

Л.М. Бурова¹, Ф.И. Товкач², А.И. Кушкина², В.С. Брицкая¹

¹Львовский национальный медицинский университет им. Данила Галицкого,
ул. Пекарская, 69, Львов, 790014, Украина

²Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, ГСП, D03680, Украина

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЛАБОРАТОРНЫХ ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI* ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ КОЛИЦИНОГЕННОСТИ

Для изучения колициногенности предложена индикаторная система, включающая лабораторные штаммы *Escherichia coli* K12, K12-C600, BE и C-Ia. С ее помощью установлено, что 32 из 100 пациентов с нарушением эубиозов толстой кишки несут колицинопродуцирующий штамм *E. coli*. Частота встречаемости колициногенных штаммов эшерихий увеличивается с возрастом пациентов. В группе годовалых детей только 24 % штаммов *E. coli* образуют активные колицины. У подростков и взрослых людей частота колициногенных штаммов возрастает до 33 и 42 % соответственно. Основной особенностью полимикробных ассоциаций, в которых преобладающий штамм *E. coli* сопровождается 3–5 штаммами других энтеробактерий, является строгое уменьшение общей активности колицинов. По чувствительности к колицинам индикаторные штаммы располагаются в следующем порядке: K12-C600 (84 %), K12 (69%), BE (63%) и C-Ia (47%). Несмотря на это, низкочувствительные штаммы могут быть полезными для идентификации высокоспецифичных колицинов. Поскольку лабораторные штаммы *E. coli* K12, BE и C-Ia являются хозяевами для специфичных бактериофагов, индикаторная система на их основе может быть полезной для изучения взаимосвязи между колицинами и колифагами, а также плазмидами и системами рестрикции-модификации.

Ключевые слова: энтеробактерии, *Escherichia coli*, колициногенность, индикаторы колицинов.

В природе бактерии существуют в сложных многокомпонентных биоцинозах, внутри которых формируются характерные взаимоотношения, способствующие сохранению и “процветанию” отдельных микробных популяций [1]. В поддержании видового разнообразия бактериальных популяций задействованы многие факторы, одним из которых является антагонизм с участием бактериоцинов.

Антагонистическая активность бактериоцинов может распространяться не только на бактерии одного и того же вида, но и на представителей других родов. В целом, такое конкурентное взаимодействие бактерий может проявляться в угнетении их развития и вытеснении из первичного сообщества. Скорее всего, в условиях конкуренции бактериоциногенные микроорганизмы имеют селективные преимущества, хотя имеется мало доказательств, касающихся этого положения, а экологическая роль бактериоциногенности до сих пор не вполне понятна [2, 10]. Тем не менее, бактериоциногенность должна учитываться в области практической медицины. Такой учет важен для понимания динамики формирования и развития микрофлоры при возникновении болезней и протекании инфекционных процессов, особенно, в случаях разнообразных заболеваний кишечного тракта человека. Он строго необходим при анализе эпидемиологических ситуаций, а также в случае создания условий для нормализации микробиоценоза организма человека [2].

По понятным причинам, наиболее изученной в настоящее время является бактериоциногенность (колициногенность) у *Escherichia coli* [10], которая характеризуется огромным набором колицинов с различной специфичностью и механизмами действия на чувствитель-

© Л.М. Бурова, Ф.И. Товкач, А.И. Кушкина, В.С. Брицкая, 2010

ные клетки [7]. Частота встречаемости колициногенных штаммов среди человеческих изолятов *E. coli* варьирует в широком диапазоне – от 9 до 80 %. Эта огромная разница частично объясняется антропологическими, этическими и гигиеническими факторами, которые влияют на микрофлору человеческого кишечника. Наиболее вероятно, что она проявилась также вследствие использования нестандартных методов и индикаторных систем, применяемых во многих лабораториях, что отразилось на достоверности результатов [10].

В этом исследовании мы впервые изучили возможность использования общеизвестных лабораторных штаммов эшерихий в качестве стандартных индикаторов для обнаружения и исследования колициногенности штаммов *E. coli*, которые входят в состав микробиоценоза толстой кишки пациентов с клинико-микробиологическими изменениями в желудочно-кишечном тракте.

