

**REZISTENCIJA NA ANTIBIOTIKE KOD BAKTERIJA MLEČNE KISELINE –
ROD *LACTOCOCCUS**
RESISTANCE TO ANTIBIOTICS IN LACID ACID BACTERIA –
STRAIN *LACTOCOCCUS***

**Filipić Brankica, Golić Nataša, Jovčić B., Čupić Miladinović Dejana,
Soković Svetlana, Popović Dušanka, Kojić M.****

*Bakterije mlečne kiseline (BMK) imaju veliku primenu u prehrambenoj industriji, posebno u proizvodnji fermentisanih mlečnih proizvoda i mesa. Najviše izučavana vrsta u okviru BMK je *Lactococcus lactis*. Sojevi koji pripadaju vrsti *L. lactis* su od izuzetnog značaja u proizvodnji fermentisanih mlečnih proizvoda poput kiselog mleka, maslaca, svežih sireva i nekih vrsta polutvrdih sireva.*

Iako se generalno laktokoke smatraju bezbednim mikroorganizmima, istraživanja ukazuju da mogu biti rezervoari gena za rezistenciju na antibiotike, koji se horizontalnim transferom mogu preneti na druge bakterijske vrste, uključujući i patogene.

*Pokazano je da se u membrani bakterija vrste *L. lactis* nalaze efluksne pumpe koje obezbeđuju rezistenciju na strukturno različite supstrate (eng. *multidrug resistance transporters-MDR*). Analizom genoma *L. lactis* detektovano je prisustvo 40 potencijalnih gena koji kodiraju MDR transportere, od čega su do danas svega četiri funkcionalno okarakterisana: *LmrA*, *LmrP*, *LmrCD* i *CmbT*. *LmrA* je prvi uopšte opisan primarni transporter kod prokariota. *LmrCD* obezbeđuje rezistenciju na holat koji ulazi u sastav žuči, što je značajno za preživljavanje laktokoka koje se primenjuju kao probiotici u digestivnom traktu ljudi i životinja. *LmrP* je sekundarni transporter i obezbeđuje rezistenciju na neke linkozamide, makrolide, streptogramine i*

* Rad primljen za štampu 19. 02. 2015. godine

** Dr Brankica Filipić, asistent, Katedra za mikrobiologiju i imunologiju, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu; dr Nataša Golić, naučni savetnik, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu; dr Branko Jovčić, docent, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu; Dejana Čupić Miladinović, istraživač pripravnik, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu; Svetlana Soković, istraživač pripravnik, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu; Dušanka Popović, istraživač pripravnik, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu; dr Milan Kojić, naučni savetnik, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

tetracikline. CmbT je poslednji okarakterisan MDR transporter kod L. lactis i doprinosi rezistenciji na linkomicin, sulfonamidne antibiotike, sulfametoksazol i sulfadiazin, aminoglikozidni antibiotik streptomycin, aminonukleozidni antibiotik puromicin i semisintetski antibiotik rifampicin.

Kako lanac hrane predstavlja važan put prenosa gena za rezistenciju u okviru ljudske i životinjske populacije, neophodno je intenzivno izučavanje mehanizama rezistencije kod laktokoka i drugih BMK namenjenih za upotrebu u prehrambenoj industriji.

Ključne reči: Bakterije mlečne kiseline, Lactococcus lactis, MDR transporteri

Uvod / Introduction

Bakterije mlečne kiseline (BMK) pripadaju grupi gram-pozitivnih bakterija, a objedinjene su zajedničkom osobinom da proizvode mlečnu kiselinu kao krajnji produkt fermentacije laktoze. BMK su među prvim mikroorganizmima upotrebljenim u industriji hrane a posebno važnu ulogu imaju u proizvodnji fermentisanih mlečnih proizvoda i proizvoda od mesa. Snižavanjem pH vrednosti, usled sinteze mlečne kiseline, kao i produkcijom bakteriocina koje sintetišu neke BMK, sprečava se razvoj patogenih mikroorganizama. Pored toga, BMK svojom metaboličkom aktivnošću doprinose poboljšanju ukusa, arome i teksture krajnjeg proizvoda. U cilju razumevanja uloge BMK u procesu fermentacije, bakterije koje pripadaju ovoj grupi su predmet stalnog izučavanja i dobro su okarakterisane u pogledu genetike, fiziologije i primene.

