

УДК 579.842.17.013:577.182

ХАРАКТЕРИСТИКА ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ, ПРОДУЦИРУЮЩИХ МИКРОЦИНЫ – НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ АНТИБИОТИКИ

© 2004 г. Б. В. Тараканов^{*1}, А. А. Яковлева^{**}, В. В. Алёшин^{*}. **

^{*}Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания сельскохозяйственных животных РАСХН, г. Боровск, Калужская обл.

^{**}НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

Поступила в редакцию 13.08.2002 г; после доработки 28.04.03 г.

Изучена биология выделенных от животных микроциногенных штаммов эшерихий EcS 5/98, EcS 6/98, EcB 214/99, а также известного продуцента микроцина C51 *Escherichia coli* M17 (p74). Показано, что по морфологии, культуральным, физиолого-биохимическим свойствам изоляты соответствуют виду *Escherichia coli*. Установлено, что продуцируемые штаммами микроцины имеют молекулярную массу менее 10 кДа, а их синтез стимулируется при обеднении среды питательными компонентами. Микроцины устойчивы к термолизину, но разрушаются проназой, протолихетромом и металлопротеиназой *Bacillus mesentericus*, т.е. являются пептидами или содержат пептиды в составе своих молекул. На основании опытов по перекрестной иммунности и определению нуклеотидных последовательностей генетических детерминант микроцины штаммов EcS 5/98 и EcS 6/98 отнесены к типу В, тогда как антибиотик штамма EcB 214/99 подавляет рост продуцентов микроцинов С- и В-типов и принадлежит к иному типу. Новые продуценты микроцинов обладают широким спектром антибактериальной активности как против природных изолятов энтеробактерий родов *Escherichia* и *Salmonella*, так и широкого круга колициногенных эшерихий и разных видов коллекционных сальмонелл.

Ключевые слова: эшерихии, биология, микроциногенная, антагонизм.

В 1976 г. группой испанских исследователей было обнаружено, что клетки энтеробактерий, кроме бактериоцинов, могут синтезировать антибиотические вещества иной природы [1]. Эти антибиотики получили название микроцинов. Микроцины – гетерогенная по природе и структуре молекул группа низкомолекулярных антибиотиков, преимущественно детерминируемых плазмидами. Они выделяются в среду и подавляют рост различных видов грамотрицательных бактерий кишечной микрофлоры (*Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Pseudomonas* и др.).

В настоящее время выделено семь типов микроцинов: А, В, С, D, Е, Н, J [2–6], изучена их структура и механизмы действия, ведутся работы по генетическому контролю синтеза микроцинов и исследуется роль этих субстанций в экологии кишечных бактерий. Широкий спектр антагонистической активности микроцинов дает основание прогнозировать перспективность применения их продуцентов для регуляции популяций грамотрицательных бактерий в кишечнике животных и человека.

Цель настоящей работы – изучение физиолого-биохимических свойств и генетических особенностей микроциногенных штаммов эшерихий, выделенных из пищеварительного тракта свиней и крупного рогатого скота.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследований были штаммы EcS 5/98, EcS 6/98, выделенные от свиней, и штамм EcB 214/99, полученный от крупного рогатого скота.

Определение продукции антагонистических веществ проведено методом отсроченного антагонизма. При этом в качестве индикаторных культур использовали *Escherichia coli* К-12, *E. coli* 113-3, а также свежeweделенные и коллекционные штаммы кишечной палочки. В качестве питательных сред использованы: минимальная среда Хмель с соавт. [7] и ее модификация, обогащенная дрожжевым экстрактом и глюкозой (0.2%); среда Лурия и Бергана (LB); минимальный агар Дэвиса; триптозный агар (ТА); ГРМ бульон и агар в различных модификациях; мясопептонный бульон (МПБ) и агар (МПА). ТА, LB и ГРМ агары готовили по стандартной прописи (полный) и обедненной, с содержанием одной

¹ Адресат для корреспонденции (e-mail: bifip@kaluga.ru).

четвертой части питательных веществ (четвертой) с добавлением 1.5% агар-агара для обеспечения ее необходимой плотности.

