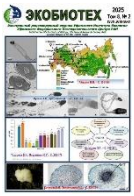
ЭКОБИОТЕХ
ISSN 2618-964X http://ecobiotech-journal.ru



УДК 579.253 UDC 579.253

ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ПОПУЛЯЦИИ КЛЕТОК *PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS*

Ступак Е.Э.
Уфимский Институт биологии Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа, Россия
E-mail: evgenia_stupak@mail.ru

Аннотация
Клетки клональной бактериальной популяции не являются абсолютно идентичными по своему фенотипу и метаболизму. Гетерогенность обусловлена стохастичностью молекулярных процессов, а также происходящими генетическими и эпигенетическими изменениями в клетках. Неоднородность популяции и способность клеток поддерживать несколько вариантов фенотипа способствуют лучшей адаптации популяции как к стабильным, так и изменяющимся условиям роста, и повышают скорость ответа на внешние воздействия. Факторы, вызывающие гетерогенность популяции, необходимо учитывать и контролировать при культивировании микроорганизмов для получения культуры клеток с необходимыми свойствами и для накопления целевого продукта. В денной работе исследовалась фенотипическая гетерогенность популяции бактерий штамма ИБ 51 *Pseudomonas chlororaphis*. Обнаружено, что при культивировании данного штамма в жидкой среде King B в стационарной фазе происходит накопление клеток, потерявших способность синтезировать феназин при экспоненциальном росте. Также показано, что при наличии в среде нескольких источников углерода, в процессе роста колонии происходит периодическое переключение уровней синтеза феназина и пиовердина.

Ключевые слова
Pseudomonas chlororaphis ◆ фенотипическая гетерогенность ◆ феназин ◆ пиовердин ◆ ацетилирование белков

Поступила в редакцию: 20.06.2025
Принято в печать: 27.06.2025

PHENOTYPIC HETEROGENEITY OF *PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS* CELL POPULATION

Stupak E.E.
Ufa Institute of Biology of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia
E-mail: evgenia_stupak@mail.ru

Abstract
The cells of a clonal bacterial population are not absolutely identical in their phenotype and metabolism. Heterogeneity is due to the stochastic nature of molecular processes, as well as genetic and epigenetic alterations occurring in cells. Population heterogeneity and the ability of cells to maintain several phenotypes contribute to better adaptation of the population to both constant and fluctuating environments and increase the response rate to external influences. Factors causing population heterogeneity must be considered and controlled when culturing microorganisms to obtain cells with the required properties and improve the accumulation of specific target products. In this research, the phenotypic heterogeneity of the bacterial population of Pseudomonas chlororaphis strain IB 51 was studied. It was found that the stationary-phase culture grown in liquid King B medium, accumulation of cells that had lost the ability to synthesize phenazine during the exponential growth phase. It was also shown that in the presence of several carbon sources, periodic switching of the synthesis levels of phenazine and pyoverdine was observed during colony growth.

Keywords
Pseudomonas chlororaphis ◆ phenotypic heterogeneity ◆ phenazine ◆ pyoverdine ◆ protein acetylation

Received: 20.06.2025
Accepted: 27.06.2025

Цитировать | Cite as

DOI: 10.31163/2618-964X/2025-21 EDN: XFLKZH

ВВЕДЕНИЕ

Многие первичные и вторичные метаболиты бактерий используются или потенциально пригодны в качестве пищевых добавок, средств защиты и стимуляции роста растений, красителей, ароматизаторов, фармацевтических препаратов [Singh et al. 2017]. Для поддержания высокого уровня синтеза целевого продукта в процессе биотехнологического производства необходимо контролировать постоянство фенотипа клеток популяции и

оптимальный для данного синтеза метаболизм бактериальных клеток. В растениеводстве задача по обеспечению эффективности бактериальных препаратов усложняется непостоянством внешних условий.

