

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

Влияние колхицина на физиолого-биохимические свойства *Rhodococcus qingshengii*

Ю.А. Маркова¹✉, Л.А. Беловежец², В.Н. Нурминский¹, И.С. Капустина¹, Н.В. Озолина¹, В.В. Гурина¹,
А.Л. Ракевич³, А.В. Сидоров¹

¹ Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия

² Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия

³ Иркутский филиал Института лазерной физики Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия

✉ juliam06@mail.ru

Аннотация. Род *Rhodococcus* объединяет полиморфные неспорообразующие грамположительные бактерии, относящиеся к классу Actinobacteria. *Rhodococcus* вместе с *Mycobacterium* и *Corynebacterium* входят в группу Mycolata. Благодаря относительно высокой скорости роста и способности к образованию биопленок, *Rhodococcus* являются удобной моделью для изучения действия биологически активных соединений на патогенные *Mycolata*. Ранее было показано, что колхицин угнетал образование биопленок у *P. carotovorum* VKM B-1247 и *R. qingshengii* VKM Ac-2784D. Целью настоящей работы было изучение действия колхицина на жирнокислотный состав и микровязкость мембран *Rhodococcus qingshengii* VKM Ac-2784D для понимания механизма действия этого алкалоида на бактериальную клетку. В качестве положительного контроля использовали нистатин, снижающий микровязкость мембран. Установлено, что колхицин в концентрациях 0.01 и 0.03 г/л и нистатин (0.03 г/л) не оказали существенного влияния на выживаемость *R. qingshengii* VKM Ac-2784D, культивируемого в забуференном физиологическом растворе глюкозы (ЗФРГ). Однако колхицин (0.03 г/л) значительно угнетал образование биопленки. Клетки *Rhodococcus*, культивируемые в течение суток в ЗФРГ с колхицином, приобретали округлую форму. Колхицин в концентрации 0.01 г/л вызывал увеличение жирных кислот C16:1(n-7), C17:0, C20:1(n-9) и C21:0. Микровязкость мембраны отдельных клеток распределялась от максимально низких до максимально высоких значений показателя обобщенной поляризации флуоресценции лаурдана (GP), что свидетельствует о разнообразии адаптационных ответов на этот алкалоид. При более высокой концентрации колхицина (0.03 г/л) в мембранах клеток *R. qingshengii* VKM Ac-2784D увеличивалось содержание насыщенных жирных кислот и падало – разветвленных. Это способствовало увеличению микровязкости мембраны, что подтверждается данными по GP. Таким образом, колхицин индуцирует перестройку клеточной мембраны *Rhodococcus*, вероятно, в сторону увеличения ее микровязкости, что может быть одной из причин негативного действия колхицина на образование биопленок *R. qingshengii* VKM Ac-2784D.

Ключевые слова: *Rhodococcus qingshengii*; колхицин; биопленки; жирные кислоты; микровязкость мембран.

Для цитирования: Маркова Ю.А., Беловежец Л.А., Нурминский В.Н., Капустина И.С., Озолина Н.В., Гурина В.В., Ракевич А.Л., Сидоров А.В. Влияние колхицина на физиолого-биохимические свойства *Rhodococcus qingshengii*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2022;26(6):568-574. DOI 10.18699/VJGB-22-69

Effect of colchicine on physiological and biochemical properties of *Rhodococcus qingshengii*

Yu.A. Markova¹✉, L.A. Belovezhets², V.N. Nurminsky¹, I.S. Kapustina¹, N.V. Ozolina¹, V.V. Gurina¹,
A.L. Rakevich³, A.V. Sidorov¹

¹ Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia

² A.E. Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia

³ Irkutsk Branch of the Institute of Laser Physics, The Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia

✉ juliam06@mail.ru

Abstract. The genus *Rhodococcus* includes polymorphic non-spore-forming gram-positive bacteria belonging to the class Actinobacteria. Together with *Mycobacterium* and *Corynebacterium*, *Rhodococcus* belongs to the Mycolata group. Due to their relatively high growth rate and ability to form biofilms, *Rhodococcus* are a convenient model for studying the effect of biologically active compounds on pathogenic *Mycolata*. Colchicine was previously found to reduce biofilm formation by *P. carotovorum* VKM B-1247 and *R. qingshengii* VKM Ac-2784D. To understand the mechanism of action of this alkaloid on the bacterial cell, we have studied the change in the fatty acid composition and microviscosity of the *R. qingshengii* VKM Ac-2784D membrane. Nystatin, which is known to reduce membrane microviscosity, is used as a positive control. It has been found that colchicine at concentrations of 0.01 and 0.03 g/l and nystatin (0.03 g/l) have no significant effect on the survival of *R. qingshengii* VKM Ac-2784D cultivated in a buffered saline solution with 0.5 % glucose (GBSS). However, colchicine (0.03 g/l) significantly inhibits biofilm formation. *Rhodococcus* cells cultivated for 24 hours in GBSS with colchicine acquire a rounded shape. Colchicine at 0.01 g/l concen-

tration increases C16:1(n-7), C17:0, C20:1(n-9) and C21:0 fatty acids. The microviscosity of the membrane of individual cells was distributed from the lowest to the highest values of the generalized laurdan fluorescence polarization index (GP), which indicates a variety of adaptive responses to this alkaloid. At a higher concentration of colchicine (0.03 g/l) in the membranes of *R. qingshengii* VKM Ac-2784D cells, the content of saturated fatty acids increases and the content of branched fatty acids decreases. This contributes to an increase in membrane microviscosity, which is confirmed by the data on the GP fluorescence of laurdan. All of the above indicates that colchicine induces a rearrangement of the *Rhodococcus* cell membrane, probably in the direction of increasing its microviscosity. This may be one of the reasons for the negative effect of colchicine on the formation of *R. qingshengii* VKM Ac-2784D biofilms.

