

<https://doi.org/10.32782/2786-9067-2023-25-3>

УДК 57.088.7:616.34-088.8:579.842.1/2

КОЛІЦИНОГЕННІСТЬ ТА ПЛАЗМІДНИЙ СПЕКТР ЯК ПОКАЗНИКИ ДИНАМІЧНОГО СТАНУ ПОПУЛЯЦІЙ КИШКОВОЇ ПАЛИЧКИ

Бурова Л. М.

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Львів, Україна

*Анотація. Кишкова мікрофлора є однією з найскладніших екосистем, часто розглядається як окремий орган людського організму. В роботі представлено дослідження наявності і кількості плазмід, виділених із штамів *E.coli*, ізольованих з кишечника пацієнтів різної вікової категорії. Особливо акцентується увага на бактеріоцинах (коліцинах). Бактеріоцини – це антимікробні пептиди, які виробляються бактеріями для конкуренції з іншими бактеріями за поживні речовини та екологічні ніші. Антимікробна дія цих пептидів на популяції бактерій у кишечнику, ймовірно, є динамічною, оскільки виживання мікробів у цьому середовищі залежить як від конкуренції, так і від співіснування.*

Ключові слова: *коліцини, бактеріоцини, плазмід, кишечник*

Вступ. Мікроорганізми існують в складних багатокомпонентних спільнотах - біоценозах, всередині яких формуються характерні взаємовідношення, які сприяють збереженню життєздатності мікробних популяцій, утворюючи єдину екологічну систему взаємовигідних симбіотичних відносин. Однією зі стратегій, які використовують бактерії, щоб гарантувати свій ріст у спільнотах, є антагонізм, який ефективно обмежує ріст інших мікроорганізмів [1].

Сучасні молекулярно-генетичні методи дозволили виявити близько 500 видів бактерій в кишечнику людини, серед яких *Escherichia coli (E.coli)* є одним з найважливіших симбіонтів товстої кишки [2]. Неоднорідність популяції кишкової палички зумовлює її полігональність різноманітних фенотипових проявів, вивчення яких залишається актуальним і сьогодні [3].

Бактерії, археї, еукарії та віруси співіснують в кишечнику людини, і це співіснування функціонально врівноважується симбіотичними або антагоністичними відносинами. Антагонізм часто характеризується продукуванням антимікробних сполук проти інших організмів, які займають ту ж екологічну нішу. Така спільна еволюція в кишечнику є поштовхом до розробки спеціалізованих антимікробних препаратів, які привертають підвищену увагу, оскільки вони можуть служити новими альтернативами антибіотикам і таким чином допомогти вирішити глобальну проблему антимікробної стійкості. Шлунково-кишковий (ШКТ) особливо підходить для пошуку нових антимікробних препаратів завдяки величезній кількості мікробів, які його заселяють [4].

Плазміди –позахромосомні молекули ДНК, які в своєму складі несуть відповідні гени (наприклад стійкості до антибіотиків, продукції коліцинів, факторів патогенності, F-фактор-кон'югативні плазміди (забезпечують процес формування пілів та транспорт ДНК) [5]. Так, R-плазміди - завжди несуть гени (один чи більше), що кодують білки, інактивуючі антибіотики [6]. Коліцинові плазміди кодують варіанти коліцинів та аналогічні білки (бактеріоцини). Останні відіграють велику роль в природних бактеріологічних спільнотах, синтез цих речовин має значення для конкуренції всередині популяції і між ними, тобто в інгібуванні розвитку інших бактерій, що володіють схожими поживними потребами [7].

Велике значення має використання бактеріоциногенії в медицині:

- при аналізі умов, які сприяють виникненню бактеріальних інфекцій [8];
- при вивченні динаміки мікрофлори в здорових і хворих людей [9];
- при розробці деяких питань патогенеза кишкових і інших інфекцій;
- з метою епідеміологічного аналізу;
- для нормалізації мікробного ценоза [10, 11].

Мета дослідження. Встановлення ролі *E. coli* в ентеробактеріальних асоціаціях товстої кишки. На основі фенотипових ознак, як плазмідний спектр, коліциногенність охарактеризувати штами кишкової палички, які персистують у пацієнтів з порушенням еубіоза кишечника.

Матеріали та методи досліджень. Обстежено мікробний пейзаж випорожнень 50 пацієнтів різного віку. Обстежені пацієнти були розділені на вікові групи: 1) діти до року - 21 особа; 2) діти до 14 років - 13 осіб; 3) підлітки (15-17 років) - 1 особа; 4) дорослі – 15 осіб. Виділені мікроорганізми досліджували за морфологічними, культуральними, біохімічними властивостями відповідно до чинних методичних матеріалів. Виділену чисту культуру *E.coli* ідентифікували за допомогою тестів Lachema (Чехія) - Enterotest I та Enterotest II.

