

## КОНЬЮГАТИВНЫЙ ПЕРЕНОС ГЕНОВ БАКТЕРИОЦИНОВ – НОВЫЙ МЕХАНИЗМ АНТИМИКРОБНОГО ДЕЙСТВИЯ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ\*

М.В. Кузнецова, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*

И.Л. Масленникова, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*

D. Žgur-Bertok, *Люблянский Университет*

M. Starčič Erjavec, *Люблянский Университет*

В связи с высоким темпом роста антибиотикоустойчивости микроорганизмов создание альтернативных антимикробных средств или способов их доставки является приоритетным направлением биологии, медицины и ветеринарии. Представлены результаты проекта по конструированию и тестированию ColE7-опосредованной «kill»–«anti-kill» системы на основе пробиотического штамма Nissle 1917. На факультете биотехнологии университета Любляны был создан генномодифицированный штамм *Escherichia coli* ŽP (киллерный донор), несущий на конъюгативной плазмиде ген колицина ColE7 с ДНК-азной активностью, а также ген *immE7* в хромосоме, обеспечивающий клетке синтез иммунного белка, который прочно связывается с соответствующим колицином, ингибируя его активность в пределах клетки хозяина. Система апробирована с референтным штаммом *E. coli* в различных экспериментальных моделях: в планктонной культуре, в формирующейся и сформированной биопленках. Показано, что антимикробное действие на основе конъюгативного переноса генов бактериоцинов возможно. Определены перспективы использования *E. coli* ŽP в качестве основы пробиотического препарата, который, в отличие от аналогов, будет обладать высокой антибактериальной активностью против энтеропатогенов за счет нового механизма доставки колицина, позволяющего эффективно воздействовать на устойчивые к бактериоцинам штаммы.

**Ключевые слова:** *Escherichia coli*, бактериоцины, колицин ColE7, конъюгация, пробиотический препарат.

Формирование резистентности к антимикробным препаратам (антибиотикам, антисептикам, бактериофагам) является естественным адаптационным механизмом микроорганизмов и представляет серьезную медицинскую и социальную

проблему [2, 7]. На сегодняшний день большинство клинически важных патогенных и условно-патогенных бактерий способны вырабатывать устойчивость к антибактериальным веществам [16, 30]. Появились штаммы различных видов

\* Работа выполнена в рамках проектов «Конъюгативный перенос гена бактериоцина ColE7, используемого в качестве альтернативного антибактериального агента» и «Факторы, влияющие на конъюгативный перенос в природных бактериальных популяциях» по программе «Открытый конкурс на софинансирование научного сотрудничества между Словенией и Российской Федерацией» в 2014–15 гг. и в 2016–18 гг.

микроорганизмов, не чувствительные к действию практически всех антибиотиков, применяемых в медицинской практике, тогда как темпы получения новых препаратов существенно снизились [6]. Тенденция к увеличению количества антибиотикоустойчивых штаммов бактерий выявлена и на предприятиях сельского хозяйства [1, 12]. В связи с этим создание новых/альтернативных антимикробных средств или способов их доставки является приоритетным направлением биологии, медицины и ветеринарии [16]. Такой альтернативой могут стать бактериоцины, низкомолекулярные пептиды, обладающие узкоспецифическим антибактериальным действием, направленным на штаммы филогенетически родственных или соименных видов бактерий [21, 27], доставленные в клетки-мишени путем конъюгативного переноса – естественного пути межклеточной коммуникации прокариотических клеток.

**Бактериоцины *Escherichia coli*.** Бактериоциногенез – биологический феномен, широко распространенный в природе, является оружием в конкуренции между штаммами и способствует выживанию бактерий в полимикробных сообществах [14, 13]. Антибиотическая активность бактериоцинов, обуславливающая антагонизм между бактериями, известна давно: первые сведения были получены А. Gratia в 1925 г. в отношении ингибиторных субстанций, образованных *E. coli* [18]. Интерес к бактериоцинам кишечной палочки связан с важной ролью этих бактерий в качестве компонента микробиоты желудочно-кишечного тракта человека и животных. Известно, что *E. coli* продуцирует два типа бактериоцинов, классифицированных по их молекулярной массе – колицины (25–80 кДа) и микроцины (<10 кДа), а также механизму действия. В отличие от микроцинов синтез колицинов регулируется посредством одного из механизмов репарации ДНК, таких как SOS-ответ, и является летальным процессом для продуцирующей его клетки [34]. Кроме того, почти все колицины кодируются на плазмиде, тогда как гены микроцинов чаще обнаруживаются в хромосоме. Микроцины разделяют по возможности посттрансляционной модификации, организации области генома и аминокислотной последо-

