

УДК 579.2

ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРОПОРАЦИИ НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ И АДГЕЗИЮ К *n*-ГЕКСАДЕКАНУ КЛЕТОК *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 231

© 2020 г. М. С. Куюкина^{1,2, *}, А. М. Варушкина^{1,2}, И. Б. Ившина^{1,2}

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов, Пермский федеральный исследовательский центр УрО РАН,
Пермь, 614081 Россия

²Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, 614990 Россия

*e-mail: kyukina@iegm.ru

Поступила в редакцию 30.04.2020 г.

После доработки 12.06.2020 г.

Принята к публикации 02.07.2020 г.

Изучено влияние электропорации на жизнеспособность, чувствительность к антибиотикам и адгезивную активность по отношению к *n*-гексадекану клеток *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 231. Установлено, что после электропорации при напряжении 9 и 12.5 кВ/см жизнеспособность родококков снижалась на 85–96%, а их чувствительность к бензилпенициллину, гентамицину, клотримазолу, неомицину и цефазолину повышалась на 8–46%. При этом динамика повышения чувствительности зависела от природы антибиотика и времени восстановления клеток после электропорации. Наиболее высокая антибиотикочувствительность, коррелирующая с повышением степени адгезии к углеводороду, была зарегистрирована для электропорированных клеток после 24-часового периода восстановления, соответствующего переходу культуры в стационарную фазу роста. Отмечено появление спонтанных мутантов *R. ruber* ИЭГМ 231, устойчивых к воздействию 200 мкг/мл канамицина и характеризующихся пониженной гидрофобностью клеточной стенки. Полученные результаты могут быть использованы при подборе оптимального режима электротрансформации родококков, в частности, повышения выживаемости клеток и сокращения периода их восстановления после электропорации, а также снижения концентрации антибиотика в селективной среде для эффективного отбора рекомбинантных клонов.

Ключевые слова: актинобактерии, *Rhodococcus*, электропорация, антибиотикочувствительность, гидрофобность, клеточная адгезия

DOI: 10.31857/S0555109920060082

Электропорация — создание пор в клеточной мембране под воздействием кратковременного электрического импульса высокого напряжения, широко используется в медицине и является удобным инструментом в решении таких биотехнологических задач, как генетическая трансформация клеток, экстракция биомолекул, инактивация микроорганизмов в сточных водах, нетермическая пастеризация продуктов питания и др. [1]. Диполи воды проникают в липидный бислой мембраны под влиянием короткого импульса продолжительностью от 10 мкс до 10 мс и мощностью от 1 до 20 кВ/см и вызывают переориентацию фосфолипидов, формируя поры для транспорта макромолекул как внутрь, так и наружу клетки [2]. Электрический импульс высокого напряжения оказывает действие также на клеточную стенку бактерий, в которой под его воздействием формируются многочисленные перфорации пептидогликанового слоя, облегчающие транспорт молекул [3].

Была доказана связь между действием электрического тока на бактериальные клетки и повышением их чувствительности к антибиотикам, биоцидам и растворителям, которая получила название “биоэлектрический эффект” [4]. Биоэлектрический эффект исследован при воздействии постоянного слабого электрического тока, однако практически не изучено влияние тока высокого напряжения на эффективность антибиотических препаратов [5, 6].

Трансформация бактерий с использованием электропорации (или электротрансформация) относится к распространенному методу доставки генетического материала внутрь клеток. При этом в качестве селективных маркеров для отбора трансформированных клеток часто используют генные кассеты антибиотикорезистентности [7]. Однако многие исследователи сталкиваются с проблемой восстановления трансформантов после электропорации, так как высокое напряжение оказывает

комплексное стрессорное воздействие на бактериальные клетки. Было отмечено, что жизнеспособность клеток падает после электропорации [3], в связи с этим для повышения эффективности трансформации предложено увеличить время восстановления бактерий в питательном бульоне или на агаре [8]. Оказалось также, что для отбора рекомбинантных клонов довольно трудно подобрать оптимальную концентрацию антибиотика в селективной среде, поскольку его низкая концентрация приводит к появлению “ложноположительных” колоний, а слишком высокая – вызывает гибель трансформированных клеток.

