

DOI: 10.7868/S3034574X26010056

Оригинальная статья

УДК 631. 8

МУЛЬТИВИДОВЫЕ БИОПЛЕНКИ PGPR-ШТАММОВ С АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПОТЕНЦИАЛОМ КАК ОСНОВА ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ЭФФЕКТИВНЫХ БИОПРЕПАРАТОВ

А.М. Лавина*, А.А. Владимирова, Ан.Х. Баймиев, Ал.Х. Баймиев

Институт биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, ИБГ УФИЦ РАН, Уфа, Российская Федерация

*E-mail: owlwoman@mail.ru

Аннотация. Изучены свойства мультивидовых биопленок PGPR-штаммов с антибактериальным потенциалом, проведена оценка их эффективности для использования в качестве основы для разработки биопрепаратов. Выделены 3 штамма бактерий рода *Pseudomonas*, проявляющих антагонистическую активность в отношении ризобий. При совместном росте PGPR-штаммов с исследуемыми культурами *Pseudomonas* sp. 1С и *Rhizobium* sp. LPi14 зафиксирован синергетический эффект, выражающийся в образовании модифицированной мультивидовой биопленки с повышенной биомассой по сравнению с монокультурами ризобактерий. Продемонстрирована ростстимулирующая активность исследуемых культур. Экспериментально доказано формирование продуктивных симбиотических ассоциаций штамма *Rhizobium* sp. LPi14 с бобовыми культурами. Полученные результаты подтверждают целесообразность внедрения биопленочных биопрепаратов, содержащих ассоциации ризосферных бактерий с PGPR-свойствами и антагонистической активностью, в агротехнические практики.^{1,2}

Ключевые слова: *Rhizobium* sp., *Pseudomonas* sp., PGPR, биопленки, биопрепараты, *Pisum sativum* L.

Финансирование. Работа выполнена в рамках Государственного задания № 1022040500077-6.

Соблюдение этических стандартов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов.

Конфликт интересов. Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Вклад авторов. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи.

Ссылка для цитирования: Лавина А.М., Владимирова А.А., Баймиев Ан.Х., Баймиев Ал.Х. Мультивидовые биопленки PGPR-штаммов с антибактериальным потенциалом как основа для разработки эффективных биопрепаратов. *Прикладная биохимия и микробиология / Applied biochemistry and microbiology*. 2026. Т. 62. № 1. С. 62–76. <https://doi.org/10.7868/S3034574X26010056>

© А. М. Лавина, А. А. Владимирова, Ан. Х. Баймиев, Ал. Х. Баймиев, 2026

¹ Дополнительные материалы доступны в электронном виде по DOI статьи: <https://doi.org/10.7868/S3034574X26010056>

² Сокращения: ДБФ — дибутилфталат; ДЭГФ — диэтилгексилфталат; ДНФ — динонилфталат

MULTISPECIES BIOFILMS OF PGPR STRAINS WITH ANTIBACTERIAL POTENTIAL AS A BASIS FOR THE DEVELOPMENT OF EFFECTIVE BIOPREPARATIONS

A.M. Lavina*, A.A. Vladimirova, An.Kh. Baimiev, Al.Kh. Baimiev

Institute of Biochemistry and Genetics, Federal State Budgetary Research Institution of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russian Federation

*E-mail: owlwoman@mail.ru

Abstract. Rhizosphere biofilm communities exhibit stress resistance, efficient resource use, and species diversity, though lab studies typically focus on mono- and binary cultures. This research aimed to investigate multispecies biofilms of PGPR strains with antibacterial potential for biofertilizer development. Three *Pseudomonas* strains showing antagonistic activity against rhizobia were identified. Co-cultivation of PGPR strains with *Rhizobium* sp. LPi14 resulted in a synergistic effect, producing a modified multispecies biofilm with enhanced biomass. The cultures demonstrated growth-stimulating activity, and experiments confirmed productive symbiosis between *Rhizobium* sp. LPi14 and legumes. The obtained results confirm the feasibility of introducing biofilm biofertilizers containing associations of rhizosphere bacteria with PGPR properties and antagonistic activity into agricultural practices.

Keywords: *Rhizobium* sp., *Pseudomonas* sp., PGPR, biofilms, biopreparations, *Pisum sativum* L.

Funding. Conducting research was carried out within the framework of the State Assignment No. 1022040500077-6.

Ethics declarations. This article does not contain any studies involving humans or animals as research subjects.

Conflict of interests. The authors of this work declare that they have no conflict of interest.

Authors contribution. All authors made a significant contribution to the development of the concept, conduct of the research, and preparation of the manuscript.

For Citation: Lavina A.M., Vladimirova A.A., Baimiev An.Kh., Baimiev Al.Kh. Multispecies biofilms of PGPR strains with antibacterial potential as a basis for the development of effective biopreparations. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya / Applied biochemistry and microbiology*. 2026;62(1):62–76. (In Russ.) <https://doi.org/10.7868/S3034574X26010056>

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в агроценозах активно применяются биоудобрения на основе ризобактерий PGPR, способствующих повышению урожайности сельскохозяйственных культур и снижению негативного воздействия агрохимикатов на окружающую среду [1–3]. Среди представителей группы PGPR особое место занимают ризосферные бактерии родов *Pseudomonas* и *Rhizobium*. Ризосферные псевдомонады демонстрируют способность к стимуляции роста растений, оптимизации их фосфорного питания и подавлению развития фитопатогенов [4–7]. В то время как ризобии характеризуются способностью к формированию симбиотических отношений с бобовыми растениями и фиксации атмосферного азота [8–11]. Многочисленные исследования подтверждают также наличие у данных микроорганизмов ряда свойств, обеспечивающих их эффективность как агентов биоконтроля и стимуляторов роста растений [12–14]. На российском рынке появился ряд микробиологических препаратов, в состав которых входят ризосферные псевдомонады и ризобактерии, представляющие собой PGPR монокультуры, среди них: «Псевдобактерин-2» на основе *Pseudomonas aureofaciens* BS1393, «Елена» — *P. aureofaciens* ИБ 51, «Ризоплан» — *P. fluorescens AP-33* и др. [2, 3, 15]. Тем не менее, применение монокультур PGPR-штаммов в агроценозах редко дает статистически значимый эффект из-за слабой адаптации и неконкурентоспособности инокулятов, которые вытесняются более жизнеспособными, зачастую обладающими фитопатогенными свойствами, бактериями. В то же время показано, что эффективность применения биопрепаратов зависит от способности составляющих их ризосферных бактерий к биопленкообразованию. Формирование бактериями микроколоний на поверхности корневой системы растений способствует их выживанию и позволяет успешно справляться с неблагоприятными факторами окружающей среды, а также патогенами [5, 16, 17]. Кроме того, биопленки регулируют влажность и кислотность почвы, что улучшает питание корней и приводит к формированию здоровой корневой системы. Процессы биопленкообразования способствуют и построению симбиотических взаимоотношений с растениями [18, 19]. В большинстве случаев данные о процессах биопленкообразования получены на моновидах культур при изучении медицинского аспекта этого феномена. При этом важно учитывать, что в ризосфере биопленки представляют собой сложные многовидовые сообщества, и результаты исследований, зафиксированные в лабораториях, необходимо адаптировать для более точного соответствия естественным условиям. В целом, сообщества, представленные мультивидами биопленками, обладают рядом преимуществ, среди которых повышенная резистентность к стрессовым факторам

и антибиотикам, более эффективное использование и распределение ресурсов, а также способность к быстрой адаптации к изменениям окружающей среды [20–23].

Цель исследования — изучение свойств мультивидовых биопленок PGPR-штаммов с антагонистическими свойствами по отношению к ряду других микроорганизмов как элемента конкурентного преимущества и оценка их эффективности для использования в качестве основы для разработки биопрепаратов.

МЕТОДИКА

Объекты и материалы исследования. В работе были использованы ризобактериальные штаммы из коллекции «Симбионт» ИБГ УФИЦ РАН: 49 штаммов *Rhizobium leguminosarum* и 1 штамм *Neorhizobium galegae*. Типовые штаммы *Pseudomonas fluorescens* biovar. I B-6735^T (ATCC 13525), *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* B-9444^T (ATCC 9444), *P. aureofaciens* ИБ51 из коллекции культур Института биологии УФИЦ РАН, 13 штаммов *Pseudomonas* sp. из коллекции «Симбионт» ИБГ УФИЦ РАН, выделенных из ризосферы дикорастущих бобовых растений, прорастающих на территории Южного Урала, а также почв, загрязненных химическими отходами [24]. Для проведения опытов с растениями использовали горох посевной (*Pisum sativum* L.), сорт «Аксацкий усатый 55».

Определение антибактериальной активности. В ходе данного исследования было проанализировано на способность проявлять антагонистический эффект 50 бактериальных изолятов, выделенных из ризосферы бобовых культур: горошка лесного (*Vicia sylvatica* L.) — 1 штамм, горошка заборного (*V. sepium* L.) — 11, чины весенней (*Lathyrus vernus* L. Bernh.) — 14, чины бледноватой (*L. pallescens* (Bieb.) C. Koch) — 1, чины болотной (*L. palustris* L.) — 1, чины лесной (*L. sylvestris* L.) — 3, чины клубненосной (*L. tuberosus* L.) — 2, чины гороховидной (*L. pisiformis* L.) — 3, чины луговой (*L. pratensis* L.) — 2, чины Гмелина (*L. gmelinii* Fritsch) — 3, клевера гибридного (*Trifolium hybridum* L.) — 8, козлятника восточного (*Galega orientalis* Lam.) — 1.