вательности лидирующего пептида. Объектами их поражения в микробной клетке являются ДНК-гираза, ДНК-зависимая РНК-полимераза и аспартил-тРНК-синтетаза. В целом, микроцины рассматриваются в качестве весьма перспективных антимикробных средств [4]. На основе механизма действия колицины можно разделить на ферментативные (энзимные), проявляющие функцию нуклеазы (субстратом может быть ДНК, рРНК или тРНК), и канал(поро)-формирующие колицины, которые изменяют ионную проницаемость и деполаризуют цитоплазматическую мембрану (табл. 1) [4, 11].

Продуцирующие колицин штаммы также синтезируют специфический белок иммунитета к своему бактериоцину, который защищает клетку от летальных эффектов белка-токсина [23]. Типичный кластер генов, ответственных за бактериоциногенез, включает гены, кодирующие белок токсина, белок иммунитета и лизисный белок [22]. Последний, известный как белок высвобождения бактериоцина (BRP), может вызывать лизис бактерий. В бактериальной популяции (без дополнительных искусственных воздействий) бактериоцины продуцируют только отдельные клетки, которые при этом погибают, но большинство являются иммунными к действию гомологичного бактериоцина и сохраняют способность к его продукции в течение бесконечного ряда поколений. Активность колицинов зависит от связывания с определенным рецептором (BtuB, Cir, FerA, FhuA и др.) во внешней мембране чувствительных клеток и транслокации его к цели с помощью Tol (колицины группы А) или TonB (колицины группы В)-рецепторов [10]. Мутации в *tol*, *tonB* и *exb* в генах *E. coli* приводят к появлению устойчивости бактерий к колицинам.

Если на поверхности наружной мембраны клеток присутствует рецепторный белок распознавания колицинов и система транслокации, такие бактерии называются чувствительными и колицины действуют на них летально (рис. 1). Бактерии с отсутствием рецепторов к данному колицину классифицируются как резистентные, бактерии с дефектом транслокационной белковой системы – как толерантные, а бактерии, продуцирующие белки имму-

Классификация колицинов *E. coli* [33]

Колицин	Молекулярный вес, Da	Механизм	Рецептор	Транслокатор
E1	57279	канал(поро)-формирующий	BtuB	TolC, TolAQ
K	59611	канал(поро)-формирующий	Tsx	OmpAF, TolABQR
N	41696	канал(поро)-формирующий	OmpF	OmpF, TolABQR
S4	54085	канал(поро)-формирующий	OmpW	OmpF, TolABQR
E2	61561	ДНКаза	BtuB	OmpF, TolABQR
E7	61349	ДНКаза	BtuB	OmpF, TolABQR
E8	70000	ДНКаза	BtuB	OmpF, TolABQR
E9	61587	ДНКаза	BtuB	OmpF, TolABQR
E3	57960	16S рРНКаза	BtuB	OmpF, TolABQR
E4	н.д.	16S рРНКаза	BtuB	OmpF, TolABQR
E6	58011	16S рРНКаза	BtuB	OmpF, TolABQR
DF13	59293	16S рРНКаза	lutA	OmpF, TolABQR
E5	58254	тРНКаза	BtuB	OmpF, TolABQR
B	54742	канал(поро)-формирующий	FepA	TonB-ExbBD
la	69429	канал(поро)-формирующий	Cir	TonB-ExbBD
lb	69923	канал(поро)-формирующий	Cir	TonB-ExbBD
5	53137	канал(поро)-формирующий	Tsx	TonC, TonB-ExbBD
10	53342	канал(поро)-формирующий	Tsx	TonC, TonB-ExbBD
D	74683	тРНКаза	FepA	TonB-ExbBD
M	29453	Пептидогликаназа	FhuA	TonB-ExbBD