Определение синтеза микроцинов проводили путем высева бактерий на целлофан, наложенный на поверхность среды в чашках Петри. После суточной инкубации полоски целлофана вместе с выросшими колониями удаляли, чашки со средой стерилизовали хлороформом и затем на поверхность среды наносили верхний слой 0.7%-ного питательного агара, к которому добавляли индикаторную культуру в экспоненциальной фазе роста. Через сутки на месте продуцирующих микроцины колоний наблюдали зоны задержки роста индикаторной культуры и измеряли их величину. Иммунитет клеток к микроцину определяли подобным же образом. Отсутствие зоны подавления роста испытуемой культуры свидетельствовало об иммунности или устойчивости ее к микроцину. В этих исследованиях в качестве референтных использовали штаммы *E. coli* M17 (p74) и *E. coli* BZB 2283, продуцирующие микроцины C51 и B17 соответственно, которые были любезно предоставлены нам проф. И.А. Хмель.

С целью идентификации штаммов у них изучали морфологию, отношение к окраске по Граму, способность к росту при 15 и 45°C, термостойкость при 60°C, толерантность к фенолу (0.2, 0.4 и 0.6%), этанолу (2, 4 и 6%) и желчи (сухой, 2 и 4%). Оценивали характер роста на агаре Клиглера, цитратном агаре Симмонса, ацетатном и малонатном агаре, гидролиз фенилаланина и мочевины, а также тесты с метиловым красным и Фогеса–Проскауэра (MR- и VP-тесты), способность к ферментации углеводов и многоатомных спиртов. Эти исследования выполнены по общепринятым методам [8].

При изучении антибиотикорезистентности у микроциногенных эшерихий определяли устойчивость к следующим антибиотикам (мкг/диск): оксацилин – 10, левомицетин – 30, стрептомицин – 30, гентамицин – 120, рифампицин – 5, неомицин – 30, эритромицин – 15, тетрациклин – 30, канамицин – 30, ванкомицин – 30, клиндамицин – 2, кларитромицин – 15, амикацин – 30. Испытывали также налидиксовую кислоту (20 мкг/мл) и фузидин (150 мкг/мл). Тестирование проводили на плотной питательной среде методом дисков.

При определении чувствительности микроцинов к протеолизу применяли следующие ферменты: термолизин – нейтральная протеиназа *Bacillus thermoproteolyticus* (“Serva”); трипсин бычий (“Serva”); субтилизин Е – сериновая протеиназа *Bacillus subtilis*, выделенная в лаборатории химии белка ГосНИИ генетика; металлопротеиназа *Bacillus mesentericus* [9]; протолихетрем – коммерческий препарат культуральной жидкости *Bacillus licheniformis*, содержащий щелочную протеазу типа “субтилизин Карлсберга”, неохарактеризован-

ную металлопротеиназу и глутамилэндопептидазу; проназу из *Streptomyces griseus* (“Fluka”). Протеолитические препараты готовили в водном растворе с конечной концентрацией ферментов 2 мг/мл.

Для исследования генетических детерминант, связанных с продукцией микроцина, они были клонированы с использованием техники получения библиотеки генов *in vivo* [10]. Для этого штамм EcS 5/98 лизогенизировали бактериофагом Mu cts и фазмидой Mud5005 [10], а полученная после термоиндукции двойного лизогена фаговая библиотека была скринирована трансдукцией в штамм *E. coli* HB101::Mu cts с последующей селекцией на чашках, содержащих микроцин штамма EcS 5/98. Трансдуктанты выращивали при перmissive температуре 30°C. Селективные чашки с агаризованной средой (четвертным ТА) готовили следующим образом: засеивали газом штамма EcS 5/98, а по истечении суток обрабатывали хлороформом для лизиса бактерий и подсушивали. Подсушенные чашки заливали тонким слоем агаризованной среды. Приготовленные таким образом чашки проявляли селективные свойства против лабораторного штамма *E. coli* HB101 в течение 3–4 сут. Полученные устойчивые к микроцину трансдуктанты проверяли на соответствие генетическим маркерам штамма *E. coli* HB101 [11], а также на способность подавлять рост реципиента *E. coli* HB101::Mu cts в опытах по отсроченному антагонизму. Локализацию изучаемых генетических детерминант на фазмидах подтверждали передачей соответствующих фенотипических признаков при трансформации фазмидной ДНК лизогенных по Mu cts штаммов при селекции по векторному маркеру фазмиды – устойчивости к канамицину.