Материалы и методы. Отбор материала проводили при анализе микробного пейзажа испражнений 100 пациентов, возрастом от 2-х недель до 57 лет. Исследования нарушений эубиоза проводили согласно действующим документальным рекомендациям [4]. Энтеробактерии идентифицировали с помощью тестов Enterotest I и Enterotest II (Lahema, Чехия)

Способность *E. coli* синтезировать колицины устанавливали методом [3,5]. Для этого штаммы кишечной палочки выращивали 24 часа при 37 °С до отдельных макроколоний на тестовых чашках Петри с 2 % МПА. Непосредственно перед использованием, бульонные суспензии индикаторных штаммов подращивали 6 час в МПБ при 37 °С. Чашки с макроколониями исследуемых культур обрабатывали парами хлороформа на протяжении 50 мин. Следующие 2,5 час их подсушивали на воздухе под ультрафиолетом. Свежие бульонные культуры индикаторных штаммов объемом 0,1 мл смешивали с 5 мл расплавленного и затем охлажденного до 48 °С 0,7% МПА. Этой смесью заливали предварительно подготовленные тестовые чашки, быстро распределяя ее по поверхности агара с макроколониями.

Учет результатов проводили после инкубации чашек при 37 °С, 24 часа. Если вокруг макроколонии наблюдали заметную зону ингибирования индикатора, данный штамм рассматривался в качестве продуцента колицина. Уровни киллерной активности выражали условными показателями – от одного до четырех плюсов (от “+” до “++++”). Колициновая активность низкого уровня, когда на газоне индикатора образовывались зоны диаметром от 7 до 16 мм, была выражена показателем “+”. Средний и высокий уровень активности обозначались “++” и “+++”; их характеризовали зоны ингибирования с диаметрами 17-26 и 27-36 мм соответственно. Очень высокий уровень был показательным для колицинов, которые образовывали зоны размером от 37 до 46 мм, поэтому для него использовали показатель “++++”.

В качестве индикаторных применяли стандартные лабораторные штаммы *E. coli*: K12, K12-S600, BE и C-Ia групп K, B и C. Бактерия *E. coli* M-17, компонент пробиотика „Колибак-терин”, была использована как дополнительный колициночувствительный штамм.

Результаты и их обсуждение. В наших исследованиях пациенты обоих полов были условно разделены на три возрастные категории: 1) дети до года – 42 человека; 2) дети до 15 лет – 27 человек; 4) взрослые – 31 человек.

У всех пациентов наблюдали изменения в эубиозе толстой кишки. Обнаруживали уменьшения бифидум- и лактобактерий, а также количественные и качественные изменения в спектре условно-патогенных энтеробактерий, стафилококков, энтерококков и грибов рода *Candida*.

Спектр грамотрицательных микробов был представлен 198 штаммами родов: *Escherichia* – 105 штаммов, из которых 10 штаммов – гемолитические *E. coli*; *Klebsiella* – 30 штаммов, из которых 10 штаммов – *K. pneumoniae*, 20 штаммов – представители *K. mobilis*; *Citrobacter* – 38 штаммов, представленные 10 штаммами *C. freundii* 28 штаммами *C. koseri*; *Pantoea* – 15 штаммов *P. agglomerans*; *Enterobacter* (*E. cloacae*) – 5 штаммов; *Proteus* (*P. mirabilis*) – 1 штамм; *Providencia* – 2 штамма, из них 1 штамм *P. rettgeri* и 1 штамм *P. stuartii*; *Morganella* (*M. morganii*) – 1 штамм; *Serratia* (*S. marcescens*) – 1 штамм.

Скрининг бактерий на наличие синтеза активных колицинов показал, что 32 из 100 исследуемых штаммов *E. coli* являются бактериоциногенными. Встречаемость колициногенных штаммов у больных дисбактериозом, обнаруженная нами, очень близка к показателю 30 % для эшерихий из различных источников [9], но ниже такового, установленного для кишечника здоровых людей – 42 % [10]. Десять из этих 32 штаммов были выявлены у детей до 1 года,

9 штаммов – у детей до 15 лет и 13 штаммов – у взрослых пациентов. С учетом общего количества пациентов в каждой из трех возрастных групп наблюдается тенденция увеличения количества колициногенных штаммов с увеличением возраста, тогда как в группе годовалых детей только 24 % штаммов кишечной палочки образуют активные колицины. У подростков и взрослых пациентов частота встречаемости таких бактерий существенно увеличивается – до 33 и 42 % соответственно.

