

Z Katedry Mikrobiologii Ogólnej Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UMCS
Kierownik: prof. dr Zbigniew Lorkiewicz

Maria BARAŃSKA

Kolicynogenność szczepów *Escherichia coli*

Propriétés colicinogènes des souches d'*Escherichia coli*

Hamon (4) w badaniach swoich stwierdził, że w stolcu noworodków występują drobnoustroje z rodziny *Enterobacteriaceae*, posiadające właściwości antybiotyczne. Substancje działające antybiotycznie, wytwarzane przez bakterie Jacob (7) nazwał bakteriocynami. Bakteriocyny pewnych szczepów *Enterobacteriaceae*, a szczególnie *Escherichia coli* nazwano kolicynami (3). Szczepy kolicynogenne występują u *E. coli* bardzo często. Spotyka się je w różnych częściach świata, w materiale wyodrębnionym ze stolców ludzi, zwierząt oraz w wodach stojących (2).

Wytwarzanie kolicyn jest cechą niezależną od innych właściwości bakterii. Szczepy kolicynogenne mogą mieć różne właściwości biochemiczne i antygenowe (2). Mogą wytwarzać różne kolicyny i często ten sam szczep syntetyzuje dwie lub więcej kolicyn. Zdolność wytwarzania kolicyn jest cechą stałą. Utrata jej jest zjawiskiem bardzo rzadkim (1).

Nie wszystkie szczepy kolicynogenne wytwarzają jednakowe strefy zahamowania. Jedne kolicyny silniej dyfundują i wytwarzają szeroką strefę zahamowania, podczas gdy inne, słabiej dyfundujące, dają węższe strefy zahamowania. Kolicynogenne lub niekolicynogenne szczepy *E. coli* mogą być wrażliwe na jedną lub więcej kolicyn. Wiele szczepów jest całkowicie opornych na działanie kolicyn (2). Szczep kolicynogenny nie wykazuje wrażliwości na działanie kolicyny, którą sam wytwarza.

Celem niniejszej pracy było wyosobnienie z kału dzieci szczepów *Escherichia coli*, określenie ich właściwości kolicynogennych oraz wrażliwości na kolicyny.

MATERIAŁ I METODY

Wyodrębnienie szczepów. Przebadano wymazy z odbytnicy 105 dzieci, w wieku od trzech tygodni do jednego roku, z których wyodrębniono 204 szczepy *E. coli*. Materiał pobierano od dzieci z Państwowego Szpitala Klinicznego nr 3 w Lublinie. Posiewy wykonywano na podłożach wybiórczych (Mac Conkeya, Endo i Krumwida). Każdy posiew wykonywano na 5 płytkach w różnych rozcieńczeniach, w celu uzyskania jak największej liczby oddzielnych kolonii. Po 24 godz. inkubacji w temp. 37°C kolonie o wyglądzie typowym dla *E. coli* przesiewano na podłoże agarowe. Świeże hodowle agarowe badano biochemicznie. Do dalszych badań użyto szczepów, które

Tab. 1. Wrażliwość szczepów
Sensibilité des souches

Kolicyny wzorcowe Colicines types	Wrażliwość poszczególnych Sensibilité des groupes																			
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI	XVII	XVIII	XIX	XX
V	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
B	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-
D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
A	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E + J	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-
G	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+
J	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
C	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
H	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J + I	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-
K	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Liczba szczepów wrażliwych w grupie Nombre des sou- ches sensibles dans le groupe	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	1

Objaśnienia: + — wrażliwe na kolicyny, — — odporne na kolicyny

Explications; + — sensibles aux colicines, — — résistantes aux colicines

E. coli na działanie kolicyn*E. coli* à l'action des colicines

grup na kolicyny particuliers aux colicines														Liczba szczepów wrażliwych Nombre des souches sensibles	% szczepów wrażli- wych % des souches sensibles				
XXI	XXII	XXIII	XXIV	XXV	XXVI	XXVII	XXVIII	XXIX	XXX	XXXI	XXXII	XXXIII	XXXIV	XXXV	XXXVI	XXXVII	XXXVIII		
-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14	6,8
-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14	6,8
-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	31	15,1
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	4,9
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	5,3
+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	32	15,6
-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	63	30,8
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	13	6,3
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	4,4
-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	1,4
+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	31	15,1
+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	76	37,1
3	1	4	1	2	1	27	3	1	1	2	1	1	9	10	3	3	100		

wytwarzały indol, nie wytwarzały acetylometylokarbinolu, dawały dodatni odczyn z czerwienią metylową, nie dezaminowały fenyloalaniny, nie rozkładały mocznika, nie wytwarzały siarkowodoru, fermentowały laktozę i glikozę z wytworzeniem gazu, nie rosły na podłożu cytrynianowo-amonowym ani w podłożu z KCN, zaś na podłożu agarowym półpłynnym wykazywały ruchliwość (z wyjątkiem kilku szczepów).