Фенотипическая гетерогенность изначально гомогенной популяции может быть результатом генетических, эпигенетических и стохастических процессов. Причем, в случае, если изменения затрагивают синтез регуляторных молекул, то изменяется и уровень экспрессии всех подконтрольных генов, что может привести к множеству фенотипических отличий. Генетические изменения возникают в результате мутаций (от точечной замены нуклеотида до перестроек генома), а если популяция не изолирована, то и в результате горизонтального переноса генов [Werner 2000]. Эпигенетические механизмы у прокариот представлены преимущественно наследуемыми изменениями профиля метилирования последовательности ДНК [Wang et al. 2023]. Также показано участие в эпигенетических изменениях профиля ацетилирования гистоноподобных белков [Zheng et al. 2023]. Стабильное наследование или периодическое переключение фенотипов может быть обеспечено и переключением уровней экспрессии в управляющих бистабильных генных сетях, например циклических сетях с отрицательными обратными связями [Tchuraev 2000]. Неоднородность в фенотипический состав бактериальной популяции вносит также стохастичность молекулярных процессов на всех этапах экспрессии генов и деградации мРНК и белков, а также неравномерность распределения молекул при делении клетки [Hardo, Bakshi 2021].

Бактерии вида P. chlororaphis колонизируют корни растений и синтезируют ряд экзоферментов (протеазы, хитиназы или фосфатазы) и вторичных метаболитов (антибиотики, сидерофоры, фитогормоны, летучие органические соединения), которые подавляют фитопатогены, проявляют нематоцидную и инсектицидную активность, стимулируют рост и системную устойчивость растений [Arrebola et al. 2019]. Одними из хорошо изученных и востребованных метаболитов, являются феназины, гетероциклические соединения, входящие в сигнальные системы клеток, стимулирующие образование биопленок, модулирующие метаболизм и экспрессию генов, как в бактериальных, так и в эукариотических клетках [Huang 2024]. Сидерофоры, вторичные метаболиты, хелатирующие ионы железа, обеспечивают бактериям конкурентное преимущество в условиях дефицита железа в окружающей среде. Сидерофор пиовердин структурно состоит из трех частей: видоспецифичного пептида, длиной от 6 до 12 аминокислот, хромофора, обуславливающего флуоресценцию, и боковой цепи, представляющей собой дикарбоновую кислоту из цикла Кребса. Бактерии рода *Pseudomonas* синтезируют более ста разновидностей пиовердина [Ghssein, Ezzeddine 2022]. Хелатируя железо в окружающей среде, пиовердин оказывает прямое антогонистическое действие на патогены. В тоже время возможно совместное использование одного пиовердина несколькими штаммами. [Gu et al, 2025]. Пиовердин является регуляторной и сигнальной молекулой, контролируя в том числе собственный синтез и влияет на системную резистентность растений. Пиовердин также защищает растения от токсичных металлов, связывая ионы Cd, Cu, Ni Zn; в отличие от железа, эти комплексы выводятся из периплазмы обратно во внешнюю среду [Ghssein, Ezzeddine 2022].

В данной работе исследовалась фенотипическия гетерогенность по уровню синтеза феназина и пиовердина популяции бактерий штамма ИБ 51 *Pseudomonas chlororaphis*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использован штамм ИБ51 *Pseudomonas chlororaphis*g (KP973976), выделенный из пахотных земель Мелеузовского района РБ. [Chetverikov 2009].

Бактерии культивировали при 30°С в жидких или на агаризованных средах LB (пептон 10 г/л; дрожжевой экстракт 5 г/л; NaCl 10 г/л), King B [King 1954] или модифицированной среде King B с заменой глицерина на глюкозу или ацетат натрия.

Для определения уровня синтеза пигментов культуру разводили в буфере трис-HCl pH 6,5 до D_{600}= 0,2. Феназин определяли по поглощению при 363 нм, пиовердин – по флуоресценции при Ex_{405}, Em_{460} [Franco 2022; Wang et al. 2020].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Штамм ИБ 51 *P. chlororaphis* на среде LB образует оранжевые колонии, на среде King B – желтые, флуоресцирующие под воздействием ультрафиолетового излучения (рис. 1). Согласно литературным данным *P. chlororaphis* синтезирует феназиновые пигменты и пиовердин [Chen et al. 2015]. В наших экспериментах пик поглощения оранжевого пигмента наблюдался при 363 нм, флуоресценция культуры на среде КВ была максимальна в условиях Ex_{405}, Em_{460} и подавлялась внесением ионов железа. Эти данные подтверждают, что на среде LB данный штамм синтезирует феназин, на среде King B – преимущественно пиовердин [Franco 2022; Wang et al. 2020].

