

UNIVERZITET U BEOGRADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Igor S. Kljujev

**KONTAMINACIJA BILJAKA
PATOGENIM BAKTERIJAMA IZ VODE
ZA NAVODNJAVANJE**

doktorska disertacija

Beograd, 2012.

UNIVERZITET U BEOGRADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Igor S. Kljujev

**KONTAMINACIJA BILJAKA
PATOGENIM BAKTERIJAMA IZ VODE
ZA NAVODNJAVANJE**

doktorska disertacija

Beograd, 2012.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF AGRICULTURE

Igor S. Kljujev

**CONTAMINATION OF PLANTS BY
PATHOGENIC BACTERIA FROM
IRRIGATION WATER**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012.

Mentor:

Dr Vera Raičević, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu,
Poljoprivredni fakultet

Članovi komisije:

Dr Miomir Nikšić, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu,
Poljoprivredni fakultet.

Dr Jelena Knežević-Vukčević, redovni profesor, Univerzitet u Bogradu,
Biološki fakultet.

Dr Radmila Stikić, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu,
Poljoprivredni fakultet.

Dr Dragan Kiković, redovni profesor, Univerzitet u Kosovskoj Mitrovici,
Prirodno-matematički fakultet.

Datum odbrane:

Datum promocije:

Ovom prilikom želim da izrazim veliku zahvalnost svom mentoru Prof. Dr Veri Raičević za rukovođenje, svestranu pomoć i podršku koju mi je pružila tokom izrade ove disertacije. Hvala, što je verovala u mene i moj rad.

Zahvaljujem se Prof. Dr Miomiru Nikšiću, Prof. Dr Radmili Stikić, Prof. Dr Jeleni Knežević-Vukčević i Prof. Dr Draganu Kikoviću na korisnim sugestijama i savetima.

Takođe, zahvaljujem se osoblju Katedre za ekološku mikrobiologiju Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu na pomoći i kolegijalnom razumevanju.

Posebnu zahvalnost dugujem svojoj porodici bez čije podrške ne bih uspeo u ovom svom poduhvatu.

*U znak pažnje, poštovanja i zahvalnosti,
svojim roditeljima, Irini,
Eleni i Andreju.*

*S ljubavlju, pažnjom i zahvalnošću,
anima koji me vole.*

Kontaminacija biljaka patogenim bakterijama iz vode za navodnjavanje

REZIME

Konzumiranje svežeg povrća i voća je satavni deo zdrave ishrane i preporučuje se kao prevencija nastanka raznih obolenja. U svetu postoji trend povećanja konzumiranja svežeg povrća i voća, pa je njegov mikrobiološki kvalitet od izuzetne važnosti za javno zdravlje i bezbednost.

Kontaminacija povrća i voća je rezultat prisustva patogenih bakterija, koje mogu kontaminirati proizvode u bilo kom delu proizvodnog lanca. Na svežem povrću je moguće prisustvo: *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*. Salmoneloze se povezuju sa paradajzom, klicama raznih biljaka, dinjom. Infekcije izazvane *E. coli* i *E. coli* O157:H7 su povezane sa zelenom salatom, klicama raznih biljaka, mrkvom i dr.

Poslednjih godina je u porastu broj epidemija izazvanih patogenima na svežem povrću i voću. Kontaminirana voda za navodnjavanje je efikasan vektor prenosa patogena na biljke, pa mikrobiološki ispravna voda ima poseban značaj u proizvodnji zdravstveno bezbedne hrane. Kontaminacija svežeg povrća patogenim bakterijama zavisi od sposobnosti ovih bakterija da kolonizuju biljku. U slučaju pojave mikrobiološke kontaminacije svežeg povrća i voća, teško je izvršiti dekontaminaciju proizvoda, jer je bakterije nemoguće potpuno ukloniti samo pranjem vodom.

Cilj ovog rada je ispitivanje prisustva i identifikacija patogenih bakterija u vodi za navodnjavanje i na povrću, proučavanje prenosa patogenih bakterija iz vode za navodnjavanje do biljke i praćenje sposobnosti patogenih bakterija da površinski i endofitno kolonizuju koren, stablo i list različitih vrsta povrća.

Mikrobiološki kvalitet vode i povrća je procenjivan na osnovu prisustva i broja koliformnih bakterija, kao i brojnosti određenih vrsta patogenih bakterija. Izolovani sojevi patogenih bakterija su identifikovani na osnovu njihovih morfoloških, ekoloških i biohemijskih osobina.

Prenos patogenih bakterija iz vode za navodnjavanje do biljke, kao i kolonizacija biljaka patogenim bakterijama je proučavana primenom PCR metode, *green fluorescent protein* genetske transformacije bakterija, metodom *fluorescence in situ hybridization* (FISH) i laser skening konfokalnom mikroskopijom (CLSM).

Broj koliformnih bakterija u ispitivanim vodama je bio mnogo veći nego što dozvoljavaju svetski standardi, pa se one ne mogu preporučiti za navodnjavanje povrća koje se konzumira sveže. U ovim vodama su identifikovane: *Escherichia coli*, *E. coli* O157:H7, *E. vulneris*, *E. adecarboxylata*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aeromonas hydrophila*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Vibrio fluvialis*, *Yersinia enterocolitica*, *Proteus spp.*

Broj koliformnih bakterija i *E. coli* na biljkama je bio visok, što ukazuje na fekalnu kontaminaciju biljaka. Na ispitivanim biljkama su identifikovane: *E. coli*, *E. coli* O157:H7, *E. vulneris*, *Salmonella spp.*

E. coli K-12, iz kontaminirane vode za navodnjavanje, je površinski i endofitno kolonizovala koren zelene salate i preko vaskularnog sistema dospela do listova biljaka. Sve patogene bakterije su površinski i endofitno kolonizovale koren, stablo i list ispitivanih biljnih vrsta. Endofitne patogene bakterije su bile prisutne u citoplazmi biljne ćelije, mada mehanizam njihov dospevanja nije razjašnjen. *Listeria monocytogenes* je, ne samo površinski, već i endofitno kolonizovala koren biljaka.

Ključne reči: kontaminacija, biljke, patogene bakterije, voda za navodnjavanje.

Naučna oblast: Mikrobiologija

Uža naučna oblast: Ekološka mikrobiologija

UDK:

Contamination of plants by pathogenic bacteria from irrigation water

ABSTRACT

Consumption of fresh vegetables and fruits is a healthy diet supply and it is recommended as prevention of illnesses. There is an increasing trend in consumption of fresh vegetables and fruits in the world, and their microbiological quality is very important for public human health and protection.

Contamination of vegetables and fruits is the result of presence of human pathogen bacteria which can contaminate products in any part of production chain. There is an evidence of presence of: *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* on the fresh vegetables. Salmonellosis is connected with tomato, sprouts, cantaloupe etc. *E. coli* and *E. coli* O157:H infections are linked with lettuce, sprouts, carrot etc. There has been an increasing number of outbreaks caused by human pathogen on fresh vegetables and fruits in the recent years. Contaminated irrigation water is a very effective vector of the transmission of human pathogen to plants, so microbiological safe water has special importance in health safety food production. Contamination of fresh vegetables by human pathogen bacteria depends on bacterial ability to colonize plant. In the case of microbiological contamination of fresh vegetables and fruits, it is very difficult to carry out decontamination of product, because it is impossible to remove all attached bacteria only by washing.

The goal of this research is an investigation of presence and identification of pathogen bacteria in the irrigation water and on vegetables, transmission of pathogen bacteria from irrigation water to plants and studying/monitoring the ability of the human pathogen to colonize the surface and endophyte of root, stem and leaf of different vegetable species. Microbiological quality of water and vegetables is estimated on the basis of the presence and number of coliform bacteria, as well as certain species of pathogen bacteria. Isolated strains of human pathogen bacteria are identified by their morphological, ecological and biochemical properties.

Transmission of pathogen bacteria from irrigation water to plants, as well as colonization of plants by human pathogen bacteria was investigated by: applying PCR method, using *green fluorescent protein* transformed bacteria, *fluorescence in situ*

hybridization (FISH) and confocal laser scanning microscopy (CLSM). The number of coliform bacteria in investigated waters was much higher than it should be according to world standards and these waters could not be recommended for irrigation of vegetables eaten raw. In these waters, the following bacteria were identified: *E. coli*, *E. coli* O157:H7, *E. vulneris*, *E. adecarboxylata*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aeromonas hydrophila*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Vibrio fluvialis*, *Yersinia enterocolitica*, *Proteus spp.*

The number of coliform bacteria and *E. coli* on the plants was high, which indicates/points to fecal contamination of plants. Similarly, the following bacteria were detected: *E. coli*, *E. coli* O157:H7, *E. vulneris*, *Salmonella spp.* on the investigation plants.

E. coli K-12 from contaminated irrigation water colonized the surface and endophyte of lettuce root and entered the leaves of lettuce through vascular plant system. All investigated human pathogenic bacteria colonized the surface and endophyte of the root, stem and leaf of the investigated plant species. Endophytic human pathogen bacteria were found in plant cells cytoplasm, although the mechanism of their entrance has not been clarified yet. *L. monocytogenes* colonized not only the surface, but endophyte of the plants root as well.

Key words: *contamination, plants, human pathogenic bacteria, irrigation water.*

Scientific area: Microbiology

Uža naučna oblast: Microbial ecology

UDK:

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. PREGLED LITERATURE.....	4
2.1. Voda za navodnjavanje kao izvor patogena i preživljavanje patogena u vodi za Navodnjavanje.....	4
2.2. Standardi mikrobiološkog kvaliteta vode za navodnjavanje.....	8
2.3. Prisustvo i preživljavanje patogene bakterije na biljkama.....	12
2.4. Epidemije izazvane kontaminiranim biljkama.....	18
2.5. Kolonizacija i mehanizmi biljno-mikrobne interakcije.....	21
3. CILJ.....	28
4. MATERIJAL I METODE.....	29
4.1. Određivanje broja i identifikacija patogenih bakterija u vodi.....	29
4.2. Određivanje broja i identifikacija patogenih bakterija na biljkama.....	45
4.3. Prenos <i>E. coli</i> K-12 iz vode za navodnjavanje do biljaka zelene salate.....	49
4.4. Kolonizacija biljaka patogenim bakterijama.....	52
5. REZULTATI.....	67
5.1. Prisustvo i identifikacija patogenih bakterija u vodi.....	67
5.1.1. Mikrobiološki kvalitet vode na O.Š.D. Radmilovac.....	67
5.1.2. Identifikacija vrsta patogenih bakterija u vodi O.Š.D. Radmilovac.....	72
5.1.3. Mikrobiološki kvalitet vode u melioracionom kanalu u Surčinu.....	74
5.1.4. Identifikacija patogenih bakterija u vodi melioracionog kanala u Surčinu.....	76
5.1.5. Mikrobiološki kvalitet vode u melioracionom kanalu u Negotinu.....	77
5.1.6. Identifikacija patogenih bakterija u vodi melioracionog kanala u Negotinu.....	79
5.1.7. Mikrobiološki kvalitet vode kanala sliva "Donje polje" i kanala "Galovica".....	80
5.1.8. Identifikacija patogenih bakterija u vodi kanala sliva "Donje polje" i kanala "Galovica".....	96
5.2. Prisustvo i identifikacija patogenih bakterija na biljkama.....	98

5.2.1. Ogledna parcela u Surčinu.....	98
5.2.2. Individualno gazdinstvo u Negotinu.....	99
5.3. Prenos <i>E. coli</i> K-12 iz vode za navodnjavanje do biljaka zelene salate.....	101
5.4. Kolonizacija biljaka patogenim bakterijama.....	106
6. DISKUSIJA.....	134
6.1. Patogene bakterije u površinskim vodama.....	134
6.2. Patogene bakterije na biljkama.....	143
6.3. Kontaminacija biljaka zelene salate sa <i>E. coli</i> K-12 iz vode za navodnjavanje.....	146
6.4. Mogućnosti kolonizacije biljaka patogenim bakterijama.....	148
7. ZAKLJUČAK.....	157
8. LITERATURA.....	161

1. UVOD

Konzumiranje svežeg povrća i voća je sastavni deo zdrave ishrane i preporučuje se zbog unošenja vitamina, minerala i vlakana kao prevencija nastanka srčanih oboljenja, kancera i dijabetesa. Svetska zdravstvena organizacija (WHO) i Organizacija za hranu i poljoprivredu preporučuju unos najmanje 400g svežeg povrća i voća dnevno.

U svetu postoji trend povećanja konzumiranja svežeg povrća i voća. Međutim, povećanje potrošnje povrća i voća može imati i neželjene posledice, jer su ovi proizvodi dobra sredina za rast mnogih humanih patogena. Tako, tokom 1990. godine, približno 12% bolesti uzrokovanih neispravnom hranom su vezane za sveže proizvode.

Poljoprivredna proizvodnja u razvijenim zemljama vodi posebnu brigu o bezbednosti i kvalitetu hrane. U poslednjih nekoliko godina potrošačka svest po pitanju bezbednosti hrane je takođe povećana u zemljama u razvoju kao što je i Srbija. Interes samih proizvođača je da se prodržavaju principa dobre poljoprivredne prakse (Good Agricultural Practices - GAP) radi izbegavanja bilo kakve kontaminacije njihovih proizvoda. Mikrobiološki kriterijumi kvaliteta hrane su od izuzetne važnosti za javno zdravlje i bezbednost, a kontaminacija voća i povrća može nastati kao rezultat prisustva mikroorganizama kao što su bakterije, virusi i paraziti. Patogene bakterije mogu kontaminirati povrće u bilo kom delu proizvodnog lanca. Potencijalni izvori mikrobiološke kontaminacije proizvoda u pred-žetvenom periodu su: zemljište, feces, voda za navodnjavanje, voda koja se koristi za primenu pesticida, insekti, ne adekvatno pripremljeno organsko đubrivo, divlje i domaće životinje kao i ne adekvatne aktivnosti radnika. Ipak, kao dva najvažnija izvora kontaminacije se ističu voda za navodnjavanje i organska đubriva (stajnjak, kompost, kanalizacioni mulj). Post-žetveni izvori kontaminacije povrća mogu biti: feces, manipulacija radnika, oprema za žetvu, oprema za transport, divlje i domaće životinje, insekti, voda za pranje kao i oprema za preradu. Kontaminacija tokom procesa proizvodnje, žetve i transporta svežeg povrća i voća može se sprečiti primenom pravila koje preporučuje dobra proizvodna praksa (GAP).

Najveći rizik za potrošača predstavlja kontaminirano povrće i voće koje se konzumira u svežem stanju, tj. bez predhodne termičke obrade. Na svežem povrću je moguće prisustvo bakterija: *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157:H7, *Campylobacter spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium*

botulinum, *Bacillus cereus*. Sve ove patogene bakterije izazivaju bolesti ljudi, i to: kampilobakterijski enteritis, hemoragični kolitis, salmoneloze, šigeloze, listerioze, dijareja sindrom, hemolitični uremični sindrom (HUS), tifus i dizenterija.

Prema podacima FDA (Food Drug Administration) u USA se godišnje registruje oko 76 miliona obolelih, 300 000 ljudi se hospitalizuje, a u 5 000 slučajeva bolest ima smrtni ishod zbog konzumiranja mikrobiološki neispravnog svežeg povrća i voća. To znači da se svaki četvrti Amerikanac razboli, a svaki hiljaditi je hospitalizovan. Saniranje ovih epidemija Ameriku košta 6.5 biliona dolara godišnje (medicinski i ostali troškovi). U periodu 1998 – 2006. godine, od ukupno svih epidemija u Americi, 76% otpada na epidemije izazvane patogenim bakterijama prisutnim u svežem povrću i voću. Tako 30% epidemija otpada na lisnato povrće, 17% na paradajz, 13% na dinju i lubenicu, 11% na peršun i druge začinske biljke i 5% na mladi luk, a svega 24% epidemija se odnosi na ostale prehrambene proizvode (mesne i mlečne preradjevine).

Poslednjih godina je u porastu broj epidemija izazvanih patogenima na svežim proizvodima (povrće i voće) kako u zemljama u razvoju, tako i u razvijenim zemljama. Tako, epidemije izazvane sa *E. coli* O157:H7 u USA i sa *S. sonnei* u Švedskoj, kao i povećan broj hepatitis infekcija su bile posledica konzumiranja kontaminirane zelene salate. Svež paradajz je implicirao velike epidemije izazvane sa *Salmonella spp.* tokom 1990, 1993 i 1999 u USA. Evidentne su epidemije izazvane konzumiranjem klica žitarica koje su bile kontaminirane sa *Salmonella spp.*, *E. coli* O157:H7, *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *Y. enterocolitica* i *Shigella spp.* U Japanu je obolelo oko 10 000 ljudi koji su konzumirali rotkvice kontaminirane sa *E. coli* O157:H7. Krastavac, luk, peršun, spanać i celer su takođe bili uzročnici mnogih epidemija. Smrznuto voće je takođe bilo uzrok epidemija izazvanih sa Hepatitisom A i calcivirus. Sve ove epidemije ističu negativan efekat konzumiranja mikrobiološki neispravnih proizvoda na ljudsko zdravlje.

Prepoznavanje primarnog izvora kontaminacije svežeg povrća i voća je prilično komplikovano. Metode za detekciju patogena na svežim proizvodima nisu sasvim usavršene, a sama priroda kontaminacije limitira efekte testiranja.

Evidentno je postojanje velikog rizika za zdravlje ljudi ukoliko se konzumiraju sveži proizvodi (povrće i voće) navodnjavani mikrobiološki ne ispravnom (kontaminiranom) vodom. Ovakva voda može biti izvor različitih patogena, posebno

bakterija fekalnog porekla (*Salmonella spp.*, *E. coli* O157:H7) koje putem vode mogu dospeti na navodnjavano povrće. Takođe, moguća je migracija *E. coli* O157:H7 iz zemljišta zalivanog kontaminiranom vodom do biljaka zelene salate, kao i njen transport kroz samu biljku. Kontaminirana voda za navodnjavanje je veoma efikasan vektor prenosa patogena na biljke, što ukazuje na važnost korišćenja vode dobrog mikrobiološkog kvaliteta za navodnjavanje. Voda za navodnjavanje ima poseban značaj u proizvodnji zdravstveno bezbedne hrane, posebno povrća koje se konzumira u svežem stanju i zato je neophodan stalni monitoring mikrobiološke ispravnosti ove vode.

U mnogim delovima Srbije, površinske i podzemne vode su ozbiljno zagađene mikrobiološkim kontaminantima poreklom uglavnom iz intenzivne stočarske proizvodnje i urbanih naselja. Nekonrolisana upotreba takvih voda u poljoprivredi može imati ozbiljne ekološke i zdravstvene implikacije. U našoj zemlji se ne poklanja dovoljno pažnje mikrobiološkoj ispravnosti vode za navodnjavanje, a za to ne postoje ni zakonske regulative. Samim tim, istraživanja o mikrobiološkom kvalitetu vode za navodnjavanje u našoj zemlji su veoma oskudna. Mikrobiološki neispravna voda za navodnjavanje predstavlja potencijalni rizik za zdravlje ljudi i ovom problemu treba posvetiti više pažnje, a na to nas obavezuje i EU sa preporukom da se u proizvodnji povrća i voća strogo mora voditi računa o eliminaciji rizika kontaminacije tokom celog proizvodnog ciklusa.

Naučni pristup problemu mikrobiološke kontaminacije se ogleda u preciznoj i pouzdanoj identifikaciji patogenih bakterija i proučavanju njihovog prenošenja u sistemu "voda za navodnjavanje – zemljište – biljke".

U slučaju pojave mikrobiološke kontaminacije svežeg povrća i voća, veoma je teško izvršiti dekontaminaciju proizvoda. Bakterije koje se nalaze na proizvodima je nemoguće sasvim ukloniti pranjem vodom i poznato je da se oko 10% enteropatogena ne uklanja pranjem. Sam postupak pranja može da dovede do širenja odnosno prenošenja bakterija na ostale jestive delove biljke. Iako je pranje svežih proizvoda vodom neophodno, danas postoje i brojne tehnologije za poboljšanje kvaliteta i mikrobiološke dekontaminacije proizvoda kao što su: tretman hlorom (najefikasniji je HOCl), UV radijacija, H₂O₂, ozon, organske kiseline i dr. Ovim postupcima je moguće samo smanjiti broj bakterija na proizvodu, ali ne i potpuno ih ukloniti.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Voda za navodnjavanje kao izvor patogena i preživljavanje patogena u vodi za navodnjavanje

Jedan od načina kontaminacije povrća i voća, patogenim mikroorganizmima je navodnjavanje vodom lošeg kvaliteta. Izvori vode za navodnjavanje mogu biti podzemne, površinske kao i otpadne vode i od toga zavise ekološke karakteristike i kvalitet vode, kao i opstanak i preživljavanje patogenih organizama. Poznato je da različiti izvori voda za navodnjavanje sadrže brojne komponente koje omogućavaju preživljavanje i opstanak *E. coli* (Pachepsky i sar., 2011). Tako, prisustvo organske materije u sedimentu i slobodnoj vodi utiče na parametre kvaliteta, uključujući i mikrobiološki kvalitet površinskih voda (Jjemba i sar. 2010). Površinske vode, slatkovodni izvori, bare, jezera, reke i potoci, su promenljivog mikrobiološkog kvaliteta i potreban je stalan mikrobiološki monitoring ukoliko se koriste za navodnjavanje. Oticanje tečnih ekskremenata iz stočnih farmi, gomile svežeg stajnjaka i njegova primena mogu takođe prouzrokovati fekalnu kontaminaciju površinskih voda. Pašnjaci sa domaćim životinjama pored vodotoka u Koloradu, utiču na porast broja fekalnih koliforma i fekalnih streptokoka u vodi sa faktora 1.6 na 12.5 (Gary i sar., 1983). Fekalna kontaminacija vodotoka u Virđžiniji je bila uglavnom rezultat prisustva domaćih životinja i kada je urađena ograda koja je ograničila pristup životinjama ovoj vodi, broj fekalnih koliforma je redukovana za 94% (Hagedorn i sar., 1999).

Izveštaj o površinskim vodama u šest oblasti koje se navodnjavaju u Alberti (Kanada) je pokazao da je 8% uzoraka vode za navodnjavanje imalo više od 100 fekalnih koliforma u 100 ml uzorka vode (Cross, 1997). *Salmonella* je izolovana iz reke Kornovalis u Novoj Škotskoj (Kanada) i to nizvodno od fabrika za preradu mesa i živine (Menon, 1985) i detektovana je u 6.2% uzoraka površinske vode u Grčkoj (Arvanitidou i sar., 1997). Šiga-toksin-produkujuća *E. coli* serotip O121 je izolovana iz jezerske vode u Konektikatu (McCarthy i sar., 2001), a *E. coli* serotip O157:H7 koja je bila povezana sa infekcijama, je izolovana iz jezera u Oregonu (Keene i sar., 1994). Nekoliko studija je pokazalo prisustvo *Campylobacter spp.* u površinskim vodama u različitim zemljama (Brennhovd i sar., 1992; Daczowska-Kozon i Brzostek-

Nowakowska, 2001; Rosef i sar., 2001; Savill i sar., 2001). Kanalizacione vode, kontaminacija iz septičkih jama, oticanje padavina tokom vremenskih nepogoda i industrijski izlivi mogu kontaminirati površinske vode. Otvoreni kanalizacioni sistemi se dovode u vezu sa pojavom patogena u priobalnim vodama u gusto naseljenim područjima u Floridi (Lipp i sar., 2001).

Podzemne vode su generalno manje sklone zagađenju ali treba imati u vidu da koršćenje ovih voda u poljoprivredi ima posledice po globalni vodeni ciklus (Siebert i sar., 2010). U istraživanju od oko 1300 uzoraka podzemne vode iz bunara sa farmi u Ontariju (Kanada), 31% bunara prelazi novo od 10 ukupnih koliforma u 100 ml vode (preporučenih za pijaću vodu), 20% bunara sadrži fekalne koliforme, 17.6% bunara sadrži *E. coli* i 14.8% bunara sadrži fekalni streptokok (Rudolf i Goss (ed.), 1993). Istraživanja uzoraka vode iz bunara u Nebraski su pokazala da 37% uzoraka sadrže fekalne koliforme i to više od 950 fekalnih koliformnih bakterija u 100 ml vode (Exner i Spalding, 1985). Ispitivanja bunarske vode u Saudijskoj Arabiji pokazala su da 5% bunara sadrže veoma visoku koncentraciju fekalnih koliforma (Alaa el-din i sar., 1994).

Podzemna voda može biti kontaminirana izvorima kontaminacije koji su veoma blizu bunara ili od površinske vode koja se proceduje kroz slabo dihtovan poklopac bunara. U Argentini, proizvodna aktivnost, odlaganje čvrstog i kanalizacionog otpada doprinose zagađenju otpadne vode (Massone i sar., 1998). Druga studija u Argentini pokazuje da je visoka zastupljenost *E. coli* u bunarskoj vodi rezultat male dubine bunara i blizina bunara poljskim toaletima (Marteau i sar., 1998).

Otpadne vode su obično lošeg mikrobiološkog kvaliteta i neophodno je njihovo prečišćavanje pre navodnjavanja. Primena ovih voda u navodnjavanju doprinosi optimizaciji iskorišćavanja vodenih resursa, pre svega u aridnim predelima, ali nosi i veliki ekološki rizik koji se mora strogo kontrolisati (Virto i sar., 2006).

Neprerađene otpadne vode antropogenog porekla mogu sadržati veliki broj patogenih mikroorganizama. Procenjuje se da 1 litar gradske kanalizacije u zemaljama u razvoju može da sadrži 5000 enterovirusa, 7000 CFU *Salmonella spp.*, 7000 CFU *Shigella spp.*, 1000 CFU *V. cholerae*, 4500 CFU *E. histolytica* i 600 *A. lumbricoides* (Feachem i sar., 1983). Nema velikog rizika od pojave bolesti kada se koristi pravilno prerađena otpadna voda u navodnjavanju useva, (Keawvichit i sar., 2001).

Briga o mikrobiološkom kvalitetu voda za navodnjavanje, kao i strategije da se redukuje rizik od patogena prilikom navodnjavanja gajivih biljaka je neophodan u cilju proizvodnje zdravstveno bezbedne hrane (Steele i Odumeru, 2004).

Brojna istraživanja su pokazala da je najčešći izvor patogenih enterobakterija u biljnoj proizvodnji voda za navodnjavanje (Howard i Hutcheson, 2003; Pachepsky i sar., 2011; Oliveira i sar., 2012).

Fekalne materije, kontaminirano zemljište i otpadne vode uvode patogene enterobakterije direktno u vodotokove odakle se voda može koristiti za navodnjavanje. Tako, u Velikoj Britaniji 71% vode za navodnjavanje potiče od površinskih voda u koje dospevaju tretirane otpadne vode (Tyrell i sar. 2006). Mogućnost kontaminacije putem vode za navodnjavanje se povećava u zemljama u razvoju. Smatra se da 10% gajenih kultura se navodnjava ne tretiranom kontaminiranim vodom (Anon 2003). Biljke navodnjavane ovom kontaminiranim vodom pokazuju povećanu sklonost prema prisustvu patogenih enterobakterija (Steele i Odumeru 2004).

Interstinalni trakt ptica može biti domaćin *Campylobacter spp.*, *Salmonella spp.*, *V. cholerae*, *Listeria spp.*, *E. coli* O157:H7 (Fenlow, 1985; Lee i sar., 1982; Luechtfeld i sar., 1980; Quessy i Messier, 1992; Wallace i sar., 1997) i na taj način ptice doprinose fekalnoj kontaminaciji površinskih voda u Njujorku (Alderisio i DeLuca, 1999).

Dokaz da kontaminirana voda za navodnjavanje može biti izvor patogena na povrću i voću su epidemiološki izveštaji o trovanju povrćem, eksperimentalne studije o kontaminaciji zelene salate sa *E. coli* O157:H7 kao i povećanje bolesti u područjima gde se navodnjava sa otpadnom vodom koja je loše prečišćena ili nije uopšte tretirana. Voda za navodnjavanje je bila uzrok epidemija izazvanih sa *E. coli* O157:H7 koja je izolovana iz zelene salate (Ackers i sar., 1998; Herwaldt, 2000). Voda za navodnjavanje je bila izvor *E. coli* koja je detektovana u klijancima kupusa koji su navodnjavani sa kanalizaciono-opterećenom vodom, dok ova bakterija nije pronađena kod klijanaca na susednom polju koji su navodnjavani sa gradskom vodovodskom vodom (Wachtel i sar., 2002b).

Eksperimentalne studije o ispitivanju kontaminacije zelene salate sa *E. coli* O157:H7 su pokazale da voda za navodnjavanje može efikasno prenositi *E. coli* do biljaka zelene salate (Solomon i sar., 2002a; Wachtel i sar., 2002a). Činjenica da kontakt sa zemljištem nije neophodan da bi biljke zelene salate postale kontaminirane,

sugeriše da se bakterije apsorbuju kroz korenov sistem. Takođe, *E. coli* je uočena u celom tkivu biljke zelene salate, uključujući i delove koji su nedostupni za post-žetveno pranje (unutrašnjost biljke). Ova ispitivanja naglašavaju i ističu važnost korišćenja vode za navodnjavanje koja je dobrog mikrobiološkog kvaliteta, posebno za povrtarske biljke koje se konzumiraju sveže.

Dokaz da patogeni, prisutni u vodi za navodnjavanje mogu kontaminirati ne samo povrće i voće, već mogu izazvati i bolesti kod ljudi, ukazuje na mogućnost opsežnog širenja bolesti u populaciji koja koristi otpadne vode za navodnjavanje, gde se te vode veoma slabo ili uopšte ne prečišćavaju pre upotrebe.

Veliki značaj imaju proučavanja o preživljavanju enterobakterija u životnoj sredini, posebno u zemljištu i vodi za navodnjavanje (Fenlon i sar., 2000; Gagliardi i Karns, 2002; Natvig i sar., 2002). Mogućnost preživljavanja *E. coli* i *S. enterica* u produženom vremenskom periodu u vodi za navodnjavanje, sugeriše na mogućnost kontaminacije biljaka tokom predžetvenog perioda u polju.

Prisustvo patogena u vodi za navodnjavanje ukazuju na potencijalni rizik od prenosa bolesti, ako povrće i voće navodnjavano ovom vodom konzumiraju ljudi. Rizik od bolesti izazvanih patogenim mikroorganizmima u vodi za navodnjavanje, zavisi od brojnih faktora, pored ostalog, latentnog perioda patogena, istrajnosti u prirodi i na biljkama, sposobnosti da se razmnožava izvan domaćina, infektivnoj dozi za čoveka i odgovora domaćina (Feachem i sar., 1983).

Životna sposobnost većine patogena se smanjuje sa vremenom (Anonymous, 1992., Manual, guidelines for water reuse). Tako, *Salmonella* spp. i *Shigella* spp. obično preživljavaju manje od 30 dana u vodi, a manje od 10 dana u zemljištu (Feachem i sar., 1983). Neke studije ukazuju na mnogo duže vreme preživljavanja *E. coli* O157:H7 u rečnim vodama i goveđem fecesu (Maule, 2000; Wang i sar., 1996). Preživljavanje enterobakterija u zemljištu zavisi od tipa zemljišta, sadržaja organske materije, pH, temperature, vlage, oksido-redukcionog potencijala, mikrobne intererakcije (Fenlon i sar., 2000), a u vodama od stepena eutrofikacije (Semenov i sar., 2008). Mnogi literaturni izvori (Steele i Odumeru, 2004) pokazuju da patogeni iz vode za navodnjavanje mogu dospeti na povrće i voće i tako ga kontaminirati (Ensink i sar., 2003; Amoah i sar., 2005; Keraita i sar., 2007; Blumenthal i sar., 2000a, 2000b; Scott i sar., 2004; Obuobie i sar., 2006).

2.2. Standardi mikrobiološkog kvaliteta vode za navodnjavanje

Brojnost ukupnih koliformnih, fekalnih koliformnih bakterija, *E. coli*, fekalnih streptokoka i jaja nematoda predstavlja mikrobiološki indikator koji se uobičajeno uzima kao smernica kvaliteta voda u cilju propisivanja kvaliteta vode za navodnjavanje. Obzirom da ukupne i fekalne koliformne bakterije mogu predstavljati i bakterije ne fekalnog porekla, *E. coli* se smatra boljim indikatorom fekalne kontaminacije vode (Barrell i sar., 2000; Edberg i sar., 2000). Činjenica da fekalni streptokok preživljava duže u životnoj sredini nego fekalne koliformne bakterije, ova bakterija može biti veoma koristan indikator prisustva dugo-preživljavajućih izlučenih virusa. Prisustvo jaja nematoda se koristi za procenu rizika od infekcija izazvanih sa *Ascaris spp.*, *Trichuris spp.* i parazitnih nematoda poreklom iz prečišćenih otpadnih voda u oblastima gde su ovi organizmi endemične vrste (Blumenthal i sar., 2000a, 2000b; Westcot, 1997).