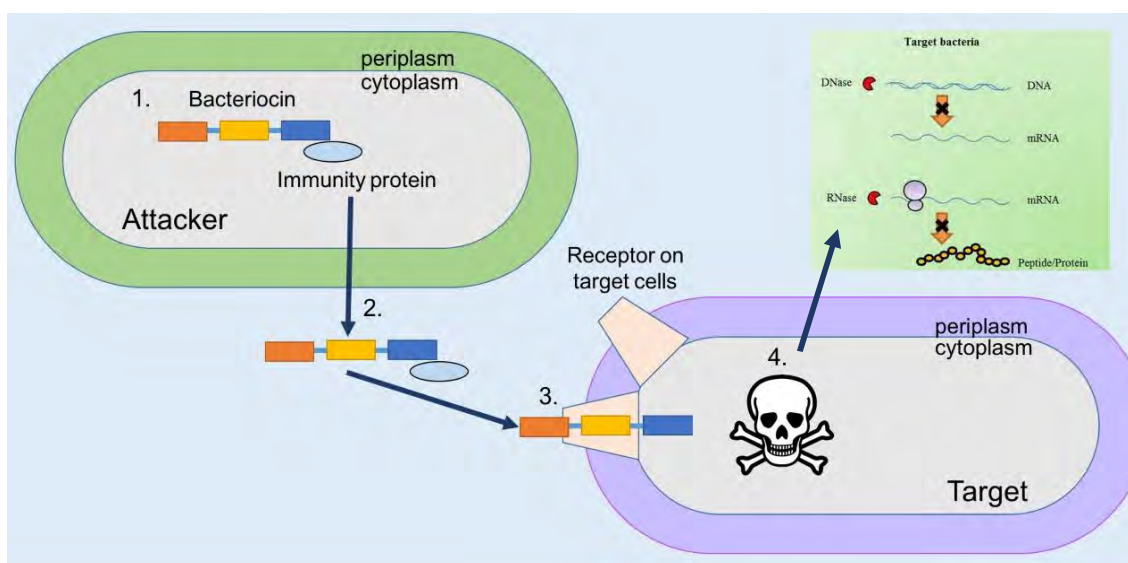


Рис. 1. Схема выделения и действия бактериоцина на чувствительную клетку: 1 – синтез бактериоцина, включающего три домена (домен транслокации – оранжевый, домен связывания с рецептором – желтый, цитотоксический домен – синий), и образование комплекса с его иммунным белком для защиты клетки-хозяина; 2 – выделение бактериоцина путем либо секреции, либо лизиса клеток; 3 – связывание бактериоцина с конкретными рецепторами на клетках-мишенях и перенос токсического домена внутрь клетки; 4 – токсический эффект, приводящий к гибели бактерий. Источник: [33]; <http://2016.igem.org/Team:Dundee/Description>

нитета, – как иммунные штаммы. Резистентные, толерантные и иммунные клетки не будут чувствительны к соответствующим колицинам.

Многочисленными исследованиями показано, что колицины часто очень эффективны против энтеропатогенных и уропатогенных штаммов *E. coli* [26, 28,

31]. Тем не менее их применение затруднено тем, что быстро появляются штаммы бактерий с устойчивостью к различным колицинам [9]. Возможным решением этой проблемы является использование альтернативного режима доставки бактериоцинов на основе горизонтального переноса *col*-генов с участием конъю-

гативных плазмид [17], что позволит воздействовать на резистентные к бактериоцинам штаммы бактерий, утративших способность синтезировать рецепторы или белки транслокации.