S obzirom da se sve veći broj bakterija koristi u proizvodnji hrane, hrana postaje značajan potencijalni izvor bakterija koje nose genetičke determinante rezistencije na antibiotike (Klein i sar., 2000). BMK imaju široku primenu kao probiotici i starter kulture u proizvodnji fermentisanih proizvoda te u velikom broju doppevaju u organizam ljudi i životinja, ali istraživanja pokazuju da i one mogu biti rezervoari gena za rezistenciju na antibiotike. Suština problema je u tome što se te genetičke determinante rezistencije na antibiotike horizontalnim transferom mogu dalje prenositi na patogene mikroorganizme, potencijalne uzročnike ozbiljnih infekcija kod ljudi i životinja (Zhou i sar., 2012). Geni koji kodiraju rezistenciju na tetraciklin, eritromicin i vankomicin pronađeni su i okarakterisani kod *Lactococcus lactis* kao i vrsta roda *Enterococcus* i *Lactobacillus* izolovanih iz mesa i fermentisanih mlečnih proizvoda (Mathur i Singh, 2005). Da bi se sprečilo širenje gena odgovornih za rezistencije, neophodno je intenzivno izučavanje mehanizama rezistencije BMK namenjenih za prehrambenu industriju.

Bakterije mlečne kiseline – Rod *Lactococcus* / *Lactic acid bacteria* – *Lactococcus*

Pojedine vrste roda *Lactococcus* mogu da dovedu do infekcija kod životinja. *Lactococcus garviae* je uglavnom u vezi sa nastankom oboljenja kod riba i uzrokuje značajne ekonomske gubitke, posebno u proizvodnji pastrmke (Vendrell i sar., 2006). Pored toga, *L. garviae* je identifikovan i kao uzročnik mastitisa krava. Takođe se može izolovati iz mesa živine, sirovog kravljeg mleka i mesnih proizvoda (Zuily, 2011), dok je *L. piscium* u vezi sa infekcijama kod lososa.

Ipak, najznačajnija vrsta u okviru roda *Lactococcus*, *L. lactis*, smatra se bezbednom za upotrebu u prehrambenoj industriji. Sojevi *L. lactis* vrste su izuzetno značajne u proizvodnji fermentisanih prehrambenih proizvoda, poput kiselog mleka, maslaca, svežih sireva i nekih vrsta polutvrdih sireva. Vrsta *L. lactis* obuhvata dve podvrste – *L. lactis* subsp. *lactis* i *L. lactis* subsp. *cremoris*. *L. lactis* subsp. *lactis* i u manjoj meri *L. lactis* subsp. *cremoris*, pojedinačno ili u kombinaciji sa drugim mikroorganizmima, su u odnosu na druge BMK najčešće korišćene kao starter kulture. Usled velikog industrijskog značaja, *L. lactis* je najviše izučavana vrsta iz grupe BMK, a prvi sekvenciran genom BMK je *L. lactis* IL1403.

Dugotrajna upotreba sojeva vrste *L. lactis* u prehrambenoj industriji je celokupnoj vrsti obezbedilo GRAS status (eng. *generaly regarded as safe*), što znači da ne predstavlja rizik po zdravlje potrošača (Khemariya i sar., 2013). Usled toga, kako se *L. lactis* putem fermentisanih mlečnih proizvoda i mesa unosi na dnevnoj bazi širom sveta, potrebna su stalna i intenzivna izučavanja prisustva genetičkih determinanti rezistencije, kako bi se ova vrsta i dalje smatrala bezbednom za upotrebu kod ljudi i životinja.

Rezistencija na antibiotike kod laktokoka / *Antimicrobial resistance in Lactococci*

Laktokoke su u prirodnom okruženju uglavnom prisutne na biljnom materijalu, ali se mogu naći i u usnoj duplji i na vimenu krava (Teuber, 1995), zbog čega se smatra da je njihovo prisustvo u mleku posledica kontaminacije u toku muže. Najčešće prisutne laktokoke u mleku su *L. lactis* subsp. *lactis* i *L. lactis* subsp. *cremoris*, a detektovano je i prisustvo *L. garvieae* (Corroler i sar., 1999; Lopez-Diaz i sar., 2002).

