

Marta Bačani¹, Valentina Odorčić,
Mirna Mrkonjić Fuka¹, Irina Tanuwidjaja¹

Izvorni znanstveni rad

Zastupljenost enterobakterija u rizosferi ekološki uzgojene zelene salate

Sadržaj

Cilj ovog rada bio je odrediti ukupan broj mikroorganizama te zastupljenost enterobakterija u rizosferi ekološki uzgojene zelene salate (*Lactuca sativa* L.). Ukupno je sakupljeno 18 uzoraka rizosfernog tla tri sorti zelene salate (kristalka, puterica i hrastov list) s područja Varaždinske (OPG1) i Istarske županije (OPG2). Uzorci su sakupljeni u ljeto 2023. godine i analizirani na ukupan broj mikroorganizama koji su uzgojeni aerobno na 30°C dok su Gram-negativne bakterije obitelji Enterobacteriaceae uzgojene anaerobno na istoj temperaturi. 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. Iako su zamijećene statistički značajne razlike u ukupnom broju mikroorganizama i enterobakterija između dva gospodarstva ($p < 0,05$), razlike u brojnosti obje skupine mikroorganizama između različitih sorti uzoraka zelene salate nisu bile statistički značajne. Rezultati ovog rada pokazuju da je rizosferno tlo ekološki proizvedene zelene salate rezervoar enterobakterija koje čine značajan udio ukupne mikrobiote rizosfere zelene salate (1,3 do 8,8%) te da je potreban konstantan nadzor u cilju zaštite zdravlja potrošača.

Glavne riječi: ekološki proizvedena zelena salata, Enterobacteriaceae, ukupan broj mikroorganizama, rizosfera

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). 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). Povrće poput zelene salate koje se uobičajeno konzumira bez termičke obrade predstavlja poseban rizik (Martinez i sur., 2015; Turner i sur., 2019; Žiarovská i sur., 2022). Patogeni u tkivo biljke mogu ući nakon žetve, ali i prilikom proizvodnje usjeva kroz oštećenja ili na mjestima bočnog izbijanja korijena te se potom mogu prenositi u jestivi dio sustavom

¹ Marta Bačani, Valentina Odorčić, mag. ing.agr., prof. dr. sc. Mirna Mrkonjić Fuka, dr. sc. Irina Tanuwidjaja, Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Svetošimunska cesta 25, 10000 Zagreb, Hrvatska
Autor za korespondenciju: mfuka@agr.hr