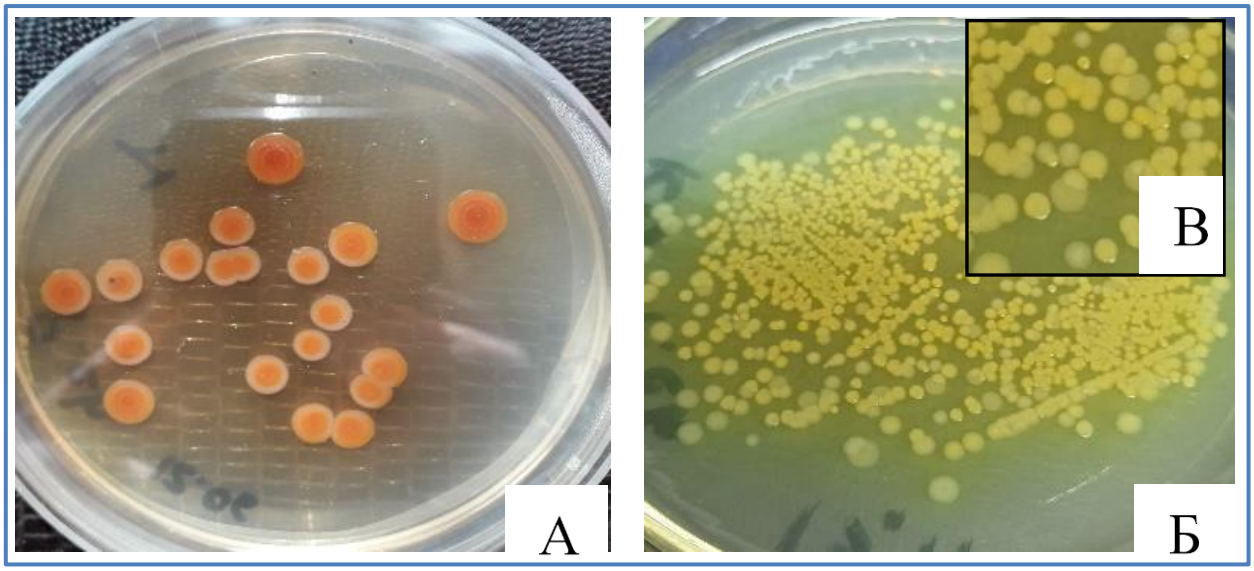


Рисунок 1. Колонии штамма ИБ 51 *P. chlororaphis* на агаризованых средах LB (А) и King B (Б и В).

Часть колоний на рисунке 1В не имеет желтой окраски. Спектрометрические и флуориметрические исследования показали, что желтый цвет колоний на среде King B обусловлен феназином, синтезирующимся на низком уровне, а клетки светлых колоний синтезируют только пиовердин. Было выявлено, что появление данной субпопуляции возможно в стационарной фазе роста культуры ИБ 51 в жидкой среде King B. Полученный вариант (ИБ 51 mut) стабильно наследовал фенотип при пересевах на агаризованной среде и при экспоненциальном росте культуры в жидкой среде, однако длительное культивирование (более 10 суток) периодической культуры приводило к накоплению феназина. При возобновлении экспоненциального роста синтез феназина вновь практически прекращался.

Следовательно, в клетках ИБ 51 mut фенотипические проявления являются следствием мутационных изменений, затрагивающих регуляторные гены.