Углекислородоокисляющие актинобактерии рода *Rhodococcus* метаболизируют сложные органические субстраты, обладают уникальными ферментными комплексами и устойчивостью к экстремальным условиям среды, что обуславливает не только их биотехнологический потенциал в качестве нефтедеструкторов и продуцентов биосурфактантов, но и интерес к созданию генетически модифицированных штаммов родококков [8–11]. При этом родококки относят к традиционно трудной для электротрансформации группе бактерий вследствие их мощной гидрофобной клеточной стенки и сложного морфогенетического цикла развития [8, 9, 11]. Важным этапом нефтедеструкции является адгезия к углеводородным субстратам [12], что подразумевает изучение адгезивной активности родококков при воздействии различных физических факторов, в том числе электропорации.

Цель работы – изучение влияния электропорации на жизнеспособность, антибиотикочувствительность и адгезивную активность родококков по отношению к углеводородному субстрату.

МЕТОДИКА

Объект исследования и условия культивирования. В работе использовали культуру актинобактерии *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 231, поддерживаемую в Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов ИЭГМ УрО РАН (WFCC #768; www.iegmcol.ru). Клетки выращивали на питательном агаре при 28°C.

Приготовление электрокомпетентных клеток и условия электропорации. В колбах Эрленмейера к 200 мл бульона Луриа–Бертани (LB), содержащего 2% глицина, вносили 10 мл стационарной культуры. Культуру предварительно выращивали на качалке (160 об./мин) при 28°C до достижения поздней экспоненциальной фазы (ОП₅₅₀ не более 0.9), охлаждали на льду в течение 20 мин, клетки осаждали центрифугированием при 3000 g в течение 20 мин при 4°C. Клеточный осадок дважды промывали деионизированной водой при 4°C и ресуспендировали в 15%-ном глицерине [8]. Суспензию электрокомпетентных клеток (100 мкл)

электропорировали в кюветах (0.2 см) при 2.5 кВ (12.5 кВ/см) или 1.8 кВ (9 кВ/см) с использованием электропоратора Pulser Transformation Apparatus (“Bio-Rad”, США). Затем к клеткам добавляли 0.9 мл LB и высевали на агаризованную среду LB незамедлительно или после 2, 4 и 24 ч инкубации при 28°C.

Определение жизнеспособности клеток. Для определения жизнеспособности клеток использовали набор LIVE/DEAD® *BacLight*TM (Bacterial Viability Kit, “Invitrogen”, США). Каплю бактериальной суспензии (10 мкл) помещали на покровное стекло (24 × 50 × 0.15 мм), смешивали с эквивалентным объемом красителя и подсушивали на воздухе в темноте в течение 10 мин. Затем клетки промывали деионизированной водой и сканировали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа (КЛСМ) Olympus FV1000 (“Olympus Corporation”, Япония) с использованием иммерсионного объектива Plan Apo VC (увеличение 100x, числовая апертура 1.4). Для возбуждения флуоресценции красителей SYTO 9 и пропидиум йодида применяли аргоновый лазер ($\lambda = 488$ нм) с 505–525 нм барьерным фильтром и гелий-неоновый лазер ($\lambda = 543$ нм) с 560–660 нм барьерным фильтром соответственно. Анализ полученных изображений проводили с помощью программы FV10 ASW 3.1 (“Olympus Corporation”, Япония).

Определение антибиотикочувствительности родококков. Чувствительность клеток к антибиотикам определяли дискодиффузионным методом с использованием индикаторных дисков, пропитанных антибиотическими препаратами следующих групп: аминогликозидов (неомицин, гентамицин и канамицин), бета-лактамов антибиотиков из группы цефалоспоринов (цефазолин) и пенициллинов (бензилпенициллин), а также производного имидазола широкого спектра действия (клотримазол) (“НИЦФ”, Россия). Результаты учитывали на 3 сут, измеряя диаметр (в мм) зоны отсутствия бактериального роста вокруг соответствующего диска. Изменение чувствительности клеток выражали в процентах по отношению к контролю. Дополнительно определяли чувствительность родококков к канамицину (10–100 мкг/мл) методом серийных разведений в агаре. Эксперименты проводили в пятикратной повторности.

Определение адгезии клеток к *n*-гексадекану. Адгезивную активность родококков определяли по отношению к *n*-гексадекану (массовая доля основного вещества 98%, “Вектон”, Россия) с помощью МАТН-теста (Microbial Adhesion to Hydrocarbons – микробная адгезия к углеводородам) по модифицированной методике [12]. Эксперименты проводили в десятикратной повторности.