Ризосферные штаммы культивировали на агаризованной питательной среде ТУ следующим образом. Двухсуточную культуру бактерий (3 мл) предварительно инкубировали в шейкере-термостате ES-20 “BioSan” (Латвия) при температуре 28°C и наносили на поверхность агаризованной среды для получения бактериального газона [25]. Посевы подсушивали, а затем наносили 5 мкл жидкой культуры определяемого штамма. Ризобактерии культивировали в жидкой питательной среде YM следующего состава (%): маннит — 1,0, дрожжевой экстракт — 0,04, NaCl — 0,01, MgSO₄ — 0,01 и K₂HPO₄·3H₂O — 0,05), псевдомонады в среде LB (%): бактотриптон — 1,0, дрожжевой экст-

ракт — 0,5, NaCl — 0,5, на шейкере при 28 °С и 180 об./мин до плотности 10⁸–10⁹ КОЕ/мл. Финальную стадию культивирования проводили в термостате при температуре 28 °С в течение 24 ч.

Исследование молекулярно-генетических характеристик бактериальных штаммов и их идентификация. ДНК бактериальных культур выделяли путем лизиса клеток с применением детергента Triton X100 (1 %) и суспензии Chelex 100 (1 %). После центрифугирования полученный супернатант использовали в качестве матрицы для проведения полимеразной цепной реакции, которую осуществляли на приборе Терцик МС2 «ДНК-Технология» (Россия).

Для оценки генетического полиморфизма полученных изолятов применяли метод RAPD-анализа. Использовали праймер случайного типа (AFK) со структурой 5'-ACGGTGGACG-3'.

Для амплификации гена 16S рибосомальной РНК были задействованы универсальные праймеры fD1 (5'-cccggtaccaagcttaaggaggtgaccagcc-3') и rD1 (5'-ccgaattcgctgcacaacagagtttgatcctggctcag-3'), которые фланкируют последовательность целевого гена 16S рРНК длиной 1500 п.н.

Секвенирование нуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью автоматического секвенатора Applied Biosystems 3500 "Applied Biosystems, Inc." (США) и набора для циклического секвенса "BrilliantDye™ Terminator v3.1" "NimaGene" (Нидерланды).

Для проведения анализа нуклеотидных последовательностей использовали пакет программ Lasergene "Dnastar, Inc." (США). Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей был проведен в Международной базе данных нуклеотидных последовательностей — GenBank, базы данных NCBI с помощью ресурса Blast базы данных NCBI (ресурс Blastn); а также с помощью программы Megaline пакета компьютерных программ "Lasergene" "Dnastar, Inc." (США).

Анализ биопленкообразования на инертных поверхностях. Штаммы псевдомонад и ризобий выращивали в жидких питательных средах LB и YM при температуре 28 °С и скорости перемешивания 180 об./мин в течение 24/48 ч до достижения концентрации 10⁸–10⁹ КОЕ/мл. Культуры разводили свежей питательной средой до концентрации 10⁶ КОЕ/мл, вносили по 200 мкл полученной суспензии в 96-луночные полистирольные планшеты Corning Inc. (США) и герметизировали их с помощью пленки Parafilm "Amcor" (США). Выдерживали при температуре 28 °С и скорости перемешивания 140 об./мин в течение 7 сут в шейкере-термостате.

Для оценки показателей плотности биопленки и микроскопирования применялся метод окрашивания генциановым фиолетовым («Агат-Мед»,

Россия) [20]. Микроскопирование проводили с помощью флуоресцентного микроскопа Biozero серии BZ-8100 "Keyence Corporation" (Япония). Оптическую плотность образцов измеряли на планшетном ридере SuperMax-3100 "Shanghai Flash Spectrum Biological Technology Co., Ltd." (China) при длине волны 590 нм. В качестве раствора для солюбилизации применяли 96%-ный раствор этанола в объеме 200 мкл [26].

Инокуляция растений и определение ростостимулирующего эффекта. В каждом варианте опыта использовали по 50 растений. Семена гороха стерилизовали 2 мин в 70%-ном этаноле, 15 мин в 15%-ном растворе гипохлорита натрия. Далее семена выдерживали в суспензии бактерий 10⁵ КОЕ/мл, а затем проращивали на фильтровальной бумаге в чашке Петри, замотанной пленкой Parafilm "Amcor" (США), в термостате при 28 °С. Морфометрические измерения корней и гипокотилей проростков проводили через 7 сут.

Получение чистых культур клубеньковых бактерий. Обработанные суспензией бактерий семена высаживали в стерильный песок и помещали в автоматизированную климатическую камеру роста растений «Спектр-15» (Россия) при освещении 2500 лк в течение 16 ч на 14 сут до появления клубеньков на корнях растений. Для выделения ризобактерий клубеньки стерилизовали 70%-ным этанолом и 10%-ным раствором гипохлорита натрия, промывали стерильной водой. Клубеньковые бактерии изолировали методом пункции ткани клубенька по протоколу, описанному в работе Баймиева с соавт. [27]. Культивировали с последующим рассевом до отдельных колоний на агаризованной питательной среде YM в термостате при температуре 28 °С в течение 48 ч.

Анализ азотфиксирующей активности ризобактерий. Исследование азотфиксирующей активности проводили ацетиленовым методом. После 14 сут проращивания корни растений промывали стерильной водой и помещали во флаконы на 15 мл (по одному растению в емкость), добавляя 10%-ный ацетилен. Флаконы инкубировали в темноте 1 ч, после чего анализировали содержание ацетилена и этилена на газовом хроматографе модели GC-2014 "Shimadzu" (Япония), оснащенном пламенным ионизационным детектором. Количество ацетилена и этилена определяли по калибровочной кривой. Величину азотфиксирующей активности рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{C_э}{3},$$

где C_э — концентрация этилена в исследуемом образце, 3 — коэффициент пересчета от редукции ацетилена к азотфиксации. Определение повторяли 3 раза.

Статистический анализ. Полученные результаты были обработаны общепринятыми методами математической статистики. Статистически значимыми принимали различия при $p \leq 0,05$.

Однофакторный дисперсионный анализ проводили в программе Microsoft Excel 2010 пакета Microsoft Office с надстройкой Xrealstats (<https://www.real-statistics.com/>). Для апостериорного анализа применяли метод множественного сравнения Тьюки (Tukey HSD test). Нормальность распределения была подтверждена по критерию Шапиро-Уилка. Для проверки равенства дисперсий в нескольких выборках применялся тест Ливена. Результаты эффективности бобово-ризобиального симбиоза представлены как среднее значение и его стандартное отклонение ($M \pm \sigma$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ризосфера представляет собой своеобразную арену сложной системы взаимоотношений между микроорганизмами в борьбе за место обитания и пищевые ресурсы, где антагонизм является одним

из ключевых механизмов поддержания баланса микробного сообщества и защиты растения-хозяина. При этом антагонистические взаимодействия проявляются не только между филогенетически удаленными друг от друга таксонами, но и близкородственными микроорганизмами, причем родственные ризосферные бактерии могут подавлять рост друг друга путем синтеза антимикробных веществ [25].

В результате скрининга были отобраны 4 изолята: LPa 5 (из ризосферы *L. palustris*), LSy14M (из ризосферы чины лесной *L. sylvestris* L.), а также 1С и LPi14 (из ризосферы чины гороховидной *L. pisiformis* L.). Мониторинг показал их способность к значительному ингибированию роста ризосферных бактерий в течение 48 ч. Так, в случае совместного культивирования изолята 1С с *R. leguminosarum* bv. *viciae* VSy9, в первые 24 ч наблюдался наибольший антагонистический эффект, который длился в течение 48 ч (рис. 1). Полученные результаты свидетельствовали о том, что исследуемые штаммы обладали выраженными антагонистическими свойствами по отношению к другим представителям ризосферной микрофлоры.