Pravila koja upućuju na mikrobiološki kvalitet voda za navodnjavanje su veoma značajna i razlikuju se među državama, kao i kada su u pitanju podzemne, površinske i otpadne vode antropogenog porekla. Mikrobiološki kvalitet vode koji je preporučen za navodnjavanje useva koji se konzumiraju u svežem stanju je često strožiji nego za useve koji podležu preradi ili za stočnu hranu. Delimičan pregled mikrobioloških indikatora i mikrobiološkog kvaliteta vode koji preporučuju neki pravilnici prikazan je u *Tabeli 1*.

Pravilnik "Uputstva za ponovnu upotrebu vode" (*Guidelines for Water Reuse*), koji je izdala američka agencija za zaštitu životne sredine (U.S. Environmental Protection Agency) preporučuje odsustvo detektabilnih fekalnih koliformnih bakterija u otpadnoj vodi koja se koristi za navodnjavanje biljaka koje se konzumiraju sveže. Isti pravilnik preporučuje manje od 200 fekalnih koliformnih bakterija u 100 ml uzorka vode za navodnjavanje biljaka koje se prerađuju ili koriste za stočnu hranu (Anonymous, 1992.). Kalifornija, država sa dugom istorijom ponovne upotrebe otpadnih voda, posebno naglašava da mora biti manje od 2.2 ukupnih koliforma i ne sme uopšte biti prisustva fekalnih koliforma u 100ml uzorka vode koja se koristi za navodnjavanje biljaka koje se konzumiraju sveže (Blumenthal i sar., 2000b). Ovi standardi su veoma slični sa pravilnikom koji preporučuje U.S. EPA kada je u pitanju voda za piće (Anonymous, Jun, 2002).

Tabela 1. Parcijalni vodič mikrobiološkog kvaliteta vode za navodnjavanje

Tip vode	Način korišćenja vode	Kriterijum^a	Referenca
sve vode		< 1000 UK < 100 FK	Anonymous. 1999. Canadian Council of Ministers of the Environment, Canadian water quality guidelines for the protection of agricultural water uses
sve vode		< 200 FC < 200 EC	Williamson, 2001
sve vode	za useve koji se sveži konzumiraju ^b	< 200 FK < 77 EC < 20 FS	Anonymous. 1988. Water quality criteria for microbiological indicators: overview report.
	za javne površine i površine za ispašu domaćih životinja	< 385 EC < 100 FS	
	za navodnjavanje (generalno) ^b	< 1000 FK < 1000 EC < 250 FS	
površinske vode		< 1000 UK ^b < 100 FK ^b	Anonymous. November 1999. Surface water quality guidelines for use in Alberta.
površinske vode	za useve koji se sveži konzumiraju	< 1000 UK < 100 FK	Anonymous. 7 August 1997. Surface water quality objectives.
površinske vode		< 1000 FK	Anonymous. 1973. Water quality criteria.
otpadne vode	za useve koji se sveži konzumiraju	0 FK	Anonymous. 1992. Manual, guidelines for water reuse.
	za prerađene useve	< 200 FC	
otpadne vode	za useve koji se sveži konzumiraju	< 1000 FK < 1 jaje nem.	Blumenthal et al., 2000a, 2000b.
	za prerađene useve	< 100 000 FK	

^aUK – ukupne koliformne u 100 ml; FK – fekalne koliformne u 100 ml; EC - *E. coli* u 100 ml; FS - fekalni streptokok (enterococci) u 100 ml.

^bGeometrijska sredina najmanje pet uzoraka uzetih u poslednjih 30 dana ne bi trebalo da bude veća od 1000 UK i 200 FK, takođe i kod, ne više od 20% ispitivanih uzoraka u bilo kom mesecu ne bi trebalo da bude veći broj ovih bakterija od navedenih vrednosti, kao i ni bilo koji uzorak uzet bilo kog dana ne bi trebao da sadrži više od 2400 UK.

Nasuprot ovome, "Izmenjen pravilnik za bezbednu upotrebu otpadnih voda i otpada u poljoprivredi i vodoprivredi" (*Revised Guidelines for the Safe Use of Wastewater and Excreta in Agriculture and Aquaculture*) koji je izdala svetska zdravstvena organizacija (World Health Organization), dopušta prisustvo do 1000 fekalnih koliformnih bakterija u 100ml uzorka vode, jedno aktivno jaje intestinalne nematode u 1000ml uzorka vode, u vodi koja se koristi u navodnjavanju svežeg povrća i voća orošavanjem, navodnjavanju parkova, travnjaka i golf terena, zatim prisustvo do

100000 fekalnih koliforma u 100ml uzorka vode za neograničeno navodnjavanje useva koji se prerađuju pre konzumiranja (Blumenthal i sar., 2000a).

Pravilnici za mikrobiološki kvalitet površinskih voda nastoje da budu blaži nego oni za otpadne vode, jer mnogi specifični humani patogeni koji su prisutni u otpadnim vodama obično se ne nalaze u površinskim nezagađenim vodama (Feachem i sar., 1983). Tako u Kanadi, gde se pretežno za navodnjavanje koriste površinske ili podzemne vode (Martin i sar., 2000), "Kanadski pravilnik kvaliteta vode za zaštitu korišćenja poljoprivrednih voda" (*Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Agricultural Water Uses*), koji je izdao kanadski savet ministarstva za životnu sredinu (Canadian Council of Ministers of the Environment) preporučuje maksimalno 1000 ukupnih koliformnih bakterija i 100 fekalnih koliforma u 100ml uzorka vode za navodnjavanje (Anonymous, 1999). Iako su ovi standardi široko prihvaćeni u Kanadi, neke provincije su izdale svoje pravilnike i standarde za mikrobiološki kvalitet vode za navodnjavanje (Anonymous, 1988; Anonymous, 1997; Anonymous, 1999; Williamson, 2001). U *Tabeli 2* je prikazan pravilnik mikrobiološkog kvaliteta vode za navodnjavanje za provinciju British Columbia u Kanadi.

Tabela 2. Kriterijum kvaliteta vode za navodnjavanje za mikrobiološke indikatore kanadskog Ministarstva za životnu sredinu (provincija British Columbia)

Vrsta navodnjavanja	<i>E. coli</i>	<i>Enterococci</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Fekalni koliformi
povrće i voće koje se konzumira sveže	≤ 77/100 ml ^a	≤ 20/100 ml ^a	/	≤ 200/100 ml ^a
javne površine i pašnjaci	≤ 385/100 ml ^a	≤ 100/100 ml ^a	≤ 10/100 ml ^b	/
generalno	≤ 1000/100 ml ^a	≤ 250/100 ml ^a	/	≤ 1000/100 ml ^a

^aGeometrijska sredina; ^b75%

Pravilnik EPA-e za površinske vode preporučuje manje od 1000 koliformnih bakterija u 100ml uzorka vode, uključujući tu i rečne vode koje se koriste za navodnjavanje useva (Anonymous, 1973.).

Nemački standard DIN 19650, za vodu za navodnjavanje, preporučuje odsustvo *E. coli* i enterokoka u vodi koja se koristi za navodnjavanje bez ograničenja u zaštićenom prostoru i na otvorenom polju. Kada je u pitanju navodnjavanje biljaka koje se gaje u zaštićenom prostoru i na otvorenom polju, a konzumiraju se sveže, ovaj standard preporučuje manje od 200 *E. coli* i manje od 100 enterokoka u 100ml vode. Za

navodnjavanje povrća do 2 nedelje pre žetve i biljaka koje se konzumiraju sveže do vremena fruktifikacije, preporučuje se manje od 2000 E. coli i manje od 400 enterokoka u 100ml vode (Tabela 3). Voda, kojom se navodnjavaju biljake za industrijsku upotrebu, bi trebala da prođe najmanje jedan tretman prečišćavanja (Stauffer i sar., 2001).

Tabela 3. Izvod iz DIN 19650 standarda, koji se odnosi na higijensko-mikrobiološku ispravnost vode za navodnjavanje (Stauffer i sar., 2001).

Klasa vode	Korišćenje	Prihvatljiv broj E. coli / 100ml	Prihvatljiv broj Enterococci / 100ml
I (Voda za piće)	Sve biljke u zaštićenom prostoru i na otvorenom polju bez ograničenja	Ne detektabilne	Ne detektabilne
II	Biljke na otvorenom polju i zaštićenom prostoru koje se konzumiraju sveže	< 200	< 100
III	Povrće do 2 nedelje pre žetve i biljke koje se konzumiraju sveže do vremena fruktifikacije	< 2000	< 400
IV	Šećerna repa, krompir za dobijanje skroba, biljke za dobijanje ulja (biljke koje se ne konzumiraju sveže)	Otpadna voda mora proći najmanje jedan korak prečišćavanja	

Razlike među pravilnicima pokazuju široko rasprostranjenu neodređenost u aktuelnom riziku izazivanja bolesti od strane patogena koji su prisutni u vodi za navodnjavanje i u ekonomskim ograničenjima raspoloživog kvaliteta vode. Standardi za navodnjavanje otpadnom vodom koje preporučuje EPA su bazirani na pretpostavki da ako patogeni mikroorganizmi mogu biti detektovani u vodi za navodnjavanje onda oni predstavljaju potencijalni rizik za zdravlje ljudi. Ovi standardi ne dozvoljavaju ni najmanji rizik u sprečavanju prenosa i širenja bolesti koju izazivaju patogeni. Nasuprot ovome, pravilnici svetske zdravstvene organizacije (WHO) su bazirani na aktuelnom riziku od prenosa bolesti koji se prognozira prema epidemiološkim studijama o nivou bolesti kojoj je izložena populacija i modelu procene rizika kojim se proračunava stepen tretmana vode koji je neophodan da ne bi broj infekcija prešao 1024 infekcije po osobi u jednoj godini (Blumenthal i sar., 2000a). Iako je visok kvalitet vode za navodnjavanje uvek poželjan, u nekim zemljama to još uvek nije moguće zbog ekonomske cene prečišćavanja otpadne (Shuval i sar., 1997).

2.3. Prisustvo i prživljavanje patogeih bakterija na biljkama

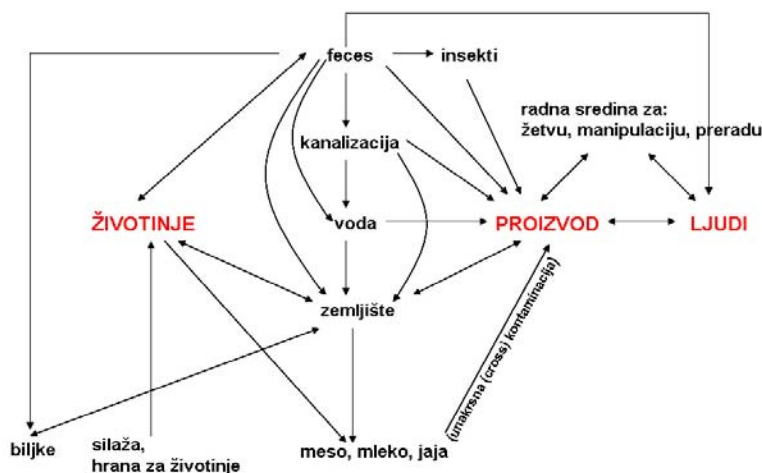
Humani patogeni kao *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, enterohemoragična *Escherichia coli*, *Campylobacter spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus* i *Clostridium botulinum* su najčešće prisutni na svježim proizvodima, odnosno svježem povrću i voću koje se pretežno konzumira u svježem stanju (Beuchat, 2002). Glavne karakteristike ovih bakterija su date u *Tabeli 4*.

Tabela 4. Glavne karakteristike patogenih bakterija i njihov efekat na zdravlje ljudi (FDA, 2005; CDC, 2006: Bacterial Disease)

Patogena bakterija	Glavne karakteristike i efekat na zdravlje ljudi
<i>Campylobacter spp.</i>	je jedan od najčešćih bakterijskih uzročnika ozbiljnih dijareja. Nalazi se uobičajeno u intestinalnom traktu životinja ili zagađenih voda. Simptomi njegovih infekcija, koji se obično javljaju u roku 2 -10 dana posle unošenja bakterije, uključuju groznicu, abdominalne grčeve i često krvavu dajareju.
<i>Escherichia coli O157:H7</i>	je visoko patogeni soj <i>Escherichia coli</i> , produkuje veoma jak toksin koji može izazvati teške bolesti. Obično se nalazi u intestinalnom traktu stoke, može kontaminirati zemljište i vodu. Izazivaju teške krvave dijareje i abdominalne grčeve.
<i>Listeria monocytogenes</i>	izaziva ozbiljne infekcije, a prisutna je u intestinalnom traktu životinja, zemljištu i vodi. Sveži proizvodi mogu postati kontaminirani od zemljišta ili stajnjaka. Uobičajeni simptomi su groznica, mišićni bolovi i ozbiljni gastrointestinalni problemi. Ako se infekcija proširi na nervni sistem, može se javiti glavobolja, ukočen vrat, konfuzija, gubitak ravnoteže i grčevi.
<i>Salmonella spp.</i>	su najčešći uzročnici bolesti koje su rezultat konzumiranja kontaminirane hrane. Žive u intestinalnom traktu životinja i ljudi. Uzrokuju dijareju, abdominalne grčeve i groznicu i to 8-72 sata posle unošenja u organizam.
<i>Shigella spp.</i>	infekcije mogu biti poreklom iz kontaminirane hrane i obično su uzrokovane svježim proizvodima do kojih bakterije dospevaju putem ne higijene radnika ili kontaminacijom na polju ili zagađene vode. Uobičajeni simptomi uključuju dijareju, groznicu, grčeve u stomaku, a počinju 1–2 dana posle unošenja patogena u organizam.

Povrće i voće može postati kontaminirano patogenim mikroorganizmima u kontaktu sa zemljištem, stajnjakom, neadekvatno kompostiranim đubrivima,

navodnjavanjem, poslešetvenim pranjem kontaminiranom vodom, kontaktu sa divljim životinjama, kao i u kontaktu sa inficiranim radnicima koji rade sa hranom (Beuchat i Ryu, 1997). Veoma je važno proučiti postupke između setve i žetve useva u cilju razumevanja na koji način određeni mikroorganizmi mogu biti povezani sa biljkama u predžetvenom periodu. Smatra se da je predžetvena kontaminacija useva sa enteropatogenim bakterijama najčešći uzrok pojave mikrobiološki neispravnih proizvoda na tržištu (Pezzoli i sar. 2007; CDC 2006b; Gillespie, 2004; Soderstrom i sar. 2005). Načini mikrobiološke kontaminacije su prikazani u Šemi 1.



Šema 1. Mogući načini mikrobiološke kontaminacije ljudi, životinja i proizvoda (L. Beuchat, 2002)

Wachtel i sar. (2002a) su ukazali na kontaminaciju korena kupusa sa *E. coli*, pošto su biljke zalivane otpadnom kontaminiranom tekućom vodom iako jestivi deo biljke nije bio tertian ovom vodom. Islam i sar. (2004) su pokazali da upotreba vode za navodnjavanje, kontaminirane sa *S. typhimurium*, rezultira kontaminacijom šargarepe i rotkvice prilikom ubiranja plodova i da *Salmonella* može da preživi u zemljištu oko 203 dana nakon njenog dospevanja. Kod zelene salate navodnjavane kontaminiranom vodom, u fazi ubiranja konstatovana je *E. coli* O157:H7, odnosno 30 dana nakon zalivanja i već posle 7 i 14 dana kod kontaminiranih biljaka uočen je značajan porast populacije *E. coli* O157:H7 (Solomon i sar. 2003).

Kvantitativni modeli procene rizika od korišćenja otpadne vode pokazuju razlike između biljaka, tako je kod zelene salate uočen veći rizik u odnosu na krastavac, brokoli

i kupus (Hamilton i sar., 2006). Vremenski interval između navodnjavanja i žetve takođe utiče na opstanka patogena na biljci. Ispitivanja u UK su pokazala da preko 50% proizvođača lisnatog povrća isporučuju povrće ne sačekavši ni 24 časa od poslednjeg navodnjavanja (Tyrell i sar. 2006).

Ispitivanja su vršena u različitim zemljama da bi se utvrdila lokalna rasprostranjenost patogenih mikroorganizama na povrću i voću (Beuchat, 2002). Patogeni, obuhvaćeni ovim ispitivanjima bili su: *Campylobacter* spp. (Kumar i sar., 2001; McMahon i Wilson, 2001; Thunberg i sar., 2002), *E. coli* O157:H7 (Little i sar., 1999; Soriano i sar., 2000; Zepeda-Lopez i sar., 1995), enterotoksigeni *S. aureus* (Johannessen i sar., 2002; Thunberg i sar., 2002), enterotoksigeni *B. cereus* (Thunberg i sar., 2002), *L. monocytogenes* (Johannessen i sar., 2002; Pingulkar i sar., 2001; Szabo i sar., 2000), *Salmonella* spp. (Sagoo i sar., 2001; Thunberg i sar., 2002; Viswanathan i Kaur, 2001), *Shigella* spp. (Little i sar., 1999; Soriano i sar., 2000), *Y. enterocolitica* (Odumeru i sar., 1997; Szabo i sar., 2000), *Cryptosporidium* spp. (Robertson i Gjerde, 2001), *C. cayetanensis* (Ortega i sar., 1997), *Giardia* spp. (Monge i Arias, 1996), *E. histolytica* (Monge i Arias, 1996), *Ascaris* spp. (Rude i sar., 1984). Udeo proizvoda koji su kontaminirani patogenima varira u odnosu na vrstu patogena i zemlju u kojoj je rađena studija (Beuchat, 1998).

Pojava patogena na proizvodima u razvijenim zemljama je generalno mala. Izveštaji pokazuju da od ukupno 1564 analiziranih uzorka povrća koji su uzeti iz supermarketa u Kanadi, *Campylobacter* spp. je detektovan u 1.6 - 3.3% uzoraka (Park i Sanders, 1992). Ispitivanja prisustva patogenih bakterija u različitim vrstama povrća koji potiču iz supermarketa u USA ukazuju na pojavu jednog enterotoksigenog *B. cereus* i jednog enterotoksigenog *S. aureus* u 40 uzoraka analiziranog povrća (Thunberg i sar., 2002). *L. monocytogenes* otkrivena je u 6 od ukupno 127 analiziranih uzoraka povrća (4.7%) dok *Salmonella* spp. i *Campylobacter* spp. nisu detektovani u ovim uzorcima. U državi Vašington, od ukupno 1000 uzoraka povrća koji su uzeti u supermarketima, *L. monocytogenes* je pronađena u 11.4% analiziranih uzoraka (Heisick i sar., 1989a, 1989b), dok kod 200 analiziranih uzoraka pečurki u Sietlu, *Campylobacter* spp. je detektovan u 1.5% uzoraka (Doyle i Schoeni, 1986). Od ukupno analiziranih 890 uzoraka svežeg povrća u Norveškoj, tri su bila pozitivna na prisustvo *L. monocytogenes*, a četiri na enterotoksigeni *S. aureus*, dok *Salmonella* i *E. coli* O157:H7

nisu pronađene u ispitivanim uzorcima (Johannessen i sar., 2002). Prisustvo *B. cereus* je detektovano u 17 od ukupno 81 (20.1%) analiziranog uzorka povrća u Japanu, ali enterotoksigenost u ovim uzorcima nije pronađena (Kaneko i sar., 1999). Takođe, u ovim uzorcima, *L. monocytogenes* nije detektovana. Vrste patogenih bakterija izolovanih iz različitih vrsta povrća su prikazane u Tabeli 5.

U zemljama u razvoju, zastupljenost patogena na povrću i voću je veća, tako, *L. monocytogenes* je detektovana u 7 od ukupno 66 analiziranih i detaljno opranih uzoraka svežih proizvoda koji potiču sa pijaca u Indiji (Pingulkar i sar., 2001), u 22% uzorka lisnatog povrća i 85% uzoraka klijanaca pasulja u Maleziji (Arumugaswamy i sar., 1994) u 7.8% uzorka povrća u Španiji (De Simon i sar., 1992). *S. aureus* je pronađen u 58.3%, a *Salmonella spp.* u 28.3% od ukupno 120 analizirana uzorka povrća i voća sa pijaca u Indiji (Viswanathan i Kaur, 2001).

Pri uzorkovanju 129 lisnatih povrtarskih biljaka u Brazilu, visoka brojnost fekalnih koliformnih bakterija je detektovana u 17% uzorka povrća, *Salmonella spp.* je pronađena u 3.1% uzorka (Takayanagui i sar., 2000). *Salmonella spp.* je detektovana u 68% od ukupno 120 uzoraka zelene salate i 72% od ukupno 89 uzoraka mirođije iz radnji u Italiji, kao i u 8.7% klijanaca pasulja u Tajlandu (Jerngklinchan i Saitanu, 1993). U svežim proizvodima u Kosta Riki dokazano je prisustvo *E. histolytica* u 2.5 do 6.2% uzoraka analiziranog povrća a *L. monocytogenes* u 20% od ukupno 50 analiziranih uzoraka salate kupusa (Monge i Arias, 1996).

U Hrvatskoj su vršena ispitivanja 229 uzoraka svežeg povrća od čega je 15 uzoraka bilo iz uvoza (Italija, Španija, Holandija, Austrija, Makedonija i BiH). Domaće povrće je bilo poreklom sa parcela iz regija u kojima je i uzorkovano. Rezultati su pokazali da je *S. enteritidis* bila izolovana iz poljski gajene zelene salate (Istra) koja je đubrena stajnjakom. U svim analiziranim uzorcima dokazano je prisustvo enterobakterija (kontaminacija 100%), enterokoke su dokazane kod 48% uzoraka, dok je *E. coli* izolovana iz 37% uzoraka lisnatog povrća, 25% uzoraka plodovitog povrća i 31% korenastog povrća. Ovo istraživanje nedvosmisleno ukazuje na veoma visok stepen kontaminacije povrća sa bakterijama indikatorima fekalnog zagađenja u maloprodajnim objektima u Republici Hrvatskoj (Pavić i sar., 2005).

Tabela 5. Primeri patogenih bakterija izolovanih sa svežeg povrća^a (Beuchat, 2002)

Patogen	Povrće	Država	Zastupljenost ^b	Reference
<i>Salmonella</i>	Klice pasulja	Tajland	30/344 (8.7%)	(Jerngklinchan and Saitanu, 1993)
	Listovi cvekle	Španija	4/52 (7.7%)	(Garcia-Villanova Ruiz et al., 1987)
	Kupus	Španija	7/41 (17.1%)	(Garcia-Villanova Ruiz et al., 1987)
	Karfiol	Holandija	1/13 (7.7%)	(Tamminga et al., 1978)
	Karfiol	Holandija	1/23 (4.5%)	(Garcia-Villanova Ruiz et al., 1987)
	Čili	Španija	2/26 (7.7%)	(Garcia-Villanova Ruiz et al., 1987)
	Korijander	Surinam	5/16 (31.3%)	(Tamminga et al., 1978)
	Endivija	Holandija	2/13 (1.5%)	(Tamminga et al., 1978)
	Morač	Holandija	2/26 (7.7%)	(Tamminga et al., 1978)
	Mladi luk	Italija	4/89 (71.9%)	(Ercolani, 1976)
	Zelena salata	Holandija	1/28 (3.6%)	(Tamminga et al., 1978)
	Zelena salata	Španija	2/28 (7.1%)	(Garcia-Villanova Ruiz et al., 1987)
	Peršun	Španija	1/23 (4.3%)	(Garcia-Villanova Ruiz et al., 1987)
	Spanać	Španija	2/38 (5.2%)	(Garcia-Villanova Ruiz et al., 1987)
Povrće	Egipat	2/250 (0.8%)	(Satchell et al., 1990)	
<i>Shigella</i>	Peršun	Egipat	1/250 (0.4%)	(Satchell et al., 1990)
	Salatno povrće	Egipat	3/250 (1.2%)	(Satchell et al., 1990)
<i>L. monocytogenes</i>	Klijanci pasulja	Malezija	6/7 (85%)	(Arumugaswamy et al., 1994)
	Kupus	Kanada	2/92 (2.2%)	(Schlech et al., 1983)
	Krastavac	Malezija	4/5 (80%)	(Arumugaswamy et al., 1994)
	Plavi patlidžan	USA	2/92 (2.2%)	(Heisick et al., 1989a)
	Zelena salata	Malezija	5/22 (22.7%)	(Arumugaswamy et al., 1994)
	Krompir	USA	19/70 (27.1%)	(Heisick et al., 1989a)
	Krompir	USA	28/132 (21.2%)	(Heisick et al., 1989b)
	Rotkvica	USA	25/68 (36.8%)	(Heisick et al., 1989a)
	Rotkvica	USA	19/132 (14.4%)	(Heisick et al., 1989b)
	Paradajz	Pakistan	2/15 (13.3%)	(Vahidy, 1992)
	Povrće	Italija	7/102 (6.9%)	(Al-Hindawi and Rished, 1979)
	Povrće	Španija	8/103 (7.8%)	(De Simon et al., 1992)
	Povrće	UK	4/64 (6.2%)	(MacGowan et al., 1994)
<i>E. coli</i> O157:H7	Kupus	Meksiko	1/4 (25.0%)	(Zepeda-Lopez et al., 1995)
	Celer	Meksiko	6/34 (17.6%)	(Zepeda-Lopez et al., 1995)
	Korijander	Meksiko	8/41 (19.5%)	(Zepeda-Lopez et al., 1995)
	Cress-salata	Meksiko	2/20 (20.0%)	(Zepeda-Lopez et al., 1995)
<i>Aeromonas</i>	Brokoli	USA	5/16 (31.3%)	(Callister and Agger., 1989)
	Celer	USA	10/20 (50%)	(Berrang et al., 1989)
	Zelena salata	USA	-	(Callister and Agger., 1989)
	Paprika	USA	-	(Callister and Agger., 1989)
	Spanać	USA	-	(Callister and Agger., 1989)

^aPodaci preuzeti od International Association of Food Protection.

^bBroj pozitivnih od ukupnog broja analiziranih uzoraka; procenat pozitivnih uzoraka.

Feachem i sar., (1983) su sumirali brojne studije o proučavanju preživljavanja patogenih mikroorganizama na površini povrća i voća. Bakterije, uključujući fekalne koliforme, *Salmonella spp.* i *Shigella spp.* obično preživljavaju manje od 15 dana na

površini biljaka, ciste *E. histolytica* manje od 2 dana, enterovirusi manje od 15 dana i jaja *A. lumbricoides* manje od 30 dana. U studiji Beuchat, (2002), detaljno je opisano preživljavanje patogenih mikroorganizama na površini povrća i voća posle žetve, uključujući uticaj biofilma na preživljavanje ovih mikroorganizama.

Kraće vreme preživljavanja patogenih mikroorganizama na usevima, u odnosu na vodu i zemljište, ogleda se u porastu izloženosti patogena sunčevom zračenju i samim tim isušivanju patogena na površini biljke. Istraživanja Armon i sar., (1994) i Bastos i Mara, (1995) ističu da je preživljavanje patogena na površini povrtnarskih biljaka, koje su navodnjavane vodom lošeg kvaliteta, slabo. Patogeni mikroorganizmi su sposobni da prežive i opstanu u zemljištu i da ponovo kontaminiraju povrtnarske biljke za vreme kišnih padavina (Bastos i Mara, 1995). *E. coli* O157:H7 preživljava na površini ubrane zelene salate do 15 dana kada se ona čuva na temperaturi od 4°C (Beuchat, 1999) i na površini ubranih svežih i zamrznutih jagoda najmanje 1 mesec (Knudsen i sar., 2001; Yu i sar., 2001).

Ispitivanja, koja se odnose na period preživljavanja *E. coli* O157:H7 na biljkama, su vršena u laboratorijskim i stakleničkim uslovima gajenja. Stine i sar., (2003) su ustanovili da ovaj patogen može da opstane duže od 2 nedelje na inokulisanoj površini dinje, a u uslovima veće vlažnosti period preživljavanja ovog patogena se povećava. Sadnice zelene salate, gajene na zemljištu navodnjavanom kontaminiranom vodom sa *E. coli* O157:H7, su imale znatno veću koncentraciju patogena čak i posle više dana gajenja (Wachtel i sar., 2002a). U sličnom ogledu koji je trajao 40 dana, biljke zelene salate su navodnjavane kontaminiranom vodom sa *E. coli* O157:H7 postupkom orošavanja. Nakon 20 dana od poslednjeg navodnjavanja, devet od 11 biljaka je bilo pozitivno na ovaj patogen (Solomon i sar., 2002). Eksperiment, gde su biljke zelene salate samo jedanput navodnjavane orošavanjem kontaminiranom vodom sa *E. coli* O157:H7 (10^4 CFU/ml vode) tokom gajenja (30 dana), je pokazao prisustvo ove bakterije u zelenoj salati u periodu žetve. Ibekwe i sar. (2004) su pomoću metode zasejavanja na hranljivim podlogama kao i real-time PCR metode ispitivali vreme opstanka *E. coli* O157:H7 u filosferi zelene salate navodnjavane kontaminiranom vodom (10^7 CFU/l) sistemom kap-po-kap. Rezultati njihovih istraživanja su pokazali da *E. coli* O157:H7 može da opstane duže od 12 dana u filosferi biljaka.

Islam i sar. (2004) su ustanovili da je mrkva, gajena u zemljištu nađubrenim sa *E. coli* O157:H7 kontaminiranim stajnjakom, bila pozitivna na ovaj patogen 84 dana nakon rasađivanja. Kod luka, ova bakterija je detektovana 49 dana nakon razvoja biljaka, ali u mnogo manjoj koncentraciji nego kod mrkve. Visoka koncentracija ćelija ovog patogena je detektovana u rizosfernom zemljištu oko biljaka luka i mrkve.

E. coli O157:H7 može da opstane na zelenoj salati i peršunu duže od 77 dana nakon rasađivanja u polju ukoliko su biljke tretirane sa kontaminiranim stajnjakom, kompostom ili vodom za navodnjavanje (Islam i sar., 2004).

S. enterica serotip *Thompson* kolonizuje i zahvata cele listove korijandera već 6 dana nakon inokulacije, a koncentracija ovog patogena na listovima u velikoj meri zavisi od temperature i relativne vlažnosti (Brandl i Mandrell, 2002). U poljskim uslovima gajenja, gde su biljke tretirane kompostom i vodom za navodnjavanje kontaminiranim sa *S. enterica* serotip *Typhimurium*, bakterija opstaje 63 dana na zelenoj salati i 231 dan na peršunu, a slični rezultati su dobijeni sa mrkvom i rotkvicom (Islam i sar., 2004). Natvig i sar., (2002) su detektovali *S. enterica Typhimurium* u listovima rukole posle 17 nedelja gajenja u zemljištu kontaminiranim stajnjakom.

Kada patogena bakterija dospe u zemljište, ono može postati rezervoar patogena ali treba imati u vidu veoma dinamične ekološki uslove u polju, stoga vreme preživljavanja *E. coli* O157:H7 u zemljištu i salati kao i procenu rizika treba bazirati pri definisanim uslovima gajenja u laboratoriji (Oliveira i sar., 2012).

2.4. Epidemije izazvane kontaminiranim biljkama

Broj registrovanih infekcija ukazuju na porast infekcije ljudi i bolesti izazvanih patogenim bakterijama koje su prisutne na svežem povrću i voću (Heaton i Jones, 2008; CDC, 2006c; Anon 2007; CDC 2006a).

Infekcije i bolesti kod ljudi zavise ne samo od vrste patogena koji su prisutni na kontaminiranom povrću i voću, već i od njegove infektivne doze (*Tabela 6*). Neki patogeni su ekstremno virulentni i samo nekoliko ćelija je dovoljno da bi došlo do pojave bolesti, dok su neki virulentni samo u većim dozama.

Na infektivnu dozu utiču mnogi faktori, kao što je zdravstveno stanje i starostna dob ljudi i posbno visoko rizična populacija su HIV pozitivne osobe, oboleli od kancera, trudne žene, starije osobe i deca (Gerba i sar., 1996).