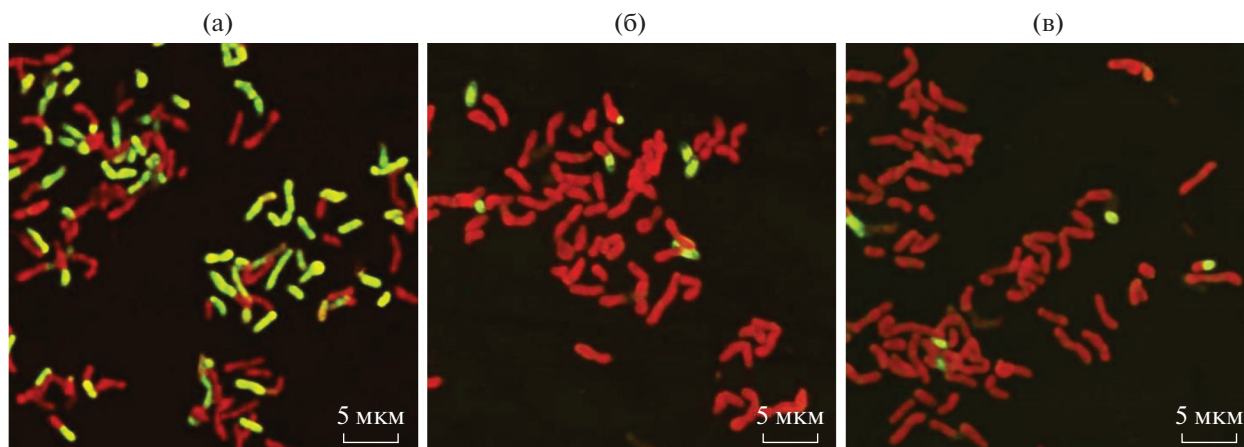


Рис. 1. КЛСМ изображения контрольных клеток *R. ruber* ИЭГМ 231 (а), после их электропорации при 9 кВ/см (б) и 12.5 кВ/см (в); живые клетки светятся зеленым светом, мертвые – красным

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние электропорации на жизнеспособность родококков. Как видно на рис. 1, электропорация при напряжении 9.0 и 12.5 кВ/см вызвала снижение степени жизнеспособности бактериальных клеток на 85 и 96% соответственно ($p < 0.05$), что согласовывалось с данными работ [3, 7]. Так, электропорация при более низком напряжении (7.5 кВ/см) снижала жизнеспособность представителей *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* на 5–17% [3]. В работе гибель клеток объяснялась потерей клеточного содержимого при формировании пор и перекисным окислением липидов мембраны.

Влияние электропорации на антибиотикочувствительность родококков. Как видно на рис. 2, изменение антибиотикочувствительности электропорированных и контрольных клеток *R. ruber* зависело от природы антибиотика и времени последующего восстановления после электропорации. Так, диаметры зоны отсутствия роста электропорированных клеток под действием бензилпенициллина и цефазолина на 1–6 мм превышали контрольные значения в течение всего периода восстановления, при этом характеризуясь сходной динамикой. Чувствительность электропорированных и контрольных клеток к неомицину и клотримазолу изменялась аналогичным образом в первые 4 ч, но становилась различной – к 24 ч культивирования. В то же время по отношению к гентамицину и канамицину наблюдались противоположные изменения чувствительности клеток на протяжении всего периода наблюдения. После 24 ч культивирования антибиотикочувствительность контрольных клеток, как правило, снижалась, а электропорированных – повышалась. При этом если через 0–4 ч после электропорации значения диаметра стерильных зон под действием большинства исследованных антибиотиков превышали контрольные значения лишь на 1–5 мм, то после 24 ч – уже на 4–9 мм. Особенно большие

различия через 24 ч опытных и контрольных значений отмечены по отношению к неомицину (19.2 и 28.0 мм соответственно), гентамицину (29.9 и 36.9 мм) и клотримазолу (14.1 и 18.1 мм). Среди исследуемых антибиотиков наблюдали понижение чувствительности через 4 и 24 ч после электропорации лишь по отношению к канамицину как у контрольных, так и опытных клеток.

