактерий, которые проявляли наиболее высокую RGP-активность, были подвергнуты молекулярно-генетической идентификации. С использованием молекулярно-генетического анализа сиквенсов 16S рРНК, в 15 колониях, изолированных из ризосферы *E. atrorubens*, произрастающем в естественном лесном фитоценозе (S-1), было выявлено 3 рода: *Buttiauxella*, *Pseudomonas* и *Bacillus*. Преобладающим родом среди изолированных колоний был *Buttiauxella*. Он был выявлен в 11 из 15 проанализированных образцов. Количество прочтений варьировало от 5214 до 401386, средняя точность выравнивания этих сиквенсов на референсный геном составила 91,5–94,0 %. В 3 колониях был идентифицирован род *Pseudomonas*. Минимальное количество прочтений составило 1591, максимальное – 4009. Идентичность с эталонным геномом варьировала от 93,6 до 93,9 %. Род *Bacillus* идентифицирован в одной изолированной колонии. Выявлено 2921 единичных прочтений со средним уровнем гомологии к референсному гену 94,1 %. Также была проведена молекулярно-генетическая идентификация 11 изолированных колоний, выделенных из ризосферы *E. atrorubens*, произрастающего на отвале вскрышных пород (S-2). Выявлено два рода: *Buttiauxella* и *Pseudomonas* (8 и 3 колонии соответствен-

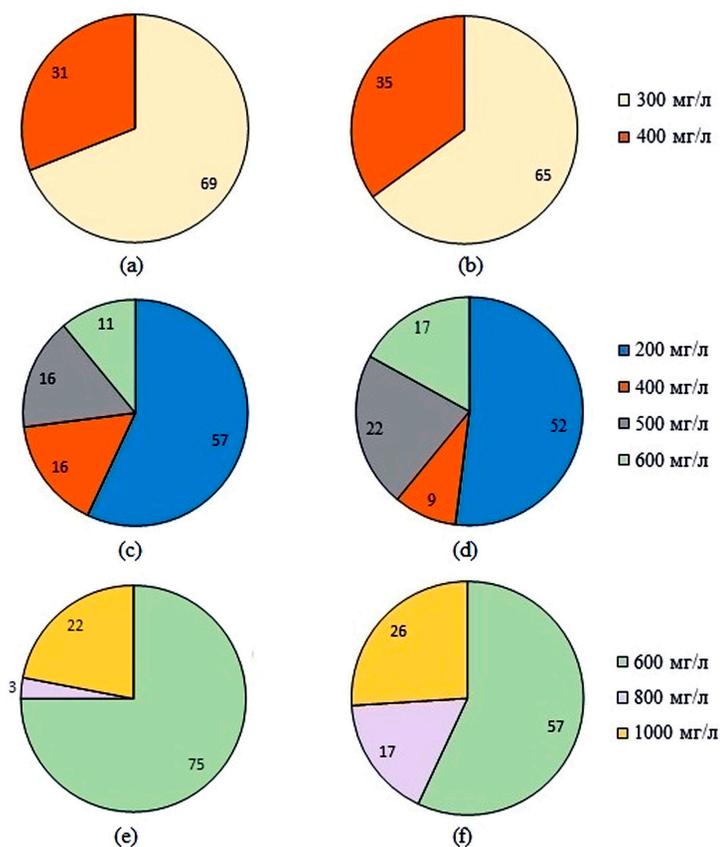


Рис. 2. Минимальная ингибирующая концентрация металлов для бактерий, выделенных из ризосферы *E. atrorubens* на участках S-1 (a, c, e) и S-2 (b, d, f). Данные представлены в процентах от общего числа изолятов тех колоний, которые прекращали свой рост при указанной концентрации металла: a, b – Ni; c, d – Cu; e, f – Zn

Fig. 2. Minimum inhibitory concentration of metals for bacteria isolated from the rhizosphere of *E. atrorubens* in S-1 (a, c, e) and S-2 (b, d, f) sites. Data are presented as a percentage of the total number of isolates of those colonies that did not grow at the indicated metal concentration: a, b – Ni; c, d – Cu; e, f – Zn

но). Общее количество прочтений варьировало от 16356 до 216996, уровень гомологии с референсными генами составил 91,6–91,7 %.