Кроме измененного уровня синтеза феназина мутантные клетки отличались повышенным уровнем синтеза пиовердина (рис. 2), что согласно литературным данным, характерно для мутаций, затрагивающих двухкомпонентную регуляторную систему GacS/GacA. [Liu et al. 2018]

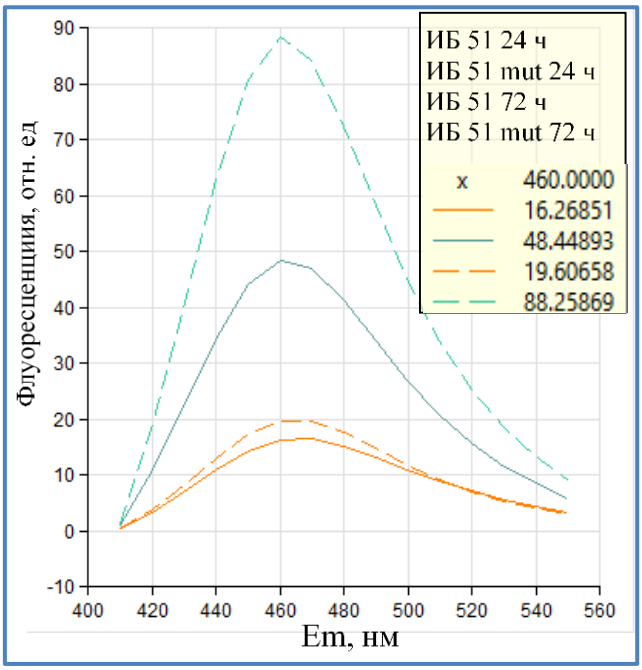


Рисунок 2. Флуоресценция культур клеток штаммов ИБ 51 и ИБ 51 mut, при культивировании в среде King B. λ возбуждающего излучения 405 нм.

Фенотипическая гетерогенность клеток возможна и в пределах одной колонии. На модифицированной среде King B с глицерином и глюкозой штамм ИБ 51 формирует оранжевые колонии. Через 14 дней при облучении ультрафиолетом в колониях обнаруживаются концентрические зоны роста с чередованием флуоресцирующих и оранжевых областей (рис. 3).

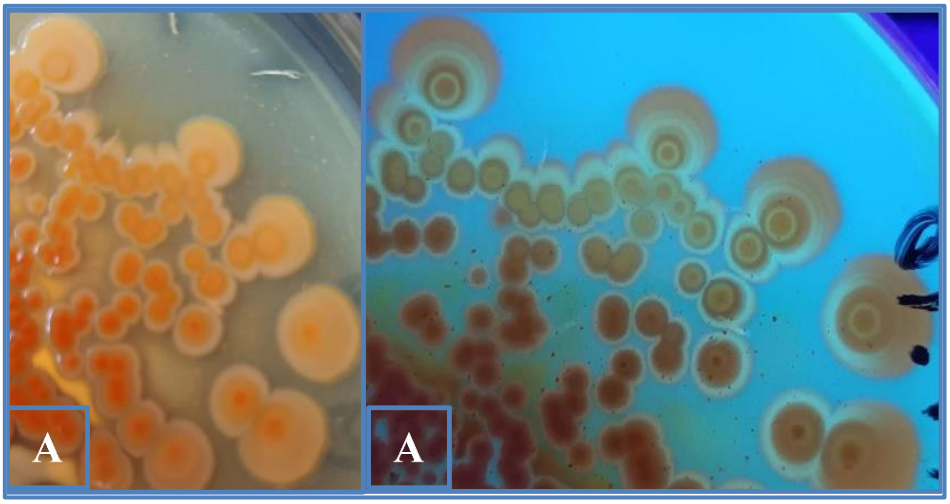


Рисунок 3. Колонии штамма ИБ 51 при дневном свете (А) и при ультрафиолетовом облучении (Б).

Для определения зависимости уровня синтеза пигментов от источника углерода был проведен эксперимент по культивированию бактерий в жидкой среде King B или

модифицированной среде King B с заменой глицерина на глюкозу или ацетат натрия. Результаты эксперимента через 48 часов культивирования представлены на рисунке 4.