Сравнительный анализ изменения антибиотикочувствительности родококков под действием электропорации показал (табл. 1), что чувствительность клеток ко всем антибиотикам за исключением канамицина повышалась в среднем на 16%, причем этот эффект был наиболее выражен у культур после 24-часового периода восстановления и составлял 27% (ANOVA, $p = 0.047$). Это указывало на формирование электропорированными клетками *R. ruber* ИЭГМ 231 значительно более чувствительной к антибиотикам культуры стационарной фазы роста, характеризующейся распадом ветвящегося первичного мицелия на укороченные палочковидные и кокковидные формы (рис. 1). В то же время контрольные клетки в данной фазе роста характеризовались постоянной или несколько пониженной антибиотикочувствительностью (за исключением бензилпенициллина, рис. 2). В работе [11] было показано резкое снижение эффективности электротрансформации клеток родококков в стационарной фазе роста и последующего восстановления трансформантов на среде с ампициллином и тиострептоном по сравнению с экспоненциально растущими клетками.

В целом, наиболее выраженное повышение чувствительности клеток *R. ruber* ИЭГМ 231 после электропорации наблюдалось к антибиотикам бета-лактаманного ряда (цефазолину и бензилпенициллину) и неомицину (табл. 1). Наименьший эффект электропорация оказывала на чувствительность родококков к канамицину, при этом