В целом можно отметить отсутствие существенных различий между изученными местообитаниями *E. atrorubens* по родовой принадлежности отобранных изолятов с наилучшей PGP-активностью. Особый интерес представляет сопоставление результатов молекулярно-генетического анализа с имеющимися в литературе данными. Присутствие в микробиоме разных видов орхидей

представителей родов *Pseudomonas* и *Bacillus* было отмечено многими авторами (Шеховцова и др., 2010; Коломейцева и др., 2013; Altinkaynak, Ozkoc, 2020; Jakubska-Busse et al., 2021; Herrera et al., 2022). Что касается рода *Buttiauxella*, сведения о нем ограничены. Ранее эндофитные бактерии *Buttiauxella agrestis* были обнаружены у близкородственного вида орхидеи *Epipactis helleborine* (Jakubska-Busse et al., 2021). Можно предположить, что широкое распространение штаммов этого рода в ризосфере *E. atrorubens* является особен-

ностью этой орхидеи. Исследования бактериальных сообществ близкородственных таксонов (*Epipactis albensis*, *E. helleborine*, *E. purpurata*), проведенные Jakubská-Busse et al. (2021), показали явные различия между видами. Причем некоторые из изученных видов орхидей произрастали в одних и тех же местообитаниях, однако их бактериальная микробиота отличалась друг от друга.

После проведения молекулярно-генетической идентификации у 26 изолятов были определены количественные показатели, отражающие способность к синтезу ИУК и солюбилизации фосфатов. Штамм ризобактерий, принадлежащий роду *Bacillus*, продемонстрировал наиболее низкую ростстимулирующую активность, поэтому в табл. 2 представлены данные только по изолятам, относящимся к двум родам (*Buttiauxella* и *Pseudomonas*).

По способности синтезировать ИУК у изученных изолятов наблюдалось варьирование в широких пределах (табл. 2): средний коэффициент вариации составлял 56 %. Достоверных различий как между представителями двух родов, так и между изученными местообитаниями (участки S-1 и S-2) не выявлено.

В целом количественные параметры, отражающие способность к синтезу ИУК, соответствуют данным других авторов (Tsavkelova et al., 2007; Шеховцова и др., 2012).

По фосфат-соллюбилизирующей способности изоляты характеризовались меньшей вариабельностью: средний коэффициент вариации составлял 14 %. Бактерии рода *Pseudomonas* соллюбилизировали фосфаты немного лучше, чем *Buttiauxella* (на 7 %). Между участками по фосфат-соллюбилизирующей способности изолятов достоверных различий не выявлено. На основе количественной оценки способности изолятов к синтезу ИУК и соллюбилизации фосфатов было отобрано 4 штамма бактерий, обладающих наиболее высокими показателями PGP-активности, включая 2 штамма, относящихся к роду *Buttiauxella*, и 2 – к роду *Pseudomonas*. Эти штаммы были протестированы на семенах циннии для оценки их влияния на прорастание семян и длину проростков (рис. 3).

Тестирование изолятов на циннии не выявило достоверных различий от контроля по всхожести семян (рис. 3а). Инокуляция семян циннии изолятами *Buttiauxella* sp. увеличивала длину проростков в сравнении с кон-

Таблица 2. Содержание ИУК и растворимых фосфатов в культуральной жидкости отобранных изолятов ризобактерий *E. atrorubens*

Table 2. The content of IAA and soluble phosphates in the culture liquid of selected isolates of *E. atrorubens* rhizobacteria

Участок	Бактерии	ИУК, мг/л		Фосфаты (PO ₄ ³⁻), мг/л	
		Среднее ± SE	Lim (min–max)	Среднее ± SE	Lim (min–max)
S-1	<i>Buttiauxella</i> sp.	15,1 ± 1,5	7,5–21,5	104,7 ± 2,5	88,9–113,4
S-2	<i>Buttiauxella</i> sp.	11,1 ± 1,7	7,4–21,3	99,0 ± 4,8	67,3–112,9
S-1	<i>Pseudomonas</i> sp.	7,7 ± 3,7	1,1–16,4	105,6 ± 0,8	104,6–107,1
S-2	<i>Pseudomonas</i> sp.	12,6 ± 2,1	8,4–17,1	105,2 ± 6,0	95,2–116,0

Примечание: представлены средние арифметические значения ± стандартные ошибки (SE) и диапазон (Lim) минимальных (min) и максимальных (max) значений. Различия между исследуемыми участками не достоверны при $p < 0,05$ ($n = 3-11$).