Usled upotrebe antibiotika u cilju prevencije ili terapije infekcija kod krava, poput mastitisa i metritisa, pod dejstvom selektivnog pritiska, laktokoke mogu steći rezistenciju na antibiotike, preživeti terapiju antibioticima i dalje delovati kao rezervoari genetičkih determinanti rezistencije za druge bakterije. Detektovano je prisustvo rezistencije na tetraciklin, klindamicin, eritromicin, streptomycin i nitrofurantoin kod *L. lactis* i *L. garvieae* izolovanih iz kravljeg mleka (Walther i sar., 2008). Tetraciklin rezistentni *L. lactis* i *L. garvieae* posedovali su *tet*(M) i *tet*(S)

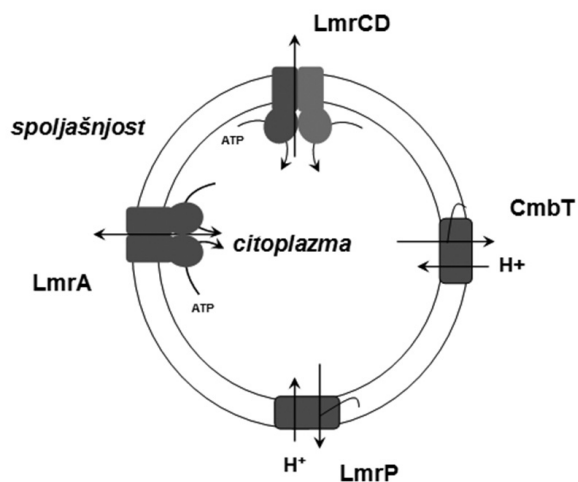
gene, a kod *L. lactis* rezistentnih na eritromicin detektovano je prisustvo *erm(B)* gena (Walther i sar., 2008).

Jedan od važnih mehanizama kojim bakterije obezbeđuju značajan nivo rezistencije jeste aktivni efluks supstrata posredstvom pumpi koje se nalaze u membrani ćelije. Efluksne pumpe mogu biti specifične za tačno određen supstrat (eng. *specific drug resistance transporters*, SDR) ili mogu prepoznavati supstrate različitih struktura kada obezbeđuju višestruku rezistenciju (eng. *multidrug resistance transporters*, MDR). Analizom genoma *L. lactis* detektovano je prisustvo 40 potencijalnih gena koji kodiraju MDR transportere (Lubelski i sar., 2006a), od čega su do danas svega četiri funkcionalno okarakterisana: LmrA, LmrP, LmrCD i CmbT.

MDR transporteri kod *L. lactis* / MDR transporters in *L. lactis*

Prema izvoru energije koji koriste za izbacivanje supstrata kroz citoplazmatsku ili spoljašnju membranu, MDR transporteri mogu da se podele u dve velike grupe:

- primarni transporteri, koji dobijaju energiju hidrolizom ATP-a i izbacuju supstrat nasuprot gradijentu koncentracije, a pripadaju ABC superfamiliji (eng. *ATP-binding cassette*, ABC);
- sekundarni transporteri, kod kojih je transport supstrata povezan sa razmenom protona (eng. *proton motive force*, PMF) i funkcionišu kao supstrat/H⁺ antiporteri.



Slika 1. Funkcionalno okarakterisani MDR transporteri kod *L. lactis*
Picture 1. Functionally characterized MDR transporters in *L. lactis*

Do sada su kod *L. lactis* okarakterisana četiri MDR transportera: dva primarna, ABC transportera (LmrA i LmrCD) i dva sekundarna, PMF transportera (LmrP i CmbT) (slika 1).

LmrA. LmrA (eng. *lactococcal multidrug-resistant protein, ATP*) je prvi uopšte opisan ABC transporter kod prokariota (van Veen i sar., 1996) i pokazuje strukturnu i funkcionalnu homologiju sa dobro okarakterisanim humanim P-glikoproteinom koji je uzročnik višestruke rezistencije tumorskih ćelija u toku hemoterapije. Pored toga, homolozi LmrA su pronađeni i kod patogenih bakterija poput *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Haemophilus influenzae* i *Mycoplasma genitalium* (van Veen i sar., 1998), zbog čega je izučavanje ovog proteina od kliničkog značaja.

LmrA je polipeptid veličine 590 aminokiselina i poseduje šest transmembranskih domena. Prepoznaje širok spektar strukturno različitih supstrata poput antikancerogenih lekova kao što su vinka alkaloidi (vinblastin i vinkristin) i antraciklini (daunomicin, doksorubicin), zatim DNK helatora (etidijum bromid), fluorescentnih boja (rodamin 6G i rodamin 123) (van Veen i sar., 1996, 1998), a obezbeđuje rezistenciju i na neke klinički najčešće korišćene antibiotike poput aminoglikozida, linkozamida, makrolida, hinolona i tetraciklina (Putman i sar., 2000).