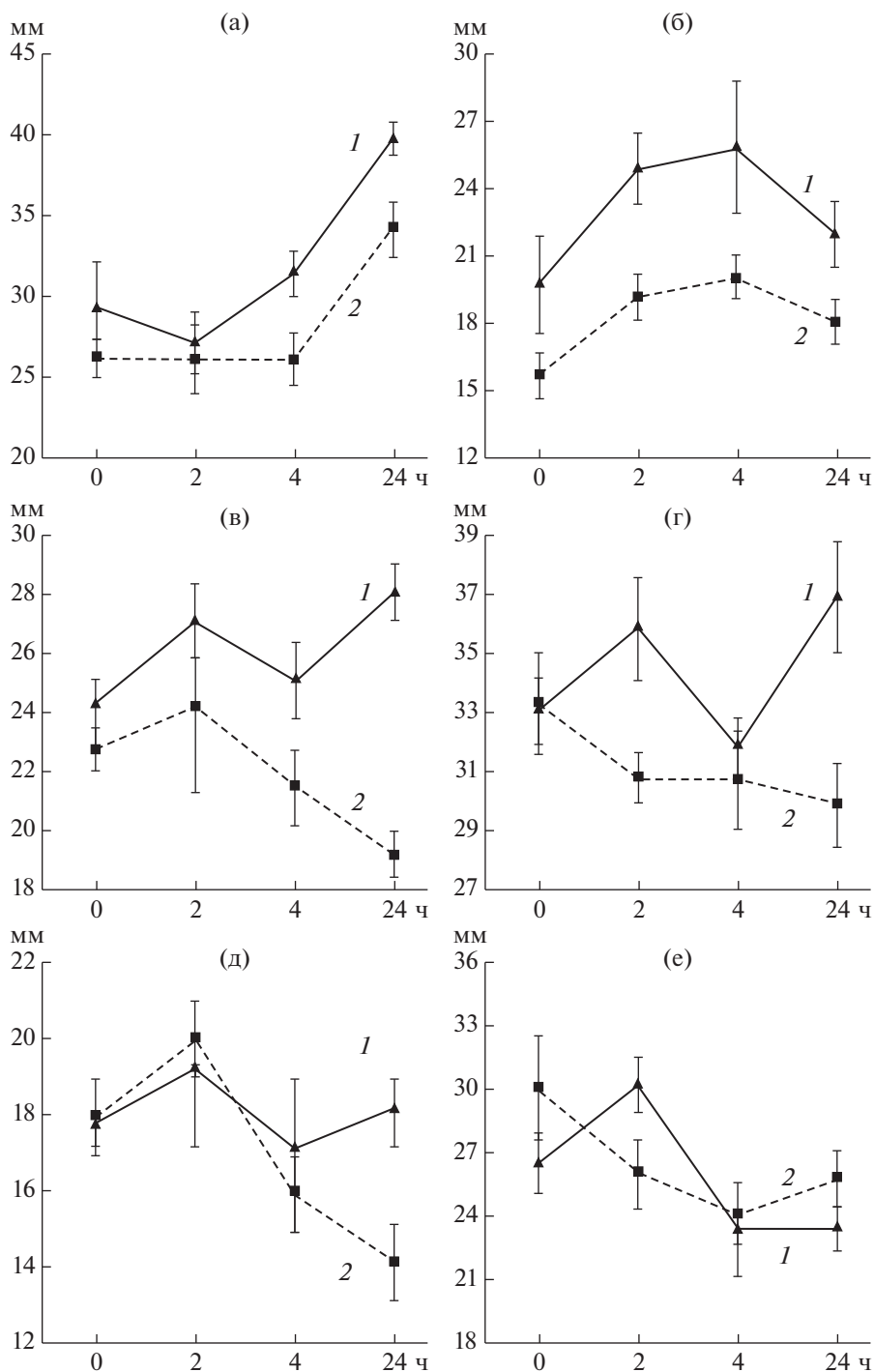


Рис. 2. Зависимость показателя антибиотикочувствительности (1 и 2 диаметр зоны отсутствия роста в опыте и контроле, мм) клеток *R. ruber* ИЭГМ 231 по отношению к бензилпенициллину (а), цефазолону (б), неомицину (в), гентамицину (г), клотримазолу (д) и канамицину (е) от времени их восстановления после электропорации

появление спонтанно устойчивых к канамицину колоний наблюдалось, как в случае электропорированных, так и контрольных клеток. Поскольку при отборе трансформированных клеток ген резистентности к канамицину часто используется в качестве маркерного [8], обнаруженное повышение устойчивости родококков к данному антибиотику,

спонтанное или обусловленное электропорацией, может значительно снижать эффективность их электротрансформации из-за большого числа “ложноположительных” колоний.

Определение чувствительности родококков к различным концентрациям (10–100 мкг/мл) канамицина выявило 60%-ное повышение жизне-

Таблица 1. Изменение антибиотикочувствительности (% к контролю) клеток *R. ruber* ИЭГМ 231 после электропорации

Антибиотик	Время восстановления после электропорации, ч				
	0	2	4	24	Среднее значение
Бензилпенициллин	12.03	3.83	20.42	16.37	13.16
Цефазолин	25.84	29.66	28.86	21.61	26.49
Клотримазол	-0.94	-3.75	7.43	28.30	7.76
Неомицин	6.87	11.91	16.73	46.18	20.42
Гентамицин	-1.00	16.61	3.55	23.66	10.71
Канамицин	-11.76	16.07	-3.01	-9.02	-1.93

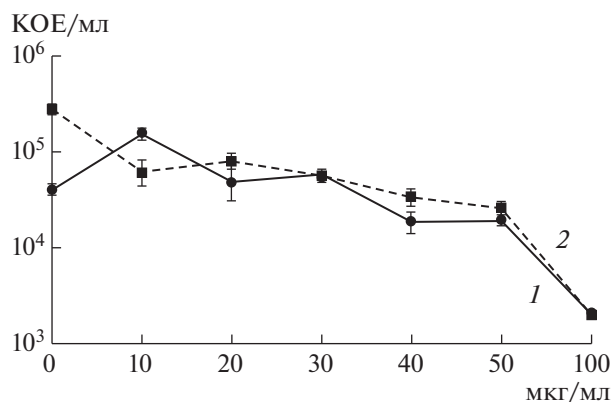
способности электропорированных клеток *R. ruber* ИЭГМ 231 при использовании 10 мкг/мл канамицина и снижение на 38–44% относительно контроля в присутствии более высоких (20 и 40 мкг/мл) концентраций антибиотика (рис. 3). В работе [13] показано, что под воздействием постоянного электрического тока низкого напряжения (0.8 В/см) жизнеспособность почвенных актинобактерий также снижалась на 40% при добавлении в среду субингибиторных (5 мкг/мл) концентраций тетрациклина, хлортетрациклина, и окситетрациклина. Как видно на рис. 3, жизнеспособность электропорированных и контрольных клеток снижалась практически одинаково в присутствии 30, 50 и 100 мкг/мл канамицина, что согласовывалось с данными, полученными дискодиффузионным методом. Таким образом, для отбора трансформантов *R. ruber* с маркером резистентности к канамицину целесообразно использование повышенной (50–100 мкг/мл) концентрации антибиотика в селективной среде.