Table 6. Infektivne doze nekih patogena koje izazivaju bolest zdravih ljudi

Mikroorganizam	Infektivna doza	Referenca
<i>Salmonella spp.</i>	10 ⁴ ćelija	D'Aoust <i>et al.</i> , 2001
<i>C. jejuni</i> .	<1000 ćelija	Nachamkin, 2001
<i>L. monocytogenes</i>	>100 ćelija/g*	Swaminathan, 2001
<i>E. coli</i> O157	4-20 (<50) CFU	Strachan <i>et al.</i> , 2001
<i>Y. enterocolitica</i>	>10 ⁴ CFU	Robins-Browne, 2001
Virus	1-10 virusnih čestica	Vasickova <i>et al.</i> , 2005
<i>Giardia lamblia</i>	10-100 cista	Smith & Grimason, 2003

*Broj u kontaminiranoj hrani odgovoran za pojavu obolenja

Brojne epidemije su povezane sa kontaminacijom povrća i voća (Beuchat, 2002; Long i sar., 2002; Seymour i Appleton, 2001). Epidemije izazvane *E. coli* O157:H7 u USA (Montana i Konektikat), zatim *S. sonnei* u Švedskoj i ostalim evropskim zemljama, u Kentakiju i Švedskoj su u vezi sa konzumiranjem zelene salate (Ackers i sar., 1998; Hilborn i sar., 1999; Nygard i sar., 2001). Paradajz je odgovoran za epidemije velikih razmera, izazvane infekcijama *Salmonella spp.* tokom 1990, 1993 i 1999 u USA (Cummings i sar., 2001; Hedberg i sar., 1999). *Salmonella spp.*, *E. coli* O157:H7, *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *Y. enterocolitica*, i *Shigella spp.* su bile uzrok bolesti izazvanih konzumiranjem kontaminiranih klica biljaka (Anonymous, 1999a, 1999b; Mahon i sar., 1997; Taormina i sar., 1999; Watanabe i sar., 1999). U epidemiji koja je povezana sa konzumiranjem rotkvice, kontaminirane sa, *E. coli* O157:H7 u Japanu je obolelo oko 10000 ljudi (Michino i sar., 1999). Krastavac, zelena salata, mladi luk, peršun, spanać, kokosov orah, korijander i celer kontaminirani sa patogenim bakterijama su takođe, bili uzroci pojave epidemija (Anonymous, 1999a; Anonymous, 2001; Campbell i sar., 2001; Dentinger i sar., 2001; Teoh i sar., 1997).

Zelena salata 'Iceberg' uvezena iz Španije tokom 2005. godine, prouzrokovala je infekciju potrošača sa *S. typhimurium* širom Velike Britanije i Finske. Ova bakterija je bila prisutna u otpadnoj vodi koja je korišćena za navodnjavanje zelene salate (Takkinen i sar. 2005). Infekcije sa *E. coli* O157:H7 u Švedskoj tokom 2005. godine su povezane sa zelenom salatnom navodnjavanom iz vodotoka kontaminiranog goveđim fecesom (Söderström i sar. 2005). Hilborn i sar. (1999) su epidemiju sa *E. coli* O157:H7

pripisali zelenoj salati navodnjavanoj vodom kontaminiranom sa polja koje je korišćeno za ispašu goveda. Epidemije u svetu i mikroorganizmi uzročnici epidemija u 2004., 2005. i 2006. godini, prikazani su u *Tabeli 7.*

Tabela 7. Epidemije izazvane kontaminiranim svežim proizvodima u periodu 2004 - 2006. godine (Heaton and Jones, 2008)

Mikroorganizam (uzročnik)	Usev	Broj inficiranih	Zemlja	Izvor kontaminacije
2004. godina				
S. Thompson	Rukola (<i>Eruca sativa</i>)	12	Norveška	Uvoz iz Italije
S. Newport	Zelena salata ‘Iceberg’	386	UK	?
Hepatitis A	Mladi luk	400	US	Loša higijena tokom žetve
2005. godina				
<i>E. coli</i> O157:H7	Zelena salata	120	Švedska	Tekuća voda (bujice)
<i>S. typhimurium</i>	Zelena salata	96	UK	Uvoz iz Španije
<i>S. typhimurium</i>	Zelena salata	56	Finska	Otpadna voda
S. Javiana	Paradajz	561	US	Post žetveno pranje
Norovirus	Malina	500	Danska	Uvoz iz Poljske
Norovirus	Malina	5	Francuska	Nepoznat uvoz
2006. godina				
<i>E. coli</i> O157:H7	Spanać	199	US	Voda za navodnjavanje
<i>E. coli</i> O157:H7	Zelena salata	77	US	?
<i>E. coli</i> O157:H7	Zelena salata	87	US	?
<i>S. typhimurium</i>	Paradajz	185	USA i Kanada	?
S. Newport	Paradajz	106	USA	?
Norovirus	Malina	43	Švedska	Uvoz iz Kine

U periodu april-maj 2000. godine u Kaliforniji, Vašingtonu, Nevadi, Novom Meksiku, Oregonu i Koloradu registrovana je epidemija uzrokovana *S. Poona* (47 obolelih). Uzrok epidemije su bile rebraste dinje uvezene iz Meksika, a ista bakterija je bila odgovorna za širu epidemiju iz perioda mart-maj 2002. godine u mnogim saveznm državama SAD i Kanadi. Kao i u prethodnoj epidemiji, uzrok je bio konzumiranje kontaminiranih rebrastih dinja iz Meksika (FAO/WHO, 2003b). Pojava salmoneloze se vezuje i sa mladim lukom, malinama, rotkvicama, zelenom salatam i lubenicama (Cooley i sar., 2003). *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* (*S. typhimurium*) je

humani patogen odgovoran za mnoge epidemije nastale konzumiranjem zelene salate, (Horby i sar., 2003). Pregled epidemija, gde su uzročnici bili patogene bakterije u periodu 2000 – 2007. godine prikazan je u *Tabeli 8*.

Tabela 8. Sveži proizvodi povezani sa epidemijama izazvanim sa Salmonella, Escherichia coli, Campylobacter u periodu 2000 - 2007. godine

Godina	Patogen	Povrće / Proizvod (Vektor)	Reference
2004	<i>S. Newport</i>	Zelena salata	Gillespie (2004)
2004	<i>S. Thompson</i>	Rukola (<i>Eruca sativa</i>)	Nygard et al. (2004)
2004	<i>S. Braenderup</i>	Paradajz	CDC (2005)
2004	<i>S. Javiana</i>	Paradajz	Anon (2005a)
2005	<i>S. typhimurium DT104</i>	Španska zelena salata	Takkinen et al. 2005
2005	<i>S. typhimurium DT104</i>	Zelena salata	Anon (2005a)
2005	<i>S. enteritidis</i>	Klijanci pasulja	Anon (2005b)
2006	<i>S. Newport</i>	Paradajz	Anon (2007)
2006	<i>S. Typhimurium</i>	Paradajz	CDC (2006a)
2007	<i>S. Senftenberg</i>	Bosiljak	Pezzoli et al. (2007)
2003	<i>E. coli O157:H7</i>	Krastavac	Duffell et al. (2003)
2003	<i>E. coli O157:H7</i>	Zelena salata	Anon (2005a)
2005	<i>E. coli O157:H7</i>	Zelena salata	Soderstrom et al. (2005)
2006	<i>E. coli O157:H7</i>	Spanać	CDC (2006b)
2006	<i>E. coli O157:H7</i>	Zelena salata	CDC (2006c)
2000	<i>C. jejuni</i>	Zelena salata	Anon (2005a)
2001	<i>C. jejuni</i>	Oranž đus	Anon (2005a)

2.5. Kolonizacija i mehanizmi biljno-mikrobne interakcije

Povrće i voće, kolonizuje velika grupa raznovrsnih mikroorganizama, kao što su bakterije, kvasci i gljive koji najčešće uzrokuju njihovo kvarenje (Lindow i Brandl, 2003). Humani patogeni mogu takođe dospeti do povrća i kolonizovati površinu biljaka, odnosno površinski se vezati npr. za rukolu i rotkvicu (Natvig i sar., 2002) zelenu salatu, peršun (Islam i sar., 2004a, 2004b). Transport humanih patogena u biljno tkivo je primećen kod različitih povrtarskih biljaka (Itoh i sar., 1998; Jablasone i sar., 2005; Solomon i sar., 2002; Wachtel i sar., 2002a, 2002b; Warriner i sar., 2003a, 2003b).

Solomon i sar. (2002) su, koristeći inokulum sa većom koncentracijom *E. coli* O157:H7 u kontaminiranoj vodi konstatovali prodiranje bakterije u vaskularni sistem zelene salate do jestivih delova biljke. Adherencija, (prijanjanje) prodiranje i transport

E. coli O157:H7 u jestive biljne delove zelene salate koja je gajena u zemljištu đubrenim sa kontaminiranim stajnjakom, prisustvo bakterija detektovano je metodom zasejavanja maceriranog biljnog tkiva na selektivne hranljive podloge, kao i primenom laser-skening-komfokalne (CLSM) i epifluorescentne mikroskopije, ali pouzdani podaci o broju bakterija unutar biljnog tkiva nisu dobijeni (Wachtel i sar., 2002a).

Ipak, najveći broj bakterija je vezan za koren, i nema velikih razlika između unutrašnje i površinske kontaminacije kada su ispitivanja bazirana na zasejavanju biljnog tkiva na selektivne hranljive podloge. Jablasone i sar., (2005) su pokazali da je moguć prodor *E. coli* O157:H7 i *S. typhimurium* u biljno tkivo. Oni su vršili površinsku sterilizaciju biljaka, a kvantifikaciju bakterija određivali zasejavanjem biljnog materijala na selektivne hranljive podloge. Pozitivni uzorci na prisustvo ovih bakterija su konstatovani 9 dana nakon inokulacije biljaka, ali je broj bakterija bio prilično mali, što je bilo blisko detekcionom limitu za ove bakterije.

Istraživanja Barak i sar., (2003) ukazuju da sojevi *S. enterica* mnogo lakše adheriraju na klicama lucerke od *E. coli* O157:H7. Istražujući odnos između *Salmonella spp.* iz vode i paradajza koji se gaji u hidroponskim uslovima, Guo i sar., (2002) su dokazali da posle izlaganja korena biljke vodi sa određenom koncentracijom *Salmonella spp.*, u roku od jednog dana, broj bakterija na hipokotilima, kotiledonima kao i u stablu biljke dostiže vrednosti od 3,01 CFU/log10 do 3,40 CFU/log10 po gramu.

Howard i Hutcheson, (2003), ukazuju da je bakterijska kolonizacija korena biljaka složen genetički proces i da bi *Pseudomonas fluorescens* kolonizirao koren biljke neophodno je prisustvo sekretornog sistema proteina tip III (TTSS). Smatra se da *Pseudomonas fluorescens* koristi TTSS sistem u cilju postizanja prednosti nad ostalim bakterijama iz rizosfere tako što translocira efektorske molekule u citoplazmu ćelija domaćina. Ova translokacija ima za posledicu lučenje nutritijenata u rizosferu. TTSS sistem je neophodan za rast brojnih bakterija koje egzistiraju na biljkama, pa tako i fitopatogene bakterije *Pseudomonas syringae*. Smatra se da, pored stimulacije lučenja nutritijenata, efektorski proteini TTSS sistema umanjuju i odbrambeni odgovor ćelija domaćina. Autori su kod *Salmonella enterica* dokazali da se eksprimiraju dva različita TTSS sistema koje kodiraju delovi njenog genoma odgovorni za patogenost označeni sa SPI1 i SPI2. TTSS funkcija koja je povezana sa SPI1 kodira invaziju ćelija domaćina, dok se SPI2 eksprimira nakon invazije ćelija domaćina. Zanimljivo je istaći da barem

jedan od izlučenih efektorskih proteina translociranih preko SPI1/TTSS sistema pokazuje homolognost sa izlučenim efektorskim proteinima mnogih fitopatogena.

Istraživanja, vršena tehnikama markiranja "green fluorescent protein" (GFP) i konfokalne mikroskopije (CLSM), daju jasniju sliku kolonizaciji biljnog tkiva koja može biti površinska i endofitna.

Površinska kolonizacija biljaka – Ispitivanja su pokazala razvoj *E. coli* O157:H7 (Wachtel i sar., 2002a), *S. enterica* (Charkowski i sar., 2002) i *L. monocytogenes* (Gorski i sar., 2004) na ivicama oštećene semene opne tokom klijanja semena. Adhezija humanih patogena za koren biljke u laboratorijskim uslovima je slična modelu biljno-asocijativnih bakterija (Romantschuk, 1992). Takođe je konstatovano da *S. enterica* obrazuje velike mikrokolonije (agregacije) na korenovim dlačicama lucerke u poređenju sa *E. coli* O157:H7 koja se uglavnom javlja sa pojedinačnim ćelijama ili mikrokolonijama (Charkowski i sar., 2002). Sledeći korak u adherenciji i autoagregaciji izražena je kod *S. enterica*. Smatra se da je autoagregacija bakterijskih ćelija povezana sa sintezom celuloznih fibrila, što je i dokazano kod *A. tumefaciens* i *R. leguminosarum* (Matthysse i sar., 1981; Smit i sar., 1987). Takođe, *S. enterica* ima sposobnost sinteze celuloznih fibrila (Zogaj i sar., 2001), ali njihova funkcija nije povezana sa bakterijskom adherencijom ili agregacijom u rizosferi.

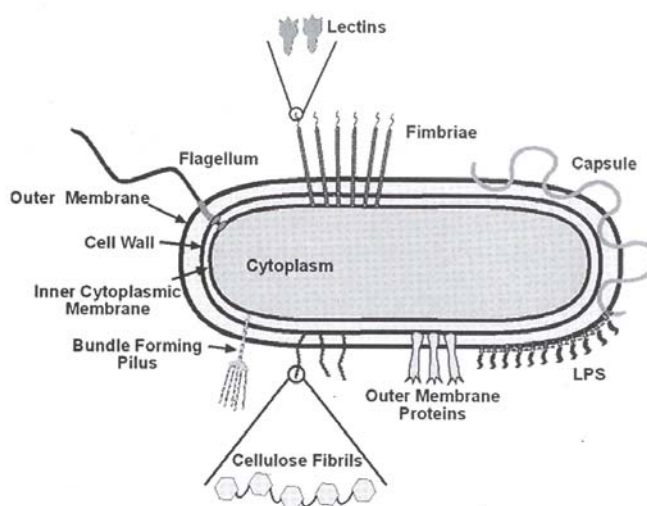
Istraživanja lokalizacije humanih patogena su vršena na biljkama koje su gajene u zemljištu i u laboratorijskim uslovima. Praćenjem kolonizacije korena *Arabidopsis thaliana* bakterijama *E. coli* O157:H7 i *S. enterica*. u laboratorijskim uslovima pokazano je da su bakterije bile koncentrisane oko vrhova korena i mestima grananja lateralnih korenova u ranom periodu razvoja biljke, a u kasnijem periodu biljnog razvoja, koren *Arabidopsis thaliana* je bio ravnomerno kolonizovan ovim bakterijama (Cooley i sar., 2003). Isti autori su inokulisali seme sa *S. enterica* mutantima koji su imali smanjen broj flagela i uočili da je kolonizacija bila znatno oslabljena, što ukazuje da pokretljivost ima važnu ulogu u kolonizaciji biljaka.

U eksperimentu gde su klijanci zelene salate gajeni u zemljištu koje je navodnjavano suspenzijom *E. coli* O157:H7, detektovano je njeno prisustvo na različitim delovima korena, uključujući i epidermalne ćelije (Wachtel i sar., 2002a).

Endofitna kolonizacija biljaka - Itoh i sar., (1998) su pomoću fluorescentne i skening-elektron mikroskopije (SEM) uspjeli da dokažu endofitnu kolonizaciju klica rotkvice sa bakterijom *E. coli* O157:H7 i na mikrografijama pokažu prisustvo bakterije u ksilemskim sudovima. Mikrografije dobijene konfokal laser skening mikroskopijom dokazuju sposobnost bakterije *S. enterica* serovar *Stanley* da dospe u unutrašnjost neoštećenih klica lucerke (Gandhi i sar., 2001).

Endofitna kolonizacija vaskularnog sistema klica pasulja sa *E. coli* i *S. enterica* je potvrđena posle površinske sterilizacije biljaka i *in situ* bojenjem (Warriner i sar., 2003b). Autori smatraju da bakterije dospevaju u biljku kroz pukotine u epidermisu ili napukline koje su rezultat izbijanja lateralnih korenova. Slične rezultate su dobili Dong i sar., (2003) proučavajući interakciju *E. coli* K-12, *K. pneumoniae* i različitih serotipova *S. enterica* sa sadnicama lucerke. Mikrografije, dobijene konfokalnom mikroskopijom, su pokazale da su mesta izbijanja lateralnih korenova bila najviše kolonizovana, a *K. pneumoniae* je bila najbolji endofitni kolonizator. Zapažene su i značajne razlike u endofitnoj kolonizaciji različitih serotipova *S. enterica*, što ukazuje na specifičnost soja za adheziju prema biljkama.

Proučavanje Warriner i sar., (2003b) su pokazala da bioluminiscentne ćelije *E. coli* mogu endofitno kolonizovati koren spanaća kada se biljke razvijaju iz inokulisanog semena u zemljištu, što upućuje da prodiranje bakterija u unutrašnjost nije isključivo *in vitro* fenomen, već da se može dešavati i kod gajenja na otvorenom polju.



Šema 2. Šematski prikaz određenih faktora adhezije kod bakterija (Nereus Gunther, U.S. Dep. of Agriculture, Agricultural Research Service, Wyndmoor)

Tabela 9. Glavni faktori vezivanja bakterija za biljku (K. Matthews, 2006)

Faktori vezivanja	Vrsta bakterije	Referenca
Afibrilarna adhezija	<i>R. leguminosarum</i>	Smit et al., 1989.
	<i>A. tumefaciens</i>	Swart et al., 1994.
	<i>Azospirillum brasilense</i>	Burdman et al., 2001.
	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	Rojas et al., 2002.
Celulozni fibrili	<i>R. leguminosarum</i>	Smit et al., 1987.
	<i>A. tumefaciens</i>	Matthysse et al., 1981.
Polisaharidi	<i>Azospirillum brasilense</i>	Del Gallo et al., 1989.
	<i>Azospirillum lipoferum</i>	Del Gallo et al., 1989.
	<i>A. tumefaciens</i>	Matthysse, 1987; Matthysse and McMahan, 2001
	<i>E. coli</i> 0157:H7 ^a	Hassan and Frank, 2004.
Bakterijski lektini	<i>B.japonicum</i>	Ho et al., 1990.; Loh et al., 1993.
	<i>R. leguminosarum</i>	Ausmees et al., 2001.
	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Sudakevitz et al., 2002.; Sudakevitz et al., 2004.
Fimbrie	<i>Tip I</i>	<i>K. pneumoniae</i> Hahtela et al., 1985.
		<i>Enterobacter agglomerans</i> Hahtela et al., 1985.
	<i>Tip III</i>	<i>K. mobilis</i> Korhonen et al., 1983.
	<i>Tip IV</i>	<i>X. vesicatoria</i> Ojanen-Reuhs et al., 1997.
Pili	<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	Hirano et al., 1996.; Hirano and Upper, 2000.;
	<i>P. fluorescens</i>	Vesper, 1987.
	<i>A. tumefaciens</i>	Gelvin, 2003.
Flagele	<i>Azospirillum brasilense</i>	Croes et al., 1993.
	<i>L. monocytogenes</i>	Gorski et al., 2003.

^aPredpostavljen factor vezivanja.

Humani patogeni, prisutni na biljkama, koriste mehanizme vezivanja slične onima kod biljno-asocijativnih bakterija. Sličnosti humanih patogena i biljno-asocijativnih bakterija u biohemijskom profilu spoljašnje površine bakterija i načinu adhezije mogu poslužiti kao osnova za fundamentalne studije o kolonizaciji biljaka patogenim bakterijama. Tipovi adhezije kod bakterija su predstavljeni na Šemi 2.

Humane patogene bakterije stvaraju strukturne adhezivne komponente koje imaju ulogu u pripajanju za ćeliju domaćina, kao i njihovoj patogeneosti i virulentnosti.

Adhezione komponente, fimbrije, pili i flagele, su najbolje okarakterisani faktori adhezije kod enterobakterija. One imaju značajnu ulogu u interakciji biljno-asocijativnih bakterija sa domaćinima. Pregled nekih faktora adhezije kod biljno-simbioznih i humanih patogenih bakterija dat je u *Tabeli 9*.

Značaj strukturnih adhezivnih komponenti u vezivanju enteropatogena za biljke još uvek nije potpuno razjašnjen. Dalja proučavanja bakterija, kao što su: *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.* i *Pseudomonas spp.* koje mogu kolonizovati i biljke i životinje, će svakako doprineti rasvetljavanju ovog pitanja.

Iako je elektronska mikroskopija često korišćena da se vizuelno uoči strukturna adhezija patogenih bakterija koje rastu u čistoj kulturi, ona se još uvek retko primenjuje za ispitivanja strukturnih faktora adhezije bakterija.

Transmisija bakterija kroz biljku - Guo i sar. (2001, 2002) su izveli niz eksperimenata sa *S. enterica* i paradajzom. U eksperimentu gde je paradajz inokulisan u fazi pre i posle početka cvetanja od ukupno 30 plodova paradajza, 11 je bilo pozitivno na prisustvo ovog patogena. Unutrašnji sadržaj ploda kod 6 od ukupno 11 plodova je bio kontaminiran *S. enterica*, što ukazuje na kretanje ovog patogena kroz biljku. Drugi eksperiment istih autora je bio fokusiran na usvajanja *S. enterica* u hidroponskim uslovima gajenja paradajza. Posle jednog dana izlaganja klijanaca kontaminiranom rastvoru, patogen je detektovan u hipokotilima, kotiledonima i stablima klijanaca paradajza. Nakon 9 dana, listovi, stabla, hipokotili i kotiledoni biljaka su imali visok broj *S. enterica*, što dokazuje sposobnost enterobakterija da budu prenete u biljke, pri uzgajanju biljaka u kontaminiranoj sredini.

Asocijacija *E. coli* O157:H7 sa zelenom salatom je istraživana od strane mnogih naučnika, kako zbog komercijalnog značaja salate, tako i zbog čestih epidemija uzrokovanih ovom bakterijom (Ackers i sar, 1998; Hilborn i sar., 1999).

Posle 10 dana gajenja zelene salate u zemljištu inokulisanom različitim koncentracijama *E. coli* O157:H7 (10^2 – 10^8 logCFU/ml), detektovana je visoka koncentracija bakterija u korenovima, hipokotilima i kotiledonima biljaka, bez obzira na primenjenu koncentraciju inokuluma (Wachtel i sar., 2002a). Konfokalna mikroskopija je pokazala vezanost bakterija za parenhimske ćelije oko stoma (ćelije koje regulišu otvaranje stoma), kao i prisustvo bakterija u sprovodnim sudovima hipokotila, što ukazuje na transmisiju bakterija kroz ksilemske sudove.

U eksperimenti sa klijanima zelene salate, koji su gajeni u zemljištu đubrenim sa *E. coli* O157:H7 kontaminiranim stajnjakom, nakon ubiranja, i površinske sterilizacija klijanaca sa HgCl_2 , mikrobiološka analiza je pokazala da su klijanci bili pozitivni na prisustvo *E. coli* O157:H7. Sličan ogled je vršen sa odraslim biljkama zelene salate koje su navodnjavane *E. coli* O157:H7 kontaminiranom vodom i đubrene *E. coli* O157:H7 kontaminiranom osokom, gde se vodilo računa da ove materije (voda i osoka) dospeju direktno na korenov sistem biljaka, nakon 5 dana od navodnjavanja i đubrenja, bakterije su detektovane u listovima zelene salate. Ova ispitivanja potvrđuju transport ćelije *E. coli* O157:H7 kroz korenov sistem u unutrašnjost biljke i putem ksilemskih sudova do lista biljke, odnosno njenog jestivog dela (Solomon i sar., 2002).

3. CILJ

Mikrobiološki kvalitet vode za navodnjavanje ima veliki značaj u proizvodnji zdravstveno bezbedne hrane, imajući u vidu da je navodnjavanje okarakterisano kao jedan od izvora patogenih mikroorganizama odgovornih za neke bolesti.

U Srbiji postoji veoma malo podataka o mikrobiološkom kvalitetu voda za navodnjavanje, a problemu zagađenih, odnosno mikrobiološki kontaminiranih voda, se ne poklanja dovoljno pažnje. Poseban problem predstavlja nepostojanje standarda o mikrobiološkom kvalitetu voda koje se koriste za navodnjavanje, što doprinosi riziku u proizvodnji zdravstveno bezbedne hrane.

Cilj ove doktorske disertacije je ispitivanje kvaliteta voda za navodnjavanje, kao i onih voda koje se potencijalno mogu koristiti za navodnjavanje, na nekoliko različitih lokacija u Srbiji i primenom različitih metoda za detekciju prisustva koliformnih bakterija. Takođe, cilj disertacije je i identifikacija patogenih bakterija u vodama i stvaranje kolekcije ovih mikroorganizama.

Voće i povrće, koje se uglavnom konzumira u svežem stanju, može se kontaminirati u lancu proizvodnje hrane od različitih izvora, a cilj ove disertacije je ispitivanje prenošenja patogenih bakterija iz vode za navodnjavanje do biljke u laboratorijskim uslovima. Cilj je da se detekcija patogenih mikroorganizama i transport patogena iz vode do biljke izvrši PCR metodom i metodom 3D Konfokal laser skening mikroskopije (CLSM).

Jedan od ciljeva disertacije je i praćenje površinske i endofitne kolonizacije korena različitih vrsta biljaka sa različitim bakterijama (*Salmonella enterica* serotip *typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Ochrobactrum anthropi*, *Roseomonas spp.*, *Herbaspirillum frisingense*) u laboratorijskim uslovima u "monoxenic" modelu sistema gajenja (jedna biljna vrsta-jedan soj bakterije). Jedan od ciljeva je bio primena Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) metode detekcije bakterija u biljnom tkivu. Cilj je bio da se ispita kolonizacija kod zelene salate (*Lactuca sativa*), spanaća (*Spinacia oleracea*), peršuna (*Petroselinum crispum*), mrkva (*Daucus carota* subsp. *sativus*); celera (*Apium graveolens*), paradajza (*Lycopersicon esculentum*), i kukuruza šećeraca (*Zea mays* var. *saccharata*).

4. MATERIJAL I METOD

Istraživanja u ovom radu, su obavljena u laboratoriji Katedre za ekološku mikrobiologiju, Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Jedan deo eksperimentalnih istraživanja je realizovan u mikrobiološkim laboratorijama School of Biological Sciences, University of Reading, UK i laboratorijama Research Unit Microbe-Plant Interactions, German Research Center for Environmental Health (GmbH), Helmholtz Zentrum Munchen, Nemačka. Takođe, deo mikrobioloških analiza obavljen je u Zavodu za zaštitu zdravlja "Timok" u Zaječaru.

4.1. Određivanje broja i identifikacija patogenih bakterija u vodi

Voda za mikrobiološke analize je uzorkovana sa četiri lokaliteta: Ogledno školsko dobro u Radmilovcu, meliracioni kanal u Surčinu, melioracioni kanal u Negotinu i kanali sliva Galovice u Sremu. Uzorci su uzeti aseptično, a uzorkovanje je vršeno tokom 2005; 2006; 2007; 2008 i 2009 godine.

O.Š.D. Radmilovac - Ogledno školsko dobro "Radmilovac" u sklopu Poljoprivrednog fakulteta, locirano je 8 km severo-istočno od Beograda. Ukupna površina oglednog dobra iznosi oko 86 ha od kojih je 30 ha pod usevom žitarica, povrća, voća i vinograda. Na ovom oglednom dobru postoje četiri prirodna vodotoka koja bi se potencijalno mogla koristiti za navodnjavanje



Slika 1. Satelitski snimak O.Š.D. Radmilovac

Voda je uzorkovana iz: vodotoka "Šugavac" na mestima gde voda ulazi u dobro i gde izlazi (gornji i donji deo), zatim dva otvorena bunara (OB1 i OB2), zatvorenog bunara (ZB), javne česme (JC) i pet pijezometra (P2, P3, P4, P5 i P6) (*Sl. 1*).

Površinske vode su uzorkovane u periodu proleća, leta i jeseni 2005 i 2006 godine, a podzemne vode iz pijezometra P6 uzorkovane su 23.07.2006., jer u ostalim terminima (28.08., 24.10. i 07.12. 2006) u njemu nije bilo vode. Mesta, uzorkovanja su prikazana su na *Slici 2*.



Slika 2. Mesta gde su vršena uzorkovanja vode na lokaciji Radmilovca

Određivanje broja i identifikacija bakterija - Broj ukupnih i fekalnih koliformnih bakterija u vodi određen je MPN metodom uz korišćenje McCrady-evih statističkih tablica radi interpretacije rezultata i dobijanja najverovatnijeg broja bakterija.

Uzorci vode su uzeti u sterilne posude, i to na način da se dobije kompozitni (reprezentativni) uzorak čija je zapremina iznosila oko 200 ml. U cilju predobogaćenja, 20 ml uzorka vode je aseptično dodato u 180 ml puferisane peptonske vode (Torlak, Srbija) i homogenizovano na orbitalnom šejkeru 30 minuta na temperaturi 37°C. Sterilnom pipetom je uzet 1ml uzorka vode i napremljena je serija razređenja 10^{-1} – 10^{-6} u puferisanoj peptonskoj vodi. Uzet je po 1ml svakog razređenja i aseptično odpipetiran u epruvete sa po 10ml MacConkey bujona (Merck, Germany) u 3 ponavljanja. Epruvete su inkubirane na 37°C tokom 24^h za ukupne koliformne i na 44°C tokom 24^h za fekalne koliformne bakterije. Epruvete koje su pokazale promenu boje od purpurne do žuto-mrke boje (zemljane boje) su uzete kao pozitivne. Broj pozitivnih epruveta za svako razređenje je obračunat pomoću McCrady-evih tablica da bi se dobio broj bakterija u 1ml uzorka vode. Broj koliformnih bakterija obračunat na 100ml i izražen kao CFU/100ml uzorka vode.

MacConkey bujon (MacConkey, 1908.)	
Peptone from gelatine	20.0 g
Lactose	10.0 g
ox bile, dried	5.0 g
bromocresol purple	0.01 g
Destilovana voda	1000 ml
pH: 7.3 ± 0.2 na 25 °C.	

Zasejavanje je vršeno i na visoko-selektivne i specifične hranljive podloge.

Za izolaciju i diferencijaciju *E. coli* i drugih laktoza-fermentujućih od laktoza-nefermentujućih enterobakterija, korišćen je Eosin Methylene Blue Agar (EMB Agar) (Biomérieux, France). Zasejane ploče sa podlogom su inkubirane na 37°C tokom 24^h. Kolonije prečnika 2-3 mm, zeleno-metalik boje, koje odbijaju svetlost i imaju tamno purpurni centar koji propušta svetlost su procenjene kao *E. coli*.

m-Aeromonas Selective Agar Base (Havelaar et al., 1987)	
Tryptose	5.0 g
Dextrin	11.4 g
yeast extract	2.0 g
sodium chloride	3.0 g
potassium chloride	2.0 g
magnesium sulfate	0.1 g
Iron chloride	0.06 g
Bromothymolblue	0.08 g
sodium desoxycholate	0.1 g
agar-agar	13.0 g
Destilovana voda	1000 ml
pH: 8.0 ± 0.2 na 25°C	

Autoklavira se na 121°C u trajanju 15 min.

Eosin Methylene Blue Agar (Levin, 1921.)	
Peptones	10.0 g
di-potassium hydrogen phosphate	2.0 g
Lactose	5.0 g
Sucrose	5.0 g
eosin Y, yellowish	0.4 g
methylene blue	0.07 g
agar-agar	13.5 g
Destilovana voda	1000 ml
pH: 7.1 ± 0.2 na 25°C	

Autoklavira se na 121°C u trajanju 15 min.

Salmonella Shigella Agar	
Peptones	10.0 g
Lactose	10.0 g
ox bile	8.5 g
sodium citrate	10.0 g
sodium thiosulfate	8.5 g
ammonium iron (III) citrate	1.0 g
brilliant green	0.0003 g
neutral red	0.025 g
agar-agar	12.0 g
Destilovana voda	1000 ml
pH: 7.0 ± 0.2 na 25°C .	

Ne aut oklavira se.

Selenit Bujon (Leifson, 1936)	
Peptone from meat	5.0 g
lactose	4.0 g
sodium selenite	4.0 g
di-potassium hydrogen phosphate	3,5 g
potassium dihydrogen phosphate	6.5 g
Destilovana voda	1000 ml
pH: 7.0 ± 0.2 na 25°C	

Ne autoklavira se.

Detekcija i izolacija *Salmonella spp.* i *Shigella spp.* je vršena obogaćenjem u Selenite Broth (Biomerieux, France). Epruvete sa 10 ml Selenite Broth su zasejane sa 1ml inokuluma i prvo inkubirane na 35°C tokom 18-24^h. Iz epruveta sa zamućenim bujonom je ezom zasejan inokulum na ploče sa Salmonella/Shigella Agarom (SS Agar) (Biomerieux, France). Zasejane petri-kutije su inkubirane 24^h na temperaturi 35°C . Bezbojne kolonije sa crnim centrom (H_2S^+) su tipične za *Salmonella spp.*

Ispitivanje prisustva *Aeromonas spp.* je vršeno zasejavanjem na visoko-selektivnoj hranjivoj podlozi m-Aeromonas Selective Agar Base (Merck, Germany) uz dodatak podlozi m-Aeromonas Selective Supplement (Merck, Germany). Zasejane petri-kutije su inkubirane na $30-35^\circ\text{C}$ tokom 24^h. Na ovoj podlozi *Aeromonas spp.* obrazuje kolonije žute boje, veličine 0.5-1.5mm u prečniku.