**Конструирование ColE7-опосредованной «kill»–«anti-kill» конъюгативной системы.** Колицины группы E состоят из трех доменов: центрального домена, необходимого для узнавания и связывания с рецепторами наружной мембраны, N-концевого, участвующего в транслокации белка через мембрану, и C-концевого нуклеазного домена. Последний содержит H-N-H-мотив и обеспечивает неспецифическую нуклеазную активность бактериоцинов. На кафедре биотехнологии Университета Любляны на основе хорошо известного пробиотического штамма Nissle 1917 [19] был создан генномодифицированный штамм *E. coli* ŽP (киллерный донор) путем введения *colE7*-гена на конъюгативной плазмиде pOX38a – производной F-плазмиды [29]. В целях защиты Nissle 1917 от летального действия ДНКазы ColE7 в его хромосому вставлен *immE7*-ген. Было сделано предположение: плаزمида pOX38a переносит *colE7* в клетку реципиента, где начинается его немедленная транскрипция и синтез бактериоцина, который «убивает» получателя. В качестве контроля конъюгативного переноса использовали штамм *E. coli* N4i без *colE7* на pOX38a (контрольный донор).

Таким образом, для доказательства конъюгационно-опосредованного механизма действия бактериоцинов была предложена антимикробная бактериальная система «kill»–«anti-kill». Производство колицина ColE7 вновь сконструированным штаммом *E. coli* ŽP было доказано с помощью чувствительного штамма *E. coli* DH5a согласно [9] (рис. 2). Исход-



Рис. 2. Зоны подавления роста *E. coli* DH5a, образованных штаммами *E. coli* ŽP (ŽP) и Nissle 1917 (EcN) [29]

ный штамм Nissle 1917, продуцирующий два микроцина – H47 и M, вызывал лишь слабый лизис индикаторного штамма, тогда как вокруг колонии штамма *E. coli* ŽP зона лизиса *E. coli* DH5a была более выражена за счет действия колицина.

Предложенная система может обеспечить большую конкурентноспособность штамма в смешанной микробной популяции, где присутствуют продуценты нескольких бактериоцинов, в различных экологических нишах. Стабильность плазмиды в штамме *E. coli* ŽP контролировали в течение 6 месяцев на агаризованной среде, содержащей хлорамфеникол. Потери или перестроек плазмиды, влияющих на экспрессию бактериоцина, не наблюдалось.

Система была апробирована с референтным штаммом *E. coli* K-12 TG1 в различных экспериментальных моделях: в планктонной культуре, в формирующейся и в сформированной биопленках [29]. Последние две модели были необходимы, так как *in vivo*, в том числе в кишечном тракте, микроорганизмы существуют в основном в составе прикрепленных сообществ. Кроме того, как известно, именно в биопленках бактериальные клетки наиболее устойчивы к действию биоцидов.

Как видно из табл. 2, трансконъюганты не были детектированы во всех четырех моделях анализа конъюгативного переноса между «киллерным» донором *E. coli* ŽP (Nissle 1917 с *immE7* в хромосоме, *colE7* на плазмиде) и штаммом-реципиентом. Доказательство того, что конъюгация между клетками происходила, было получено в экспериментах с контрольным донорным штаммом *E. coli* N4i: частота передачи составила  $10^{-4}$ – $10^{-3}$  и была сопоставима во всех четырех моделях (в планктонной культуре в большом и малом объеме, в формирующейся и в предварительно сформированной биопленках). Сделан вывод, что все клетки-реципиенты, получившие *colE7*-ген посредством конъюгативного переноса, экспрессировали его и были лизированы из-за ДНК-азной активности колицина.

**Перспективы использования ColE7-опосредованной «kill»–«anti-kill» конъюгативной системы.** В сфере медицины применение бактериоцинов и штаммов-продуцентов ограничивается зонами

Конъюгативная передача плазмиды pOX38a в клетки *E. coli* K-12 TG с использованием «kill»–«anti-kill» системы

Модель	Состав конъюгативной смеси					
	Контрольный донор N4i × K-12 TG1			Киллерный донор ŽP × K-12 TG1		
	R	T	v	R	T	v
Жидкая культура (4 мл)	6,1×10 <sup>7</sup>	6,4×10 <sup>4</sup>	1,0×10 <sup>-3</sup>	3,9×10 <sup>7</sup>	0	0
Планктон (200 мкл)	1,6×10 <sup>8</sup>	1,3×10 <sup>5</sup>	8,0×10 <sup>-4</sup>	1,1×10 <sup>8</sup>	0	0
Формирующаяся биопленка (200 мкл)	3,1×10 <sup>7</sup>	7,1×10 <sup>3</sup>	2,3×10 <sup>-4</sup>	3,7×10 <sup>7</sup>	0	0
Сформированная биопленка (200 мкл)	5,4×10 <sup>7</sup>	4,9×10 <sup>5</sup>	9,2×10 <sup>-3</sup>	2,7×10 <sup>7</sup>	0	0