Iako fiziološka uloga LmrA transportera nije najbolje razjašnjena, molekularni mehanizmi kojim LmrA posreduje u transportu supstrata su detaljno izučeni. Pokazano je da poseduje dva vezujuća mesta, jedno visokog afiniteta okrenuto ka citoplazmatičnoj strani ćelije i drugo, niskog afiniteta, orijentisano ka spoljašnjoj strani membrane koje omogućava otpuštanje supstrata u okolni prostor (van Veen i sar., 2000).

LmrCD. LmrC i LmrD su dva ABC polutransportera čiji su geni lokalizovani na istom operonu, a biohemijska ispitivanja pokazuju da LmrC i LmrD međusobno interaguju i dimerizuju u funkcionalni LmrCD heterodimerni protein (Lubelski i sar., 2004). Da LmrC i LmrD funkcionalno interaguju, dokazano je i činjenicom da *L. lactis* pokazuje značajan nivo rezistencije samo kada su LmrC i LmrD eksprimirani zajedno, dok nema efluksa supstrata kada su subjedinice eksprimirane pojedinačno.

LmrCD pokazuje visok nivo homologije sa ostalim ABC-transporterima, uključujući LmrA, humani P-glikoprotein i BmrA kod *Bacillus subtilis*. Istraživanjima je utvrđeno da delecija *lmrCD* gena kod *L. lactis* dovodi do povećane osetljivosti ovog soja na daunomicin, rodamin 6G i Hoechst (Lubelski i sar., 2006b). Pored toga, pokazano je da LmrCD ima ključnu ulogu u obezbeđivanju rezistencije na holat (Zaidi i sar., 2008), koji ulazi u sastav žuči kod ljudi. Iako laktokoke obično nisu deo fiziološke flore intestinalnog trakta, rezistencija na holat i žučne soli je od velikog značaja, posebno kod laktokoka koje se primenjuju kao probiotici. Homolozi LmrCD proteina su široko rasprostranjeni i među bakterijama gastrointestinalnog trakta poput laktobacila i bifidobakterija. Kako su ovi mikroorganizmi često

izloženi dejstvu žučnih soli, posedovanje transportera sličnih LmrCD proteinu im omogućava preživljavanje i kolonizaciju u crevima.

LmrP. LmrP protein pripada PMF grupi transportera i poseduje 12 transmembranskih domena. Obezbeđuje rezistenciju na različita lipofilna katjonska toksična jedinjenja poput etidijuma, rodamina 123, daunomicina i tetrafenilfosfonijuma (TPP⁺) (Bolhuis i sar., 1995; Putman i sar., 1999). Transportni eseji urađeni u celim ćelijama, kao i u membranskim vezikulama, pokazali su da je efluks toksičnih katjona inhibiran dodatkom nigericina (koji deluje na membranski potencijal, $\Delta\psi$) i valinomicina (koji remeti gradijent koncentracije protona, ΔpH), čime je potvrđeno da LmrP pripada grupi sekundarnih transportera (Putman i sar., 1999).

Pored toksičnih katjona, LmrP transporter takođe obezbeđuje rezistenciju na nekoliko grupa antibiotika širokog spektra koji pripadaju linkozamidima, makrolidima, streptograminima i tetraciklinima (Putman i sar., 2001). Osim toga, izučavanjem transportnih modela, uočeno je da LmrP prepoznaje supstrat unutar ćelijske membrane kao i LmrA i P-glikoprotein (Bolhuius i sar., 1996; Higgins i Gottesman, 1992).

CmbT. Poslednji okarakterisan MDR transporter kod *L. lactis* je sekundarni transporter CmbT (eng. cysteine and methionine biosynthesis transporter) (Filipić i sar., 2013a). Zapravo, *cmbT* gen je prvi put detektovan prilikom izučavanja metabolizma sumpora kod *L. lactis* (Fernández i sar., 2002), a pokazano je da produkt ovog gena snižava aktivnost cistation β, γ -lijaze, ključnog enzima u biosintezi metionina i cisteina, ali tada nije izučavana njegova uloga u fenomenu rezistencije na antibiotike (Golic i sar., 2005). Ipak, tačna uloga CmbT proteina u metabolizmu sumpora i dalje je nerazjašnjena.