Bakterije sa karakterističnim kolonijama su izolovane, a njihove čiste kulture su dobijene metodom iscrpljivanja.

Identifikacija je vršena na osnovu morfoloških karakteristika kolonija, ćelija, ekoloških i biohemijskih osobina i dalje identifikacija pomoću API 20E i API-WEB (Biomerieux, France).

Melioracioni kanal u Surčinu - Melioracioni kanal u Surčinu se jednim svojim delom nalazi u sklopu komercijalnog poljoprivrednog gazdinstva "Salat Centar" specijalizovanog za gajenje povrća. Ovaj kanal je lociran oko 10km severno od Beograda. Voda iz dela kanala, koji protiče kroz gazdinstvo "Salat Centar" (Slika 3), je tokom trogodišnjeg oglada korišćena za navodnjavanje oglednih biljaka krompira.



Slika 3. Deo melioracionog kanala u Surčinu koji protiče kroz "Salat Centar"

Uzorci vode za mikrobiološke analize uzimani su tokom vegetacionog perioda 2006, 2007 i 2008. godine. Voda je uzorkovana u periodima pre navodnjavanja biljaka, za vreme navodnjavanja i u periodu ubiranja useva. U vodi ovog kanala je ispitivano prisustvo i brojnost koliformnih bakterija i *E. coli*.

Određivanje broja i identifikacija bakterija – Broj koliformnih bakterija i *E. coli* je određen indirektnom metodom, zasejavanjem na visoko-selektivnoj hromogenoj hranljivoj podlozi Selective-*E. coli*/coliform-chromogenic-medium (CM1046) (Oxoid, Hampshire, UK). Po specifikaciji proizvođača, ova podloga se koristi za detekciju i određivanje broja *Escherichia coli* i drugih koliformnih bakterija u uzorcima hrane i vode. Detekcioni limit podloge za broj koliformnih bakterija i *E. coli* iznosi 1 CFU/ml.

MacConkey agar (MacConkey, 1905.)

Peptone from gelatine	17.0 g
peptone from casein	1.5 g
peptone from meat	1.5 g
sodium chloride	5.0 g
lactose	10.0 g
bile salt mixture	1.5 g
neutral red	0.03 g
crystal violet	0.001 g
agar-agar	13.5 g
Destilovana voda	1000 ml
pH: 7.1 ± 0.2 na 25 °C.	

Autoklavira se na 121°C u trajanju 15 min.

Selective *E.coli*/coliform chromogenic medium
(Kilian and Bulow, 1979)

Pepton	8.0 g
Di-sodium hydrogen phosphate	2.2 g
Sodium chloride	5.0 g
Potassium di-hydrogen phosphate	1.8 g
Sodium lauryl sulphate	0.1 g
Chromogenic mix	0.35 g
Agar	10.6 g
Destilovana voda	1000 ml
pH 6.7 ± 0.2	

Ne autoklavira se.

Voda za bakteriološke analize je uzrta u zapremini od 1000ml. Kompozitni uzorak vode je sadržao tri sub-uzorka (pojedinačna uzorka) koji su uzeti tri puta tokom dana (8^h, 10^h i 12^h) u cilju izbjegavanja dnevnih vremenskih varijacija. Tokom uzorkovanja, sud je potopljen 20–30 cm ispod površine vode i onda je sa njega skinut poklopac da se napuni vodom. Ovo je urađeno u cilju dobijanja reprezentativnog uzorka. Uzorci su čuvani na 4°C u mraku radi sprečavanja uticaj sunčeve svetlosti i visokih temperatura na njih. Istog dana su transportovani u laboratoriju i urađena je mikrobiološka analiza.

Uzorci vode su homogenizovani, (mućkanjem 10 puta) u sudu. Sterilnom pipetom je uzet 1ml uzorka (razređenje 10⁰) i zasejan na Selective-*E.coli*/coliform-chromogenic-medium. Nakon toga je 20ml uzorka vode dodato u 180 ml pufervisane peptonske vode (Peptone Saline Diluent CM0733, Oxoid, Hampshire, UK) i homogenizovano na orbitalnom šejkeru 30 minuta na 37°C. Zatim je uzet 1 ml homogenizovanog uzorka i napremljena serija razređenja 10⁻¹–10⁻⁷ u pufervisanoj peptonskoj vodi (Peptone Saline Diluent CM0733, Oxoid, Hampshire, UK). Iz svakog razređenja je po 1ml inokuluma zasejan u petri-kutiju sa podlogom u tri ponavljanja. Inkubacija je vršena na 37°C 24 časa. Nakon inkubacije, određen je broj tamno-ljubičastih do indigo-plavih kolonije koje su procenjene kao *E. coli* i broj roze (pink) kolonija, koje su procenjene kao koliformne bakterije. Broj bakterija je izražen kao CFU/ml uzorka vode. Broj ukupnih koliformnih bakterija je određen kao suma *E. coli* i koliformnih bakterija (suma ljubičastih i pink kolonija).

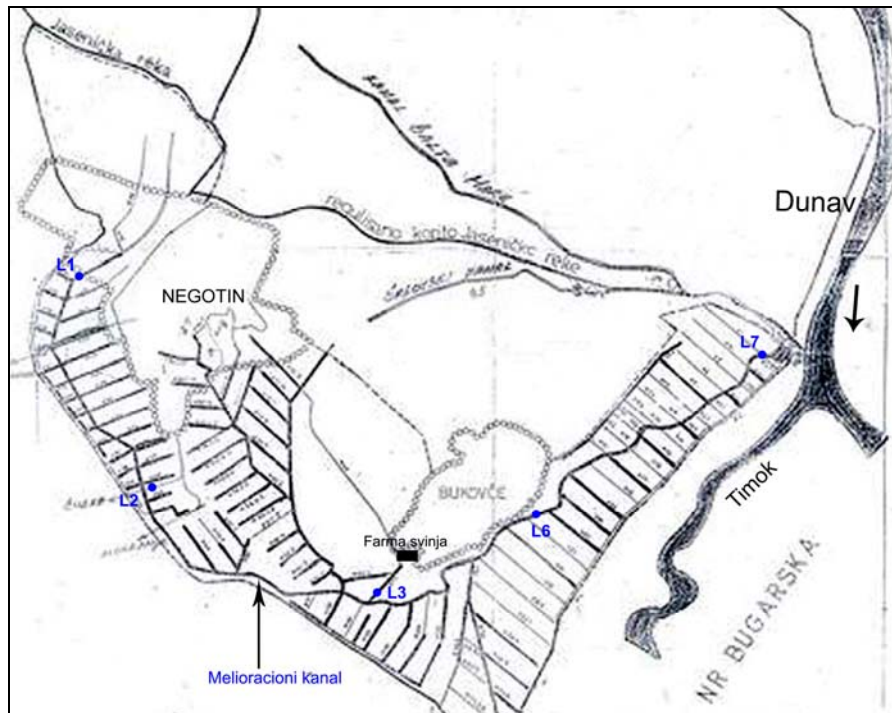
Prisutvo patogenih bakterija u kanalskoj vodi praćeno je na selektivnim hranljive podloge, McConkey Agar (Merck, Germany), EMB Agar (Biomerieux, France) i m-Aeromonas Selective Agar Base (Merck, Germany) uz dodatak podlozi m-Aeromonas Selective Supplement (Merck, Germany). Inkubacija je trajala 24^h na 37°C i 30°C i 35°C. Karakteristične i morfološki različite kolonije bakterija su izolovane i metodom iscrpljivanja su dobijene njihove čiste kulture. Određene su morfološke, ekološke i biohemijske osobine, a pomoću API 20E i API-WEB su potvrđene do roda ili vrste.

Melioracioni kanal u Negotinu - Melioracioni kanal opštine Negotin predviđen je za odvodnjavanje viška vode sa močvarnog područja negotinske nizije. Površina ovog područja iznosi 6900ha, a pokriva područje grada Negotina i sela Miloševa, Kobišnice, Bukovča i Srbova. Dužina ovog kanala iznosi 22.290m.

U melioracioni kanal se direktno ulivaju atmosferske i kanalizacione otpadne vode grada Negotina i otpadne vode sa farme svinja u Kobišnici. Činjenica da sela kroz koja prolazi ovaj kanal nemaju kanalizacioni sistem, otpadne i kanalizacione vode iz domaćinstava takođe dospevaju u kanal. Sve ove otpadne vode se ulivaju u melioracioni kanal bez predhodnog tretmana iako od 1989. godine postoji postrojenje za prečišćavanje otpadnih voda, ali je rad postrojenja iste godine i obustavljen zbog oštećenja opreme.

Voda melioracionog kanala u Negotinu je uzorkovana na šest lokaliteta: Miloševo - početak melioracionog kanala (L1), Negotin - mesto izlivanja gradske kanalizacije (L2), *Kobišnica* – mesto izlivanja otpadnih voda sa farme svinja (L3), *Kobišnica* - meliracioni kanal posle svih zagađivača, oko 100m nizvodno od farme svinja (L6), *Srbovo* - mesto neposrednog ulivanja kanala u Dunav (U7) (*Slike 4 i 5*).

Uzorkovanje je vršeno mesečno od oktobra 2007. do marta 2008 godine.



Slika 4. Karta melioracionog kanala područja negotinske nizije



Slika 5. Lokacije melioracionog kanala u Negotinu gde je uzorkovana voda

Određivanje broja i identifikacija bakterija – Broj ukupnih koliformnih bakterija je određen MPN metodom. Voda je uzorkovana aseptično i kompozitni uzorak je zapremine 500ml. Uzorci su čuvani na 4°C do transportovanja.

U laboratoriji je uzorak promućkan 10 puta u sudu za uzorke i 20ml uzorka vode aseptično dodato u 180ml puferisane peptonske vode (Torlak, Srbija) i homogenizovano na orbitalnom šejkeru 30 minuta na temperaturi 37°C. Pripremljena je serija razređenja od 10^{-1} do 10^{-6} . Po 1ml inokuluma iz svakog razređenja je zasejavan u epruvete sa po 10 ml 0,5% Laktoza-Andrade-Peptonske vode (Torlak, Beograd) sa Durham-ovim cevčicama. Zasejavanje je obavljeno u pet ponavljanja, a inkubacija je vršena na 37 °C 24^h. Zasejane epruvete u kojima je došlo do promene boje podloge (iz roze u žutu) i stvaranja gasa (mehurići u Durham-ovim cevčicama) su procenjene kao pozitivne i obračunate pomoću McCrady-jevih tablica. Broj ukupnih koliformnih bakterija je izražen kao CFU/100ml uzorkovane vode.

Za utvrđivanje prisustva *E. coli*, inokulum je iz homogenizovanog uzorka vode ezom zasejan na EMB Agar (Biomerieux, France). Inkubacija je vršena na 37°C 24^h.

Laktoza Andrade Peptonska Voda (Forbes et al., 1998)	
Pepton – 4 "Torlak"	10.0 g
Laktoza	10.0 g
NaCl	5.0 g
Fuksin S	0.01 g
Destilovana voda	1000 ml
pH 7.4 ± 0.2	

Autoklavira se na 121°C u trajanju 15 min.

Ispitivanje prisustva *Salmonella spp.* i *Shigella spp.* je vršeno zasejavanjem na Selenite Broth (Merck, Germany), a iz pozitivnih epruveta na SS Agar (Merck, Germany). Takođe, za detekciju *Salmonella spp.* korišćena je i visoko specifična hromogena podloga ChromID™ *Salmonella* Agar (SM2) (Biomerieux, France). Ova podloga sadrži hromogeni substrat i optimizovana je za selektivnu izolaciju i detekciju većine laktoza⁺ sojeva *Salmonella spp.* Kolonije *Salmonella spp.* na ovoj podlozi su krupne, blede-roze do prljavo-roze boje, dok su ostali mikroorganizmi inhibirani ili daju bezbojne i blede-plave kolonije. Inkubacija traje 18–24^h na temperaturi 35°C.

ChromID™ O157:H7 Agar (O157 H7 ID-F) (Martin et al., 1999)	
Gelatin peptone (bovine or porcine)	5.50 g
Yeast extract	6.00 g
Sodium chloride	5.00 g
Sodium carbonate	0.13 g
Neutral red	0.01 g
Sodium deoxycholate (bovine)	1.50 g
Mixture of carbohydrates (bovine)	24.00 g
Mixture of activators	0.25 g
Mixture of chromogenic substrates	0.25 g
Agar	12.50 g
Purified water	1000 ml
pH: 7.1 na 25 °C	

Ne autoklavira se.

ChromID™ Salmonella Agar (SM2) (Pignato et al., 1995)	
Peptones (porcine or bovine)	6.25 g
Tris	0.16 g
Lactose (bovine)	6.00 g
Bile salts (bovine or ovine)	1.50 g
Chromogenic mixture	9.63 g
NaCl	5.00 g
Selective mixture	0.03 g
Agar	14.00 g
Purified water	1000 ml
pH: 7.3 na 25 °C	

Ne autoklavira se.

Detekcija i izolacija *E. coli* O157:H7 je vršena pomoću visoko-selektivne hromogene podloge ChromID™ O157:H7 Agar (O157 H7 ID-F) (Biomerieux, France). Ova podloga je u saglasnosti sa USDA, BAM i ISO 16654 standardima i omogućava detekciju i preliminarnu (prvu) identifikaciju *E. coli* O157:H7 u uzorcima hrane i vode. Na ovoj hranljivoj podlozi *E. coli* O157:H7 obrazuje tipične zelene kolonije. Inkubacija traje 24^h na temperaturi 37° C.

Tipične kolonije bakterija, procenjene kao *E. coli*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* i *E. coli* O157:H7 su izolovane i njihove čiste kulture su dobijene metodom iscrpljivanja. Ovi sojevi bakterija su dalje identifikovani na osnovu morfoloških, ekoloških i biohemijskih osobina i potvrđeni pomoću API 20E i API-WEB (Biomerieux, France). Izolovani sojevi *E. coli* O157:H7 su potvrđeni pomoću latex agglutination kit-a (Oxoid, England).

Kanali sliva "Donje polje" i kanal "Galovica" - Sliv Galovica obuhvata kanalsku mrežu čija ukupna dužina iznosi 1 444.732 km, dok dužina samog kanala Galovica iznosi 46.888 m. Ova kanalska mreža, posebno u delu jugo-istočnog Srema, ima ulogu da evakuše suvišnu površinsku i podzemnu vodu, a sa druge strane veliki deo ovih kanala se koriste za navodnjavanje u letnjem periodu, kao npr. kanali sliva Petrac.

Tokom 2008 i 2009 godine, uzorkovana je tekuća voda iz kanala, stajaća voda iz akumulacije i podzemna voda iz pijezometra (*Slike 6 i 7*) na lokacijama:

1. kanal 2-3 – lokacija kod C.S. "Donje polje"
2. kanal "Petrac 1" - lokacija blizu C.S. "Donje polje"
3. kanala "Petrac 1" - lokacija kod C.S. "Petrac"
4. kanal "Petrac 3" - lokacija blizu C.S. "Novi Fenek"
5. kanal Galovica – lokacija ispod naselja Surčin
6. kanal "Galovica" - lokacija kod C.S. "Galovica"
7. kanal "Petrac 4" – lokacija kod C.S. "Novi Fenek"
8. akumulacija S.R.C. "Surčin" – lokacija naselje Surčin
9. pijezometar LP 107 – lokacija neposredno pored kanala "Petrac 1" u blizini obilaznice autoputa kroz Beograda.

Kanal 2-3 – se nalazi pored same C.S. "Donje polje" i njime voda dospeva u ovu crpnu stanicu. Voda ovog kanala se koristi za navodnjavanje površina koje pripadaju gazdinstvu PKB Beograd koje su locirane u neposrednoj blizini.

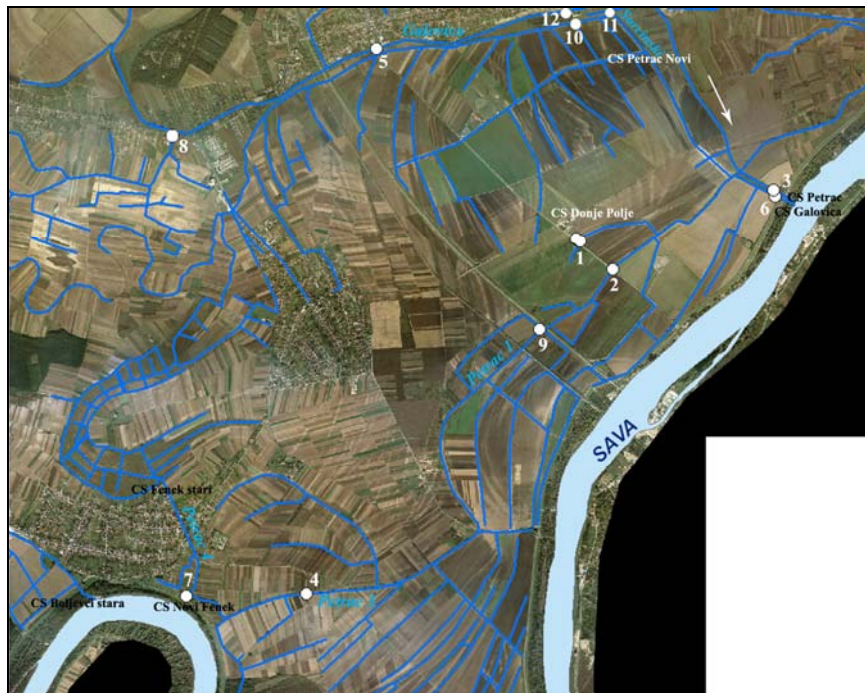
Sliv kanala Petrac (kanali Petrac 1, Petrac 3, Petrac 4) – nalazi se na površini od oko 10.000 ha i prostire se uz obalu reke Save od koje je zaštićen nasipom. Vode u kanalima ovog sliva su u velikoj meri pod uticajem vodnog režima reke Save. Na ovoj lokaciji se nalazi kanal Petrac (obuhvata kanale Petrac 1, Petrac 2, Petrac 3, Petrac 4), C.S. "Petrac" kao i bunari beogradskog vodovoda. Kanal Petrac ima dužinu od 22.496m i prostire se severnim delom poteza Zidina, zatim ide paralelno sa savskim nasipom (udaljen oko 600m ispod sela Bežanija) sve do C.S. "Petrac". Njegova uloga je da sakuplja vodu iz fenečke bare, a u letnjem periodu se koristi za navodnjavanje.

Sliv kanala Petrac je podeljen na dva dela, prvi deo obuhvata kanale Petrac 1 i Petrac 2, a drugi deo kanali Petrac 3 i Petrac 4. Kanali slivova Petrac 1 i Petrac 2 su usmereni prema C.S. Petrac, dok su kanali slivova Petrac 3 i Petrac 4, kao i vode iz fenečke bare usmereni prema C.S. Novi Fenek.

Sliv kanala Petrac 1 obuhvata 41 kanal čija je ukupna dužina 63.221m, dok dužina samog kanala Petrac 1 iznosi 8.148m. U ovaj kanal se uliva kanal Petrac 2 na lokaciji Donje Polje u Surčinu. Kanal Petrac 2 obuhvata 24 kanala čija ukupna dužina iznosi 18.736m, a sam kanal ima dužinu 3.569m. Voda kanala Petrac 1 je usmerena prema C.S. "Petrac" koja je locirana na 12-om km savskog nasipa i ima dva uliva i dva

crpna bazena iz kojih je uzorkovana voda. Deo vode poreklom iz fenečke bare odlazi u kanal Petrac 4 iz koga ide u Petrac 3 i dalje u kanal Petrac 1 i sa vodom iz tih slivova dospeva na C.S. Petrac.

Ovom slivu pripada i surčinski kanal u dužini od 5.620 m. U ovaj kanal se uliva voda kanala Petrac 1 na lokaciji Donje Polje i voda surčinskog kanala ide direktno na C.S. Petrac.



Slika 6. Karta kanalske mreže sliva Donje Polje

U kanal Petrac 3 se uliva kanal Petrac 4. Voda kanala Petrac 3, kao i deo vode iz fenečke bare su usmereni prema C.S. "Novi Fenek" koja se nalazi na levoj obali reke Save na 33-em km savskog nasipa blizu naselja Boljevci. Sliv C.S. "Novi Fenek" obuhvata 28 kanala čija je ukupna dužina 37km. Ova crpna stanica se koristi za odvodnjavanje 2.315ha i navodnjavanje 3.639ha zemljišta (navodnjava se 1.260ha u slivu Fenek i 2.379ha u slivu Zidina). Takođe, koristi se i za ubacivanje savske vode u kanale radi navodnjavanja.

Kanal Galovica – dovodi vodu do C.S. "Galovica" koja se nalazi na 12-om km savskog nasipa, a udaljena je oko 65 m nizvodno od C.S. "Petrac". Sastoji se iz dovodnog kanala, izlivnog bazena i odvodnog kanala iz kojih je uzorkovana voda za

mikrobiološke analize. Kanali Galovica i Petrac 1 idu paralelno, sa međusobnim rastojanjem od 65m, do crpnih stanica, a spojeni su posebnim spojnim kanalom sa ustavom za upuštanje i ispuštanje vode.

Akumulacija S.R.C. "Surčin" – se nalazi u naselju Surčin i voda ove akumulacije se koristi u rekreacione svrhe.

Pijezometar LP 107 - je lociran neposredno pored kanala Petrac 1 u blizini obilaznice autoputa kroz Beograda.



Slika 7. Lokacije uzorkovanja vode u slivu Donje Polje (5 – strelica pokazuje ulivanje kanalizacije u kanal; 11 – strelica pokazuje direktno ispuštanje fekalija u kanal)

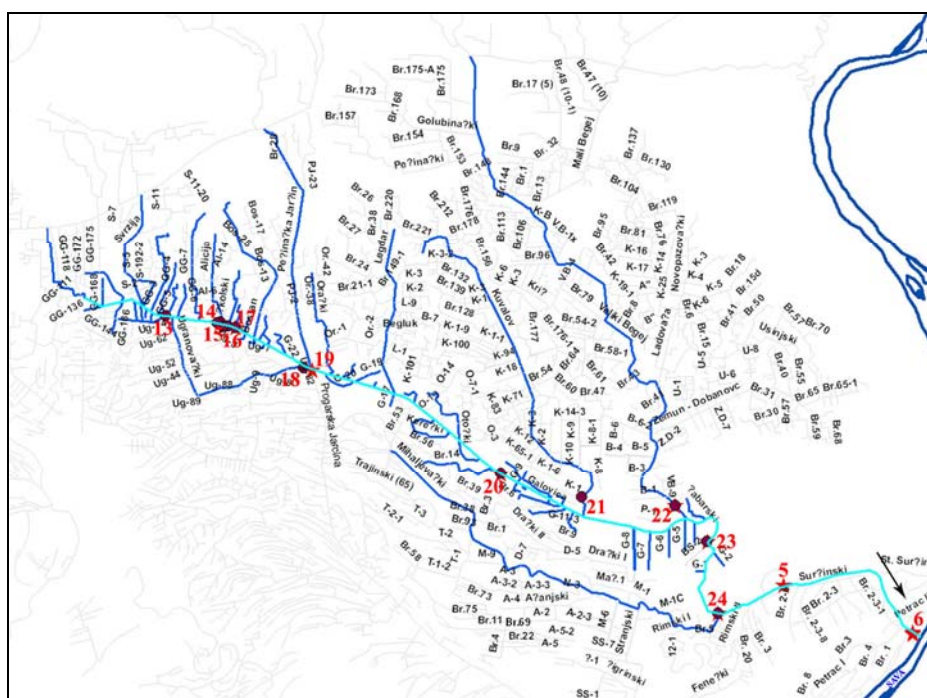
Na lokaciji Donje Polje u slivu kanala Petrac 1, u letnjem periodu 2009. godine ispitivan je mikrobiološki kvalitet vode bočnih kanala koji se ulivaju u kanal Petrac 1. Ovi kanali su procenjeni kao potencijalni zagađivači i voda je uzorkovana iz kanala (*Slike 6 i 7*) na sledećim lokacijama:

10. kanal Smrdljivac – lokacija kod mlina
11. kanal Smrdljivac – lokacija ispod naselja Surčin
12. kanal Galovica – lokacija kod aerodromskog kolektora

U cilju procene mikrobiološkog kvaliteta vode glavnog kanala "Galovica", tokom 2009. i 2010. godine vršena su uzorkovanja vode samog kanala Galovica.

Voda je uzorkovana iz samog kanala Galovica (Slika 8), a lokacije uzorkovanja vode (Slika 9), idući od početka kanala (izvora) ka mestu gde se Galovica uliva u reku Savu (ušće), su bile sledeće:

- 13. kanal Galovica na 6. km
- 20. kanal Galovica na 24. km
- 23. kanal Galovica na 36. km



Slika 8. Karta kanala Galovica

Galovica na 6. km (početak kanala Galovica) – ovaj deo kanala obuhvata kanalsku mrežu koja direktno dovodi vodu u kanal Galovica. Površina ovog sliva iznosi 1500.52 ha, a ukupna dužina njegove kanalske mreže je 99.582m. Kanali ovog sliva ovode atmosfersku vodu, iz katastarskih opština Buđanovci i Sibač, u Galovicu.

Kanal Galovica na 24. km (srednja Galovica) – obuhvata veći broj kanala koji imaju manju slivnu površinu i direktno se ulivaju u kanal Galovica. Površina ovog sliva iznosi oko 3273.92ha, a ukupna dužina kanalske mreže je 71.679km. Kanali ovog sliva

prolaze kroz katastarske opštine: Ugrinovci, Deč, Šimanovci, Sremski Mihaljevci, Prhovo i Pećinci.



Slika 9. Kanal "Galovica" sa bočnim kanalima koji se u njega ulivaju

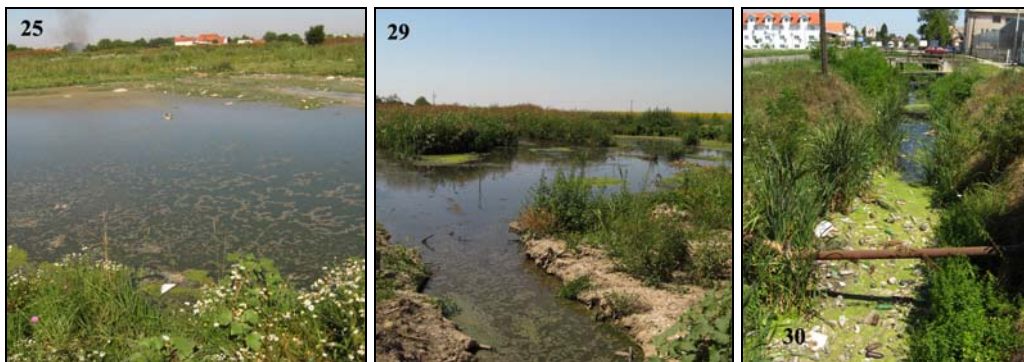
Kanal Galovica na 36. km – prolazi južno ispod katastarske opštine Dobanovci. Na ovoj lokaciji, u kanal Galovicu se direktno ulivaju otpadne vode iz industrijske zone Dobanovaca.

U okviru sliva Galovica, voda za mikrobiološka ispitivanja je uzorkovana u industrijskoj zoni blizu potencijalnih zagađivača. Ovim ispitivanjima obuhvaćeni su bočni kanali koji se ulivaju u kanal Galovica, a u koje potencijalni zagađivači ispustaju svoje otpadne vode.

Voda je uzorkovana iz kanala u letnjem periodu 2009. godine (Slika 10) i to na sledećih osam lokacija:

25. dovodni kanal u Galovicu – lokacija u Deču
26. kanal Galovica – lokacija kod Deča
27. školski kanal – lokacija Pećinci gde dospevaju komunalne otpadne vode nakon tretmana
28. školski kanal – lokacija Pećinci gde se ispuštaju otpadne vode
29. ugranovački kanal – lokacija Subotište

- 30. kanal Mali Begej – lokacija Stara Pazova
- 31. kanal Golubinci – lokacija Stari Banovci gde su ranije ispuštane otpadne vode
- 32. kanal Patka – lokacija Petrović salaš



Slika 10. Lokacije potencijalnih zagađivača kanala "Galovica"

Uzorkovanje vode na lokacijama sliva Galovice vršeno je tokom 2008; 2009 i 2010 godine.

Određivanje broja i identifikacija bakterija – Broj ukupnih koliformnih, fekalnih koliformnih bakterija i *E. coli* u uzorcima vode je određen petrifilm metodom (3M, USA). Ova metoda je sertifikovana za određivanje broja koliforma u mnogim zemljama zapadne Evrope.

Voda je uzorkovana i reprezentativni uzorci, zapremine oko 500ml su istog dana dopremljeni u laboratoriju i analizirani. Aseptično je uzeto 20ml uzorka vode dodato u 180 ml Buffered Peptone Water (BPW) (Biomérieux, France) i homogenizovano na orbitalnom šejkeru 30 minuta na temperaturi 37°C. Pripremljena je serija razređenja 10^{-1} - 10^{-6} . Inokulum od 1ml, je zasejan na *Escherichia coli*/Coliform-Count-Plate (EC) petrifilm (3M, USA). Petrifilm je dehidrisana visoko-selektivna hranljiva podloga koja sadrži hranljive materije, vodo-rastvorljivu želatinoznu substancu i indikator boje. Indikator boje omogućava bojenje bakterijskih kolonija, tako da se mogu jasno razlikovati koliformne bakterije i *E. coli*. Kolonije koliformnih bakterija se javljaju crveno obojene sa mehurićima gasa pored same kolonije, dok kolonije *E. coli* su takođe sa gasom ali plave boje. Mehurići gasa se uvek javljaju pored kolonija bakterija koje fermentuju laktozu. Inkubacija za ukupne koliformne bakterije i

E. coli je bila na temperaturi 37°C, a za fekalne koliformne bakterije na temperaturi 44°C u trajanju 24^h. Broj koliformnih bakterija i *E. coli* je obračunat i izražen kao CFU/100 ml vode.

Broj *E. coli* O157:H7 u uzorcima vode je određen na visoko-selektivnoj hromogenoj podlozi ChromID™ O157:H7 Agar (Biomerieux, France). Zasejavanje je vršeno u 3 ponavljanja. Inkubacija je trajala 24^h na temperaturi 37°C. Tipične kolonije zelene boje, procenjene kao *E. coli* O157:H7, su izbrojane i urađen je obračun broja bakterija kao CFU u 100 ml uzorka vode.

Brojnost *Salmonella spp.* je određena na visoko-selektivnoj hromogenoj podlozi ChromID™ Salmonella Agar (SM2) (Biomerieux, France). Inkubacija je trajala 18–24^h na temperaturi 35°C i nakon toga brojane su tipične blede-roze kolonije *Salmonella spp.* i obračunate kao CFU/100 ml vode.

Broj *Aeromonas spp.* je određen na visoko-selektivnoj hranjivoj podlozi m-*Aeromonas* Selective Agar Base (Merck, Germany) uz dodatak podlozi m-*Aeromonas* Selective Supplement (Merck, Germany). Podlozi je, pre razlivanja u petri-kutije, dodat m-*Aeromonas* Selective Supplement (Ampicillin 5.0mg/ml i Vancomycin 1.0mg/ml). Inkubacija traje 24^h, na 30-35°C i broje se tipične kolonije žute boje.

Izolacija karakterističnih kolonija *E. coli*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella spp.* i *Aeromonas spp.* i dobijanje čistih kultura metodom isrpljivanja je predhodila određivanju morfoloških, ekoloških i biohemijskih osobina. Vrsta *E. coli* O157:H7 je dokazana latex aglutination test-om (Oxoid, UK), dok je za potvrđivanje ostalih vrsta bakterija korišćen API 20E test i API-WEB softver (Biomerieux, France).

4.2. Određivanje broja i identifikacija patogenih bakterija na biljkama

Biljni materijal je uzorkovan na oglednim parcelama u okviru komercijalnog poljoprivrednog gazdinstva "Salat Centar" u Surčinu gde su analizirane krtole krompira i individualnog gazdinstva u Negotinu, gde analizirano povrće.

Ogledna parcela u Surčinu - Ogledna parcela na kojoj je gajen krompir se nalazi neposredno pored melioracionog kanala u Surčinu. Tokom 2006; 2007 i 2008 godine, u terminima žetve vršene su analize krtola krompira (*Slika 11*). Usev je tokom celog perioda ogleda zalivan vodom iz melioracionog kanala.