Плазмидную и фазмидную ДНК выделяли методом щелочного лизиса [12] и анализировали с помощью эндонуклеаз рестрикции. Для секвенирования ДНК применяли дополнительную очистку, добавляя к осветленному лизату равный объем 8 М раствора ацетата аммония. Субклонирование фрагментов фазмид проводили в вектор pUC19 [13] по общеизвестным методикам [11]. Секвенирование плазмидной ДНК осуществляли с помощью набора *fmol* DNA Sequencing System (“Promega”), используя олигонуклеотидные затравки, комплементарные векторной части pUC19 или Mud5005. Сравнение определенных в эксперименте последовательностей с документами в электронной базе данных GenBank проводили с помощью программы BLAST [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования показали, что изученные микроциногенные штаммы EcS 5/98, EcS 6/98, EcB 214/99, а также известный продуцент микроцина C 51 *E. coli* M17 (p74), являются палочками с за-

Таблица 1. Влияние условий культивирования на продукцию микроцинов

Испытуемые штаммы <i>E. coli</i>	Среды выращивания						Согласно [6]
	ТА		LB		ГРМ		
	полный	1/4	полный	1/4	полный	1/4	
M17 (p74)	+20	+30	–	+25	н	н	+22
S 5/98	–	+19	–	+14	+15	+17	–
S 6/98	–	+17	–	+15	–	+17	–
B 214/99	+12	+16	–	+18	+15	+15	+15

Примечание. Знак “+” – микроцины продуцируются; знак “–” – микроцин не продуцируется; цифра указывает диаметр зоны задержки роста индикаторного штамма в мм; н – не исследовали.

круглыми концами, отрицательно окрашивающимися по Граму. На селективной среде Эндо они образуют темно-красные колонии с характерным металлическим блеском. Все культуры растут при температуре 15 и 45°C и погибают после 30-минутной экспозиции при 60°C. Эти штаммы толерантны к фенолу (0.6%), этанолу (2%), хорошо растут в среде с 20% желчи, а культура EcB 214/99 и в среде с 40% желчи. Они не образуют H₂S, продуцируют газ из глюкозы, дают положительную реакцию с метиловым красным, но не используют ацетат и малонат в качестве источника энергии, не гидролизуют фенилаланин и мочевины и имеют отрицательную реакцию Фогеса-Проскауера. На цитратном агаре Симмонса растут только штаммы EcS 5/98 и EcB 214/99.

Исследование ферментативных свойств показало, что все изученные штаммы сбраживали с образованием кислоты лактозу, мальтозу, маннит, глюкозу, ксилозу, трегалозу, сорбит и не ферментировали инозит, дульцит и салицин. Арабинозу сбраживали штаммы *E. coli* M17 (p74), EcS 5/98, EcS 6/98 и не использовал штамм EcB 214/99, а сахарозу не ферментировали культуры EcS 5/98 и EcS 6/98. *E. coli* M17 (p74) давала положительную реакцию с сахарозой, тогда как продукция кислоты из сахарозы у штамма EcB 214/99 была вариабельной.

Таким образом, полученные данные по совокупности признаков позволяют отнести изученные штаммы к виду *Escherichia coli*.

В процессе исследований нас интересовало в какой мере отражаются условия культивирования бактерий на продукции микроцинов. С этой целью были использованы триптозный агар (ТА), LB-агар, ГРМ-агар и агаризованная минимальная среда Хмель с соавт. [7]. Высев микроциногенных штаммов на эти среды показал, что на полном ТА зоны задержки роста давали только штаммы *E. coli* M17 (p74) и EcB 214/99. Обеднение среды увеличивало у этих штаммов диаметры зон задержки роста с 20 до 30 мм и с 12 до 16 мм соответственно. При этом отчетливо проявились

зоны задержки роста и у штаммов EcS 5/98 и EcS 6/98, которые при их выращивании на богатой среде отсутствовали (табл. 1).