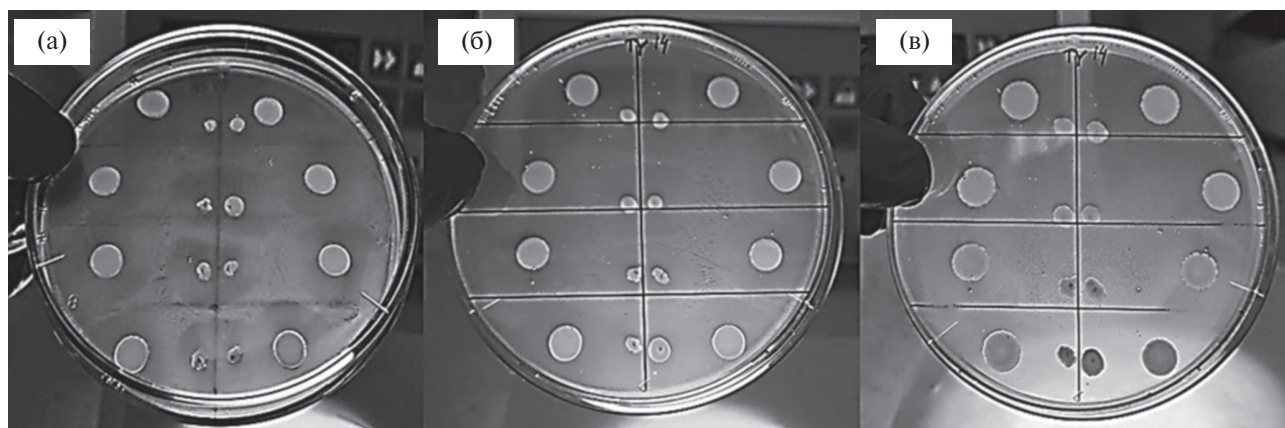


Рис. 1. Подавление бактерий *R. leguminosarum* bv. *viciae* VSy9 штаммом *Pseudomonas* sp. 1С после совместного культивирования в течение 24 (а), 48 (б) и 72 (в) ч

Fig. 1. Inhibition of *R. leguminosarum* bv. *viciae* VSy9 by *Pseudomonas* sp. 1C after co-cultivation for 24 h (a), 48 h (b), and 72 h (c).

На основе сравнительного анализа полученных нуклеотидных последовательностей фрагментов гена 16S с аналогичными структурами, представленными в базе данных GenBank, было установлено, что процент идентичности изолятов LPa 5 и LSy14M по отношению к типовому штамму *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525^T составил 99,7% и 99,5% соответственно. Изолят из ризосферы чины гороховидной оказался бинарным. В результате четырехкратного пересева были получены две культуры: LPi14, имевшая гомологию нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК с типовым штаммом *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841 99,5%, и 1С, имевшая 98,2% гомологии

с типовым штаммом *Pseudomonas protegens* CHA0^T. Антагонистическую активность в бинарном изоляте проявлял только штамм *Pseudomonas* sp. 1С, тогда как *Rhizobium* sp. LPi14 такого эффекта не показал.

Все изолированные штаммы были протестированы на антагонистическую активность в отношении различных бактериальных культур (табл. 1), а именно 5 штаммов, относящихся к виду *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *Sinorhizobium meliloti* и 4 вида бактерий рода *Pseudomonas*. В качестве контрольной была использована культура *R. leguminosarum* bv. *viciae* VSy1. На примере последнего было выявлено отсутствие конкурент-

ного взаимодействия между представителями экспериментальной группы *R. leguminosarum* bv. *viciae*, что указывало на отсутствие конкуренции внутри данного вида. Кроме того, полученные результаты исследования свидетельствовали о том, что исследуемые штаммы псевдомонад де-

монстрировали выраженное ингибирующее действие на рост бактериального газона, представленного культурами *R. leguminosarum* bv. *viciae* и *S. meliloti* Mlu10, но, в то же время, не оказывали конкурентного давления на близкородственные штаммы.

Таблица 1. Объекты-мишени антагонистического влияния исследуемых штаммов*

Table 1. Target organisms affected by the antagonistic activity of the investigated strains*

Штамм-мишень	Исследуемый объект			Контроль <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> VSy1
	<i>Pseudomonas</i> sp. LPa 5	<i>Pseudomonas</i> sp. LSy14M	<i>Pseudomonas</i> sp. 1C + <i>Rhizobium</i> sp. LPi14	
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> VSy9	+	+	+	–
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> VC7	+	+	+	–
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> LSy4	+	+	+	–
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> LVe 8.8	+	+	+	–
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> LSy9	+	+	+	–
<i>S. meliloti</i> Mlu10	+	+	+	–
<i>P. fluorescens</i> bv. I B-6735 ^T	–	–	–	–
<i>Pseudomonas</i> sp. 38 Fos	–	–	–	–
<i>P. chlororaphis</i> subsp. <i>chlororaphis</i> B-9444 ^T	–	–	–	–
<i>Pseudomonas</i> sp. STA3	–	–	–	–

* «+» — антагонистическая активность, «-» — отсутствие ингибирующего воздействия.

* «+» - antagonistic activity; «-» - no inhibitory effect.

Выбор ризобияльных штаммов *R. leguminosarum* Pvu5; *R. leguminosarum* VSy12; *R. leguminosarum* LSy10; *R. leguminosarum* TPr3; *R. leguminosarum* TPr4; *R. leguminosarum* THy1; *R. leguminosarum* Thy2; *N. galegae* 0702, а также *P. aureofaciens* ИБ51 «Елена» с PGPR-свойствами для дальнейших исследований был обусловлен тем, что ранее [28] был доказан ростостимулирующий эффект, оказываемый этими штаммами на семена как бобовых, так и небобовых растений. В работе Вершинина и соавт., 2019, показано, что эти культуры синтезируют ауксины, которые определяли их ростостимулирующий эффект [28], поэтому штаммы были отобраны для исследования ростостимулирующих эффектов при совместном культивировании нескольких штаммов, а именно, в мультивидовых биопленках.

Были исследованы антагонистические взаимодействия ризобияльных штаммов, обладающих ростостимулирующим эффектом по отношению к родственному штамму *R. leguminosarum* bv. *viciae* VSy9. Показано, что штамм *Neorhizobium galegae* 0702 ингибировал рост культуры *R. leguminosarum* bv. *viciae* VSy9, в то время как штаммы *R. leguminosarum* VSy12 и *R. leguminosarum* LSy10 показали низкую степень колонизации бактериального газона. При этом было выявлено, что при совместном культивировании исследуемых ризобияльных штаммов и штаммов *Pseudomonas* sp. 1C и *Rhizobium* sp. LPi14 во всех случаях наблюдалось подавление бактериального газона, представленного штаммом *R. leguminosarum* bv. *viciae* VSy9, что обусловлено ингибирующим действием *Pseudomonas* sp. 1C (рис. 2).

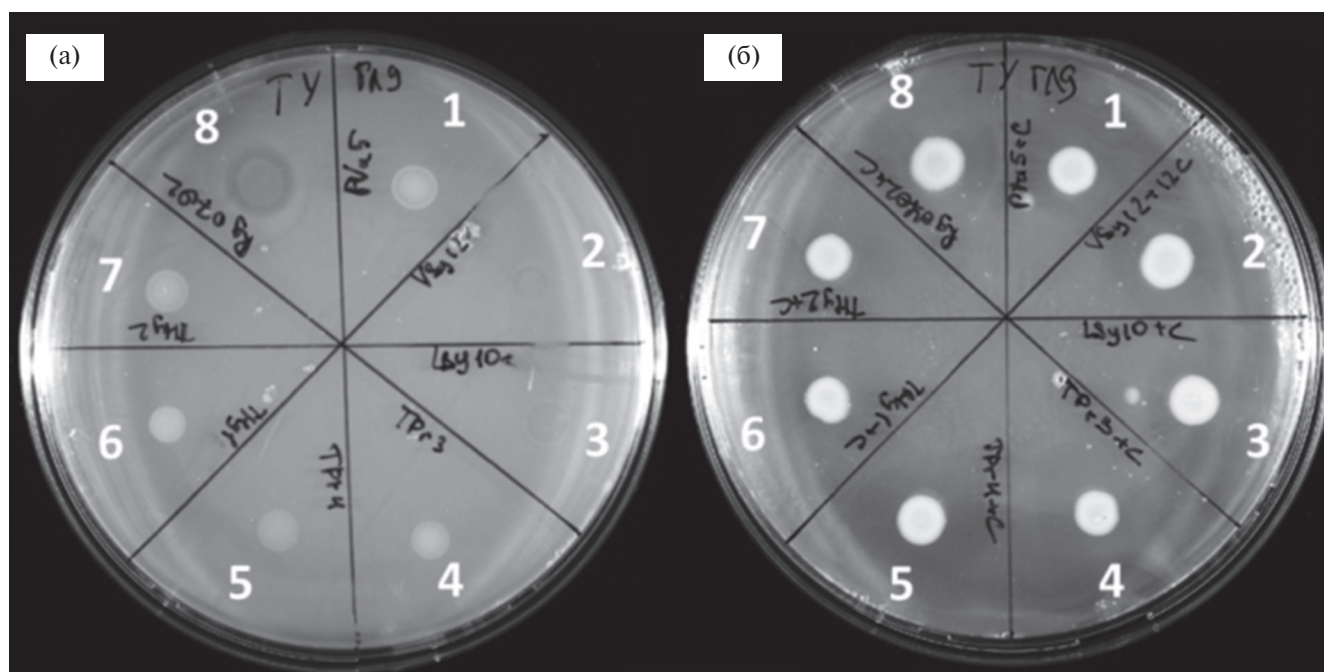


Рис. 2. Антагонистическая активность по отношению к штамму *R. leguminosarum* bv. *viciae* VSy9:

(a) – 1 - *R. leguminosarum* Pvu5; 2 - *R. leguminosarum* VSy12; 3 - *R. leguminosarum* LSy10; 4 - *R. leguminosarum* TPr3; 5 - *R. leguminosarum* TPr4; 6 - *R. leguminosarum* THy1; 7 - *R. leguminosarum* Thy2; 8 - *N. galegae* 0702; (б) – 1 - *R. leguminosarum* Pvu5; 2 - *R. leguminosarum* VSy12; 3 - *R. leguminosarum* LSy10; 4 - *R. leguminosarum* TPr3; 5 - *R. leguminosarum* TPr4; 6 - *R. leguminosarum* THy1; 7 - *R. leguminosarum* Thy2; 8 - *N. galegae* 0702, культивируемых совместно с *Pseudomonas* sp. 1C и *Rhizobium* sp. LPi14

Fig. 2. Antagonistic activity against *R. leguminosarum* bv. *viciae* VSy9 (a, b): 1 – *R. leguminosarum* Pvu5; 2 – *R. leguminosarum* VSy12; 3 – *R. leguminosarum* LSy10; 4 – *R. leguminosarum* TPr3; 5 – *R. leguminosarum* TPr4; 6 – *R. leguminosarum* THy1; 7 – *R. leguminosarum* Thy2; 8 – *N. galegae* 0702, co-cultivated with *Pseudomonas* sp. 1C and *Rhizobium* sp. LPi14

Колонизация корней растений требует наличия у бактерий адаптационных характеристик, повышающих их шансы на выживание в конкурентной среде. В частности, важным фактором, влияющим на выживаемость бактерий, является их способность формировать биопленки [20]. Более того, в естественных условиях мультивидовые биопленки представляют собой преобладающую форму организации микробных сообществ, и при их изучении основное внимание следует уделять не индивидуальным характеристикам биопленочного фенотипа отдельных популяций микроорганизмов, а результатам их взаимодействия друг с другом [21]. Для исключения негативного влияния штамма *Pseudomonas* sp. 1C на рост других микроорганизмов в составе мультивидовой биопленки было изучено 8 анализируемых ризобийных штаммов и 6 штаммов псевдомонад: *Pseudomonas* sp. 1 НМ; *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *chlororaphis* В-9444; *Pseudomonas* sp. 17 НМ; *Pseudomonas aureofaciens* ИБ51; *Pseudomonas* sp. ОВА 2.4.1, которые также обладали PGPR-свойствами [24, 29, 30]. Основное внимание уделялось изучению ингибирующего эффекта штамма *Pseudomonas* sp. 1C на эти ростостимулирующие микроорганизмы. Обнаружен антагонистический

эффект штамма *Pseudomonas* sp. 1C в отношении ризобийных штаммов *R. leguminosarum* LSy10 (рис. 3а) и *R. leguminosarum* VSy12 (рис. 3б). При этом в отношении родственных и других ризобийных штаммов конкурентное давление не было отмечено.

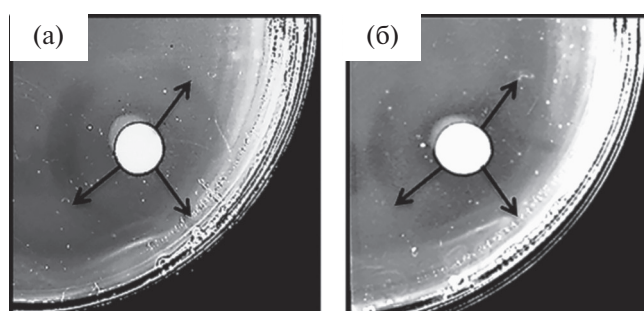


Рис. 3. Антагонистический эффект штамма *Pseudomonas* sp. 1C по отношению к *R. leguminosarum* LSy10 (а), (*R. leguminosarum* VSy12 (б)). Стрелками показан радиус зоны ингибирования

Fig. 3. Antagonistic effect of *Pseudomonas* sp. 1C against *R. leguminosarum* LSy10 (a) and *R. leguminosarum* VSy12 (b). Arrows indicate the radius of the inhibition zone

Микроскопические исследования биопленок монокультур *Rhizobium* sp. LPi14 и *Pseudomonas* sp. 1C, бинарной культуры *Rhizobium* sp. LPi14 и *Pseudomonas* sp. 1C (рис. 4.), а также мультивидовых биопленок, образуемых штаммами, обладающими PGPR свойствами, на 96-луночных полистироловых планшетах в течение 7 сут показали, что все исследуемые культуры способны к образованию биопленок. При микроскопическом анализе клеточных конгломератов выявлена их характерная трехмерная организация

и наличие четко выраженных слоев. Выявлены два типа организации клеточных конгломератов: либо компактное равномерное распределение клеток с высокой плотностью, либо сетчатые структуры с четко очерченными полостями. Так была установлена способность всех исследованных культур к образованию микроколоний на абиотических поверхностях, что является ключевым фактором успешной колонизации ризосферы и способствует повышению резистентности микробного сообщества.

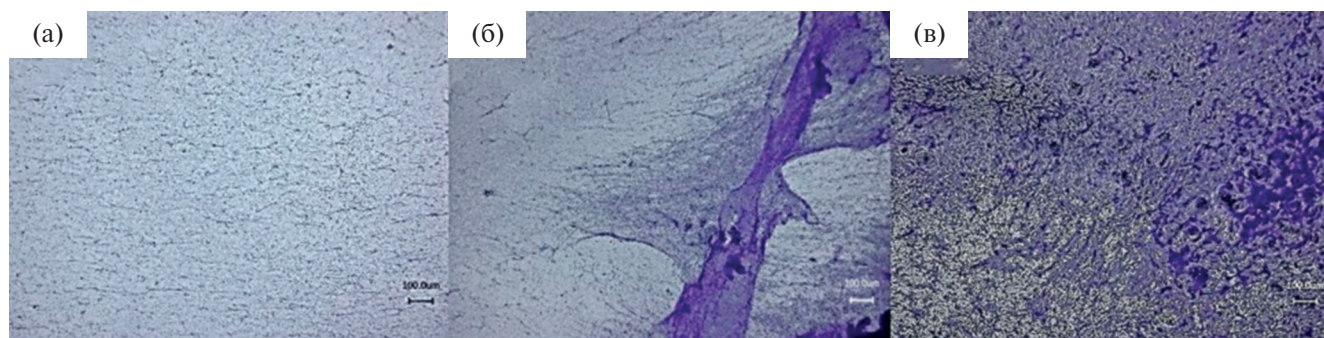


Рис. 4. Биопленка, образованная штаммами: *Rhizobium* sp. LPi14 (а); *Pseudomonas* sp. 1C (б); *Rhizobium* sp. LPi14 и *Pseudomonas* sp. 1C (в)

Fig. 4. Biofilm formed by the strains: *Rhizobium* sp. LPi14 (a); *Pseudomonas* sp. 1C (b); *Rhizobium* sp. LPi14 and *Pseudomonas* sp. 1C (c)

Важно отметить, что при мультивидовом культивировании наблюдалось формирование более сложных трехмерных архитектур биопленок, причем каждая ассоциация демонстрировала уникальные структурные особенности, отличные от предшествующих вариантов.

Было определено, что совместное культивирование штаммов *Pseudomonas* sp. 1C и *Rhizobium* sp. LPi14 с исследуемыми штаммами *R. leguminosarum* приводило к увеличению биомассы мультивидовой биопленки по сравнению с монокультурой (рис. 5). При образовании зрелых биопленок, состоящих из штаммов псевдомонад, корреляции между толщиной и совместным культивированием трех штаммов не выявлено. Это может быть обусловлено достижением критической массы биопленки и высокими показателями скорости роста и размножения штаммов. Тем не менее, при анализе значений относительной биомассы биопленок штамма *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* B-9444 было отмечено увеличение показателя связывания кристаллического фиолетового более чем в 12 раз по сравнению с исходным штаммом. Природа взаимодействий между микроорганизмами в мультивидовых биопленках определяет уникальные характеристики всего сообщества, формируя особые типы связей, которые не встречаются в менее сложных биологических системах [21]. Синергические эффекты совместного культивирования могут быть обусловлены совместным синтезом экзополисахаридного матрикса и сигнальных молекул, а также оптимизацией использования питательных веществ и путей их обмена.

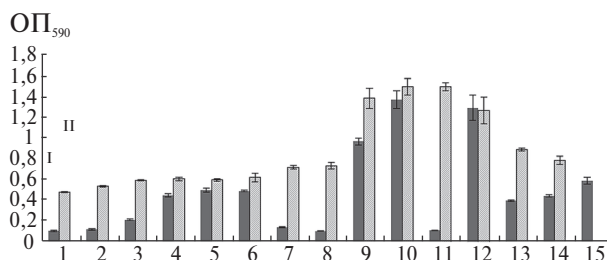


Рис. 5. Биомасса биопленок (OD_{590}) штаммов: 1 - *R. leguminosarum* Pvu5; 2 - *R. leguminosarum* VSy12; 3 - *R. leguminosarum* LSy10; 4 - *R. leguminosarum* TPr3; 5 - *R. leguminosarum* TPr4; 6 - *R. leguminosarum* THy1; 7 - *R. leguminosarum* Thy2; 8 - *R. leguminosarum* VSy9; 9 - *N. galegae* 0702; 10 - *Pseudomonas* sp. 1 HM; 11 - *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* B-9444; 12 - *Pseudomonas* sp. 17 HM; 13 - *Pseudomonas* sp. OBA 2.4.1; 14 - *P. aureofaciens* ИБ51; 15 - *Pseudomonas* sp. 1C и *Rhizobium* sp. LPi14.