žila biljke (Mendes i sur., 2013; Thomas i sur., 2024). Nepropisno tretirani stajski gnoj, kao i voda za navodnjavanje upitne mikrobiološke čistoće, česti su izvori patogenih bakterija (Mendes i sur., 2013; Broszat i sur., 2014). Urbanizacija i globalno zatopljenje kontinuirano dovode do nedostatka kvalitetne vode za navodnjavanje, zbog čega se u poljoprivrednoj proizvodnji koristi otpadna voda koja može sadržavati lijekove, fekalije te ljudske patogene koji predstavljaju prijetnju globalnom zdravlju. Također, netretirana otpadna voda oslobađa organske spojeve ugljika i druge hranjive tvari koji mogu stimulirati rast bakterija, kako korisnih, tako i patogenih. Posebno zabrinjava činjenica proizašla iz istraživanja obrađenih otpadnih voda u Republici Hrvatskoj kojom je dokazana prisutnost multirezistentnih patogenih bakterija porodice *Enterobacteriaceae* i u pročišćenoj otpadnoj vodi (Puljko i sur., 2022), što predstavlja značajan zdravstveni rizik ukoliko se takva voda koristi za navodnjavanje povrća poput zelene salate. 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* u otpadnoj vodi (Broszat i sur., 2014; Bottichio i sur., 2020). Velik broj članova ove porodice su uzročnici bolničkih i izvanbolničkih infekcija od kojih su najznačajnije infekcije mokraćnog sustava, bakterijemija, infekcije probavnog sustava, meningitis i kožne infekcije (Jelić, 2018; Taggar i sur., 2020). Ova porodica spada u red *Enterobacteriales* kojeg čine i porodice *Budviciaceae*, *Erwiniaceae*, *Pectobacteriaceae*, *Yersiniaceae*, *Hafniaceae* i *Morganellaceae* sa ukupno 60 rodova i više od 250 vrsta. Članovi reda *Enterobacteriales* su štapičaste, Gram-negativne, fakultativno anaerobne bakterije koje ne produciraju spore, te su ubikvisti i nastanjuju čitav niz ekoloških niša, od tla i vode do živih organizama uključujući i ljude. 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 gastrointestinalnog (GI) trakta, usne šupljine i spolnog sustava (Adeolu i sur., 2016; Jelić, 2018) te se zbog toga smatraju indikatorima onečišćenja otpadnih voda (Encyclopedia Britannica). Obligatni i oportunistički patogeni prisutni u vodi za navodnjavanje ili u stajskom gnoju su izrazit problem budući da je dokazano da *E. coli* i *Salmonella enterica* serovar 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). Također, u slučaju uzgoja stoke u blizini obradivih zemljišta za proizvodnju voća i povrća, nezreo stajnjak ili kontaminirana površinska voda također mogu doći u dodir s usjevima (Nag i sur., 2022), čime se mogu širiti patogene bakterije koje čine tipičnu GI mikrobiotu. Yu i sur. (2018) potvrdili su ovaj put kontaminacije detektirajući *K. pneumoniae* u zelenoj salati sugerirajući na korištenje gnojiva na bazi izmeta tijekom uzgoja povrća budući da *K. pneumoniae* čini sastavni dio mikrobiote GI trakta životinja. Tijekom 2018. i 2019. godine izbila je epidemija povezana s rimskom salatam 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). Zastupljenost i brojnost mikroorganizama, a time i prisutnost patogena, u rizosferi pojedine biljke ovisi o više faktora. Neki od tih faktora su vrsta i otpornost mikroorganizma i biljke, tip tla, te klimatski i antropogeni utjecaji. Upravo zbog kombinacije navedenih faktora, raznolikost mikroorganizama varira ovisno o lokacijama, sorti biljaka, ali i o vremenu uzorkovanja tla (Berg i Smalla, 2009; Redžepović i sur., 2012; Kłapeć i sur., 2016; Yu i sur., 2018). S obzirom

na rizik unosa patogenih bakterija termički neobrađenom hranom te s obzirom na sve veći interes za ekološki uzgojeno povrće, u ovom je radu provedeno istraživanje određivanja ukupnog broja bakterija iz porodice *Enterobacteriaceae* u rizosferi ekološki uzgojene zelene salate na dva lokaliteta u Republici Hrvatskoj kako bi se dobio uvid u zastupljenost enterobakterija u ukupnoj rizosfernoj mikrobioti te kako bi se dobio uvid u potencijal rizosferenog tla u širenju enterobakterija na svježe lisnato povrće.

Materijali i metode

Uzorkovanje rizosfernog tla

Uzorci tla korišteni za izolaciju i identifikaciju bakterija su sakupljeni na dva geografski udaljena obiteljska poljoprivredna gospodarstva (OPG). Oba se obiteljska gospodarstva bave ekološkim uzgojem povrća i voća. OPG1 nalazi se na području Varaždinske županije u blizini grada Varaždina, a OPG2 na području Istarske županije u blizini grada Pule. Za izolaciju i identifikaciju bakterija su uzorkovani uzorci rizosfernog tla tri sorte zelene salate: kristalka (K), puterica (P) i hrastov list (H). Za svaku je sortu salate sakupljeno po tri uzorka na svakom OPG-u (n=18) tijekom ljeta 2023. godine.