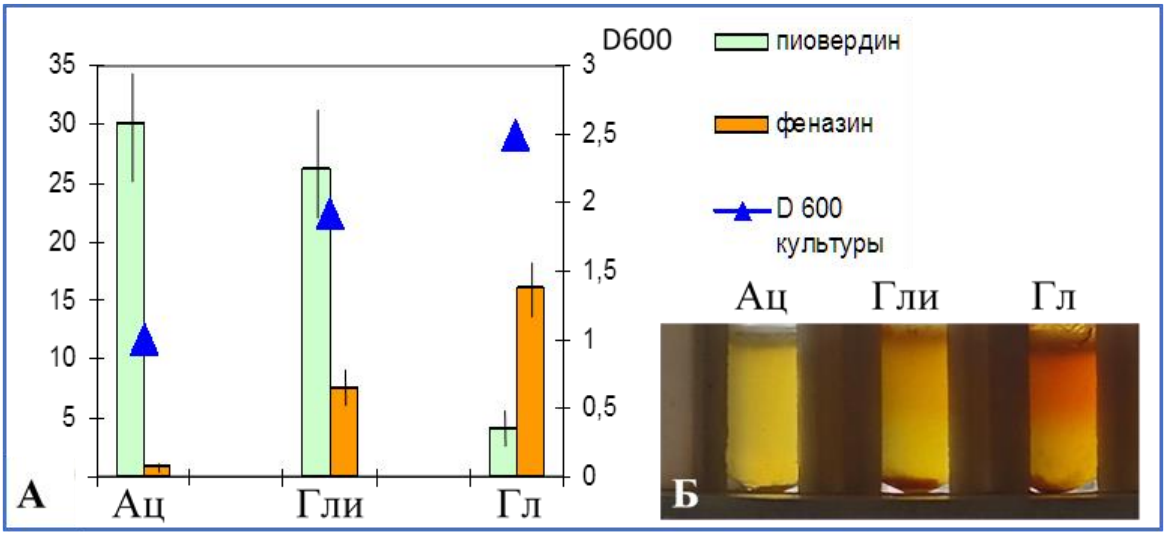


Рисунок 4. Зависимость уровня синтеза пигментов (в относительных единицах) и оптической плотности культуры при длине волны 600 нм от источника углерода в среде культивирования. Ац. – ацетат натрия, Гли – глицерин, Гл – глюкоза.

Проведенные эксперименты показали, что интенсивность синтеза пигментов зависела от источника углерода. Максимум синтеза феназина наблюдался в модифицированной среде King B с глюкозой, что согласуется с ранее полученными данными [Van Rij et al. 2004]. Синтез пиовердина был наиболее высоким в среде с ацетатом натрия, что отражает повышение уровня синтеза пиовердина при получении углерода из глюконеогенных субстратов (в данном случае ацетата и глицерина), по сравнению с синтезом из гликолитических субстратов (глюкоза). Пептидная цепь пиовердина синтезируется из аминокислот, связанных по происхождению с циклом трикарбоновых кислот, пентозофосфатным циклом и гликолизом, причем около 60% потока углерода, необходимого для синтеза пиовердина поступает из цикла трикарбоновых кислот, потоки углерода в который возрастают при использовании глюконеогенных субстратов [Mendonca et al. 2020].

Формирование концентрических зон роста с разным уровнем синтеза пигментов на чашках со средой King B с добавлением глюкозы может быть связано с периодической сменой метаболизма при изменении уровня концентрации субстратов или их соотношения в среде по периферии колонии, а также с изменением плотности клеток и скорости их роста [Schink et al. 2022; Goodwin et al. 2006]. Можно также предположить участие в изменении уровня синтеза пигментов углеродной катаболической репрессии, регуляторного механизма, обеспечивающего переключение метаболических путей на усвоение предпочтительного источника углерода [Rojo 2010]. Четкие границы зон с разным уровнем интенсивности окраски свидетельствуют о необходимости для переключения метаболических путей определенных пороговых значений соотношения источников углерода в среде и наличии в регуляторных сетях обратных связей, стабилизирующих уровень синтеза пигментов на определенных значениях.