Досліджувані клони перевіряли на наявність плазмідної ДНК, за допомогою лужного методу [12]. Напряга електричного поля становила 6-10 В/см. Час розділення 4-6 години. Для визначення розміру в якості стандарту використовували ДНК плазміди F (*E. coli* K12).

При виявленні біосинтезу коліцинів користувались методом, розробленим співробітниками ІЕІХ АМН України [13,14]. З метою виявлення спектру активності в якості індикаторних штамів використовували стандартні лабораторні штами *E. coli*: K12, BE та *E.coli* M-17 (виділений з пробіотику „Колібактерин”).

Результати та їх обговорення. При вивченні видового складу ентеробактерій встановили, що у 14 (28%) пацієнтів виділили монокультуру, у решти, 36 пацієнтів (72%) – асоціацію мікроорганізмів (*E coli* та штам УПМ, як: *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Pantoea*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Providencia*, *Morganella*). Цілком логічно, що з віком змінюється

видовий склад мікрофлори кишечника, що й підтверджується експериментально. Більша частина виділених штамів кишкової палички зустрічалась в складі асоціації з іншими видами умовно-патогенних ентеробактерій. Вивчення вище вказаних фенотипів у штамів кишкової палички підтвердило те, що вони знаходяться в тісній взаємодії з іншими членами кишкової мікробної асоціації.

При визначенні антагоністичної активності досліджуваних клінічних штамів *E.coli* виявили, що 32 штами володіють коліцинопродуруючими властивостями. З них 10 штамів виявили у дітей до 1 року, 8 штамів – до 14 років, 1 штам виявлений у пацієнта 15 років, 13 штамів – у дорослих. Від загальної досліджуваної групи (50 досліджуваних штамів) це становило відповідно 31%-25%-3%-41% (табл.1).

Таблиця 1

Продукція коліцинів штамами *Escherichia coli*, ізольованих від пацієнтів
різної вікової категорії

	Вікова категорія				Загальна кількість
	Діти до 1 року	До 14 років	15-17 років	дорослі	
Кількість штамів	21	13	1	15	50
Коліциногенність (абсолютне число / у %)	10/31%	8/25%	1/3%	13/41%	32/100%
Наявність плазмід	34/77%		1/2%	9/21%	44/100%

86% штамів, виявлених в монокультурі містять плазміди. 67% з них виявились поліплазмідними, а 58% несли великі плазміди. 64% штамів в монокультурі здатні до утворення бактеріоцинів по відношенню до індикаторних культур. З них 67% (6 з 9 штамів) синтезують бактеріоцини широкого спектру активності (табл.2).

Таблиця 2

Плазмідний спектр та коліциногенність штамів *Escherichia coli*,
ізольованих в монокультурі та в асоціації

	Монокультура (14 штамів)	Асоціація (36 штамів)
Наявність плазмід	12 штамів – 86%	32 штами – 89%
- поліплазміди	8 штамів – 67%	28 штами – 88%
-великі плазміди	7 штамів – 58%	26 штамів – 81%
Коліциногенність	9 штамів – 64%	23 штами – 64%
-широкий спектр активності	6 штамів – 67%	18 штамів – 78%

Найбільш плазмідовмістними були штами, які знаходились в асоціації з іншими ентеробактеріями - 89%. 88% з них містять більше однієї плазміди, 81% штамів несуть

великі плазміди. 23 штами цієї групи (64%) є бактеріоциногенними, з них 78% (18 з 23 штамів) виявляють широкий спектр активності.

Високий показник наявності плазмід, більше 77%, виявляються в дитячому віці, в цій же групі виявлено найбільше плазмід з великою молекулярною масою.

Більше 20% досліджуваних штамів у віковій групі від 18 до 45 років несли плазміди і в цьому ж показнику були поліплазмідними. В порівнянні з іншими віковими групами, штами ізольовані від дорослих мають великий спектр активності по відношенню до індикаторних штамів.