Izolacija mikroorganizama iz tla

Mikroorganizmi su izolirani iz tla metodom razrjeđenja kako bi se odredio ukupni broj mikroorganizama te broj enterobakterija. Po 10 g pojedinog uzorka rizosfernog tla je pomiješano s 90 ml fiziološke otopine (0,85 % NaCl, VWR, Belgium) u Erlenmeyerovoj tikvici u koju su prethodno stavljene kvarcne kuglice za razbijanje agregata tla. Usitnjavanje fragmenata i homogenizacija tla je provedena na Shakeru (Orbital Shaker-Incubator ES-20, BioSan, Latvia) na sobnoj temperaturi pri 250 rpm/30 minuta. Potom je od homogeniziranog tla u fiziološkoj otopini (0,85% NaCl) pripremljena serija razrjeđenja do 10^{-6} razrjeđenja u omjeru 1:10. Ukupan broj mikroorganizama određen je na neselektivnoj hranjivoj podlozi TSA (Tryptic soy agar, Biolife, Italija) nakon inkubacije ploča na 30°C, aerobno, u trajanju od 24h. Brojnost bakterija porodice *Enterobacteriaceae* određena na VRBG selektivnoj hranjivoj podlozi (Violet red bile glucose agar, Biolife, Italija) nakon anaerobne inkubacije inokuliranih ploča na 30°C u trajanju od 24h. Po završetku inkubacije, kolonije porasle na TSA i VRBG podlogama su izbrojene pomoću brojača kolonija (ColonyStar, Funk Gerber, Njemačka) te je prema formuli (1) izračunata CFU vrijednost (*eng. Colony Forming Unit*) izražena po gramu tla (CFU/g).

Formula 1.

$CFU = (\text{broj kolonija/volumen korištenog uzorka}) \times \text{recipročna vrijednost decimalnog razrjeđenja}$.

Rezultati ovog istraživanja su prikazani kao \log_{10} CFU/g srednje vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom. Za statističku je obradu rezultata korišten Studio R (Verzija 4.3.3., R Core team 2023). Statistički značajne razlike su određene Kruskal-Wallis testom te su smatrane značajnima ukoliko je $p < 0,05$.

Rezultati i rasprava

Na temelju izračunatih CFU vrijednosti za ukupan broj mikroorganizama i broj enterobakterija, za svaki je uzorak izračunat prosječan CFU/g tla s pripadajućom standardnom devijaci-

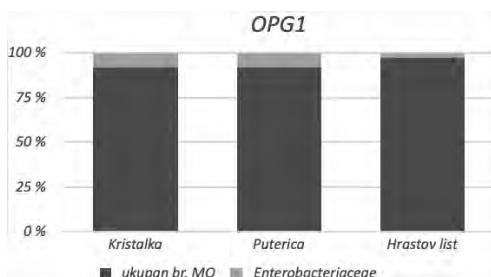
jom te su također izračunati i prosjeci za oba OPG-a, a na temelju sorte salate. Rezultati su objedinjeni i prikazani u tablici 1.

Tablica 1. Ukupan broj mikroorganizama i broj enterobakterija s pripadajućim standardnim devijacijama (log CFU/g ± sd) za OPG1 i OPG2 / **Table 1.** Total number of microorganisms and number of enterobacteria with associated standard deviations (log CFU/g ± sd) for OPG1 and OPG2

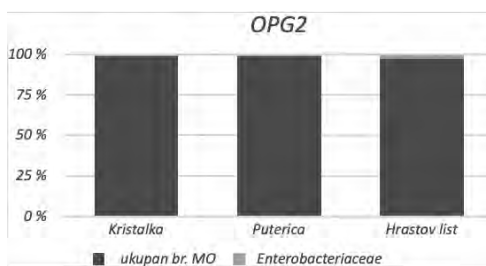
Sorta	Uzorak	OPG1		OPG2	
		Ukupan broj MO [log CFU/g] ^a	<i>Enterobacteriaceae</i> [log CFU/g] _a	Ukupan broj MO [log CFU/g] ^b	<i>Enterobacteriaceae</i> [log CFU/g] _b
Kristalka	K1	7,07 ± 0,03	6,10 ± 0,03	7,12 ± 0,00	5,18 ± 0,05
	K2	6,92 ± 0,02	5,85 ± 0,02	6,85 ± 0,02	4,45 ± 0,05
	K3	6,87 ± 0,02	5,64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