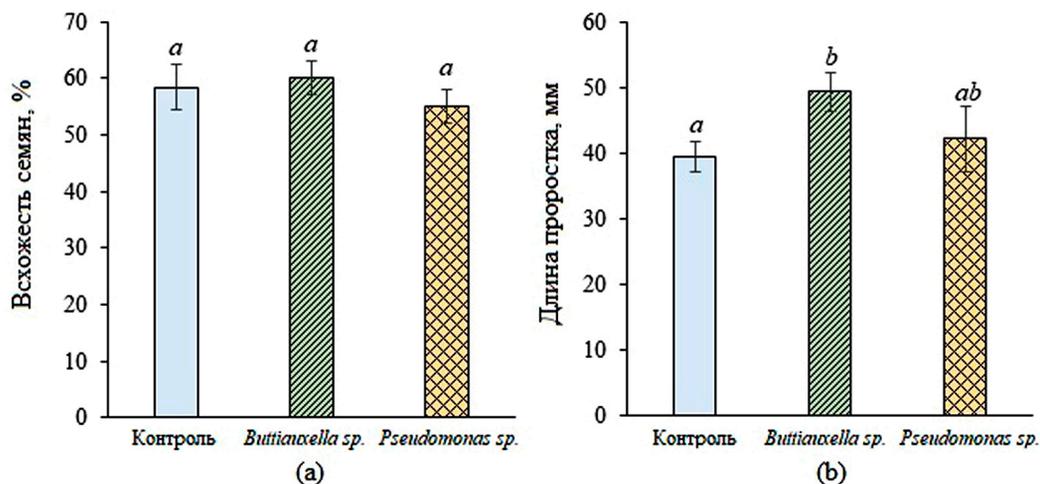


Рис. 3. Результаты оценки влияния выделенных штаммов *Buttiiauxella sp.* и *Pseudomonas sp.* на всхожесть семян (а) и длину проростков (б) циннии. Данные представлены как средние арифметические значения \pm стандартные ошибки (SE); разными буквами отмечены достоверные различия между исследуемыми участками при $p < 0,05$ ($n = 60$ при оценке всхожести; $n = 15$ при измерении длины проростков)

Fig. 3. The results of assessing the impact of the isolated strains of *Buttiiauxella sp.* and *Pseudomonas sp.* on seed germination (a) and seedling length (b) of zinnia. Data are presented as mean values \pm standard errors; different letters indicate significant differences between the study sites at $p < 0.05$ ($n = 60$ for seed germination; $n = 15$ for seedling length)

тролем (в среднем на 25 %), в то время как достоверного влияния изолятов *Pseudomonas sp.* на длину проростков не выявлено (рис. 3б).

Исследования, направленные на оценку способности бактерий, ассоциированных с разными видами орхидей, благоприятствовать прорастанию семян и развитию растений, проводили и другие авторы (Wilkinson et al., 1994; Tsavkelova et al., 2007; Galdiano et al., 2011; Рассохина и др., 2020; Сидоров и др., 2020). В целом результаты этих исследований свидетельствуют о положительном влиянии изолятов на всхожесть и ростовые параметры проростков некоторых видов орхидей (Wilkinson et al., 1994; Tsavkelova et al., 2007; Galdiano et al., 2011) и ряда культурных растений (Рассохина и др., 2020; Сидоров и др., 2020). Вместе с тем отмечено, что не все штаммы бактерий, активные в производстве ИУК, способствовали прорастанию семян. Так, при тестировании изолятов *Rhizobium sp.* на тропической орхи-