Для выяснения возможности влияния на синтез пигментов посттрансляционных модификаций белков в среду культивирования вносили ингибитор деацетилирования белков – бутират натрия. К настоящему времени считается, что ацетилирование белков у прокариот играет важную роль в поддержании клеточного гомеостаза, регуляции экспрессии генов и изменении метаболизма в ответ на внешние воздействия. Ацетилирование белков может

влиять на метаболизм клетки, как путем непосредственной модификации ферментов, так и при модификации регуляторных и гистоноподобных белков [VanDrisse, Escalante-Semerena 2019]. Показано, что внесение в среду культивирования бактерий бутирата натрия происходит изменение уровня экспрессии генов, участвующих в синтезе первичных и вторичных метаболитов [Zheng et al. 2023]

В наших экспериментах бутират натрия снижал уровень синтеза феназина в средах LB и King B, повышал уровень синтеза пиовердина в среде King B (Рис. 4).

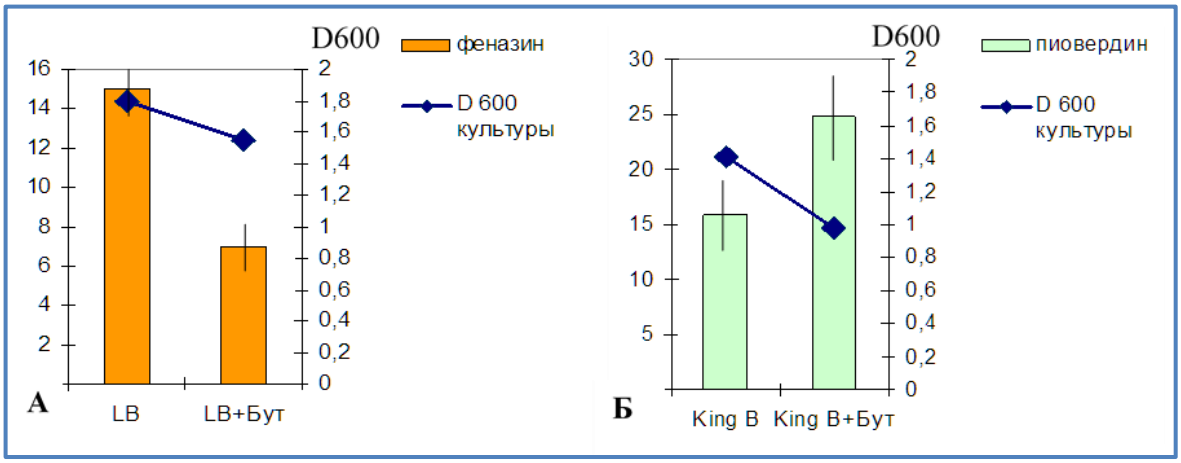


Рисунок 5. Влияние бутирата натрия на синтез пигментов *P. chlororaphis* ИБ 51 через 48 часов роста культуры. А – в среде LB, Б – в среде King B.

Известно, что на ацетилирование белков влияет метаболизм ацетата в бактериальной клетке [Weinert et al. 2013]. Сопоставление наших экспериментов по внесению в среду ацетата натрия и ингибиторов деацетилирования белков позволяет предположить, что действие ацетата на уровень синтеза пигментов может быть связано не только с переключением метаболических путей в результате смены источника углерода, но и является результатом изменением уровня ацетилирования белков, участвующих в синтезе или в регуляции синтеза пигментов. Так же вероятно, что бутират натрия влияет на метаболизм клетки как источник углерода, или как возможный предшественник диаминобутирата, входящего в состав пиовердина.