Key words: *Rhodococcus qingshengii*; colchicine; biofilms; fatty acids; membrane microviscosity.

For citation: Markova Yu.A., Belovezhets L.A., Nurminsky V.N., Kapustina I.S., Ozolina N.V., Gurina V.V., Rakevich A.L., Sidorov A.V. Effect of colchicine on physiological and biochemical properties of *Rhodococcus qingshengii*. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(6):568-574. DOI 10.18699/VJGB-22-69

Введение

Род *Rhodococcus* объединяет полиморфные неспорообразующие грамположительные бактерии, относящиеся к классу Actinobacteria. *Rhodococcus* широко распространены в окружающей среде, включая живые организмы. Одна из важных особенностей этих микроорганизмов – способность разлагать органические соединения с разной химической структурой, в том числе поллютанты (полициклические ароматические углеводороды, ПАУ, бифенилы, алканы и др.) (Szőköl et al., 2014; Li et al., 2016). На этом основан растущий интерес к *Rhodococcus* как к ценным биотехнологическим видам.

Rhodococcus вместе с *Mycobacterium* и *Corynebacterium* относятся к группе Mycolata, которая характеризуется наличием миколовых кислот на клеточной стенке (Sutcliffe, 1998). Эта особенность делает их более устойчивыми к токсичным соединениям, таким как дезинфектанты, антибиотики или ПАУ. В отличие от мико- и коринебактерий, большинство видов *Rhodococcus* непатогенные. Поэтому благодаря относительно высокой скорости роста и способности к образованию биопленок *Rhodococcus* являются удобной моделью для изучения действия биологически активных соединений на патогенные *Mycolata*.

Целостность микробиологической клетки обеспечивает цитоплазматическая мембрана. Чтобы выжить в постоянно изменяющихся условиях окружающей среды и поддерживать оптимальную текучесть мембраны, бактерии изменяют жирнокислотный состав мембранных липидов (Dubois-Brissonnet et al., 2016). Клеточная мембрана – основная мишень токсичности неполярных органических растворителей (de Carvalho et al., 2005). Растительные метаболиты тоже влияют на мембрану, ингибируя активность эффлюкс-каналов (Tegos et al., 2002), содержание белков-поринов (Abreu et al., 2012) и т. д.

Ранее мы выявили, что алкалоид колхицин в концентрации 0.25 г/л супрессировал образование биопленки видами *Pectobacterium carotovorum* VKM B-1247 и *Rhodococcus qingshengii* VKM Ac-2784D (Быбин и др., 2018). При этом негативное влияние на жизнеспособность этих бактерий не обнаружено. Колхицин широко известен как алкалоид, нарушающий полимеризацию тубулина у эукариотических клеток (Zhang et al., 2018). Возможно, по отношению к микроорганизмам он выполняет аналогичную функцию, воздействуя на цитоскелет и препятствуя адгезии микробных клеток (Dubey et al., 2011). Однако его влияние на микробные клетки практически не изучено. Это обусловило наш интерес к данному соединению.

Цель настоящей работы состояла в изучении действия колхицина на жирнокислотный состав и микровязкость мембран *R. qingshengii* VKM Ac-2784D.

Материалы и методы

В исследовании использовали штамм *R. qingshengii* VKM Ac-2784D, выделенный нами из ризосферы пырея ползучего (*Elytrigia repens* (L.) Nevski), произрастающего на нефтезагрязненной территории Иркутской области (Россия) (Petrushin et al., 2021). Этот штамм *Rhodococcus* характеризуется стабильно высоким формированием биопленок, поэтому считается хорошей моделью для их изучения.

Бактерии культивировали на БТН-агаре (ООО «Биотехновация», Россия) в течение 48 ч при 26 °С. Затем переносили на забуференный физиологический раствор с 0.5 % глюкозы (ЗФРГ) и доводили плотность суспензии до ОП₅₉₅ 0.26–0.33.

Минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) колхицина для *R. qingshengii* VKM Ac-2784D определяли методом предельных разведений (Руководство..., 2000).