дее *Dendrobium moschatum* прорастания семян не наблюдалось, поскольку эти бактерии образовывали обильную внеклеточную слизь, которая покрывала семена толстым (до 3 мм) слоем (Tsavkelova et al., 2007). В исследованиях Wilkinson et al. (1994) на семенах орхидеи *Pterostylis vitata* было протестировано семь штаммов, принадлежащих четырем родам. Оказалось, что большая часть изолятов способствовала симбиотическому прорастанию семян, в то время как некоторые штаммы ингибировали этот процесс. Разные наблюдаемые эффекты, возможно, объясняются отсутствием унифицированного подхода к инокуляции тестируемых семян и сложностью взаимоотношений между растениями и ассоциативными микроорганизмами.

Заключение

Изучение культивируемых бактериальных изолятов из ризосферы орхидеи *Epipactis*

atrorubens, произрастающей на серпентинитовых субстратах Среднего Урала, показало, что по способности ризобактерий к синтезу ИУК и солюбилизации фосфатов существенных различий между изученными местообитаниями не выявлено. По способности к азотфиксации выделялись изоляты ризобактерий орхидеи из трансформированной экосистемы. Более того, они оказались более устойчивы к повышенным концентрациям тяжелых металлов (Ni, Cu, Zn) по сравнению с ризобактериями из естественного фитоценоза.

Молекулярно-генетическая идентификация изолятов с наилучшей PGP-активностью показала их сходный таксономический состав. Большинство выделенных штаммов были представлены одиночными грамотрицательными палочками и принадлежали к родам *Buttiauxella* и *Pseudomonas*.

Инокуляция семян циннии выборочными штаммами *Pseudomonas* sp. и *Buttiauxella* sp. не оказывала достоверно значимого влияния на их всхожесть. При этом *Buttiauxella* sp. способствовала увеличению длины проростков в сравнении с контролем (в среднем на 25 %).

Полученные результаты позволяют сделать предположение о том, что выделенные изоляты ризобактерий *E. atrorubens*, благодаря ростстимулирующей активности и металлоторантности, могут способствовать адаптации орхидеи к техногенному субстрату. Дальнейшие исследования будут направлены на изучение таксономического состава бактериальных сообществ с помощью метагеномного анализа и более детальное изучение их характеристик, способствующих росту и жизнедеятельности орхидей в неблагоприятных условиях среды обитания.

Список литературы / References

Белимов А. А. (2012) *Взаимодействия ассоциативных бактерий с растениями: роль биотических и абиотических факторов*. Saarbrücken, Palmarium Academic Publishing, 225 с. [Belimov A. A. (2012) *Interaction of associative bacteria with plants: the role of biotic and abiotic factors*. Saarbrücken, Palmarium Academic Publishing, 225 p. (in Russian)]

Боронин А. М. (1998) Ризосферные бактерии рода *Pseudomonas*, способствующие росту и развитию растений. *Соросовский образовательный журнал*, 10: 25–31 [Boronin A. M. (1998) Plant growth-promoting rhizobacteria *Pseudomonas*. *Soros Educational Journal* [Sorosovskii obrazovatel'nyi zhurnal], 10: 25–31 (in Russian)]

Вадюнина А. Ф., Корчагина З. А. (1986) *Методы исследования физических свойств почв*. Москва, Агропромиздат, 416 с. [Vadyunina A. F., Korchagina Z. A. (1986) *Methods for studying the physical properties of soils*. Moscow, Agropromizdat, 416 p. (in Russian)]

Коломейцева Г. Л., Цавкелова Е. А., Колобов Е. С. (2013) Динамические сообщества оранжевых биоценозов в экспозициях тропических и субтропических растений. *Научный журнал КубГАУ*, 87: 43–54 [Kolomeitseva G. L., Tsavkelova E. A., Kolobov Y. S. (2013) Dynamic communities of greenhouse biocenoses in expositions of tropical and subtropical plants. *Scientific Journal of Kuban State Agrarian University* [Nauchnyi zhurnal KubGAU], 87: 43–54 (in Russian)]