U cilju funkcionalne karakterizacije CmbT proteina, *cmbT* gen je uspešno kloniran i ekspimiran u laktokokalnim ćelijama pomoću NICE sistema (eng. nisin controlled gene expression system) (Filipić i sar., 2013a). Pokazano je da su ćelije *L. lactis* koje pojačano sintetišu CmbT protein bile rezistentne na linkomicin (linkozamidni antibiotik koji u svojoj strukturi poseduje sumpor) kao i sulfonamidne antibiotike, sulfametoksazol i sulfadiazin. Prepoznavanje supstrata koji u svojoj strukturi poseduju sumpor, bilo je očekivano, s obzirom da je eksperimentalno utvrđena veza između CmbT proteina i metabolizma sumpora u *L. lactis*. Nasuprot LmrP proteinu, za koji nije pokazano da obezbeđuje rezistenciju na aminoglikozidne antibiotike, CmbT značajno doprinosi rezistenciji *L. lactis* na streptomycin, a pored toga i na aminonukleozidni antibiotik puromicin i semisintetski antibiotik rifampicin. Sa druge strane, CmbT nije imao značajnu ulogu u obezbeđivanju rezistencije na azitromicin, eritromicin i tetraciklin, koje LmrP prepoznaje, što ukazuje da LmrP i CmbT prepoznaju strukturno različite supstrate.

Pored antibiotika, pokazano je da CmbT prepoznaje i druge strukturno različite supstrate, čime je potvrđeno da je u pitanju MDR transporter. Slično LmrCD proteinu i CmbT obezbeđuje rezistenciju na holat, jednu od najznačajnijih

slobodnih žučnih kiselina u gastrointestinalnom traktu ljudi, koja snažno inhibira rast različitih intestinalnih bakterija. Pokazana je i CmbT proteinom posredovana rezistencija na Hoechst 33342 i etidijum bromid (Filipić i sar., 2013a).

Da bi se odredilo kom tipu transportera pripada CmbT urađeni su transportni eseji u prisustvu etidijum bromida i Hoechst 33342 koji imaju osobinu da fluoresciraju pri interakciji sa DNK. Intenzitet fluorescencije kod *L. lactis* koji pojačano eksprimira *cmbT*, bio je dva puta manji u poređenju sa kontrolnim *L. lactis* sojem u prisustvu etidijum bromida, a tri puta manji u prisustvu Hoechst 33342 (Filipić i sar., 2013a), čime je potvrđeno da je CmbT efluksni protein. Pored toga, dodatak ATPaznog inhibitora orto-vanadata nije imao uticaja na izbacivanje EtBr iz ćelije, dok je dodatak jonofora valinomicina i nigericina inhibirao efluks Hoechst 33342 iz ćelije, na osnovu čega se može zaključiti da za aktivnost CmbT proteina nije potrebna energija dobijena hidrolizom ATP-a, već da pripada grupi protonskih pumpi kao i ranije okarakterisan transporter LmrP (Filipić i sar., 2013a).

Poređenjem rasta kontrolnog *L. lactis* i *L. lactis* koji pojačano eksprimira *cmbT* u bogatom i hemijski definisanom minimalnom medijumu u prisustvu metionina i cisteina (Lozo i sar., 2008), dobijeno je da *L. lactis* koji pojačano eksprimira *cmbT* brže raste u odnosu na kontrolni soj, što je najverovatnije posledica efluksne aktivnosti CmbT transportera koji izbacuje toksične agense iz ćelije (Filipić i sar., 2013b). Za određivanje specifičnosti supstrata za CmbT korišćen je indirektan kompjuterski pristup, koji se zasniva na strukturnim karakteristikama samih supstrata i obuhvata trodimenzionalne QSAR (eng. quantitative structure activity relationships, QSAR) studije (Filipić i sar., 2014). Pokazano je da CmbT protein prepoznaje supstrate najverovatnije unutar lipidnog dvosloja, a ne u citoplazmi, posredstvom aminokiselinskih ostataka Leu331, Val357 i Leu360 koji se nalaze u membrani (Filipić i sar., 2014), što je u skladu sa rezultatima dobijenim za LmrA i LmrP kod kojih je za određivanje specifičnosti supstrata primenjen eksperimentalni pristup (Bolhuis i sar, 1996; Mazurkiewicz i sar., 2005).

Zaključak / Conclusion

Uvođenje antibiotika u terapiju infektivnih oboljenja kod ljudi i životinja bilo je od revolucionarnog značaja. Međutim, razvoj rezistencije na različite antimikrobne agense kod bakterija postao je globalni problem. Dugo je izučavanje mehanizama rezistencije bilo usmereno samo na patogene bakterije, međutim, poslednjih godina sve veći značaj dobijaju i nepatogene ili komensalne bakterije, kao rezervoar genetičkih determinanti rezistencije na antibiotike.