Примечание: R – реципиент, КОЕ/мл; T – трансконогянт, КОЕ/мл; v – частота конъюгативной передачи, рассчитана как отношение числа клеток-трансконогянтов к числу клеток-реципиентов [20]. Время экспозиции 6 ч.

слизистых оболочек – ротовая и ушная полости, желудочно-кишечный и репродуктивный тракты. Препараты на основе кишечной палочки активно применяются для лечения и профилактики дисбактериоза кишечника человека. В настоящее время в России известные пробиотики «Колибактерин» и «Бификол» разработаны на основе штамма *E. coli* M17, который является производным выделенного А. Ниссле штамма, используемого для получения препарата «Mutaflor» (Германия) [2, 19]. Разработка новых комбинированных, сбалансированных, бактериоциногенных микробных комплексов на основе известных штаммов-продуцентов бактериоцинов и вновь созданного штамма *E. coli* ŽP позволит создать высокоэффективные пробиотические препараты с широким спектром антагонистической активности.

Создание новых методов и средств специфической профилактики и терапии бактериальных инфекций сельскохозяйственных животных активно осуществляется в России и за рубежом. Предложены две основные стратегии применения бактериоцинов: в первом случае очищенные бактериоцины непосредственно добавляются к корму для животных в качестве противомикробных добавок, во втором – с помощью пробиотических штаммов формируют кишечную микрофлору с первых часов жизни животного. Обе процедуры способствуют снижению количества энтеропатогенов животных, а также патогенов, передающихся через пищевые продукты. Как следствие, это может предотвратить появление бактерий, устойчивых к антибиотикам, экономические потери и негативные последствия для здоровья человека [8].

Перспективным на сегодняшний день считается применение искусственно сконструированных штаммов с множественной продукцией бактериоцинов или комбинированных пробиотических препаратов, сочетающих несколько штаммов с различными свойствами. Так, например, в связи с утратой пробиотическим штаммом *E. coli* M17 антагонистических свойств было предложено восстановить его конкурентоспособность с помощью рекомбинантных плазмид, детерминирующих продукцию двух бактериоцинов (микроцина B5 и колицин E1), а также устойчивость к ним. Показано, что штамм *E. coli*, продуцирующий одновременно микроцин и колицин, жизнеспособен в условиях кишечника животных [3, 5].

Перспективность данного направления обусловлена также запретом применения в животноводстве синтетических стимуляторов продуктивности и ограничением использования антибиотиков. Поэтому в последние годы в сельскохозяйственном производстве возрос интерес к пробиотикам, но они не всегда достаточно эффективны из-за нарастающей бактериоциноустойчивости энтеропатогенных бактерий. Новый штамм *E. coli* ŽP, в отличие от аналогов, обладает высокой антибактериальной активностью против энтеропатогенов за счет конъюгативного механизма передачи колицина и будет эффективно действовать на резистентные и толерантные к бактериоцинам штаммы. Его введение повысит общее содержание в кишечнике бактерий группы кишечной палочки, подавляя при этом развитие патогенных представителей данного вида, без заметного влияния на молочнокислую и бифидофлору кишечника животных, поэтому сельское хозяйство является наи-

более перспективной отраслью, где возможно использование пробиотического препарата на основе созданного штамма *E. coli* ЖР.

**Заключение.** В настоящее время распространение антибиотикорезистентности микроорганизмов приняло глобальный характер. Актуальность и серьезность этой проблемы в полной мере осознана как международным медицинским сообществом, так и производителями сельскохозяйственной продукции. В 2006 г. вступил в силу запрет на использование антибиотиков в кормах в Европе, за исключением двух антибиотиков в кормах для домашней птицы [12]. Всемирная организация здравоохранения разработала и опубликовала в 2014 г. «Глобальную стратегию ВОЗ по сдерживанию устойчивости к противомикробным препаратам», в которой рекомендовано рассматривать указанную проблему в качестве одного из приоритетов национальных систем здравоохранения [32]. Основой нового плана действий стал единый подход к борьбе с лекарственной устойчивостью среди людей и животных.