На полном LB-агаре вокруг колоний микроциногенных эшерихий зон подавления роста индикаторного штамма не наблюдалось, тогда как на четвертном LB они были отчетливо видны. На полном ГРМ-агаре микроцины продуцировали штаммы EcS 5/98 и EcB 214/99, а на четвертном ГРМ проявилось образование микроцинов и у штамма EcS 6/98 и увеличилась зона подавления роста индикатора у штамма EcS 5/98. На минимальной среде Хмель с соавт. [7] с дрожжевым экстрактом и глюкозой микроцины продуцировали только штаммы *E. coli* M17(p74) и EcB 214/99.

Полученные данные подтверждают раннее сделанные наблюдения, что обеднение среды выращивания эшерихий стимулирует у них синтез микроцинов. Однако отсутствие продукции микроцина на минимальной среде Хмель с соавт. у штаммов EcS 5/98 и EcS 6/98 дает основание предположить, что существуют и другие еще не идентифицированные факторы, влияющие на синтез микроцинов.

Продуцируемые изученными штаммами микроцины проходили через целлофан, и это показывает, что их молекулярная масса была меньше 10 кДа.

Исследования устойчивости продуцентов микроцинов к антибиотикам показали, что все они чувствительны к использованным в опытах препаратам. Исключение составил штамм EcB 214/99, который был устойчив к фузидину (150 мкг/мл). Это контрастирует с резистентностью к ряду антибиотиков, свойственной многим природным неантагонистическим штаммам эшерихий. Низкое содержание детерминант устойчивости к антибиотикам в геномах штаммов-продуцентов микроцинов мы склонны связывать с компенсаторным действием микроцинов, обеспечивающих их обладателям выживание в природных микробных сообществах за счет подавления конкурентных микроорганизмов – продуцентов антибиотиков.

Чтобы получить данные о природе микроцинов, продуцируемых выделенными штаммами

Таблица 2. Чувствительность микроцинов к протеолитическим ферментам

Ферменты	Микроцины, продуцируемые штаммами			
	<i>E. coli</i> M17 (p74)	EcS 5/98	EcS 6/98	EcB 214/99
Термолизин	–	–	–	–
Трипсин	+	–	–	–
Субтилизин E	+	+	–	+
Металлопротеиназа <i>B. mesentericus</i>	+	+	+	+
Протолихетрем	+	+	+	+
Проназа	+	+	+	+

Примечание. Знак “+” – микроцин разрушается; знак “–” – не разрушается.

Таблица 3. Чувствительность штаммов-продуцентов к микроцинам, синтезируемым различными культурами

Индикаторные штаммы	Штаммы-продуценты микроцинов				
	<i>E. coli</i> M17 (p74)	EcS 5/98	EcS 6/98	EcB 214/99	<i>E. coli</i> BZB 2283
<i>E. coli</i> M17 (p74)	–	+25	+23	+26	+10
EcS 5/98	+17	–	–	+8	–
EcS 6/98	+20	–	–	+7	–
EcB 214/99	+11	–	–	–	–
<i>E. coli</i> BZB 2283	+40	–	–	+9	–

Примечание. Знак “+” культура чувствительна к микроцину; знак “–” культура устойчива к микроцину; цифра – диаметр зоны подавления роста (мм).

