

# Potencijal rizosfernog mikrobioma ekološki uzgojene zelene salate u širenju antibiotički rezistentnih enterobakterija

---

Bačani, Marta

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:227522>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-02**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET

**POTENCIJAL RIZOSFERNOG MIKROBIOMA  
EKOLOŠKI UZGOJENE ZELENE SALATE U  
ŠIRENJU ANTIBIOTIČKI REZISTENTNIH  
ENTEROBAKTERIJA**

DIPLOMSKI RAD

Marta Bačani

Zagreb, kolovoz, 2024.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET**

Diplomski studij:

Agroekologija – Mikrobna biotehnologija u poljoprivredi

**POTENCIJAL RIZOSFERNOG MIKROBIOMA  
EKOLOŠKI UZGOJENE ZELENE SALATE U  
ŠIRENJU ANTIBIOTIČKI REZISTENTNIH  
ENTEROBAKTERIJA**

DIPLOMSKI RAD

Marta Bačani

Mentor:

Prof. dr. sc. Mirna Mrkonjić Fuka

Zagreb, kolovoz, 2024.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZJAVA STUDENTA  
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, **Marta Bačani**, JMBAG 1003156862, rođen/a 20.01.2001. u Koprivnici, izjavljujem da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom:

**POTENCIJAL RIZOSFERNOG MIKROBIOMA EKOLOŠKI UZGOJENE ZELENE  
SALATE U ŠIRENJU ANTIBIOTIČKI REZISTENTNIH ENTEROBAKTERIJA**

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
*Potpis studenta / studentice*

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZVJEŠĆE  
O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA**

Diplomski rad studenta/ice **Marte Bačani**, JMBAG 1003156862, naslova

**POTENCIJAL RIZOSFERNOG MIKROBIOMA EKOLOŠKI UZGOJENE  
ZELENE SALATE U ŠIRENJU ANTIBIOTIČKI REZISTENTNIH  
ENTEROBAKTERIJA**

obranjen je i ocijenjen ocjenom \_\_\_\_\_, dana \_\_\_\_\_.

Povjerenstvo:

potpisi:

- |    |                                   |           |       |
|----|-----------------------------------|-----------|-------|
| 1. | Prof. dr. sc. Mirna Mrkonjić Fuka | mentor    | _____ |
| 2. | Dr. sc. Irina Tanuwidjaja         | komentor* | _____ |
| 3. | Prof. dr. sc. Sanja Sikora        | član      | _____ |
| 4. | Prof. dr. sc. Aleksandra Bensa    | član      | _____ |

## **Zahvala**

Zahvalila bih se svojoj mentorici, prof. dr. sc. Mirni Mrkonjić Fuka na pruženoj prilici za stjecanje iskustva, ukazanom povjerenju i vremenu te korisnim savjetima i stručnom vodstvu.

Zahvaljujem se i komentorici dr.sc. Irini Tanuwidjaja na omogućenom prijenosu znanja iz područja molekularne biologije i iskustvu rada u laboratoriju (University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna, Institute of Food Science, Food Microbiology and Hygiene Laboratory) te na svim savjetima, smjernicama i pomoći oko obrade podataka.

Također, zahvaljujem se asistentici Zavoda za mikrobiologiju, Valentini Odorčić, mag. ing. agr. na pomoći u laboratoriju prilikom izvođenja analiza te korisnim i praktičnim savjetima za izradu diplomskog rada.

Za kraj najveća zahvala mojoj obitelji koja mi je pružila podršku, razumijevanje i strpljenje tijekom cjelokupnog studiranja.

## Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Cilj rada.....	2
2. Razrada literature .....	3
2.1. Širenje antibiotske rezistencije u okolišu.....	3
2.2. Opće karakteristike reda Enterobacteriales .....	5
2.3. Antibiotska rezistencija reda Enterobacteriales .....	6
2.3.1. Rezistencija na beta laktamske antibiotike .....	7
2.3.2. Rezistencija na karbapeneme .....	8
2.3.3. Rezistencija na trimetoprim-sulfametoksazol .....	8
2.3.4. Rezistencija na kinolone .....	8
2.4. Identifikacija bakterija matrično potpomognutom laserskom desorpcijsko ionizacijskom spektrometrijom masa u vremenu leta (MALDI-TOF) .....	9
2.5. Genotipizacija rep- PCR metodom .....	10
2.6. Određivanje osjetljivosti na antibiotike disk difuzijskom metodom.....	11
3. Materijali i metode.....	13
3.1. Kemikalije .....	13
3.2. Laboratorijski uređaji .....	13
3.3. Otopine i hranjive podloge .....	14
3.3.1. Fiziološka otopina (0,85 % NaCl).....	14
3.3.2. Kruta TSA podloga .....	14
3.3.3. VRBG podloga.....	14
3.3.4. Tekuća TSB podloga.....	14
3.3.5. Mueller-Hinton (MH) agar .....	14
3.3.6. Kruta BHI podloga.....	15
3.4. Molekularni reagensi, markeri i početnice .....	15
3.5. Antibiotici.....	15
3.6. Uzorkovanje .....	16
3.7. Određivanje ukupnog broja mikroorganizama i enterobakterija.....	16
3.8. Identifikacija izolata iz rizosfernog tla kristalke .....	17
3.9. Genotipizacija izolata reda Enterobacteriales .....	18

3.9.3. DNA ekstrakcija.....	18
3.10. Određivanje antibiotske rezistencije .....	20
3.11. Statistička obrada rezultata.....	21
4. Rezultati .....	22
4.1. Brojnost mikroorganizama i enterobakterija u rizosferi salate .....	22
4.2. Mikrobna raznolikost u rizosferi zelene salate sorte kristalka .....	24
4.3. Genotipizacija enterobakterija.....	25
4.4. Osjetljivost sojeva reda Enterobacteriales na antibiotike.....	28
5. Rasprava.....	32
6. Zaključak.....	36
7. Popis literature .....	37
8. Prilozi .....	44
Životopis.....	43



## Sažetak

Diplomskog rada studenta/ice **Marte Bačani**, naslova

### **POTENCIJAL RIZOSFERNOG MIKROBIOMA EKOLOŠKI UZGOJENE ZELENE SALATE U ŠIRENJU ANTIBIOTIČKI REZISTENTNIH ENTEROBAKTERIJA**

Cilj ovog rada bio je odrediti zastupljenost enterobakterija u rizosferi ekološki uzgojene zelene salate (*Lactuca sativa* L.) te istražiti osjetljivost sojeva reda Enterobacteriales prema klinički značajnim antibioticima. Ukupno je sakupljeno 18 uzoraka rizosfernog tla tri sorti zelene salate (kristalka, puterica i hrastov list) s područja Varaždinske (OPG1) i Istarske županije (OPG2). Prosječne vrijednosti ukupnog broja mikroorganizama iznosile su  $6,92 \pm 0,12$  log CFU/g za OPG1 te  $7,09 \pm 0,16$  log CFU/g za OPG2, dok je ukupni broj enterobakterija bio  $5,68 \pm 0,26$  log CFU/g za OPG1, te  $5,23 \pm 0,42$  log CFU/g za OPG2. S obzirom da su statistički značajne razlike zamijećene samo u ukupnom broju mikroorganizama i enterobakterija između različitih gospodarstava, ali ne i između sorata, MALDI-TOF masenim spektrometrom identificirani su samo izolati izolirani iz rizosfernog tla sorte kristalke (n=120). Ukupno je identificirano šest rodova i 24 različite vrste bakterija, među kojima su tri roda i 12 vrsta pripadali redu Enterobacteriales, a po zastupljenosti se isticala vrsta *Enterobacter ludwigi* (41,2%). Svi izolati enterobakterija (n=85) genotipizirani su rep-PCR metodom te je selektirano njih 68 kojima je određena antibiotska rezistencija na 10 klasa antibiotika disk difuzijskom metodom. Među ispitivanim sojevima, jedan soj pokazao je ekstrinzično uvjetovanu rezistenciju na dvije klase antibiotika (1,5%), dva soja bila su rezistentna na jednu klasu (2,9%), jedan soj bio je rezistentan na jednu klasu antibiotika (1,5%), a umjereno osjetljiv na drugu, dok su tri soja bila umjereno osjetljiva na jednu klasu antibiotika (4,4%). Kod ostalih sojeva (n=55) rezistentnost ili umjerena osjetljivost bila je intrinzično uvjetovana za ispitivane klase antibiotika, dok je šest sojeva bilo osjetljivo na sve ispitivane antibiotike. Rezultati ovog rada pokazuju da enterobakterije čine značajan udio ukupne mikrobiote rizosfere zelene salate (1,3 do 8,8%), ali da ni jedan soj ne pripada skupini multirezistentnih bakterija.

**Ključne riječi:** ekološki proizvedena zelena salata, rizosfera, ukupan broj mikroorganizama, Enterobacteriaceae, antibiotska rezistencija

## Summary

Of the master's thesis – student Marta Bačani, entitled

### **THE POTENTIAL OF THE RHIZOSPHERIC MICROBIOME OF ORGANICLY GROWN LETTUCE IN THE SPREAD OF ANTIBIOTIC-RESISTANT ENTEROBACTERIA**

The aim of this study was to determine the presence of enterobacteria in the rhizosphere of organically grown lettuce (*Lactuca sativa* L.) and to investigate the sensitivity of Enterobacteriales strains to clinically relevant antibiotics. A total of 18 rhizosphere soil samples of three varieties of lettuce (Iceberg, Butterhead and Oak leaf) were collected from Varaždin (OPG1) and Istria (OPG2) Counties. The average values of the total number of microorganisms were  $6,92 \pm 0,12$  log CFU/g for OPG1 to  $7,09 \pm 0,16$  log CFU/g for OPG2, while the total number of enterobacteria was  $5,68 \pm 0,26$  log CFU/g for OPG1 and  $5,23 \pm 0,42$  log CFU/g for OPG2. Although statistically significant differences were observed only in the total number of microorganisms and enterobacteria between the two farms, but not between cultivars, only isolates isolated from the rhizosphere soil of the Iceberg variety were identified by MALDI-TOF (n=120). In total, six genera and 24 different types of bacteria were identified, among which three genera and 12 species belonged to the order Enterobacteriales and species *Enterobacter ludwigi* was the most abundant (41,2%). All isolates of enterobacteria (n=85) were genotyped using the rep-PCR method, and 68 of them were selected for which antibiotic resistance to 10 different classes of antibiotics was determined using the disk diffusion method. Among the tested isolates, one showed extrinsically conditioned resistance to two classes of antibiotics (1.5%), two isolates were resistant to one class of antibiotics (2.9%), one isolate was resistant to one class of antibiotics (1.5%) and moderately sensitive to another, while three isolates were moderately sensitive to one class of antibiotics (4.4%). In the other strains (n=55), resistance or moderate sensitivity was intrinsically determined for the tested classes of antibiotics, while six strains were sensitive to all tested antibiotics. The results of this work show that enterobacteria make up a significant proportion of the total microbiota of the lettuce rhizosphere (1.3 to 8.8%), but that not a single strain belongs to the group of multiresistant bacteria.

**Keywords:** organically produced lettuce, rhizosphere, total number of microorganisms, Enterobacteriaceae, antibiotic resistance

## 1. Uvod

Rizosferni mikrobiom čine različiti mikroorganizmi, korisni i patogeni, koji naseljavaju područje tla koje je pod direktnim utjecajem korijena biljke. Brojnost obje skupine mikroorganizama vrlo je velika u zoni rizosfere zahvaljujući prisutnosti različitih biljnih izlučevina koji potiču rast i razvoj mikroorganizama (Sun i sur., 2023). Osim toga, brojnost mikroorganizama u rizosferi ovisi i o vrsti mikroorganizma i biljke, tipu tla, klimatskim i antropogenim utjecajima (Berg i Smalla., 2009; Redžepović i sur., 2012; Kłapeć i sur., 2016; Yu i sur., 2018). Korisni mikroorganizmi rizosfere imaju važnu ulogu u kruženju elemenata, poticanju rasta biljaka, razgradnji organske tvari te u obrani biljaka od štetnika (Pantigoso i sur., 2022). S druge strane fitopatogeni mikroorganizmi djeluju štetno na rast i zdravlje biljaka te mogu dovesti do gubitka prinosa. Naročiti problem predstavljaju patogeni mikroorganizmi koji mogu uzrokovati ozbiljne posljedice po zdravlje u slučaju kontaminacije biljnih proizvoda namijenjenih prehrani ljudi (Mendes i sur., 2013).

Urbanizacija i globalno zatopljenje kontinuirano dovode do nedostatka kvalitetne vode za navodnjavanje, zbog čega se u poljoprivrednoj proizvodnji, zbog nedostataka resursa, za navodnjavanje koristi otpadna voda koja može sadržavati lijekove, fekalije te ljudske patogene. Također, netretirana otpadna voda oslobađa organske spojeve ugljika i druge hranjive tvari koji mogu stimulirati rast bakterija, kako korisnih, tako i patogenih. Sekvenciranjem bakterijskih 16S rRNA gena iz DNA zajednice tla navodnjavanog otpadnom vodom u usporedbi s tlom navodnjavanim kišnicom, utvrđena je veća relativna brojnost bakterija porodice *Enterobacteriaceae* (Broszat i sur., 2014; Bottichio i sur., 2020). Posebno zabrinjava činjenica proizašla iz istraživanja obrađenih otpadnih voda u Republici Hrvatskoj kojom je dokazana prisutnost multirezistentnih patogenih bakterija porodice *Enterobacteriaceae* i u pročišćenju otpadnoj vodi (Puljko i sur., 2022). Ova porodica često je normalan stanovnik probavnog trakta ljudi i životinja, no predstavljaju i uzročnika brojnih bolničkih i izvanbolničkih infekcija. Zbog činjenice da nekoliko vrsta unutar ove porodice pripada ESKAPE grupi patogena (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterobacter* spp.), koji su multirezistentni na antibiotike, enterobakterije postaju zabrinjavajući problem na globalnoj razini (Jelić, 2018; Taggar i sur., 2020).

Opsežna uporaba antibiotika u stočarskoj proizvodnji i primjena stajnjaka smatra se značajnim putem ulaska ostatka lijekova i gena otpornosti na antibiotike u poljoprivredna tla. Stajnjak je veliki rezervoar plazmida, transpozona i integrona, koji utječu na horizontalni prijenos gena rezistencije na antibiotike, čime se ubrzava razvoj otpornosti na antibiotike među autohtonim bakterijskim zajednicama u tlu (Zhang i sur., 2020).

Povrće poput zelene salate, špinata i klica koje se uobičajeno konzumira bez termičke obrade predstavlja poseban rizik za ljudsko zdravlje zbog potencijalnog unosa antibiotički rezistentnih sojeva tijekom konzumacije (Remuzgo-Martinez i sur., 2015; Turner i sur., 2019; Žiarovská i sur., 2022). Potencijalno patogene bakterije mogu ući u lanac proizvodnje hrane ne samo nakon žetve, već i tijekom proizvodnje usjeva kroz mjesta bočnog izbijanja korijena ili kroz različita oštećenja te se potom mogu prenositi u jestivi dio krvožilnim sustavom biljke (Mendes i sur., 2013; Thomas i sur., 2024). Dokazano je da *E. coli* i *Salmonella enterica* serevor Typhimurium, koje i u niskim koncentracijama predstavljaju značajan rizik za ljudsko

zdravlje, preživljavaju na zelenoj salati tijekom cijele vegetacije i do nekoliko dana nakon branja (Brandl i sur., 2023). Ulaskom rezistentnih bakterija u jestive dijelove komercijalnih usjeva i njihovom konzumacijom može doći do infekcija sojevima koje je zbog njihove rezistentnosti na klinički značajne antibiotike nemoguće liječiti, zbog čega se povećavaju troškovi i raste mortalitet (Huang i sur., 2021). Enterobakterije otporne na antibiotike prisutne su u velikom broju u rizosferi zelene salate (Erlacher i sur., 2015; Maffei i sur., 2016; Zhang i sur., 2019; Guron i sur., 2019; Thomas i sur., 2024), međutim o enterobakterijama i njihovom obrascu antibiotske rezistencije u ekološki uzgojenoj zelenoj salati nema dovoljno podataka, a oni potpuno nedostaju za područje RH. Stoga ovaj rad daje uvid u antibiotsku rezistenciju enterobakterija prisutnih u rizosferi ekološki uzgojene zelene salate u RH i potencijal rizosferenog tla u širenju takvih bakterija na svježije lisnato povrće.

## 1.1. Cilj rada

S obzirom na rizik unosa multirezistentnih patogenih bakterija hranom te sve veći interes za ekološki uzgojeno povrće, cilj ovog rada je bio odrediti brojnost te identificirati vrste i sojeve reda Enterobacteriales izolirane iz rizosfere ekološki proizvedene zelene salate te istražiti osjetljivost sojeva prema klinički značajnim antibioticima, a kako bi se evaluirao potencijal rizosferenog mikrobioma zelene salate u širenju patogenih bakterija u lancu opskrbe hranom.

Hipoteze ovog istraživanja su:

1. Bakterije reda Enterobacteriales biti će prisutne u ispitivanim uzorcima tla te će činiti značajan udio ukupne mikrobiote tla. Osim enterobakterija sa štetnim utjecajem na zdravlje čovjeka, biti će identificirane i vrste s potencijalnim korisnim djelovanjem na tlo i biljku.
2. Enterobakterije izolirane iz rizosfere ekološki uzgojene zelene salate će biti značajan izvor rezistencije na antibiotike u okolišu.

Specifični ciljevi istraživanja:

1. Određivanje ukupnog broja bakterija i ukupnog broja bakterija reda Enterobacteriales u rizosferi ekološki uzgojene zelene salate na dva obiteljska poljoprivredna gospodarstva
2. Identifikacija izolata poraslih na VRBG podlozi selektivnoj za enterobakterije MALDI-TOF masenim spektrometrom do razine roda i vrste
3. Selekcija sojeva Enterobacteriales nakon izolacije DNA te određivanja unutarvrstne raznolikosti rep-PCR metodom
4. Ispitati djelovanje 10 klasa antibiotika (penicilini,  $\beta$ -laktami, cefalosporini 1. i 2. generacije, cefalosporini 3. i 4. generacije, karbapenemi, aminoglikozidi, tetraciklini, fluorokinoloni, antagonisti folne kiseline i nitrofurani) na sojeve vrsta reda Enterobacteriales disk difuzijskom metodom

## 2. Razrada literature

### 2.1. Širenje antibiotske rezistencije u okolišu

Pri liječenju bakterijskih infekcija upotrebljavaju se antimikrobni lijekovi, odnosno antibiotici, koji na različite načine ometaju životni ciklus mikroorganizma. Mehanizam djelovanja antibiotika podrazumijeva inhibiciju sinteze i ometanje funkcije stanične stijenke, inhibiciju sinteze proteina i nukleinskih kiselina te inhibiciju enzima ključnih za djelovanje mikroorganizama (Park i sur., 2016). Zbog prekomjerne i neadekvatne primjene antibiotika sve se više razvija rezistencija na ovu skupinu lijekova. Infekcije rezistentnim sojevima rezultiraju povećanim morbiditetom, smrtnošću i povećanim troškovima liječenja, a sve veću zabrinutost uzrokuje upravo pojava multirezistentnih enterobakterija (eng. *multiple drug resistant*, MDR) koje predstavljaju prijetnju globalnom zdravlju (Jelić, 2018). Multirezistentnost podrazumijeva neosjetljivost na najmanje jedan agens u tri ili više antimikrobnih kategorija, odnosno klasa antibiotika, među kojima su aminoglikozidi, beta-laktami, glikopeptidi, lipopeptidi, makrolidi, oksazolidinoni, kinoloni i tetraciklini, pri čemu se u obzir uzima samo ekstrinzična, odnosno stečena antibiotska rezistencija, dok se intrinzična otpornost ne uzima u obzir pri svrstavanju organizama u MDR (Magiorakos i sur., 2012; Sweeney i sur., 2018; CLSI, 2020). Najčešći mehanizmi rezistencije na antibiotike su: proizvodnja enzima koji ometaju mehanizam djelovanja antibiotika, smanjenje propusnosti stanične membrane, aktivno izbacivanje antibiotika iz stanice efluks pumpom, formacija biofilmova te ciljana izmjena i zaobilazanje antibiotika (Park i sur. 2016).