Далее определяли видовой состав энтеробактерий в микробиоценозе толстой кишки пациентов, у которых обнаруживается колициногенный штамм *E. coli* (фенотип Col⁺). Оказалось, что этих пациентов можно разделить на три группы. К первой группе были отнесены те из них, у которых кишечная палочка была ассоциирована с 3–5 другими энтеробактериями из списка, приведенного выше, т.е. входила в состав полимикробной ассоциации. Во вторую группу включали пациентов с диассоциациями, т.е. таких, которые имели двойную популяцию энтеробактерий. В третью группу входили пациенты, в толстой кишке которых не обнаруживали других энтеробактерий, кроме колицинообразующей *E. coli* (монокультура).

Основные особенности колициногенности *E. coli* при нарушениях зубиозов исследовали, устанавливая уровни киллерной активности колицинов и характер их действия на все пять индикаторных штаммов. Некоторые показательные примеры этих исследований представлены в табл. 1.

Анализ полученных данных показал, что для полимикробных ассоциаций характерны следующие особенности. Во-первых, восемь Col⁺-штаммов, входящие в эти ассоциации, несли высокоактивные колицины, эффективно убивающие клетки индикаторов. Очень высокий уровень активности характерный для колицина из *E. coli* 19, обнаружен у самого маленького пациента – ребенка возрастом две недели. Этот Col⁺-штамм сопровождался тремя энтеробактериями – *C. koseri*, *C. freudii* и *P. rettgeri*.

Во-вторых, в этой группе пациентов мы выявили очень интересную закономерность: наиболее активные колицины характеризуют Col⁺-штаммы четырех самых молодых пациентов – возрастом от 2 недель до 3 месяцев. С увеличением возраста (11, 20, 22 и 55 лет) наблюдается строгая тенденция к уменьшению не только уровней активности колицинов, но и количества, убиваемых ими, индикаторных штаммов.

Таблица 1

Колициногенная активность штаммов *E. coli* изолированных из толстой кишки пациентов с дисбактериозами

№ Col ⁺ -штамма	Возраст пациента (годы)	Индикаторный штамм <i>E. coli</i>					Общее количество энтеробактерий
		К 12	М 17	К12-С600	ВЕ	С-1а	
1	>1	++	+	++	+	++	5
19	>1	++++	++	++++	++++	+	4
58	20	+	+	+	+	-	3
31	55	+	+	-	-	-	3
40	7	+++	++	++++	+++	+++	2
17	5	-	+	-	-	-	2
22	>1	-	-	++	-	-	2
33	23	-	-	-	+	-	2
99	40	-	-	+	-	-	2
20	22	+	-	+	-	-	1
30	>1	++	-	++	-	-	1
38	2	+++	++	+++	+++	++	1
100	31	+++	++++	+++	++++	++++	1

Примечания: «-» - активность колицинов не обнаружена; «>1» - менее одного года.

Совершенно противоположная тенденция просматривается в группе из 15 пациентов с наличием диассоциации. В этих случаях активные колицины, как правило, выявляются у Col⁺-штаммов полученных от людей в возрасте от 7 до 51 года (всего 4 человека), тогда как дети

в возрасте от 4 месяцев до 5 лет (всего 7 человек) имеют колициногенные штаммы с бактериоцинами низкой активности. У *E. coli* из диассоциаций обнаружены четыре специфические колицина (штаммы 17, 22, 33 и 99), активность которых определяется только на штаммах-индикаторах М-17, К12-С600 и ВЕ (табл.1).

Среди штаммов монокультуры выявлены как высокоактивные колицинообразующие бактерии (штаммы 38 и 100, табл. 1, рисунок), так и те, которые несут бактериоцины низкого и среднего уровней активности. К колицинам этих групп индикаторные штаммы ВЕ, С-Ia и М-17 проявляют пониженную чувствительность. В отличие от двух предыдущих, в данной группе пациентов какой-либо связи между возрастом и активностью колицинов не обнаружено.