Высокая адаптивность микроорганизмов к постоянно меняющимся условиям среды, их способность приобретать устойчивость к антибиотикам является основной причиной, ограничивающей эффективность антибактериальной терапии человека и животных. Во всем мире ведутся интенсивные поиски альтернативы антибиотиков, новых кормовых добавок, применяемых в животноводстве и птицеводстве, что позволит добиться высокой конкурентоспособности на рынке. В связи с запретом использования синтетиче-

ских стимуляторов продуктивности, а также ограничением использования антибиотиков в последние годы в животноводстве/птицеводстве возрос интерес к использованию пробиотиков – прямых доноров нормальной эволюционно закрепленной микрофлоры кишечника [1, 8]. Современная биотехнология, разрабатывающая генно-инженерные методы создания генетически модифицированных биологических продуктов различного назначения активно используется и для получения новых пробиотических препаратов. Возможность конструирования новых штаммов с альтернативными механизмами антимикробного действия в перспективе может оказаться главным методом борьбы с антибиотикоустойчивыми патогенными бактериями.

Результаты исследований по созданию и тестированию нового пробиотического штамма *E. coli* ЖР с конъюгационно-опосредованным механизмом действия колицинов свидетельствуют о его высокой эффективности *in vitro*. Антибактериальное воздействие на устойчивые к бактериоцинам клетки достигается за счет конъюгативного переноса *colE7* в клетку реципиента, в которой начинается синтез колицина, убивающего получателя. Учитывая, что обеспечение защиты сельскохозяйственных животных от инфекционных болезней остается одной из главных задач медицинской/ветеринарной науки и практики, актуальным является дальнейшее изучение эффективности генномодифицированного штамма при лечении и профилактике эшерихиозов и оценка его терапевтического и противозидемического потенциала.

#### Библиографический список

1. Данилевская Н.В., Субботин В.В. Эффективность специфической профилактики болезней птиц // 25 лет на благо промышленного птицеводства: Материалы юбил. конф. НПП «АВИВАК». – СПб: АВИВАК, 2015. – С. 107–111.
2. Национальная концепция профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, и информационный материал по ее положениям / В.И. Покровский, В.Г. Акимкин, Н.И. Брико, Е.Б. Брусина, Л.П. Зуева, О.В. Ковалишена, В.Л. Стасенко, А.В. Тутельян, И.В. Фельдблюм, В.В. Шкарин. – Н. Новгород: изд-во «Ремедиум Приволжье», 2012. – 84 с.
3. Пантелева А.А. Гены продукции микроцина *Escherichia coli* S5/98, их экспрессия и влияние на антагонистические свойства рекомбинантных штаммов: автореф. дис. ... канд. биол. наук, 2006. – 26 с.
4. Похиленко В.Д., Перельгин В.В. Бактериоцины: их биологическая роль и тенденции применения // Электронный научный журнал «ИССЛЕДОВАНО В РОССИИ» <http://zhurnal.ape.relarn.ru/articles/2011/016.pdf>
5. Чеснокова В.Л., Лившиц В.А., Сокуренок Е.В., Алешин В.В., Кравцов Э.Г., Далин М.В., Быков В.А. Штамм бактерий *Escherichia coli* m17 fimh::kan/p colap, используемый для получения пробиотического препарата // Патент РФ № 2144954.