Красная книга Свердловской области: животные, растения, грибы (2018) Корытин Н. С. (отв. ред.) Екатеринбург, ООО «Мир», 450 с. [Red Book of the Sverdlovsk region: animals, plants, mushrooms (2018) N. S. Korytin (ed.) Ekaterinburg, Mir LLC, 450 p. (in Russian)]

Мамаев С. А., Князев М. С., Куликов П. В., Филиппов Е. Г. (2004) *Орхидные Урала: систематика, биология, охрана*. Екатеринбург, УрО РАН, 124 с. [Mamaev S. A., Knyazev M. S.,

Kulikov P. V., Filippov E. G. (2004) *Orchids of the Urals: systematics, biology, protection*. Ekaterinburg, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 124 p. (in Russian)]

Нетрусов А. И., Егорова М. А., Захарчук Л. М., Колотилова Н. Н. (2005) *Практикум по микробиологии: Учебное пособие для студентов высших учебных заведений*. Нетрусов А. И. (ред.) Москва, Издательский центр «Академия», 608 с. [Netrusov A. I., Egorova M. A., Zakharchuk L. M., Kolotilova N. N. (2005) *Workshop on Microbiology: Textbook for students of higher educational institutions*. Netrusov A. I. (ed.) Moscow, Publishing Center "Academy", 608 p. (in Russian)]

Перебора Е. А. (2011) *Экология орхидных Северо-Западного Кавказа*. Краснодар, КубГАУ, 441 с. [Perebora E. A. (2011) *Ecology of orchids in the Northwestern Caucasus*. Krasnodar, Kuban State Agrarian University, 441 p. (in Russian)]

Рассохина И. И., Платонов А. В., Маракаев О. А. (2020) Влияние штамма *Pseudomonas* sp. GEOT18, изолированного из подземных органов *Dactylorhiza incarnata* (L.) Soó (Orchidaceae Juss.), на ростовые процессы культурных растений. *Международный научно-исследовательский журнал*, 6–2: 20–24 [Rassokhina I. I., Platonov A. V., Marakaev O. A. (2020) Influence of *Pseudomonas* sp. GEOT188 strain, isolated from underground bodies of *Dactylorhiza incarnata* (L.) Soó (Orchidaceae Juss.) on growth processes of cultural plants. *International Research Journal* [Mezhdunarodnyi nauchno-issledovatel'skii zhurnal], 6–2: 20–24 (in Russian)]

Сидоров А. В., Зайцева Ю. В., Маракаев О. А. (2020) Влияние культуральной жидкости ассоциативных бактерий рода *Pseudomonas* на прорастание, морфогенез и рост *Dactylorhiza incarnata* (L.) Soó (Orchidaceae) в культуре *in vitro*. *Вестник Томского государственного университета. Биология*, 51: 6–24 [Sidorov A. V., Zaytseva Y. V., Marakaev O. A. (2020) Effect of supernatant of associative bacteria of the genus *Pseudomonas* on germination, morphogenesis and growth of *Dactylorhiza incarnata* (L.) Soó (Orchidaceae) *in vitro*. *Vestnik Tomskogo Gosudarstvennogo Universiteta, Biologiya*, 51: 6–24 (in Russian)]

Филимонова Е. И., Лукина Н. В., Глазырина М. А. (2014) Орхидные в техногенных экосистемах Урала. *Экосистемы, их оптимизация и охрана*, 11: 68–75 [Filimonova E. I., Lukina N. V., Glazyrina M. A. (2014) Orchids in technogenic ecosystems of Ural. *Optimization and Protection of Ecosystems* [Ekosistemy, ih optimizatsiya i ohrana], 11: 68–75 (in Russian)]

Шеховцова Н. В., Первушина К. А., Маракаев О. А., Холмогоров С. В., Осипов Г. А. (2010) Микроорганизмы, ассоциированные с подземными органами растений семейства Orchidaceae средней полосы России. *Проблемы агрохимии и экологии*, 4: 30–36 [Shekhovtsova N. V., Pervushina K. A., Marakaev O. A., Kholmogorov S. V., Osipov G. A. (2010) Microorganisms associated with underground organs of central Russia Orchidaceae. *Problems of Agrochemistry and Ecology* [Problemy agrokhimii i ekologii], 4: 30–36 (in Russian)]