монокультура;
мультивидовая биопленка (культивирование со штаммами *Pseudomonas* sp. 1C и *Rhizobium* sp. LPi14)

Fig. 5. Biofilm biomass (OD_{590}) of the strains: 1 - *R. leguminosarum* Pvu5; 2 - *R. leguminosarum* VSy12; 3 - *R. leguminosarum* LSy10; 4 - *R. leguminosarum* TPr3; 5 - *R. leguminosarum* TPr4; 6 - *R. leguminosarum* THy1; 7 - *R. leguminosarum* Thy2; 8 - *R. leguminosarum* VSy9; 9 - *N. galegae* 0702; 10 - *Pseudomonas* sp. 1 HM; 11 - *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* B-9444; 12 - *Pseudomonas* sp. 17 HM; 13 - *Pseudomonas* sp. OBA 2.4.1; 14 - *P. aureofaciens* ИБ51; 15 - *Pseudomonas* sp. 1C and *Rhizobium* sp. LPi14.
monoculture;
multispecies biofilm (co-cultivation with *Pseudomonas* sp. 1C and *Rhizobium* sp. LPi14)

Для оценки ростостимулирующего эффекта нами была проведена обработка семян гороха посевного (сорт «Аксацкий усатый 55») штаммами PGPR-бактерий. Установлено, что штаммы *Pseudomonas* sp. 1C и *Rhizobium* sp. LPi14 оказывали сопоставимый ростостимулирующий эффект. При этом показатели в случае их совместного использования отличались незначительно. Анализ результатов показал преимущественно положительное влияние исследуемых штаммов на рост проростков гороха, особенно в составе мультивидовых биопленок (рис. 6). Снижение ростостимулирующего эффекта было отмечено в мультивидовых биопленках, представленных *R. leguminosarum* LSy10+ *Pseudomonas* sp. 1C и *Rhizobium* sp. LPi14 и *R. leguminosarum* VS12+ *Pseudomonas* sp. 1C и *Rhizobium* sp. LPi14, что может быть обусловлено зафиксированным нами ранее антагонистическим эффектом штамма *Pseudomonas* sp. 1C в отношении данных культур. Кроме того, было выявлено негативное влияние штамма *N. galegae* 0702 как в монокультуре, так и в мультивидовой биопленке. Важно отметить, что горох посевной не является растением-хозяином для представителей *N. galegae*, которые вступают в симбиотические отношения с культурами козлятника восточного. Тем не менее, его выбор в качестве опытной культуры был обусловлен желанием оценить влияние мультивидовой суспензии, в состав которой входили бы родственные к роду *Rhizobium* бактерии, ввиду того, что была зафиксирована антагонистическая активность штамма *N. galegae* 0702 в отношении ризобияльного штамма *R. leguminosarum* VSy9 (растение-хозяин горошек лесной). В мультивидовой биопленке штамм *N. galegae* 0702 ингибировал ростостимулирующий эффект *Pseudomonas* sp. 1C и *Rhizobium* sp. LPi14. Механизм антагонистического действия может быть связан с конкурентной борьбой за питательные вещества и, как следствие, синтезом токсических метаболитов, подавляющих рост и развитие как не принадлежащих к роду Галега (*Galega*) бобовых растений, так и близкородственных микроорганизмов. Следовательно, полученные данные указывают на необходимость подбора культур в составе мультивидовых биопленочных удобрений.

При отборе ризобияльных штаммов для использования в качестве биологического удобрения первостепенное значение уделяется оценке их азотфиксирующей способности, которая включает анализ количества клубеньков, образуемых на корнях растений, а также определению азотфиксирующей активности штаммов. При этом, несмотря на то, что бобово-ризобияльный симбиоз является высокоспецифичным и каждый вид бобовых растений способен нодулироваться лишь ограниченным кругом ризобактерий, наличие клубеньков на корнях не гарантирует, что происходит активная фиксация атмосферного азота. В некоторых случаях клубеньковые бактерии вместо фиксации

атмосферного азота начинают паразитировать на сельскохозяйственных культурах, используя их азотные соединения для своего собственного развития [10, 31, 32].

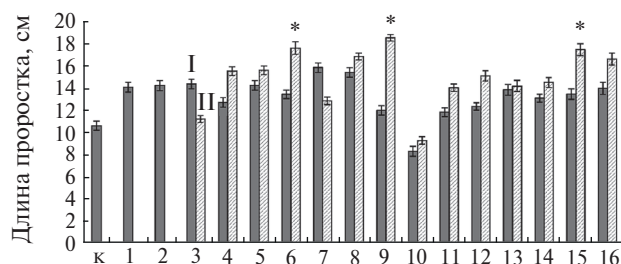


Рис. 6. Средняя длина проростков растений гороха посевного (см), инокулированных штаммами: К – контрольные растения; 1 – *Rhizobium* sp. LPi14; 2 – *Pseudomonas* sp. 1C и *Rhizobium* sp. LPi14; 3 – *R. leguminosarum* VSy12; 4 – *R. leguminosarum* TPr3; 5 – *R. leguminosarum* Pvu5; 6 – *R. leguminosarum* TPr4; 7 – *R. leguminosarum* LSy10; 8 – *R. leguminosarum* Thy2; 9 – *R. leguminosarum* THy1; 10 – *N. galegae* 0702; 11 – *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* B-9444; 12 – *Pseudomonas fluorescens* biovar I B-6735; 13 – *P. aureofaciens* ИБ51; 14 – *P. sp.* 1 НМ; 15 – *P. sp.* 17 НМ; 16 – *P. sp.* ОВА 2.4.1.

* Обозначены статистически значимые показатели, которые превышали значения в контроле на 20% ($p \leq 0,05$).

монокультура;

мультивидовая биопленка (культивирование со штаммами *Pseudomonas* sp. 1C и *Rhizobium* sp. LPi14)

Fig. 6. Average length (cm) of pea (*Pisum sativum*) seedling shoots inoculated with the strains: K - control plants; 1 – *Rhizobium* sp. LPi14; 2 – *Pseudomonas* sp. 1C and *Rhizobium* sp. LPi14; 3 – *R. leguminosarum* VSy12; 4 – *R. leguminosarum* TPr3; 5 – *R. leguminosarum* Pvu5; 6 – *R. leguminosarum* TPr4; 7 – *R. leguminosarum* LSy10; 8 – *R. leguminosarum* Thy2; 9 – *R. leguminosarum* THy1; 10 – *N. galegae* 0702; 11 – *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* B-9444; 12 – *Pseudomonas fluorescens* biovar I B-6735; 13 – *P. aureofaciens* ИБ51; 14 – *P. sp.* 1 НМ; 15 – *P. sp.* 17 НМ; 16 – *P. sp.* ОВА 2.4.1. monoculture;

multispecies biofilm (co-cultivation with *Pseudomonas* sp. 1C and *Rhizobium* sp. LPi14). *Statistically significant values exceeding the control by 20% ($p \leq 0.05$) are marked

В рамках проведения экспериментальной оценки эффективности биоудобрений на основе штамма *Rhizobium* sp. LPi14, была проведена предпосевная обработка семян гороха посевного (*Pisum sativum* L.). Опытные и контрольные растения выращивали в течение трех недель в стерильном речном песке. Был проведен RAPD-анализ ДНК бактерий, инокулированных из клубеньков растений гороха, обработанных штаммами *Rhizobium* sp. LPi14, а также бинарной суспензией бактерий *Pseudomonas* sp. 1C и *Rhizobium* sp. LPi14 с использованием праймеров случайного типа 5'-ACGGTGGACG-3'(AFK). По-

казана идентичность их RAPD-профилей (рис. 7). Продемонстрирована способность штамма *Rhizobium* sp. LPi14 нодулировать опытные бобовые растения. Кроме того, было проведено секвенирование нуклеотидных последовательностей фрагментов генов *16S* рРНК. Во всех случаях нами был идентифицирован идентичный *Rhizobium* sp. LPi14 штамм.