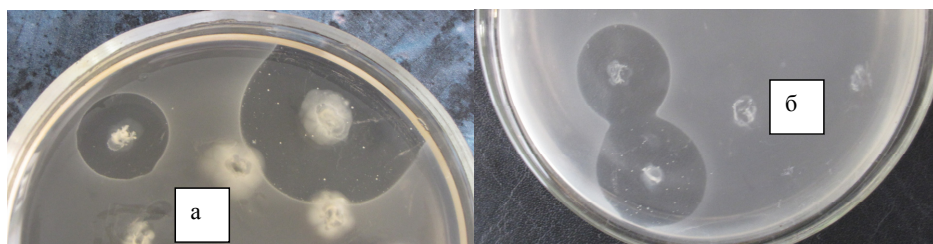


Рисунок. Зоны угнетения роста вокруг макроколоний Col⁺-изолятов 38 и 100 на газонах индикаторных штаммов *E.coli* C-Ia (а) и K12-C600 (б)

Таким образом, колициногенность штаммов ешерихий, персистирующих не только во множественном окружении, но и в условиях диассоциаций, а также в монокультуре, в первую очередь, характеризуется большим разнообразием колицинов. Оно отражает активную микробную динамику в толстой кишке пациентов, которая состоит в замене одних штаммов *E. coli* на другие и удалении энтеробактерий из микробного сообщества. Скорее всего, эти процессы во многом зависят от киллерного потенциала бактериоцинов тех бактерий, которые в данный момент времени и в данных условиях являются активными участниками антагонистических взаимоотношений.

Оценка эффективности предложенной нами индикаторной системы, которая включает четыре общеизвестных лабораторных штамма *E. coli* групп К (К12, К12-С600), В (ВЕ) и С (С-Ia), а также дополнительный штамм М-17, была проведена на основе учета простых показателей (табл. 2).

Таблица 2

Показатели эффективности индикаторной системы для определения бактериоциногенности клинических изолятов *E. coli*

Штамм-индикатор	Штамм-индикатор*				
	К12	К12-С600	М-17	ВЕ	С-Ia
К12		0,78	0,59	0,53	0,59
К12-С600	0,63		—	—	—
М-17	0,46	—		—	—
ВЕ	0,44	—	0,44		0,59
С-Ia	0,38	—	0,34	0,34	
Эффективность (%)**:					
Выборка 1	69	84	65	63	47
Выборка 2	22	27	21	20	15

*- вверху и справа от косой линии представлена доля общих совпадений результатов определения активности колицинов (C₁) без учета ее уровня при попарном рассмотрении индикаторов; слева и внизу – совпадение только положительных результатов – C₂ (наличие зон ингибирования возле макроколоний). См. текст.

** - «выборка 1» - положительные результаты определения колицинов в группе из 32 Col⁺-штаммов *E. coli*; «выборка 2» - эффективность определения колицинов для 100 штаммов *E. coli* с фенотипами Col⁺ и Col⁻.

«—» - вычисления не проводили.

Для пары индикаторов (например, K12 и BE) подсчитывали долю совпадающих результатов:

$$C_{1(K12/BE)} = \sum (P^{+/+} + P^{-/-})/32$$

где, $P^{+/+}$ - наличие чувствительности к колицину у обеих индикаторных штаммов; $P^{-/-}$ - отсутствие чувствительности у K12 и BE; „32” – общее количество колицинов. Долю положительных совпадений определяли только по наличию чувствительности к колицинам двух индикаторов одновременно:

$$C_{2(K12/BE)} = \sum (P^{+/+})/32$$

Анализ данных показал, что наиболее схожими по чувствительности к колицинам являются штаммы K12 и K12-C600, которые в общем совпадают на 78 % и при совместном использовании приводят к 63 % положительных определений колициногенности (табл. 2). Эти факты могут быть объяснены очень близким генетическим родством данных бактерий – C600 является полиауксотрофным штаммом, производным от K12, и, в отличие от своего родителя, не содержит профага лямбда и F-плазмиды [6]. Возможно, за счет этих особенностей, применение индикатора K12-C600 позволило идентифицировать 84 % колициногенных эшерихий, что соответствует 27 % от общего объема выборки, которая включает 100 штаммов с фенотипами Col⁺ и Col⁻. Эффективность определения колицинов с использованием индикатора K12-C600 в 1,2 раза больше, чем таковая для родительского штамма K12, и в 1,8 раза больше, чем для штамма C-Ia.