Oznaczanie kolicynogenności. W badaniach posługiwano się techniką podwójnych warstw agarowych wg Frédéricq'a. Jako szczepu wskaźnikowego używano *E. coli* ROW, wrażliwego na działanie kolicyn. 18-godzinna hodowlę *E. coli* wysiewano na płytki agarowe (pH 7,6). Po 24 godz. inkubowania w temp. 37°C zabijano pałeczki okrężnicy parami chloroformu. Następnie suszono płytki w temp. 42° w celu odparowania chloroformu. Potem zalewano je 2 ml 0,7% agaru, do którego dodawano 0,2 ml 4-godzinnej hodowli bulionowej szczepu wskaźnikowego *E. coli* ROW. W ciągu 24 godz. wzrostu szczep wrażliwy namnażał się w agarze, z wyjątkiem miejsc wokół kolonii wytwarzających kolicyny, gdzie powstawały strefy zahamowania.

Oznaczanie wrażliwości *E. coli* na standartowe kolicyny. Badano wrażliwość wyosobnionych szczepów kolicynogennych i niekolicynogennych na działanie kolicyn wytwarzanych przez kolicynogenne szczepy Frédéricq'a. Do tego celu użyto następujących szczepów kolicynogennych: CA7 (V), CA18 (B), CA23 (D), CA31 (A), CA38 (E+J), CA42 (F), CA46 (G), CA53 (I), CA57 (C), CA58 (H) CA62 (I+J) i K235 (K). W nawiasach podano typy kolicyn wytwarzanych przez użyte szczepy *E. coli*.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

W przeprowadzonych badaniach wyizolowano 204 szczepy *E. coli* od 105 dzieci. Od jednego dziecka pobierano dwu-, trzy-, a nawet czterokrotnie wymazy z odbytnicy w r. 1966, od maja do grudnia włącznie.

Na 204 wyizolowane szczepy *E. coli* 83 szczepy (40,6%) wytwarzały kolicyny. Najwyższy odsetek szczepów kolicynogennych stwierdzono w próbkach pobieranych w październiku (51%) i w maju (50%), a najniższy w lipcu (17%). Szerokość stref zahamowania wahała się od 4 do 15 mm. Próbkę pobierane w różnych odstępach czasu od tego samego dziecka różniły się między sobą pod względem zawartości szczepów kolicynogennych. Niekiedy w pierwszej próbce stwierdzano obecność szczepów kolicynogennych, a w następnych próbkach tych szczepów nie wykrywano. Zdarzały się też przypadki odwrotne. Zjawiska te zachodziły w szczepach wyizolowanych z materiałów pobieranych w odstępach kilkudniowych.

W badaniach nad wrażliwością szczepów *E. coli* na standartowe kolicyny stwierdzono, że 100 szczepów (48%) wykazywało oporność na wszystkie kolicyny, 104 (51,9%) natomiast były wrażliwe na działanie jednej lub kilku kolicyn. W związku z tym badane szczepy podzielono na grupy, w zależności od wrażliwości na kolicyny (tab. 1). Szczepy

wrażliwe na wiele kolicyn okazały się niekolicynogenne. Najwięcej szczepów wykazywało wrażliwość na działanie kolicyny K (37,1%) i kolicyny G (30,8%).

DYSKUSJA

W wyniku badań nad wytwarzaniem kolicyn przez *E. coli* u noworodków oraz wrażliwością tych szczepów na standartowe kolicyny stwierdzono, że na 204 wyizolowane szczepy *E. coli* kolicyny wytwarzało 40,6%, co stanowi dość dużą wartość, wyższą od tej, którą uzyskali *V i e u* (10) — 28,11% i *H a m o n* (5) — 26,09%. *V i e u* (10) uważa, że występowanie szczepów kolicynogennych uzależnione jest w dużej mierze od położenia geograficznego miejscowości, z której pochodzą osoby badane.

W wynikach przeprowadzonych badań szczególną uwagę zwraca fakt, że w niektórych przypadkach szczepy z pierwszej próbki posiadały właściwości kolicynogenne, natomiast szczepy pobrane od tego samego dziecka po kilku dniach, były już niekolicynogenne (8,9%). Podobne wyniki uzyskali wcześniej *R o b b i n s*, *S o m e r* i *P a r r* (9). Obserwowali oni mianowicie 6 osób, z których 5 było nosicielami szczepów tych samych typów antybiotycznych. Szczepy te w 100% miały właściwości antybiotyczne, ale w ciągu trzech tygodni straciły je. Autorzy ci sugerują, że w przewodzie pokarmowym mogą istnieć dwie kategorie szczepów zdolnych do wytwarzania antybiotyków typu kolicyn. Jedne to szczepy stałe, występujące w przewodzie pokarmowym przez wiele miesięcy, drugie — „przejściowe”, które można wyodrębnić w ciągu krótkiego okresu, od kilku dni do kilku tygodni. Zjawiska te wymagają jednak dalszych badań w oparciu o większą liczbę szczepów *E. coli*, wyizolowanych od tego samego osobnika.