Влияние электропорации на адгезию родококков к *n*-гексадекану. Проблема формирования биопленок микроорганизмами в экстремальных условиях существования стимулировала изучение воздействия физических факторов на адгезивные свойства клеток. Было показано [14], что воздействие слабого постоянного тока (20–40 мА) способствовало повышению гидрофобности клеточной поверхности и отрицательного заряда смешанной культуры почвенных бактерий-деструкторов фенола, влияя на эффективность их адгезии к различным субстратам. Изменение поверхностных свойств бактерий происходило преимущественно после 3–5 ч воздействия током, при этом более высокая сила тока оказывала более выраженный эффект на клеточную адгезию к *n*-октану.

По полученным данным адгезивная активность клеток *R. ruber* ИЭГМ 231 по отношению к *n*-гексадекану не изменялась через 4 ч после электропорации, однако уровень адгезии клеток к гидрофобному субстрату возрастал от 95.6 до 98% ($p < 0.05$) после 24-часового периода восстановления (рис. 4). Можно предположить, что электропорация приводила к повышению степени гидро-

фобности клеточной поверхности и, как следствие, увеличению адгезии к *n*-гексадекану, но при этом требовалось время для изменения липидного состава и электростатических свойств клеток [12]. Обнаруженное повышение в результате электропорации адгезивной активности родококков к углеводородному субстрату необходимо учитывать при изучении экспрессии генов адгезии к жидким углеводородам у бактерий-нефтедеструкторов с использованием полученных ранее Tn5-мутантных клонов *R. ruber* ИЭГМ 231 [12].

Сделана попытка выявления связи между повышением чувствительности родококков к антибиотикам и их адгезивной активностью к гидрофобному субстрату после электропорации. В результате не было обнаружено статистически значимой корреляции ($R = 0.03$, $p < 0.05$) между гидрофобностью антибиотиков, измеряемой как коэффициент распределения в системе октанол–вода ($\log P_{o/w}$) [15, 16], и повышением чувствительности к ним электропорированных клеток родококков (табл. 2). Тем не менее, отмечено, что чувствительность родококков к наиболее гидрофобным антибиотикам – бензилпенициллину и клотримазолу, в первые 2 ч после электропора-

**Рис. 3.** Жизнеспособность клеток *R. ruber* ИЭГМ 231 после электропорации (2, контроль) и 4 ч инкубации в присутствии субингибиторных концентраций канамицина (1).

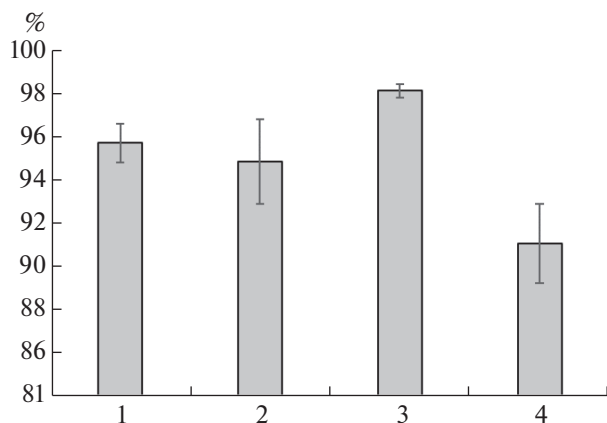


Рис. 4. Адгезия (%) к *n*-гексадекану клеток *R. ruber* ИЭГМ 231, выращенных в среде LB (1, контроль), через 4 (2) и 24 ч (3) после электропорации, спонтанно резистентные к канамицину (4, 200 мкг/мл)

ции практически не отличалась от контрольных показателей и лишь через 4 ч начинала постепенно возрастать (рис. 2). Это согласовывалось с результатами МАТН-теста: степень адгезии клеток к гидрофобному субстрату увеличилась через 24 ч после электропорации, что, по-видимому, облегчало транспорт гидрофобных антибиотиков внутрь клеток вследствие повышения гидрофобности клеточной стенки. В то же время чувствительность клеток к действию наиболее гидрофильных антибиотиков из группы аминогликозидов (неомицина, канамицина и гентамицина) возрастала уже в первые часы после электропорации, а через 24 ч были выявлены разнонаправленные эффекты: повышение чувствительности к неомицину и гентамицину и снижение — к канамицину (рис. 2). Следует отметить, что спонтанные мутанты *R. ruber* ИЭГМ 231, устойчивые к воздействию 200 мкг/мл канамицина, обладали пониженной адгезией к *n*-гексадекану по сравнению с контролем ($p < 0.05$) (рис. 4), что свидетельствовало о специфическом механизме резистентности к данному антибиотику, не связанном с изменением гидрофобности клеточной стенки. Согласно [17], степень гидрофобности клеток