Данные представленные в табл. 2 свидетельствуют о том, что индикаторные штаммы по уменьшению их чувствительности к колицинам можно расположить в следующем порядке: K12-C600 (84 %), K12 (69 %), M-17 (65 %), BE (63 %) и C-Ia (47 %). Из этого ряда следует, что слабочувствительные индикаторы могут быть исключены из системы без значительной потери ее общей эффективности. Однако известно, что встречаются колицины, например такие как L и Js, для индикации которых необходимы особые чувствительные штаммы [10]. Действительно, мы обнаружили, что колициногенность двух штаммов может быть определена только при использовании индикатора M-17 или BE, тогда как установление признака Col⁺ у двух других эшерихий возможно исключительно с помощью *E. coli* K12-C600. С другой стороны, пул колицинов, может быть множественным и включать киллерные факторы, различающиеся по характеру действия и специфичности [8]. Учет этого явления невозможен без набора разнообразных индикаторов.

Чувствительность к колицинам, или эффективность их определения, однозначно коррелирует со степенью попарных совпадений чувствительности разных индикаторов (см. выше, табл. 2). Значительное уменьшение этих совпадений с *E. coli* K12 у BE (46 %) и C-Ia (38 %) указывает не только на принципиальное различие в специфичности колицинов, но и на разную восприимчивость клеток индикаторных эшерихий групп K, B и C к их киллерному действию. Эта особенность открывает возможность для более основательного изучения колициногенности на уровне взаимодействия пептидных киллеров с бактериальной клеткой.

Использованные в наших исследованиях индикаторы колицинов *E. coli* K12, BE и C-Ia, как известно, являются хозяевами для трех наиболее изученных фаговых систем – лямбдоидных фагов, фагов серии T и P-фагов соответственно. Поэтому, предложенная нами индикаторная система может оказаться полезной для изучения взаимосвязи между колицинами и колифагами, а также такими автономными генетическими элементами *E. coli* как плазмиды и системы рестрикции-модификации.

Таким образом, из полученных данных следует, что к особенностям колициногенности клинических изолятов *E. coli*, выделенных от пациентов с дисбиозами толстой кишки можно отнести динамическое изменение состава ее энтеробактериальной микрофлоры. Эта динамика пока не вполне понятна, однако можно заключить, что она зависит от возраста пациента и от активности колицинов, того штамма *E. coli* Col⁺, который превалирует в микробной ассоциации. Система предложенных в работе индикаторов, которая включает лабораторные штаммы *E. coli* K, B и C, является эффективной и адекватной для изучения колициногенности.

Индикаторный штамм E. coli C-Ia, использованный в работе, совместно с другими штаммами группы C любезно предоставлен в коллекцию бактерий и фагов отдела молекулярной генетики бактериофагов ИМБ НАН Украины Dr. J. Bertani, Dr. G. Deho и Dr. E. Haggard-Ljungquist за что авторы выражают огромную признательность.

Л.М. Бурова¹, Ф.І. Товкач², А.І. Кушкіна², В.С. Брицька¹

¹Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького

²Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ

ВИКОРИСТАННЯ ЛАБОРАТОРНИХ ШТАМІВ *ESCHERICHIA COLI* ДЛЯ ВИВЧЕННЯ КОЛІЦИНОГЕННОСТІ

Резюме

Для вивчення коліциногенності запропоновано індикаторну систему, яка складається з лабораторних штамів *E. coli* K12, K12-C600, BE та C-Ia. За її допомогою встановлено, що 32 із 100 пацієнтів з порушеннями в еубіозах товстої кишки несуть коліцинопродукуючий штам *E. coli*. Виявлено, що коліциногенні штами ешеріхій зустрічаються частіше у пацієнтів старшого віку. В групі однорічних дітей тільки 24 % штамів *E. coli* утворюють активні коліцини. У підлітків і дорослих частота виявлення коліциногенних штамів зростає до 33 та 42 % відповідно. Головною особливістю полімікробних асоціацій, в яких превалюючий штам *E. coli* супроводжується 3–5 штамми інших ентеробактерій, є чітке зниження загальної активності коліцинів. За чутливістю до коліцинів індикаторні штами розташовуються в такому порядку: K12-C600 (84%), K12 (69%), BE (63%) і C-Ia (47%). Не дивлячись на це, низькочутливі штами можуть бути корисними для ідентифікації дуже специфічних коліцинів. Оскільки лабораторні штами *E. coli* K12, BE і C-Ia є хазяями для специфічних бактеріофагів, індикаторна система на їх основі може бути корисною для вивчення взаємозв'язку між коліцинами і коліфагами, а також плазмідами і системами рестрикції-модифікації.