a-b CFU vrijednosti unutar istog reda označavaju statistički značajne razlike (Kruskal-Wallis test, $p < 0,05$) / CFU values within the same row indicate statistically significant differences (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 ($6,92 \pm 0,12 \log \text{CFU/g}$) i OPG2 ($7,09 \pm 0,16 \log \text{CFU/g}$), a isti trend je zabilježen i za ukupni broj bakterija porodice *Enterobacteriaceae* (OPG1 $5,68 \pm 0,26 \log \text{CFU/g}$; OPG2 $5,23 \pm 0,42 \log \text{CFU/g}$), što pokazuje značajan utjecaj faktora vezanih za različite geografske lokacije iz kojih je uzorkovano tlo (Klapeć i sur., 2016). Budući da se lokaliteti s kojih su uzorkovani 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 različita vrsta i sastav tla te da je upravo korelacija navedenih čimbenika razlog detektiranih značajnih razlika u mikrobioti rizosfere. Zbog navedenih razlika u prosječnim vrijednostima CFU ukupnog broja bakterija i ukupnog broja bakterija porodice *Enterobacteriaceae*, 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 1. je vidljivo da je najveći prosječni CFU na OPG1 u rizosferi tla na kojem je uzgajana sorta kristalka s prosječnom vrijednošću od $6,95 \pm 0,10 \log \text{CFU/g}$, dok je najmanji broj ukupnih mikroorganizama na rizosfernom tlu na kojem se uzgaja sorta puterica te iznosi $6,86 \pm 0,15 \log \text{CFU/g}$. Prosječna CFU vrijednost za *Enterobacteriaceae* je u korelaciji s ukupnim brojem mikroorganizama i najveća je u rizosferi sorte kristalka ($5,87 \pm 0,23 \log \text{CFU/g}$), no za razliku od ukupnog broja mikroorganizama, ukupan broj enterobakterija je najmanji u rizosferi sorte hrastov list ($5,38 \pm 0,08 \log \text{CFU/g}$). Najveći prosječni broj ukupnih mikroorganizama izoliranih iz rizosfere OPG2 se nalazi u tlu u kojem je uzgajana sorta hrastov list i iznosi $7,18 \pm 0,22 \log \text{CFU/g}$, dok je najniža vrijednost zabilježena u rizosferi sorte kristalka ($7,03 \pm 0,16 \log \text{CFU/g}$). Prosječna CFU vrijednost bakterija porodice *Enterobacteriaceae* je također najveća u tlima u kojima je uzgajana sorta hrastov list ($5,53 \pm 0,47 \log \text{CFU/g}$), a najniža kod sorte kristalka i iznosi $5,01 \pm 0,50 \log \text{CFU/g}$, što je u korelaciji s ukupnim brojem mikroorganizama. Unatoč navedenim razlikama u prosječnim CFU vrijednostima obje skupine mikroorganizama u rizosferi različitih sorti na OPG1 i OPG2, statističkom analizom nisu utvrđene značajne razlike u CFU vrijednostima između sorti (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$), odnosno sorta uzgajane salate nije utjecala niti na ukupan broj mikroorganizama niti na ukupan broj enterobakterija. Iz rezultata je vidljivo da bakterije porodice *Enterobacteriaceae* čine značajan udio ukupne mikrobiote rizosfere zelene salate s prevalencijom od 1,3 do 8,8% (Graf 1; Graf 2).