Для оценки влияния нистатина и колхицина на кинетику роста и образование биопленки 150 мкл бактериальной суспензии вносили в лунки стерильных плоскодонных 96-луночных планшетов и измеряли оптическую плотность (ОП) в первые, третьи и восьмые сутки культивирования с помощью планшетного ридера iMark (Bio-Rad, США), λ = 595 нм. Планшет отмывали от слабо прикрепившихся клеток. Осадок окрашивали 1 % раствором кристаллического фиолетового в течение 45 мин. Затем после трехкратного промывания для экстрагирования краски в лунки добавляли по 200 мкл 96 % этанола. Уровень экстракции (абсорбции) кристаллического фиолетового этанолом измеряли с помощью планшетного ридера iMark (Bio-Rad) при длине волны 595 нм в единицах оптической плотности (ед. ОП₅₉₅). Степень образования биопленки соответствовала интенсивности окрашивания красителем содержимого лунок (Шагинян и др., 2007).

В работе использовали два контроля. Одним из них были бактерии, культивируемые в ЗФРГ без добавления колхицина. Вторым контролем служили бактерии, выросшие в среде с добавлением 0.03 г/л нистатина (ОАО «Бисинтез», Пенза, Россия), так как нистатин обладает способностью снижать микровязкость клеточных мембран. Колхицин (Sigma-Aldrich, США) был в концентрациях 0.01 и 0.03 г/л. При построении графиков применяли показатель относительной оптической плотности в про-

центрах к контролю. Размеры клеток оценивали с помощью программы AxioVision Rel. 4.8.

Для определения жирнокислотного состава бактериальной мембраны и упорядоченности (микровязкости, текучести) ее липидной фазы бактерии культивировали в вышеуказанных средах в течение суток. Упорядоченность липидов мембран оценивали по обобщенной поляризации (GP) флуоресценции липофильного зонда лаурдан в каждом пикселе, соответствующем светящейся области изображения. Для окрашивания препаратов в каждую пробирку вносили 10 мкМ метанольного раствора лаурдана (2-(диметиламино)-6-додеканоилнафталин) (Sigma-Aldrich). Живые окрашенные бактерии наблюдали под микроскопом (лазерный сканирующий конфокальный флуоресцентный микроскоп MicroTime 200; PicoQuant GmbH, Германия).

При анализе данных распределения величин GP визуализировали в виде гистограмм. Для каждой гистограммы строили теоретическое многомодальное распределение как суперпозицию (наложение) нескольких нормальных распределений (Нурминский и др., 2017). Далее делали оценку формы (подгонку параметров) экспериментальных распределений значений GP бактериальных мембран. Модельное распределение представляло собой нормальное распределение или смесь распределений и, таким образом, состояло из одной или нескольких компонент (составляющих). В результате анализа осуществляли подбор оптимальных параметров компонент, наиболее близко подходящих к экспериментальному распределению.

Для определения состава жирных кислот (ЖК) бактерии культивировали аналогичным образом без добавления лаурдана. Экстракцию липидов осуществляли по методу (Bligh, Dyer, 1959). К экстракту липидов после удаления растворителя добавляли 1 % метанольный раствор H_2SO_4 и нагревали на водяной бане при 60 °C в течение 30 мин. После охлаждения трижды экстрагировали гексаном (Christie, 1993). Метилловые эфиры ЖК анализировали с помощью хроматомасс-спектрометра Agilent Technology 5973N/6890N MSD/DS (США). Детектор – масс-спектрометр – квадруполь, способ ионизации – электронный удар (EI), энергия ионизации 70 эВ, для анализа применяли режим регистрации полного ионного тока. Для разделения экстракта использовали капиллярную колонку HP-INNOWAX (30 м × 250 мкм × 0.50 мкм). Неподвижная фаза – полиэтиленгликоль; подвижная фаза – гелий; скорость потока газа – 1 мл/мин. Температура испарителя – 250 °C, источника ионов – 230 °C, детектора – 150 °C, температура линии, соединяющей хроматограф с масс-спектрометром, – 280 °C. Диапазон сканирования – 41–450 а. е. м. Объем вводимой пробы – 1 мкл, разделение потоков – 5:1. Хроматографию выполняли в изотермическом режиме при 200 °C. Для идентификации пиков метилловых эфиров ЖК использовали стандарты метилловых эфиров (Sigma-Aldrich) и метод масс-спектрометрии с помощью библиотеки масс-спектров NIST 05 (Озолина и др., 2017). Содержание отдельных ЖК рассчитывали как процент к общему количеству ЖК и разделяли на группы: насыщенные (НЖК), мононенасыщенные (МНЖК), полиненасыщенные (ПНЖК), насыщенные *iso*- и *anteiso*-

метил разветвленные жирные кислоты (РЖК) (Rodrigues, de Carvalho, 2015).

Достоверность различий биоупленкообразования и количественного содержания жирных кислот оценивали по непараметрическому критерию Крускала–Уоллиса с поправкой Даннета (Гланц, 1998). Все расчеты проводили с помощью программы RStudio.

Результаты и обсуждение

Обнаружено, что МИК колхицина для *R. qingshengii* ВКМ Ас-2784D равна 0.02 г/л, поэтому в дальнейших экспериментах мы использовали концентрации ниже и выше этого значения, 0.01 и 0.03 г/л соответственно. Выбранные концентрации колхицина и нистатина не оказали значимого влияния на рост *Rhodococcus* (рис. 1). В то же время было установлено, что колхицин в концентрации 0.03 г/л существенно угнетал образование биоупленки на всех этапах эксперимента, а в концентрации 0.01 г/л оказал разнонаправленное действие. Нистатин в первые сутки стимулировал формирование биоупленки, на третьи и восьмые сутки культивирования его влияние было сопоставимо с контролем (рис. 2).