Dva su osnovna tipa antibiotske rezistencije: intrinzična i stečena rezistencija. Pod intrinzičnom se rezistencijom podrazumijeva prijenos gena s roditelja na potomstvo, odnosno vertikalni prijenos gena (Remuzgo-Martinez, 2015). Stečena rezistencija, podrazumijeva mutacije i horizontalni transfer gena (Kristich i sur., 2014). Načini horizontalnog transfera gena su konjugacija, transdukcija i transformacija (Yutin, 2013). Konjugacija je prijenos genetskih elemenata dviju susjednih stanica preko pili struktura, transdukciju provode bakteriofazi unošenjem strane DNA u bakterijsku stanicu, a transformacija je ulazak slobodne DNA u bakterijsku stanicu iz okoline. Osim ova dva tipa postoji i adaptivna, odnosno fenotipska antimikrobna rezistencija koja je povezana s ekspeditivnom prilagodbom transkriptoma kao odgovor na uvjete stresa ili podražaje iz okoline. Suprotno intrinzičnoj ili stečenoj otpornosti, adaptivna otpornost je nenasljedni fenotip koji se općenito vraća nakon uklanjanja signala okidača (Tavares-Carreón i sur., 2023). Zbog navedenih mehanizama, česta uporaba antibiotika, dovodi do povećanja broja multirezistentnih bakterija koji koriste više mehanizama rezistentnosti istovremeno (Park i sur., 2016; Bush, 2012). Širenje i razvoj rezistencije na antibiotike kod patogenih bakterija ozbiljno je ugrozilo učinkovitost sadašnjih antibiotika, a otkrivanje novih antibiotika je izuzetno sporo (Zhang i sur., 2019). U brojnim istraživanjima dokazano je da okoliš također predstavlja značajan izvor antibiotske rezistentnih bakterija te da su tlo, voda i sediment rezervoari antibiotske rezistencije. (McKinney i sur., 2018; Zhang i sur., 2019; Zhang i sur., 2020; Huang i sur., 2021; Zalewska i sur., 2021).

Širenje patogenih mikroorganizama i gena rezistencije na antibiotike u tlu uglavnom se pripisuje intenzivnom stočarstvu, poljoprivrednim praksama, primjeni stajskog gnojiva i otpadnih voda za navodnjavanje (Zhang i sur., 2019). U istraživanju Zhanga i sur. (2017) i Martia i sur. (2014) ispitivao se učinak primjene stajnjaka na širenje antibiotske rezistencije u tlu. Tako su Zhang i sur. (2017) koristili različite vrste stajnjaka (gnoj peradi, goveda i svinja), različito tretirane prije primjene (anaerobno digestirano, kompostirano, mehanički odvodnjeno gnojivo) i u različitim količinama te dokazali da stajnjak mijenja sastav mikrobiote u tlu i značajno povećava razinu gena koji kodiraju za rezistenciju na antibiotike. Voda za navodnjavanje najčešće potječe iz bunara, rijeka, rezervoara i jezera, koja su podložna kontaminaciji ljudskim patogenima putem fecesa životinja (Maffei i sur., 2016). Tijekom 2018. i 2019. godine izbila je epidemija povezana s rimskom salatom kontaminiranom patogenim sojem *E. coli* O157:H7 u Sjedinjenim Američkim Državama. Iako konačan put kontaminacije nije bio utvrđen, smatra se da je izvor onečišćenja bio spremnik onečišćene vode korištene za zalijevanje prilikom uzgoja zelene salate 2018. godine te kontaminacija fecesom stoke koja je pasla na susjednom gospodarstvu 2019. godine (Waltenburg i sur., 2021). Otpadna voda koja se koristi za navodnjavanje može osim patogenih mikroorganizama sadržavati i lijekove, ponajviše antibiotike, bakterije otporne na takve lijekove te gene rezistencije na antibiotike (Larsson i Flach, 2022). Koegzistencija antibiotika, patogena i gena rezistencije na antibiotike u otpadnoj vodi izaziva zabrinutost zbog mogućnosti mobiliziranja, širenja i prijenosa gena rezistencije na antibiotike i na bakterije koje su potencijalno patogene za ljude (Broszat i sur., 2014). U istraživanju koje je provedeno u dolini Mezquital 2014. godine otkrivena je veća prevalencija gamaproteobakterija u tlu navodnjavanom otpadnom vodom. To je razred medicinski, ekološki i znanstveno važnih grupa bakterija, kao što su *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae*, *Pseudomonadaceae* i *Xanthomonadaceae*. Osim toga detektirano je i obilje gena otpornosti na sulfonamidim i nakupljanje antibiotika tijekom dugotrajnog navodnjavanja takvom vodom (Broszat i sur., 2014).

Posljednjih godina otpadna voda prije primjene podvrgava se pročišćavanju, no unatoč tome, poznata je činjenica da su postrojenja za pročišćavanje rezervoari antibiotika, ali i gena rezistencije na antibiotike koji se ispuštaju iz farmi, bolnica i farmaceutske industrije (Han i sur. 2022). Kako postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda primaju otpadnu vodu iz različitih izvora, bakterije iz okoliša i patogene bakterije iz gastrointestinalnog (GI) trakta ljudi koji dopijevaju u kanalizacijski sustav (od kojih neke nose stečene gene rezistencije na antibiotike) mogu komunicirati i horizontalno razmjenjivati gene. Ovaj horizontalni prijenos gena rezistencije na antibiotike glavni je uzrok širenja rezistencije kod većine Gram-negativnih bakterija, a u uređajima za pročišćavanje otpadnih voda olakšan je upravo zbog velike gustoće bakterija, velikog opterećenja hranjivim tvarima i raznim vrstama zagađivača, uključujući antibiotike. Stoga se uređaji za pročišćavanje otpadnih voda, ali i sama voda ispuštena iz takvih uređaja, smatra potencijalnim rezervoarima gena rezistencije na antibiotike, ali i rezervoarom oportunističkih patogena te se smatraju žarišnom točkom za horizontalni transfer antibiotski rezistentnih gena (Puljko i sur., 2022). U istraživanju Hana i sur. (2022) otkrivena je visoka koncentracija sulfametoksazola u tlu u blizini uređaja za pročišćavanje otpadnih voda, dok sulfametoksazol nije primijećen na drugim mjestima uzorkovanja tla koja su udaljena od uređaja za pročišćavanje otpadnih voda, čime je

potvrđeno da uređaji za pročišćavanje otpadnih voda djeluju kao izvor onečišćenja te sadrže mnoštvo gena otpornosti na antibiotike (Han i sur. 2022).

Još jedan potencijalan izvor patogenih mikroorganizama i gena rezistencije na antibiotike u tlu je i stajnjak životinja koji se također naširoko koristi u poljoprivredi. Ostaci veterinarskih antibiotika i geni rezistencije na antibiotike prisutni u stajnjaku mogu ući u hranidbeni lanac kroz sustav tlo-biljka, što isto tako rezultira širenjem gena rezistencije na antibiotike među životinjama, okolišem i ljudima (Huang i sur., 2021). Stajnjak predstavlja glavni put za ulazak gena rezistencije na antibiotike u tlo, čak i ako životinje koje ga proizvode nikada nisu bile liječene antibioticima (Zhang i sur., 2019). Iako proces kompostiranja može značajno smanjiti razinu otpornosti na antibiotike u stajnjaku, rizik od prijenosa rezistoma iz njega na poljoprivredna tla ne može se u potpunosti eliminirati (Zhang i sur., 2019; Huang i sur., 2021). Rezistencija na antibiotike može se prenijeti iz tla u biljke na nekoliko načina. Na primjer, bakterije koje nose gene rezistencije na antibiotike mogu se pričvrstiti na površinu lišća povrća, preživjeti kao filozofnii mikroorganizmi, kolonizirati se u lišću tkiva kao endofiti lista, ili prenositi u korijenje povrća kao endofiti korijena (Zhang i sur., 2019).

## 2.2. Opće karakteristike reda Enterobacteriales

Bakterije reda Enterobacteriales pripadaju razredu Gammaproteobacteria. To je velika i raznolika skupina Gram-negativnih, fakultativno anaerobnih, štapićastih bakterija koje ne stvaraju spore. Članovi reda su ubikvisti te nastanjuju niz različitih ekoloških niša od tla i vode do živih organizama uključujući i ljude (Adeolu i sur., 2016). Red Enterobacteriales sastoji se od sedam obitelji uključujući *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae*, *Pectobacteriaceae*, *Yersiniaceae*, *Hafniaceae*, *Morganellaceae* i *Budviciaceae* te 60 rodova koji obuhvaćaju preko 250 vrsta (Taggar i sur., 2020). Obitelj *Enterobacteriaceae* obuhvaća više od 30 rodova i 120 vrsta bakterija, no oni klinički značajne uglavnom obuhvaćaju 10 rodova i manje od 25 vrsta. Gotovo svi su fakultativni anaerobi, koji fermentiraju glukozu, reduciraju nitrata u nitrite i negativni su na oksidazu. Uz iznimku rodova *Shigella* i *Klebsiella* koje su nepomične, ove bakterije su pokretne i imaju flagele (Rock i Donnenberg, 2014).

*Enterobacteriaceae* predstavljaju mali dio gastrointestinalne (GI) mikrobiote ljudi u zdravim uvjetima. Iako njihova uloga još nije u potpunosti razjašnjena, poznato je da enterobakterije održavaju anaerobno okruženje u GI traktu jer kao fakultativni anaerobi troše kisik koji difundira s površine sluznice i stoga sudjeluju u uspostavljanju savršenog okruženja za obligatne anaerobe koji čine većinu crijevne mikrobiote. Osim toga ključne su za proizvodnju vitamina, poput vitamina K i B12, ali i za zaštitu od crijevnih patogenih infekcija. Ove bakterije onemogućuju kolonizaciju egzogenih patogena kroz različite mehanizme poput izlučivanja antimikrobnih spojeva, kompeticije za hranjive tvari i imunološke aktivacije (Moreira de Gouveia i sur., 2024). Neke vrste karakterizira i mogućnost fiksacije atmosferskog dušika, inhibitorno djelovanje prema fitopatogenim mikroorganizmima, dok neki sojevi doprinose fermentaciji hrane te imaju probiotička svojstva (Ramos-Vivas i sur., 2022).

Unatoč korisnom djelovanju, mnoge enterobakterije značajni su biljni, životinjski, ali i ljudski patogeni. Enterobakterije su uzročnici bolničkih i izvanbolničkih infekcija. Najčešće

su to infekcije mokraćnog sustava, bakterijemije i niz infekcija probavnog sustava, a uzročnici su i meningitisa i kožnih infekcija, posebno rana zbog čega se smatraju izuzetno štetnim za ljudsko zdravlje (Taggar i sur., 2020). Pojedine su vrste, poput *Salmonella* spp., *Shigella* spp. i *Yersinia pestis* obligatni patogeni, dok su *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* i *Proteus mirabilis* oportunistički patogeni koji čine tipičnu mikrobiotu GI trakta, usne šupljine i spolnog sustava (Adeolu i sur., 2016; Jelić, 2018) zbog čega se smatraju i indikatorima onečišćenja otpadnih voda (Britannica, 2022). Kao fitopatogeni mikroorganizmi, među kojima se posebno ističe porodica *Erwiniaceae*, mogu biti štetni za rast i zdravlje biljaka te dovesti do gubitka prinosa (Mendes i sur., 2013).

Neke od vrsta porodice *Enterobacteriaceae* pripadaju ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterobacter* spp.) grupi patogena koje su multirezistentne na većinu klinički značajnih antibiotika, prilagođene su za preživljavanje u modernom zdravstvenom okruženju i imaju sposobnost širenja diljem svijeta te se iz tog razloga nalaze na listi prioriteta Svjetske zdravstvene organizacije za razvoj novih antibiotika (Jelić, 2018; Taggar i sur., 2020; Miller i sur., 2024).

### 2.3. Antibiotička rezistencija reda *Enterobacteriales*

Enterobakterije su važni uzročnici mnogih infektivnih bolesti, a postale su i sve značajniji uzročnici infekcija povezanih sa zdravstvenom skrbi. Pojedine vrste bakterija ovog reda posjeduju intrinzičnu otpornost na određene grupe antibiotika, što je urođena karakteristika ove skupine, no puno veći klinički problem predstavlja stečena otpornost na antibiotike, koja se javlja u bakterija koje bi prirodno trebale biti osjetljive na taj antibiotik. Mehanizmi stečene otpornosti često su nepredvidivi te stalno evoluiraju, kao posljedica velike uporabe antibiotika. Nestašica novih antibiotika koji bi nadvladavali mehanizme otpornosti na postojeće antibiotike je posebno izražena upravo kod Gram-negativnih bakterija (Andrašević i sur., 2009, Jelić, 2018).

Zbog niske toksičnosti, a visoke baktericidnosti i širokog spektra djelovanja,  $\beta$ -laktamski antibiotici su najčešće korišteni antibiotici u kliničkoj praksi te najviše zabrinjava stjecanje otpornosti enterobakterija na ovu grupu antibiotika. Nadalje, pri liječenju infekcija mokraćnog sustava i infekcija probavnog sustava visoko mjesto zauzimaju trimetoprim-sulfametoksazol i kinoloni s obzirom da su ovi antibiotici učinkovitije uništavaju mikroorganizme iz mokraćnog sustava negoli ostale grupe antibiotika. Velika uporaba trimetoprim-sulfametoksazola dovela je, međutim, do široko rasprostranjene otpornosti na ovaj antibiotik u većine enterobakterija. S toga se kao posljednja linija obrane u liječenju infekcija uzrokovanih multirezistentnim Gram-negativnim bakterijama koriste karbapenemi (Andrašević i sur., 2009; Tambić Andrašević i sur., 2012). No zbog razvoja mehanizama kojima bakterije deaktiviraju i ovu skupinu antibiotike, namjenjenu liječenju teških bakterijskih infekcija, dolazi do pojave rezistencije na karbapeneme, zbog čega se naglašava važnost razvoja novih antibiotika i učinkovitog upravljanja antibioticima koji se trenutno koriste (Smith i sur., 2024).



Primjeri mehanizama kojima enterobakterije razvijaju otpornost na antibiotike su promjene ciljnog mjesta penicilin vežućih proteina kod beta-laktamskih antibiotika ili promjene DNAGiraze kod kinolona. Mehanizam izbacivanja antibiotika iz stanice posredstvom pumpe bitan je način stjecanja otpornosti na tetracikline i kinolone. Do smanjene propusnosti stanične stijenke dolazi zbog gubitka porinskih proteina i ovako posredovana otpornost je obično nižeg stupnja, jer se radi o smanjenom, a ne potpuno prekinutom unosu antibiotika u stanicu. Proizvodnja enzima koji razaraju antibiotik najbitniji je mehanizam otpornosti na  $\beta$ -laktamske antibiotike i aminoglikozide (Jelić, 2018).

### 2.3.1. Rezistencija na beta laktamske antibiotike

Najčešći mehanizam otpornosti enterobakterija na beta-laktamske antibiotike je proizvodnja enzima beta-laktamaza. Prvi beta-laktamski antibiotik s djelotvornošću na Gram-negativne bakterije je bio ampicilin. Neke vrste enterobakterija pokazuju urođenu otpornost na ampicilin zbog prirodne proizvodnje malih količina beta-laktamaza koje su dovoljne za razaranje labilnih supstrata kao što su ampicilin i cefalosporini I. generacije, no ne i cefalosporine II. i III. generacije te karbapeneme. Kod *Klebsiella* spp., *Proteus vulgaris*, *Citrobacter diversus* urođena rezistencija na ampicilin je posredovana beta-laktamazama, što podrazumijeva da su podložne inhibiciji klavulanskom kiselinom. U *Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii*, *Serratia* spp., *Morganella morganii*, *Providencia stuartii*, *Proteus rettgeri* otpornost na ampicilin i cefalosporine prve generacije je posredovana inducibilnim AmpC beta-laktamazama (Andrašević i sur., 2009).

Ampicilin i cefalosporini I. generacije su jaki induktori i labilni supstrati AmpC beta-laktamaza, što je osnova njihove neučinkovitosti u bakterijskih vrsta koje prirodno posjeduju inducibilne AmpC beta-laktamaze. *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella* spp. i *Shigella* spp. su prirodno osjetljive na ampicilin, no ubrzo nakon uvođenja ampicilina u kliničku praksu opisan je u soju *E. coli* mehanizam otpornosti na ampicilin posredstvom proizvodnje stečene beta-laktamaze nazvane TEM-1. TEM-1 se nalazi na plazmidu i brzo se proširila među Gram-negativnim bakterijama (Andrašević i sur., 2009).

Prisutnost urođenih beta-laktamaza i pojava stečenih beta-laktamaza bila je poticaj za otkrivanje spojeva otpornih na aktivnost bakterijskih beta-laktamaza te su tako nastali cefalosporini II., III. i IV. generacije. Ubrzo nakon uvođenja cefalosporina III. generacije, odnosno cefalosporina proširenog spektra, pojavili su se izolati otporni na te antibiotike za što su najviše odgovorne enterobakterija koje prirodno luče male količine kromosomske AmpC  $\beta$ -laktamaze (*Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii* i *Serratia* spp.). U sljedećoj fazi širenja rezistencije geni za AmpC  $\beta$ -laktamaze prelaze na plazmide i na taj se način šire u bakterijske vrste koje prirodno ne posjeduju kromosomske AmpC (npr. *E. coli* i *K. pneumoniae*) (Andrašević i sur., 2012). Paralelno s evolucijom AmpC beta-laktamaza počeo se širiti i drugi mehanizam otpornosti na cefalosporine III. generacije, proizvodnja beta-laktamaza proširenog spektra (eng. *extended spectrum beta-laktamaze*, ESBL). ESBL hidroliziraju cefalosporine širokog i proširenog spektra djelovanja, monobaktame i peniciline. Većina ESBL nastala je mutacijom gena koji kodiraju beta-laktamaze širokog spektra TEM-1, TEM-2 i SHV-1. Kasnije se počinje širiti novi tip ESBL koje pokazuju veći afinitet za cefotaksim te su nazvane cefotaksimaze M (CTX-M). CTX-M nisu nastale mutacijom beta-laktamaza širokog spektra,

već su kodirane plazmidskim genima koji potječu od kromosomskih gena klinički slabo značajne bakterijske vrste *Kluyvera* spp. ESBL se prenose plazmidima te se lako šire i izazivaju epidemije u bolničkoj i u izvanbolničkoj sredini (Andrašević i sur., 2009). Geni za ESBL enzime se nalaze na plazmidima na kojima se također nalaze i geni koji kodiraju determinante uključene u rezistenciju na fluorokinolone, aminoglikozide i trimetoprim-sulfametoksazol (Tambić Andrašević i sur., 2012).

### 2.3.2. Rezistencija na karbapeneme

Učestale infekcija koje uzrokuju sojevi enterobakterija koji proizvode ESBL dovele su do povećane uporabe karbapenema (imipenem, meropenem, ertapenem, doripenem) kao lijekova posljednje linije obrane. Karbapenemi, zbog strukture i veličine lako ispoljavaju svoja antibakterijska svojstva, dok su u isto vrijeme otporni na hidrolizu većinom  $\beta$ -laktamaza. Enterobakterije postaju rezistentne na karbapeneme zbog produkcije karbapenemaza ili smanjenja propusnost bakterijske stjenke koja u kombinaciji s  $\beta$ -laktamazama minimalne sposobnost hidrolize karbapenema (ESBL, AmpC) dovodi do rezistencije. U sojeva koji ne posjeduju gen za karbapenemaze, rezistencija na karbapeneme je uglavnom nestabilna te može nestati zbog negativnog utjecaja smanjene propusnosti stjenke na preživljenje mutanata i zbog nemogućnosti širenja horizontalnim transferom gena. Ovakav mehanizam najčešće dovodi do rezistencije na ertapenem, ali ne i na druge karbapeneme. Pojava karbapenemaza u enterobakterija predstavlja problem u kliničkoj praksi, zbog velike raznolikosti enzima i mogućnosti širenja rezistencije karbapenemazama horizontalnim prijenosom gena. Geni za karbapenemaze nalaze se često na plazmidima zajedno s genima koji kodiraju determinante rezistencije na ostale klase antibiotika. (Tambić Andrašević i sur., 2012).

### 2.3.3. Rezistencija na trimetoprim-sulfametoksazol

Trimetoprim-sulfametoksazol (kotrimoksazol) je, zbog odličnih suzbijanja uzročnika iz urogenitalnog područja, često bio prvi lijek izbora u liječenju infekcija mokraćnog sustava. Široka uporaba ovog antibiotika dovela je do visoke otpornosti *E. coli* na ovaj antibiotik u mnogim zemljama Europe i SAD-u. Većina kotrimoksazol rezistentnih *E. coli* pripada klonalnoj grupi A (engl. *clonal group A*, CGA). Ovaj klon pokazuje virulentni profil karakterističan za sojeve koji uzrokuju ekstraintestinalne infekcije i posjeduje konzervirani multiplorezistentni fenotip kodiran konjugabilnim plazmidom (Andrašević i sur., 2009).

### 2.3.4. Rezistencija na kinolone

Kinoloni su širokospektralni antibiotici, koji se najčešće upotrebljavaju u liječenju infekcija mokraćnog sustava uzrokovanih bakterijama *E. coli*, ali i infekcija uzrokovanih drugim enterobakterijama. Rezistencija na kinolone je posljedica promjena u enzimima koji su primarna ciljna mjesta djelovanja antibiotika (DNA giraza i topoizomeraza IV) ili smanjenja koncentracije antibiotika u bakterijskoj stanici zbog promjena u propusnosti

bakterijske stjenke. Oba mehanizma rezistencije su posljedica mutacija gena koji se nalaze na bakterijskom kromosomu (Tambić Andrašević i sur., 2012).