Шеховцова Н. В., Первушина К. А., Маракаев О. А., Охупкина В. А. (2012) Кинетические параметры роста бактерий, ассоциированных с подземными органами *Dactylorhiza maculata* (L.) Soó (Orchidaceae). *Фундаментальные исследования*, 3–3: 542–544 [Shekhovtsova N. V., Pervushina K. A., Marakaev O. A., Okhapkina V. A. (2012) The growth kinetic parameters of the bacteria, associated with underground organs of the *Dactylorhiza maculata* (L.) Soó (Orchidaceae). *Fundamental Research* [Fundamental'nye issledovaniya], 3–3: 542–544 (in Russian)]

Adamowski W. (2006) Expansion of native orchids in anthropogenous habitats. *Polish Botanical Studies*, 22: 35–44

Altinkaynak H., Ozkoc I. (2020) Isolation and molecular characterization of plant growth promoting bacteria from the rhizosphere of orchids in Turkey. *Rhizosphere*, 16: 100280

Bayman P., Otero J. T. (2006) Microbial endophytes of orchid roots. *Microbial root endophytes. Soil Biology, Volume 9*. Schulz B.J.E., Boyle C.J.C., Sieber T.N. (eds.) Springer, Berlin, Heidelberg, p. 153–177

Bric J.M., Bostock R.M., Silverstone S.E. (1991) Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(2): 535–538

Chibrik T.S., Lukina N.V., Filimonova E.I., Glazyrina M.A., Rakov E.A., Maleva M.G., Prasad M.N.V. (2016) Biological recultivation of mine industry deserts: facilitating the formation of phytocoenosis in the Middle Ural region, Russia. *Bioremediation and Bioeconomy*. Prasad M.N.V. (ed.) Amsterdam, Elsevier, p. 389–418

Djordjević V., Tsiftsis S., Lakušić D., Stevanović V. (2016) Niche analysis of orchids of serpentine and non-serpentine areas: Implications for conservation. *Plant Biosystems*, 150(4): 710–719

Faria D.C., Dias A.C.F., Melo I.S., de Carvalho Costa F.E. (2013) Endophytic bacteria isolated from orchid and their potential to promote plant growth. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(2): 217–221

Filimonova E.I., Lukina N.V., Glazyrina M.A., Borisova G.G., Maleva M.G., Chukina N.V. (2019) Endangered orchid plant *Epipactis atrorubens* on serpentine and granite outcrops of Middle Urals, Russia: a comparative morphophysiological study. *AIP Conference Proceedings*, 2063: 040016

Filimonova E., Lukina N., Glazyrina M., Borisova G., Tripti, Kumar A., Maleva M. (2020) A comparative study of *Epipactis atrorubens* in two different forest communities of the Middle Urals, Russia. *Journal of Forestry Research*, 31(6): 2111–2120

Galdiano R.F. Jr., Pedrinho E.A.N., Castellane T.C.L., Lemos E.G.M. (2011) Auxin-producing bacteria isolated from the roots of *Cattleya walkeriana*, an endangered brazilian orchid, and their role in acclimatization. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo*, 35(3): 729–737

Herrera H., Fuentes A., Soto J., Valadares R., Arriagada C. (2022) Orchid-associated bacteria and their plant growth promotion capabilities. *Orchids Phytochemistry, Biology and Horticulture. Reference Series in Phytochemistry*. Merillon J.-M., Kodja H. (eds.) Springer, Cham, p. 175–200

Jakubska-Busse A., Kedziora A., Cieniuch G., Korzeniowska-Kowal A., Bugla-Płoskonska G. (2021) Proteomics-based identification of orchid-associated bacteria colonizing the *Epipactis albensis*, *E. helleborine* and *E. purpurata* (Orchidaceae, Neottieae). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(7): 4029–4038

Jurkiewicz A., Turnau K., Mesjasz-Przybyłowicz J., Przybyłowicz W., Godzik B. (2001) Heavy metal localisation in mycorrhizas of *Epipactis atrorubens* (Hoffm.) Besser (Orchidaceae) from zinc mine tailings. *Protoplasma*, 218(3–4): 117–124