Zemljište na kojem je gajen usev krompira je glinovito i nalazi se na aluvijalnom nanosu. U zadnjih deset godina, na njemu je gajena zelena salata, paradajz i kupus.



Slika 11. Ogledna parcela pod usevom krompira u Surčinu

Krompir (*Solanum tuberosum*) sorta Liseta je korišćen u ogledu. Krtole krompira su sadene u približno istom periodu u sve tri godine (početak maja 2006 i početak aprila 2007 i 2008 godine) na dubinu od 10cm sa rastojanjem među biljakama 30cm i međurednim rastojanjem od 75cm.

Tokom vegetacionog perioda primenjena je odgovarajuća agrotehnika koja se sastojala u nagrtanju biljaka zemljištem (30 dana nakon sadnje), tretiranju pesticidima protiv korova i fitopatogenih gljiva, primeni mineralnog đubriva (NPK) (jednom tokom sadnje i nekoliko puta u vegetacionom periodu). Biljke krompira su navodnjavane "sistemom brazda" vodom iz melioracionog kanala koje je udaljen oko 100m od eksperimentalnog polja. Površina oglednog polja pod usevom krompira je bila 22.774.8m².

Bakteriološka analiza krtola krompira – Na parceli je uzorkovan veći broj biljaka (9 uzorkovanja) udaljenih jedna od druge i od svake biljke je uzeto po nekoliko krtola tako da se dobije reprezentativni uzorak težine oko 600g. Uzorci krtola krompira su stavljeni u sterilne plastične kese za uzorkovanje i čuvani na 4°C i transportovani u laboratoriju.

U laboratoriji je izmerena težina kese sa krtolama radi obračuna broja bakterija na krompiru. Nakon toga je u kesu sa uzorkom dodato 200ml sterilne puferisane

peptonske vode (Oxoid, Hampshire, UK) i homogenizovano na orbitalnom šejkeru 1 minut da bi bakterije, vezane za površinu krtola, bile suspendovane u rastvor. Zatim je otpipetiran 1ml ove suspenzije (razređenje 10^{-1}) i zasejan na Selective *E.coli*/coliform chromogenic medium (CM1046) (Oxoid, Hampshire, UK) tako da inokulum bude ravnomerno raspoređen po celoj površini agarne ploče. Takođe, napravljena je serija razređenja 10^{-2} – 10^{-5} i iz svakog razređenja je zasejan 1ml inokuluma u Petri-kutiju sa napred navedenom podlogom u 3 ponavljanja. Inkubacija je vršena na temperaturi 37°C u trajanju 24^{h} , kolonije tamno-ljubičaste do indigo-plave boje su brojane kao *E. coli*, a kolonije pink boje kao koliformne bakterije. Broj ukupnih koliformnih bakterija je dobijen kao zbir ljubičastih i pink kolonija (zbir *E. coli* i koliformnih bakterija).

Obračun broja koliformnih bakterija i *E. coli* na krtolama krompira izvršen je prema težini krtola krompira na sledeći način: broj izbrojanih kolonija x zasejano razređenje/razređenja da se dobije CFU/g krtole krompira.

$$\text{Koncentracija bakterija CFU/g} = \text{broj kolonija} \times \text{zasejano razređenje} / d$$
$$d = \text{težina uzorka ploda} / (\text{težina uzorka ploda} + \text{količina peptonske vode})$$

U cilju identifikacije kolonija procenjenih kao *E. coli* urađena je izolacija karakterističnih kolonija i dobijanje čistih kultura a zatim su određene morfološke osobine kolonija i ćelija, i API 20E testa i API-WEB softvera.

Individualno gazdinstvo u Negotinu - Parcele individualnog gazdinstva gde su uzeti uzorci svežeg povrća je locirano u neposrednoj blizini melioracionog kanala u Negotinu (opisan u poglavlju 4.1.) i navodnjavaju se intenzivno kanalskom vodom tokom celog vegetacionog perioda.

Parcele sa kojih je uzorkovano povrće su bile približne veličine oko 1000m^2 . U toku vegetacionog perioda, primenjena je uobičajena agrotehnika za svaku biljnu vrstu, a sastojala se u tretiranju pesticidima, primeni samo mineralnog đubriva NPK i redovnog navodnjavanja koje je vršeno "sistemom brazda".

Uzorkovanje je obavljeno krajem septembra 2007 godine. Mikrobiološkim analizama su obuhvaćeni jestivi delovi mrkve (*Daucus carota* subsp. *Sativus*), peršuna (*Petroselinum crispum*), celera (*Apium graveolens*), kupusa (*Brassica oleracea* var. *Capitata* L), mladog luk (*Allium cepa*), paradajza (*Lycopersicon esculentum*), krastavca (*Cucumis sativus* L.) paprike (*Capsicum annuum*) (Slika 12).



Slika 12. Parcele pored melioracionog kanala u Negotinu gdje je uzorkovano povrće

Bakteriološka analiza povrća - obuhvata određivanje broja ukupnih koliformnih, fekalnih koliformnih bakterija, kao i detekciju vrsta patogenih bakterija na jestivim delovima biljaka. Za određivanje broja koliformnih bakterija je primenjen petrifilm metod. Uzorci povrća su testirani na prisustvo *E. coli*, *E. coli* O157:H7 i *Salmonella spp.* Za detekciju ovih bakterijskih vrsta korišćene su specifične i visoko-selektivne hromogene hranljive podloge.

Sa svake parcele uzorkovano je po 5 biljaka za svaku biljnu vrstu, koje su udaljene jedna od druge tako da se dobije reprezentativni uzorak u količini oko 500g. Delovi uzorkovanih biljaka su stavljeni u sterilne kese i čuvani na 4°C tokom transporta do laboratorije. U laboratoriji je izmerena težina kese sa uzorkom radi obračuna broja bakterija na 1 g svežeg biljnog materijala i kesu dodato 200ml sterilne pufersane peptonske vode (Biomérieux, France) i homogenizovano na šejkeru 1 minut. Po 1 ml suspenzije (razređenje 10^{-1}) je zasejan na Coliform Count Plate (CC) petrifilm (3M, USA), koji sadrži Violet Red Bile (VRB) podlogu sa vodo-rastvorljivom želatinoznom materijom i tetrazolium indikatorom. Ona omogućava određivanje broja koliformnih bakterija koje se javljaju u vidu crvenih kolonija sa mehurićima gasa (posledica

fermentacije laktoze). Detekcioni limit ove metode je 1 CFU/g. Zasejevanje je izvršeno razređenjima 10^{-2} – 10^{-5} sa 1ml inokuluma. Inkubacija je vršena na temperaturi 37°C i 44°C za fekalne koliformne bakterije u toku 24^h. Kolonije, procenjene kao koliformne bakterije, su izbrojane, obračunate prema težini uzorka i izražene kao CFU/g.

Za detekciju i izolaciju ispitivanih patogenih vrsta bakterija *E. coli*, *E. coli* O157:H7 i *Salmonella spp.*, inokulum iz razređenja 10^{-1} je ezom zasejan na visokoselektivne i hromogene hranljive podloge. Za *E. coli* je korišćen Eosin Methylene Blue Agar (EMB Agar) (Biomerieux, France) i Selective *E.coli*/coliform chromogenic medium (CM1046) (Oxoid, Hampshire, UK). Za *E. coli* O157:H7 ChromID™ O157:H7 Agar (O157 H7 ID-F) (Biomerieux, France) i inkubirana 24^h na temperaturi 37°C. Za utvrđivanje prisustva i izolaciju *Salmonella spp.*, vršeno je obogaćenje u Selenite Broth (Merck, Germany) a iz pozitivnih epruveta inokulum zasejan na ploče sa Salmonella/Shigella Agarom (SS Agar) (Biomerieux, France) i ChromID™ Salmonella Agarom (SM2) (Biomerieux, France). Zasejane ploče su inkubirane na 35°C tokom 24^h.

Tipične kolonije ispitivanih vrsta bakterija su izolovane i njihove čiste kulture su identifikovane pomoću API 20E testa i API-WEB softvera (Biomerieux, France), dok je *E. coli* O157:H7 potvrđena pomoću latex agglutination kit-a (Oxoid, England).

4.3. Prenos *E. coli* K-12 iz vode za navodnjavanje do biljaka zelene salate

Transport patogenih bakterija iz vode za navodnjavanje do biljke praćen je u laboratorijskim uslovima (mikrobiološka laboratorija School of Biological Sciences, University of Reading, UK). U ovom eksperimentu korišćena je *E. coli* K-12 W3110, i eksperimentalna biljka zelena salata (*Lactuca sativa*). Voda za navodnjavanje je inokulisana bakterijom i zelena salata je zalivana kontaminiranom vodom. Koncentracija *E. coli* K-12 W3110 u vodi je 10^8 CFU/ml ($OD_{650} \approx 1$).

Pre setve, seme je površinski sterilisano 10% etanolom u trajanju od 10 minuta, i ispirano tri puta sterilnom dH₂O. Biljke su gajene u substratu (kompostu) tri nedelje i po potrebi zalivane kontaminiranom vodom. Ogled je izveden u tri ponavljanja, a kontrolna biljka je zalivana sterilnom vodom (Slika 13).



Slika 13. Rast zelene salate (levo - inokulisane biljke; desno – kontrola)

Biljke (tretirane i kontrolne) sa korenom su izvađene iz supstrata i broj *E. coli* K-12 W3110 u rizosfernom zemljištu i biljnom materijalu je određen indirektnom metodom zasejavanja na MacConkey Agar (Oxoid, UK).

Od rizosfernog zemljišta, korena i lista biljke (po 1g) napravljena su razređenja 10^{-1} - 10^{-6} u sterilnom rastvoru $MgCl_2$. Inokulum je zasejan na MacConkey Agar (Oxoid, UK) u tri ponavljanja.

U cilju detekcije prisustva *E. coli* K-12 W3110 u unutrašnjosti biljnog tkiva, urađena je površinska sterilizacija korena i lista (70% etanolom, 10 minuta, isprani 5 puta u sterilnoj dH_2O). Provera efikasnosti površinske sterilizacije je izvršena na MacConkey Agar. Sterilnim skalpelom odsečeni koren i list su macerirani u avanu oko 5 minuta dok se biljni sok nije pojavio. Na 100mg svežeg biljnog materijala (koren i list) dodato je 1 ml sterilnog rastvora $MgCl_2$. Napravljene su serije razređenja 10^{-1} - 10^{-6} za koren i list i iz svakog razređenja je 100 μ l inokuluma zasejano na MacConkey Agar (Oxoid, UK) u tri ponavljanja. Inkubacija je trajala 24^h na 37°C nakon čega je određen broj pink kolonija procenjenih kao *E. coli* K-12, a broj je izražen kao CFU/1g svežeg biljnog materijala.

Identifikacija i potvrda vrste *E. coli* K-12 W3110 izolovane iz biljnog materijala je urađena pomoću API 20E testa i API-WEB softvera (Biomerieux, France).

U ispitivanju površinske i endofitne kolonizacije korena i lista biljaka zelene salate sa bakterijom *E. coli* K-12 W3110, primenjena je PCR metoda. Specifični prajmer za ovu bakteriju je *feoA* BW25113 (for: 5' – GAA ACC TTA ATT AAA CAT

TAG CCA GTC CGG – 3' i rev: 5' – GCC ACT CAA AAT GTA GTG ACA GGC GAT T – 3'). Marker je HyperLadder™ I (Bioline Quantitative DNA Markers).

Ukupna zapremina PCR reakcije smeše je 25µl. Reakciona smeša se sastoji od: bakterijske kulture (1µl), Go Taq Green Master Mix (Promega)(12.5µl), primer F (forward)(1µl), primer R (reverse) (1µl) i sterilne dH₂O (9.5µl). U 200µl-sku test mikrotubu je dodata bakterijska kultura i ostali sastojci reakcije smeše. Mikrotuba je centrifugirana i stavljena na programiran "thermal-cycler" (PCR mašina).

Ciklični program se sastojao u sledećem:

- primarna denaturacija 1 ciklus na 94°C – 1 min i 45sec praćena sa 30 ciklusa na 94°C – 15 sec
- aniling (annealing) na 66°C – 15 sec
- elongacija (elongation) na 72°C – 1 min.
- 1 ciklus na 94°C – 15 sec, 66°C – 15 sec i finalna elongacija na 72°C – 10min kojom je kompletirana reakcija.

Rezultati PCR reakcije su analizirani na agarozu gelu posle horizontalne elektroforeze:

- 50ml 1%-og agarozu gela dodato 5µl gel-red-a, promesano i sipano u kadicu za horizontalnu elektroforezu sa "češljem" za pravljenje bunarića i tako ostavljeno da se čvrstne.
- u bunariće je stavljeno po 5µl uzorka i u poseban bunarić marker i gel je držan na 120V, 400mA u trajanju 30 minuta.
- gel je posmatran pod UV zracima.

Uzorci korena i lista posle površinske sterilizacije, su u sterilnim uslovima sečeni i bojeni propidijum jodidom (PI) (0.1 mg/ml) u trajanju od 10 minuta i posmatrani konfokalnim mikroskopom (Leica inverted DM IRE2 sa softverom TCS SP2 AOBS). Korišćen je objektiv 40x uljane imerzije 1.25 NA (numerical aperture) Green Helium Neon laser: ekscitacije 543nm i emisije 593-726nm.

4.4. Kolonizacija biljaka patogenim bakterijama

Mogućnost površinske i endofitne kolonizacije korena različitih vrsta biljaka sa sojevima patogenih bakterija je ispitana u laboratorijskim uslovima u "monoxenic" modelu sistema gajenja (jedna biljna vrsta je inokulisana jednim sojem bakterije). Istraživanja su obavljena u laboratorijama Research Unit Microbe-Plant Interactions, German Research Center for Environmental Health (GmbH), Helmholtz Zentrum Munchen, Nemačka.

Neki sojevi ispitivanih vrsta patogenih bakterija su Gfp-transformisani, a za neke je primenjena metoda Fluorescence *in situ* hybridization (FISH).

Odabrani sojevi patogenih bakterija : tri soja *Salmonella enterica* serotip *typhimurium* (LT2, S1 i ATCC14028), dva soja *Listeria monocytogenes* (EGD-E i SV4B), dva soja *Pseudomonas aeruginosa* (PA01 i DSM50071) jedan soj *Escherichia coli* (PBA28) i *Ochrobactrum anthropi* (1ADSM14396). Takođe, u eksperimentu su korišćeni i sojevi ređe zastupljenih patogenih bakterija iz roda *Roseomonas* i to dve vrste *R. fauriae* (KACC11694), *R. genomospecies* (6CCUG33010), i jedan soj apatogene bakterije *Herbaspirillum frisingense* (GSF30BA28). Ovi sojevi bakterija potiču iz kolekcije kultura bakterija Helmholtz Zentrum Munchen, German Research Center for Environmental Health (GmbH), Research Unit Microbe-Plant Interactions.

Salmonella typhimurium LT2 je soj koji se najčešće koristi u laboratorijskim eksperimentima, dok je soj *S. typhimurium* S1 izolovan iz organskog otpada dobijenog razlaganjem biljnog materijala (izolovao M. Schmid). *Listeria monocytogenes* SV4B je odabrana kao reprezentativan predstavnik patogenih bakterija i veoma je zastupljena u infekciji ljudi.

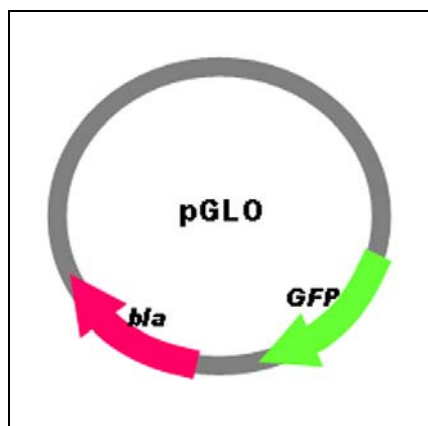
Kolonizacija je praćena kod biljaka: zelene salate (*Lactuca sativa*) sorta 2476; spanać (*Spinacia oleracea*), peršun (*Petroselinum crispum*); mrkva (*Daucus carota* subsp. *sativus*); celer (*Apium graveolens*); paradajz (*Lycopersicon esculentum*); kukuruz šećerac (*Zea mays* var. *saccharata*);

GFP - Transformacija sojeva bakterija metodom elektroporacije

Pseudomonas aeruginosa, *E. coli* i *Herbaspirillum frisingense* su Gfp-transformisani metodom elektroporacije. Gfp (green fluorescent protein) je korišćen kao marker za gensku ekspresiju kod bakterija (Šema 3). Gfp-transformacija bakterija se sastojala od postupka pripreme elektro-kompetentnih ćelija i samog postupka elektroporacije.

- Priprema elektro-kompetentnih ćelija:

- 50ml LB podloge je inokulisano odabranim sojem bakterije i inkubirano preko noći
- zatim je 500ml LB podloge inokulisano sa 1:100 sveže kulture koja je inkubirana preko noći i inkubirano na 37°C uz neprekidno mućkanje na 300 rpm da bi se postigla koncentracija $OD_{600} = 0.5 - 0.7$.
- sve sledeće faze postupka su se radile na ledu:
- ćelije bakterija su hladene na ledu oko 15 minuta
- suspenzija je centrifugirana na 5000rpm na 4°C u trajanju od 15 minuta
- ćelije su resuspendovane sa 500ml ledeno hladne MQH₂O, a zatim centrifugirane 15 minuta na 5000rpm na 4°C
- ćelije su resuspendovane sa 50ml ledeno hladnog 10% glicerola i opet centrifugirane 15 minuta na 5000 rpm na 4°C
- ćelije su resuspendovane u 1ml ledeno hladnom glicerolu
- suspenzija ćelija je podeljena na količine od 60µl koje su čuvane na -80°C sve do upotrebe.



Šema 3. GFP (green fluorescent protein) transformacija bakterija

- Postupak elektroporacije:
- elektro-kompetentne ćelije su odmrznute na ledu
- stavljena je 2mm elektroporaciona kiveta na led
- pažljivo je izmešana suspenzija bakterijskih ćelija sa 300ng plazmida i inkubirano na ledu 30 minuta
- mešavina je prebačena u 2mm-elektroporacionu kivetu koja je odmah stavljena na led
- elektroporator (micropulser) je podešen na EC2 (voltage 2.5 kV; capacity 25 μ F; resistance 200 Ω) za 2mm-kivetu i kiveta je stavljena na pulsiranje 4.5–5.5 msec.
- zatim je dodato 1ml hranljivog bujona u kivetu
- suspenzija ćelija je prebačena u 2ml-mikrotubu i inkubirana na 30°C u trajanju od 1^h uz neprekidno mućkanje na 200rpm
- zatim je zasejano 750 μ l na selektivnu hranljivu podlogu.

Priprema sojeva bakterija za inokulaciju

Sojevi bakterija su zasejani na odgovarajućim čvrstim selektivnim hranljivim podloge (*Slika 14*), a nakon inkubacije je pikirana pojedinačna kolonija i prenetu u odgovarajuću tečnu hranljivu podlogu.

E. coli PBA28 (Gfp) je kultivisana na Luria Bertani (LB) Agar uz dodatak, nakon autoklaviranja rastvora antibiotika Kanamicin (50mg/1000ml), sterilisanog membranskom filtracijom (0.2 μ m). Inkubacija je trajala 24^h na 37°C. Nakon inkubacije pikirana je jedna kolonija i prenetu u falkonen epruvetu (50 ml) sa 20 ml LB Bujona sa Kanamicinom (50mg/1000ml). Epruveta je inkubirana preko noći na 37°C uz neprekidno mućkanje (zapušač epruvete je bio malo otvoren radi izdvajanja gasa).

Herbaspirillum frisingense GSF30BA28 (Gfp) je kultivisan na Hranljivom Agar uz dodatak rastvor antibiotika Kanamicin (50mg/1000ml). Inkubacija je vršena na temperaturi 30°C 24^h. Pikirana je jedna kolonija i prenetu u falkonen epruvetu sa 20 ml Hranljivog Bujona sa Kanamicinom (50mg/1000ml). Inkubacija je vršena preko noći uz neprekidno mućkanje na 30°C.

Pseudomonas aeruginosa PA01 (Gfp) Gfp-transformisani soj je kultivisan na hranljivoj podlozi LB Agar uz dodatak sterilnog rastvora antibiotika Kanamicin (50mg/1000ml) i Gentamicin (80mg/1000 ml). *Pseudomonas aeruginosa* DSM50071

(ne transformisani soj) je kultivisan na Hranljivom Agararu na 30°C tokom 24^h, nakon čega je pojedinačna kolonija *P. aeruginosa* PA01 (Gfp) prenet u falkonen epruvete sa 20ml LB Bujona sa rastvorom antibiotika (Kanamicin i Gentamicin). Takođe, soj *P. aeruginosa* DSM50071 je prenet u falkonen epruveta sa 20ml Hranljivog Bujona (Merck, Germany). Epruvete su inkubirane preko noći uz neprekidno mućkanje na 30°C (zapušač epruvete je bio malo otvoren radi stvaranja aerobnih uslova).

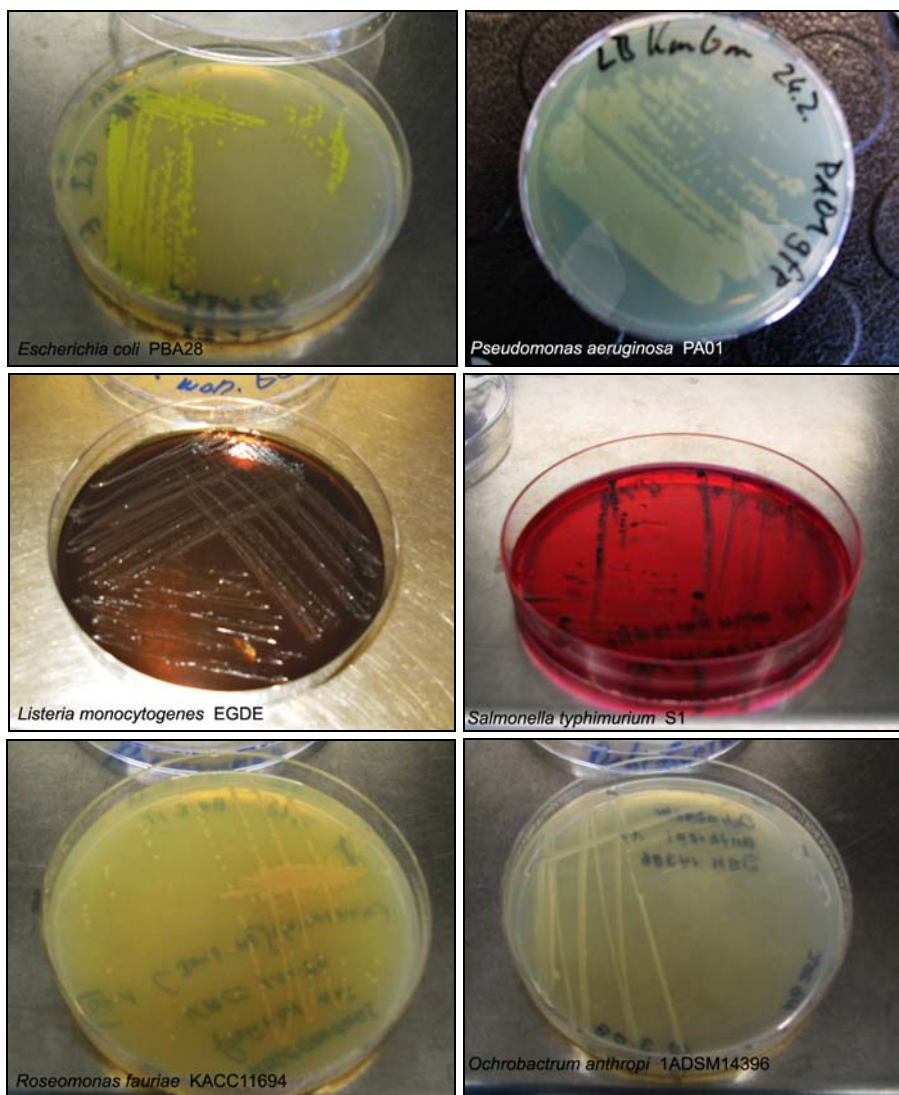
<i>Luria Bertani (LB) Bujon</i>	
Tryptone	10.0 g
Yeast extract	5.0 g
NaCl	10.0 g
Destilovana voda	1000 ml
pH = 7.0	

Kulture *Salmonella typhimurium* LT2, *Salmonella typhimurium* ATCC14028 i *Salmonella typhimurium* S1 su kultivisane na selektivnoj podlozi Xyline-Lysine-Desoxycholate (XLD) Agararu (Merck, Germany) i inkubirane na 37°C tokom 24^h. Na ovoj podlozi sojevi *Salmonella typhimurium* su davali tipične kolonije crne boje. Zatim je pikirana pojedinačna kolonija za svaki od ova tri soja i prenet u posebnu falkonen epruvetu sa 20ml Luria Bertani (LB) Bujona. Epruvete su inkubirane uz neprekidno mućkanje preko noći na 37°C.

Sojevi vrste *Listeria monocytogenes* EGD-E i *Listeria monocytogenes* SV4B su kultivisani na selektivnoj podlozi Oxford Agar uz dodatak odgovarajućeg soplementa (Fluka, Switzerland), i inkubirani na 40°C 24^h. Nakon inkubacije, tipične kolonije sojeva *Listeria monocytogenes* (sitne, bele boje i okružene sa tamnom zonom) su prenete u falkonen epruvete sa po 20ml Brain Heart Infusion (BHI) Bujona (Difco, USA). Epruvete su inkubirane preko noći uz neprekidno mućkanje na 37°C.

Ochrobactrum anthropi 1ADSM14396 je kultivisan na Hranljivom Agararu (Merck, Germany) 24^h na 30°C i prenet u falkonen epruvetu sa 20ml Hranljivog bujona na inkubaciju tokom noći uz neprekidno mućkanje na 30°C.

Sojevi *Roseomonas fauriae* KACC11694 i *Roseomonas genomospecies* 6CCUG33010 su aktivirani na Kolumbia Agararu (Merck, Germany) i inkubirani na 30–37°C tokom 24^h. Nakon inkubacije kolonije su prenete u falkonen epruvete sa 20ml Kolumbia Bujona na inkubaciju preko noći na temperaturi od 30–37°C.



Slika 14. Petri kutije sa sojevima bakterija korišćenim za inokulaciju biljaka

Pripreme suspenzije bakterija za inokulaciju :

- inkubirane kulture su centrifugirane na 5000rpm u trajanju od 3 minuta
- uklonjen je supernatant, dodato je 20ml PBS 1X, vorteksovano i ponovo centrifugirano na 5000 rpm, 3 minuta i ovaj postupak je ponovljen još dva puta
- ponovo je uklonjen supernatant, dodato je 20ml PBS 1X, vorteksovano i merena je koncentracija bakterija (OD) na spektrofotometru pri talasnoj dužini 436nm
- kalibracija spektrofotometra je urađena stavljanjem 1 ml PBS 1X u kivetu i podešavanjem kazaljke na 0 podeok.

- rastvor za određivanje OD₄₃₆ je pravljen tako da odnos, bakterijska kultura (inokulum): PBS 1X bude 1 : 9 (100μl inokuluma+900μl PBS 1X) nakon čega je očitana vrednost

- ukoliko koncentracija bakterija nije bila u granicama 10⁷–10⁹ CFU/ml, suspenzija bakterija je podešavana dodavanjem bakterijske kulture ili rastvora PBS 1X da se dovede do ≈ 10⁸ CFU/ml.

Finalna koncentracija *E. coli* pBA28 (Gfp) za inokulaciju je iznosila 10⁹ CFU/ml PBS (pH 7.2 – 7.4) (OD₄₃₆ = 0.910/ml).

Koncentracija *Herbaspirillum frisingense* GSF30BA28 (Gfp) je približno 10⁸ CFU/ml PBS (OD₄₃₆ = 0.858/ml).

Koncentracije *P. aeruginosa* PA01 (Gfp) i *P. aeruginosa* DSM50071 za inokulaciju ≈ 10⁸ CFU/ml PBS (OD₄₆₃ = 0.863/ml i OD₄₃₆ = 0.873/ml).

Finalna koncentracija suspenzije bakterija za sojeve *S. typhimurium* LT2 i *S. typhimurium* S1 je ≈ 10⁸ CFU/ml PBS (OD₄₃₆ = 0.846/ml i OD₄₃₆ = 0.846/ml), dok je za *S. typhimurium* ATCC14028 ≈ 10⁷ CFU/ml PBS (OD₄₃₆ = 0.710/ml).

Koncentracija za soj *L. monocytogenes* EGD-E je ≈ 10⁶ CFU/ml PBS (OD₄₃₆=0.656/ml) i *L. monocytogenes* SV4B ≈ 10⁷ CFU/ml PBS (OD₄₃₆ = 0.793/ml).

Koncentracija *Ochrobactrum anthropi* 1A DSM14396 za inokulaciju je iznosila ≈ 10⁸ CFU/ml PBS (OD₄₃₆ = 0.806/ml).

Finalna koncentracija za *Roseomonas fauriae* KACC11694 je iznosila ≈ 10⁷ CFU/ml PBS (OD₄₃₆=0.768/ml), dok je za *Roseomonas genomospecies* 6CCUG33010 bila ≈ 10⁹ CFU/ml PBS (OD₄₃₆ = 0.944).

Priprema biljnih vrsta za inokulaciju i gajenje

U eksperimentu je korišćeno sertifikovano seme (Kiepenkerl, Germany).

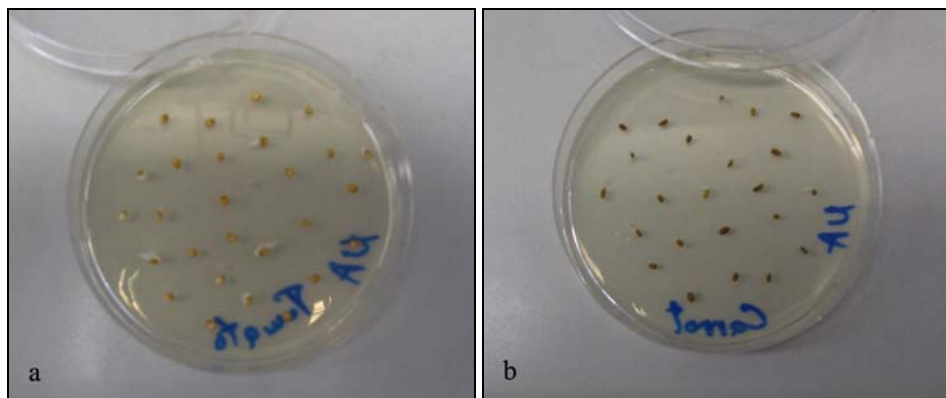
Površinska sterilizacija semena ispitivanih biljnih vrsta izvršena je metodom po Burun (2002), a nakon toga je provera sterilnosti semena. Biljke su gajene u sterilnim i kontrolisanim uslovima tri nedelje.

Postupak površinske sterilizacije semena biljaka:

- u sterilnu falkonen epruvetu je stavljeno oko 30 semenki jedne biljne vrste
- seme je tretirano 2 minuta 70% etanolom uz povremeno mućkanje

- 15 minuta tretiranje sa 2% NaOCl (15 ml NaOCl + 85 ml H₂O_{dem.})
- ispiranje seme 5 - 6 puta sterilnom H₂O_{dem.}
- tretiranje semena 30 minuta u rastvoru antibiotika (Penicillin G-sodium-salt 600mg/1000ml (0.6g), Streptomycin-sulfate-salt 250mg/1000ml (0.25g).

Nakon sterilizacije seme biljaka, bez predhodnog pranja, je stavljeno u petri-kutije sa Hranljivim Agarom (Sigma-Aldrich) i LB Agarom i inkubirano na 30°C tokom 24-48^h do pojave klice (kotiledona) (Slika 15). Na ovaj način je vršeno naklijavanje semena, kao i provera sterilnosti semena i klijanaca pre sadnje i inokulacije substrata suspenzijom bakterija.



Slika 15. Petri kutije sa naklijalim semenom biljaka (a – paradajz; b - mrkva)

Seme paradajza, kukuruza šećerca, celera, zelene salate i mrkve je naklijavano u petri-kutijama sa Hranljivim Agarom, dok je seme spanaća i peršuna naklijavano na LB Agaru (sastav je isti kao LB bujona, samo se dodaje 16.0 g/1000ml Agar-agara).