Graf 1. Grafički prikaz udjela bakterija porodice *Enterobacteriaceae* u ukupnom broju mikroorganizama na OPG1 / **Graph 1.** Graphic representation of the proportion of *Enterobacteriaceae* family in the total number of microorganisms on OPG1



Graf 2. Grafički prikaz udjela bakterija porodice *Enterobacteriaceae* u ukupnom broju mikroorganizama na OPG2 / **Graph 2.** Graphic representation of the proportion of *Enterobacteriaceae* family in the total number of microorganisms on OPG2

Na OPG1 je udio bakterija porodice *Enterobacteriaceae* u ukupnom broju mikroorganizama veći iako je prosječni ukupni broj mikroorganizama manji u odnosu na OPG2. Također, obzirom na velik udio enterobakterija u ukupnom broju mikroorganizama i na OPG2, može se pretpostaviti da postoji problem s mikrobiološkom ispravnnošću vode za navodnjavanje na oba gospodarstva, a što je u razgovoru s proizvođačem s područja Istarske županije i potvrđeno za OPG2. Iako postoji velik broj istraživanja ukupne i patogene mikrobiote svježe ubranog zelenog lisnatog povrća (Berg i Smalla, 2009; Guron i sur., 2019; Ibekwe i sur., 2020; Bigott i sur., 2022), mali je udio istraživanja u kojima se prati brojnost ukupnog broja mikroorganizama i broja enterobakterija u rizosfernom tlu. Broj bakterija porodice *Enterobacteriaceae* u listovima zelene salate proizvedenoj konvencionalnim uzgojem na području Poljske (Kłapeć i sur., 2016) kretao se od 3,48-5,48 log CFU/g, dok je u rizosferi 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 vezane uz rizosferno tlo niže su za 1,29-2,31 log CFU/g za bakterije porodice *Enterobacteriaceae* te 1,64-2,0 log CFU/g za ukupan broj mikroorganizama u odnosu na vrijednosti dobivene u našem istraživanju. Međutim, poznato je iz istraživanja Oliveira i sur. (2010) i Maffeia i sur. (2016) kako postoje značajne razlike u prevalenciji patogena s obzirom na ekološku ili konvencionalnu proizvodnju. Tako je u zelenoj salati proizvedenoj na području Španjolske detektiran 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). Međutim, autori zaključuju da iako postoji opće prihvaćeno mišljenje da organski proizvodi predstavljaju veći rizik od prijenosa bolesti koje se prenose hranom nego konvencionalni proizvodi, povećane razine enterobakterija u rizosferi zelene salate ne moraju nužno biti povezane s fekalnom kontaminacijom. Naime, pojedine vrste enterobakterija mogu predstavljati sastavni dio korisne mikrobiote biljaka (Oliveira i sur., 2010) te je stoga nužno provesti njihovu detaljnu identifikaciju.

Zaključak

Provedbom ovog istraživanja određen je ukupan broj mikroorganizama i utvrđena je zastupljenost bakterija porodice *Enterobacteriaceae* u rizosfernoj mikrobioti ekološki uzgojene zelene salate. Evidentirane su statistički značajne razlike u dobivenim rezultatima između dviju geografski udaljenih lokacija (OPG1, Varaždin; OPG2, Pula). S obzirom na značajan udio bakterija porodice *Enterobacteriaceae* na oba OPG-a, pretpostavlja se da je njihov izvor mikrobiološki neispravna voda za navodnjavanje i/ili stajnjak, koji su i najčešći izvori patogenih bakterija u ekološkom uzgoju lisnatog povrća. Budući da se zeleno lisnato povrće najčešće konzumira bez termičke obrade, kontaminacija potencijalno patogenim bakterijama porodice *Enterobacteriaceae* može predstavljati značajan zdravstveni rizik. Stoga su nužna daljnja istraživanja rizosferne mikrobiote zelene salate s ciljem identifikacije i karakterizacije enterobakterija koje mogu predstavljati prijetnju za zdravlje potrošača.

Napomena

Rezultati prezentirani u radu nastali su u okviru diplomskog rada studentice Marte Bačani pod naslovom "Potencijal rizosferenog mikrobioma ekološki uzgojene zelene salate u širenju antibiotički rezistentnih enterobakterija".

Literatura

Adeolu, M., Alnajar, 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

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](https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00654.x).

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.

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](https://doi.org/10.1093/cid/ciz1182).