Таким образом, проведенные нами эксперименты выявили несколько механизмов формирования фенотипической гетерогенности в популяции клеток штамма ИБ 51 *P. chlororaphis.* Обнаружено, что при культивировании данного штамма в жидкой среде King B в стационарной фазе происходит накопление клеток, потерявших способность синтезировать феназин при экспоненциальном росте. Также показано, что при наличии в среде нескольких источников углерода, в процессе роста колонии происходит периодическое переключение уровней синтеза феназина и пиовердина. Таким образом, в условиях наших экспериментов фенотипическая неоднородность клеток популяции штамма ИБ 51 *Pseudomonas chlororaphis* была обусловлена мутационными процессами при остановке роста культуры и переключениями метаболических путей в процессе роста популяции при истощении предпочтительного источника углерода в среде.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России № 075-03-2021-607 по теме №122031100163-4 с использованием оборудования центра коллективного пользования УФИЦ РАН «Агидель».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ
REFERENCES

Arrebola E., Tienda S., Vida C., de Vicente A., Cazorla F.M. (**2019**) Fitness features involved in the biocontrol interaction of *Pseudomonas chlororaphis* with host plants: the case study of PcPCL1606. *Front Microbiol*. 10: 719. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00719

Chen Y., Shen X., Peng H., Hu H., Wang W., Zhang X. (**2015**) Comparative genomic analysis and phenazine production of Pseudomonas chlororaphis, a plant growth-promoting rhizobacterium. *Genomics Data*. **4**: 33-42. https://doi.org/10.1016/j.gdata.2015.01.006

Chetverikov S.P. Suleimanova L.R., Loginov O.N. (**2009**) Complex formation between trigliceropeptides pseudomonades and plant root exudates as a mechanism of action on phytopathogens *Applied Biochemistry and Microbiology*. **45**(5): 506-510. https://doi.org/10.1134/S0003683809050093

Franco A. Elbahnasy M., Rosenbaum M.A. (**2022**). Screening of natural phenazine producers for electroactivity in bioelectrochemical systems. *Microbial Biotechnology*. **16**(3): 579-594. https://doi.org/10.1111/1751-7915.14199

Ghssein G., Ezzeddine, Z. (**2022**). A Review of *Pseudomonas aeruginosa* metallophores: pyoverdine, pyochelin and pseudopaline. *Biology*. **11***(*12): 1711. https://doi.org/10.3390/biology11121711

Goodwin J.R., Hafner M., Fredericks P. M. (**2006**) Raman spectroscopic study of the heterogeneity of microcolonies of a pigmented bacterium. *J. Raman Spectrosc*. **37**(9): 932-936. https://doi.org/10.1002/jrs.1523

Gu S., Shao Z., Qu Z., Zhu S., Shao Y., Zhang D., Allen R., He R., Shao J., Xiong G., Jousset A., Friman V.P., Wei Z., Kümmerli R., Li Z. (**2025**) Siderophore synthetase-receptor gene coevolution reveals habitat- and pathogen-specific bacterial iron interaction networks. **11**(3): 5038. https://doi.org/10.1126/sciadv.adq5038

Hardo G., Bakshi S. (**2021**) Challenges of analysing stochastic gene expression in bacteria using single-cell time-lapse experiments. *Essays Biochem*. **65**(1): 67-79. https://doi.org/10.1042/EBC20200015

Huang W., Wan Y.., Su H., Zhang Z., Liu Y., Sadeeq M., Xian M, Feng X., Xiong P., Hou F. (**2024**) Recent advances in phenazine natural products: biosynthesis and metabolic engineering. *J Agric Food Chem*. **72**(39):21364-21379. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.4c05294

King E.O., Ward M.K., Raney D.E. (**1954**) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J Lab Clin Med* **44**:301–307

Liu Y., Wang Z., Bilal M., Hu H., Wang W., Huang X., Peng H., Zhang X. (**2018**) Enhanced fluorescent siderophore biosynthesis and loss of phenazine-1-carboxamide in phenotypic variant of *Pseudomonas chlororaphis* HT66. *Front Microbiol*. **9**: 759. |https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00759

Mendonca C.M. Yoshitake S., Wei H., Werner A., Sasnow S.S., Thannhauser T.W., Aristilde L. (**2020**) Hierarchical routing in carbon metabolism favors iron-scavenging strategy in iron-deficient soil *Pseudomonas* species. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **117**(51): 32358-32369. https://doi.org/10.1073/pnas.2016380117.