Ключові слова: ентеробактерії, *Escherichia coli*, коліциногенність, індикатори для коліцинів.

Л.М. Бурова¹, Ф.І. Товкач², А.І. Кушкіна², В.С. Брицька¹

¹Danylo Halytsky Lviv National Medical University

²Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,

National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

USING THE LABORATORY STRAINS OF *ESCHERICHIA COLI* FOR STUDYING COLICINOGENICITY

Summary

The indicator system which includes laboratory strains of *Escherichia coli* K12, K12-C600, BE, and C-Ia is offered for studying colicinogenicity. It has helped to establish that 32 of 100 patients with dysbacterioses of colon carry a colicin-producing strain of *E. coli*. A tendency is discovered to the increase of occurrence of colicinogenic strains of escherichias with patients' age. Only 24 % of *E. coli* strains form active colicins in a group of one-year old children. Frequency of colicinogenic strains occurrence increases to 33 and 42 %, respectively, in teenagers and adult patients. A strict decrease of total activity of colicins is the main peculiarity of polymicrobe associations in which the prevailing strain of *E. coli* is accompanied by 3-5 strains of other enterobacteria. As to their sensitivity of colicins the indicator strains are arranged in the following order: K12-C600 (84%), KR (69%), BE (63%) and C-Ia (47%). In spite of that, the low-sensitive strains can be effective for identification of very specific colicins. Since the laboratory strains of *E. coli* K12, BE and C-Ia are the hosts for specific bacteriophages of *E. coli*, the indicator system on their basis may be useful for studying the interrelation between colicins and coliphages, as well as plasmids and restriction-modification systems.

The paper is presented in Russian.

Key words: enterobacteria, *Escherichia coli*, colicinogenicity, indicators for colicins.

The author's address: Burova L.M., Danylo Halytsky Lviv National Medical University; 69 Pekarskaya St., Lviv, 790014, Ukraine.

1. Горелов А.В., Усенко Д.В. Роль микрофлоры желудочно-кишечного тракта и принципы коррекции нарушений ее состава // Русский медицинский журнал. – 2008. – 16, № 19. – С. 1–6.
2. Егоров Н.С., Баранова И.П. Бактериоцины. Образование, свойства, применение // Антибиотики и химиотерапия. – 1999. – № 6. – С. 33–40.
3. Информационное письмо по типированию колицинов, выделенных возбудителями дизентерии и других кишечных инфекций. – Киев, 1979. – 8 с.
4. Клиническая лабораторная аналитика // Под ред. В.В. Меньшикова. – Москва: Агат-Мед, 2003. – Т. IV. – 815 с.

5. Колтукова Н.В., Серебрякова Т.Л., Яновська В.В. Коліциногенна активність та чутливість до антибіотиків колекційних і свіжовиділених штамів *Shigella flexneri* та *Shigella sonnei* // Мікробіол. журн. – 2005. – **67**, № 5. – С. 69–79.
6. Bachmann B.J. Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12 // Bacteriol.Rev. – 1972. – **36**, N 4. – P. 525–557.
7. Cascales E., Buchanan S. K., Duche D., Kleanthous C., Lloubes R., Postle K., Riley M., Slatin S., Cavard D. Colicin Biology // Microbiol. Mol.Biol.Rev. – 2007. – **71**, N1. – P. 158–229.
8. Gordon D.M., O'Brien C.L. Bacteriocin diversity and the frequency of multiple bacteriocin production in *Escherichia coli* // Microbiology. – 2006. – **152**, N11. – P. 3239-3244;
9. Riley M. A., Gordon D. M. The ecology and evolution of bacteriocins // J. Industr. Microbiol. – 1996. – **17**, N1. – P. 151–158.
10. Smarda J., Obdrzalek V. Incidence of colicinogenic strains among human *Escherichia coli* // J. Basic Microbiol. – 2001. – **41**, N6. – P. 367–374.

Отримано 14.04.2009