6. Allen H.K., Trachsel J., Looft T., Casey T.A. Finding alternatives to antibiotics // Ann. N. Acad. Sci. – 2014. – Vol. 1323. – P. 91–100.
7. Barriere S.L. Clinical, economic and societal impact of antibiotic resistance // Expert Opin. Pharmacother. – 2015. – Vol. 16. – P. 151–153.
8. Ben Lagha A., Haas B., Gottschalk M., Grenier D. Antimicrobial potential of bacteriocins in poultry and swine production // Vet. Res. – 2017. – Vol. 48. – P. 22.
9. Budič M., Rijavec M., Petkovšek Ž., Žgur-Bertok D. *Escherichia coli* bacteriocins: antimicrobial efficacy and prevalence among isolates from patients with bacteraemia // PLoS One. – 2011. – Vol. 6(12). – e28769.
10. Cao Z., Klebba P.E. Mechanisms of colicin binding and transport through outer membrane porins // Biochimie. – 2002. – Vol. 84. – P. 399–412.
11. Cascales E., Buchanan S.K., Duché D., Kleanthous C., Lloubès R. [et al.] Colicin Biology // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2007. – Vol. 71. – P. 158–229.
12. Castanon J.I. History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds // Poult. Sci. – 2007. – Vol. 86(11). – P. 2466–2471.
13. Cursino L., Smajs D., Smarda J., Nardi R.M., Nicoli J.R., Chartone-Souza E., Nascimento A.M. Exoproducts of the *Escherichia coli* strain H22 inhibiting some enteric pathogens both in vitro and in vivo // J. Appl. Microbiol. – 2006. – Vol. 100(4). – P. 821–829.
14. Cursino L., Smarda J., Chartone-Souza E., Nascimento A. Recent updated aspects of colicins of Enterobacteriaceae // Brasil. J. Microbiol. – 2002. – Vol. 33. – P. 185–195.
15. Dunlap P. Biochemistry and genetics of bacterial bioluminescence // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. – 2014. – Vol. 144. – P. 37–64.
16. Fernebro J. Fighting bacterial infections-future treatment options // Drug. Resist. Updat. – 2011. – Vol. 14. – P. 125–139.
17. Filutowicz M., Burgess R., Gamelli R.L., Heinemann J.A., Kurenbach B., Rakowski S.A., Shankar R. Bacterial conjugation-based antimicrobial agents // Plasmid. – 2008. – Vol. 60. – P. 38–44.
18. Gratia A. Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille // Comput. Rend. Soc. Biol. – 1925. – Vol. 93. – P. 1040–1042.
19. Grozdanov L., Raasch C., Schulze J., Sonnenborn U., Gottschalk G., Hacker J., Dobrindt U. Analysis of the genome structure of the nonpathogenic probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 // J. Bacteriol. – 2004. – Vol. 186(16). – P. 5432–5441.
20. Guglielmetti E., Korhonen J.M., Heikkinen J., Morelli L., von Wright A. Transfer of plasmid-mediated resistance to tetracycline in pathogenic bacteria from fish and aquaculture environments // FEMS. Microbiol. Lett. – 2009. – Vol. 293. – P. 28–34.
21. Karpiński T.M., Szkaradkiewicz A.K. Characteristic of bacteriocines and their application // Pol. J. Microbiol. – 2013. – Vol. 62. – P. 223–235.
22. Kleanthous C. Swimming against the tide: progress and challenges in our understanding of colicin translocation // Nat. Rev. Microbiol. – 2010. – Vol. 8. – P. 843–848.
23. Kleanthous C., Walker D. Immunity proteins: enzyme inhibitors that avoid the active site // Trends Biochem. Sci. – 2001. – Vol. 26. – P. 624–631.
24. Marincs F. On-line monitoring of growth of *Escherichia coli* in batch cultures by bioluminescence // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2000. – Vol. 53. – P. 536–541.
25. Petkovšek Ž., Žgur-Bertok D., Starčič Erjavec M. Colicin insensitivity correlates with a higher prevalence of extraintestinal virulence factors among *Escherichia coli* isolates from skin and soft-tissue infections // J. Med. Microbiol. – 2012. – Vol. 61(6). – P. 762–765.
26. Schamberger G.P., Phillips R.L., Jacobs J.L., Diez-Gonzalez F. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 populations in cattle by addition of colicin E7-producing *E. coli* to feed // Appl. Environ. Microbiol. – 2004. – Vol. 70. – P. 6053–6060.
27. Šmarda J., Šmajs D. Colicins – Extracellular lethal proteins of *Escherichia coli* // Folia Microbiol. (Praha). – 1998. – Vol. 43. – P. 563–582.
28. Stahl C.H., Callaway T.R., Lincoln L.M., Lonergan S.M., Genovese K.J. Inhibitory activities of colicins against *Escherichia coli* strains responsible for postweaning diarrhea and edema disease in swine // Antimicrob. Agents Chemother. – 2004. – Vol. 48. – P. 3119–3121.
29. Starčič Erjavec M., Petkovšek Ž., Kuznetsova M.V., Maslennikova I.L., Žgur-Bertok D. Strain ŽP – the first bacterial conjugation-based "kill"- "anti-kill" antimicrobial system // Plasmid. – 2015. – Vol. 3(82). – P. 28–34.
30. Tenover F.C. Development and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents: an overview // Clin. Infect. Dis. – 2001. – Vol. 33. – S108–S115.
31. Trautner B.W., Hull R.A., Darouiche R.O. Colicins prevent colonization of urinary catheters // J. Antimicrob. Chemother. – 2005. – Vol. 56. – P. 413–415.
32. WHO's first global report on antibiotic resistance reveals serious, worldwide threat to public health. Retrieved 2014-05-02.