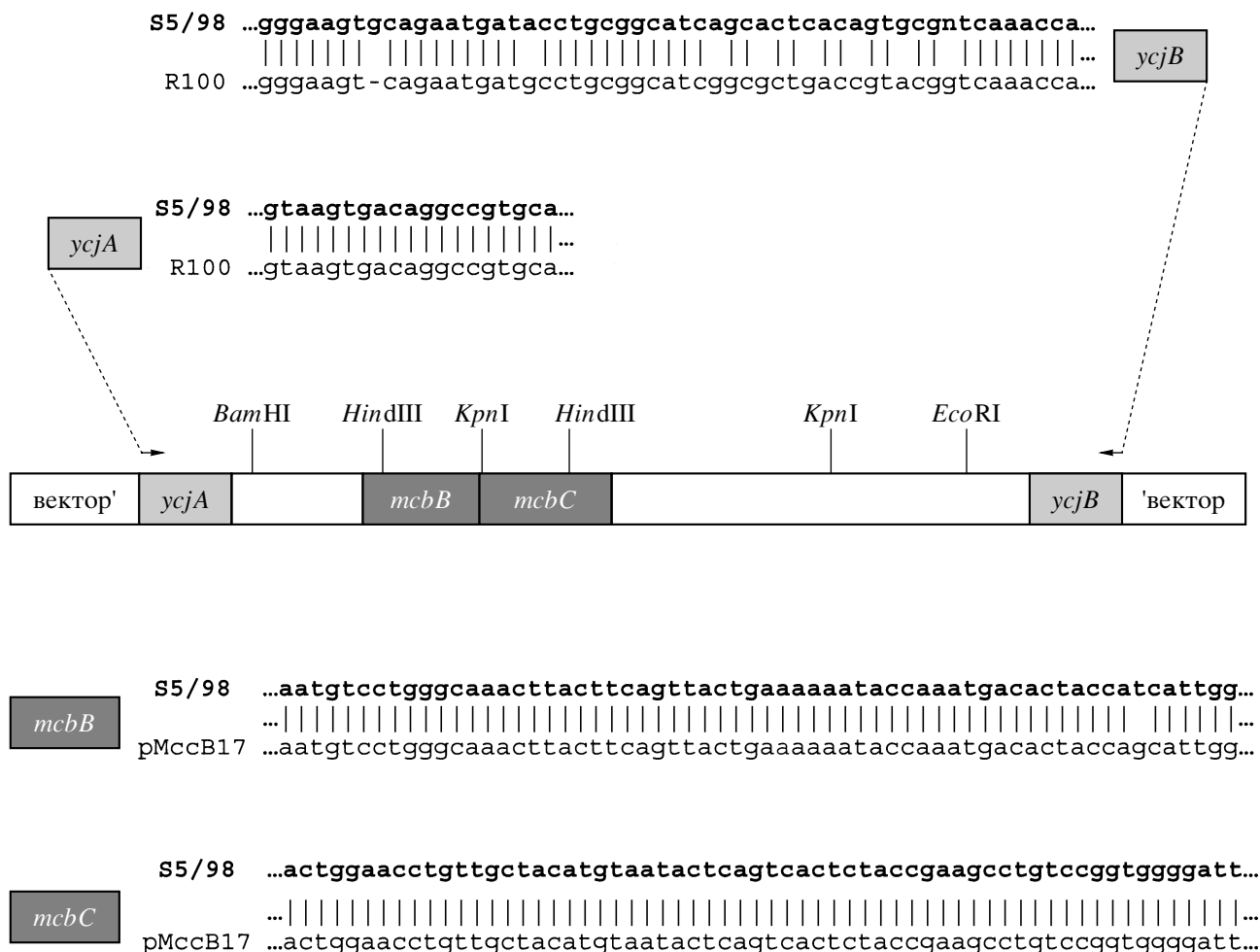
бактерий, было изучено действие различных протеолитических ферментов на ингибиторную активность микроцинов. Определение проводилось непосредственно на поверхности питательной среды. Протеолитические ферменты инактивировали микроцины, но имелись отличия в действии ферментов на микроцины разных штаммов. Так, изученные нами микроцины инактивировались проназой, протолихетремом и металлопротеиназой из *B. mesentericus*, но не инактивировались термолизином (табл. 2). На микроцин штамма EcS 6/98 не действовал субтилизин E и трипсин, который также не инактивировал микроцины штаммов EcS 5/98 и EcB 214/99. Однако делать на основании этих данных выводы о различиях микроцинов преждевременно, поскольку опыты проводились не с чистыми препаратами микроцинов. Тем не менее, приведенные выше результаты показывают, что микроцины из выделенных нами штаммов являются пептидами или содержат пептиды в составе своих молекул.

В настоящее время выделяют семь типов микроцинов [2–6]. Микроцины классифицируют прежде всего по критерию перекрестного иммунитета, т.е. устойчивости штаммов-продуцентов к действию микроцинов того же типа и чувствительности к микроцинам другого типа. Кроме того, их различают

по свойствам и структуре молекул, механизмам действия и спектрам антибиотической активности [2].