Культивирование *R. qingshengii* ВКМ Ас-2784D в присутствии колхицина в течение суток привело к значимому изменению морфологии клетки в сторону более округлой формы (табл. 1). При этом мы наблюдали неоднород-

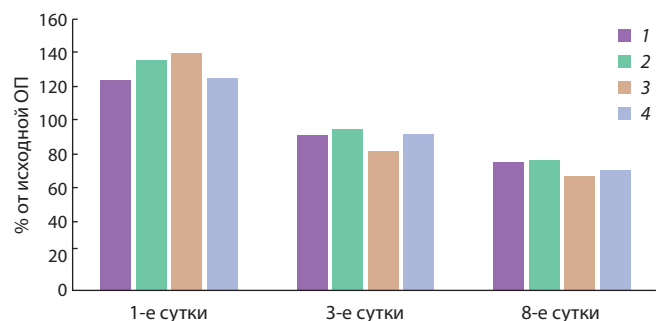


Рис. 1. Оптическая плотность суспензии клеток *R. qingshengii* ВКМ Ас-2784D относительно контроля, %, в первые, третьи и восьмые сутки культивирования.

Здесь и на рис. 2: 1 – ЗФРГ; 2 – ЗФРГ с 0.03 г/л колхицина; 3 – ЗФРГ с 0.01 г/л колхицина; 4 – ЗФРГ с 0.03 г/л нистатина.

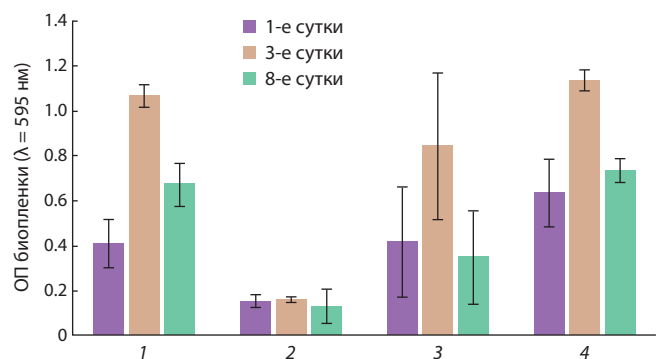


Рис. 2. Оптическая плотность биоупленки *R. qingshengii* ВКМ Ас-2784D в первые, третьи и восьмые сутки культивирования.

Таблица 1. Размеры клеток *R. qingshengii* ВКМ Ас-2784D через сутки культивирования в контрольных условиях и в присутствии исследуемых соединений

Вариант	Длина, нм	Ширина, нм	Длина/ширина
Контроль	1.35 ± 0.29	0.56 ± 0.08	2.42
Колхицин, 0.01 г/л	1.04 ± 0.23*	0.58 ± 0.1	1.78*
Нистатин, 0.03 г/л	1.46 ± 0.36	0.68 ± 0.14	2.12

* $p < 0.05$.

ность внутриклеточного содержимого (рис. 3), что согласуется с результатами, полученными для *Bacillus megaterium* (Dubey et al., 2011). Форма клеток *Rhodococcus* под действием нистатина не изменялась.

Изменение морфологии клетки, как правило, сопровождается структурно-функциональной перестройкой их клеточных мембран (de Carvalho et al., 2014). При этом происходит изменение степени насыщенности ЖК, их длины, а также количества разветвленных жирных кислот.

Мембраны клеток *Rhodococcus* в контрольных условиях содержали преимущественно пальмитиновую, стеариновую и олеиновую кислоты (табл. 2). Отношение насыщенных кислот к мононенасыщенным жирным кислотам

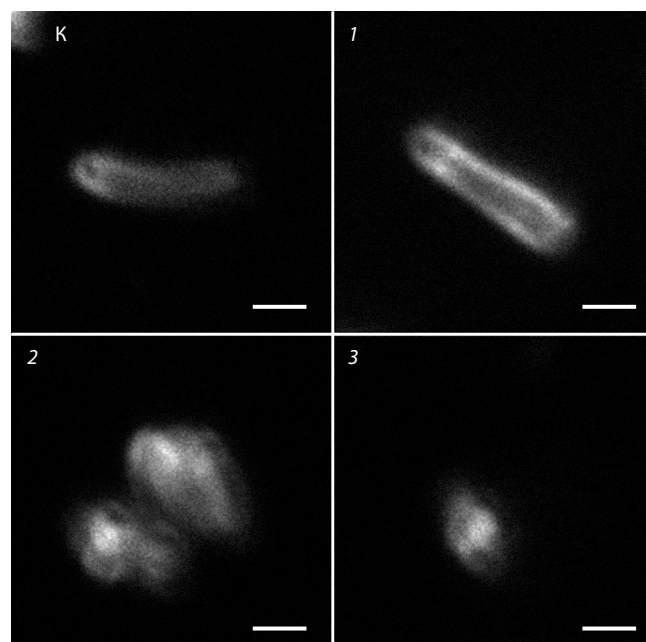


Рис. 3. Морфология клеток *R. qingshengii* ВКМ Ас-2784D при культивировании в течение суток в забуференном физиологическом растворе с глюкозой (5 г/л) (К) и при внесении 0.03 г/л нистатина (1), 0.01 г/л колхицина (2), 0.03 г/л колхицина (3).