Prva determinanta plazmidne rezistencije na kinolone nazvana je Qnr i kodirana je genom na plazmidu pMG252. Qnr geni kodiraju proteine s pentapeptidnim ponavljajućim sljedovima koji se vežu za DNA girazu, no točan mehanizam na koji qnr proteini štite DNA girazu još nije otkriven. Prisutnost *qnr* gena, smanjuje maksimalnu učinkovitost kinolona pružajući bakterijama produženi vremenski okvir u kojem dolazi do mutacija i razvoja efikasnijih mehanizama rezistencije na kinolone. Trenutno je poznato 5 skupina *qnr* gena (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*) i svi dijele isti mehanizam djelovanja. Nedugo nakon otkrića *qnr* gena, otkriveno je još nekoliko determinanti plazmidne rezistencije na kinolone od kojih se ističe enzim AAC(6')-Ib-cr, koji je mutirana verzija aminoglikozid acetil transferaze. Pojava plazmidnih determinanti rezistencije na kinolone upućuje na brzo širenje kinolonske rezistencije među enterobakterijama, horizontalnim prijenosom gena (Tambić Andrašević i sur., 2012).

Osim za kinolone, među enterobakterijama pronađene su i nove determinante rezistencije za aminoglikozide. Riječ je o enzimima, nazvanim 16S rRNA metilaze. Sojevi koji posjeduju rRNA metilaze, izrazito su rezistentni na sve trenutno dostupne aminoglikozide. Do sada je otkriveno šest različitih gena za rRNA metilaze: *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *armA* i *npmA*. Geni ovih enzima se nalaze na plazmidima koji imaju izrazito velik potencijal horizontalnog prijenosa. Svi enzimi metiliraju aminoacilno mjesto na 16S rRNA čime onemogućuju ispoljavanje baktericidnog učinka aminoglikozida te predstavljaju potencijalnu opasnost u budućnosti (Tambić Andrašević i sur., 2012).

## **2.4. Identifikacija bakterija matično potpomognutom laserskom desorpcijsko ionizacijskom spektrometrijom masa u vremenu leta (MALDI-TOF)**

Matično potpomognuta laserska desorpcijsko ionizacijska spektrometrija masa u vremenu leta (engl. *Matrix Assisted LASER Desorption/Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry*) je kemotaksonomska metoda koja se koristi za identifikaciju mikroorganizama. Masena spektrometrija je analitička tehnika u kojoj se kemijski spojevi ioniziraju u nabijene molekule i mjeri se njihov omjer mase i naboja (Singhal i sur., 2015; Tsuchida i sur., 2020). Razvojem ionizacije laserske desorpcije uz pomoć matrice (MALDI) povećala se primjenjivost MS na velike biološke molekule poput proteina, a povećala se i količina mikrobnih vrsta koje se mogu identificirati ovom metodom (Oviaño i sur. 2020). U procesu dolazi do pretvaranja peptida u ione dodavanjem ili gubitkom jednog ili više od jednog protona, no stvaranje iona ne dovodi do značajnog gubitka integriteta uzorka, što nazivamo „meko ionizacija“ (Singhal i sur., 2015; Tsuchida i sur., 2020).

Proces započinje tako da se uzorak za analizu pomoću MALDI MS priprema miješanjem ili oblaganjem otopinom organskog spoja koji apsorbira energiju i naziva se matrica. Otopina matrice sastoji se od vode i mješavine organskih otapala koja sadrže etanol/metanol ili acetonitril i jaku kiselinu poput trifluoroctene kiseline (TFA), koja otapa matricu. Otapala prodiru kroz staničnu stijenku mikroorganizama i ekstrahiraju unutarstanične

proteine. Kada otapalo ispari, dolazi do 'ko-kristalizacije' proteinskih molekula i drugih staničnih spojeva zarobljenih unutar otopine matrice. Proces pripreme uzorka za identifikaciju mikroorganizama pomoću MALDI-TOF MS započinje biranjem kolonije mikroorganizama koja se nanosi na ploču za analizu. Pripremna ekstrakcija proteina nastavlja se dodatkom mravlje kiseline koja je povećala sposobnost MALDI-TOF MS u identificiranju bakterijskih vrsta. Nadalje, uzorak unutar matrice ionizira se automatizirano laserskim zrakama. Desorpcija i ionizacija laserskom zrakom stvara jednostruko protonirane ione iz analita u uzorku. Protonirani ioni se zatim ubrzavaju pri fiksnom potencijalu, gdje se odvajaju jedan od drugog na temelju omjera mase i naboja. Nabijeni analiti se detektiraju i mjere pomoću različitih vrsta analizatora mase, a za mikrobiološke primjene koriste se uglavnom analizatori vremena leta (TOF). Tijekom MALDI-TOF analize, omjer mase i naboja iona mjeri se vremenom potrebnim da ion prijeđe dužinu cijevi. Nekoliko TOF analizatora uključuje ionsko zrcalo na stražnjem kraju letjelice, koje služi za refleksiju povratnih iona kroz letjelicu do detektora. Stoga ionsko zrcalo ne samo da povećava duljinu cijevi, već i ispravlja male razlike u energiji među ionima. Na temelju informacija o TOF-u, generira se karakterističan spektar koji se naziva otisak prsta peptidne mase (PMF) za analite u uzorku. Identifikacija mikroorganizama pomoću MALDI-TOF MS vrši se ili usporedbom PMF-a nepoznatog mikroorganizma s PMF-ovi sadržanim u bazi podataka ili usklađivanjem masa biomarkera nepoznatog organizma s bazom podataka proteoma. U PMF usklađivanju, MS spektar nepoznatih mikrobnih izolata uspoređuje se s MS spektrima poznatih mikrobnih izolata sadržanih u bazi podataka. Za identifikaciju mikroorganizama na razini vrste koristi se tipični raspon mase od 2–20 kDa, koji predstavlja uglavnom ribosomske proteine. Za identifikaciju određenog mikroorganizma uspoređuje se njegov PMF s PMF-ovima ribosomskih proteina koji se nalaze u opsežnoj otvorenoj bazi podataka. Dakle, identitet mikroorganizma može se utvrditi sve do razine vrste i soja (Singhal i sur., 2015).

Unatoč tome što je MALDI-TOF proces brz, osjetljiv, visoko specifičan, pouzdan i ekonomičan, ograničenje tehnologije je u tome da je identifikacija novih izolata moguća samo ako spektralna baza podataka sadrži otiske peptidne mase tipskih sojeva specifičnih rodova/vrsta/podvrsta/sojeva, odnosno potrebno je poznavanje kompletne sekvence genoma organizma prije nego što se može stvoriti baza podataka njegovih predviđenih molekularnih masa proteina (Oviaño i sur. 2020, Tsuchida i sur., 2020).

## 2.5. Genotipizacija rep-PCR metodom

Rep-PCR temelji se na PCR (eng. *Polymerase Chain Reaction*) metodi, odnosno lančanoj reakciji polimeraze u kojoj se umnaža željeni odsječak DNA *in vitro*. Za umnažanje segmenta DNA pomoću PCR-a potreban je predložak DNA koji je potrebno umnožiti, početnica, DNA nukleotidi, enzim Taq polimeraza, pufer i ioni  $Mg^{2+}$ . Cijeli ciklički proces PCR-a je automatiziran i odvija se nekoliko sati. Njime upravlja uređaj, koji je programiran da mijenja temperaturu reakcije svakih nekoliko minuta kako bi se omogućila denaturacija i sinteza DNA (Joshi i Deshpande, 2011).

PCR tehnika se sastoji od tri glavna koraka: denaturacija, vezanje početnica i produljenje lanaca. U prvom koraku uzorak se prvo zagrijava pri temperaturi 90 – 97 °C uslijed čega dolazi do denaturacije, odnosno dvolančana molekula DNA se razdvaja na dvije

jednolančane DNA. U sljedećem koraku pri temperaturi 50 – 60 °C početnice se vežu za komplementarni lanac DNA te u posljednjem koraku započinje produljenje lanaca. Taq polimeraza dodaje dostupne nukleotide na krajeve vezanih početnica. Ovaj korak se odvija pri 72 °C, u trajanju od dvije do pet minuta. Provedeni proces rezultira udvostručenjem izvorne DNA, pri čemu svaka od novih molekula sadrži jedan stari i jedan novi lanac DNA. Ciklus denaturacije i sintetiziranja nove DNA ponavlja se 25-30 puta, čime se stvara velik broj kopije originalnog fragmenta DNA koji se mogu koristiti za daljnju analizu. Broj DNA fragmenata se eksponencijalno povećava, a računa se kao  $2^n$  ( $n$  = broj ciklusa). Po završetku PCR reakcije, uzorci se analiziraju i vizualiziraju agaroznom gel elektroforezom (Joshi i Deshpande, 2011; Khehra i sur., 2023).

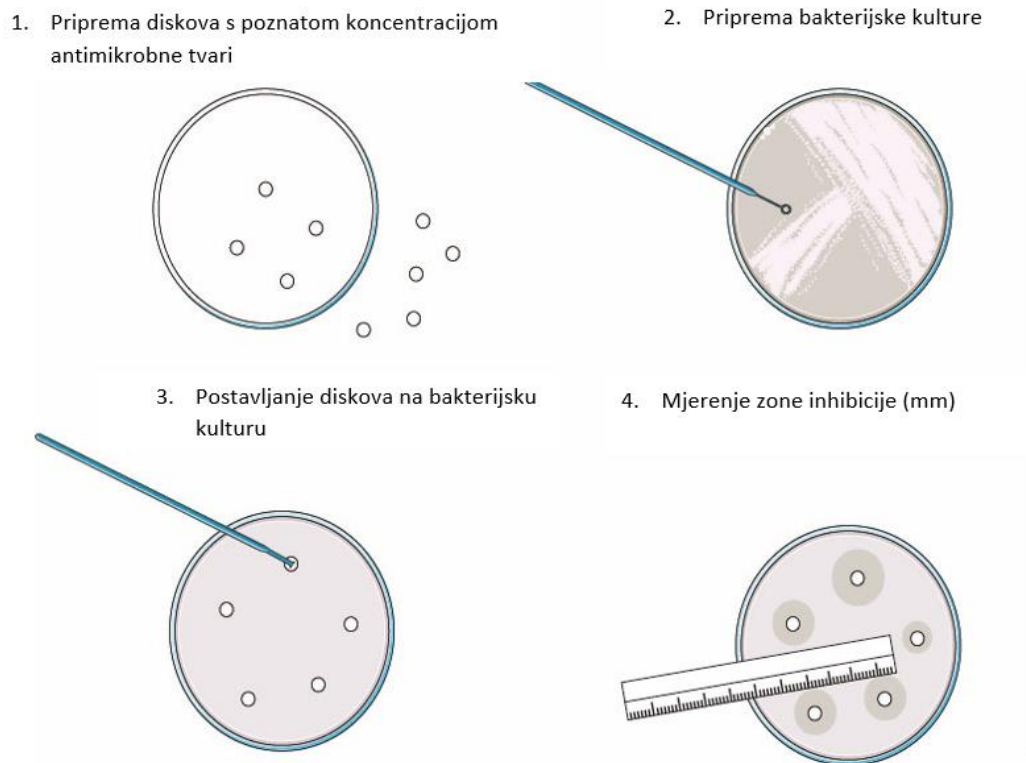
Rep-PCR metoda umnaža fragmente DNA koristeći početnice usmjerene na nekodirajuće ponavljajuće sekvence DNA razbacane unutar bakterijskog genoma, što omogućava identifikaciju sojeva bakterija (Healy i sur., 2005; Hussain i sur., 2021). Ponavljajuće ekstragene palindromske (REP) sekvence DNA obično se sastoje od dupliciranih gena, a prvo put su identificirane kod *E. coli* i *Salmonella typhimurium*. REP sekvenca duga je oko 40 parova baza i postoji otprilike 500-1000 kopija REP sekvenci umetnutih u DNA kromosoma, što čini oko 5% genoma. Ove sekvence su kasnije identificirane i karakterizirane u mnogim bakterijskim vrstama. (Wang i sur. 2015). Svaki mikrobnj soj ili izolat ima ponavljajuće sekvence smještene u različitim regijama njihovog genoma. Umnažanjem DNA između susjednih ponavljajućih elemenata pomoću PCR-a nastaju ampliconi, višestruki PCR produkti koji se razlikuju po veličini, odnosno proporcionalnoj genomskoj udaljenosti između veznih mjesta susjednih ponavljajućih elemenata. Ampliconi se zatim vizualiziraju elektroforezom te se uspoređuju uzorci povezivanja kako bi se odredila genetska povezanost između analiziranih bakterijskih izolata (Figuroa i sur., 2015; Hussain i sur., 2021).

## **2.6. Određivanje osjetljivosti na antibiotike disk difuzijskom metodom**

Metoda disk difuzije upotrebljava se od 1940. godine za rutinsko testiranje osjetljivosti bakterija na antimikrobne tvari (Prusty i sur., 2020). Postupak započinje pripremom biomasa analiziranih bakterijskih kultura izradom McFarland standarda, bakterijska kultura se potom inokulira na Mueller-Hinton (MH) agar. U sljedećem koraku celulozni diskovi filter papira (promjera oko 6 mm), koji sadrže poznatu koncentraciju ispitivane antimikrobne tvari, stave se na površinu agara. Petrijeve zdjelice se inkubiraju pod odgovarajućim uvjetima (37 °C/24 h) te antimikrobno sredstvo difundira u agar i inhibira rast ispitivanog mikroorganizma. Ako je bakterija osjetljiva na djelovanje antibiotika, pojavljuje se zona gdje izostaje bakterijski rast (zona inhibicije). Stupanj osjetljivosti bakterijskih kultura temelji se na veličini, odnosno promjeru zone inhibicije bakterijskog rasta oko diska koji se izražava u milimetrima (mm) (CLSI, 2020).

Antibiogram daje kvalitativne rezultate kategorizirajući bakterije kao osjetljive (O), umjereno osjetljive (UO) ili rezistentne na antimikrobno sredstvo (R), prema kriterijima koje određuje CLSI (eng. *Clinical and Laboratory Standard Institute*). Metoda disk difuzije smatra se alatom za tipizaciju koji se temelji na fenotipu otpornosti testiranog mikrobnog soja.

Međutim, budući da inhibicija rasta bakterija ne znači i njihovu smrt, ova metoda ne može razlikovati baktericidne i bakteriostatske učinke (Balouiri i sur., 2016; CLSI, 2020)



Slika 2.6.1. Shematski prikaz provedbe metode disk difuzije. Izvor: [https://superbloov.life/product\\_details/51709227.html](https://superbloov.life/product_details/51709227.html) - prestupljeno 5.4.2024.

### **3. Materijali i metode**

#### **3.1. Kemikalije**

1. Agaroza, Biozym LE Agarose (Biozym Scientific GmbH, Njemačka)
2. Natrij klorid (NaCl; VWR Chemicals, Belgija)
3. Voda, reagens za molekularnu biologiju (Sigma-Aldrich Co., SAD)
4. Mravlja kiselina (CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 70%, Carl Roth, Njemačka)
5. HCCA Matrix otopina ( $\alpha$ -cijano-4-hidroksicimetna kiselina, Bruker Daltonics, Njemačka)
6. Acetonitril (50%)

#### **3.2. Laboratorijski uređaji**

1. Orbitalna treskalica „Orbital Shaker-Incubator ES-20“ (BioSan, Latvija)
2. Brojač kolonija „Colony star“ (Funke Gerber, Njemačka)
3. Inkubator, Sanyo Incubator (Sanyo Electronic CO. Ltd., Japan)
4. Laboratorijska vaga, TE3102S (Santarius AG, Njemačka)
5. Vorteks uređaj „Vorteks V-1-plus“ (Biosan, Latvija)
6. Termoblok, ThermoMixer C (Eppendorf AG, Njemačka)
7. Magnetska mješalica, IKA® big squid (IKA-Werke, Njemačka)
8. Centrifuga 5417R (Eppendorf AG, Njemačka)
9. Vorteks miješalica, Vorteks V-1-plus (Biosan, Latvija)
10. Uređaj za kvantifikaciju DNA, Qubit™ 2.0 Fluorometer (Life Technologies, SAD)
11. Uređaj za PCR, Mastercycler Nexus SX1 (Eppendorf AG, Njemačka)
12. Kadica za izradu gela (Thermo Scientific, SAD)
13. Sustav za horizontalnu elektroforezu, SEA 2000® (Elchrom Scientific AG, Švicarska)
14. Uređaj za hlađenje sustava za horizontalnu elektroforezu, Julabo F12 (Julabo Labortechnik GmbH, Njemačka)
15. Uređaj za vizualizaciju agaroznih gelova, Molecular Imager® Gel Doc® XR+ with Image Lab Software (Bio-Rad Laboratories Inc., SAD)
16. Densitometar, DEN-1 Densitometer (Biosan, Latvija)
17. MALDI-TOF instrument (Bruker Daltonik, Bremen, Njemačka)

### 3.3. Otopine i hranjive podloge

#### 3.3.1 Fiziološka otopina (0,85 % NaCl)

Za pripremu fiziološke otopine korišten je natrij klorid (NaCl, VWR Chemicals, Belgija). Fiziološka otopina je pripravljena otapanjem 8,5 g natrij klorida u 1000 ml destilirane vode i sterilizirana na temperaturi od 121 °C u trajanju od 15 min. Sterilna fiziološka otopina korištena je za pripremu serije razrjeđenja za određivanje ukupnog broja mikroorganizama i ukupnog broja bakterija reda Enterobacteriales u rizosfernom tlu te za pripremu biomase za određivanje osjetljivosti sojeva na antibiotike.

#### 3.3.2. Kruta TSA podloga

Za pripremu TSA (eng. *Tryptic soy agar*, Biolife, Italija) hranjive podloge korištena je komercijalno dostupna, dehidrirana hranjiva podloga. Podloga je pripravljena otapanjem 40 g dehidrirane hranjive podloge u 1000 ml destilirane vode i sterilizirana na 121 °C/15 min. Potom je ohlađena na 45 – 50 °C, izlivena u Petrijeve zdjelice i ostavljena da polimerizira na sobnoj temperaturi. Ova podloga korištena je za određivanje ukupnog broja mikroorganizama u ispitivanom uzorku tla.

#### 3.3.3. VRBG podloga

VRBG (eng. *Violet red bile glucose agar*, Biolife, Italija) podloga pripravljena je suspendiranjem 41,5 g dehidrirane hranjive podloge u 1000 ml hladne destilirane vode. Smjesa je zagrijana do vrenja uz miješanje do potpunog otapanja dehidrirane hranjive podloge. Agar je do analiza održan u tekućem stanju temperiranjem na 47 – 50 °C u vodenoj kupelji. Ova podloga korištena je za određivanje ukupnog broja bakterija reda Enterobacteriales u rizosfernom tlu.

#### 3.3.4. Tekuća TSB podloga

Za pripremu TSB (eng. *Tryptic Soy Broth*, Difco, BBLTM Bacto™ Tryptonic Soy Broth, BD, Francuska) tekuće hranjive podloge korištena je komercijalno dostupna, dehidrirana hranjiva podloga. Podloga je pripravljena otapanjem 30 g dehidrirane podloge u 1000 ml destilirane vode i sterilizirana pri 120 °C/15 min. Tekuća TSB podloga korištena je za uzgoj prekonocnih kultura bakterija reda Enterobacteriales, odnos uzgoj biomase za izolaciju genomske DNA.

#### 3.3.5. Mueller-Hinton (MH) agar

Za pripremu Mueller-Hinton krute hranjive podloge (Biolife, Italija) korištene su komercijalno dostupna, dehidrirana hranjiva podloga i tehnički agar (eng. *Agar Technical*, Biolife, Italija). Podloga je pripravljena otapanjem 22 g dehidrirane podloge i 15 g agara u 1000 ml destilirane vode i sterilizirana na 121 °C/15 min. Nakon što je podloga ohlađena na 45 – 50 °C, u Petrijeve zdjelice otpipetirano je točno po 15 ml podloge. Nakon pipetiranja, podloge su ostavljene da polimeriziraju na sobnoj temperaturi. Ova podloga je korištena za ispitivanje osjetljivosti sojeva reda Enterobacteriales na odabrane antibiotike.



### 3.3.6. Kruta BHI podloga

Za pripremu BHI krute podloge (eng. *Brain Heart Infusion Broth*, Biolife, Italija) korišteni su komercijalno dostupna, dehidrirana hranjiva podloga i tehnički agar (eng. *Agar Technical*, Biolife, Italija). Podloga je pripremljena otapanjem 37 g dehidrirane podloge i 15 g agara u 1000 ml destilirane vode. Podloga je zatim sterilizirana na 121 °C/15 min i ohlađena na 45 – 50 °C. Ova podloga korištena je za uzgoj biomase izolata iz reda Enterobacteriales potrebne za ispitivanje antibiotske rezistencije.