Kulikov P.V., Filippov E.G. (2001) Specific features of mycorrhizal symbiosis formation in the ontogeny of orchids of the temperate zone. *Russian Journal of Ecology*, 32(6): 408–412

Kumar A., Tripti, Voropaeva O., Maleva M., Panikovskaya K., Borisova G., Rajkumar M., Bruno L.B. (2021a) Bioaugmentation with copper tolerant endophyte *Pseudomonas lurida* strain EOO26 for improved plant growth and copper phytoremediation by *Helianthus annuus*. *Chemosphere*, 266: 128983

Kumar A., Tripti, Maleva M., Bruno L.B., Rajkumar M. (2021b) Synergistic effect of ACC deaminase producing *Pseudomonas* sp. TR 15a and siderophore producing *Bacillus aerophilus* TR 15c for enhanced growth and copper accumulation in *Helianthus annuus* L. *Chemosphere*, 276: 130038

Kumar S., Chaudhuri S., Maiti S.K. (2013) Soil dehydrogenase enzyme activity in natural and mine soil – a review. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 13(7): 898–906

Lugtenberg B., Kamilova F. (2009) Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63: 541–556

Rajakaruna N., Boyd R. S. (2014) *Serpentine soils. Oxford bibliographies in ecology*. Gibson D. (ed.) Oxford University Press, New York

Rajkumar M., Ma Y., Freitas H. (2013) Improvement of Ni phytostabilization by inoculation of Ni resistant *Bacillus megaterium* SR 28C. *Journal of Environmental Management*, 128: 973–980

Rajkumar M., Bruno L. B., Banu J. R. (2017) Alleviation of environmental stress in plants: the role of beneficial *Pseudomonas* spp. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 47(6): 372–407

Rana A., Saharan B., Joshi M., Prasanna R., Kumar K., Nain L. (2011) Identification of multi-trait PGPR isolates and evaluating their potential as inoculants for wheat. *Annals of Microbiology*, 61(4): 893–900

Rasmussen H. N. (2002) Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. *Plant and Soil*, 244(1–2): 149–163

Rewicz A., Bomanowska A., Shevera M., Kurowski J., Krason K., Zielinska K. (2017) Cities and disturbed areas as man-made shelters for orchid communities. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 45(1): 126–139

Ribeiro C. M., Cardoso E. J.B.N. (2012) Isolation, selection and characterization of root-associated growth promoting bacteria in Brazil Pine (*Araucaria angustifolia*). *Microbiological Research*, 167(2): 69–78

Smith S. E., Read D. J. (2008) *Mycorrhizal symbiosis* (Third Edition). N.Y., Academic Press, 787 p.

Sokolova M. G., Akimova G. P., Vaishlya O. B. (2011) Effect of phytohormones synthesized by rhizosphere bacteria on plants. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 47(3): 274–278

Swarts N. D., Dixon K. W. (2009) Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. *Annals of Botany*, 104(3): 543–556

Tsavkelova E. A., Cherdyntseva T. A., Netrusov A. I. (2005) Auxin production by bacteria associated with orchid roots. *Microbiology*, 74(1): 46–53

Tsavkelova E. A., Cherdyntseva T. A., Klimova S. Y., Shestakov A. I., Botina S. G., Netrusov A. I. (2007) Orchid-associated bacteria produce indole-3-acetic acid, promote seed germination, and increase their microbial yield in response to exogenous auxin. *Archives of Microbiology*, 188(6): 655–664

Vakhrameeva M. G., Tatarenko I. V., Varlygina T. I., Torosyan G. K., Zagulskii M. N. (2008) *Orchids of Russia and adjacent countries (within the borders of the former USSR)*. Koenigstein, Germany, Koeltz Scientific Books, 690 p.

Vessey J. K. (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255(2): 571–586

Wilkinson K. G., Dixon K. W., Sivasithamparam K., Ghisalberti E. L. (1994) Effect of IAA on symbiotic germination of an Australian orchid and its production by orchid-associated bacteria. *Plant and Soil*, 159(2): 291–295