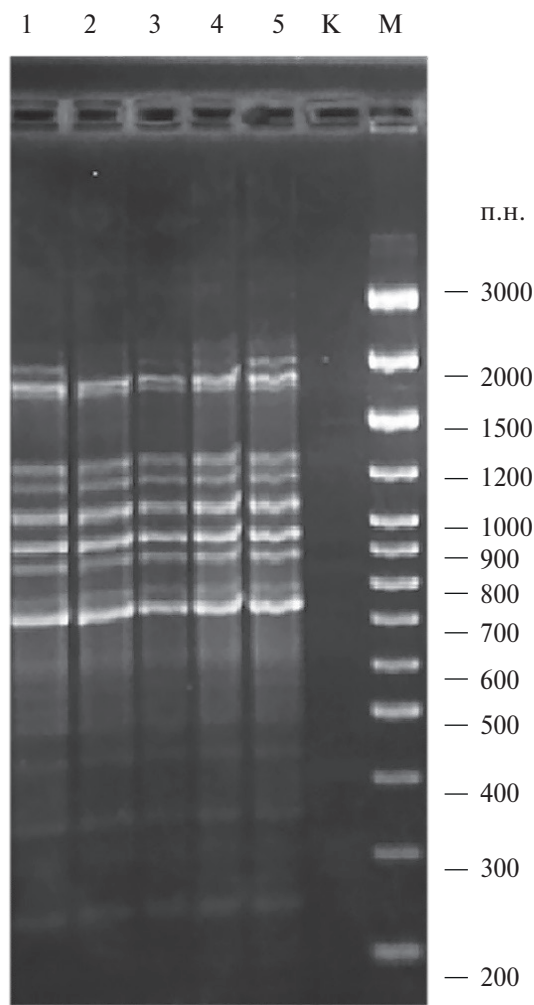


Рис. 7. Электрофореграмма RAPD-анализа клубеньковых бактерий: 1 – *Rhizobium* sp. LPi14; 2, 3 – ризобактерии, изолированные из клубеньков растений гороха, обработанные штаммами *Pseudomonas* sp. 1C и *Rhizobium* sp. LPi14; 4, 5 – ризобактерии, изолированные из клубеньков растений гороха, обработанных штаммом *Rhizobium* sp. LPi14; К – отрицательный контроль; М – ДНК-маркер

Fig. 7. RAPD analysis electropherogram of nodule bacteria: 1 – *Rhizobium* sp. LPi14; 2, 3 – rhizobacteria isolated from pea root nodules treated with *Pseudomonas* sp. 1C and *Rhizobium* sp. LPi14; 4, 5 – rhizobacteria isolated from pea root nodules treated with *Rhizobium* sp. LPi14; K – negative control; M – DNA marker

В рамках исследования эффективности применения мультивидовых биопленочных консорциумов

PGPR-штаммов, проявивших ростостимулирующую активность в отношении проростков посевного гороха и обладающих антибактериальной активностью в качестве компонента биопрепаратов, был проведен комплексный анализ эффективности бобово-ризобияльного симбиоза. Так, была определена высота стебля и высушенная биомасса опытных растений, а также подсчитано количество клубеньков гороха посевного и проанализирована эффективность процессов азотфиксации.

Выявлено, что обработка посевного гороха консорциумом ризобактерий с ростостимулирующими свойствами приводила к статистически значимому увеличению роста стебля и биомассы растений. Согласно данным, представленным в табл. 2, выявлена способность всех штаммов клубеньковых бактерий в составе мультивидовых биопленок к азотфиксации и обеспечению растений азотным питанием. Эффективность подтверждена показателями сухой биомассы и объемами фиксированного атмосферного азота. Максимальные показатели эффективности бобово-ризобияльного симбиоза были зафиксированы в случае обработки гороха суспензией трех культур: *R. leguminosarum* TPr4, *Pseudomonas* sp. 1C и *Rhizobium* sp. LPi14. Экспериментальные исследования подтвердили эффективность применения и бинарного удобрения, содержащего штаммы *Pseudomonas* sp. 1C и *Rhizobium* sp. LPi14. На примере гороха посевного продемонстрировано, что использование бинарного удобрения, основанного на штаммах *Pseudomonas* sp. 1C и *Rhizobium* sp. LPi14, обеспечивает существенное улучшение ростовых параметров растений, а также приводит к образованию эффективного бобово-ризобияльного симбиоза. Дополнительно установлено, что включение культур в мультивидовые биопленочные консорциумы, содержащие штаммы *R. leguminosarum* TPr4, *R. leguminosarum* THy1 и *Pseudomonas* sp. 17 НМ, значительно усиливает их PGPR-свойства и не влияет на антагонистический эффект.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Следовательно, применение мультивидовых биопленочных сообществ, обладающих PGPR-активностью и антибактериальным потенциалом, имеет ряд преимуществ, среди которых: успешная колонизации ризосферы, защита от фитопатогенов, повышение продуктивности растений и установление более эффективных симбиотических отношений. При этом биопленочная организация микроорганизмов обеспечивает их пространственно-метаболическую кооперацию, что, в свою очередь, позволяет успешно занять свою экологическую нишу в ризосфере и минимизирует потери функциональной активности при внесении в почву.

Таблица 2. Эффективность бобово-ризобийного комплекса***Table 2.** Efficiency of the legume-rhizobia complex*

Вариант	Высота стебля, см	Зеленая масса, г/растение	Количество клубеньков, шт./растение	Фиксированный азот, мкг/растение
Контроль	30,6 ± 3,2 a	0,9 ± 0,03 a	-	-
<i>R. leguminosarum</i> TPr4 + <i>P. sp.</i> 1C и <i>R. sp.</i> LPi14	38,6 ± 3,4 b	1,2 ± 0,03 b	38 ± 8 b	45,3 ± 2,4 ab
<i>R. leguminosarum</i> THy1+ <i>P. sp.</i> 1C и <i>R. sp.</i> LPi14	38,6 ± 3,1 a	1,3 ± 0,04 b	28 ± 6,8 ab	31,6 ± 3,2 b
<i>P. sp.</i> 17 HM + <i>P. sp.</i> 1C и <i>R. sp.</i> LPi14	38,9 ± 4 a	1,1 ± 0,02 ab	28 ± 4,6 ab	29,5 ± 1,1 b
<i>P. sp.</i> 1C и <i>R. sp.</i> LPi14	34,7 ± 2,4 b	1 ± 0,02 a	27 ± 7 a	28,6 ± 1,1 a

* Результаты статистического анализа показателей приведены с использованием метода компактных букв для обозначения статистически значимых различий между группами ($p < 0.05$).

* The statistical analysis results are shown via the compact letter display, highlighting groups with statistically significant differences ($p < 0.05$).

Таким образом, селекция ризосферных штаммов, характеризующихся конкурентоспособностью и симбиотической активностью, а также формирующих мультивидовые биопленки, представляет собой актуальную научно-практи-

ческую задачу, решение которой повысит эффективность биопрепаратов и будет способствовать повышению урожайности сельскохозяйственных культур в условиях современных агроэкологических вызовов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kong Z., Liu H. Modification of rhizosphere microbial communities: A possible mechanism of plant growth promoting rhizobacteria enhancing plant growth and fitness. *Front. Plant Sci.* 2022. V. 13. Pp. 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.920813>
- Лыскова И.В., Широких И.Г., Назарова Я.И. и др. Эффективность применения лабораторных образцов на основе бактерий рода *Streptomyces* на горохе в условиях Волго-Вятского региона. *Аграрная наука Евро-Северо-Востока.* 2024. Т. 25. №. 4. С. 634–644. <https://doi.org/10.30766/2072-9081.2024.25.4.634-644>
- Шарапова И.Э., Бессолицына Е.А., Красильникова Е.В. и др. Влияние качества посадочного материала и инокуляции биопрепаратом на продуктивность картофеля при выращивании в условиях республики Коми. *Journal of Agriculture and Environment.* 2024. V. 52. № 12. Pp. 1–6. <https://doi.org/10.60797/JAE.2024.52.13>
- Leontidou K., Genitsaris S., Papadopoulou A. et al. Plant growth promoting rhizobacteria isolated from halophytes and drought-tolerant plants: genomic characterisation and exploration of phyto-beneficial traits. *Sci. Rep.* 2020. V. 10. № 1. Pp. 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71652-0>
- Ansari F.A., Jabeen M., Ahmad I. *Pseudomonas azotoformans* FAP5, a novel biofilm-forming PGPR strain, alleviates drought stress in wheat plant. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 2021. V. 18. №. 12. Pp. 3855–3870. <https://doi.org/10.1007/s13762-020-03045-9>
- Khoshru B., Fallah Nosratabad A., Mahjenabadi V.A.J., Knežević M., Hinojosa A.C. et al. Multidimensional role of *Pseudomonas*: from biofertilizers to bioremediation and soil ecology to sustainable agriculture. *J. Plant Nutr.* 2025. V. 48. № 6. Pp. 1016–1042. <https://doi.org/10.1080/01904167.2024.2416078>
- Коршунова Т.Ю., Бакаева М.Д., Кузина Е.В. и др. Роль бактерий рода *Pseudomonas* в устойчивом развитии агросистем и защите окружающей среды. *Прикл. биохимия и микробиология.* 2021. Т. 57. № 3. С. 211–227. <https://doi.org/10.31857/s0555109921030089>
- Хакимова Л.Р., Лавина А.М., Вершинина З.Р., Баймиев А.Х. Влияние конститутивной экспрессии гена *garp1* на образование бактериальных биопленок и ростостимулирующую активность ризобий // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2017. Т. 53. № 4. С. 400–405. <https://doi.org/10.1134/s0026365619010105>