## 3.4. Molekularni reagensi, markeri i početnice

1. AccuStart™ II PCR SuperMix (2x; Quanta Bioscience, SAD)
2. Boja za elektroforezu, GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Thermo Scientific, SAD)
3. Komplet za DNA kvantifikaciju, Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Life Technologies, SAD)
4. Chelex® 100 Resin (Bio-Rad Laboratories Inc., SAD)
5. Liofilizirana početnica GTG5 (Metabion, International AG, Njemačka)
6. Molekularni biljeg, 100 bp-DNA-Ladder extended (Carl Roth GmbH, Njemačka)
7. TAE pufer (50x) za molekularnu biologiju (AppliChem GmbH, Njemačka)

## 3.5. Antibiotici

Osjetljivost sojeva iz reda Enterobacteriales ispitana je na 12 različitih antibiotika koji pripadaju slijedećim klasama: penicilini, β-laktami, cefalosporini 1. i 2. generacije, cefalosporini 3. i 4. generacije, karbapenemi, aminoglikozidi, tetraciklini, fluorokinoloni, antagonisti folne kiseline i nitrofurani. U ovom istraživanju korišteni su komercijalno dostupni antibiotski diskovi BD BBL™ Sensi-Disc™ (Becton, Dickinson and Company, BD, Francuska). U Tablici 3.5.1. prikazani su korišteni antibiotici po klasama, njihove koncentracije i mehanizam djelovanja.

Tablica 3.5.1. Klase antibiotika, koncentracije i mehanizam djelovanja

Klasa	Antibiotik	Koncentracija	Mehanizam djelovanja
PENICILINI	Ampicilin (AM)	10 µg	Inhibicija sinteze stanične stjenke
B-LAKTAMI	Amoksicilin-clavulanat (AMC)	20/10 µg	Inhibicija sinteze stanične stjenke
CEFALOSPORINI 1. I 2. GENERACIJE	Cefazolin (CZ)	30 µg	Inhibicija sinteze stanične stjenke
CEFALOSPORINI 3. I 4. GENERACIJE	Ceftriakson (CRO) Ceftazidime (CAZ)	30 µg 30 µg	Inhibicija sinteze stanične stjenke

KARBAPENEMI	Imipenem (IPM)	10 µg	Inhibicija sinteze stanične stjenke
AMINOGLIKOZIDI	Tobramicin (NN)	10 µg	Inhibicija sinteze proteina
TETRACIKLINI	Tetracikline (TE)	30 µg	Inhibicija sinteze proteina
FLUOROKINOLONI	Ciprofloksacin (CIP)	5 µg	Inhibicija sinteze nukleinskih kiselina
	Norfloksacin (NOR)	10 µg	
ANTAGONISTI FOLNE KISELINE	Trimetoprim-sulfametoksazol (SXT)	1.25/23.75 µg	Inhibicija sinteze folne kiseline
NITROFURANI	Nitrofurantoin (F/M)	300 µg	Inhibicija enzimskih sustava

Izvor: Magiorakos i sur, 2012: CLSI, 2020.

### 3.6. Uzorkovanje tla

Uzorci tla korišteni za primarnu izolaciju bakterija su sakupljeni na dva obiteljska poljoprivredna gospodarstva (OPG1 i OPG2) koja se bave ekološkim uzgojem zelene salate (*Lactuca sativa* L.), OPG1 je na području Varaždinske županije u blizini grada Varaždina, a OPG2 je na području Istarske županije, u blizini grada Pule. Prikupljeni su uzorci rizosfere tla na kojem su uzgajane tri sorte salate, kristalka (K), puterica (P) i hrastov list (H). Uzorkovanje tla je provedeno u ljeto 2023. godine te su sakupljena tri uzorka za svaku sortu salate (n=18). Uzorci su transportirani u Zavod za mikrobiologiju Sveučilišta u Zagrebu Agronomski fakultet pri temperaturi od 4 °C te analizirani pri zaprimanju.

### 3.7. Određivanje ukupnog broja mikroorganizama i enterobakterija

Za potrebe određivanja ukupnog broja mikroorganizama i ukupnog broja bakterija reda Enterobacteriales, prikupljeni su uzorci tla (n=18) razrijeđeni u fiziološkoj otopini (0,85 % NaCl, VWR, Belgium) u omjeru 1:10. Ukratko, 10 g rizosfernog tla je pomiješano s 90 ml fiziološke otopine u Erlenmeyerovoj tikvici u koju su prethodno stavljene kvarcne kuglice za razbijanje agregata tla. Usitnjavanje fragmenata i homogenizacija tla je provedena na orbitalnoj treskalici (Orbital Shaker-Incubator ES-20, BioSan, Latvia) u trajanju od 20 minuta, a potom je napravljena serija razrijeđena u rasponu od  $10^{-1}$  do  $10^{-6}$ .

Ukupni broj mikroorganizama u rizosfernom tlu je određen na TSA podlozi (eng. *Tryptic soy agar*, Biolife, Italija), unaprijed pripremljenoj prema uputama proizvođača. Ukratko, iz serije razrjeđenja je na pojedinačne polimerizirane TSA podloge inokulirano po 100 µl od  $10^{-2}$  do  $10^{-6}$  razrjeđenja u duplikatima. Podloge su potom inkubirane aerobno na 30 °C u trajanju od 24h.

Ukupan broj bakterija reda Enterobacteriales je određen na VRBG agaru (eng. *Violet red bile glucose agar*, Biolofo, Italija) prethodno pripremljenom prema uputama proizvođača. Ukratko, po 1 ml odgovarajućeg razrjeđenja ( $10^{-3}$  do  $10^{-5}$ ) je sterilno otpipetiran u sterilne, prazne Petrijeve zdjelice. Razrjeđenja su prelivena s 10 ml VRBG agara temperiranog na 47 – 50 °C. Nakon polimerizacije, sve ploče prelivene su s dodatnih 5 ml VRBG podloge te

inkubirane anaerobno na 30 °C u trajanju od 24 h. Ukupan broj bakterija reda Enterobacteriales u svim uzorcima rizosfernog tla je određen u duplikatima.

Po završetku inkubacije, porasle su kolonije izbrojene pomoću brojača kolonija (ColonyStar, Funk Gerber, Berlin) te je izračunat CFU (eng. *Colony forming units*) prema formuli (1) i izražen kao log CFU po gramu tla (log CFU/g).

Formula 1.

$$\text{CFU} = \left( \frac{\text{broj kolonija}}{\text{volumen korištenog uzorka}} \right) \times \text{recipročna vrijednost decimalnog razrjeđenja}$$

Ukupan broj mikroorganizama i ukupan broj bakterija reda Enterobacteriales su prikazani kao srednje vrijednosti s pripadajućim standardnim devijacijama (log CFU/g ± sd).

### 3.8. Identifikacija izolata iz rizosfernog tla kristalke

Po 10 nasumično odbranih kolonija poraslih na VRBG podlozi iz svakog uzorka rizosfernog tla salate sorte kristalka prikupljenih na OPG1 i OPG2 pročišćeno je metodom iscrpljenja. Ukratko, s VRBG agara sterilnom ezom uzet je mali dio jedne kolonije i iscrpljen na čistoj, sterilnoj VRBG podlozi te je inkubiran na 30 °C kroz 24 h. Svaki izolat je pročišćen tri puta do dobivanja morfološki jednakih, čistih kolonija, odnosno do monokulture. Čisti izolati su spremljeni u tekućoj TSB podlozi pomiješanoj s glicerolom (25%) i čuvani na -20 °C do daljnjih analiza. Prikupljeno je ukupno 120 izolata.

Za potrebe identifikacije pročišćeni izolati iz glicerola nacijspljeni su na krutu TSA podlogu i inkubirani na 30 °C kroz 24 h. Identifikacija do razine vrste ili roda provedena je MALDI-TOF masenim spektrometrom (Bruker Daltonics, Njemačka) prema uputama proizvođača, odnosno prema protokolu „*extended direct transfer*“. Pojedinačna bakterijska kolonija razmazana je sterilnom čačalicom u tankom sloju na označene pozicije na MSP96 pločici za MALDI-TOF. Nakon nanošenja izolata, isti su prekriveni s 1 µl 70% mravlje kiseline (Carl Roth, Njemačka) i ostavljeni da se osuše na sobnoj temperaturi na zraku. Nakon sušenja, uzorcima na pločici dodan je još 1 µl unaprijed pripremljene MALDI matrice (10 mg/ml α-cijano-4-hidroksicimetna kiselina (HCCA) u 50%-tnom acetonitrilu i 2,5%-tnoj trifluorooctenoj kiselini, Bruker Daltonics, Njemačka) te je pločica ponovno ostavljena na sušenje na sobnoj temperaturi. Pripremljena pločica stavljena je u MALDI-TOF uređaj gdje su snimljeni spektri svakog uzorka, u rasponu masa od 2000 – 20000 Da, pomoću Microflex LT spektrometra masa (Bruker Daltonics, Njemačka) pod kontrolom računalnog programa FlexControl verzija 3.4 (Bruker Daltonics, Njemačka). Maseni spektri su obrađeni pomoću računalnog programa Biotyper verzija 4.1 (Bruker Daltonics, Njemačka) i uspoređeni s bazom Biotyper koja sadrži 8223 referentna MALDI-TOF MS spektra. Identifikacija izolata se temelji na sličnosti masenog spektra izolata određenom referentnom spektru te je izražena numeričkim kategorijama gdje vrijednosti variraju od 0,00 do 3,00. Vrijednost ≥ 2,00 ukazuje da je izolat točno identificiran na razini vrste, vrijednost ≥ 1,70 i < 2,00 da je izolat točno identificiran na razini roda, a vrijednost < 1,70 da ne postoje sličnosti između masenog spektra izolata i referentnih spektara, odnosno da identifikacija nije moguća ni na razini vrste ni na razini roda (Tablica 3.8.1.).

Tablica 3.8.1. Interpretacija pouzdanosti identifikacije izolata snimljenih MALDI-TOF uređajem

Vrijednosti	Interpretacija	Kategorija	Boja
2,00-3,00	pouzdana identifikacija na razini vrste	(+++)	Zelena
1,70-1,99	pouzdana identifikacija na razini roda	(+)	Žuta
0.00-1,69	identifikacija nije moguća	(-)	Crvena

U daljnje analize uključeni su samo izolati čija pripadnost redu Enterobacteriales je dokazana pomoću MALDI-TOF masenog spektrometra.

Nakon identifikacije izolata raznolikost mikroorganizama između gospodarstava određena je Shannon-Waeaver indeksom raznolikosti prema formuli (2). Veće vrijednosti Shannon-Waeaver indeksa ukazuju na veću raznolikost jedinki unutar nekog sustava.

Formula 2.

$$H' = - \sum_{i=1}^s p_i \ln p_i$$

Gdje je:  $p_i$  – udio jedinki vrste  $i$  u ukupnom broju svih jedinki ( $p_i = n/N$ ).

### 3.9. Genotipizacija izolata reda Enterobacteriales

#### 3.9.1. DNA ekstrakcija

Genomska DNA izolirana je iz izolata Enterobacteriales ( $n=85$ ) pomoću 10,0 % (m/V) otopine Chelex® 100 Resin (Bio-Rad Laboratories Inc., SAD) koja je pripremljena na način da je sterilno odvagano 2 g Chelex® 100 Resin i resuspendirano u 20 ml vode za molekularnu biologiju (Sigma-Aldrich Co., SAD). Chelex® 100 Resin otopinu potrebno je stalno miješati na magnetskoj miješalici (IKA® big squid, IKA-Werke, Njemačka) zbog brzog odvajanja faza.

Pojedinačni izolati reda Enterobacteriales iscrpljeni su do monokulture na krutoj TSA podlozi, zatim pojedinačna kolonija svakog izolata je sterilno inokulirana u 1,5 ml tekuće TSB podloge i inkubirana pri 30 °C preko noći. Nakon inkubacije, bakterijske stanice su od tekuće TSB podloge odvojene centrifugiranjem u centrifugi (5417R, Eppendorf AG, Njemačka) na 16 000  $xg/3$  min te je potom suvišna tekuća podloge pažljivo odlicena. Zaostali pelet je resuspendiran u 200  $\mu$ l 10,0 % (m/V) otopine Chelex® 100 Resin. Dobivena suspenzija je homogenizirana vorteksiranjem i inkubirana u termobloku (ThermoMixer C, Eppendorf AG, Njemačka) pri 56 °C/20 min/300 rpm. Nakon inkubacije, uzorci su ponovo vorteksirani i inkubirani u termobloku pri 100 °C/80 min/100 rpm. Nakon druge inkubacije, Chelex smola je odvojena centrifugiranjem na 14 000  $xg/2$  min. Zatim je u nove, sterilne mikrotubice pažljivo otpipetirano 100  $\mu$ l supernatanta koji sadrži DNA.

Genomska DNA je kvantificirana pomoću uređaja Qubit™ 2.0 Fluorometer (Life Technologies, SAD) i kompleta za kvantifikaciju genomske DNA Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Life Technologies, SAD). S obzirom da je Qubit™ dsDNA HS Reagent osjetljiv

na svjetlost, koncentrirana i radna otopina Qubit™ zaštićene su od svjetlosti. Svi reagensi (Qubit™ dsDNA HS Reagent 200x, Qubit™ dsDNA HS standard #1 (0 ng/μl), Qubit™ dsDNA HS standard #2 (10 ng/μl), Qubit™ dsDNA HS buffer) ostavljeni su da se temperiraju na sobnoj temperaturi. Zatim je pripremljena radna otopina Qubit™ dsDNA HS Reagent razrjeđenjem koncentriranog reagensa Qubit™ dsDNA HS Reagent 200x u puferu Qubit™ dsDNA HS buffer u omjeru 1:200. Standardi i genomska DNA su zatim pomiješani s radnom otopinom Qubit™ dsDNA HS Reagent u ukupnom volumenu od 200 μl. Korišteni volumeni standarda, uzoraka DNA i radne otopine prikazani su u Tablici 3.9.1.1.

Tablica 3.9.1.1. Korišteni volumeni standarda, uzoraka DNA i radne otopine

	Standard	Uzorci DNA
V (radna otopina Qubit™ dsDNA HS Reagent)	190 μl	198 μl
V (standard ili uzorak)	10 μl	2 μl
Ukupan volumen	200 μl	200 μl

Svi su uzorci zatim dobro izmiješani na vorteks mješalici i inkubirani na sobnoj temperaturi 2 min. Neposredno prije mjerenja, uređaj Qubit™ 2.0 Fluorometer (Life Technologies, SAD) je kalibriran mjerenjem koncentracije standarda #1 i #2. Nakon kalibracije izmjerena koncentracija izolirane DNA i izražena u ng/μl. Zatim je za genotipizaciju, prema potrebi, DNA razrijeđena na koncentraciju od 20 ng/μl u vodi za molekularnu biologiju (Sigma-Aldrich Co., SAD).

### 3.9.2. Genotipizacija izolata rep-PCR metodom

Izolati su genotipizirani pomoću rep-PCR metode, pri čemu je korištena početnica GTG5 (5' GTG GTG GTG GTG GTG 3'). Sastav reakcijske smjese, ukupnog volumena 25 μl za jednu reakciju, prikazan je u Tablici 3.9.2.1., a temperaturni profili provođenja Rep-PCA-a u Tablici 3.9.2.2. Rep-PCR reakcija je provedena u PCR uređaju (Mastercycler Nexus SX1, Eppendorf AG, Njemačka).

Tablica 3.9.2.1. Rep-PCR reakcijska smjesa

Reagens	Početna koncentracija	Završna koncentracija	Volumen (μl)
AccuStart™ II PCR SuperMix	2X	1x	12,5
GTG5 početnica	50 pmol/ μl	2 pmol/ μl	1,0
Ultra čista voda			10,5
DNA	20 ng/ μl	0,8 ng(μl	1
Ukupan volumen			25

Tablica 3.9.2.2. Temperaturni profili rep-PCR reakcije

Rep-PCR korak	Temperatura	Vrijeme	Broj ciklusa
---------------	-------------	---------	--------------

Početna denaturacija	94 °C	5 min	1
Denaturacija	94 °C	1 min	
Vežanje početnice	52 °C	1 min	30
Produženja lanca	72 °C	3 min	
Završno produživanje lanca	72 °C	10 min	1

Vizualizacija rep-PCR produkata provedena je u 2,0% agaroznom gelu koji je pripremljen miješanjem 1,4 g agaroze (Biozym LE Agarose, Biozym Scientific GmbH, Njemačka) i 70 ml 0,75x TAE pufera (AppliChem GmbH, Njemačka). Agarosa je u potpunosti otopljena u mikrovalnoj pećnici te potom izlivena u kadicu za izradu gela i ostavljena na sobnoj temperaturi da polimerizira. Prije nanošenja u gel svakom rep-PCR produktu (5 µl) dodano je 1,5 µl 6x LD boje (Thermo Scientific, SAD) koja je dobro pomiješana s produktom pipetiranjem. Uz rep-PCR produkte, u agarozni gel je dodano i 5 µl molekularnog biljega (100 bp-DNA-Ladder extended, Carl Roth GmbH, Njemačka). Uzorci su razdvojeni horizontalnom gel elektroforezom (SEA 2000®, Elchrom Scientific AG, Švicarska) na 80 V, 2000 mA, 300 W kroz 1 h i 50 min pri 19 °C (Julabo F12, Julabo Labortechnik GmbH, Njemačka. Nakon završetka elektroforeze, gel je bojan 30 min u 0,028 % otopini GelRed® Nucleic Acid Stain (Biotium, SAD). Višak boje uklonjen je odbojavanjem u 0,75x TAE puferu (AppliChem GmbH, Njemačka) 10 min. Nakon odbojavanja provedena je vizualizacija i fotografiranje gelova pomoću uređaja za vizualizaciju agaroznih gelova (Molecular Imager® Gel Doc® XR+ with Image Lab Software, Bio-Rad Laboratories Inc., SAD).

Rep-PCR obrasci su analizirani pomoću programa BioNumerics verzija 7.6.1 (Applied Maths, Belgija). Pri konstrukciji dendrograma je korištena razina tolerancije od 1% i optimizacija od 0,5%. Na temelju sličnosti manje od 95% (poglavlje 8., slika 8.1.) izabrano je 68 reprezentativnih izolata koji su korišteni za ispitivanje antibiotske rezistencije, dok je grupiranje izolata i opis grupa provedeno na temelju sličnosti 70% radi lakše preglednosti (poglavlje 4, slika 4.3.1.).

### 3.10. Određivanje antibiotske rezistencije

Osjetljivost sojeva iz reda Enterobacteriales na antibiotike je ispitana disk difuzijskom metodom (CLSI, 2020). Ispitivanje je provedeno na 12 različitih antibiotika koji pripadaju klasama: penicilini, β-laktami, cefalosporini, karbapenemi, aminoglikozidi, tetraciklini, fluorokinoloni, antagonisti folne kiseline i nitrofurani. Korišteni antibiotici po klasama i njihove koncentracije navedene su u Tablici 3.5.1. (poglavlje 3.5). Sojevi reda Enterobacteriales su prvo iscrpljeni do monokulture na krutim BHI podlogama te inkubirani na 25 °C preko noći. Nakon inkubacije je za svaki ispitani soj pripremljena točno određena biomasa dodavanjem jedne po jedne kolonije u 5 ml sterilne fiziološke otopine do postizanja turbiditeta McFarland standarda 0,5 što odgovara bakterijskoj koncentraciji  $1,5 \times 10^8$  CFU/ml. Nakon dodavanja kolonije suspenzija je dobro homogenizirana vorteksiranjem na vorteks miješalici (Vorteks V1-plus, Biosan, Latvija). Turbiditet je izmjeren denzitrometrom (DEN-1 Densitometer, Biosan, Latvija). Pripremljene bakterijske suspenzije nacijepljene su na krute MH podloge sterilnim vatenim štapićima, gusto razmazane, a između svakog razmaza ploča

je zakrenuta za 60°. Diskovi s odabranim antibioticima nanjeni su na MH ploče. Ploče su zatim stavljene na inkubaciju pri 37 °C/24 h. Nakon inkubacije izmjereni su promjeri zone inhibicije bakterijskog rasta uključujući i promjer antibiotičkog diska te su izraženi u milimetrima (mm). Sojevi Enterobacterales su identificirani kao osjetljiv (O), umjereno osjetljiv (UO) ili rezistentan (R), na ispitane antibiotike na temelju smjernica propisanih od strane Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2020).

### **3.11. Statistička obrada rezultata**

Rezultati ovog istraživanja su prikazani kao srednje vrijednosti s pripadajućim standardnim devijacijama. Prije statističke obrade podataka provjereno je da li ukupan broj mikroorganizama i ukupan broj bakterija reda Enterobacterales pokazuju normalnu distribuciju Shapiro-Wilk testom, dok je homogenost provjerena Levene testom. S obzirom da navedeni podaci nisu normalno distribuirani, statistički značajne razlike u brojnosti određene su Kruskal-Wallis testom. Statistički značajnima se smatraju one razlike kod kojih je  $p < 0,05$ . Za analizu korelacije između ukupnog broja mikroorganizama i enterobakterija korišten je Spearmanov koeficijent. Raznolikost mikroorganizama između gospodarstava određena je Shannon-Weaver indeksom raznolikosti. Sve statističke analize rezultata su provedene u računalnom programu Microsoft Excel 2016 pomoću dodatka Analiza podataka (eng. *Analysis ToolPak*) te R okolišu (Verzija 4.3.3., R Core team 2023).