Висновки та перспективи. В 14 з 50 пацієнтів ізольовано *E coli* в монокультурі, 36 пацієнтів - в ізоляції з іншими ентеробактеріями. Виявлено найбільшу кількість поліплазмідних штамів кишкової палички в асоціації з іншими ентеробактеріями (88%), в монокультурі (67%). Штами кишкової палички, виділені з асоціації, частіше (81%) містять великі плазміди. Однаковою виявилась кількість бактеріоциногенних штамів монокультури та в асоціації – 64%. В асоціації кишкових ентеробактерій зростає частота виявлення плазмідних штамів *E coli*, розширюється спектр активності коліцинів. Можливо, що саме ці властивості є ключовими для створення ефективних пробіотиків для тих видів бактерій, яким складно підібрати пребіотичні стимулятори. Окрім того, бактеріоцини мають великі перспективи для лікування захворювань, викликаних патогенними бактеріями, і можуть використовуватися в майбутньому як альтернатива існуючим антибіотикам.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Russel J, Røder HL, Madsen JS, Burmølle M, Sørensen SJ. Antagonism correlates with metabolic similarity in diverse bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2017. Vol.114, no.40. P.79-81. DOI: 10.1073/pnas.1706016114 (date of access: 18.09.2017).
2. Salazar N, Arboleya S, Valdés L, et al. The human intestinal microbiome at extreme ages of life. Dietary intervention as a way to counteract alterations. *Frontiers in Genetics*. 2014. Vol. 5. P.34-43. DOI: 10.3389/fgene.2014.00406 (date of access: 25.11.2014).
3. Riley MA, Gordon DM. A survey of Col plasmids in natural isolates of Escherichia coli and an investigation into the stability of Col-plasmid lineages. *J Gen Microbiol*. 1992. Vol. 138, no 7. P. 45-52. DOI: 10.1099/00221287-138-7-1345. PMID: 1512564 (date of access: 5.12. 1991).
4. Л.Б. Романюк, Н.Я. Кравець, С.І. Климнюк, В.С. Копча, О.Й. Дронова. Антибіотикорезистентність умовно-патогенних мікроорганізмів: актуальність, умови виникнення, шляхи подолання. *Інфекційні хвороби*. 2019. Т. 98, № 4. С. 63-70.

5. Shoemaker, N.B. et al. Доказательство существования генного перехода устойчивости среди бактериоподобных видов и среди других видов бактерий человеческой толстой кишки. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001. Vol. 67. P.561-568.
6. Мейнелл Г. Бактериальные плазмиды, пер. с англ. М. : Мир, 1976. 237 с.
7. E. Garcia-Gutierrez, M. J Mayer, P.D.Cotter, A. Narbad. Gut microbiota as a source of novel antimicrobials. *Gut Microbes*. 2019. Vol. 10, no.1. P.1-21. DOI: 10.1080/19490976.2018.1455790. (date of access: 22.05.2018).
8. Hammami R, Fernandez B, Lacroix C, Fliss I. Anti-infective properties of bacteriocins: an update. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2013. Vol. 70, no.16. P. 47-67. DOI: 10.1007/s00018-012-1202-3. (date of access: 30.10.2012)
9. Umu ÖCO, Gueimonde M, Oostindjer M. et al. Use of Fecal Slurry Cultures to Study In Vitro Effects of Bacteriocins on the Gut Bacterial Populations of Infants. *Probiotics Antimicrobial Proteins*. 2020. Vol.12, no. 3. P. 18- 25. DOI: 10.1007/s12602-019-09614-w (date of access: 1.12.2019).
10. C. Cesa-Luna, J-M.Alatorre-Cruz, R.Carreno-Lopes et al. Emerging Applications of Bacteriocins as Antimicrobials, Anticancer Drugs, and Modulators of The Gastrointestinal Microbiota. *Journal Microbiology*. 2021. Vol. 70, no.2. P. 143-159. DOI: 10.33073/pjm-2021-020. (date of access: 21.06.21).
11. Nogacka AM, Salazar N, Arboleya S. et al. Early microbiota, antibiotics and health. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2018. Vol. 75, no. 1. P. 83-91. DOI: 10.1007/s00018-017-2670-2. (date of access: 7.10.2017)
12. Kado C. J., Liu S.-T. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J/ Bacteriology*.1981. Vol. 145, no3. P. 1365-1373.
13. Інформаційне письмо по типированию колицинов, выделенных возбудителями дизентерии и других кишечных инфекций. Киев.1979. 8с.
14. Колтукова Н.В., Серебрякова Т.Л., Яновська В.В. Коліциногенна активність та чутливість до антибіотиків колекційних і свіжовиділених штамів *Shigella flexneri* та *Shigella sonnei*. *Мікробіологічний журнал*.2005. Т.67, №5. С.69-79.