Окрашивание лаурданом. Увеличение × 600.

Таблица 2. Состав жирных кислот мембран клеток *R. qingshengii* ВКМ Ас-2784D, культивируемых в течение суток в ЗФРГ, в присутствии колхицина (0.03 и 0.01 г/л) и нистатина (0.03 г/л)

Жирная кислота	Контроль	Концентрация алкалоидов, г/л		
		Колхицин 0.03	Колхицин 0.01	Нистатин 0.03
Лауриновая С12:0	–	–	–	0.76 ± 0.04
Миристиновая С14:0	4.76 ± 0.38	6.09 ± 0.02	5.45 ± 0.26	4.89 ± 0.02
Пентадекановая С15:0	1.99 ± 0.22	2.36 ± 0.32	2.25 ± 0.01	1.60 ± 0.06
Антеизо-пентадекановая С15:0-а	–	–	–	1.08 ± 0.03
Пальмитиновая С16:0	36.76 ± 3.52	34.58 ± 0.33	32.27 ± 2.10	27.98 ± 0.48*
Изопальмитиновая С16:0-і	–	–	–	1.63 ± 0.04
Пальмитолеиновая С16:1(n-9)	5.16 ± 1.05	3.78 ± 0.35	4.50 ± 0.14	3.53 ± 0.21
С16:1(n-7)	1.31 ± 0.14	2.33 ± 0.35	3.11 ± 0.36*	2.21 ± 0.28
С16:1(n-9)	–	–	–	4.78 ± 0.17
С16:1(n-5)	2.30 ± 0.26	2.06 ± 0.09	3.79 ± 1.04	–
Гептадекановая С17:0	1.26 ± 0.14	1.35 ± 0.03	1.60 ± 0.11*	1.28 ± 0.05
Антеизо-гептадекановая С17:0-а	0.84 ± 0.23	1.23 ± 0.03*	0.72 ± 0.16	0.83 ± 0.09
Стеариновая С18:0	12.09 ± 0.19	14.80 ± 0.25	10.15 ± 0.21	13.91 ± 0.29
Олеиновая С18:1(n-9)	25.79 ± 2.42	24.24 ± 0.24	28.46 ± 1.10	30.29 ± 0.09*
С18:1(n-7)	1.36 ± 0.11	0.89 ± 0.02	2.33 ± 0.13	0.59 ± 0.13
Линолевая С18:2(n-6)	4.41 ± 0.61	1.54 ± 0.01	2.01 ± 0.49	2.33 ± 0.05
Арахидиновая С20:0	0.99 ± 0.08	1.55 ± 0.01*	1.16 ± 0.01	0.86 ± 0.00
С20:1(n-9)	–	0.46 ± 0.04	0.36 ± 0.01	0.27 ± 0.00
Генэйкозановая С21:0	–	0.48 ± 0.09	0.44 ± 0.09	0.26 ± 0.03
Бегеновая С22:0	1.10 ± 0.13	2.28 ± 0.19	1.40 ± 0.03	0.92 ± 0.17

* $p < 0.05$.

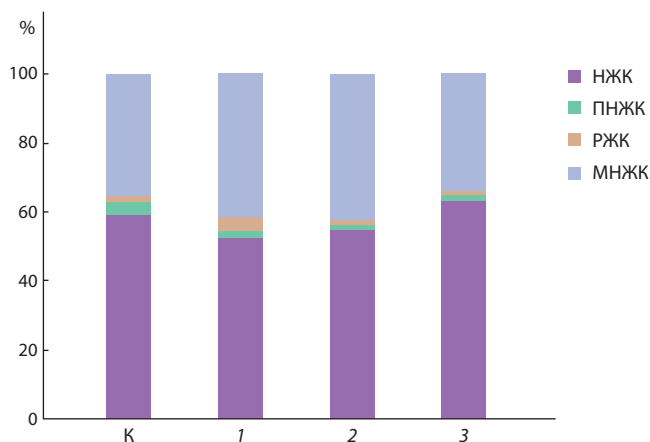


Рис. 4. Относительное содержание основных групп жирных кислот при культивировании в течение суток в забуференном физиологическом растворе с глюкозой (5 г/л) (К) и при внесении 0.03 г/л нистатина (1), 0.01 г/л колхицина (2), 0.03 г/л колхицина (3).

НЖК – насыщенные жирные кислоты; ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты; РЖК – разветвленные жирные кислоты; МНЖК – мононенасыщенные жирные кислоты.