9. Asante M., Ahiabor B.D.K., Atakora W.K. Growth, nodulation, and yield responses of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) as influenced by combined application of rhizobium inoculant and phosphorus in the Guinea Savanna zone of Ghana. *Int. J. Agron.* 2020. V. 2020. № 1. Pp. 1–16. <https://doi.org/10.1155/2020/8691757>
10. Palai J.B., Malik G.C., Maitra S., Banerjee M. Role of rhizobium on growth and development of groundnut: a review. *Int. J. Agricul., Environ. Biotechnol.* 2021. V. 14. № 1. Pp. 63–73. <https://doi.org/10.30954/0974-1712.01.2021.7>
11. Purwaningsih S., Agustiyani D., Antonius S. Diversity, activity, and effectiveness of Rhizobium bacteria as plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) isolated from Dieng, central Java. *Iran. J. Microbiol.* 2021. V. 13. № 1. Pp. 130–136. <https://doi.org/10.18502/ijm.v13i1.5504>
12. Bhattacharyya C., Roy R., Tribedi P., Ghosh A. Biofertilizers as substitute to commercial agrochemicals. *Agrochemicals detection, Treatment and Remediation.* / Ed. M. N. V. Prasad Oxf.: B.-H., 2020. P. 290. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-103017-2.00011-8>
13. Ueda A., Saneoka H. Characterization of the ability to form biofilms by plant-associated *Pseudomonas* species. *Curr. Microbiol.* 2015. V. 70. Pp. 506–513. <https://doi.org/10.1007/s00284-014-0749-7>
14. Lahlali R., Ezrari S., Radouane N. et al. Biological control of plant pathogens: a global perspective. *Microorganisms.* 2022. V. 10. № 3. Pp. 1–33. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030596>
15. Григориади А.С., Зобкова Н.В., Сотникова Ю.М. и др. Реакция микробного сообщества ризосферы растений-фиторемедиантов на нефтяное загрязнение и применение биопрепаратов. *Известия вузов. Прикл. химия и биотехнология.* 2023. Т. 13. № 4 (47). С. 523–531. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2523-13-4-523-531>
16. Ajjiah N., Fiodor A., Pandey A.K. et al. Plant growth-promoting bacteria (PGPB) with biofilm-forming ability: a multifaceted agent for sustainable agriculture. *Diversity.* 2023. V. 15. № 1. Pp. 1–21. <https://doi.org/10.3390/d15010112>
17. Li Y., Narayanan M., Shi X. et al. Biofilms formation in plant growth-promoting bacteria for alleviating agro-environmental stress. *Sci. Total Environ.* 2024. V. 907. Pp. 167774. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.167774>
18. Sarkar A., Bhattacharjee S. Biofilm-mediated bioremediation of xenobiotics and heavy metals: a comprehensive review of microbial ecology, molecular mechanisms, and emerging biotechnological applications. *3 Biotech.* 2025. V. 15. № 4. Pp. 1–30. <https://doi.org/10.1007/s13205-025-04252-2>
19. Nadar S., Khan T. Chapter Role of Microbial Biofilms in Bioremediation. *Microbes Based Approaches for the Management of Hazardous Contaminants.* Eds. A. Kumar, L. Shukla, J. Singh, L.F.R. Ferreira. Wiley. 2024, pp. 257–276. <https://doi.org/10.1002/9781119851158.ch17>
20. Вершинина З.Р., Чубукова О.В., Никоноров Ю.М. и др. Влияние сверхэкспрессии гена *RosR* на образование биопленок бактериями *Rhizobium leguminosarum*. *Микробиология.* 2021. Т. 90. № 2. С. 191–203. <https://doi.org/10.31857/s0026365621020154>
21. Nozhevnikova A.N., Botchkova E.A., Plakunov V.K. Multi-species biofilms in ecology, medicine, and biotechnology. *Microbiology.* 2015. V. 84. Pp. 731–750. <https://doi.org/10.1134/s0026261715060107>
22. Schulze A., Mitterer F., Pombo J. P., Schild S. Biofilms by bacterial human pathogens: Clinical relevance – development, composition and regulation – therapeutical strategies. *Microbial Cell.* 2021. V. 8. № 2. Pp. 28–56. <https://doi.org/10.15698/mic2021.02.741>
23. Ульянов В.Ю., Определенцева С.В., Швиденко И.Г. и др. Биологическая кинетика биопленок клинических штаммов *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных у больных с бронхолегочными осложнениями при травматической болезни спинного мозга. *Клин. лаб. диагностика.* 2014. Т. 59. № 8. С. 43–47.
24. Чубукова О.В., Хакимова Л.Р., Акимова Е.С., Вершинина З.Р. Филогения и свойства новых штаммов *Pseudomonas* sp. из ризосферы бобовых растений Южного Урала. *Микробиология.* 2022. Т. 91. № 5. С. 537–546. <https://doi.org/10.31857/s0026365622100196>
25. Баймиев Ал.Х., Владимиров А.А., Матнязов Р.Т. и др. Распространенность способности подавления роста родственных штаммов у ризобий. *Микробиология.* 2023. Т. 92. № 6. С. 625–630. <https://doi.org/10.31857/S0026365623600311>
26. Merritt J., Kreth J., Qi F., Sullivan R., Shi W. Non-disruptive, real-time analyses of the metabolic status and viability of *Streptococcus mutans* cells in response to antimicrobial treatments. *J. Microbiol. Methods.* 2005. V. 61. № 2. Pp. 161–170. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.11.012>
27. Баймиев Ан.Х., Коряков И.С., Акимова Е.С., Владимиров А.А., Матнязов Р.Т. Оптимизация поиска высокоэффективных штаммов клубеньковых бактерий для инокуляции бобовых растений. *С.-х. биология.* 2023. Т. 58. № 5. С. 864–874. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2023.5.864rus>
28. Вершинина З.Р., Хакимова Л.Р., Лавина А.М. и др. Влияние конститутивной экспрессии гена *garp1* на образование бактериальных биопленок и ростостимулирующую активность ризобий. *Микробиология.* 2019. Т. 88. № 1. С. 62–71. <https://doi.org/10.1134/s0026365619010105>

29. Чубукова О.В., Хакимова Л.Р., Акимова Е.С., Вершинина З.Р., Матниязов Р.Т. Устойчивые к воздействию тяжелых металлов PGPR штаммы *Pseudomonas* sp., стимулирующие рост люцерны посевной при кадмиевом стрессе. *Изв. РАН. Сер. биол.* 2024. Т. 5. С. 585–595. <https://doi.org/10.31857/S1026347024050037>
30. Хакимова Л.Р., Чубукова О.В., Мурясова А.Р., Вершинина З.Р. Влияние штамма *Pseudomonas* sp. ОВА 2.4.1 на растения гороха посевного (*Pisum sativum* L.) при ингибирующем действии солей кадмия. *Биомика.* 2022. Т. 14. № 2. С. 101–110. <https://doi.org/10.31301/2221-6197.bmcs.2022-7>
31. Perrine-Walker F.M., Prayitno J., Rolfe B.G. Infection process and the interaction of rice roots with rhizobia. *J. Exp. Bot.* 2007. V. 58. № 12. Pp. 3343–3350. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm181>
32. Сарсенова А.С., Ибраева А.Ж., Шорабаев Е.Ж., Саданов А.К. Селекция активных штаммов клубеньковых бактерий *Pisium sativum*ю. *Биотехн. теория и практика.* 2009. №. 1. С. 47–52.

REFERENCES

1. Kong Z., Liu H. Modification of rhizosphere microbial communities: A possible mechanism of plant growth promoting rhizobacteria enhancing plant growth and fitness. *Front. Plant Sci.* 2022, vol. 13, pp. 1–11.
2. Lyskova I. V., Shirokikh I. G., Nazarova Ya. I., et al. The effectiveness of using the laboratory samples based on bacteria of the genus *Streptomyces* on peas in the conditions of the Volga-Vyatka region. *Agricultural Science Euro-North-East.* 2024, vol. 25, no. 4, pp. 634–644. (In Russ.) <https://doi.org/10.30766/2072-9081.2024.25.4.634-644>
3. Sharapova I. E., Bessolitsyna E. A., Krasilnikova E. V. et al. Influence of quality of planting material and inoculation with biodrug on potato productivity under cultivation in the Republic of Komi conditions. *Journal of Agriculture and Environment.* 2024, vol. 52, no. 12, pp. 1–6. <https://doi.org/10.60797/JAE.2024.52.13>
4. Leontidou K., Genitsaris S., Papadopoulou A. et al. Plant growth promoting rhizobacteria isolated from halophytes and drought-tolerant plants: genomic characterisation and exploration of phyto-beneficial traits. *Sci. Rep.* 2020, vol., 10, no. 1, pp. 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71652-0>
5. Ansari F. A., Jabeen M., Ahmad I. *Pseudomonas azotoformans* FAP5, a novel biofilm-forming PGPR strain, alleviates drought stress in wheat plant. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 2021, vol. 18, no. 12, pp. 3855–3870. <https://doi.org/10.1007/s13762-020-03045-9>
6. Khoshru B., Fallah Nosratabad A., Mahjenabadi V.A.J. et al. Multidimensional role of *Pseudomonas*: from biofertilizers to bioremediation and soil ecology to sustainable agriculture. *J. Plant Nutr.* 2025, vol. 48, no. 6, pp. 1016–1042. <https://doi.org/10.1080/01904167.2024.2416078>
7. Korshunova T.Yu., Bakaeva M.D., Kuzina E.V. et al. Role of bacteria of the genus *Pseudomonas* in the sustainable development of agricultural systems and environmental protection. *Applied Biochemistry and Microbiology.* 2021, vol. 57, no. 3, pp. 211–227. <https://doi.org/10.31857/s0555109921030089>
8. Khakimova L.R., Lavina A.M., Vershinina Z.R. et al. Effect of constitutive expression of the *RapA1* gene on formation of bacterial biofilms and growth-stimulating activity of rhizobia. *Applied Chemistry and Microbiology.* 2017, vol. 53, no. 4, pp. 400–405. <https://doi.org/10.1134/s0026365619010105>
9. Asante M., Ahiabor B.D.K., Atakora W.K. Growth, nodulation, and yield responses of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) as influenced by combined application of rhizobium inoculant and phosphorus in the Guinea Savanna zone of Ghana. *Int. J. Agron.* 2020, vol. 2020, no. 1, pp. 1–16. <https://doi.org/10.1155/2020/8691757>
10. Palai J. B., Malik G. C., Maitra S., et al. Role of rhizobium on growth and development of groundnut: a review. *Int. J. Agricul. Environ. Biotechnol.* 2021, vol. 14, no. 1, pp. 63–73. <https://doi.org/10.30954/0974-1712.01.2021.7>
11. Purwaningsih S., Agustiyani D., Antonius S. Diversity, activity, and effectiveness of Rhizobium bacteria as plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) isolated from Dieng, central Java. *Iran. J. Microbiol.* 2021, vol. 13, no. 1, pp. 130–136. <https://doi.org/10.18502/ijm.v13i1.5504>
12. Bhattacharyya C., Roy R., Tribedi P. et al. Biofertilizers as substitute to commercial agrochemicals. *Agrochemicals Detection, Treatment and Remediation* / Ed. M.N.V. Prasad. Oxford: B.-H., 2020, 290 p. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-103017-2.00011-8>
13. Ueda A., Saneoka H. Characterization of the ability to form biofilms by plant-associated *Pseudomonas* species. *Curr. Microbiol.* 2015, vol. 70, pp. 506–513. <https://doi.org/10.1007/s00284-014-0749-7>
14. Lahlali R., Ezrari S., Radouane N. et al. Biological control of plant pathogens: a global perspective. *Microorganisms.* 2022, vol. 10, no. 3, pp. 1–33. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030596>
15. Grigoradi A.S., Zobkova N.V., Sotnikova Yu.M. et al. Response of the rhizosphere microbial community of phytoremediation plants to oil pollution and the application of biopreparations. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology.* 2023, vol. 13, no. 4 (47), pp. 523–531. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2523-13-4-523-531>