Staphylococcus aureus, *S. saprophyticus* и *Pseudomonas aeruginosa* снижалась на 23–47% в присутствии субингибиторной и повышенной концентрации цефуроксима, цефотаксима и амикацина. Однако результаты других работ [18–21] сильно различались, и зависели от вида бактерий и антибиотика. Например, в работе [21] установлено, что степень гидрофобности клеток *Streptococcus sobrinus* под воздействием субингибиторных концентраций канамицина, гентамицина, стрептомицина, хлорамфеникола, ванкомицина и новобиоцина повышалась на 6–75%, но в присутствии таких же количеств эритромицина, линкомицина, клоксациллина, оксациллина и рифампинома — снижалась на 18–74%. Полученные данные объяснялись влиянием антибиотиков на активность глюкансвязывающих лектинов, увеличение которой приводило к пропорциональному снижению степени гидрофобности клеток, однако механизм этого процесса остался не выясненным.

Полученные в настоящей работе данные свидетельствовали о том, что связь между молекулярной массой антибиотиков и повышением чувствительности к ним родококков после электропорации слабая или совсем отсутствует ($R = -0.03$, $p < 0.05$). Например, увеличение чувствительности к неомицину, в молекуле которого содержится три остатка аминокислот, было в 2 раза выше, чем к содержащему всего два остатка гентамицину (табл. 2). Это согласовывалось с результатами исследования [22] планктонных и иммобилизованных форм коагулазонегативных стафилококков, в котором было показано, что размеры молекул цефазолина, ванкомицина, диклоксациллина, тетрациклина и рифампицина не оказывали видимого эффекта на чувствительность к ним бактериальных клеток.

Таким образом, выявленное в настоящей работе повышение антибиотикочувствительности клеток *R. ruber* ИЭГМ 231 в результате электропорации, коррелирующее с увеличением степени их адгезии к *n*-гексадекану, требует дальнейшего изучения. Полученные результаты могут быть использованы при подборе оптимального режима электротрансформации родококков, в частности,

Таблица 2. Зависимость изменения антибиотикочувствительности электропорированных клеток *R. ruber* ИЭГМ 231 от молекулярной массы и гидрофобности антибиотиков

Антибиотик	M_r , г/моль	$\log P_{o/w}$	Изменение антибиотикочувствительности клеток после электропорации, %
Бензилпенициллин	334.39	1.8	13.16
Гентамицин	477.60	-3.1	10.71
Канамицин	484.50	-6.3	-1.93
Клотримазол	344.84	0.5	7.76
Неомицин	614.64	-7.8	20.42
Цефазолин	454.51	-0.6	26.49

уменьшения напряженности электрического поля для повышения выживаемости клеток, а также сокращения периода их восстановления после электротрансформации и снижения концентрации антибиотика в селективной среде для эффективного отбора рекомбинантных клонов. При этом целесообразно избежать перехода культуры электропорированных клеток *R. ruber* в стационарную фазу роста, при которой значительно возрастает их антибиотикочувствительность.