<i>Hranljivi Agar</i>	
Meat extract	1.0 g
Peptone	5.0 g
NaCl	5.0 g
Yeast extract	2.0 g
Agar-agar	16.0 g
Destilovana voda	1000 ml
pH = 7.1	

Posle inkubacije, klijanci pored kojih nije bilo bakterijske kontaminacije su dobro isprani sa sterilnom H₂O_{dem.} Klijanci su stavljani u falkonen epruvete (50ml),

dodata je sterilna voda, pažljivo je mućkano da se klijanci ne oštete i ovaj postupak sa novom sterilnom vodom je ponovljen 3 puta. Nakon pranja, klijanci su bili spremni za sadnju u priprmljeni substrat i inokulaciju sa suspenzijom bakterija.

Biljke su gajene u sterilnom kvarcnom pesku, granulacije partikula 1.0–2.5mm, kome je dodat sterilni hranljivi rastvor. Kvarcni pesak je dobro opran tekućom vodom, a zatim ispran u destilovanoj vodi i ostavljen da se ocedi nakon čega je sterilisan u Pasterovoj peći na temperaturi od 200°C u trajanju od 3^h.

U aseptičnim uslovima je stavljeno po 200g sterilnog i suvog kvarcnog peska u plastične posude sa poklopcima (SIGMA, kat.br. P-5929) i u svaku posudu je dodato po 20ml sterilnog rastvora Basal Salt Mixture (MS) (SIGMA M5524-10L 096K8306) tako da se pesak ravnomerno nakvasi i posuda je odmah zatvorena.

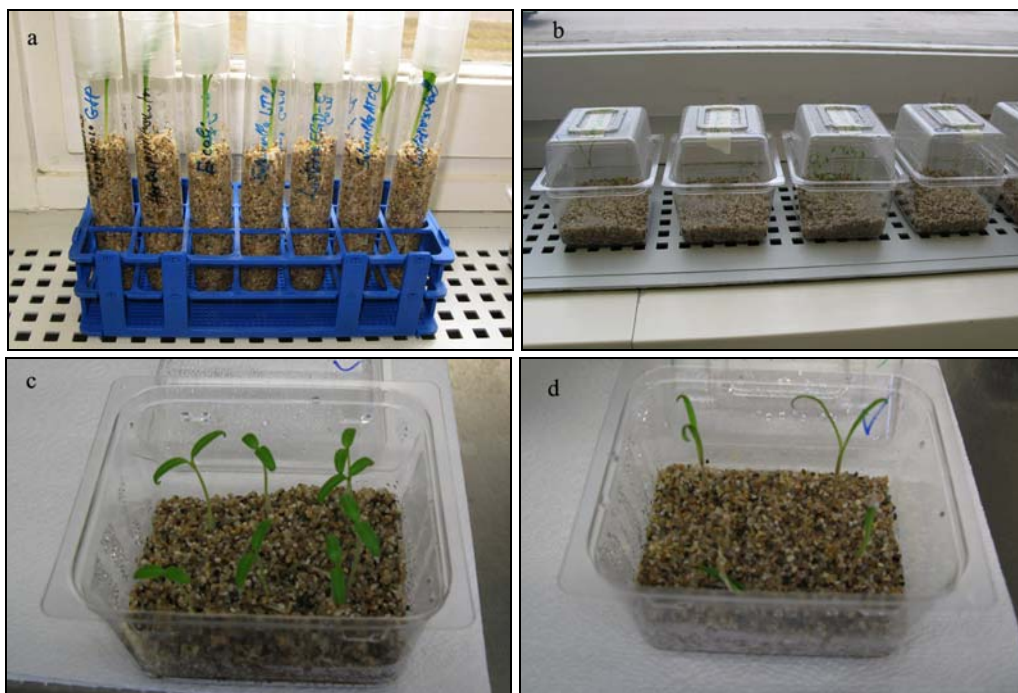
Rastvor Basal Salt Mixture (MS) (SIGMA M5524-10L 096K8306) je pripremljen na sledeći način: rastvoreno je 4.3 g MS praha u 1000 ml H₂O_{dem} i homogenizovano na šejkeru do potpunog rastvaranja, a onda autoklavirano na 121°C pri 1.5 at u trajanju od 20 minuta.

U svaku posudu je posađeno po 5-6 klijanaca biljaka. Posle jednog dana klijanci su inokulisani sa 1ml suspenzije sojeva bakterija, u predhodno navedenim koncentracijama, tako što je pipetom naneta suspenzija bakterija po površini kvarcnog peska pored klijanaca. Kao kontrola sterilnosti uslova u sistemu za gajenje, korišćene su posude sa klijancima biljaka koji su inokulisani sa 1 ml sterilnog PBS rastvora.

Klijanci kukuruza šećerca su gajeni u velikim sterilnim staklenim epruvetama (3cm širine i 20cm dužine) koje su bile napunjene sa sterilnim kvarcnim peskom u visini od oko 7cm (*Slika 14a*). U epruvete je dodato po 10ml sterilnog rastvora Basal Salt Mixture (MS) nakon čega je u svaku epruvetu posađen po jedan klijanac i 1ml suspenzije bakterija. Epruvete su zatvorene zapašaćima sa parafilmom. Posle jedne sedmice gajenja, na epruvete sa biljkama su stavljene druge sterilne epruvete tako da im se otvori poklapaju i spoj je učvršćen sa parafilmom. U ovom sistemu, biljke su mogle nesmetano rasti do 30 cm u visinu.

Biljke su gajene 21 dan, u potpuno sterilnim uslovima na sobnoj temperaturi i uobičajenom svetlosnom režimu (*Slika 16*). Nakon ovog perioda, biljke su pažljivo pincetom izvađene iz substrata u sterilnim uslovima. Strogo se vodilo računa da prilikom vađenja biljaka ne dođe do oštećenja korenovog sistema. U sterilnim uslovima

je pažljivo odvojen korenov sistem biljke, a slepljene čestice kvarcnog peska i slabo vezane bakterijske ćelije su uklonjene pranjem korena sa sterilnim Phosphate-buffered saline (PBS) rastvorom. Nakon toga su pravljene preparati tkiva korena za laser-skening-konfokal mikroskopsku analizu (CLSM).



Slika 16. Sudovi sa biljkama (a – kukuruz šećerac; b – gajenje biljaka; c – paradajz; d – spanać)

Biljke koje su inokulisane Gfp–transformisanim sojevima bakterija (*P. aeruginosa* PA01, *E. coli* pBA28 i *H. frisingense* GSF30BA28) su direktno pripremane za mikroskopiranje, odnosno nakon njihovog ubiranja su odmah pravljene preparati korena i posmatrani pod CLSM. Za biljke koje su inokulisane Gfp-ne-transformisanim sojevima bakterija, nakon njihovog ubiranja je urađen FISH za biljni koren, a onda su pripremljeni preparati korena.

Priprema preparata biljaka inokulisanih Gfp-transformisanim bakterijama

Nakon 3 nedelje gajenja, biljke su pažljivo izvađene iz supstrata i u sterilnim uslovima skalpelom je odsečen koren, sa njega su pažljivo odstranjene partikule kvarcnog peska i ispran je u PBS 1X. Koren je prosušten na vazduhu, stavljen na mikroskopsku pločicu, dodata je kap Citifluor (UK) i pokriven pokrovnim stakalcem. Ovako pripremljen preparat je pregledan pod CLSM.

4.4.1. Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)

Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) metodom se detektuju sekvence nukleinskih kiselina pomoću filogenetski fluorescentno obeleženih oligonukleotidnih proba koje specifično hibridizuju komplementarnu ciljanu sekvencu unutar bakterijske ćelije (Moter i Gobel, 2000; Eldor 2007; Blomme i Handler, 2009).

Metoda Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) je urađena za korenove biljaka koje su inokulisane: *Pseudomonas aeruginosa* DSM50071; *Salmonella typhimurium* LT2; *Salmonella typhimurium* ATCC14028; *Salmonella typhimurium* S1; *Listeria monocytogenes* EGD-E ; *Listeria monocytogenes* SV4B; *Ochrobactrum anthropi* 1A DSM14396; *Roseomonas fauriae* KACC11694; *Roseomonas genomospecies* 6CCUG33010.

Procedura FISH metode uključuje: fiksaciju uzorka, pripremu uzorka i pretretmanski korak, hibridizaciju (vezivanje specifičnih proba za određivanje specifične ciljane sekvence), ispiranje uzorka (da bi se otklonile nevezane probe) i mikroskopiranje i interpretacija rezultata.

Fiksacija biljnog korena za Gram-negativne bakterije obavlja se sa PFA (paraformaldehid) dok se fiksacija sa EtOH primenjuje za Gram-pozitivne bakterije. Pre hibridizacije uzorak mora biti fiksiran da bi bio permeabilan za prodiranje fluorescentne probe u ćeliju.

Hibridizacija mora biti izvedena pod preciznim uslovima zbog pravilnog umnožavanja proba ciljane sekvence. U ovom koraku FISH procedure, hibridizacioni pufer se dodaje u uzorak koji sadrži fluorescentne probe komplementarne sa ciljanim mestom na RNK. Hibridizacija se obavlja u mračnoj i humidnoj sredini, obično na temperaturi od 37°C do 50°C, a vreme hibridizacije od 30 minuta pa do nekoliko časova. Posle hibridizacije, uzorak se ispira u puferu za ispiranje (Washing buffer) da bi se otklonile nevezane probe, zatim se suši i spreman je za mikroskopiranje.

Postupak fiksacije korena biljaka sa PFA (paraformaldehid)

Priprema PFA rastvora: u mikrotubu (2ml) dodati PFA i PBS 1X u odnosu 3:1 vol/vol (750 μ l PFA i 250 l PBS 1X). Rastvor se može čuvati 1–3 dana na temperaturi 4°C ili 7 dana na temperaturi -20°C.

Koren biljke, ispran u PBS 1X, stavlja se u mikrotubu sa PFA rastvorom i inkubira na 4°C 2^h. Zatim se koren ispra 3 puta sa PBS 1X, stavlja u mikrotubu sa rastvorom PBS 1X / EtOH_{absolute} 1 : 1 vol/vol (500 μ l PBS 1X i 500 μ l EtOH_{absolute}) i čuvan na -20°C do FISH analize i mikroskopiranja (Amann i sar., 1990).

Postupak FISH metode za koren biljke:

- posle fiksacije, koren se suši na 46°C 20 minuta
 -1ml-sku mikrotubu dodaje se 180 μ l hibridizacionog pufera i čuva na ledu do upotrebe
 priprema hibridizacioni pufer za *in situ* hibridizaciju na 46°C (u2 ml ERT (Eppendorf reaction tube) dodati:

5 M NaCl.....360 μ l

1 M Tris/HCl pH 8.0.....40 μ l

primenjen je 35 % rastvor formamida koji je napravljen prema sledećoj tabeli
 tako da ukupna zapremina iznosi 1600 μ l.

% Formamida (v/v)	Formamid (μ l)	MQ voda (μ l)
0	0	1600
5	100	1500
10	200	1400
15	300	1300
20	400	1200
25	500	1100
30	600	1000
35	700	900
40	800	800
45	900	700
50	1000	600
60	1100	500
65	1200	400
70	1300	300

10 % (w/v) SDS.....2 μ l

pripremljen hibridizacioni pufer se čuva na ledu do upotrebe

- dehidracija korena se vrši u rastućoj seriji etanola (oko 3 minuta u 50%, 80% i 100% EtOH)
- koren se suši na vazduhu, (koren snežno-bele boju i blago smežuran).
- koren se prenosi u mikrotube sa 180 μ l hibridizacionim puferom u koje se dodaje 20 μ l odgovarajuća specifična probe i 20 μ l univerzalna proba EUB-338-Fluos i inkubirana na 46°C 1.5^h (Amann et al., 1992; Manz et al., 1992).
- priprema pufera za ispiranje za *in situ* hibridizaciju na 46°C i ispiranje na 48°C, tako što u falkonen epruvetu (50ml) dodaje:

1 M Tris/HCl pH 8.0.....1 ml

0.5 M EDTA pH 8.0.....500 μ l

5 M NaCl je primenjena prema % formamida u hibridizacionom puferu, na osnovu tabele

% Formamida u hibridizacionom puferu	(NaCl) u mol/l	NaCl (μl) (od 20% formamida pa ka višim koncentracijama, dodati 500 μl 0,5 M EDTA)
0	0,900	9,000
5	0,636	6,300
10	0,450	4,500
15	0,318	3,180
20	0,225	2,150
25	0,159	1,490
30	0,112	1,020
35	0,080	700
40	0,056	460
45	0,040	300
50	0,028	180
55	0,020	100
60	0,008	40
70	0,000	ne dodavati NaCl, već samo 350 μ l EDTA

H₂O_{ultra pure}.....50 ml

10 % (w/v) SDS.....50 μ l

- pufer za ispiranje se čuva u vodenom kupatilu na temperaturi 48°C do upotrebe
- 1ml ovog pufera se prenosi u novu 2ml-mikrotubu
- koren se stavlja u petri-kutiju sa puferom za ispiranje i mućka
- koren se prenosi u mikrotubu (2ml) sa puferom i inkubira u vodenom kupatilu na 48°C 20 minuta.
- u cilju otklanjanja pufera za ispiranje, koren se pere hladnom sterilnom destilovanom H₂O u petri-kutiji uz mućkanje, i prenosi mikroskopsku pločicu i suši na vazduhu

- na suv koren se stavlja Citifluor, koren pokriva pokrovnim stakalcem i pregleda pod CLSM.

Strogo specifične oligonukleotidne probe, korišćene u ovim istraživanjima su:

- Salm-63-Cy3 za *Salmonella typhimurium*
- Lis-1255-Cy3 za *Listeria monocytogenes*
- Gam-42a-Cy3 za *Pseudomonas aeruginosa* DSM50071
- Alf-1b-Fluos i Rhi-1247-Cy3 za *Ochrobactrum anthropi* 1A DSM14396
- Azobras-440a-Cy5 i Abras-1420-Cy3 za *Roseomonas fauriae* KACC11694 i *R. genomospecies* 6CCUG33010

Za koren biljke spanaća, inokulisane sa *R. genomospecies* 6CCUG33010, primenjena specifična proba je Azo-Cy5.

Specifične probe su primenjene u kombinaciji sa univerzalnom (nespecifičnom) probom EUB-338-Fluos za sve ispitivane sojeve bakterija. Oligonukleotidne probe su rastvarane u adekvatnom radnom rastvoru i to oko 30ng/μl za fluorohrom-obeležene (Cy3 i Cy5) oligonukleotidne probe i 50ng/μl za Fluos probu i čuvane su na temperaturi -20°C do upotrebe.

Karakteristike i specifičnosti svih korišćenih oligonukleotidnih proba kao i procenat primenjenog formamida za hibridizacioni pufer su prikazani u *Tabeli 10*. Probe su sintetizovane i dobavljene od Thermo Electron, Division Interactiva (Ulm, Germany).

Tabela 10. Karakteristike i specifičnosti korišćenih oligonukleotidnih proba

Bakterija	Proba	Specifičnost	Pozicija vezivanja		Sekvenca 50–30	% FA***	Referenca
			Ciljni (rRNA)	<i>E. coli</i> ****			
<i>S. typhimurium</i>	Salm-63	<i>Salmonella spp.</i> , <i>Plesiomonas shigelloides</i>	23 S	1742–1760	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	35	W. Ludwig, (ne objavljeno)
<i>L. monocytogenes</i>	Lis-1255	<i>Listeria sp.</i> , <i>B. thermosphacta</i> , <i>B. campestris</i>	16 S	1255–1272	ACCTCGCGGCTTCGCGAC	35	Wagner et al. (1998)
<i>P. aeruginosa</i>	Gam-42a	γ Proteobacteria	23 S	1027 - 1043	GCCTTCCCACATCGTTT sa kompetitor oligo GCCTTCCCCTTCGTTT	35	Manz et al., 1992
<i>O. anthropi</i>	Alf-1b	α -Proteobacteria, δ -Proteobacteria, <i>Spirochaetes</i>	16 S	19 - 35	CGTTCGYTCTGAGCCAG	35	Manz et al., 1992
	Rhi-1247	<i>Rhizobia</i>	16 S	1246-1260	TCGCTGCCCACTGTC		Ludwig et al., 1998
<i>Roseomonas spp.</i>	Azobras-440a	<i>Azospirillum spp.</i> <i>Skermanella</i> , <i>Rhodocista</i>	16 S	440-457	GTCATCATCGTCGCGTGC	35	Stoffels et al., 2001
	Abras-1420	<i>A. brasilense</i>	16 S	1420-1438	CCACCTTCGGGTAAAGCCA		Stoffels et al., 2001
Svi sojevi bakterija	EUB-338	Bacteria (osim * i **)	16 S	338–355	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	35	Amann et al. (1990)

*Planctomycetales

**Verrucomicrobiales

***Koncentracija formamida (v/v) korišćena za hibridizacioni puffer

****Pozicija u rRNA kod *E. coli* (Brosius et al., 1981).

3D Konfokal laser skening mikroskopija (CLSM)

Tro-dimenzionalna (3D) mikroskopska analiza preparata korenovog sistema biljaka vršena je konfokal laser skening mikroskopom (CLSM) model LSM-510-META, Zeiss (Germany) (*Slika 17*). Korišćena su dva He–Ne lasera (He–Ne 1 i He–Ne 2) i Ar-jon laser. He–Ne laseri su obezbeđivali ekscitaciju talasnih dužina 543 nm (ekscitacija za Cy3) i 633 nm (ekscitacija za Cy5) sa LP 560 i LP 650 "long-pass" filterima i to posebno za svaki. Fluorescentna boja Cy5 se emituje u crvenom spektru, ali se na mikrografiji vidi plava boja, dok se Cy3 na mikrografiji vidi kao crvena fluorescentna boja. Treći kanal za boju Ar-jon laser, daje ekscitaciju talasne dužine 488nm sa BP500–550 "band-pass" filterom, korišćen je radi autofluorescencije koja omogućava da struktura korena biljaka bude vidljiva.



Slika 17. Konfokal laser skening mikroskop, model LSM-510-META (Germany)

Broj bakterija koje površinski i endofitno kolonizuju koren biljaka određen je direktnim brojanjem bakterijskih ćelija na 3D-mikrografijama. Pomoću Zeiss LSM Image Browser softvera je određena zapremina snimljenog dela korena na 3D-mikrografiji i u tom delu su izbrojane ćelije bakterija na površini i unutrašnjosti korena. Kao površinska zona korena uzeta je dubina 0–5 μ m, dok je kao unutrašnjost korena uzeta dubina veća od 5 μ m. Broj bakterija je obračunat na jedinicu zapremine i prikazan kao broj ćelija/mm³ apsolutno suvog korena biljke.

5. REZULTATI

5.1. Prisustvo i identifikacija patogenih bakterija u vodi

Mikrobiološki kvalitet vode je praćen na lokaciji O.Š.D. Radmilovac, melioracionom kanalu u Surčinu, melioracionom kanal u Negotinu i kanalu sliva Galovice.

5.1.1. Mikrobiološki kvalitet vode na O.Š.D. Radmilovac

Broj ukupnih i fekalnih koliformnih bakterija u vodi određen je MPN metodom na MacConkey tečnoj podlozi uz korišćenje McCrady-evih statističkih tablica.

Tokom 2005. godine, u gornjem delu vodotoka "Šugavac", broj ukupnih koliformnih bakterija se kretao od 4.00×10^2 do 3.00×10^5 CFU/100ml (prosek 5.33×10^4 CFU/100ml). U 2006. godini, broj ukupnih koliformnih bakterija je iznosio 1.50×10^2 do 1.40×10^4 CFU/100ml, (prosek 5.31×10^3 CFU/100ml). Brojnost fekalnih koliformnih bakterija u 2005. je od 0 do 2.50×10^4 CFU/100ml (prosek 4.53×10^3 CFU/100ml), a u 2006.g. u rasponu od 0 do 4.50×10^3 CFU/100ml, prosek je 1.67×10^3 CFU/100ml (*Tabela 11*).

U donjem delu vodotoka "Šugavac", u 2005. godini, broj ukupnih koliformnih bakterija varirao je od 1.10×10^3 do 3.20×10^6 CFU/100ml, dok njihov prosečan broj iznosi 4.89×10^5 CFU/100ml. Brojnost fekalnih koliformnih bakterija se kretala od 7.50×10^2 do 3.00×10^6 CFU/100ml, (prosek 4.31×10^5 CFU/100ml). U 2006. godini konstatovana je brojnost od 1.50×10^3 do 2.50×10^5 CFU/100ml ukupnih koliformnih bakterija (prosek 4.39×10^4 CFU/100ml). Broj fekalnih koliformnih bakterija se kretao od 4.50×10^2 do 2.00×10^4 CFU/100ml (prosek 6.67×10^3 CFU/100ml) (*Tabela 12*).

Tabela 11. Broj koliformnih bakterija u gornjem delu vodotoka "Šugavac" u 2005. i 2006. godini

Datum uzorkovanja vode	Ukupne koliformne (broj CFU u 100 ml)	Fekalne koliformne (broj CFU u 100 ml)
14.04.2005.	4.50×10^2	0.00
25.04.2005.	3.00×10^5	1.00×10^4
16.05.2005.	4.00×10^2	0.00
08.06.2005.	9.50×10^4	2.50×10^4
05.07.2005.	1.50×10^3	1.50×10^2
10.10.2005.	1.50×10^3	4.50×10^2
14.10.2005.	2.50×10^4	4.50×10^2
21.10.2005.	2.50×10^3	1.50×10^2
<i>Prosek</i>	5.33×10^4	4.53×10^3
24.04.2006.	1.50×10^2	0.00
20.05.2006.	4.50×10^2	1.60×10^2
25.06.2006.	1.40×10^3	2.50×10^2
23.07.2006.	1.40×10^4	4.50×10^3
28.08.2006.	9.50×10^3	2.50×10^3
28.09.2006.	9.50×10^3	2.50×10^3
24.10.2006.	4.50×10^3	2.50×10^3
07.12.2006.	3.00×10^3	9.50×10^2
<i>Prosek</i>	5.31×10^3	1.67×10^3

Tabela 12. Broj koliformnih bakterija u donjem delu vodotoka "Šugavac" u 2005. i 2006. godini

Datum uzorkovanja vode	Ukupne koliformne (broj CFU u 100 ml)	Fekalne koliformne (broj CFU u 100 ml)
14.04.2005.	1.10×10^3	9.50×10^2
25.04.2005.	3.20×10^6	3.00×10^6
16.05.2005.	9.50×10^3	7.50×10^2
08.06.2005.	1.50×10^5	7.50×10^3
05.07.2005.	4.50×10^4	2.50×10^3
10.10.2005.	7.50×10^3	4.50×10^3
14.10.2005.	9.50×10^3	2.50×10^3
<i>Prosek</i>	4.89×10^5	4.31×10^5
24.04.2006.	1.50×10^3	4.50×10^2
20.05.2006.	9.50×10^3	3.00×10^3
25.06.2006.	1.10×10^4	4.50×10^3
23.07.2006.	2.50×10^4	1.40×10^4
28.08.2006.	4.50×10^4	9.50×10^3
28.09.2006.	4.50×10^3	1.15×10^3
24.10.2006.	4.50×10^3	7.50×10^2
07.12.2006.	2.50×10^5	2.00×10^4
<i>Prosek</i>	4.39×10^4	6.67×10^3

U otvorenom bunaru br. 1, u 2005. godini, broj ukupnih koliformnih bakterija varirao je od 0 do 3.00×10^4 CFU/100ml, a fekalnih koliformnih od 0 do 4.50×10^2 CFU/100ml (prosek 8.42×10^3 i 9.0×10^1 CFU/100ml). Vrednosti u 2006. godini za ukupne koliformne bakterije, su od 7.0×10^1 do 1.40×10^3 CFU/100ml, prosek 5.65×10^2 CFU/100ml, dok su fekalne koliformne bakterije detektovane samo jednom i to 28. 08. 2006. godine (4×10^1 CFU/100ml) (Tabela 13).

Tabela 13. Broj koliformnih bakterija u otvorenom bunaru br. 1 u 2005. i 2006. godini

Datum uzorkovanja vode	Ukupne koliformne (broj CFU u 100 ml)	Fekalne koliformne (broj CFU u 100 ml)
14.04.2005.	0.00	0.00
25.04.2005.	3.00×10^4	0.00
16.05.2005.	9.50×10^2	0.00
08.06.2005.	1.50×10^4	9.00×10^1
05.07.2005.	4.50×10^3	4.50×10^2
10.10.2005.	9.00×10^1	0.00
Prosek	8.42×10^3	9.00×10^1
24.04.2006.	7.00×10^1	0.00
20.05.2006.	4.50×10^2	0.00
25.06.2006.	1.10×10^3	0.00
23.07.2006.	1.40×10^3	0.00
28.08.2006.	9.50×10^2	4.00×10^1
28.09.2006.	1.50×10^2	0.00
24.10.2006.	2.50×10^2	0.00
07.12.2006.	1.50×10^2	0.00
Prosek	5.65×10^2	5.00

U otvorenom bunaru br. 2, u vodi uzorkovanoj u 2005. godini, detektovano je od 9.00×10^1 do 3.10×10^4 CFU/100ml ukupnih koliformnih bakterija (prosek 1.12×10^4 CFU/100ml) U 2006. godini konstatovano je od 1.50×10^2 do 1.40×10^4 CFU/100ml ukupnih koliformnih bakterija, prosek je 4.29×10^3 CFU/100ml. Broj fekalnih koliformnih bakterije se kretao od 0 do 1.00×10^4 CFU/100ml, prosek 2.17×10^3 CFU/100ml u 2005.g a 2006.g. fekalne koliformne bakterije su detektovane samo 28. 08. 2006. godine (9×10^1 CFU/100ml) (Tabela 14).

Tabela 14. Broj koliformnih bakterija u otvorenom bunaru br. 2 u 2005. i 2006. godini

Datum uzorkovanja vode	Ukupne koliformne (broj CFU u 100 ml)	Fekalne koliformne (broj CFU u 100 ml)
14.04.2005.	9.00×10^1	0.00
25.04.2005.	3.10×10^4	1.00×10^4
16.05.2005.	4.00×10^2	4.00×10^1
08.06.2005.	2.50×10^4	4.50×10^2
05.07.2005.	9.50×10^3	2.50×10^3
10.10.2005.	9.50×10^2	0.00
<i>Prosek</i>	1.12×10^4	2.17×10^3
24.04.2006.	1.50×10^2	0.00
20.05.2006.	2.50×10^2	0.00
25.06.2006.	4.50×10^3	0.00
23.07.2006.	1.40×10^4	0.00
28.08.2006.	9.50×10^3	9.00×10^1
28.09.2006.	2.50×10^3	0.00
24.10.2006.	9.50×10^2	0.00
07.12.2006.	2.50×10^3	0.00
<i>Prosek</i>	4.29×10^3	1.13×10^1

U vodi iz zatvorenog bunara u 2005. godini broj ukupnih koliformnih bakterija je bio od 4.00×10^1 do 3.00×10^5 CFU/100ml (prosek 6.70×10^4 CFU/100ml), U toku 2006. godine, brojnost se kretala od 4.00×10^1 do 1.40×10^4 CFU/100ml, prosečno 5.61×10^3 CFU/100ml.

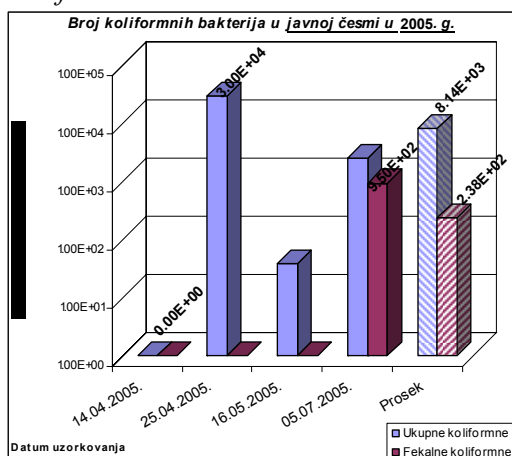
Tabela 15. Broj koliformnih bakterija u zatvorenom bunaru u 2005. i 2006. godini

Datum uzorkovanja vode	Ukupne koliformne (broj CFU u 100 ml)	Fekalne koliformne (broj CFU u 100 ml)
14.04.2005.	4.00×10^1	0.00
25.04.2005.	3.00×10^5	3.00×10^4
16.05.2005.	2.00×10^2	0.00
08.06.2005.	9.50×10^4	9.50×10^2
05.07.2005.	4.50×10^3	1.50×10^2
10.10.2005.	2.50×10^3	4.00×10^1
<i>Prosek</i>	6.70×10^4	5.19×10^3
24.04.2006.	1.10×10^4	4.00×10^1
20.05.2006.	7.50×10^3	7.00×10^1
25.06.2006.	9.50×10^3	3.00×10^2
23.07.2006.	1.40×10^4	1.10×10^3
28.08.2006.	1.50×10^3	9.00×10^1
28.09.2006.	1.10×10^3	9.50×10^2
24.10.2006.	4.00×10^1	0.00
07.12.2006.	2.50×10^2	0.00
<i>Prosek</i>	5.61×10^3	3.19×10^2

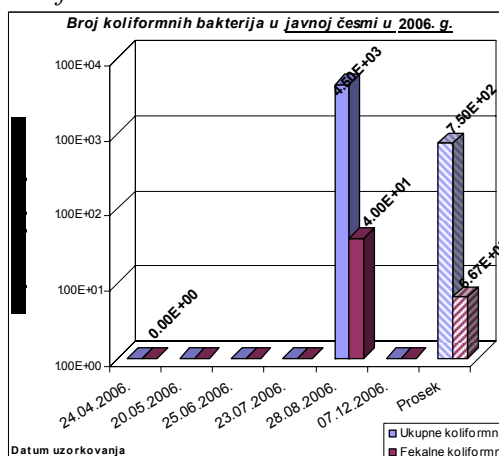
Ukupan broj fekalnih koliformnih bakterija je od 0 do 3×10^4 CFU/100ml (prosek 5.19×10^3 CFU/100ml) u toku 2005.g. dok je 2006.g. bilo od 0 do 1.10×10^3 CFU/100ml (prosek 3.19×10^2 CFU/100ml) (Tabela 15).

U vode sa javne česme u 2005. godini najveća brojnost ukupnih koliformnih bakterija bila je 25. aprila (3.00×10^4 CFU/100ml), dok 14. april uopšte nije bilo. Fekalne koliformne bakterije konstatovane su jedino 5. jula (9.50×10^2 CFU/100ml). Prosečan broj ukupnih koliformnih bakterija je iznosio 8.14×10^3 CFU/100ml, a fekalnih koliformnih bakterija 2.38×10^2 CFU/100ml (Grafik 1). U terminima 8. jun i 10. oktobar iste godine, česma je bila pod vodom (potopljena) zbog obilnih kišnih padavina.

Grafik 1.



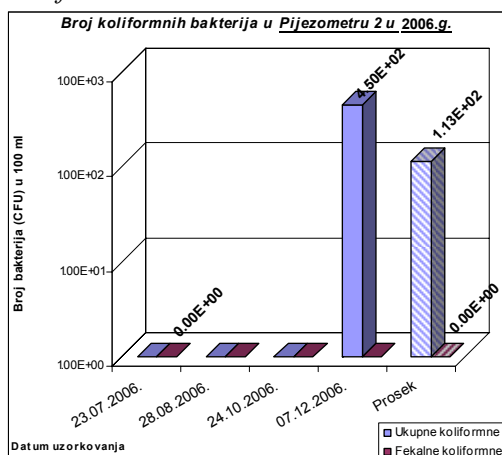
Grafik 2.



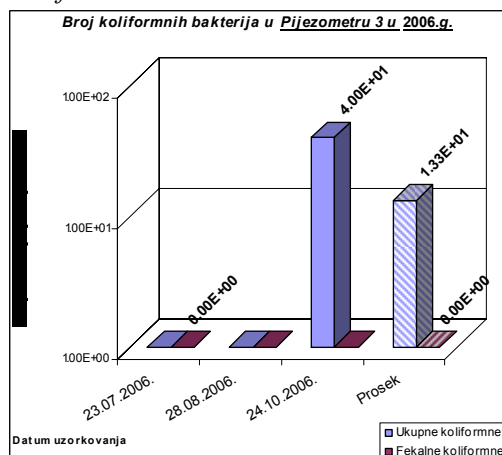
Tokom 2006. godine, 24. april, 20. maj, 25. jun, 23. jul i 7. decembar nije detektovano prisustvo ukupnih i fekalnih koliformnih bakterija., a 28. avgust broj ukupnih koliformnih bakterija iznosio 4.50×10^3 CFU/100ml, i fekalnih 4×10^1 CFU/100ml. Prosečna vrednost za ukupne koliformne bakterije je bila 7.50×10^2 CFU/100ml, a za fekalne 6.67 CFU/100ml (Grafik 2). Česma je bila pod vodom zbog obilnih padavina. 28. septembra i 24. oktobra.