Następnie, badając wrażliwość szczepów *E. coli* na standartowe kolicyny, stwierdzono, że 100 szczepów było opornych na działanie 12 badanych kolicyn, a 104 wykazywały wrażliwość na działanie jednej lub więcej kolicyn. Na uwagę zasługuje stosunkowo duży procent szczepów wrażliwych na kolicyny K i G. Natomiast *L o r k i e w i c z*, *M a c i a ż e k* i *N a c k i e w i c z* (8) stwierdzili, że większość szczepów wyosobnionych z kału była wrażliwa na kolicyny K i V. Drobnoustroje wyosobnione od niemowląt wykazywały duże różnice we wrażliwości na działanie standartowych kolicyn. Na tej podstawie wyróżniono 38 grup *E. coli*. Najliczniej występowały drobnoustroje wrażliwe na kolicyny K i G w grupie XXVIII, na kolicynę K w grupie XXXV, na kolicyny K, G, J+I w grupie XIX oraz na kolicynę G w grupie XXIV (tab. 1).

PIŚMIENICTWO

1. Frédéricq P.: Colicines. Ann. Rev. Microb., **11**, 7, 1957.
2. Frédéricq P.: Colicines et colicinogénie. Ann. Inst. Pasteur, **107**, suppl. 5, 7, 1964.
3. Gratia A., Frédéricq P.: Diversité des souches antibiotiques de *E. coli* et étendue variable de leur champ d'action. Compt. Rend. Soc. Biol., **140**, 1032, 1946.
4. Hamon Y.: Étude des images de sensibilité des *Escherichia coli* pathogènes pour le nourrisson à diverses colicines types. Intérêt épidémiologique de cette étude. Ann. Inst. Pasteur, **95**, 117, 1958.
5. Hamon Y.: Recherche et identification de la propriété colicinogène parmi les différents lysotypes d'*Escherichia coli* pathogènes pour le nourrisson. Ann. Inst. Pasteur, **96**, 615, 1959.
6. Hormaeche E.: Report of the *Enterobacteriaceae* Subcommittee of the Nomenclature Committee of the International Association of Microbiological Societies, **8**, 25, 1958.
7. Jacob F., Siminovitch L., Wollman E. L.: Comparaison entre la biosynthèse induite de la colicine et des bactériophages et entre leur mode d'action. Ann. Inst. Pasteur, **84**, 313, 1953.
8. Lorkiewicz Z., Maciążek K., Naćkiewicz Z.: The Influence of Acriflavine on Transfer of the Colicinogenic Factor. Acta Microb. Polonica, **13**, 273, 1964.
9. Robbins M. L., Somer A. M., Parr L. M.: Variation in the Antibiotic Producing Bacterial Flora of the Human Intestinal Tract. J. Bact., **74**, 377, 1957.
10. Vieu J.: Applications de la bactériocinogénie et des bactériocines. Ann. Inst. Pasteur, **107**, suppl. 5, 93, 1964.

Колициногенность штаммов *Escherichia coli*

Резюме

Из мазков, взятых из прямой кишки у 105 детей в возрасте от трех недель до одного года, выделено 204 штамма *Escherichia coli*. Колициногенность *E. coli* определялась при помощи техники агаровых слоев по Фредерику. Из 204 изолированных штаммов *E. coli* 83 штамма (40,6%) образовали колицины.

Самый высокий процент колициногенных штаммов обнаружено в пробах, взятых в октябре (51%) и в мае (50%), самый низкий — в июле (17%).

Чувствительность штаммов *E. coli* колициногенных и неколициногенных к стандартным колицинам также определялась по методу Фредерика. Штаммы, взятые у младенцев, проявляли большие различия в чувствительности к действию стандартных колицин. На этой основе все штаммы были разделены на 38 групп. Установлено, что 100 штаммов (48%) были резистентны ко всем колицинам.

104 штамма были чувствительны к действию одного или нескольких колицинов. Штаммы, чувствительные ко многим колицинам, были неколициногенными. Больше всего штаммов было чувствительных к действию колицина К (37,1%) и колицина G (30,8%).

Propriétés colicinogènes des souches d'*Escherichia coli*

Résumé

Des fèces de 105 enfants âgés de 3 semaines à 1 an on a isolé 204 souches d'*Escherichia coli*. Les propriétés colicinogènes des souches en question ont été définies à l'aide de la technique des couches de gélose selon Frédéricq. Il y avait 83 souches d'*E. coli* sur 204 qui formaient des colicines, ce qui faisait 40,6% du total. Le pour-cent le plus élevé des souches colicinogènes a été constaté dans les échantillons prélevés en octobre (51%) et en mai (50%), tandis que le plus bas était en juillet (17%).

La sensibilité des souches d'*E. coli* colicinogènes et non colicinogènes aux colicines types a été définie aussi selon la méthode de Frédéricq. Les souches provenant des nourrissons démontraient de grandes différences de sensibilité à l'action des colicines types. C'était à cette base qu'on les a divisées en 38 groupes. On a constaté que 100 souches (48%) étaient résistantes à toutes les colicines et 104 souches (51,9%) étaient sensibles à l'action d'une seule ou de quelques colicines. Les souches sensibles à plusieurs colicines n'étaient pas colicinogènes. Le nombre des souches sensibles à l'action des colicines K (37,1%) et G (30,8%) était le plus grand.