33. Yang S.-C., Lin C.-H., Sung C.T., Fang J.-Y. Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals // *Front. Microbiol.* – 2014. – Vol. 5. – P. 241.
34. Žgur-Bertok D. Regulating colicin synthesis to cope with stress and lethality of colicin production // *Biochem. Soc. Trans.* – 2012. – Vol. 40 (6). – P. 1507–1511.

### CONUGATIVE TRANSFER OF BACTERIOCIN GENES – NEW MECHANISM OF ANTIMICROBIAL ACTION OF PROBIOTIC PREPARATIONS

M.V. Kuznetsova<sup>1</sup>, I.L. Maslennikova<sup>1</sup>, D. Žgur-Bertok<sup>2</sup>, M. Starčič Erjavec<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS*

<sup>2</sup> *University of Ljubljana*

In connection with the high rate of antibiotic resistance growth of microorganisms, the creation of alternative antimicrobial agents or methods for their delivery is a priority in biology, medicine and veterinary medicine. The results of the design and testing of the ColE7-mediated "kill"–"anti-kill" system based on the probiotic strain Nissle 1917 are presented. The genetically modified strain *Escherichia coli* ŽP (donor killer) has been made at University of Ljubljana (Slovenia), carrying the colicin gene ColE7 with DNA-ase activity on the conjugative plasmid, as well as the *immE7* gene in the chromosome. It provides the cell with the synthesis of an immune protein that binds tightly to the corresponding colicin, inhibiting its activity within the host cell. The system has been tested with the reference *E. coli* strain in various experimental models: in plankton culture, in a forming and formed biofilm. It has been shown that the antimicrobial action based on the conjugative transfer of bacteriocin genes is possible. Prospects for the use of *E. coli* ŽP as the basis of a probiotic preparation, which, unlike analogues, will have a high antibacterial activity against enteropathogens due to a new delivery mechanism of colicin, allowing an effective treatment of strains resistant to bacteriocins are identified.

*Keywords: Escherichia coli, bacteriocins, colicin ColE7, conjugation, probiotic preparation.*

#### Сведения об авторах

*Кузнецова Марина Валентиновна*, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН (ИЭГМ УрО РАН), 614081, г. Пермь, ул. Голева, 13; e-mail: mar@iegm.ru

*Масленникова Ирина Леонидовна*, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории иммунорегуляции, ИЭГМ УрО РАН; e-mail: I.Maslennikova1974@gmail.com

*Žgur-Bertok Darja*, PhD, Professor of Chair of Molecular Genetics and Biology of Microorganisms Research Group, Department of Biology, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana; e-mail: darja.zgur@bf.uni-lj.si

*Starčič Erjavec Marjanca*, PhD, Assoc. Professor of Chair of Molecular Genetics and Biology of Microorganisms Research Group, Department of Biology, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana; e-mail: marjanca.staric.erjavec@bf.uni-lj.si

*Материал поступил в редакцию 31.10.2017 г.*