составляло 1.64. Доля полиненасыщенных и разветвленных кислот была невелика (4.41 и 0.84 % соответственно). Колхицин в концентрации 0.01 г/л способствовал изменению соотношения насыщенных и мононенасыщенных ЖК (1.29) в сторону последних, параллельно снижая количество полиненасыщенных ЖК. В то же время количество длинноцепочечных ЖК C20:1(n-9), C21:0 и C22:0 увеличивалось. В присутствии 0.03 г/л колхицина возрастало относительное содержание насыщенных и разветвленных ЖК (рис. 4), при этом отношение НЖК к МНЖК достигало 1.89. Все это свидетельствует о перестройке мембраны *R. qingshengii* ВКМ Ас-2784D в ответ на присутствие колхицина в среде культивирования. Интересно, что различные концентрации колхицина оказывали прямо противоположное влияние на состав ЖК клеточной

мембраны. Вероятно, это связано с разной степенью нарушения систем регуляции. Внесение нистатина как соединения, достоверно увеличивающего текучесть мембран, сопровождалось возрастанием количества ненасыщенных и разветвленных ЖК при значительном снижении содержания пальмитиновой и увеличении олеиновой ЖК.

Текучесть (микровязкость) мембран – интегральный показатель, зависящий от насыщенности липидов, содержания стерина и белков. Поэтому на следующем этапе исследования было определено влияние колхицина и нистатина на упорядоченность липидной фазы мембраны *R. qingshengii* ВКМ Ас-2784D. Для этого использовали показатель GP флуоресценции лаурдана, который может принимать значения в диапазоне от -1 до +1. Его отрицательные значения соответствуют меньшей микровязкости (большей текучести) клеточной мембраны (Нурминский и др., 2015) (см. Материалы и методы).

Подгонка экспериментальных распределений значений GP бактериальных мембран позволила выявить от одной до четырех компонент при влиянии нистатина и колхицина (рис. 5). Наиболее весомая компонента во всех вариантах – компонента, характеризующая жидко-неупорядоченные области мембраны (α : (средние значения GP): -0.16–0.04, вклад: 73.9–100 %), что соответствует известному механизму действия данного антибиотика на мембраны эу- и прокариот (Ефимова и др., 2014). Колхицин, наоборот, способствовал повышению упорядоченности мембран, α самых весомых компонент хоть и незначительно, но сместились в сторону положительных значений, по сравнению с контролем, в обоих вариантах концентраций (α : 0.04, вклад: 73.9–89.4 %), что согласуется с наблюдаемым нами увеличением количества насыщенных ЖК. Однако при этом существенно усилился разброс данных и количество компонент увеличилось до 2 (в варианте с 0.01 мг/мл) и до 4 (в варианте с 0.03 мг/мл). Минорные компоненты соответствовали более плотноупакованным участкам мембран (α : 0.29, вклад: 1.8 %) или, наоборот, менее плотноупакованным (α : -0.29, вклад: 6.7 %).

а

Вариант	Компонента	Среднее GP, α	Стандартное отклонение, σ	Вклад, %
Контроль	1	0.01	0.16	100
Нистатин	1	-0.16	0.17	100
Колхицин, 10 мкг/мл	1	-0.08	0.24	26.1
	2	0.04	0.16	73.9
Колхицин, 30 мкг/мл	1	-0.19	0.03	2.1
	2	0.04	0.18	89.4
	3	0.29	0.02	1.8
	4	-0.29	0.11	6.7

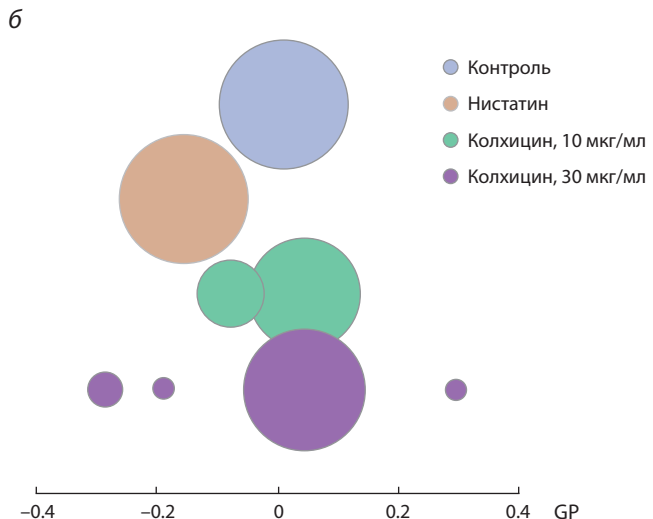


Рис. 5. Влияние нистатина и колхицина на параметры компонент распределений значений GP мембран *R. qingshengii* ВКМ Ас-2784D (а) и сопоставление компонент на пузырьковой диаграмме (б). Площадь круга отражает величину вклада каждой компоненты, $n = 10-26$.

Заклучение

Таким образом, колхицин в составе ЗФРГ в концентрациях 0.01 и 0.03 г/л не оказал существенного влияния на выживаемость *R. qingshengii* ВКМ Ас-2784D, но при этом значительно угнетал образование биопленки. Клетки *Rhodococcus*, культивируемые в течение суток в ЗФРГ с колхицином, приобретали округлую форму. В присутствии 0.01 г/л колхицина увеличилось содержание С16:1(n-7), С17:0, С20:1(n-9) и С21:0 жирных кислот.