## 4. Rezultati

### 4.1. Brojnost mikroorganizama i enterobakterija u rizosferi salate

Na temelju izračunatih CFU vrijednosti za ukupan broj mikroorganizama i broj enterobakterija, za svaki je uzorak izračunat prosječan log CFU/g tla s pripadajućom standardnom devijacijom te su također izračunati i prosjeci za oba OPG-a, a na temelju sorte salate. Rezultati su objedinjeni i prikazani u tablici 4.1.1.

Tablica 4.1.1. Ukupan broj mikroorganizama i broj enterobakterija s pripadajućim standardnim devijacijama (log CFU/g  $\pm$  sd) za OPG1 i OPG2

Vrsta salate	Uzorak	OPG1		OPG2	
		Ukupan broj MO [log CFU/g]	Enterobacteriaceae [log CFU/g]	Ukupan broj MO [log CFU/g]	Enterobacteriaceae [log CFU/g]
Kristalka	K1	7,07 $\pm$ 0,03	6,10 $\pm$ 0,03	7,12 $\pm$ 0,00	5,18 $\pm$ 0,05
	K2	6,92 $\pm$ 0,02	5,85 $\pm$ 0,02	6,85 $\pm$ 0,02	4,45 $\pm$ 0,05
	K3	6,87 $\pm$ 0,02	5,64 $\pm$ 0,03	7,13 $\pm$ 0,03	5,41 $\pm$ 0,02
Kristalka $\bar{x} \pm$ sd		<b>6,95 <math>\pm</math> 0,10</b>	<b>5,87 <math>\pm</math> 0,23</b>	<b>7,03 <math>\pm</math> 0,16</b>	<b>5,01 <math>\pm</math> 0,50</b>
Putarica	P1	7,03 $\pm$ 0,02	5,85 $\pm$ 0,02	6,96 $\pm$ 0,01	4,97 $\pm$ 0,04
	P2	6,74 $\pm$ 0,01	5,73 $\pm$ 0,02	7,17 $\pm$ 0,04	5,19 $\pm$ 0,04
	P3	6,81 $\pm$ 0,01	5,84 $\pm$ 0,02	7,01 $\pm$ 0,03	5,32 $\pm$ 0,01
Putarica $\bar{x} \pm$ sd		<b>6,86 <math>\pm</math> 0,15</b>	<b>5,81 <math>\pm</math> 0,07</b>	<b>7,04 <math>\pm</math> 0,11</b>	<b>5,16 <math>\pm</math> 0,18</b>
Hrastov list	H1	7,00 $\pm$ 0,03	5,43 $\pm$ 0,02	6,97 $\pm$ 0,01	5,18 $\pm$ 0,00
	H2	7,03 $\pm$ 0,03	5,41 $\pm$ 0,01	7,40 $\pm$ 0,01	6,06 $\pm$ 0,06
	H3	6,82 $\pm$ 0,03	5,29 $\pm$ 0,02	7,17 $\pm$ 0,02	5,34 $\pm$ 0,04
Hrastov list $\bar{x} \pm$ sd		<b>6,95 <math>\pm</math> 0,12</b>	<b>5,38 <math>\pm</math> 0,08</b>	<b>7,18 <math>\pm</math> 0,22</b>	<b>5,53 <math>\pm</math> 0,47</b>
$\bar{x} \pm$ sd		<b>6,92 <math>\pm</math> 0,12</b>	<b>5,68 <math>\pm</math> 0,26</b>	<b>7,09 <math>\pm</math> 0,16</b>	<b>5,23 <math>\pm</math> 0,42</b>

<sup>a-b</sup> CFU vrijednosti unutar istog reda označavaju statistički značajne razlike (Kruskal-Wallis test,  $p < 0,05$ )

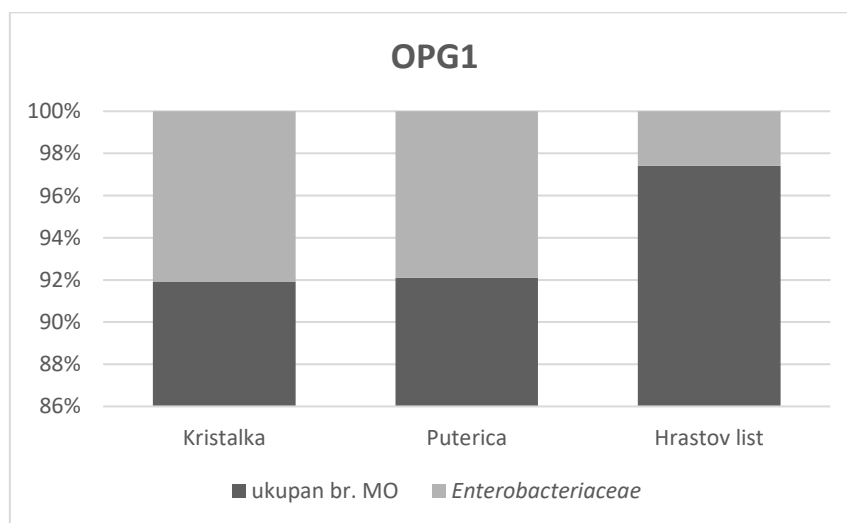
Statističkom su analizom utvrđene značajne razlike (Kruskal-Wallis test,  $p < 0,05$ ) između CFU vrijednosti ukupnog broja mikroorganizama na OPG1 (6,92  $\pm$  0,12 log CFU/g) i OPG2 (7,09  $\pm$  0,16 log CFU/g), a isti trend je zabilježen i za enterobakterije (OPG1 5,68  $\pm$  0,26 log CFU/g; OPG2 5,23  $\pm$  0,42 log CFU/g). Zbog navedenih razlika u prosječnim vrijednostima CFU ukupnog broja bakterija i ukupnog broja bakterija reda Enterobacteriales, provedena je i analiza korelacije te je utvrđeno da je korelacija neznatna i pozitivna



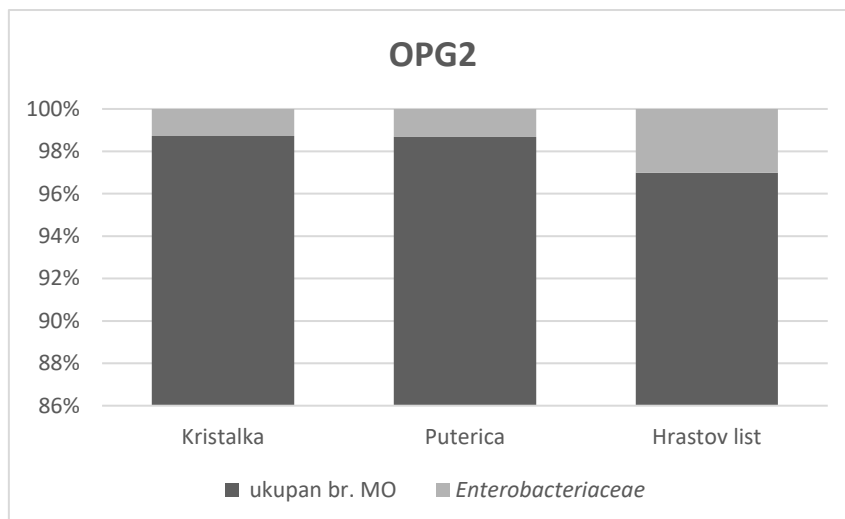
(Spearmanov koeficijent; 0,06), odnosno porast ukupnog broja bakterija znači i porast ukupnog broja enterobakterija.

Iz tablice 4.1.1. je vidljivo da je najveći prosječni CFU na OPG1 u rizosferi tla na kojem je uzgajana sorta kristalka s prosječnim CFU od  $6,95 \pm 0,10$  log CFU/g, dok je najmanji prosječni CFU ukupnih mikroorganizama na rizosfernom tlu na kojem se uzgaja sorta puterica te iznosi  $6,86 \pm 0,15$  log CFU/g. Prosječna CFU vrijednost za enterobakterije prati prosječni CFU ukupnog broja mikroorganizama i najveći je u rizosferi sorte kristalke ( $5,87 \pm 0,23$  log CFU/g), no za razliku od ukupnog broja mikroorganizama, ukupan broj enterobakterija je najmanji u rizosferi sorte hrastov list ( $5,38 \pm 0,08$  log CFU/g). Najveći prosječni CFU ukupnih mikroorganizama izoliranih iz rizosfere OPG2 se nalazi u rizosferi tla na kojem je uzgajana sorta hrastov list i iznosi  $7,18 \pm 0,22$  log CFU/g, dok je najniži prosječni CFU zabilježen kod rizosfere sorte kristalke ( $7,03 \pm 0,16$  log CFU/g). Prosječna CFU vrijednost bakterija reda Enterobacteriales je također najveća kod tla na kojem je uzgajana sorta hrastov list ( $5,53 \pm 0,47$  log CFU/g), a najniža kod sorte kristalke i iznosi  $5,01 \pm 0,50$  log CFU/g što prati prosječni CFU ukupnog broja mikroorganizama. Unatoč navedenim razlikama u prosječnim CFU vrijednostima obje skupine mikroorganizama u rizosferi različitih sorti na OPG1 i OPG2, statističkom analizom nisu utvrđene statistički značajne razlike u CFU vrijednostima između sorti (Kruskal-Wallis,  $p > 0,05$ ), odnosno sorta uzgajane salate nije utjecala na ukupan broj mikroorganizama i na ukupan broj enterobakterija.

Iz rezultata je vidljivo da bakterije reda Enterobacteriales čine značajan udio ukupne mikrobiote rizosfere zelene salate sa zastupljenošću od 1,3 do 8,8% (Graf 4.1.1; Graf 4.1.2).



Graf 4.1.1. Prikaz udjela enterobakterija u ukupnom broju mikroorganizama na OPG1



Graf 4.1.2. Prikaz udjela entrobakterija u ukupnom broju mikroorganizama na OPG2

S obzirom da su rezultati određivanja brojnosti ukupnih mikroorganizama i enterobakterija pokazali da nema statistički značajnih razlika između sorata te da je najveća prosječna CFU vrijednost za ukupan broj mikroorganizama i bakterija reda Enterobacteriales dobivena za rizosferno tlo na kojem je uzgajana sorta kristalka, daljnja izolacija i identifikacija enterobakterija provedena je samo na uzorcima rizosfernog tla sorte kristalka.

## 4.2. Mikrobna raznolikost u rizosferi zelene salate sorte kristalka

Izolati izolirani iz rizosfere zelene salate sorte kristalka (n=120) na VRBG podlozi, podvrgnuti su identifikaciji pomoću MALDI-TOF masenog spektrometra. Ukupno je 89 (74,2%) izolata identificirano do razine vrste, 26 (21,7%) do razine roda, dok pet izolata (4,2%) nije bilo moguće identificirati. Na OPG1 najbrojnija vrsta je *Enterobacter ludwigi* (51,7%), a slijede ju vrste *Lelliottia amnigena* (13,3%) i *Hafnia alvei* (6,7%). Ostale vrste su zastupljene s <5,0%. Na OPG2 16,7% izolata identificirano je do razine roda *Enterobacter* spp., a isti udio izolata (16,7%) identificiran je kao vrsta *Enterobacter bugandensis*. Slijede ih vrste roda *Pseudomonas* spp. (8,3%) i vrsta *Enterobacter ludwigi* (8,3%). *Aeromonas* spp., *Enterobacter hormaechei* i *Priestia megaterium* zastupljeni su s 5%, dok su ostale vrste zastupljene s <5,0%. Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 4.2.1.

Kako bismo utvrdili na kojem OPG-u je prisutna veća raznolikost vrsta, izračunat je Shannon-Waeaver indeks raznolikosti, koji je za OPG1 iznosio 1,79, a za OPG2 2,62, što ukazuje na veću raznolikost vrsta na OPG2.

Od 120 izolata, njih 85 (70,8%) pripadalo je redu Enterobacteriales. Najveći broj, njih 52 (43,3%) identificirano je u uzorcima s OPG1, dok je njih 33 (27,5%) podrijetlom s OPG2.

Tablica 4.2.1. Identificirane vrste izolirane iz rizosfere ekološki uzgojene zelene salate sorte kristalka na VRBG podlozi (n=120) s dva obiteljsko-poljoprivredna gospodarstva (OPG1 i OPG2)

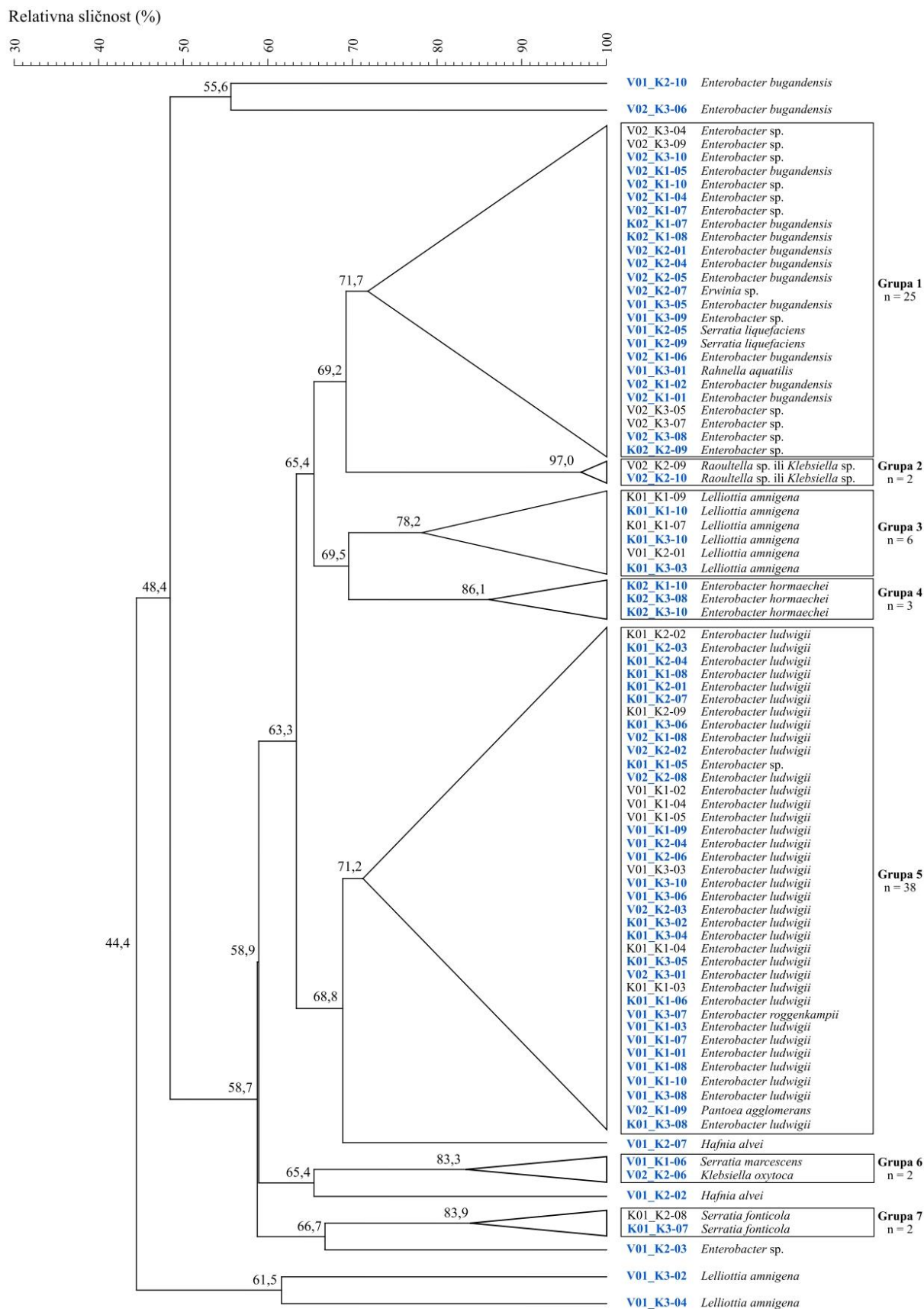
Vrsta	OPG1	OPG2
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	1	0
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	2	0
<i>Aeromonas media</i>	0	2
<i>Aeromonas</i> spp.	0	3
<i>Aeromonas veronii</i>	0	1
<i>Bacillus velezensis</i>	0	1
<i>Chryseobacterium</i> spp.	0	1
<i>Enterobacter bugandensis</i>	1	10
<i>Enterobacter hormaechei</i>	0	3
<i>Enterobacter ludwigi</i>	31	5
<i>Enterobacter roggenkampii</i>	1	0
<i>Enterobacter</i> spp.	2	10
<i>Erwinia</i> spp.	0	1
<i>Hafnia alvei</i>	4	0
<i>Raoultella</i> spp. or <i>Klebsiella</i> spp.	0	2
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0	1
<i>Lelliottia amnigena</i>	8	0
<i>Pantiea agglomerans</i>	0	1
<i>Priestia megaterium</i>	0	3
<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	2	0
<i>Pseudomonas mendocina</i>	0	1
<i>Pseudomonas putida</i>	0	2
<i>Pseudomonas</i> spp.	2	5
<i>Rahnella aquatilis</i>	1	0
<i>Raoiltella ornithinolytica</i>	0	1
<i>Rosellomorea marsiflavi</i>	0	1
<i>Serratia fonticola</i>	2	0
<i>Serratia liquefaciens</i>	2	0
<i>Serratia marcescens</i>	1	0
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0	1
Neidentificirano	0	5
Ukupno	60	60

### 4.3. Genotipizacija enterobakterija

Svi izolati reda Enterobacteriales (n=85) genotipizirani su pomoću rep-PCR metode. Na temelju rep-PCR obrazaca dobivenih amplifikacijom pomoću GTG5 početnice konstruiran je dendrogram pomoću programa BioNumerics verzija 7.6.1 (Applied Maths, Belgija) na osnovu

70% (slika 4.3.1.) i 95% (slika 8.1) sličnosti među izolatima. Zbog velike unutarvrstne raznolikosti među izolatima (relativna sličnost 44%) te zbog preglednosti podataka, opisan je dendrogram dobiven na temelju 70% sličnosti na kojem razlikujemo 14 različitih grupa. U sedam grupa su svrstana od dva do 38 sojeva, dok je u ostale pridružen po jedan soj. Grupa s najvećim brojem sojeva su grupa jedan i pet. U grupi jedan ističe se *E. bugandensis* (40%), a u istu grupu svrstani su i pripadnici *S. liquefaciens*, *R. aquatilis* i *Enterobacter* spp. Grupu pet uglavnom čini vrsta *E. ludwigi* (92%), a prisutne su i *P. agglomerans*, *E. roggkampii* i *Enterobacter* spp. Grupu dva čine *Raoultella* spp./*Klebsiella* spp., grupa tri ima šest članova i to isključivo *L. amnigena*, u grupi četiri to su isključivo *E. hormaechei*, dok je u grupi sedam to *S. fonticola*.

Izolati obilježeni plavom bojom i deblje otisnuti (n=68) predstavljaju reprezentativne sojeve pojedinih grupa. Kako bi bio uključen što veći broj izolata, probir izolata za analize antibiotske rezistencije je izvršen na temelju 95% sličnosti obrazaca dobivenih rep-PCR metodom (Slika 8.1).

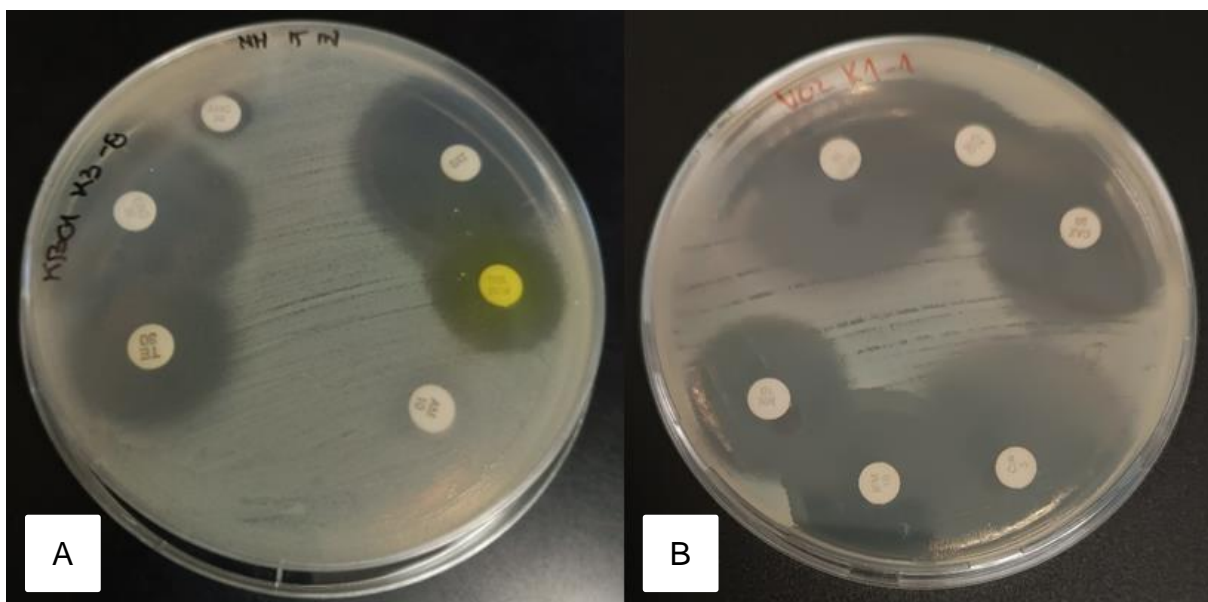


Slika 4.3.1. Dendrogram za sojeve reda Enterobacteriales konstruiran na temelju rep-PCR obrazaca dobivenih amplifikacijom s početnicom GTG5 s označenim grupama unutar vrste ili roda koje pokazuju 70,0 % sličnosti

#### 4.4. Osjetljivost sojeva reda Enterobacteriales na antibiotike

Osjetljivost sojeva Enterobacteriales ispitana je na 12 različitih antibiotika koji su svrstani u 10 klasa antibiotika (penicilini,  $\beta$ -laktami, cefalosporini 1. i 2. generacije, cefalosporini 3. i 4. generacije, karbapenemi, aminoglikozidi, tetraciklini, fluorokinoloni, antagonisti folne kiseline i nitrofurani) disk difuzijskom metodom. Po završetku inkubacije, izmjereni su promjeri zone inhibicije rasta za svaki analizirani antibiotik i za svaki ispitani soj. Djelovanje antibiotika očituje se kao zona oko diska gdje izostaje bakterijski rast.