Tokom 2006.g. ukupne koliformne bakterije detektovane su u pijezometru 2, 3, 4 i 5. Najveći broj je u pijezometru br. 4 (prosečno 7.99×10^3 CFU/100ml). Fekalne koliformne bakterije konstatovane su samo u pijezometru br. 4 i to 23. jul (4.50×10^3 CFU/100ml) i 28. avgust (2.50×10^3 CFU/100ml), prosek je iznosio 1.75×10^3 CFU/100ml (Grafici 3, 4, 5 i 6).

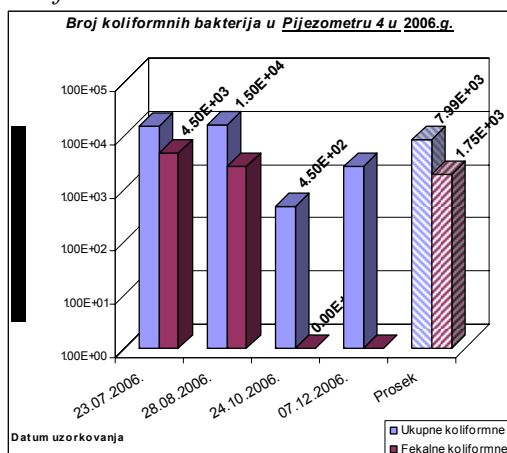
Grafik 3.



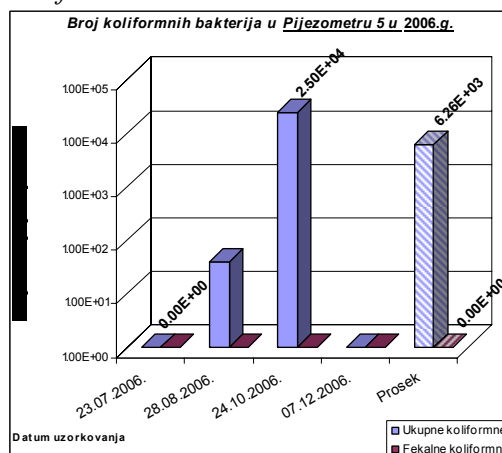
Grafik 4.



Grafik 5.



Grafik 6.



U pijezometru br. 3, 7. decembra, nije bilo vode, dok u pijezometru br. 6 samo u jednom terminu bilo vode (23. jul), i tada nije konstatovano prisustvo ukupnih i fekalnih koliformnih bakterija. U ostalim terminima u ovom pijezometru nije bilo vode (28. avgust, 24. oktobar i 7. decembar).

5.1.2. Identifikacija vrsta patogenih bakterija u vodi O.Š.D. Radmilovac

Morfološke (odgajivačke,) osobine izolovanih kolonija- svi izolovani sojevi su ravnomerno mutili hranjivi bujon. Kolonije *E. coli 1* na EMB agaru su bile veličine 2-3 mm u prečniku, zeleno-metalik boje, koje odbijaju svetlost i imaju tamno purpurni centar koji propušta svetlost. Na hranjivom agaru, *E. coli 1* je obrazovala bele i sjajne kolonije, dok je hranjivi bujon mutila i stvarala praškast talog. *E. coli 1* je menjala boju

MacConkey-evog bujona u žutu i izdvajao se gas u Durham-ovim cevčicama. Na krvnom agaru, kolonije su pokazivale β – hemolizu.

Sojevi *Citrobacter freundii* na EMB agaru stvaraju sitne kolonije, roze boje sa tamnim centrom u sredini. Sojevi *Klebsiella pneumoniae* na EMB agaru stvaraju krupne, sluzave, pihijaste kolonije, a kolonije sojeva *Enterobacter aerogenes* su roze, prelivaju se sa sivo-braon centrom koji propusta svetlosne zrake.

Aeromonas hydrophila 1 je na m-*Aeromonas* Selective Agar Base stvara sitne do srednje veličine žute kolonije, glatke, sjajne.

Na Salmonella/Shigella Agar (SS Agar), izolovani sojevi *Salmonella spp.* stvaraju kolonije crne boje (H_2S^+), dok su kolonije sojeva *Shigella spp.* karakteristične žute boje.

Morfološke karakteristike ćelija - sve izolovane bakterije su Gram-negativne, asporogene, pokretne, izuzev *Klebsiella pneumoniae* koja je nepokretna i stvara kapsule. Oblik ćelija izolovanih sojeva je štapićast, izuzev ćelija *Citrobacter freundii* koji u obliku kokobacila. Ćelije su pojedinačne ili su palisadnog rasporeda. Veličina ćelija izolovanih bakterija je u opsegu $1-3 \times 0.4-0.7 \mu m$.

Ekološke karakteristike- izolovani sojevi bakterija dobro rastu u opsegu pH od 6.0 do 8.0, na temperaturi od 25°C do 44°C. U odnosu na kiseonik, su fakultativno anaerobne bakterije.

Biohemijske osobine su potvrdile pripadnost izolovanih sojeva datim vrstama. Sojevi *E. coli 1* produkuj indol i imaju pozitivnu Methyl-Red (MR) reakciju, dok je Voges-Proskauer (VP) test negativan i ne koriste citrate. Za razliku od *E. coli*, sojevi *Klebsiella pneumoniae* i *Enterobacter aerogenes* ne stvaraju indol, MR reakcija je negativna, a VP reakcija pozitivna i koriste citrate. Izolati *Salmonella spp.* stvaraju vodonok-sulfid (H_2S^+), a sojevi *Shigella spp.* ne.

Na osnovu API testa i prema softveru API-WEB tačnost identifikovanih sojeva je iznosila preko 99.8%. Potvrđeno je prisustvo: *Escherichia coli 1*; *Citrobacter freundii*; *Klebsiella pneumoniae*; *Aeromonas hydrophila 1*; *Enterobacter aerogenes*; *Salmonella spp.*; *Shigella spp.*

U gornjem delu vodotoka "Šugavac" identifikovane su : *Escherichia coli 1*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae* i *Aeromonas hydrophila 1*, dok su u

donjem delu ovog vodotoka, pored ovih vrsta, identifikovane još i *Salmonella spp.* i *Shigella spp.*

U otvorenom bunaru br. 1 bile su prisutne vrste: *Escherichia coli 1*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aeromonas hydrophila 1* i *Enterobacter aerogenes*, a u otvorenom bunaru br. 2 su pored *Escherichia coli 1* i *Aeromonas hydrophila 1*, bile prisutne i *Salmonella spp.* i *Shigella spp.*

U uzorcima vode iz zatvorenog bunara detektovane su i identifikovane sledeće vrste patogenih bakterija: *Escherichia coli 1*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aeromonas hydrophila 1* i *Salmonella spp.*

Voda iz javne česme je bila kontaminirana vrstama: *Escherichia coli 1*, *Aeromonas hydrophila 1* i *Salmonella spp.* (Tabela 16).

U pijezometrima detektovane su: *Escherichia coli 1*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella spp.*

Tabela 16. Identifikovane patogene bakterije u vodama O.Š.D. Radmilovac

Bakterije \ Vode	Šugavac-gornji deo	Šugavac-dornji deo	Otvoreni bunar 1	Otvoreni bunar 2	Zatvoreni bunar	Javna česma	Pijezometri
<i>Escherichia coli 1</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Citrobacter freundii</i>	+	+	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	-	+	-	+
<i>Aeromonas hydrophila 1</i>	+	+	+	+	+	+	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-	+	-	-	-	-
<i>Salmonella spp.</i>	-	+	-	+	+	+	+
<i>Shigella spp.</i>	-	+	-	+	-	-	-

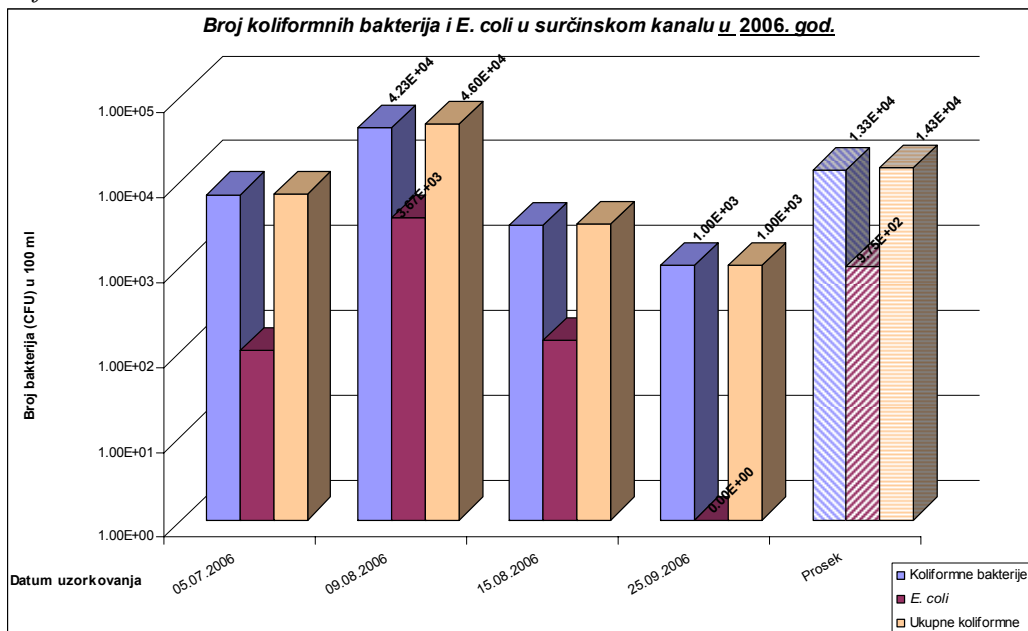
5.1.3. Mikrobiološki kvalitet vode u melioracionom kanalu u Surčinu

Broj koliformnih bakterija i *E. coli* u melioracionom kanalu u Surčinu je određen na visoko-selektivnoj hromogenoj podlozi Selective-E.coli/coliform-chromogenic-medium (CM1046) (Oxoid, Hampshire, UK).

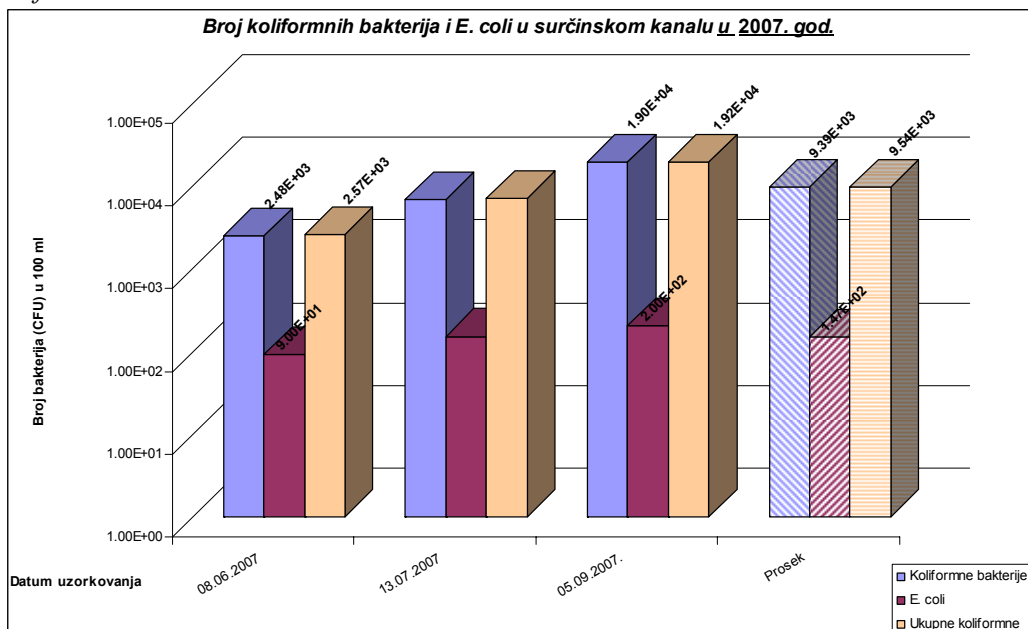
Broj koliformnih bakterija u 2006. godini se kretao od 1.00×10^3 do 4.23×10^4 CFU/100ml (prosek 1.33×10^4 CFU/100ml). Broj *E. coli* je iznosio od 0 do

3.67×10^3 CFU/100ml (prosek 9.75×10^2 CFU/100ml. Prosečna vrednost za ukupne koliformne bakterije (zbir koliformnih bakterija i *E. coli*) u ispitivanom periodu je 1.43×10^4 CFU/100ml (Grafik 7).

Grafik 7.

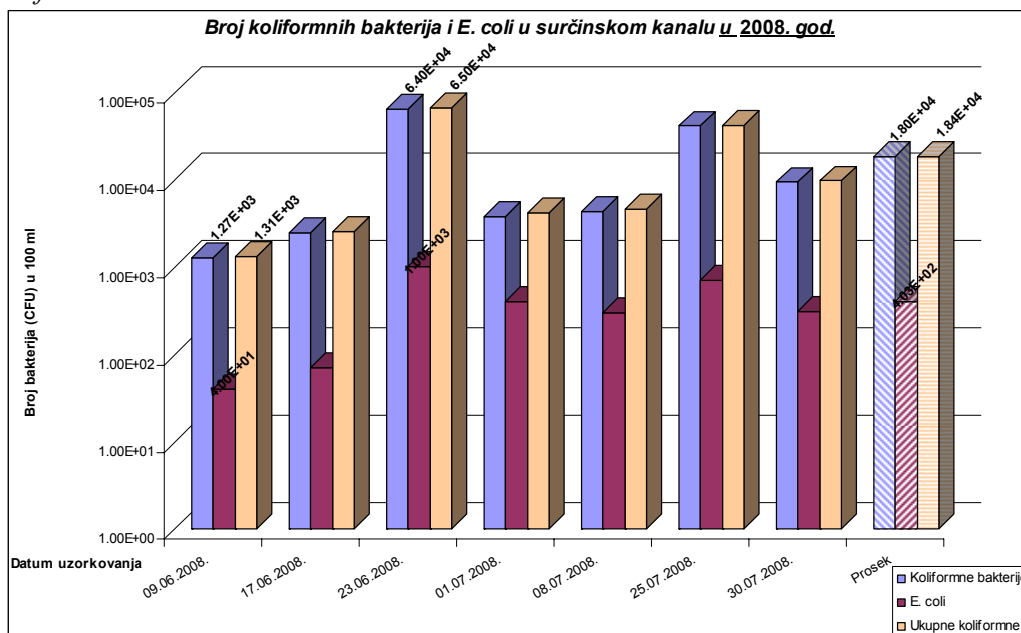


Grafik 8.



U toku 2007. g. prosečna vrednost koliformnih bakterija je 9.39×10^3 CFU/100ml a *E. coli* 1.47×10^2 CFU/100ml. Prosečan broj ukupnih koliformnih bakterija je bio 9.54×10^3 CFU/100ml (Grafik 8).

Grafik 9.



Tokom 2008. godine, u vodi surčinskog kanala broj koliformnih bakterija je varirao od 1.27×10^3 do 6.40×10^4 CFU/100ml. Broj *E. coli* varirao je od 4.00×10^1 do 1.00×10^3 CFU/100ml. Prosečna vrednost ukupnih koliformnih bakterija je iznosila 1.84×10^4 CFU/100ml (Grafik 9).

5.1.4. Identifikacija patogenih bakterija u vodi melioracionog kanala u Surčinu

Morfologija kolonija- sojevi *E. coli* 2, *E. vulneris* i *E. adecarboxylata* na EMB agaru daju karakteristične kolonije sa metalnim sjajem. Sojevi *Vibrio fluvialis* na istoj podlozi imaju glatke i sjajne sitne kolonije 2-4 mm u prečniku, roze boje sa prozračnom zonom oko kolonija. Kolonije *Yersinia enterocolitica* na EMB agaru su sitne, glatke površine, okruglog oblika, roze boje sa tamno-crvenim centrom. Vrsta *Aeromonas hydrophila* 1 na podlozi m-*Aeromonas* Selective Agar Base stvara tipične žute kolonije.

Morfologija ćelija izolovanih sojeva- ćelije su štapićastog oblika, jedino vrste *Vibrio fluvialis* su blago izvijeni štapići. Svi sojevi su Gram-negativni, asporogeni, pokretni.

Ispitivanja *ekoloških karakteristika* sojeva pokazuju da se vrste *E. coli* 2, *E. vulneris* i *E. adecarboxylata* dobro razvijaju na temperaturi 25°C-44°C, u intervalu pH vrednosti 5.0–9.0. Sojevi *Vibrio fluvialis*, se najbolje razvijaju na temperaturi od 20°C do 42°C i intervalu pH vrednosti od 7.5 do 8.5. *Yersinia enterocolitica* se najbolje razvija na temperaturi 20–35°C i pH opsegu od 5.0 do 9.5. U odnosu na kiseonik, svi sojevi pripadaju fakultativno anaerobnim bakterijama.

U pogledu *biohemijskih osobina*, izolovane bakterije su karakteristične za vrstu kojoj pripadaju. Konstatovano jeu okviru vrste *Vibrio fluvialis* dva tipa soja koji se delimično razlikuju u biohemijskim karakteristikama.

Iz uzoraka kanalske vode na lokaciji Surčina identifikovane su *E. coli* 2;*E. vulneris*;*E. adecarboxylata*; *Vibrio fluvialis* (dva različita soja u pogledu biohemijskih osobina); *Yersinia enterocolitica*; *Aeromonas hydrophila* 1

Na osnovu API testa i prema softveru API–WEB tačnost identifikovanih sojeva je iznosila preko 98.7%.

5.1.5. Mikrobiološki kvalitet vode u melioracionom kanalu u Negotinu

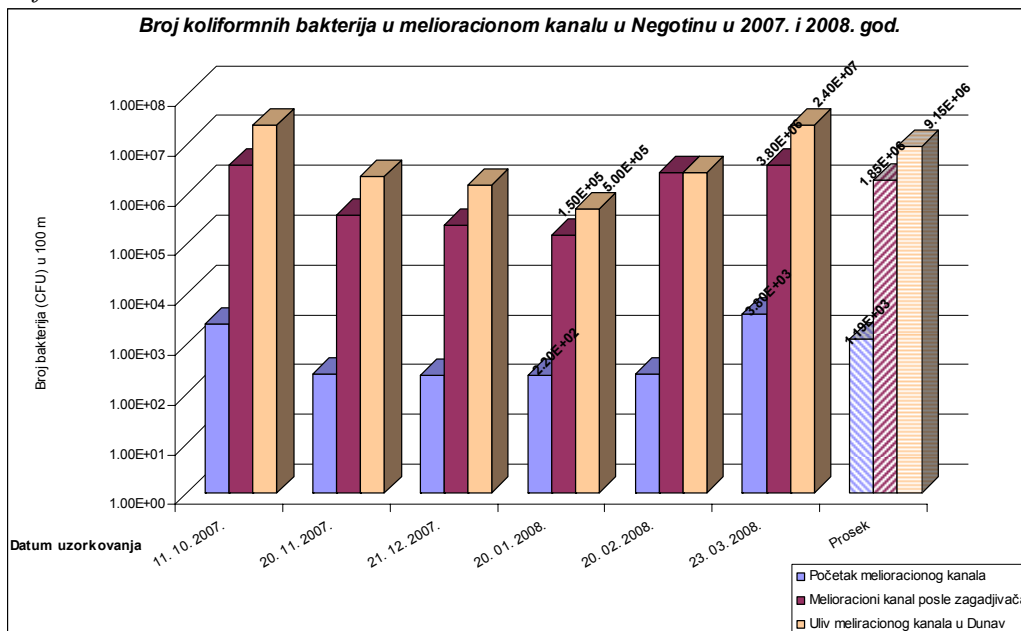
Broj ukupnih koliformnih bakterija je određen MPN metodom na Laktoza-Andrade-Peptonskoj vodi (Torlak, Beograd) sa Durham-ovim cevčicama.

Broj koliformnih bakterija u dela kanala koji se uliva u Dunav se kretao od 5.00×10^5 do 2.40×10^7 CFU/100ml, (prosek 9.15×10^6 CFU/100ml). Najveća brojnost koliformnih bakterija je konstatovana u oktobru i martu.

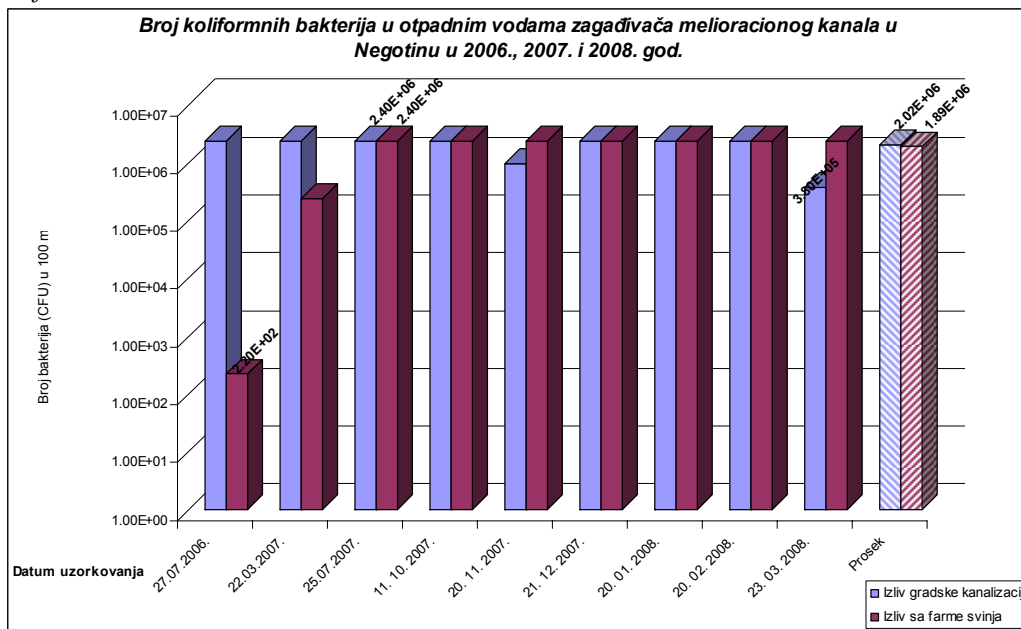
U vodi središnjeg dela melioracionog kanala (mesto posle ulivanja otpadnih voda) broj koliformnih bakterija se kretao od 1.50×10^5 do 3.80×10^6 CFU/100ml, (prosek 1.85×10^6 CFU/100ml). Koliformne bakterije su bile najbrojnije u oktobru, februaru i martu.

U početnom delu melioracionog kanala, konstatovana je najmanja brojnost koliformnih bakterija od 2.20×10^2 do 3.80×10^3 CFU/100ml. Najveća brojnost je u oktobru i martu (*Grafik 10*).

Grafik 10.



Grafik 11.



Na lokaciji ulivanja otpadne vode gradske kanalizacije u melioracioni kanal konstatovana je prosečna brojnost koliformnih bakterija 2.02×10^6 CFU/100ml.

Na mestu ulivanja otpadne vode sa farme svinja u kanal, broj koliformnih bakterija iznosio je od 2.20×10^2 do 2.40×10^6 CFU/100ml. Intenzitet kontaminacije je bio ujednačen, izuzev jula 2006. g., kada je farma radila manjim kapacitetom (*Grafik 11*).

5.1.6. Identifikacija patogenih bakterija u vodi melioracionog kanala u Negotinu

Morfološke osobine kolonija- E. coli 1 na EMB agaru stvara karakteristične kolonije metalnog sjaja, na ChromID™ O157:H7 Agar su indigo-plave boje. Vrsta *Echerichia coli O157:H7* na visoko selektivnoj hranljivoj podlozi ChromID™ O157:H7 Agar je stvara tipične okrugle, glatke i sjajne kolonije zelene boje, 2–5 mm u prečniku. Na hranjivom agaru obrazuje bele, sjajne kolonije, u hranljivom bujonu stvara zamućenje i praškasti talog. Kolonije *Salmonella spp.* i *Shigella spp.* na Salmonella/Shigella Agar (SS Agar) su tipične za ove vrste bakterija.

Morfološke osobine ćelija- izolovane bakterije su štapićaste, izuzev vrste *Citrobacter freundii* koja je kokobacil, asporogene, Gram-negativne i pokretne. Veličina ćelija vrste *Echerichia coli O157:H7* je $1.5-2.0 \times 0.4-0.8 \mu\text{m}$.

Ekološke karakteristike ispitivanih sojeva patogenih bakterija su tipične za identifikovane vrste. Vrsta *Echerichia coli O157:H7* se dobro razvija na temperaturi od 25°C do 44°C, i intervalu pH 6.0–8.0. Svi sojevi su fakultativni anaerobi. *Biohemijske osobine* ispitivanih sojeva su pokazale da vrsta *Echerichia coli O157:H7* ima veoma slične osobine kao *E. coli 1*. Razlika je u fermentaciji sorbitola. Identifikacija soja *Echerichia coli O157:H7* je potvrđena i aglutinacionim testom.

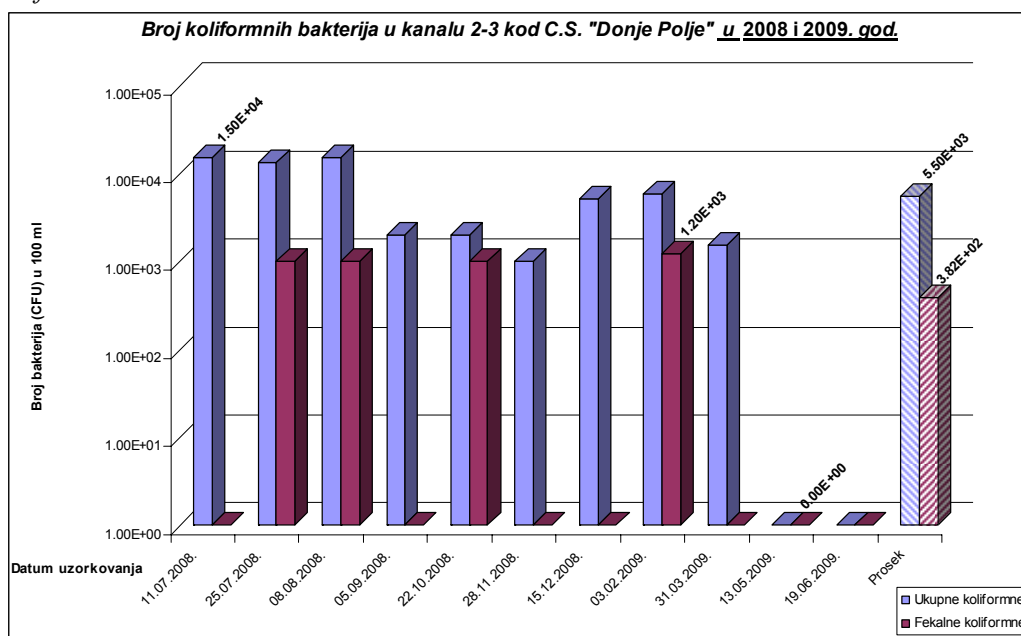
U uzorcima vode melioracionog kanala na lokaciji Negotina identifikovane su: *E. coli 1*; *E. coli O157 :H7*; *Citrobacter freundii*; *Salmonella spp*; *Shigella spp.*; *Proteus spp.*; *Aeromonas hydrophila 1*. Prema API sistemu identifikacije i API–WEB softveru, preciznost identifikacije izolovanih sojeva je iznosila više od 98%.

5.1.7. Mikrobiološki kvalitet vode kanala sliva "Donje polje" i kanala "Galovica"

Broj ukupnih i fekalnih koliformnih bakterije određen je primenom Coliform-Count-Plate (EC) petrifilm (3M, USA).

U vodi kanala 2-3 pored C.S. "Donje polje" konstatovano je od 0 do 1.50×10^4 CFU/100ml ukupnih koliformnih i od 0 do 1.20×10^3 CFU/100ml fekalnih koliformnih bakterija. Tokom ispitivanja prisustvo fekalnih koliformnih bakterija nije detektovano u sedam terimina, a ukupnih koliformnih bakterija u dva termina. Brojnost obe grupe bakterija je bila izraženija u toplijem delu godine (Grafik 12).

Grafik 12.



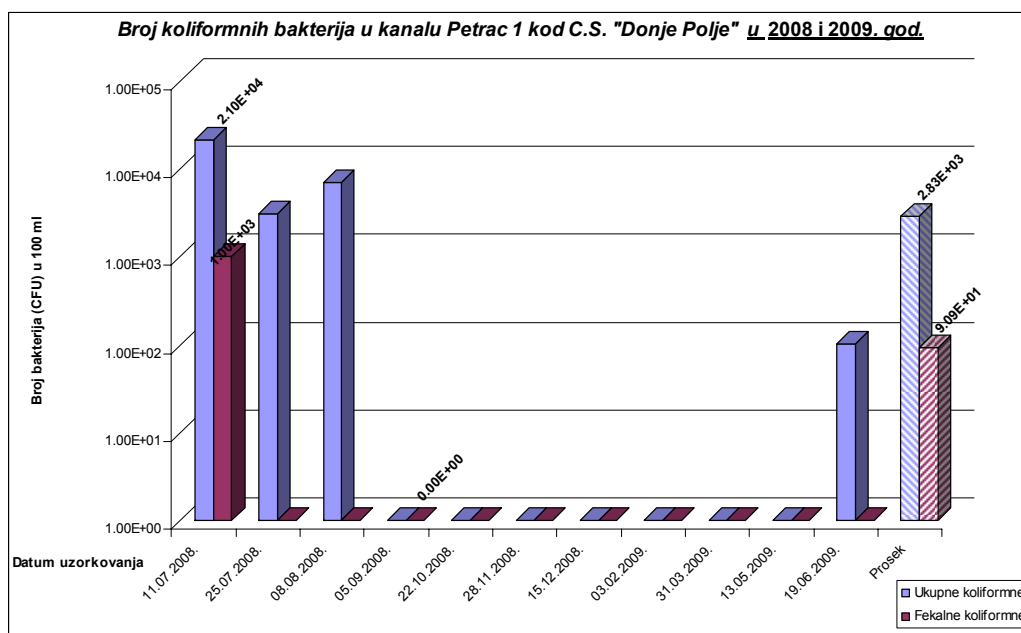
Od patogenih bakterija, u vodi kanala 2-3 kod C.S. "Donje polje", konstatovano je prisustvo *Aeromonas spp.* (8.00×10^2 – 5.00×10^4 CFU/100ml) i *E. coli* O157:H7 (5.00×10^1 - 2.00×10^4 CFU/100ml). Brojnost *Salmonella spp.* je od 8.00×10^1 - 5.00×10^2 CFU/100ml i *E.coli* od 2.00×10^1 – 1.50×10^2 CFU/100ml). U junu i decembru nije konstatovano prisustvo patogenih vrsta bakterija (Tabela 17).

Tabela 17. Broj patogenih bakterija u kanalu 2-3 kod C.S. "Donje Polje"

Datum uzorkovanja	Broj patogenih bakterija (u 100 ml)			
	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Aeromonas</i> spp.
11. 07. 2008.	2.0×10^1	5.0×10^1	1.6×10^2	2.3×10^4
25. 07. 2008.	9.0×10^1	3.52×10^3	8.0×10^1	2.3×10^4
08. 08. 2008.	6.0×10^1	5.2×10^3	1.0×10^2	6.6×10^3
05. 09. 2008.	0	1.2×10^2	0	4.0×10^3
22. 10. 2008.	1.5×10^2	4.0×10^2	1.5×10^2	4.5×10^4
28. 11. 2008.	0	5.0×10^1	0	8.0×10^2
15. 12. 2008.	0	0	0	0
03. 02. 2009.	5.0×10^1	1.0×10^2	1.0×10^2	1.65×10^3
31. 03. 2009.	0	2.0×10^4	5.0×10^2	3.4×10^4
13. 05. 2009.	0	0	0	5.0×10^4
19. 06. 2009.	0	0	0	0
Prosek	3.36×10^1	2.68×10^3	9.91×10^1	1.71×10^4

U vodi kanala "Petrac 1" kod C.S. "Donje Polje" ukupne koliformne bakterije su konstatovane četiri puta u letnjim mesecima (prosek 2.83×10^3 CFU/100ml) (Grafik 13). Fekalne koliformne bakterije su detektovane samo u julu i brojnost je iznosila 1.00×10^3 CFU/100ml.

Grafik 13.



Na lokaciji kanala "Petrac 1" kod C.S. "Donje Polje" među patogenim vrstama bakterija, najbrojniji je *Aeromonas spp.*, (prosek 2.62×10^4 CFU/100ml). Broj *E. coli* O157:H7 se kretala od 3.00×10^1 do 4.50×10^3 CFU/100ml. Vrste *E. coli* i *Salmonella spp.* su imale manju brojnost, koja je prosečno iznosila 2.86×10^1 CFU/100ml i 2.59×10^1 CFU/100ml. Sve vrste bakterija bile su detektovane samo u letnjim mesecima (Tabela 18).