Микровязкость мембраны отдельных клеток распределяется от максимально низких до максимально высоких показателей GP, что свидетельствует о разнообразии адаптационных ответов на данный алкалоид. При более высокой концентрации колхицина (0.03 г/л) в мембранах клеток *R. qingshengii* ВКМ Ас-2784D увеличивалось содержание насыщенных жирных кислот и падало содержание разветвленных жирных кислот. В результате микровязкость мембраны увеличивалась, что подтверждалось данными по GP флуоресценции лаурдана. Результаты свидетельствуют об адаптивной перестройке клеточной мембраны под действием исследуемого алкалоида, что согласуется с другими исследованиями (Wang et al., 2020). Это может быть одной из причин негативного действия колхицина на образование биопленок *R. qingshengii* ВКМ Ас-2784D.

Список литературы / References

- Быбин В.А., Турская А.Л., Максимова Л.А., Маркова Ю.А. Оценка влияния ряда алкалоидов на биопленкообразование бактерий разных видов. В: Механизмы устойчивости растений и микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды: Сборник материалов Годичного собрания Общества физиологов растений России, Всероссийской научной конференции с международным участием и школы молодых ученых. Иркутск: Институт географии им. В.Б. Сочавы Сибирского отделения Российской академии наук, 2018;1206-1209. DOI 10.31255/978-5-94797-319-8-1206-1209.
- [Bybin V.A., Turskaya A.L., Maksimova L.A., Markova Yu.A. Evaluation of the influence of some alkaloids on biofilm formation by different bacterial species. In: Proceedings of the Annual Meeting of the Society of Plant Physiologists of Russia, the All-Russia Scientific Conference with International Participation, and the School of Young Scientists. Irkutsk: Sochava Institute of Geography of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 2018;1206-1209. DOI 10.31255/978-5-94797-319-8-1206-1209. (in Russian)]
- Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1998. [Glantz S. Primer of Biostatistics. McGraw-Hill Publ., 1991. (Russ. ed.): Glants S. Mediko-Biologicheskaya Statistika. Moscow: Praktika Publ., 1998.]
- Ефимова С.С., Щагина Л.В., Остроумова О.С. Исследование каналообразующей активности полиеновых антибиотиков в липидных бислоях с использованием дипольных модификаторов. *Acta Naturae*. 2014;6(4(23)):72-85.
- [Efimova S.S., Schagina L.V., Ostroumova O.S. Investigation of channel-forming activity of polyene macrolide antibiotics in planar lipid bilayers in the presence of dipole modifiers. *Acta Naturae*. 2014;6(4(23)):67-79. DOI 10.32607/20758251-2014-6-4-67-79.]
- Нурминский В.Н., Нестеркина И.С., Спиридонова Е.В., Ракевич А.Л., Озолина Н.В. Выявление стерин-содержащих доменов вакуолярной мембраны методом конфокальной микроскопии. *Биол. мембраны*. 2017;34(4):307-312. DOI 10.7868/S0233475517040065.
- [Nurminsky V.N., Nesterkina I.S., Spiridonova E.V., Ozolina N.V., Rakevich A.L. Identification of sterol-containing domains in vacuolar membranes by confocal microscopy. *Biochemistry (Moscow). Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*. 2017;11(4):296-300. DOI 10.1134/S1990747817040080.]
- Нурминский В.Н., Ракевич А.Л., Мартынович Е.Ф., Озолина Н.В., Нестеркина И.С., Колесникова Е.В., Пилипченко А.А., Салыев Р.К., Чернышов М.Ю. Особенности структуры вакуоли растительной клетки, выявленные с помощью конфокальной микроскопии. *Цитология*. 2015;57(6):443-451.
- [Nurminsky V.N., Ozolina N.V., Nesterkina I.S., Kolesnikova E.V., Salyaev R.K., Rakevich A.L., Martynovich E.F., Pilipchenko A.A., Chernyshov M.Y. Peculiar properties of some components in a plant cell vacuole morphological structure revealed by confocal microscopy. *Cell Tiss. Biol*. 2015;9(5):406-414. DOI 10.1134/S1990519X15050090.]
- Озолина Н.В., Гурина В.В., Нестеркина И.С., Дударева Л.В., Катышев А.И., Нурминский В.Н. Жирнокислотный состав общих липидов вакуолярной мембраны при абиотическом стрессе. *Биол. мембраны*. 2017;34(1):63-69. DOI 10.7868/S0233475517010078.
- [Ozolina N.V., Gurina V.V., Nesterkina I.S., Dudareva L.V., Katshev A.I., Nurminsky V.N. Fatty acid composition of total lipids in vacuolar membrane under abiotic stress. *Biologicheskije Membrany = Biological Membranes*. 2017;34(1):63-69. DOI 10.7868/S0233475517010078. (in Russian)]
- Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Ремедиум, 2000. [Guidelines for the Experimental (Preclinical) Study of New Pharmacological Substances. Moscow: Remedium Publ., 2000. (in Russian)]
- Шагинян И.А., Данилина Г.А., Чернуха М.Ю., Алексеева Г.В., Битов А.Б. Формирование биопленок клиническими штаммами бактерий комплекса *Burkholderia cepacia* в зависимости от их фенотипических и генотипических характеристик. *Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2007;1:3-9.
- [Shaginyan I.A., Danilina G.A., Chernukha M.Yu., Alekseeva G.V., Batov A.B. Biofilm formation by strains of *Burkholderia cepacia* complex in dependence of their phenotypic and genotypic characteristics. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology, and Immunobiology*. 2007;1:3-9. (in Russian)]
- Abreu A.C., McBain A.J., Simoes M. Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents. *Nat. Prod. Rep*. 2012;29(9):1007-1021. DOI 10.1039/c2np20035j.
- Bligh E.G., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol*. 1959;37:911-917.
- Christie W.W. Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis. In: Christie W.W. *Advances in Lipid Methodology – Two*. Dundee: Oily Press, 1993;69-111.
- de Carvalho C.C., Marques M.P., Hachicho N., Heipieper H.J. Rapid adaptation of *Rhodococcus erythropolis* cells to salt stress by synthesizing polyunsaturated fatty acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2014;98(12):5599-5606. DOI 10.1007/s00253-014-5549-2.
- de Carvalho C.C., Parreño-Marchante B., Neumann G., Da Fonseca M.M.R., Heipieper H.J. Adaptation of *Rhodococcus erythropolis* DCL14 to growth on *n*-alkanes, alcohols and terpenes. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2005;67(3):383-388. DOI 10.1007/s00253-004-1750-z.
- Dubey K.K., Jawed A., Haque S. Structural and metabolic correlation for *Bacillus megaterium* ACBT03 in response to colchicine biotransformation. *Microbiology*. 2011;80(6):758-767. DOI 10.1134/S0026261711060099.
- Dubois-Brissonnet F., Trotier E., Briandet R. The biofilm lifestyle involves an increase in bacterial membrane saturated fatty acids. *Front. Microbiol*. 2016;7:1673. DOI 10.3389/fmicb.2016.01673.