Na Slici 4.4.1. ispitana je osjetljivost sojeva na šest različitih antibiotika. Što je zona inhibicije manja, to je soj otporniji na djelovanje antibiotika, kao što je slučaj za ampicilin i amoksisicilin na slici A kod soja K3-8. Ostali antibiotici imaju široku zonu inhibicije koja je izmjerena u milimetrima. Drugi soj, K1-1, na slici B, pokazao je osjetljivost na sve ispitivane antibiotike.



Slika 4.4.1. Ispitivanje antibiotičke rezistencije A) *Enterobacter ludwigii*, K3-8; B) *Enterobacter bugandensis*, K1-1

Tablica 4.4.1. Antibiotička rezistencija ispitivanih sojeva (n=68)

Vrsta	Soj	PENICILINI	β-LAKTAMI	CEFALOSPORINI 1. i 2. GEN.	CEFALOSPORINI 3. i 4. GENERACIJE		KARBAPENEMI	AMINOGLIKOZIDI	TETRAKILINI	KINOLONI		ANTAGONISTI FOL. KIS.	NITROFURANTOIN
		AM 10 µg	AMC 30 µg	CZ 30 µg	CRO 30 µg	CAZ 30 µg	IPM 10 µg	NN 10 µg	TE 30 µg	CIP 5 µg	NOR 10 µg	SXT 25 µg	F/M 300 µg
<i>Enterobacter bugandensis</i>	V01_K2-10	R*	R*	R*	O	O	O	O	O	O	O	O	R*
<i>Enterobacter bugandensis</i>	V01_K3-5	R*	R*	R*	O	O	O	O	O	O	O	O	O
<i>Enterobacter bugandensis</i>	V02_K1-1	R*	R*	R*	O	O	O	O	O	O	O	O	UO*
<i>Enterobacter bugandensis</i>	V02_K1-2	O	O	R*	O	O	O	O	O	O	O	O	R*
<i>Enterobacter bugandensis</i>	V02_K1-5	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	UO*
<i>Enterobacter bugandensis</i>	V02_K1-6	R*	R*	R*	O	O	O	O	O	O	O	O	O
<i>Enterobacter bugandensis</i>	V02_K2-1	R*	R*	O	O	O	O	O	O	O	O	O	UO*
<i>Enterobacter bugandensis</i>	V02_K2-4	R*	R*	R*	O	O	O	O	O	O	O	O	O
<i>Enterobacter bugandensis</i>	V02_K2-5	R*	R*	R*	O	O	O	O	O	O	O	O	UO*
<i>Enterobacter bugandensis</i>	V02_K3-6	R*	R*	R*	O	O	O	O	O	O	O	O	O
<i>Enterobacter bugandensis</i>	KB02_K1-7	R*	R*	R*	O	O	O	O	O	O	O	O	R*
<i>Enterobacter bugandensis</i>	KB02_K1-8	R*	R*	R*	O	O	UO**	O	O	O	O	O	R*
<i>Enterobacter hormaechei</i>	KB02_K1-10	R*	R*	R*	O	O	O	O	O	O	O	O	UO*
<i>Enterobacter hormaechei</i>	KB02_K3_8	R*	R*	R*	O	O	O	O	O	O	O	O	UO*
<i>Enterobacter hormaechei</i>	KB02_K3_10	R*	R*	R*	O	O	O	O	O	O	O	O	UO*
<i>Enterobacter ludwigii</i>	V01_K1-1	R*	R*	R*	O	O	O	O	O	O	O	O	O
<i>Enterobacter ludwigii</i>	V01_K1-3	R*	R*	R*	O	O	O	O	O	O	O	O	O
<i>Enterobacter ludwigii</i>	V01_K1-7	R*	R*	R*	O	O	O	O	O	O	O	O	O
<i>Enterobacter ludwigii</i>	V01_K1-8	R*	R*	R*	O	O	R**	O	O	O	O	O	O
<i>Enterobacter ludwigii</i>	V01_K1-9	R*	R*	R*	O	O	O	O	O	O	O	O	O
<i>Enterobacter ludwigii</i>	V01_K1-10	R*	R*	R*	O	O	R**	O	R**	O	O	O	R*
<i>Enterobacter ludwigii</i>	V01_K2-4	R*	R*	R*	O	O	O	O	O	O	O	O	O
<i>Enterobacter ludwigii</i>	V01_K2-6	R*	R*	R*	O	O	O	O	O	O	O	O	O
<i>Enterobacter ludwigii</i>	V01_K3-6	R*	O	R*	O	O	O	O	O	O	O	O	R*
<i>Enterobacter ludwigii</i>	V01_K3-8	R*	R*	R*	O	O	O	O	O	UO**	O	O	O
<i>Enterobacter ludwigii</i>	V01_K3-10	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
<i>Enterobacter ludwigii</i>	V02_K1-8	R*	R*	R*	O	O	O	O	O	O	O	O	O
<i>Enterobacter ludwigii</i>	V02_K2-2	R*	R*	R*	O	O	O	O	O	O	O	O	R*
<i>Enterobacter ludwigii</i>	V02_K2-3	R*	R*	R*	O	O	O	O	O	O	O	O	O
<i>Enterobacter ludwigii</i>	V02_K2-8	R*	R*	R*	O	O	O	O	O	O	O	O	UO*
<i>Enterobacter ludwigii</i>	V02_K3-1	R*	R*	R*	O	O	O	O	O	O	O	O	O
<i>Enterobacter ludwigii</i>	KB01_K1-6	R*	R*	R*	O	O	O	O	O	O	O	O	O
<i>Enterobacter ludwigii</i>	KB01_K1-8	R*	R*	R*	O	O	O	O	O	O	O	O	UO*
<i>Enterobacter ludwigii</i>	KB01_K2-1	R*	R*	R*	O	O	O	O	O	O	O	O	R*
<i>Enterobacter ludwigii</i>	KB01_K2-3	R*	R*	R*	O	O	O	O	O	O	O	O	R*
<i>Enterobacter ludwigii</i>	KB01_K2-4	R*	R*	R*	O	O	O	O	O	O	O	O	R*
<i>Enterobacter ludwigii</i>	KB01_K2-7	R*	R*	R*	O	O	O	O	O	O	O	O	R*
<i>Enterobacter ludwigii</i>	KB01_K3-2	R*	R*	R*	O	O	O	O	O	O	O	O	UO*

<i>Enterobacter ludwigii</i>	KB01_K3-4	R*	R*	R*	O	O	O	O	O	O	O	O	O	UO*
<i>Enterobacter ludwigii</i>	KB01_K3-5	R*	R*	R*	O	O	O	O	O	O	O	O	O	UO*
<i>Enterobacter ludwigii</i>	KB01_K3-6	R*	R*	R*	O	O	O	O	O	O	O	O	O	R*
<i>Enterobacter ludwigii</i>	KB01_K3-8	R*	R*	R*	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
<i>Enterobacter roggenkampii</i>	V01_K3-7	R*	R*	R*	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
<i>Enterobacter</i> sp.	V01_K2-3	R*	R*	R*	O	O	UO**	O	R**	O	O	O	O	R*
<i>Enterobacter</i> sp.	V01_K3-9	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
<i>Enterobacter</i> sp.	V02_K1-4	R*	R*	R*	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
<i>Enterobacter</i> sp.	V02_K1-7	R*	R*	R*	O	O	O	O	O	O	O	O	O	UO*
<i>Enterobacter</i> sp.	V02_K1-10	R*	R*	R*	O	O	O	O	O	O	O	O	O	UO*
<i>Enterobacter</i> sp.	V02_K3-8	R*	R*	R*	O	O	O	O	O	O	O	O	O	UO*
<i>Enterobacter</i> sp.	V02_K3-10	UO*	R*	R*	O	O	O	O	O	O	O	O	O	UO*
<i>Enterobacter</i> sp.	KB01_K1-5	R*	R*	R*	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
<i>Enterobacter</i> sp.	KB02_K2_9	R*	R*	R*	O	O	O	O	O	O	O	O	O	UO*
<i>Erwinia</i> sp.	V02_K2-7	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
<i>Hafnia alvei</i>	V01_K2-2	R*	R*	R*	O	O	O	O	R**	O	O	O	O	R*
<i>Hafnia alvei</i>	V01_K2-7	UO*	R*	R*	O	UO*	O	O	O	O	O	O	O	O
<i>Klebsiella oxytoca</i>	V02_K2-6	R*	O	UO**	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
<i>Raoultella</i> sp. ili <i>Klebsiella</i> sp.	V02_K2-10	R*	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
<i>Lelliottia amnigena</i>	V01_K3-2	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	UO*
<i>Lelliottia amnigena</i>	V01_K3-4	R*	O	R*	UO*	UO*	O	O	O	O	O	O	O	R*
<i>Lelliottia amnigena</i>	KB01_K1-10	O	O	UO*	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
<i>Lelliottia amnigena</i>	KB01_K3-3	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
<i>Lelliottia amnigena</i>	KB01_K3-10	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
<i>Pantoea agglomerans</i>	V02_K1-9	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	R*
<i>Rahnella aquatilis</i>	V01_K3-1	R*	O	R*	UO*	O	O	O	O	O	O	O	O	R*
<i>Serratia fonticola</i>	KB01_K3-7	R*	R*	R*	O	O	O	O	O	O	O	O	O	UO*
<i>Serratia liquefaciens</i>	V01_K2-5	R*	R*	R*	O	O	O	O	O	O	O	O	O	R*
<i>Serratia liquefaciens</i>	V01_K2-9	R*	R*	R*	O	O	O	O	O	O	O	O	O	R*
<i>Serratia marcescens</i>	V01_K1-6	R*	R*	R*	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O

O-osjetljiv, UO-umjereno osjetljiv, R-rezistent

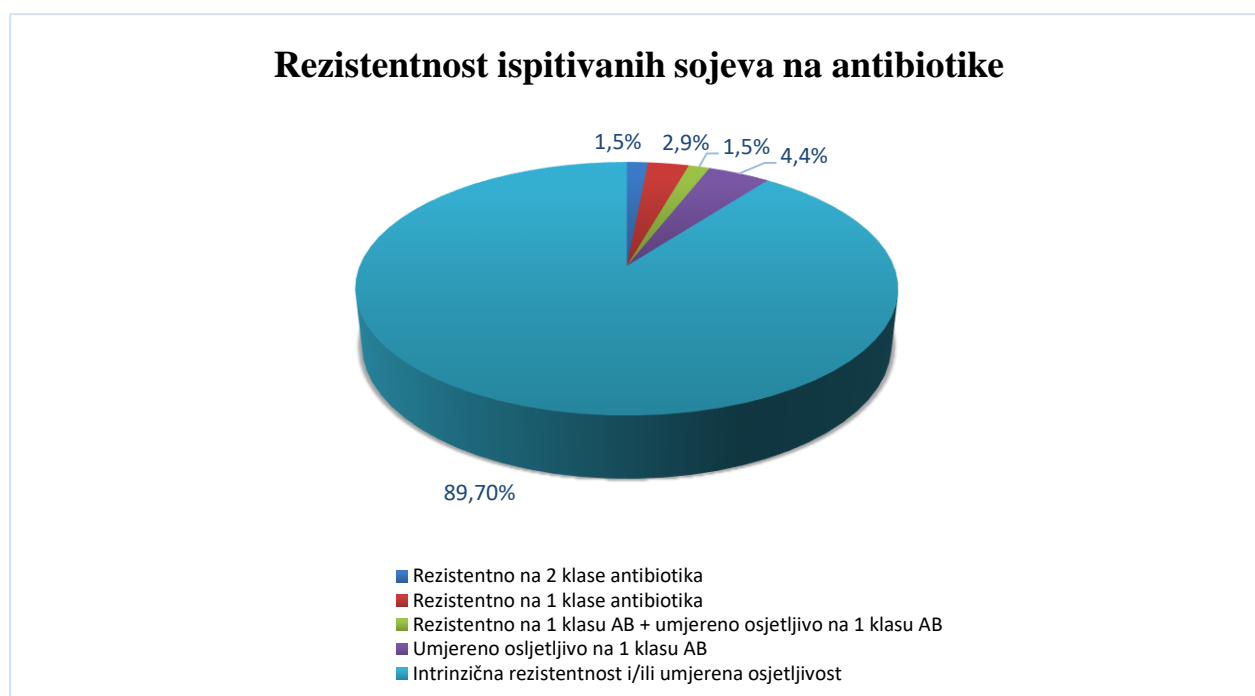
\*intrinzična rezistencija, \*\*ekstrinzična rezistencija

AM- Ampicilin 10µg, AMC- Amokscilin 30µg, CZ- Cefazolin 30µg, CRO- Ceftriaksone 30µg, CAZ- Ceftazidim 30µg, IPM-Imipenem 10µg, NN- Tobramicine 10µg, TE- Tetraciklin 30µg, CIP- Ciprofloksacin 5µg, NOR- Norfloksacin 10µg, SXT- Sulfametoksazole 25µg, F/M- Nitrofurantoin 300µg



Najbolje djelovanje pokazali su antibiotici sulfametoksazole (25 µg), norfloksacin (10 µg) i tobramicine (10 µg) na koje je osjetljivo 100% sojeva. Navedeni antibiotici pripadaju klasama antagonisti folne kiseline, fluorokinoloni te aminoglikozidi čiji mehanizmi djelovanja su inhibicija sinteze folne kiseline, inhibicija sinteze nukleinskih kiselina i inhibicija sinteze proteina. Osim toga, 97,1% sojeva osjetljivo je i na ceftriaksone (30 µg), 44,1% na nitrofurantoin (300 µg), 95,6% na tetraciklin (30 µg), 98,5% na ciprofloksacin (5 µg), 94,1% na imipenem (10 µg) i 97,1% na ceftazidim (30 µg). Najveća rezistencija zabilježena je na antibiotik ampicilin (10 µg), na koji je rezistentno 82,4% sojeva, na amokscilin (30 µg) njih 77,9%, dok je 82,4% sojeva rezistentno na cefazolin (30 µg) (Tablica 4.4.1.). Mehanizam djelovanja ovih antibiotika je inhibicija sinteze stanične stjenke.

Među 68 ispitana soja, ekstrinzična rezistentnost utvrđena je kod njih sedam. Jedan soj pokazao je ekstrinzičnu rezistenciju na dvije klase antibiotika (1,5%), dva soja bila su rezistentna na jednu klasu (2,9%), jedan soj bio je rezistentan na jednu klasu antibiotika (1,5%), a umjereno osjetljiv na drugu, dok su tri soja bila umjereno osjetljiva na jednu klasu antibiotika (4,4%). Ni jedan soj nije svrstan u MDR bakterije. Šest sojeva (8,8%) bilo je osjetljivo na sve ispitivane antibiotike. Kod ostalih sojeva (n=55) rezistentnost ili umjerena osjetljivost intrinzično je uvjetovana na ispitivane klase antibiotika. Kod 10 sojeva (14,7%) utvrđena je intrinzična rezistentnost na četiri klase antibiotika, 20 sojeva (29,4%) pokazalo je rezistenciju na tri različite klase antibiotika, jedan soj (1,5%) bio je rezistentan na tri klase, a umjereno osjetljiv na dvije, 16 sojeva (23,5%) bilo je rezistentno na tri klase, a umjereno osjetljivo na jednu, dva soja (2,9%) bila su rezistentna na dvije klase, a umjereno osjetljiva na jednu, jedan soj (1,5%) bio je rezistentan na dvije klase antibiotika i umjereno osjetljiv na druge dvije, dva soja (2,9%) bila su rezistentna na dvije klase antibiotika, dva soja (2,9%) bila su rezistentna na jednu klasu i posljednja dva soja (2,9%) bila su umjereno osjetljiva na jednu od ispitivanih klasa antibiotika (Graf 4.4.2.).



Graf 4.4.2. Udio intrinzično i ekstrinzično rezistentnih sojeva enterobakterija

## 5. Rasprava

U ovom radu određen je ukupan broj mikroorganizama i ukupan broj enterobakterija u rizosferi ekološki uzgojene zelene salate. Prosječne vrijednosti ukupnog broja mikroorganizama iznosile su  $6,92 \pm 0,12$  log CFU/g za OPG1 te  $7,09 \pm 0,16$  log CFU/g za OPG2, dok je ukupni broj enterobakterija bio  $5,68 \pm 0,26$  log CFU/g za OPG1, te  $5,23 \pm 0,42$  log CFU/g za OPG2. Na OPG1 je udio bakterija reda Enterobacteriales u ukupnom broju mikroorganizama veći iako je prosječni ukupni broj mikroorganizama manji u odnosu na OPG2. Upravo zbog velikog udjela enterobakterija u ukupnom broju mikroorganizama na oba gospodarstva, može se pretpostaviti da problem s mikrobiološkom ispravnošću vode za navodnjavanje koji je potvrđen za OPG2 u razgovoru s proizvođačem, postoji i na OPG1 ili da enterobakterije dospijevaju u tlo i stajnjakom koji se koristi na oba gospodarstva.

Statističkom su analizom utvrđene značajne razlike (Kruskal-Wallis test,  $p < 0,05$ ) između CFU vrijednosti ukupnog broja mikroorganizama na OPG1 i OPG2, a isti trend je zabilježen i za enterobakterije. Budući da se lokaliteti s kojih su uzeti uzorci rizosfere nalaze na geografski udaljenim područjima, te da OPG1 pripada nizinskoj Hrvatskoj, a OPG2 primorskoj Hrvatskoj, može se pretpostaviti da ih odlikuju različiti klimatski uvjeti, ali i različiti tipovi i svojstva tla te da je upravo korelacija navedenih čimbenika razlog detektiranih značajnih razlika u mikrobioti rizosfere (Klapeć i sur., 2016).

Iako postoji značajan broj istraživanja kojima je analizirana ukupna i patogena mikrobiota svježe ubranog zelenog lisnatog povrća (Guron i sur., 2019, Bigott i sur., 2022, Berg i sur. 2009, Ibekwe i sur. 2020), mali je udio istraživanja u kojima se prati brojnost ukupnog broja mikroorganizama i broja enterobakterija u rizosfernom tlu. Tako se broj enterobakterija u zelenoj salati proizvedenoj konvencionalnim uzgojem na području Poljske (Klapeć i sur. 2016) kretao se od  $3,48$ - $5,48$  log CFU/g, dok je u rizosferi ekološki proizvedene zelene salate zabilježena vrijednost od  $2,92$ - $4,39$  log CFU/g za enterobakterije i  $4,92$ - $5,41$  log CFU/g za ukupan broj mikroorganizama. Ove vrijednosti niže su za  $0,24$ - $0,5$  log CFU/g za ukupan broj mikroorganizama i  $1,74$ - $3,64$  log CFU/g za ukupan broj enterobakterija u odnosu na vrijednosti dobivene u našem istraživanju. Međutim, poznato je iz istraživanja Oliveira i sur. (2010) i Maffei i sur. (2016) kako postoje značajne razlike u prevalenciji patogena u ekološki i konvencionalno proizvedenoj svježoj zelenoj salati. U zelenoj salati proizvedenoj na području Španjolske detektiran je značajno veći broj enterobakterija u ekološkoj ( $5,16$  log CFU/g) u odnosu na konvencionalnu ( $3,80$  log CFU/g) proizvodnju (Oliveira i sur., 2010).