Usled toga, od velikog je značaja izučavanje i poznavanje mehanizama rezistencije kod BMK i laktokoka koje se najčešće koriste kao starter kulture, kako bi se omogućio pravilan odabir sojeva za upotrebu u prehrambenoj industriji. To znači da laktokoke koje ulaze u sastav startera prolaze detaljne analize, uključujući i testove rezistencije na antibiotike. Pored toga, u potpunosti mora biti isključena mogućnost da se geni za rezistenciju nalaze na prenosivim genetičkim

elementima poput plazmida, kako bi se onemogućio horizontalni transfer gena za rezistenciju na druge bakterije.

Međutim, rizik da bakterije mlečne kiseline budu izvor gena za rezistenciju, ipak postoji, najviše u uslovima tradicionalne proizvodnje, kada fermentaciji podležu sirovo meso i mleko, a proces je vođen autohtonim sojevima bakterija mlečne kiseline, koje nisu ispitane na prisustvo genetičkih determinanti rezistencije. Zbog toga se preporučuje da se u uslovima tradicionalne proizvodnje sirovo mleko zameni termički obrađenim, kada god je to moguće, kako bi se izbegla opasnost da se rezistentni sojevi BMK nađu u gotovom proizvodu.

Pored toga, svest da bakterije poreklom od životinja prisutne u hrani, mogu biti eventualni rezervoar gena za rezistenciju na antibiotike, važna je za racionalizaciju upotrebe antibiotika, ne samo kod ljudi već i u veterinarskoj medicini.

NAPOMENA / ACKNOWLEDGEMENT

Rad je realizovan po projektu „Izučavanje gena i molekularnih mehanizama u osnovi probiotičke aktivnosti bakterija mlečne kiseline izolovanih sa područja Zapadnog Balkana“ (broj: 173019), Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije.

This work is realized by the Project „Genes and molecular mechanisms promoting probiotic activity of lactic acid bacteria from the Western Balkans“ (number: 173019), financed by the Ministry of Education, Science and Technological Development of Republic of Serbia.

Literatura / References

1. Bolhuis H., Poelarends G., van Veen HW, Poolman B., Driessen AJM and Konings WN. The lactococcal *lmrP* gene encodes a proton motive force-dependent drug transporter. *J Biol Chem* 1995; 270: 26092–98.
2. Bolhuis H., vanVeen HW, Molenaar D., Poolman B, Driessen, AJM, Konings WN. Multidrug resistance in *Lactococcus lactis*: evidence for ATP-dependent drug extrusion from the inner leaflet of the cytoplasmic membrane. *EMBO J* 1996; 15: 4239– 45.
3. Corroler D, Desmaures N, Gueguen M. Correlation between polymerase chain reaction analysis of the histidine biosynthesis operon, randomly amplified polymorphic DNA analysis and phenotypic characterization of dairy *Lactococcus* isolates. *Appl Microbiol and Biotechnol* 1999; 51: 91–99.
4. Fernández M, Kleerebezem M, Kuipers OP, Siezen RJ, van Kranenburg R. Regulation of the *metC-cysK* operon, involved in sulphur metabolism in *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol* 2002; 184: 82-90.
5. Filipic B, Golic N, Jovcic B, Tolinacki M, Bay DC, Turner RJ, Antic-Stankovic J, Kojic M, Topisirovic L. The *cmbT* gene encodes a novel major facilitator multidrug resistance transporter in *Lactococcus lactis*. *Res Microbiol* 2013a; 164: 46-54.
6. Filipic B, Jovcic B, Uzelac G, Miljkovic M, Antic-Stankovic J, Topisirovic L, Golic N. Over-expressed CmbT multidrug resistance transporter improves the fitness of *Lactococcus lactis*. *Genetika* 2013b; 45(1): 197-206.
7. Filipic B, Nikolic K, Filipic S, Jovcic B, Agbaba D, Antic Stankovic J, Kojic M, Golic N. Identifying the CmbT substrates specificity by using a quantitative structure-activity relationship (QSAR) study. *J Taiwan Inst Chem E* 2014; 45(3): 764-71.
8. Golic N, Schliekelmann M, Fernandez M, Kleerebezem M, van Kranenburg R. Molecular characterization of the CmbR activator binding site in the *metC-cysK* promoter region in *Lactococcus lactis*. *Microbiol-SGM* 2005; 151: 439-46.