Эксперименты, проведенные по изучению перекрестного иммунитета у выделенных нами продуцентов микроцинов, показали, что штаммы EcS 5/98, EcS 6/98 и EcB 214/99 продуцировали микроцины, ингибирующие штамм *E. coli* M17 (p74), который синтезирует микроцин C51, и сами оказались чувствительными к последнему, т.е. синтезируемые ими микроцины не принадлежат к типу C (табл. 3). Штаммы EcS 5/98 и EcS 6/98 не подавляли рост продуцента микроцина B17 *E. coli* BZB 2283, что позволило выдвинуть предположение о том, что они продуцируют микроцины типа B. Что касается микроцина штамма EcB 214/99, то он подавлял рост штаммов эшерихий, синтезирующих микроцины C и B типов и, следовательно, принадлежит к какому-то иному типу, который в связи с отсутствием референтных штаммов идентифицировать пока не представляется возможным.

Для проверки предположения о принадлежности микроцина, продуцируемого штаммом EcS 5/98, к типу B, были клонированы генетические детерминанты, определяющие продукцию микроцина и иммунитет к нему. Рекомбинантные кишечные палочки были получены путем скрининга фаговой библиотеки EcS 5/98 на векторе Mud5005 [10], как описано в разделе “Объекты и методы”. Частичное



Организация фрагмента ДНК из штамма EcS 5/98 в составе векторной фазмиды Mud5005, обеспечивающего продукцию микроцина типа В. Секвенированные фрагменты сопоставлены с гомологичными участками плазмид R100 и pMccB15.

определение клонированных последовательностей обнаружило их гомологию с генами *mcbB* и *mcbC*, вовлеченными в продукцию микроцина В17 (рисунок) [15]. Последовательности, примыкающие к соответствующим детерминантам, при поиске с помощью программы BLAST обнаружили сходство с генами плазмид из группы IncFII. Оно было наибольшим с открытыми рамками считывания с неидентифицированной функцией *uscI* и *uscJ* плазмиды R100 (номер в GenBank AP000342), в которой указанные рамки соседствуют. В случае штамма EcS 5/98 гомологичные последовательности разделены инсерцией, содержащей гены продукции микроцина и иммунитета к нему. Интересно, что при щелочном лизисе клеток штамма EcS 5/98 плазмиды не обнаруживаются (данные не представлены). Это может быть связано либо с большим размером резидентной плазмиды, либо с ее интеграцией в хромосомную ДНК штамма EcS 5/98. Следует отметить также, что штамм EcS 5/98 не проявлял устойчивости к антибиотикам, кодируемым плазми-

дой R100, в то же время плазида R100 не содержала генов для биосинтеза микроцинов.

Одной из важнейших характеристик микроцинов является спектр антибактериальной активности штаммов-продуцентов. Исследования показали, что рост у 69–84% эшерихий и 42.6% сальмонелл дикого типа, выделенных от крупного рогатого скота, подавлял микроцинами штаммов EcS 5/98 и EcS 6/98 (табл. 4). Среди энтеробактерий, изолированных из фекалий свиней, чувствительными к микроцинам EcS 5/98 и EcS 6/98 оказалось 90 и 80% штаммов кишечных и паратифозных палочек соответственно, тогда как микроцин С51 подавлял рост 52 и 50% штаммов. Микроцин С51 ингибировал развитие несколько большего числа штаммов эшерихий, выделенных из кишечника цыплят, а штаммы, изолированные из фекалий кошек, практически все подавлялись изученными микроцинами. Интересным представляется и тот факт, что выделенные нами продуценты микроцинов подавляли колициногенные штаммы

Таблица 4. Чувствительность эшерихий и сальмонелл дикого типа, выделенных от разных видов животных, к микроцинам

Хозяева штаммов	Род тестируемых бактерий	Количество исследованных штаммов	Процент штаммов, чувствительных к микроцинам		
			C 51	EcS 5/98	EcS 6/98
Крупный рогатый скот: коровы	<i>Escherichia</i>	200	н	84	н
	<i>Salmonella</i>	47	н	42.6	н
бычки	<i>Escherichia</i>	84	н	69	69
Свиньи	<i>Escherichia</i>	50	52	90	90
	<i>Salmonella</i>	30	50	80	80
Цыплята-бройлеры	<i>Escherichia</i>	17	88.2	82.3	82.3
	<i>Salmonella</i>	23	56.5	56.5	56.5
Кошки	<i>Escherichia</i>	100	100	99	99

Примечание. н – не исследовали.