S obzirom da su rezultati određivanja brojnosti ukupnih mikroorganizama i enterobakterija pokazali da nema statistički značajnih razlika između sorata zelene salate, za daljnju analizu korišteno je samo rizisferno tlo sorte kristalka. Iz rizosfere kristalke izolirano je 120 izolata na VRBG podlozi selektivnoj za enterobakterije koju su podvrgnuti MALDI-TOF masenoj spektrometriji na temelju koje je identificirano 85 izolata reda Enterobacteriales. Najzastupljenija vrsta bila je *Enterobacter ludwigii* (41,2%), potom *Enterobacter* spp. (15,3%), *E. bugandensis* (14,1%) i *Lelliottia amnigena* (9,4%), dok su vrste *E. hormaechei*, *E. roggenkapii*, *Serratia liquefaciens*, *S. marcescens*, *S. fanticola*, *Rahnella aquatilis*, *Pantoea agglomerans*, *Hafnia alvei*, *Klebsiella oxytoca* i *Erwinia* spp., zastupljene s  $<5,0\%$ . Na temelju sličnosti 95% izabrano je 68 reprezentativnih izolata kojima je ispitana osjetljivost na antibiotike. S obzirom na rezultate ispitivanja antibiotske rezistencije prema kojima ni jedan soj nije ekstrinzično rezistentan na više od dije klase antibiotika, u ispitivanim

uzorcima nije bilo prisutnih MDR bakterija, nego je rezistencija na većinu antibiotika bila intrinzično uvjetovana.

Za većinu izoliranih i identificiranih sojeva reda Enterobacteriales unutar ovog rada poznato je patogeno djelovanje na čovjeka, no prisutni su i fitopatogeni, ali i sojevi s potencijalnim korisnim djelovanjem na tlo i biljku.

Enterobacter vrste kao što su *Enterobacter bugandensis* (n=12), *Enterobacter ludwigii* (n=35), *Enterobacter hormaechei* (n=3) i *Enterobacter roggkampii* (n=1), identificirane u ovom radu, uzročnici su brojnih infekcija zahvaljujući čimbenicima virulencije koje posjeduju, a to su pili, flagele, proteini vanjske membrane, kapsule, egzo i endotoksini, sustavi za preuzimanje željeza i metabolički putovi specifični za nišu (Pati i sur., 2018). S obzirom da su *Enterobacter* vrste članovi ESKAPE grupe, poznata je njihova rezistentnost na antibiotike (Jean i Hsueh, 2017) te je za ampicilin, amoksisilin, cefalosporine 1. generacije i cefoksitin, ona intrinzično uvjetovana zahvaljujući AmpC  $\beta$ -laktamazi (Intra i sur., 2023). S toga je u našem ispitivanju ekstrinzična rezistentnost bila prisutna kod jednog soja *E. bugandensis* koji je pokazao umjerenu osjetljivost na karbapeneme, dok je jedan soj *E. ludwigii* pokazao umjerenu osjetljivost na kinolone. Jedan soj *Enterobacter* sp. bio je umjereno osjetljiv na karbapeneme, a rezistentan na tetracikline. Jedan soj *E. ludwigii* bio je rezistentan na karbapeneme, dok je drugi bio rezistentan na karbapeneme i tetracikline. Kod ostalih sojeva bila je prisutna samo intrinzična rezistentnost na ispitivane antibiotike. Pati i sur. (2018), zaključili su da je upravo *E. bugandensis* najpatogenija vrsta unutar roda *Enterobacter* zbog rezistencije na cefalosporine 3. generacije, peniciline i kinolone te zbog mogućnosti prenošenja gena rezistencije na antibiotike putem plazmida (Pati i sur., 2018). *E. ludwigii* i *E. hormaechei* su vrste koje pripadaju kompleksu *Enterobacter cloacae* koji se sastoji od šest vrsta (*E. asburiae*, *E. cloacae*, *E. hormaechei*, *E. kobei*, *E. ludwigii* i *E. nimipressuralis*) (Shafeeq i sur., 2020). Kompleks *E. cloacae* nozokomijalni su patogeni odgovorni za infekcije povezane sa zdravstvenom skrbi (Ting-Kuang i sur., 2022; Baek i sur., 2024). Za potencijalno patogenu vrstu *E. roggkampii*, u istraživanju Guo i sur. (2020) utvrđeno je da pojedini sojevi mogu povećavati otpornost biljke na stres, fiksiraju dušik te pokazuju i antagonističku aktivnost prema patogenim mikroorganizmima poput *Fusarium moniliforme*, *F. cubense*, *Botrytis cinerea*, *Cyanophora paradoxa* i *Sporisorium scitamineum* (Guo i sur., 2020).

U ovom istraživanju izolirane su tri vrste koje pripadaju rodu *Serratia* i to *S. liquefaciens*, *S. fonticola* i *S. marcescens*. Za sve tri vrste poznata je intrinzična rezistencija na peniciline,  $\beta$ -laktame, cefalosporine 1. i 2. generacije te nitrofurantoina (Kunjalwar i sur., 2024), no ekstrinzična rezistentnost nije bila određena ni za jedan od ispitivanih sojeva. *S. liquefaciens* nije uobičajena komponenta ljudske fekalne mikrobiote stoga se većina infekcija kod ljudi dobiva egzogeno. Ona uzrokuje osteomijelitis, infektivni artritis, endoftalmitis i meningitis, sepsu, tromboflebitis i ulkus rožnice (Donnenberg, 2015). *S. fonticola* se povezuje s infekcijama mokraćnog sustava, endokarditisa, infekcije kože dijabetičkog stopala, infekcije bilijarnog trakta i krvotoka, cerebelarnog apscesa i septičkog artritisa (Kunjalwar i sur., 2024). *S. marcescens* uzrokuje brojne oportunističke i nozokomijalne infekcije (upale pluća, sepsu, meningitis, peritonitis, endokarditis, artritis, osteomijelitis, keratitis te infekcije mokraćnog sustava i kože) (Zivkovic Zaric i sur., 2023; Tavares-Carreón i sur., 2023).

*Lelliottia amnigena* izaziva infekcije kod ljudi s oslabljenim imunitetom. Iako se smatra da je postotak virulencije nizak, zabilježeno je nekoliko slučajeva infekcija kod ljudi, kao što su endoftalmitis, infekcija mokraćnog sustava, pionefroza i sepsa (Birlutiu i sur., 2023). *L. amnigena* se smatra prirodno rezistentnom na cefalosporine 1. i 2. generacije, ali i na peniciline, cefalosporine 3. i 4. generacije te nitrofurantoina (Birlutiu i sur., 2023; Parashar i sur., 2023). I u našem ispitivanju *L. amnigena* (n=8) pokazala je intrinzičnu rezistenciju na navedene antibiotike, dok ekstrinzična rezistentnost nije bila dokazana ni za jedan od ispitivanih antibiotika.

U uzorku s OPG1 identificirana je i vrsta *Rahnella aquatilis* (n=1) koja je poznata kao oportunistički patogen koji uzrokuje čitav niz infekcija kod imunokompromitiranih bolesnika (Bellais i sur., 2001; Lee i sur., 2019), a u ovom istraživanju potvrđena je samo njezina intrinzična rezistentnost na penicilin, nitrofurane i cefalosporine 1. i 2. generacije, te umjerena osjetljivost na cefalosporine 3. i 4. generacije, ekstrinzična rezistentnost nije ustanovljena. U uzorku s OPG2 izolirana su dva izolata *Klebsiella* spp., od kojih je jedna identificirana kao *Klebsiella oxytoca*, koja se zapravo smatra kompleksom od najmanje 6 vrsta (*K. grimontii*, *K. huaxiensis*, *K. michiganensis*, *K. oxytoca*, *K. pasteurii* i *K. spallanzanii*). *Klebsiella* vrste inače su sastavni dio mikrobiote GI trakta životinja te putem stajnjaka dolaze u tlo preko kojeg se šire u biljke što su dokazali Yu i sur. (2018) detektirajući *K. pneumoniae* u zelenoj salati sugerirajući na korištenje gnojiva na bazi izmeta tijekom uzgoja povrća (Yu i sur., 2018). *K. oxytoca* važan je ljudski patogen koji uzrokuje brojne infekcije u rasponu od blagog proljeva do po život opasne bakterijemije i meningitisa (Yang i sur., 2022). Kod *Klebsiella* spp., urođena je rezistencija na ampicilin posredovana  $\beta$ -laktamazama (Andrašević i sur., 2009) što je potvrđeno i u ovom radu, dok je *K. oxytoca* pokazala ekstrinzično uvjetovanu umjerenu osjetljivost na cefalosporine 1. i 2. generacije. Unatoč patogenom djelovanju na čovjeka, *Klebsiella* spp. pripadaju PGPR (eng., *Plant growthpromoting rhizobacteria*) koje djeluju kao asocijativni fiksatori dušika kod biljaka kao što su kukuruz, pšenica, krumpir, šećerna repa i suncokret (Spasenić, 2018).

Nasuprot *Klebsiella* spp. koje mogu imati korisno djelovanje na rast biljaka, u našem ispitivanju identificirana je i *Erwinia* spp. (n=1) koja se smatra se biljnim patogenom za vrste biljaka iz porodica *Rosaceae*, *Myrtaceae* i *Cucurbitaceae*. *Erwinia* spp. koje se smatraju najčešćim biljnim patogenima su *E. pyrifoliae*, *E. tracheiphila* i *E. psidii* (Morgan i sur., 2022). Ispitivanjem antibiotičke rezistencije *Erwinia* spp., utvrđena je njezina osjetljivost na sve ispitivane antibiotike.

Još jedna identificirana vrsta u ovom istraživanju je *Hafnia alvei* (n=2) koja obično obitava u rijekama i ribogojilištima, ali i u zagađenim vodama i kanalizaciji. Podaci o rezistenciji na antibiotike pokazuju da je ova bakterija prirodno rezistentna na većinu klinički važnih antibiotika, ali i na kolistin, antibiotik posljednjeg izbora u tretiranju infekcija izazvanih enterobakterijama (Ramos-Vivas i sur., 2022). U našem ispitivanju osim intrinzične rezistencije *H. alvei* na peniciline,  $\beta$ -laktame, nitrofurane, cefalosporine 1. i 2. generacije, dokazana je i rezistentnost na tetracikline koja se smatra ekstrinzično uvjetovanom. Osim patogenog djelovanja na čovjeka (gastroenteritis, meningitis, bakterijemija, upala pluća, nozokomijalna infekcija rana, endoftalmitis) (Joshua i sur., 2018; Ionescu i sur., 2022), postoje i potencijalno korisni sojevi, uglavnom za kontrolu proliferacije drugih mikroorganizama kao što su *Salmonella* spp., *Bacillus* spp., ili neki serotipovi *E. coli*,

uključujući enterotoksigene sojeve. *H. alvei* je također uključen u popis mikroorganizama s poželjnim doprinosom fermentaciji hrane, a smatra se da neki sojevi imaju i probiotička svojstva (Ramos-Vivas i sur., 2022).

*Pantoea agglomerans*, izolirana iz naših uzoraka (n=1), koja se nalazi u tlu, kukcima, hrani te u kliničkim uzorcima ljudi, može uzrokovati po život opasne infekcije kod imunosuprimiranih pojedinaca, starijih osoba, novorođenčadi i dojenčadi uključujući septikemiju, upalu pluća, septički artritis, infekcije rana i zglobova te meningitis, a odgovoran je i za profesionalne respiratorne bolesti. Istraživanje Guevarra i sur. (2021) pokazalo je da je *P. agglomerans* intrinzično otporna na klinički važne antibiotike kao što su penicilin G, bacitracin, rifampicin, vankomicin i fosfomicin, no u našem istraživanju, ispitivani soj pokazao je intrinzičnu rezistenciju samo na nitrofurane. Unatoč patogenosti, različiti sojevi *P. agglomerans* pokazuju inhibitorno djelovanje prema fitopatogenima mikroorganizmima, što ih čini poželjnim sredstvom za biokontrolu.

## 6. Zaključak

1. Ukupni broj bakterija u uzorcima rizosfernog tla ekološki uzgojene zelene salate sorti kristalka, puterica i hrastov list sakupljenim s dva obiteljsko poljoprivredna gospodarstva (OPG1 i OPG2) iznosio je  $6,92 \pm 0,12$  log CFU/g za OPG1 te  $7,09 \pm 0,16$  log CFU/g za OPG2, dok je ukupni broj enterobakterija bio  $5,68 \pm 0,26$  log CFU/g za OPG1, te  $5,23 \pm 0,42$  log CFU/g za OPG2. Statističkom analizom utvrđene su statistički značajne razlike za ukupan broj mikroorganizama i ukupan broj enterobakterija između OPG1 i OPG2 (Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ ), ali statistički značajne razlike nisu bile prisutne između sorata ( $> 0,05$ ).
2. Enterobakterije čine značajan udio ukupne mikrobiote rizosfere zelene salate s prevalencijom od 1,3 do 8,8%.
3. Iz rizosfere zelene salate sorte kristalka s dva OPG-a izolirano je 120 izolata na VRBG podlozi selektivnoj za enterobakterije. Nakon analize izolata MALDI-TOF masenim spektrometrom identificirana su tri roda i 12 vrsta enterobakterija među kojima je najzastupljenija bila *Enterobacter ludwigi* (n=35).
4. Rep-PCR metodom detektirana je značajna unutarvrсна raznolikost enterobakterija te se ova metoda pokazala korisnom za probir sojeva (n=68) na temelju njihove sličnosti od  $\geq 95\%$ .
5. Ispitivanjem antibiotske rezistencije, jedan soj pokazao je ekstrinzično uvjetovanu rezistenciju na dvije klase antibiotika (1,5%), dva soja bila su rezistentna na jednu klasu (2,9%), jedan soj bio je rezistentan na jednu klasu antibiotika (1,5%), a umjereno osjetljiv na drugu, dok su tri soja bila umjereno osjetljiva na jednu klasu antibiotika (4,4%). Šest sojeva bilo je osjetljivo na sve ispitivane antibiotike, dok je kod ostalih sojeva (n=55) rezistentnost ili umjerena osjetljivost intrinzično uvjetovana.
6. Kao najdjelotvorniji antibiotici pokazali su se sulfametoksazol (25  $\mu\text{g}$ ), sorfloksacin (10  $\mu\text{g}$ ) i sobramicin (10  $\mu\text{g}$ ), dok je najslabija djelotvornost zabilježena za ampicilin (10  $\mu\text{g}$ ), amokscilin (30  $\mu\text{g}$ ) te cefazolin (30  $\mu\text{g}$ ).
7. Među izoliranim bakterijama identificirane su vrste s korisnim djelovanjem na rast biljaka i zdravlja ljudi, ali i brojni potencijalni patogeni sojevi multirezistentni na antibiotike.

## 7. Popis literature

1. Adeolu M., Alnajjar S., Naushad S., Gupta S.R. (2016). Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam.nov., *Pectobacteriaceae* fam.nov., *Yersiniaceae* fam.nov., *Hafnuaceae* fam.nov., *Morganellaceae* fam.nov. and *Budviciaceae* fam.nov. Microbiology society, 66(12):5575-5599. DOI: doi.org/10.1099/ijsem.0.001485
2. Andrašević S., Vranić-Ladavac M., Tambić Andrašević A., (2009). Osjetljivost enterobakterija na antibiotike, Klinika za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“, Zagreb, Zavod za javno zdravstvo Istarska županija, Pula, 2009, ISSN 1331-2820, DOI: <https://hrcak.srce.hr/file/77683>
3. Baek J.Y., Yang J., Ko J.H., Cho S.Y., Huh K., Chung D.R., Peck K.R., Ko K.S., Kang C.I. (2024). Extensively drug-resistant *Enterobacter ludwigii* co-harboring MCR-9 and a multicopy of bla<sub>IMP-1</sub> in South Korea. Journal of Glob Antimicrobial Resistance, 36:217-222. DOI: 10.1016/j.jgar.2023.12.015
4. Balouiri M., Sadiki M., Ibsouda S.K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity. Journal of Pharmaceutical Analysis, 6(2):71-79. DOI: 10.1016/j.jpha.2015.11.005
5. Bellais S., Poirel L., Fortineau N., Decousser J.W., Nordmann P. (2001). Biochemical-genetic characterization of the chromosomally encoded extended-spectrum class A beta-lactamase from *Rahnella aquatilis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 45(10):2965-8. DOI: 10.1128/AAC.45.10.2965-2968.2001
6. Berg G., Smalla K. (2009). Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. FEMS Microbiology Ecology, 68(1):1-13. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2009.00654.x.
7. Bigott Y., Gallego S., Montemurro N., Breuil M.C., Pérez S., Michas A., Martin-Laurent F., Schröder P. (2022). Fate and impact of wastewater-borne micropollutants in lettuce and the root-associated bacteria, Science of The Total Environment, 831:154674. DOI: doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154674.
8. Birlutiu V., Birlutiu R.M., Dobritoiu E.S. (2023). *Lelliottia amnigena* and *Pseudomonas putida* Coinfection Associated with a Critical SARS-CoV-2 Infection: A Case Report. Microorganisms, 11(9):2143. DOI: 10.3390/microorganisms11092143
9. Bottichio L., Keaton A, Thomas D., Fulton T., Tiffany A., Frick A., Mattioli M., Kahler A., Murphy J., Otto M., Tesfai A., Fields A., Kline K., Fiddner J., Higa J., Barnes A., Arroyo F., Salvatierra A., Holland A., Taylor W., Nash J., Morawski B.M., Correll S., Hinnenkamp R., Havens J., Patel K., Schroeder M.N., Gladney L., Martin H., Whitlock L., Dowell N., Newhart C., Watkins L.F., Hill V., Lance S., Harris S., Wise M., Williams I., Basler C., Gieraltowski L. (2020). Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections Associated With Romaine Lettuce-United States 2018, Clinical Infectious Diseases, 71(8):e323-e330. DOI: 10.1093/cid/ciz1182.
10. Brandl M.T., Ivanek R., Allende A., Munther D.S.. (2023). Predictive Population Dynamics of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* on Plants: a

- Mechanistic Mathematical Model Based on Weather Parameters and Bacterial State. *Appl Environ Microbiol.* 89(7):e00700-23. DOI: 10.1128/aem.00700-23.
11. Britannica. (2022). The Editors of Encyclopaedia. "coliform bacteria". *Encyclopedia Britannica*. URL <https://www.britannica.com/science/coliform-bacteria>. (2.3.2024.)
  12. Broszat M., Nacke H., Blasi R., Siebe C., Huebner J., Daniel R., Grohmann E. (2014). Wastewater irrigation increases the abundance of potentially harmful gammaproteobacteria in soils in Mezquital Valley, Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(17):5282-91. DOI: 10.1128/AEM.01295-14.
  13. Bush K. (2012). Improving known classes of antibiotics: an optimistic approach for the future. *Current Opinion in Pharmacology*. 12(5): 527-534.
  14. CLSI (2020). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th ed. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, Pennsylvania, SAD.
  15. Donnenberg M.S. (2015). Enterobacteriaceae. Saunders, 2503-2517.e5, DOI: 10.1016/B978-1-4557-4801-3.00220-4.
  16. Erlacher A., Cardinale M., Grube M., Berg G. (2015). Biotic Stress Shifted Structure and Abundance of *Enterobacteriaceae* in the Lettuce Microbiome, *PLoS One*. DOI: [10.1371/journal.pone.0118068](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118068)
  17. Figueroa C.J., Tang Y.W., Taur Y. (2015). Principles and Applications of Genomic Diagnostic Techniques, Academic Press, 381-397, DOI:10.1016/B978-0-12-397169-2.00022-6.
  18. Guevarra R.B., Magez S., Peeters E., Chung M.S., Kim K.H., Radwanska M. (2021). Comprehensive genomic analysis reveals virulence factors and antibiotic resistance genes in *Pantoea agglomerans* KM1, a potential opportunistic pathogen. *PLoS One*, 16(1):e0239792. DOI: 10.1371/journal.pone.0239792
  19. Guo D.J., Singh R.K., Singh P., Li D.P., Sharma A., Xing Y.X., Song X.P., Yang L.T., Li Y.R. (2020). Complete Genome Sequence of *Enterobacter roggenkampii* ED5, a Nitrogen Fixing Plant Growth Promoting Endophytic Bacterium With Biocontrol and Stress Tolerance Properties, Isolated From Sugarcane Root. *Front Microbiology*, 11:580081. DOI: 10.3389/fmicb.2020.580081
  20. Guron G.K.P., Arango-Argoty G., Zhang L., Pruden A., Ponder M.A. (2019). Effects of Dairy Manure-Based Amendments and Soil Texture on Lettuce- and Radish-Associated Microbiota and Resistomes. 4(3):e00239-19. DOI: 10.1128/mSphere.00239-19.
  21. Han B, Ma L., Yu Q., Yang J., Su W., Hilal M.G., Li X., Zhang S., Li H. (2022). The source, fate and prospect of antibiotic resistance genes in soil: A review. *Front Microbiology*, 13:976657. DOI: 10.3389/fmicb.2022.976657
  22. Healy M., Huang J., Bittner T., Lising M., Frye S., Raza S., Schrock R., Manry J., Renwick A., Nieto R., Woods C., Versalovic J., Lupski J.R. (2005). Microbial DNA typing by automated repetitive-sequence-based PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(1):199-207. DOI: 10.1128/JCM.43.1.199-207.2005
  23. Huang J., Mi J., Yan Q., Wen X., Zhou S., Wang Y., Ma B., Zou Y., Liao X., Wu Y. (2021). Animal manures application increases the abundances of antibiotic resistance



- genes in soil-lettuce system associated with shared bacterial distributions, *Science of The Total Environment*, ISSN 0048-9697, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.147667.
24. Hussain M-I., Borah P., Hussain .I, Sharma R.K., Kalita M.C. (2021). Densitometric analysis of rep-PCR data: Insight into genetic variability and transmission of *Clostridium perfringens* typed with an improved multiplex PCR. *Anaerobe*, 70:102383. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2021.102383
  25. Ibekwe A.M., Ors S., Ferreira J.F.S., Liu X., Suarez D.L., Ma J., Ghasemimianaei A., Yang C.H. (2020). Functional relationships between aboveground and belowground spinach (*Spinacia oleracea* L., cv. Ragoon) microbiomes impacted by salinity and drought, *Science of The Total Environment*, 717:137207. DOI: doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137207.
  26. Ionescu M.I., Neagoe D.Ş., Crăciun A.M., Moldovan O.T. (2022). The Gram-Negative Bacilli Isolated from Caves-*Sphingomonas paucimobilis* and *Hafnia alvei* and a Review of Their Involvement in Human Infections. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(4):2324. DOI: 10.3390/ijerph19042324
  27. Jean S.S., Hsueh P.R. (2017). Distribution of ESBLs, AmpC  $\beta$ -lactamases and carbapenemases among *Enterobacteriaceae* isolates causing intra-abdominal and urinary tract infections in the Asia-Pacific region during 2008-14: results from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). *J Antimicrob Chemother*, 72(1):166-171. DOI: 10.1093/jac/dkw398
  28. Jelić M. (2018). Mehanizmi rezistencija na antibiotike u enetrobakterija otpornih na karbapeneme. Disertacija. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet.
  29. Joshi M., Deshpande J. D. (2011) Polymerase chain reaction: methods, principles and application. *International Journal of Biomedical Research*, 81 – 97. DOI:10.7439/ijbr.v2i1.83
  30. Khehra N., Padda I.S., Swift C.J. (2023). Polymerase Chain Reaction (PCR). *StatPearls* PMID: 36943981.
  31. Kłapeć T., Wójcik-Fatla A., Cholewa A., Cholewa G., Dutkiewicz J. (2016). Microbiological characterization of vegetables and their rhizosphere soil in Eastern Poland. *Annals of Agricultural Environmental Medicine*, 23(4):559-565. DOI: 10.5604/12321966.1226846.
  32. Kristich C. J., Rice L. B., Arias C. A. (2014). Enterococcal infection - Treatment and antibiotic resistance. U: *Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection* (Ur. Gilmore, M. S., Clewell D. B., Ike Y., Shankar N.). Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190420/> – pristupljeno 5.4.2024.
  33. Kunjalwar R., Shaw D., Mudey G. (2024). Unveiling the Menace of *Serratia fonticola*: Rising Pathogenic Threat or Bystander? *Cureus* 16(3): e56840. DOI:10.7759/cureus.56840
  34. Larsson D.G.J., Flach C.F. (2022). Antibiotic resistance in the environment. *Nature Reviews Microbiology*, 20(5):257-269. DOI: 10.1038/s41579-021-00649-x.