9. Higgins CF, Gottesman MM. Is the multidrug transporter a flippase? Trends Biochem Sci 1992; 17: 18-21.
10. Khemariya P, Singh S, Nath G, Gulati AK. Isolation, Identification, and Antibiotic Susceptibility of *Lactococcus lactis* from Dairy and Non-dairy Sources. Czech J Food Sci 2013; 31(4): 323-31.
11. Klein G, Hallman C, Casas IA, Abad J, Louwers J, Reuter G. Exclusion of vanA, vanB and vanC type glycopeptide resistance in strains of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus rhamnosus* used as probiotics by polymerase chain reaction and hybridization methods. J Appl Microbiol 2000; 89: 814–15.
12. Lopez-Diaz TM, Alonso C, Roman C, Garcia-Lopez ML, Moreno B. Lactic acid bacteria isolated from a hand made blue cheese. Food Microbiol 2002; 17: 23–32.
13. Lozo J, Begovic J, Jovicic B, Golic N, Topisirovic L. Effect of methionine and cysteine deprivation on growth of different natural isolates of *Lactobacillus* spp. in chemically defined media. Arch Biol Sci 2008; 60(4): 509-17.
14. Lubelski J, de Jong A, van Merkerk R, Agustindari H, Kuipers OP, Kok J, Driessen AJM. LmrCD is a major multidrug resistance transporter in *Lactococcus lactis*. Mol Microbiol 2006a; 61: 771–81.
15. Lubelski J, Mazurkiewicz P, van Merkerk R, Konings WN, Driessen AJM. *ydaG* and *ydbA* of *Lactococcus lactis* encode a heterodimeric ATP-binding cassette-type multidrug transporter. J Biol Chem 2004; 279: 34449–55.
16. Lubelski J, van Merkerk R, Konings WN, Driessen AJM. Nucleotide-Binding Sites of the Heterodimeric LmrCD ABC-Multidrug Transporter of *Lactococcus lactis* Are Asymmetric. Biochemistry 2006b; 45: 648-56.
17. Mathur S, Singh R. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. Int J Food Microbiol 2005; 105(3): 281-95.
18. Mazurkiewicz P, Sakamoto K, Poelarends GJ, Konings WN. Multidrug Transporters in Lactic Acid Bacteria. Mini-Rev Med Chem 2005; 5: 173-81.
19. Putman M, van Veen HW, Degener JE, Konings WN. The lactococcal secondary multidrug transporter LmrP confers resistance to lincosamides, macrolides, streptogramins and tetracyclines. Microbiology 2001; 147: 2873–80.
20. Putman M, van Veen HW, Konings WN. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. Microbiol. Mol Biol Rev 2000; 64: 672–93.
21. Putman M, van Veen HW, Poolman B, Konings WN. Restrictive use of detergents in the functional reconstitution of the secondary multidrug transporter LmrP. Biochemistry 1999; 38: 1002–8.
22. Teuber M. The genus *Lactococcus*. In: Wood, B.J.B., Holzapfel, W.H. (Eds.), The Genera of Lactic Acid Bacteria. Blackie Academic & Professional, London, 1995: 173–234.
23. van Veen HW, Callaghan R, Soceneantu L, Sardini A, Konings WN, Higgins CF. A bacterial antibiotic-resistance gene that complements the human multidrug-resistance P-glycoprotein gene. Nature 1998; 391: 291–95.
24. van Veen HW, Margolles A, Muller M, Higgins CF, Konings WN. The homodimeric ATP-binding cassette transporter LmrA mediates multidrug transport by an alternating two-site (two-cylinder engine) mechanism. EMBO J 2000; 19: 2503–14.
25. van Veen HW, Venema K, Bolhuis H, Oussenko I, Kok J, Poolman B, Driessen AJM, Konings WN. Multidrug resistance mediated by a bacterial homolog of the human drug transporter MDR1, Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 10668–72.
26. Vendrell D, Balcázar JL, Ruiz-Zarzuola I, de Blas I, Gironés O, Múzquiz JL. *Lactococcus garvieae* in fish: A review. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2006; 29: 177–98.
27. Walther C, Rossano A, Thomann A, Perreten V. Antibiotic resistance in *Lactococcus* species from bovine milk: Presence of a mutated multidrug transporter *mdt(A)* gene in susceptible *Lactococcus garvieae* strains. Vet Microbiol 2008; 131: 348–57.

28. Zaidi AH, Bakkes PJ, Lubelski J, Agustiandari H, Kuipers OP, Driessen AJM. The ABC-Type multidrug resistance transporter LmrCD is responsible for an extrusion-based mechanism of bile acid resistance in *Lactococcus lactis*. J Bacteriol 2008; 190: 7357–66.
29. Zhou N, Zhang JX, Fan MT, Wang J, Guo G, Wei XY. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Chinese yogurts. J Dairy Sci 2012; 95(9): 4775-83.
30. Zully S. *Lactococcus garvieae* endocarditis. Arch Cardiovasc Dis 2011; 104: 138-9.