Таблица 5. Антибактериальная активность штаммов-продуцентов микроцинов

Тест-культуры*	Диаметр (мм) зоны подавления роста штаммом			
	<i>E. coli</i> M17 (p74)	EcS 5/98	EcS 6/98	EcB 214/99
<i>Salmonella heidelberg</i> 287	+16	–	–	–
<i>Sal. stanley</i> 5716	+22	–	–	–
<i>Sal. kirkee</i>	+21	–	–	–
<i>Sal. give</i>	+30	+12	+10	+10
<i>Sal. bovis morbipicans</i> 988	+29	+8	+8	+8
<i>Sal. dublin</i> 42	+28	+	–	–
<i>Sal. london</i> 1446	+36	+17	+17	+16
<i>Sal. gaminare</i>	+30	+11	+13	+11
<i>Sal. utrecht</i>	+22	–	–	–
<i>Sal. derby</i>	+21	+7	+9	+8
<i>Sal. amager</i> 2399	+18	+8	+8	+10
<i>Sal. sendai</i>	–	–	–	–
<i>Sal. rostock</i>	–	+12	+12	+10
<i>Sal. readiry</i>	+33	+20	+18	+21
<i>Sal. typhimurium</i> с колицинами E1 и J	+15	–	–	–
<i>Sal. enteritidis</i> 41997	+18	+11	+10	+10
<i>Klebsiella</i> sp. 4140 (K-7)	–	+16	+12	+12
<i>Escherichia coli</i> 113-3	+28	+22	+18	+20
<i>Proteus</i> sp. 14	–	–	–	–
<i>Proteus</i> sp. 2091	–	–	–	–
<i>Providencia stuartii</i>	–	–	–	–
<i>Providencia alcalifaciens</i>	–	–	–	–
<i>Staphylococcus aureus</i>	–	–	–	–
<i>Staphylococcus saprophiticus</i>	–	–	–	–
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	–	–	–	–

Примечание. Знаком “+” показана чувствительность тест-культур к исследуемому микроцину, знаком “–” – устойчивость, цифра указывает диаметр зоны подавления роста в мм.

* Тест-культуры получены от проф. И.А. Хмель.

эшерихий, а также разные виды сальмонелл и один штамм клебсиелл. Представители родов *Proteus*, *Providencia* и *Staphylococcus* оказались устойчивыми к изучаемым микроцинам (табл. 5). Полученные данные показывают, что спектры антагонистической активности штаммов EcS 5/98

и EcS 6/98 очень сходны. Рестриктивный гидролиз суммарных нуклеиновых кислот, выделенных из клеток этих штаммов, дает при электрофоретическом разделении множество полос с идентичным паттерном (не показано). Это свидетельствует об аутентичности этих штаммов, имеющих,

как было показано выше, совпадающие физиолого-биохимические признаки.

Авторы выражают благодарность И.А. Хмель за предоставленные продуценты микроцинов и тест-культуры, А.Б. Шевелеву за препараты протеолитических ферментов и анонимному рецензенту за критические замечания к ранней версии рукописи.