REFERENCES

1. Russel J, Røder HL, Madsen JS, Burmølle M, Sørensen SJ. Antagonism correlates with metabolic similarity in diverse bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2017;114(40):79-81. DOI: 10.1073/pnas.1706016114 (date of access: 18.09.2017).
2. Salazar N, Arboleya S, Valdés L, et al. The human intestinal microbiome at extreme ages of life. Dietary intervention as a way to counteract alterations. *Frontiers in Genetics*. 2014;5: 34- 43. DOI: 10.3389/fgene.2014.00406 (date of access: 25.11.2014).

3. Riley MA, Gordon DM. A survey of Col plasmids in natural isolates of *Escherichia coli* and an investigation into the stability of Col-plasmid lineages. *J Gen Microbiol.* 1992;138(7):45-52. DOI: 10.1099/00221287-138-7-1345. PMID: 1512564 (date of access: 5.12. 1991).
4. L.B. Romanyuk, N.YA. Kravec, S.I. Klimnyuk, V.S. Kopcha, O.J. Dronova. Antibiotikorezistentnist umovno-patogennih mikroorganizmiv: aktualnist, umovi viniknennya, shlyahi podolannya. *Infekcijni hvorobi.* 2019;98(4):63-70.
5. Shoemaker, N.B. et al. Dokazatelstvo sushhestvovaniya gennogo perehoda ustojchivosti sredi bakteriopodobnyh vidov i sredi drugih vidov bakterij chelovecheskoj tolstoj kishki *Applied and Environmental Microbiology.* 2001;67:561-8.
6. Mejnell G. Bakterialnye plazmidy, per. s angl. M.: Mir, 1976. 237 s.
7. E. Garcia-Gutierrez, M. J Mayer, P.D.Cotter, A. Narbad. Gut microbiota as a source of novel antimicrobials. *Gut Microbes.* 2019;10(1):1-21. DOI: 10.1080/19490976.2018.1455790. (date of access: 22.05.2018).
8. Hammami R, Fernandez B, Lacroix C, Fliss I. Anti-infective properties of bacteriocins: an update. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2013;70(16):47-67. DOI: 10.1007/s00018-012-1202-3. (date of access: 30.10.2012)
9. Umu ÖCO, Gueimonde M, Oostindjer M. et al. Use of Fecal Slurry Cultures to Study In Vitro Effects of Bacteriocins on the Gut Bacterial Populations of Infants. *Probiotics Antimicrobial Proteins.* 2020;12(3):18- 25. DOI: 10.1007/s12602-019-09614-w (date of access: 1.12.2019).
10. C. Cesa-Luna, J-M.Alatorre-Cruz, R.Carreno-Lopes et al. Emerging Applications of Bacteriocins as Antimicrobials, Anticancer Drugs, and Modulators of The Gastrointestinal Microbiota. *Journal Microbiology.* 2021;70(2):143-159. DOI: 10.33073/pjm-2021-020. (date of access: 21.06.21).
11. Nogacka AM, Salazar N, Arboleya S. et al. Early microbiota, antibiotics and health. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2018;75(1):83-91. DOI: 10.1007/s00018-017-2670-2. (date of access: 7.10.2017)
12. Kado C. J., Liu S.-T. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J/ Bacteriology.* 1981;145(3):1365-1373.
13. Informacionnoe pismo po tipirovaniyu kolicinov, vydelennyh vobuditelnyami dizenterii i drugih kischechnyh infekcij. Kiev.1979. 8s.
14. Koltukova N.V., Serebryakova T.L., Yanovska V.V. Kolicinogenna aktivnist ta chutlivist do antibiotikov kolekcijnih i svizhovidilennyh shtamiv *Shigella flexneri* ta *Shigella sonnei*. *Mikrobiologichnij zhurnal.* 2005;67(5):69-79.

COLICINOGENY AND PLASMID SPECTRUM AS INDICATORS OF THE DYNAMICS STATE OF *ESCHERICHIA COLI* POPULATIONS

Burova L.M.

Abstract. Bowel microflora is one of the most complex ecosystems, often considered as a separate organ of the human body. In the paper it is presented the investigation of presence and number of plasmids isolated from E.coli strains taken from the patients' bowel of different age categories. Particular attention is paid to bacteriocins (colicins) in fact presenting antimicrobial compounds. Bacteriocins are antimicrobial peptides produced by bacteria to compete with other bacteria for nutrients and ecological niches. The antimicrobial effect of these peptides on the bacterial populations in the gut is likely dynamic as the survival of the microbes in this environment depends on both competition and cooperation.

Keywords: colicins, bacteriocins, plasmids, bowel microflora

Бурова Лариса Михайлівна ORCID ID 0000-0002-0832-729X,
тел.0677936449, burova.lm@gmail.com

Надійшла до редакції / Received: 24.11.2022