16. Ajjah N., Fiodor A., Pandey A. K., et al. Plant growth-promoting bacteria (PGPB) with biofilm-forming ability: a multifaceted agent for sustainable agriculture. *Diversity*. 2023, vol. 15, no. 1, pp. 1–21. <https://doi.org/10.3390/d15010112>
17. Li Y., Narayanan M., Shi X. et al. Biofilms formation in plant growth-promoting bacteria for alleviating agro-environmental stress. *Sci. Total Environ*. 2024, vol. 907, p. 167774. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.167774>
18. Sarkar A., Bhattacharjee S. Biofilm-mediated bioremediation of xenobiotics and heavy metals: a comprehensive review of microbial ecology, molecular mechanisms, and emerging biotechnological applications *3 Biotech*. 2025, vol. 15, no. 4, pp. 1–30. <https://doi.org/10.1007/s13205-025-04252-2>
19. Nadar S., Khan T. Chapter Role of Microbial Biofilms in Bioremediation. *Microbes Based Approaches for the Management of Hazardous Contaminants* / Eds. A. Kumar, L. Shukla, J. Singh, L.F.R. Ferreira. Wiley, 2024, pp. 257–276. <https://doi.org/10.1002/9781119851158.ch17>
20. Vershinina Z.R., Chubukova O.V., Nikonorov Yu.M. et al. Effect of *RosR* gene overexpression on biofilm formation by *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiology*. 2021, vol. 90, no. 2, pp. 191–203. <https://doi.org/10.31857/s00263656>
21. Nozhevnikova A.N., Botchkova E.A., Plakunov V.K. Multi-species biofilms in ecology, medicine, and biotechnology. *Microbiology*. 2015, vol. 84, pp. 731–750. <https://doi.org/10.1134/s0026261715060107>
22. Schulze A., Mitterer F., Pombo J. P. et al. Biofilms by bacterial human pathogens: Clinical relevance – development, composition and regulation – therapeutical strategies. *Microbial Cell*. 2021, vol. 8, no. 2, pp. 28–56. <https://doi.org/10.15698/mic2021.02.741>
23. Ulyanov V.Yu., Opredelentseva S.V., Shvidenko I.G. et al. The biological kinetics of biofilms of clinical strains of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* separated from patients with bronchopulmonary complications under traumatic disease of spinal cord. *Clinical Laboratory Diagnostics*. 2014, vol. 59, no. 8, pp. 43–47. (In Russ.)
24. Chubukova O.V., Khakimova L.R., Akimova E.S. Phylogeny and properties of new *Pseudomonas* spp. from the rhizosphere of southern ural leguminous plants. *Microbiology*. 2022, vol. 91, no. 5, pp. 537–546. <https://doi.org/10.31857/s0026365622100196>
25. Baimiev Al.Kh., Vladimirova A.A., Matniyazov R.T. et al. Occurrence of the ability to suppress the growth of related strains in rhizobia. *Microbiology*. 2023, vol. 92, no. 6, pp. 625–630. <https://doi.org/10.31857/S0026365623600311>
26. Merritt J., Kreh J., Qi F. et al. Non-disruptive, real-time analyses of the metabolic status and viability of *Streptococcus mutans* cells in response to antimicrobial treatments. *J. Microbiol. Methods*. 2005, vol. 61, no. 2, pp. 161–170. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.11.012>
27. Baimiev An.Kh., Koryakov I.S., Akimova E.S. et al. Optimization of the search for highly efficient nodule bacteria strains for inoculation of legume plants *Agricultural Biology*. 2023, vol. 58, no. 5, pp. 864–874. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2023.5.864rus>
28. Vershinina Z.R., Khakimova L.R., Lavina A.M. et al. Effect of constitutive expression of the *rapA1* gene on formation of bacterial biofilms and growth-stimulating activity of rhizobia. *Microbiology*. 2019, vol. 88, no. 1, pp. 62–71. <https://doi.org/10.1134/s0026365619010105>
29. Chubukova O.V., Khakimova L.R., Akimova E.S. et al. Heavy metals-resistant PGPR strains of *Pseudomonas* sp. stimulating the growth of alfalfa under cadmium stress. *Biology Bulletin*. 2024, vol. 5, pp. 585–595. <https://doi.org/10.31857/S1026347024050037>
30. Khakimova L.R., Chubukova O.V., Muryasova A.R. et al. The effect of the *Pseudomonas* sp. OBA 2.4.1 strain on pea plants (*Pisum sativum* L.) under the inhibitory action of cadmium salts. *Biomics*. 2022, vol. 14, no. 2, pp. 101–110. <https://doi.org/10.31301/2221-6197.bmcs.2022-7>
31. Perrine-Walker F.M., Prayitno J., Rolfe B.G. et al. Infection process and the interaction of rice roots with rhizobia. *J. Exp. Bot*. 2007, vol. 58, no. 12, pp. 3343–3350. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm181>
32. Sarsenova A.S., Ibraeva A.Zh., Shorabaev E.Zh. et al. Selection of active strains of nodule bacteria for *Pisum sativum*. *Biotechnology: Theory and Practice*. 2009, no. 1, pp. 47–52.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Лавина Анна Михайловна — к.б.н., научный сотрудник, Институт биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Российская Федерация

E-mail: owlwoman@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0002-0593-6874>

Владимирова Анастасия Андреевна — к.б.н., научный сотрудник, Институт биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Российская Федерация

E-mail: vladimirovaw@bk.ru

<https://orcid.org/0000-0002-0409-7861>

Баймиев Андрей Ханифович — д.б.н., доцент, ведущий научный сотрудник, Институт биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Российская Федерация

E-mail: baymiev@anrb.ru

<https://orcid.org/0000-0001-6637-9365>

Баймиев Алексей Ханифович — д.б.н., доцент, заведующий лабораторией, Институт биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Российская Федерация

E-mail: baymiev@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0002-0593-6874>

Поступила в редакцию 30.07.2025

После доработки 15.09.2025

Принята к публикации 25.09.2025

ABOUT THE AUTHORS

Lavina, Anna M. — Ph.D., researcher Institute of Biochemistry and Genetics, Federal State Budgetary Research Institution of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russian Federation

E-mail: owlwoman@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0002-0593-6874>

Vladimirova, Anastasia A. — Ph.D., researcher, Institute of Biochemistry and Genetics, Federal State Budgetary Research Institution of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russian Federation

E-mail: vladimirovaw@bk.ru

<https://orcid.org/0000-0002-0409-7861>

Baymiev, Andrey Kh. — Doctor of Biological Sciences, Associate Professor, Leading Researcher Federal State Budgetary Research Institution of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russian Federation

E-mail: baymiev@anrb.ru

<https://orcid.org/0000-0001-6637-9365>

Baimiev, Aleksey Kh. — Doctor of Biological Sciences, Associate Professor, Head of the Laboratory Federal State Budgetary Research Institution of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russian Federation

E-mail: baymiev@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0002-0593-6874>

Received July 30, 2025

Revised September 15, 2025

Accepted September 25, 2025