Исследования проведены при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и администрации Калужской области, проект № 01-04-96027, а также гранта Министерства промышленности, науки и технологий ИШ-1712.2003.4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Asensio C., Perez-Diaz V.C., Martinez M.C., Baquero F. A new family of low molecular weight antibiotics from Enterobacteria // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1976. V. 69. P. 7–14.
2. Baquero F., Moreno F. The microcins // FEMS Microbiol. Lett. 1984. V. 23. P. 117–124.
3. Lavina M., Gaggero C., Moreno F. Microcin H47, a chromosome-encoded microcin antibiotic of *Escherichia coli* // J. Bacteriol. 1990. V. 172. № 11. P. 6585–6588.
4. Salomon R.A., Farias R.N. Microcin 25, a novel antimicrobial peptide produced by *Escherichia coli* // J. Bacteriol. 1992. V. 174. № 22. P. 7428–7435.
5. Хмель И.А. Микроцины – пептидные антибиотики энтеробактерий: генетический контроль синтеза, структура и механизм действия // Генетика. 1999. Т. 31. № 1. С. 5–16.
6. Хмель И.А., Метлицкая А.З., Фоменко Д.Е., Катруха Г.С., Басюк Е.И., Курепина Н.Е., Липасова В.А., Безруков В.М. Микроцины – новые пептидные антибиотики из энтеробактерий и генетический контроль их синтеза // Мол. биология. 1999. Т. 33. № 1. С. 113–119.
7. Khmel I.A., Kopylov V.M., Vorobjeva I.P., Polyani V.P. The influence of colicinogenic plasmids ColJb-P9, ColJa-CA53 and ColV-K30 on the repair mutagenesis and induction of colicin E1 synthesis // Mol. Gen. Genet. 1981. V. 181. № 1. P. 101–106.
8. Голубева И.В., Килессо В.А., Киселева Б.С., Прямухина Н.С., Татарина С.Д., Хоменко Н.А., Ющенко Г.В. Энтеробактерии. Руководство для врачей. М.: Медицина, 1985. 321 с.
9. Морозова И.П., Юсупова М.П., Гололобов М.Ю., Королькова Н.К., Ходова О.М., Степанов В.М. Металлопротеиназа *Bacillus mesentericus*, штамм В-313 // Биохимия. 1993. Т. 58. Вып. 9. С. 1420–1429.
10. Groisman E.A., Casadaban M.J. Mini-mu bacteriophage with plasmid replicons for *in vivo* cloning and *lac* gene fusing // J. Bacteriol. 1986. V. 168. № 1. P. 357–364.
11. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 394 с.
12. Birnboim H.C., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA // Nucl. Acids Res. 1979. V. 7. № 6. P. 1513.
13. Yanisch-Perron C., Vieira J., Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors // Gene. 1985. V. 33. № 1. P. 103–119.
14. Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs // Nucl. Acids Res. 1997. V. 25. № 17. P. 3389–3402.
15. Genilloud O., Moreno F., Kolter R. DNA sequence, products, and transcriptional pattern of the genes involved in production of the DNA replication inhibitor microcin B17 // J. Bacteriol. 1989. V. 171. № 2. P. 1126–1135.

Characterization of Enterobacteria Producing the Low-Molecular-Weight Antibiotics Microcins

B. V. Tarakanov^{*1}, A. A. Yakovleva^{**}, and V. V. Aleshin^{***}

^{*}All-Russia State Institute of the Physiology, Biochemistry, and Feed of Livestock, Borovsk, Kaluga oblast, 249013 Russia

^{**}Belozerskii Institute of Molecular Biology and Bioorganic Chemistry, Moscow State University, Vorob'evy gory, Moscow, 119992 Russia

¹Corresponding author. E-mail: bifip@kaluga.ru

Abstract—A comparative study of the morphological, cultural, physiological, and biochemical properties of the microcinogenic strains EcS 5/98, EcS 6/98, and EcB 214/99 with the known microcin C51 producer *Escherichia coli* M17(p74) showed that these strains belong to the species *E. coli*. The strains produced microcins with molecular masses lower than 10 kDa. Microcin biosynthesis was stimulated by a deficiency of nutrients in the cultivation media. Microcins were found to be resistant to thermolysin, but were degraded by pronase, protolichetrem, and the *Bacillus mesentericus* metalloproteinase. This indicated that microcins are peptides or contain peptides in their molecules. The study of cross immunity to microcins and the sequence of their genetic determinants showed that the microcins of strains EcS 5/98 and EcS 6/98 are of B type, whereas the microcin of strain EcB 214/99 presumably belongs to another type, since it suppresses the growth of the producers of C-type and B-type microcins. The new microcin producers possess antibacterial activity against natural isolates belonging to the genera *Escherichia* and *Salmonella*, against a wide range of colicinogenic *Escherichia* strains, and against the collection *Salmonella* cultures.

Key words: escherichia, biology, microcinogeny, antagonism.