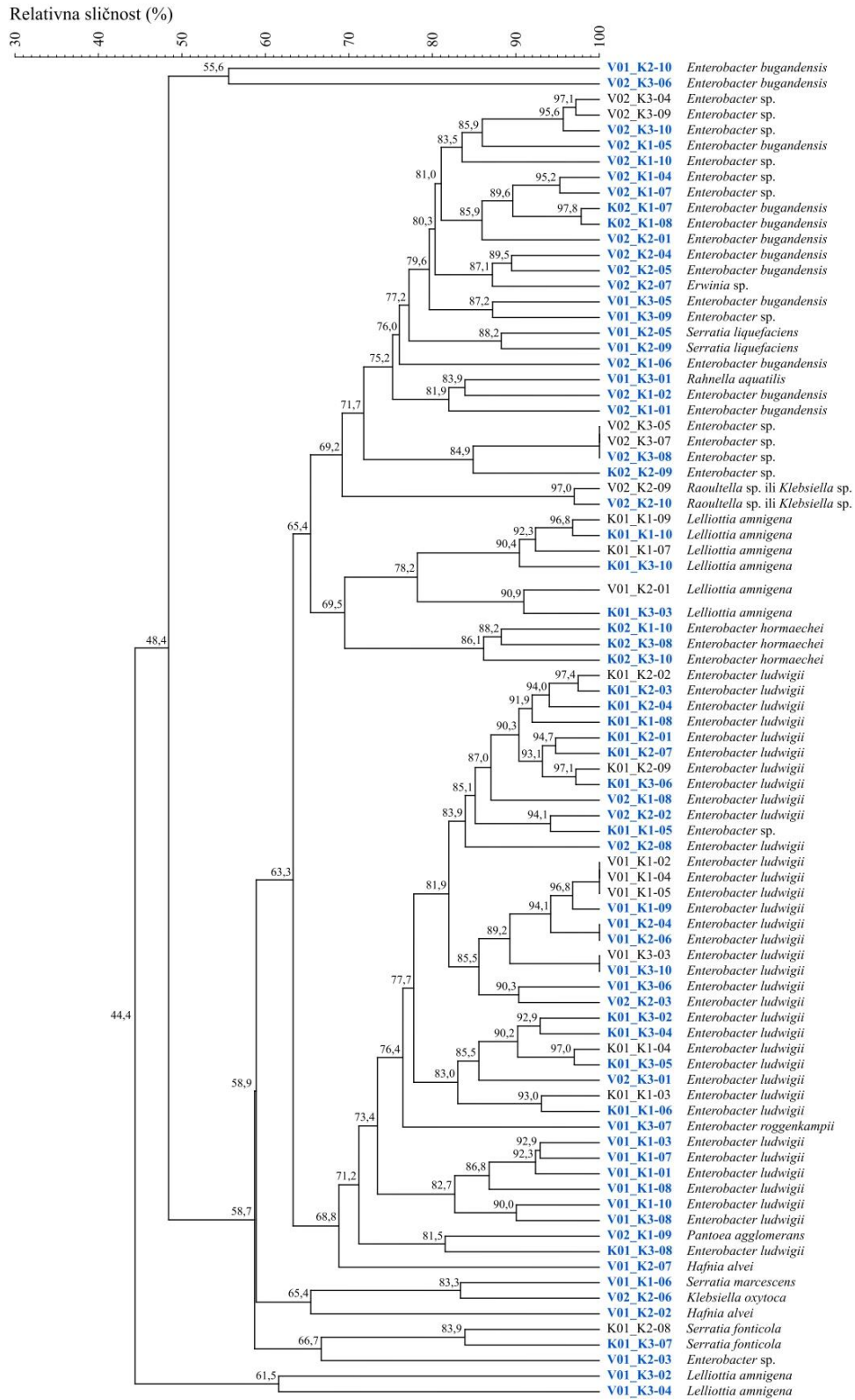
35. Lee W.J., Song Y., Park S.Y., Kim M.J. (2019). Bacteremia due to *Rahnella aquatilis* in a Patient with a Chemoport. *Infection & Chemotherapy*, 51(2):191-195. DOI: 10.3947/ic.2019.51.2.191
36. Maffei D.F., Batalha E.Y., Landgraf M., Schaffner D.W., Franco B.D. (2016). Microbiology of organic and conventionally grown fresh produce. *Brazilian Journal of Microbiology*; 47 Suppl 1: 99-105. DOI: 10.1016/j.bjm.2016.10.006.
37. Magiorakos A.P., Srinivasan A., Carey R.B., Carmeli Y., Falagas M.E., Giske C.G., Harbarth S., Hindler J.F., Kahlmeter G., Olsson-Liljequist B., Paterson D.L., Rice L.B., Stelling J., Struelens M.J., Vatopoulos A., Weber J.T., Monnet D.L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3):268-81. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.
38. Marti R., Tien Y.C., Murray R., Scott A., Sabourin L., Topp E. (2014). Safely coupling livestock and crop production systems: how rapidly do antibiotic resistance genes dissipate in soil following a commercial application of swine or dairy manure? *Applied Environment Microbiology*, 80(10):3258-65. DOI: 10.1128/AEM.00231-14
39. McKinney C.W., Dungan R.S., Moore A., Leytem A.B. (2018). Occurrence and abundance of antibiotic resistance genes in agricultural soil receiving dairy manure. *FEMS Microbiology Ecology*, 94(3). DOI: 10.1093/femsec/fiy010
40. Mendes R., Garbeva P., Raaijmakers J.M. (2013). The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*; 37(5):634-63. DOI: 10.1111/1574-6976.12028.
41. Miller, W.R., Arias, C.A. ESKAPE pathogens: antimicrobial resistance, epidemiology, clinical impact and therapeutics. *Nature Reviews Microbiology* (2024). DOI:10.1038/s41579-024-01054-w
42. Moreira de Gouveia M.I., Bernalier-Donadille A., Jubelin G. (2024). *Enterobacteriaceae* in the Human Gut: Dynamics and Ecological Roles in Health and Disease, *Biology*, 13(3):142. DOI: doi.org/10.3390/biology13030142
43. Morgan T., Rezende R.R., Lima T.T.M., Souza F.O., Alfenas-Zerbini P. (2022). Genomic Analysis Unveils the Pervasiveness and Diversity of Prophages Infecting *Erwinia* Species. *Pathogens*, 12(1):44. DOI: 10.3390/pathogens12010044
44. Oliveira M., Usall J., Viñas I., Anguera M., Gatiús F., Abadías M. (2010). Microbiological quality of fresh lettuce from organic and conventional production. *Food Microbiology*, 27(5):679-84. DOI: 10.1016/j.fm.2010.03.008
45. Oviaño M., Rodríguez-Sánchez B. (2020). MALDI-TOF mass spectrometry in the 21st century clinical microbiology laboratory. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*, 39(4):192-200. DOI: 10.1016/j.eimc.2020.02.027
46. Pantigoso H.A., Newberger D., Vivanco J.M. (2022). The rhizosphere microbiome: Plant-microbial interactions for resource acquisition. *Journal of Applied Microbiology*, 133(5):2864-2876. DOI: 10.1111/jam.15686.
47. Parashar M., Dhar S.K., Kaur J., Chauhan A., Tamang J., Singh G.B., Lyudmila A., Perveen K., Khan F., Bukhari N.A., et al. (2023). Two Novel Plant-Growth-

- Promoting *Lelliottia amnigena* Isolates from *Euphorbia prostrata* Aiton Enhance the Overall Productivity of Wheat and Tomato. *Plants*, 12(17):3081. DOI: 10.3390/plants12173081
48. Park A. J., Krieger J. R., Khursigara C. M. (2016). Survival proteomes: the emerging proteotype of antimicrobial resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(3): 323–342.
  49. Pati N.B., Doijad S.P., Schultze T., Mannala G.K., Yao Y., Jaiswal S., Ryan D., Suar M., Gwozdziński K., Bunk B., Mraheil M.A., Marahiel M.A., Hegemann J.D., Spröer C., Goesmann A., Falgenhauer L., Hain T., Imirzalioglu C., Mshana S.E., Overmann J., Chakraborty T. (2018). *Enterobacter bugandensis*: a novel enterobacterial species associated with severe clinical infection. *Scientific Reports*, 8(1):5392. DOI: 10.1038/s41598-018-23069-z
  50. Prusty J.S., Kumar A. (2020). Coumarins: antifungal effectiveness and future therapeutic scope. *Molecular Diversity*, 24(4):1367-1383. DOI: 10.1007/s11030-019-09992-x
  51. Puljko A., Milaković M., Križanović S., Kosić-Vukšić J., Babić I., Petrić I., Maravić A., Jelić M., Udiković-Kolić N. (2022). Prevalence of enteric opportunistic pathogens and extended-spectrum cephalosporin- and carbapenem-resistant coliforms and genes in wastewater from municipal wastewater treatment plants in Croatia, *Journal of Hazardous Materials*, 427:128155. DOI: doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.128155.
  52. Ramos-Vivas J., Tapia O., Elexpuru-Zabaleta M., Pifarre K.T., Armas Diaz Y., Battino M., Giampieri F. (2022). The Molecular Weaponry Produced by the Bacterium *Hafnia alvei* in Foods. *Molecules*, 27(17):5585. DOI: 10.3390/molecules27175585
  53. Redžepović S., Blažinkov M., Sikora S., Husnjak S., Čolo J. I Bogunović M. (2012). Enzymatic activity and microbiological characteristics of luvic and pseudogley soils in western Slavonia. *Periodicum biologorum*, 114 (1), 111-116. Preuzeto s <https://hrcak.srce.hr/80905>
  54. Remuzgo-Martínez S., Lázaro-Díez M., Mayer C., Aranzamendi-Zaldumbide M., Padilla D., Calvo J., Marco F., Martínez-Martínez L., Icardo J.M., Otero A., Ramos-Vivas J. (2015). Biofilm Formation and Quorum-Sensing-Molecule Production by Clinical Isolates of *Serratia liquefaciens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(10):3306-15. DOI: 10.1128/AEM.00088-15
  55. Rock C., Donnenberg M.S. (2014). Human Pathogenic *Enterobacteriaceae*, Reference Module in Biomedical Sciences, Elsevier. DOI: doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.00136-7.
  56. Shafeeq S., Wang X., Lünsdorf H., Brauner A., Römling U. (2020). Draft Genome Sequence of the Urinary Catheter Isolate *Enterobacter ludwigii* CEB04 with High Biofilm Forming Capacity. *Microorganisms*. 8(4):522. DOI: doi.org/10.3390/microorganisms8040522
  57. Singhal N., Kumar M., Kanaujia P.K., Viridi J.S. (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology*, 6:791. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00791

58. Smith H.Z., Hollingshead C.M., Kendall B. (2024). Carbapenem-Resistant Enterobacterales. StatPearls. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551704/>
59. Spasenić D. (2018). Značaj asocijativnih i endofitskih fiksatora dušika u održivoj poljoprivrednoj proizvodnji. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet. URL: <https://repositorij.agr.unizg.hr/islandora/object/agr%3A994/datastream/PDF/view>
60. Sun S., Xue R., Liu M., Wang L., Zhang, W. (2023). Research progress and hotspot analysis of rhizosphere microorganisms based on bibliometrics from 2012 to 2021. *Frontiers in Microbiology*, 14:1085387. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1085387.
61. Sweeney M. T., Lubbers B. V., Schwarz S., Watts J. L. (2018). Applying definitions for multidrug resistance, extensive drug resistance and pandrug resistance to clinically significant livestock and companion animal bacterial pathogens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(6): 1460–1463.
62. Taggar G., Attiq Rheman M., Boerlin P., Diarra M.S. (2020). Molecular Epidemiology of Carbapenemases in Enterobacterales from Humans, Animals, Food and the Environment. *Antibiotics (Basel)*, 9(10):693. DOI: 10.3390/antibiotics9100693.
63. Tambić Andrašević A., Jelić M., Gužvinec M., Butić I., Bukovski S. (2012). Rezistentne enterobakterije u Hrvatskoj – uloga praćenja rezistencije na antibiotike na nacionalnoj razini, Klinika za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“, Zagreb, Zavod za javno zdravstvo Istarska županija, Pula, ISSN 1331-2820, DOI: <https://hrcak.srce.hr/file/144504>
64. Tavares-Carreón F., De Anda-Mora K., Rojas-Barrera I.C., Andrade A. (2023). *Serratia marcescens* antibiotic resistance mechanisms of an opportunistic pathogen: a literature review, 11:e14399. DOI: 10.7717/peerj.14399
65. Thomas G.A., Paradell Gil T., Müller C.T., Rogers H.J., Berger C.N. (2024). From field to plate: How do bacterial enteric pathogens interact with ready-to-eat fruit and vegetables, causing disease outbreaks? *Food Microbiology*, 117:104389. DOI: 10.1016/j.fm.2023.104389.
66. Tsuchida S., Umemura H., Nakayama T. (2020). Current Status of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) in Clinical Diagnostic Microbiology. *Molecules*, 25(20):4775. DOI: 10.3390/molecules25204775
67. Turner K., Moua C.N., Hajmeer M., Barnes A., Needham M. (2019). Overview of Leafy Greens-Related Food Safety Incidents with a California Link: 1996 to 2016. *Journal of Food Protection*, 82(3):405-414. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-18-316.
68. Waltenburg M.A., Schwensohn C., Madad A., Seelman S.L., Peralta V., Koske S.E., Boyle M.M., Arends K., Patel K., Mattioli M., Gieraltowski L., Neil K.P.; Outbreak Investigation Team. (2021). Two multistate outbreaks of a reoccurring Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strain associated with romaine lettuce: USA, 2018-2019. *Epidemiology & Infection*, 150:e16. DOI: 10.1017/S0950268821002703.

69. Wang X., Jordan I.K., Mayer L.W. (2015). Phylogenetic Perspective on Molecular Epidemiology. Academic Press, 517-536, DOI:10.1016/B978-0-12-397169-2.00029-9.
70. Yang J., Long H., Hu Y., Feng Y., McNally A., Zong Z. (2022). *Klebsiella oxytoca* Complex: Update on Taxonomy, Antimicrobial Resistance, and Virulence. Clinical Microbiology Reviews, 35(1):e0000621. DOI: 10.1128/CMR.00006-21
71. Yu Y.C., Yum S.J., Jeon D.Y., Jeong H.G. (2018). Analysis of the Microbiota on Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Cultivated in South Korea to Identify Foodborne Pathogens. Journal of Microbiology and Biotechnology, 28(8):1318-1331. DOI: 10.4014/jmb.1803.03007.
72. Yutin N. (2013). Horizontal Gene Transfer. Brenner's Encyclopedia of Genetics, 530-532.
73. Zalewska M., Błażejewska A., Czapko A., Popowska M. (2021). Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Animal Manure - Consequences of Its Application in Agriculture, 12:610656. DOI: 10.3389/fmicb.2021.610656
74. Zhang Y.J., Hu H.W., Chen Q.L., Singh B.K., Yan H., Chen D., He J.Z. (2019). Transfer of antibiotic resistance from manure-amended soils to vegetable microbiomes. Environment International, 130:104912. DOI: 10.1016/j.envint.2019.104912.
75. Zhang Y.J., Hu H.W., Chen Q.L., Yan H., Wang J.T., Chen D., He J.Z. (2020). Manure Application Did Not Enrich Antibiotic Resistance Genes in Root Endophytic Bacterial Microbiota of Cherry Radish Plants. Applied and Environmental Microbiology, 86(2):e02106-19. DOI: 10.1128/AEM.02106-19.
76. Zhang Y.J., Hu H.W., Gou M., Wang J.T., Chen D., He J.Z. (2017). Temporal succession of soil antibiotic resistance genes following application of swine, cattle and poultry manures spiked with or without antibiotics. Environ Pollut, 231(Pt 2):1621-1632. DOI: 10.1016/j.envpol.2017.09.074
77. Zivkovic Zaric R., Zaric M., Sekulic M., Zornic N., Nestic J., Rosic V., Vulovic T., Spasic M., Vuleta M., Jovanovic J., Jovanovic D., Jakovljevic S., Canovic P. (2023). Antimicrobial Treatment of *Serratia marcescens* Invasive Infections: Systematic Review. Antibiotics (Basel), 12(2):367. DOI: 10.3390/antibiotics12020367
78. Žiarovská J., Urbanová L., Moravčíková D., Artimová R., Omelka R., Medo J. (2022). Varieties of Lettuce Forming Distinct Microbial Communities Inhabiting Roots and Rhizospheres with Various Responses to Osmotic Stress. Horticulturae 8(12):1174. DOI: 10.3390/horticulturae8121174

## 8. Prilozi



Slika 8.1. Dendrogram za sojeve reda Enterobacteriales konstruiran na temelju rep-PCR obrazaca dobivenih amplifikacijom s početnicom GTG5, namijenjen selekciju sojeva temeljem 95% sličnosti

## Životopis

Marta Bačani rođena je 20.01.2001. u Koprivnici. Osnovnu školu pohađala je u Velikom Bukovcu od 2007. do 2015. godine. Završila je Medicinsku školu u Varaždinu, smjer farmaceutski tehničar, 2019. godine, nakon čega je iste godine upisala preddiplomski studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike na Zdravstvenom veleučilištu Zagreb. Godine 2022. školovanje je nastavila na diplomskom studiju Mikrobne biotehnologije u poljoprivredi na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Posjeduje izvrsno poznavanje engleskog jezika, te vještine rada na računalu i korištenja programskih alata za analizu i grafički prikaz podataka. Aktivno doprinosi akademskoj zajednici vršenjem uloge demonstratora na modulima Mikrobiologija namirnica i Molekularne metode u mikrobnj agroekologiji na Agronomskom fakultetu. Promovira znanosti iz mikrobiologije objavom izvornog znanstvenog rada u časopisu Glasnik zaštite bilja.

Referenca: Bačani M., Odorčić V., Mrkonjić Fuka M., Tanuwidjaja I. (2024). Zastupljenost enterobakterija u rizosferi ekološki uzgojene zelene salate. Glasnik zaštite bilja, 47. (4) 14-21. Preuzeto s <https://hrcak.srce.hr/319516>