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. *Applied and Environmental Microbiology*, 89(7):e00700-23. DOI: [10.1128/aem.00700-23](https://doi.org/10.1128/aem.00700-23).

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](https://doi.org/10.1128/AEM.01295-14).

Encyclopedia Britannica. URL: <https://www.britannica.com/science/coliform-bacteria> (2.3.2024.)

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. *mSphere*, 4(3):e00239-19. DOI: [10.1128/mSphere.00239-19](https://doi.org/10.1128/mSphere.00239-19).

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.

Jelić, M. (2018) Mehanizmi rezistencija na antibiotike u enterobakterija otpornih na karbapeneme. Disertacija. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet.

Ktapeć, 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 and Environmental Medicine*, 23(4):559-565. DOI: [10.5604/12321966.1226846](https://doi.org/10.5604/12321966.1226846).

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](https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.006).

Martinez, B., Stratton, J., Bianchini, A., Wegulo, S., Weaver, G. (2015) Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 to internal tissues and its survival on flowering heads of wheat. *Journal of Food Protection*, 78(3):518-24. DOI: [10.4315/0362-028X.JFP-14-298](https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-298).

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](https://doi.org/10.1111/1574-6976.12028).

Nag, R., Russell, L., Nolan, S., Auer, A., Markey, B.K., Whyte, P., O'Flaherty, V., Bolton, D., Fenton, O., Richards, K.G., Cummins, E. (2022) Quantitative microbial risk assessment associated with ready-to-eat salads following the application of farmyard manure and slurry or anaerobic digestate to arable lands. *Science of the Total Environment*, 806(Pt 3):151227. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2021.151227](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151227).

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](https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.03.008)

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](https://doi.org/10.1111/jam.15686).

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.

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.

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 of Microbiology*, 14:1085387. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1085387.

Taggar, G., Attiq Rheman, M., Boerlin, P., Diarra, M.S. (2020) Molecular Epidemiology of Carbapenemases in Enterobacteriales from Humans, Animals, Food and the Environment. *Antibiotics (Basel)*, 9(10):693. DOI: 10.3390/antibiotics9100693.

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.

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.

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 and Infection*, 150:e16. DOI: 10.1017/S0950268821002703.

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 Biotechnology*, 28(8):1318-1331. DOI: 10.4014/jmb.1803.03007.

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

Prispjelo/Received: 14.5.2024.

Prihvaćeno/Accepted: 17.6.2024.

Original scientific paper

Prevalence of enterobacteria in the rhizosphere of organically grown lettuce (*Lactuca sativa* L.)

Abstract

The aim of this study was to determine the total number of microorganisms and the prevalence of bacteria of the family Enterobacteriaceae in the rhizosphere of organically grown lettuce (*Lactuca sativa* L.). 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 samples were collected in the summer of 2023 and analyzed for the total number of microorganisms grown aerobically at 30°C and Gram-negative bacteria of the Enterobacteriaceae family, grown anaerobically at the same temperature. The average values of the total number of microorganisms were $8.6 \times 10^6 \pm 2.2 \times 10^6$ CFU/g for OPG1 and $1.3 \times 10^7 \pm 5.2 \times 10^6$ CFU/g for OPG2, while the total number of enterobacteria was $5.7 \times 10^5 \pm 3.2 \times 10^5$ CFU/g for OPG1 and $2.7 \times 10^5 \pm 3.3 \times 10^5$ CFU/g for OPG2. Although statistically significant differences were observed in total number of microorganisms and enterobacteria between the two farms ($p < 0.05$), the differences in abundance of both groups of microorganisms between different varieties of lettuce samples were not statistically significant. The results of this work show that the rhizosphere soil of organically produced lettuce is a reservoir of enterobacteria that make up a significant proportion of the total microbiota of the lettuce rhizosphere (1.3 to 8.8%) and that constant monitoring is needed in order to protect the health of consumers.

Key words: organically produced lettuce, Enterobacteriaceae, total number of microorganisms, rhizosphere