Rojo, F. (**2010**) Carbon catabolite repression in *Pseudomonas*: optimizing metabolic versatility and interactions with the environment. *FEMS Microbiology Reviews*. **34**(5): 658–684. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00218.x

Schink S.J. Christodoulou D., Mukherjee A., Athaide E., Brunner V., Fuhrer T., Bradshaw G.A. Sauer U., Basan M. (**2022**) Glycolysis/gluconeogenesis specialization in microbes is driven by biochemical constraints of flux sensing. *Mol Syst Biol*. **18**: e10704. https://doi.org/10.15252/msb.202110704

Singh, R. M. Kumar, A. Mittal, P. K. Mehta. (**2017**) Microbial metabolites in nutrition, healthcare and agriculture. *3Biotech*. **7**(15). https://doi.org/10.1007/s13205-016-0586-4

Tchuraev R.N, Stupak I.V., Tropynina T.S., Stupak E.E. (**2000**) Epigenes: design and construction of new hereditary units. *FEBS Letters*. **486**(3):200-202. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)02300-0

VanDrisse C.M. Escalante-Semerena J.C. (**2019**) Protein acetylation in вacteria. *Annu Rev Microbiol*. **73**: 111–132. https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-115526

Van Rij E.T., Wesselink M., Chin-A-Woeng T.F.C., Bloemberg G.V., Lugtenberg B.J.J. (**2004**) Influence of environmental conditions on the production of phenazine-1-carboxamide by Pseudomonas chlororaphis PCL1391. *Mol. Plant-microbep Interact*. **17**(5): 557–566. https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.5.557

Wang X., Kleerekoper Q., Revtovich A.V., Kang D., Kirienko N.V. (**2020**) Identification and validation of a novel anti-virulent that binds to pyoverdine and inhibits its function. *Virulence*. **11**(1): 1293-1309. https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1819144

Wang X., Yu D., Chen L. (**2023**) Antimicrobial resistance and mechanisms of epigenetic regulation. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. **13**: 2235-2988. https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1199646

Weinert B.T. Iesmantavicius V., Wagner S.A., Schölz C., Gummesson B., Beli P., Nyström T., Choudhary C. (**2013**) Acetyl-phosphate is a critical determinant of lysine acetylation in *E. coli*. *Mol Cell*. **51**(2): 265–272. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.06.003

Werner A. Genetic variation: molecular mechanisms and impact on microbial evolution. (**2000**) *FEMS Microbiology Reviews*. Volume **24**(1): 1-7. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00529.x

Zheng J., Li Y., Liu N., Zhang J., Liu S., Tan H. (**2023**) Multi-omics data rveal theeffect of sodium dutyrate on gene expression and protein modification in *Streptomyces*. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. **21**(6):1149-1162. https://doi.org/10.1016/j.gpb.2022.09.002

Цитировать как
Ступак Е.Э. (**2025**). Фенотипическая гетерогенность популяции клеток *Pseudomonas chlororaphis*. *Экобиотех*. **8**(2): 291-298. DOI: 10.31163/2618-964X/2025-21 EDN: XFLKZH

Cited as
Stupak E.E. Phenotypic heterogeneity in *Pseudomonas chlororaphis* cell population. *Ecobiotech*. **8**(2): 291-298. DOI: 10.31163/2618-964X/2025-21 EDN: XFLKZH (In Rus.)

Сведения об авторе

Ступак Евгения Эдуардовна, к.б.н, Уфимский Институт биологии Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа, Россия. E-mail: evgenia_stupak@mail.ru, SPIN: 3578-5964, ORCID: 0000-0001-7063-1877, Scopus: 6603002906, WoS: J-6678-2018

Information About the Author

Stupak Evgeniya Edwardovna, PhD in Biological Sciences, Institute of Biology of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia. E-mail: evgenia_stupak@mail.ru, SPIN: 3578-5964, ORCID: 0000-0001-7063-1877, Scopus: 6603002906, WoS: J-6678-2018