ENGLISH

**RESISTANCE TO ANTIBIOTICS IN LACTIC ACID BACTERIA –
STRAIN *LACTOCOCCUS***

**Filipić Brankica, Golic Natasa, Jovicic B., Cupic Miladinovic-Cupic Dejana,
Sokovic Svetlana, Popovic Dusanka, Kojic M.**

Lactic acid bacteria (LAB) are widely used in the food industry, especially in the production of fermented dairy products and meat. The most studied species among LAB is *Lactococcus lactis*. *L. lactis* strains are of great importance in the production of fermented dairy products such as yogurt, butter, fresh cheese and some kind of semi-hard cheese.

Although *L. lactis* acquired the „Generally Regarded As Safe“ (GRAS) status, many investigations indicated that lactococci may act as reservoirs of antibiotic resistance genes, which could be transferred to other bacterial species in human gastrointestinal tract including pathogens.

The genome analysis of *L. lactis* indicated the presence of at least 40 putative drug transporter genes, and only four multidrug resistance (MDR) transporters are functionally characterized: LmrA, LmrP, LmrCD i CmbT. LmrA is the first described MDR transporter in prokaryotes. LmrCD is responsible for resistance to cholate, which is an integral part of human bile and LmrCD is important for intestinal survival of lactococci that are used as probiotics. Secondary multidrug transporter LmrP confers resistance to lincosamides, macrolides, streptogramins and tetracyclines. CmbT protein has an effect on the host cell resistance to lincomycin, sulfadiazine, streptomycin, rifampicin, puromycin and sulfametoxazole.

Since the food chain is an important way of transmitting resistance genes in human and animal population, it is of great importance to study the mechanisms of resistance in lactococci and other LAB, intended for the food industry.

Key words: Lactic acid bacteria, *Lactococcus lactis*, MDR transporters

РЕЗИСТЕНТНОСТЬ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ К АНТИБИОТИКАМ – РОД *LACTOCOCCUS*

Филипич Бранкица, Голич Наташа, Йович Б., Чупич Миладинович Деяна, Сокович Светлана, Попович Душанка, Койич М.

Молочнокислые бактерии (МКБ) находят широкое применение в пищевой промышленности, особенно в производстве кисломолочных продуктов и мяса. Наиболее изученным видом в рамках МКБ является *Lactococcus lactis*. Штаммы, относящиеся к виду *L. Lactis*, имеют исключительное значение в производстве кисломолочных продуктов, таких как простокваша, сливочное масло, свежие сыры и некоторые виды полутвердых сыров.

Несмотря на то, что в основном лактококки считаются безопасными микроорганизмами, исследования показывают, что они могут быть резервуаром генов устойчивости к антибиотикам, которые путем горизонтального переноса могут быть переданы другим видам бактерий, включая патогенные.

В работе показано, что в мембране бактерий вида *L. lactis* локализуются эффлюксные насосы, обеспечивающие резистентность к структурно различным субстратам (eng. multidrug resistance transporters-MDR). Путем анализа генома *L. lactis* установлено наличие 40 потенциальных генов, кодирующих транспортеры MDR, из которых до настоящего времени всего четыре получили функциональную характеристику: *LmrA*, *LmrP*, *LmrCD* и *SmbT*. *LmrA* является первым описанным основным транспортером у прокариотов. *LmrCD* обеспечивает резистентность к холатам, входящим в состав желчи, что имеет значение для выживания лактококков, применяемых в качестве пробиотиков, в пищеварительном тракте человека и животных. *LmrP* является вторичным транспортером и обеспечивает резистентность к некоторым линкозамидам, макролидам, стрептограминам и тетрациклинам. *SmbT* является последним описанным транспортером MDR у *L. lactis* и способствует резистентности к линкомицину, сульфонамидным антибиотикам, сульфаметоксазолу и сульфадиазину, аминогликозидному антибиотику стрептомицину, аминонуклеозидному антибиотику пурамицину и полусинтетическому антибиотику рифампицину.

Так как пищевая цепь представляет собой важный путь переноса генов резистентности в рамках популяции человека и животных, необходимо интенсивное изучение механизмов резистентности у лактококков и других МКБ, предназначенных для использования в пищевой промышленности.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, *Lactococcus lactis*, MDR транспортеры