- Li C., Zhang C., Song G., Liu H., Sheng G., Ding Z., Wang Z., Sun Y., Xu Y., Chen J. Characterization of a protocatechuate catabolic gene cluster in *Rhodococcus ruber* OA1 involved in naphthalene degradation. *Ann. Microbiol.* 2016;66(1):469-478. DOI 10.1007/s13213-015-1132-z.
- Petrushin I.S., Markova Yu.A., Karepova M.S., Zaytseva Yu.V., Belovezhets L.A. Complete genome sequence of *Rhodococcus qingshengii* strain VKM Ac-2784D, isolated from *Elytrigia repens* rhizosphere. *Microbiol. Resour. Announc.* 2021;10(11):e00107-21. DOI 10.1128/MRA.00107-21.
- Rodrigues C.J.C., de Carvalho C.C.C.R. *Rhodococcus erythropolis* cells adapt their fatty acid composition during biofilm formation on metallic and non-metallic surfaces. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2015; 91(12):fiv135. DOI 10.1093/femsec/fiv135.
- Sutcliffe I.C. Cell envelope composition and organisation in the genus *Rhodococcus*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1998;74(1):49-58. DOI 10.1023/a:1001747726820.
- Szőkö J., Rucká L., Šimčíková M., Halada P., Nešvera J., Pátek M. Induction and carbon catabolite repression of phenol degradation genes in *Rhodococcus erythropolis* and *Rhodococcus jostii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014;98(19):8267-8279. DOI 10.1007/s00253-014-5881-6.
- Tegos G., Stermitz F.R., Lomovskaya O., Lewis K. Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002;46(10):3133-3141. DOI 10.1128/AAC.46.10.3133-3141.2002.
- Wang C., Chen Y., Zhou H., Li X., Tan Z. Adaptation mechanisms of *Rhodococcus* sp. CNS16 under different temperature gradients: Physiological and transcriptome. *Chemosphere.* 2020;238:124571. DOI 10.1016/j.chemosphere.2019.124571.
- Zhang W., Zhou Q.M., Du G.H. Colchicine. In: Du G.H. Natural Small Molecule Drugs from Plants. Singapore: Springer, 2018;503-507. DOI 10.1007/978-981-10-8022-7_83.

ORCID ID

Yu.A. Markova orcid.org/0000-0001-7767-4204
L.A. Belovezhets orcid.org/0000-0001-5922-3397
V.N. Nurminsky orcid.org/0000-0003-1265-1639
I.S. Kapustina orcid.org/0000-0002-6495-1783

N.V. Ozolina orcid.org/0000-0002-0436-8166
V.V. Gurina orcid.org/0000-0001-7552-0818
A.L. Rakevich orcid.org/0000-0002-3445-0558
A.V. Sidorov orcid.org/0000-0003-4948-4301

Благодарности. Работа выполнена в рамках базовой тематики под № гос. регистрации 121031300011-7.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 18.05.2022. После доработки 29.06.2022. Принята к публикации 08.07.2022.