Работа выполнена в рамках госзаданий ААААА19-119112290010-7 (ИЭГМ УрО РАН) и АААА-А20-120070600010-9 (ПГНИУ) и при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-29-05006).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kotnik T., Frey W., Sack M., Meglič S. H., Peterka M., Miklavčič D. // Trends Biotechnol. 2015. V. 33. № 8. P. 480–488.
2. Kotnik T., Rems L., Tarek M., Miklavčič D. // Ann. Rev. Biophys. 2019. V. 48. № 1. P. 63–91.
3. Yeo S.K., Liong M.T. // J. Sci. Food Agric. 2013. V. 93. № 2. P. 396–409.
4. Blenkinsopp S.A., Khoury A.E., Costerton J.W. // Appl. Environ. Microbiol. 1992. V. 58. № 11. P. 3770–3773.
5. Matl F.D., Obermeier A., Zlotnyk J., Friess W., Stemberger A., Burgkart R. // Bioelectromagnetics. 2011. V. 32. № 5. P. 367–377.
6. Martens S.L., Klein S., Barnes R.A., Trejo Sanchez P., Roth C.C., Ibey B.L. // AMB Express. 2020. V. 10. № 1. P. 1–11.
7. Provenzano D., Trevino V., Ermolinsky B. Handbook of Electroporation / Ed. D. Miclavcic. Berlin, Heidelberg: Springer, 2019. P. 1–22.
8. Fernandes P.J., Powell J.A.C., Archer J.A.C. // Microbiol. 2001. V. 147. № 9. P. 2529–2536.
9. Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Krivoruchko A.V. Microbial Resources: From Functional Existence in Nature to Industrial Applications. / Ed. I. Kurtböke. Amsterdam: Elsevier, 2017. P. 121–148.
10. Kuyukina M.S., Ivshina I.B. Production of Trehalolipid Biosurfactants by *Rhodococcus*. Biology of *Rhodococcus*, 2nd edition. / Ed. H. Alvarez. Springer Nature, 2019. P. 271–298.
11. Shao Z., Dick W.A., Behki R.M. // Lett. Appl. Microbiol. 1995. V. 21. № 4. P. 261–266.
12. Рубцова Е.В., Кююкина М.С., Ившина И.Б. // Прикл. биохимия и микробиология. 2012. Т. 48. № 5. С. 501–509.
13. Li H., Li B., Zhang Z., Zhu C., Tian Y., Ye J. // Ecotoxicol. Env. Safety. 2018. V. 148. № 2. P. 842–850.
14. Luo Q., Wang H., Zhang X., Qian Y. // Appl. Environ. Microbiol. 2005. V. 71. № 1. P. 423–427.
15. Organic Pollutants in the Water Cycle: Properties, Occurrence, Analysis and Environmental Relevance of Polar Compounds. / Ed. T. Reemtsma, M. Jekel. Weinheim: John Wiley & Sons, 2006. 350 p.
16. Пшенкина Н.Н., Софронов Г.А. // Общая реаниматология. 2011. Т. 7. № 3. С. 14–18.
17. Kustos T., Kustos I., Kilár F., Rappai G., Kocsis B. // Chemother. 2003. V. 49. № 5. P. 237–242.
18. Savoia D., Malcangi A., Martinetto P. // J. Chemother. 1990. V. 2. № 1. P. 20–25.
19. Wojnicz D., Jankowski S. // Int. J. Antimicrob. Agents. 2007. V. 29. № 6. P. 700–704.
20. Furneri P.M., Garozzo A., Musumarra M.P., Scuderi A.C., Russo A., Bonfiglio G. // Int. J. Antimicrob. Agents. 2003. V. 22. № 2. P. 164–167.
21. Wu Q., Wang Q., Taylor K.G., Doyle R.J. // J. Bacteriol. 1995. V. 177. № 5. P. 1399–1401.
22. Cerca N., Martins S., Cerca F., Jefferson K.K., Pier G.B., Oliveira R., Azeredo J. // J. Antimicrob. Chemother. 2005. V. 56. № 2. P. 331–336.

Electroporation Effects on *Rhodococcus ruber* IEGM 231 Antibiotic Susceptibility and Adhesive Activity Towards *n*-Hexadecane

M. S. Kuyukina^{a, b, *}, A. M. Varushkina^{a, b}, and I. B. Ivshina^{a, b}

^aInstitute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, 614081 Russia

^bPerm State University, Perm, 614990 Russia

*e-mail: kuyukina@iegm.ru

Electroporation effects on viability, antibiotic susceptibility and adhesive activity of *Rhodococcus ruber* IEGM 231 towards *n*-hexadecane were investigated. An 85–96% reduction of cell viability was observed after electroporation at 9 and 12.5 kV/cm. As a result of electroporation, the antibiotic susceptibility of rhodococci increased by 8–46% towards benzylpenicillin, gentamicin, clotrimazole, neomycin and cefazolin. Different dynamics of antibiotic susceptibility was revealed depending on the antibiotic used and the cell recovery time after electroporation. The highest antibiotic susceptibility correlated with increased adhesion to hydrocarbon was recorded for electroporated cells after a 24 h recovery period corresponding to the culture entrance into the stationary growth phase. However, spontaneous mutants of *R. ruber* IEGM 231 resistant to 200 µg/ml of kanamycin were characterized by reduced cell wall hydrophobicity. These findings can be used for electrotransformation of hydrocarbon-oxidizing rhodococci in order to increase the efficiency of recombinant clone selection by reducing the cell recovery period and lowering the antibiotic concentration in a selective medium.

Keywords: actinobacteria, *Rhodococcus*, electroporation, antibiotic susceptibility, hydrophobicity, cell adhesion