Tabela 18. Broj patogenih bakterija u kanalu Petrac 1 kod C.S. "Donje Polje"

Datum uzorkovanja	Broj patogenih bakterija (u 100 ml)			
	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>Salmonella spp.</i>	<i>Aeromonas spp.</i>
11. 07. 2008.	7.0×10^1	3.0×10^1	4.0×10^1	3.3×10^4
25. 07. 2008.	3.0×10^1	8.8×10^2	6.0×10^1	9.0×10^3
08. 08. 2008.	1.5×10^2	4.5×10^3	8.5×10^1	7.3×10^3
05. 09. 2008.	0	0	0	0
22. 10. 2008.	0	1.5×10^2	1.0×10^2	2.5×10^2
28. 11. 2008.	0	0	0	0
15. 12. 2008.	0	0	0	0
03. 02. 2009.	0	0	0	0
31. 03. 2009.	0	0	0	0
13. 05. 2009.	0	0	0	2.9×10^4
19. 06. 2009.	6.5×10^1	2.4×10^2	0	2.1×10^5
Prosek	2.86×10^1	5.27×10^2	2.59×10^1	2.62×10^4

U kanalu *Petrac 1* kod C.S. "Petrac" prosečan broj ukupnih koliformnih bakterija je 4.92×10^3 CFU/100ml, dok su fekalne koliformne bakterije konstatovane samo tokom uzorkovanja u jul 2008. i julu 2009. godine (Grafik 14).

U vodi ovog kanala, od patogenih vrsta bakterija, najbrojniji je *Aeromonas spp.*, (prosek je 5.55×10^4 CFU/100ml), a najmanja brojnost je *Salmonella spp.*, prosek 1.01×10^2 CFU/100ml (Tabela 19).

Grafik 14.

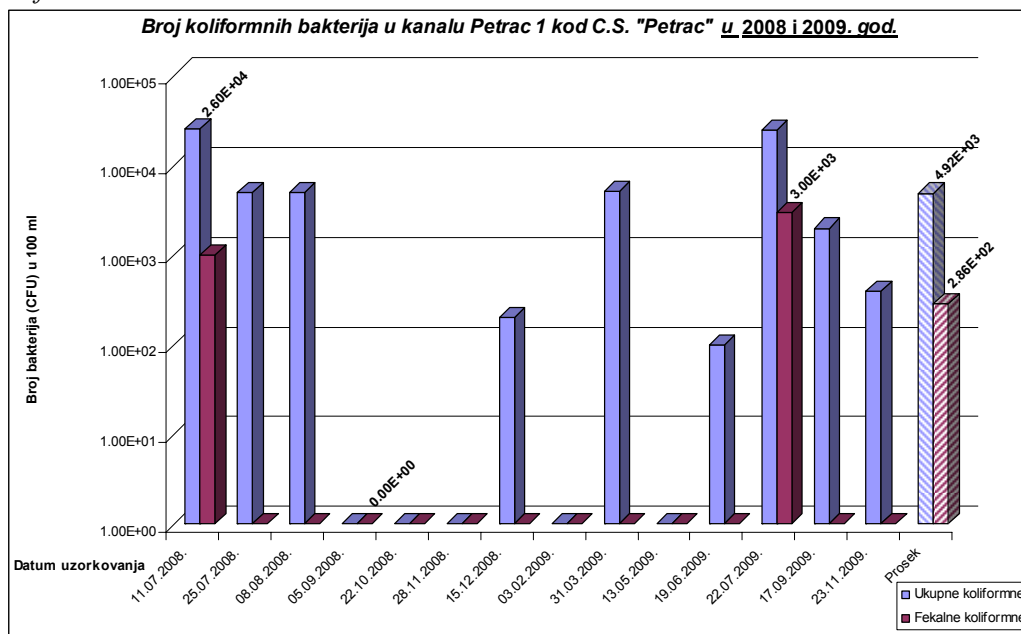


Tabela 19. Broj patogenih bakterija u kanalu Petrac 1 kod C.S. "Petrac"

Datum uzorkovanja	Broj patogenih bakterija (u 100 ml)			
	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>Salmonella spp.</i>	<i>Aeromonas spp.</i>
11. 07. 2008.	6.8×10^2	4.0×10^1	1.0×10^2	4.6×10^4
25. 07. 2008.	3.5×10^2	1.0×10^3	6.0×10^1	2.8×10^4
08. 08. 2008.	1.4×10^2	3.0×10^2	8.5×10^1	5.0×10^2
05. 09. 2008.	0	0	0	1.4×10^3
22. 10. 2008.	0	0	0	0
28. 11. 2008.	0	0	0	0
15. 12. 2008.	0	2.0×10^2	3.0×10^1	5.0×10^1
03. 02. 2009.	0	0	0	0
31. 03. 2009.	1.3×10^3	1.25×10^4	1.0×10^3	5.6×10^4
13. 05. 2009.	0	0	0	6.5×10^4
19. 06. 2009.	0	0	0	1.5×10^3
22. 07. 2009.	1.0×10^2	3.5×10^4	1.0×10^2	5.8×10^5
17. 09. 2009.	6.5×10^1	0	4.0×10^1	2.1×10^3
23. 11. 2009.	0	0	0	2.3×10^3
Prosek	1.88×10^2	3.51×10^3	1.01×10^2	5.55×10^4

U vodi kanala *Petrac 3 kod C.S. "Novi Fenek"* ukupne koliformne bakterije su detektovane tokom četiri, a fekalne tokom dva uzorkovanja (avgust i decembar 2008.). Prosečan broj ukupnih koliformnih bakterija, za ceo period istraživanja, je iznosio 2.31×10^3 CFU/100ml, a fekalnih 3.20×10^2 CFU/100ml (*Grafik 15*).

Grafik 15.

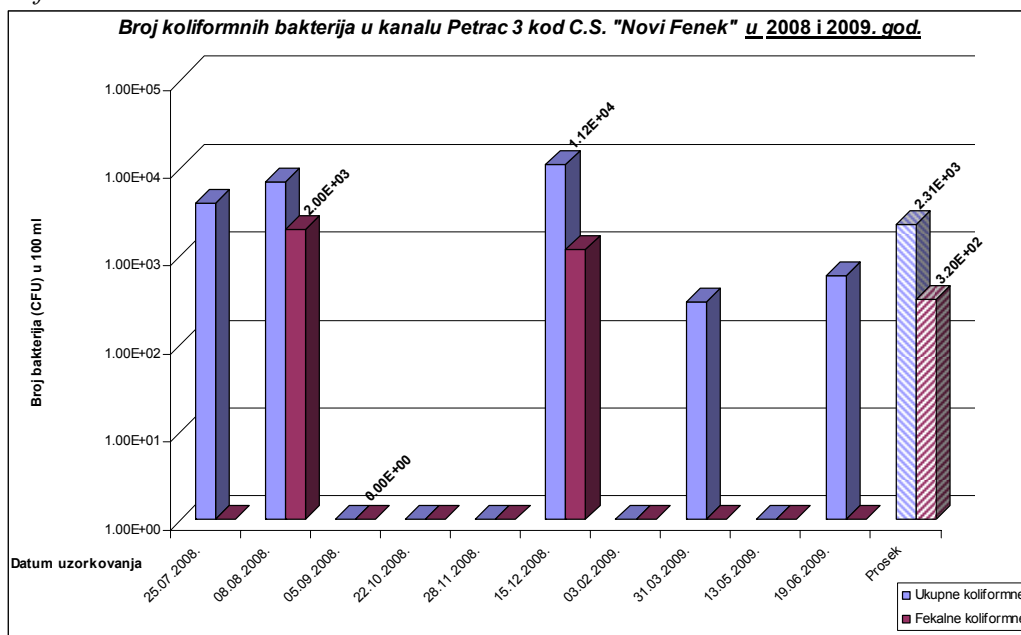


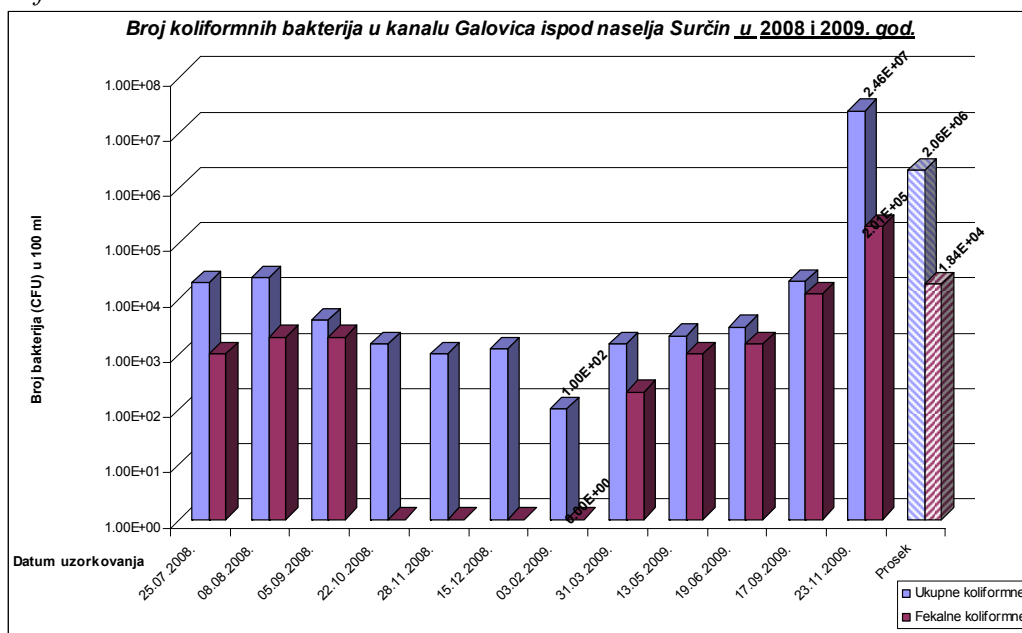
Tabela 20. Broj patogenih bakterija u kanalu Petrac 3 kod C.S. "Novi Fenek"

Datum uzorkovanja	Broj patogenih bakterija (u 100 ml)			
	<i>E. coli</i>	<i>E. coli O157:H7</i>	<i>Salmonella spp.</i>	<i>Aeromonas spp.</i>
25. 07. 2008.	0	1.0×10^2	2.0×10^2	1.5×10^3
08. 08. 2008.	5.0×10^2	1.5×10^2	4.5×10^2	3.0×10^3
05. 09. 2008.	0	0	0	0
22. 10. 2008.	0	0	0	0
28. 11. 2008.	0	0	0	2.0×10^2
15. 12. 2008.	7.0×10^2	2.1×10^4	1.0×10^2	4.0×10^2
03. 02. 2009.	0	0	0	0
31. 03. 2009.	0	0	0	5.4×10^4
13. 05. 2009.	0	0	0	5.0×10^3
19. 06. 2009.	3.6×10^2	5.0×10^3	5.0×10^2	3.0×10^3
Prosek	1.56×10^2	2.61×10^3	1.25×10^2	6.66×10^3

Ispitivane patogene vrste bakterija su bile periodično prisutne u vodi kanala Petrac 3 kod C.S. "Novi Fenek". *Aeromonas spp.* je detektovan tokom sedam uzorkovanja vode, *E. coli* O157:H7 i *Salmonella spp.* tokom četiri uzorkovanja i *E. coli* tokom tri uzorkovanja vode. U pogledu brojnosti nije bilo izrazitih razlika, s tim što su *Aeromonas spp.* i *E. coli* O157:H7 nešto brojnije (prosek 6.66×10^3 CFU/100ml i 2.61×10^3 CFU/100ml) (Tabela 20).

U kanalu Galovica na lokaciji ispod naselja Surčin broj ukupnih koliformnih bakterija se kretao od 1.00×10^2 do 2.46×10^7 CFU/100ml, a fekalnih od 0 do 2.01×10^5 CFU/100ml. Prosek za ukupne fekalne bakterije je 2.06×10^6 CFU/100ml a fekalne 1.84×10^4 CFU/100ml (Grafik 16).

Grafik 16.



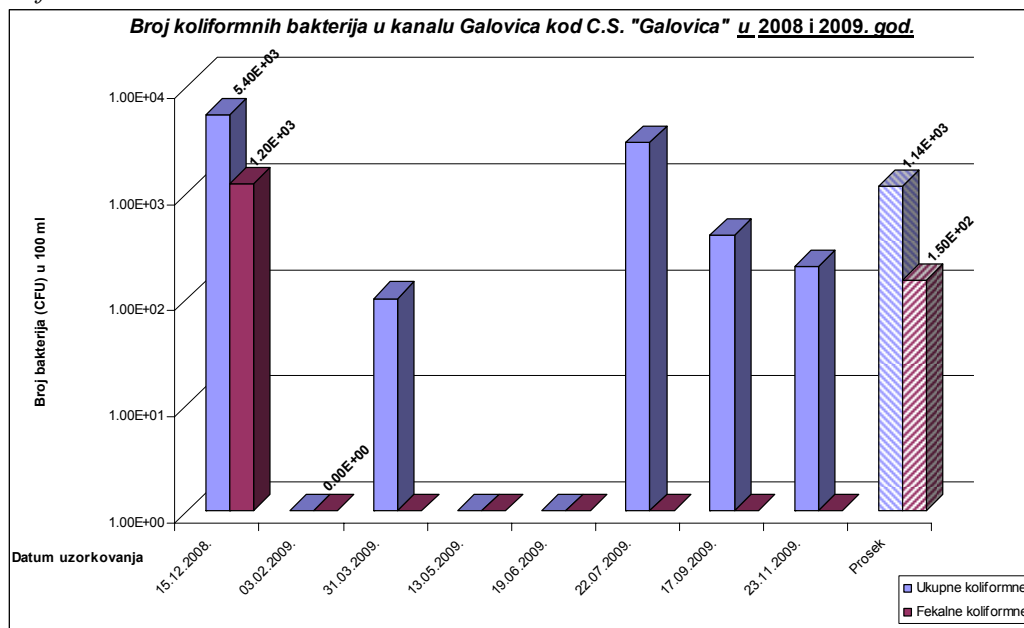
U vodi kanala Galovica konstatovana je visoka brojnost ispitivanih vrsta patogenih bakterija izuzev u decembru 2008. i februaru 2009. godine. Najveća brojnost je konstatovana za *E. coli* (prosek 2.02×10^5 CFU/100ml), *Aeromonas spp.* prosek 2.45×10^4 CFU/100ml i *E. coli* O157:H7 prosek 1.41×10^3 CFU/100ml, *Salmonella spp.* prosek 6.16×10^2 CFU/100ml) (Tabela 21).

Tabela 21. Broj patogenih bakterija u kanalu Galovica ispod naselja Surčin

Datum uzorkovanja	Broj patogenih bakterija (u 100 ml)			
	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Aeromonas</i> spp.
25. 07. 2008.	1.4×10^2	1.8×10^3	8.0×10^1	2.2×10^4
08. 08. 2008.	1.8×10^3	1.0×10^3	3.5×10^2	2.4×10^3
05. 09. 2008.	2.1×10^3	1.8×10^2	1.8×10^2	3.5×10^2
22. 10. 2008.	1.0×10^3	3.0×10^2	2.0×10^2	5.0×10^1
28. 11. 2008.	2.0×10^2	1.0×10^2	5.0×10^1	0
15. 12. 2008.	0	0	0	0
03. 02. 2009.	0	0	0	0
31. 03. 2009.	9.0×10^2	5.0×10^2	0	6.7×10^4
13. 05. 2009.	1.5×10^4	0	4.3×10^2	5.0×10^3
19. 06. 2009.	5.0×10^2	3.5×10^3	0	3.2×10^4
17. 09. 2009.	9.0×10^2	9.6×10^3	2.6×10^3	7.0×10^2
23. 11. 2009.	2.4×10^6	0	3.5×10^3	1.7×10^5
Prosek	2.02×10^5	1.41×10^3	6.16×10^2	2.45×10^4

U kanalu Galovica kod C.S. "Galovica", prosečna vrednost ukupnih koliformnih bakterije, u ispitivanom periodu, je 1.14×10^3 CFU/100ml, a fekalnih 1.50×10^2 CFU/100ml. Najveća brojnost koliformnih bakterija je u decembru 2008. i julu 2009. god. (Grafik 17).

Grafik 17.

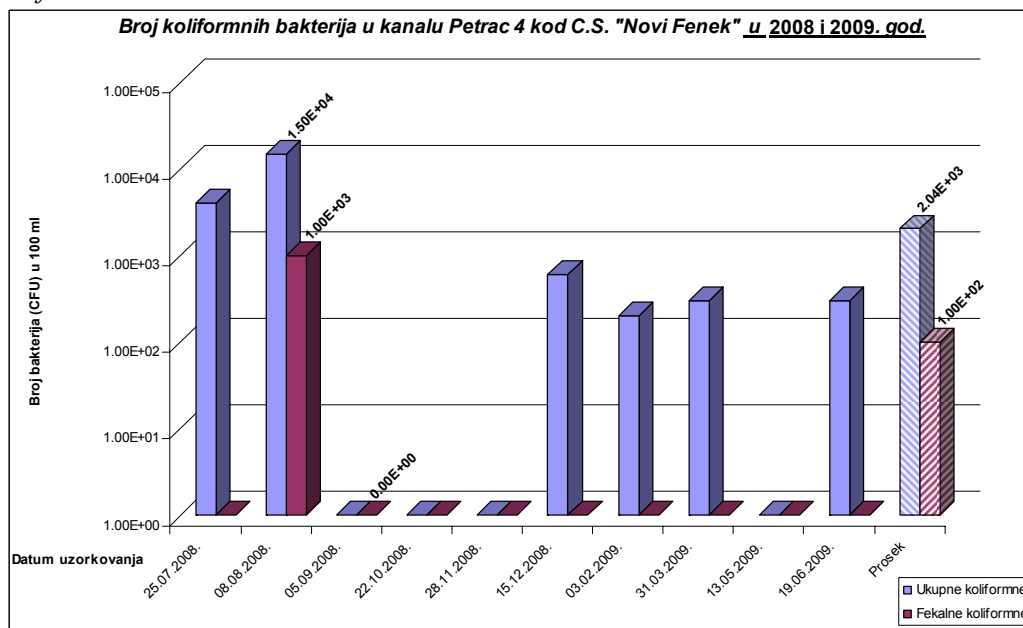


U vodi kanala Galovica kod C.S. "Galovica", konstantna je najveća brojnost *Aeromonas spp.* (prosek 6.33×10^4 CFU/100ml) a najmanja *Salmonella spp.* Sve vrste ispitivanih patogenih bakterija su prisutne u vodi uzorkovanoj u decembru 2008. i julu 2009. godine (Tabela 22).

Tabela 22. Broj patogenih bakterija u kanalu Galovica kod C.S. "Galovica"

Datum uzorkovanja	Broj patogenih bakterija (u 100 ml)			
	<i>E. coli</i>	<i>E. coli O157:H7</i>	<i>Salmonella spp.</i>	<i>Aeromonas spp.</i>
15. 12. 2008.	1.8×10^3	1.0×10^3	1.5×10^2	2.6×10^3
03. 02. 2009.	0	0	0	3.1×10^3
31. 03. 2009.	5.0×10^2	5.0×10^2	0	4.0×10^4
13. 05. 2009.	0	0	0	3.5×10^4
19. 06. 2009.	0	0	0	5.3×10^4
22. 07. 2009.	2.0×10^2	2.0×10^3	2.3×10^2	3.7×10^5
17. 09. 2009.	0	5.0×10^1	0	3.1×10^3
23. 11. 2009.	1.0×10^2	0	0	3.0×10^2
Prosek	3.25×10^2	4.44×10^2	4.75×10^1	6.33×10^4

Grafik 18.



U kanalu Petrac 4 kod C.S. Novi Fenek fekalne koliformne bakterije su detektovane u avgustu 2008. i njihov broj je iznosio 1.00×10^3 CFU/100ml. Ukupne

koliformne bakterije su detektovane u šest termina uzorkovanja, a njihova prosečna vrednost je 2.04×10^3 CFU/100ml (Grafik 18).

U kanalskoj vodi na lokalitetu C.S. "Novi Fenek" *E. coli*, *E. coli O157:H7*, *Salmonella spp.*, *Aeromonas spp.* su detektovane u julu i avgustu 2008. godine.

Tabela 23. Broj patogenih bakterija u kanalu Petrac 4 kod C.S. "Novi Fenek"

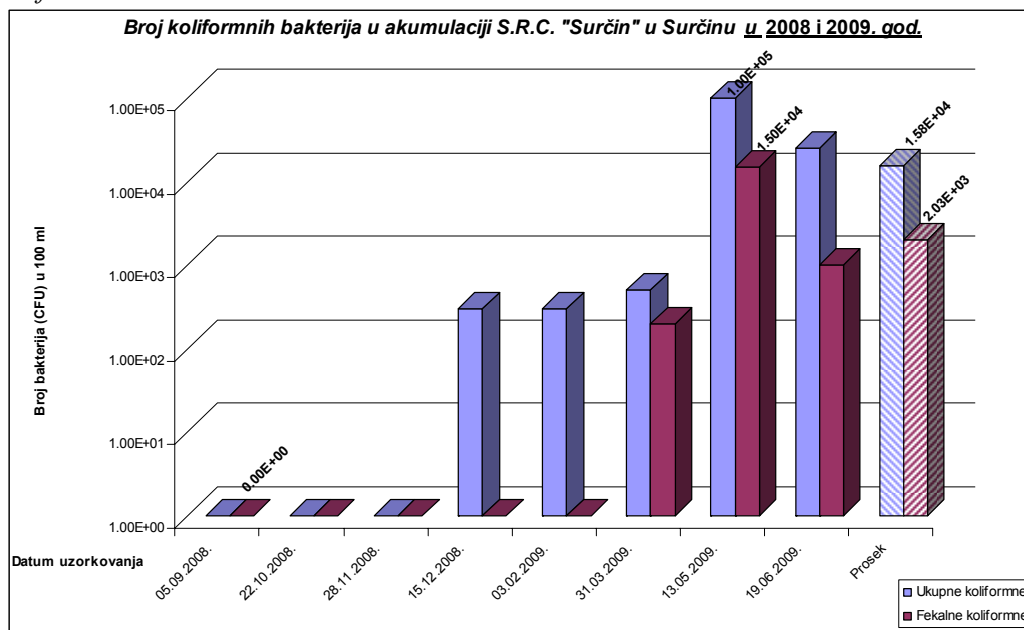
Datum uzorkovanja	Broj patogenih bakterija (u 100 ml)			
	<i>E. coli</i>	<i>E. coli O157:H7</i>	<i>Salmonella spp.</i>	<i>Aeromonas spp.</i>
25. 07. 2008.	5.0×10^1	1.5×10^3	5.0×10^1	2.0×10^3
08. 08. 2008.	6.0×10^1	1.1×10^3	1.0×10^2	8.5×10^2
05. 09. 2008.	0	0	0	0
22. 10. 2008.	0	0	0	0
28. 11. 2008.	0	0	0	0
15. 12. 2008.	3.0×10^1	0	0	3.0×10^3
03. 02. 2009.	0	0	0	1.5×10^3
31. 03. 2009.	0	2.0×10^2	5.0×10^1	3.2×10^4
13. 05. 2009.	0	0	0	0
19. 06. 2009.	0	0	0	2.8×10^3
Prosek	1.40×10^1	2.82×10^2	2.00×10^1	4.16×10^3

Prosečne vrednosti pokazuju da je najbrojniji *Aeromonas spp.* (4.16×10^3 CFU/100ml), a najmanje zastupljena je *E. coli* (1.40×10^1 CFU/100ml). U septembru, oktobru i novembru 2008. g. i maju 2009. godine, nije utvrđeno prisustvo patogenih vrsta bakterija (Tabela 23).

U vodi, iz akumulacije S.R.C. "Surčin" u Surčinu, ukupne koliformne bakterije su zastupljene u periodu od decembra 2008. do juna 2009. g. (prosk 1.58×10^4 CFU/100ml), a fekalne koliformne od marta do juna 2009. g. (prosek 2.03×10^3 CFU/100ml). Tokom jeseni 2008. godine ove bakterije nisu detektovane (Grafik 19).

Voda iz pomenute akumulacije u Surčinu bila je kontaminirana patogenim bakterijama tokom prolećnog dela 2009. godine (mart, maj i jun). *Aeromonas spp.* je bio prisutan u vodi tokom celog perioda ispitivanja (izuzetak je februar 2009. godine) i njegov prosečan broj je iznosio 4.90×10^3 CFU/100ml.

Grafik 19.



Prosečne vrednosti broja *E. coli* O157:H7 i *E. coli* su bile 5.63×10^2 CFU/100ml i 2.56×10^2 CFU/100ml. Najmanja brojnost je konstatovana za *Salmonella spp.* (prosek 7.50×10^1 CFU/100ml). U 2008. godini (jesen) nije detektovano prisustvo *E. coli* O157:H7 i *Salmonella spp.* u vodi (Tabela 24).

Tabela 24. Broj patogenih bakterija u akumulaciji S.R.C. "Surčin" u Surčinu

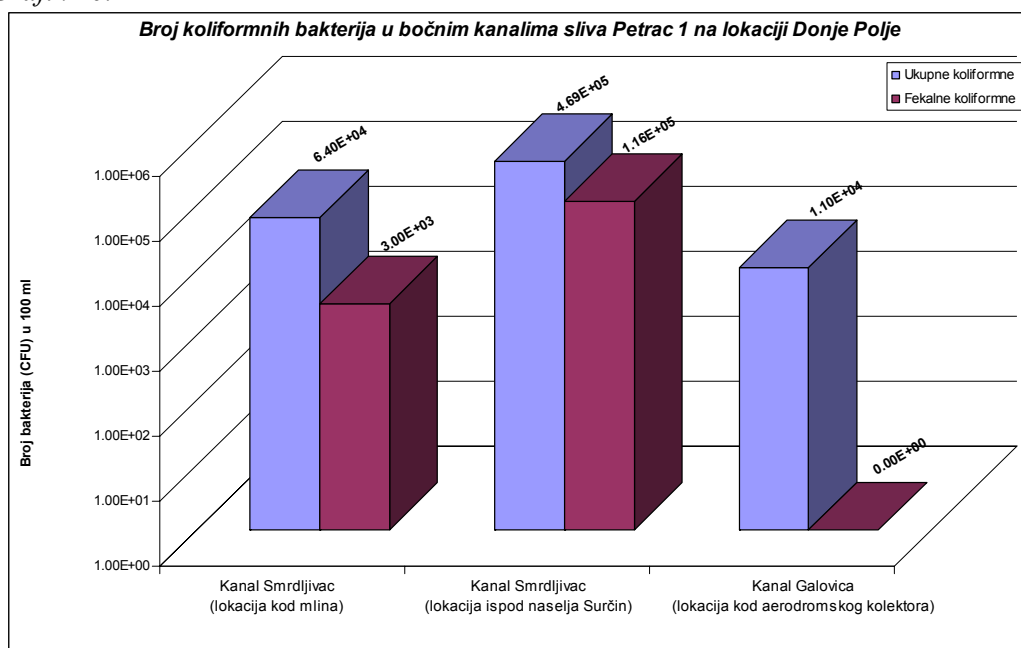
Datum uzorkovanja	Broj patogenih bakterija (u 100 ml)			
	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>Salmonella spp.</i>	<i>Aeromonas spp.</i>
05. 09. 2008.	0	0	0	2.0×10^3
22. 10. 2008.	0	0	0	2.8×10^3
28. 11. 2008.	0	0	0	5.0×10^2
15. 12. 2008.	1.0×10^2	0	0	1.0×10^3
03. 02. 2009.	0	0	0	0
31. 03. 2009.	1.5×10^2	1.4×10^3	1.0×10^2	1.5×10^3
13. 05. 2009.	3.0×10^2	1.0×10^2	5.0×10^2	3.1×10^4
19. 06. 2009.	1.5×10^3	3.0×10^3	0	4.5×10^2
Prosek	2.56×10^2	5.63×10^2	7.50×10^1	4.90×10^3

U pijezometru LP 107 koji se nalazi neposredno pored kanala Petrac 1, nije konstatovano prisustvo ukupnih i fekalnih koliformnim bakterijama u septembru i

oktobru 2008. g. U ovoj vodi nisu detektovane patogene ni *E. coli*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Aeromonas spp.*, *Proteus spp.*

U bočnim kanalima sliva Petrac 1 na lokaciji Donje Polje najveći broj ukupnih i fekalnih koliformnih bakterija je detektovan u kanalu Smrdljivac na lokaciji ispod naselja Surčin. U vodi ovog kanala broj ukupnih koliformnih bakterija je iznosio 4.69×10^5 CFU/100ml, a broj bakterija fekalnog porekla 1.16×10^5 CFU/100ml.

Grafik 20.



U ovom kanalu, ali na lokaciji kod mlina, konstatovano je ukupnih koliforma bakterija 6.4×10^4 CFU/100ml, a fekalnih 3.0×10^3 CFU/100ml. U kanalu Galovica, na lokaciji kod aerodromskog kolektora, detektovane su samo ukupne koliformne bakterije (1.10×10^4 CFU/100ml) (Grafik 20).

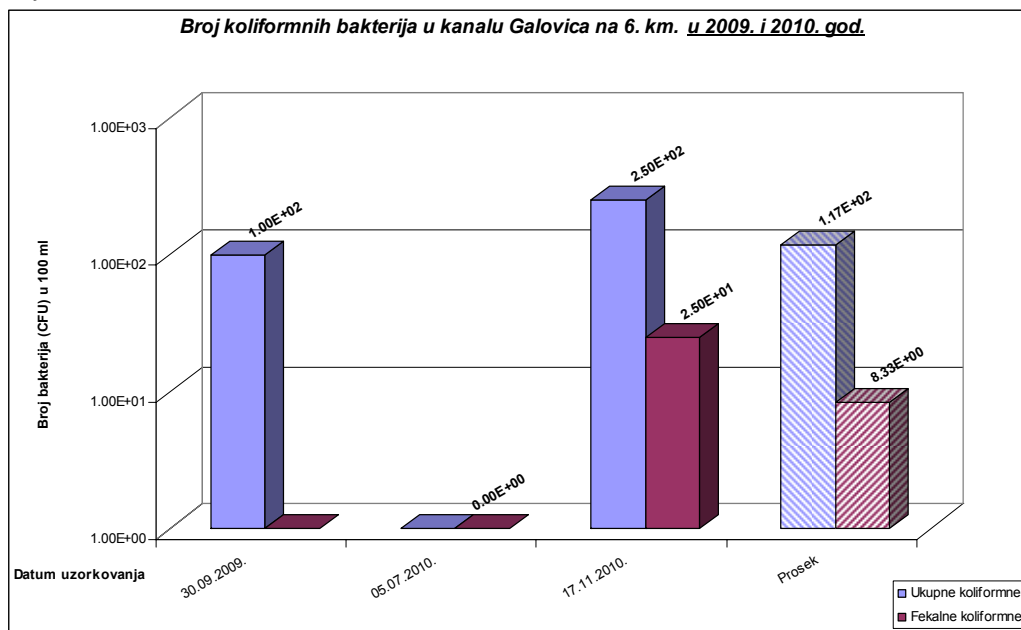
U vodi iz kanala Smrdljivac ispod naselja Surčin, konstatovana je najveća brojnost *Aeromonas spp.*, *E. coli* O157:H7 (3.60×10^5 CFU/100ml), dok je broj *E. coli* i *Salmonella spp.* bio približno ujednačen (5.20×10^4 CFU/100ml i 5.00×10^4 CFU/100ml). U vodi ovog kanala na lokaciji kod mlina detektovana je manja brojnost *E. coli*, *E. coli* O157:H7 i *Aeromonas spp.*, dok prisustvo *Salmonella spp.* nije detektovano. U kanalu Galovica (kod aerodromskog kolektora) utvrđeno je prisustvo samo *E. coli* i *Aeromonas spp.* (6.00×10^2 CFU/100ml i 1.50×10^4 CFU/100ml) (Tabela 25).

Tabela 25. Broj patogenih bakterija u bočnim kanalima sliva Petrac 1 u Donjem Polju

Lokacija uzorkovanja vode	Broj patogenih bakterija (u 100 ml)			
	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Aeromonas</i> spp.
kanal Smrdljivac (kod mlina)	1.0×10^3	7.0×10^4	0	3.0×10^4
kanal Smrdljivac (ispod naselja Surčin)	5.2×10^4	3.6×10^5	5.0×10^4	4.6×10^6
kanal Galovica (kod aerod. kolektora)	6.0×10^2	0	0	1.5×10^4

Na lokaciji *sliva Galovice* ispitivano je prisustvo i brojnost koliformnih i patogenih bakterija i to u samom kanalu Galovica, duž celog toka, kao i bočnim kanalima koji se direktno ulivaju u kanal Galovicu.

Grafik 21.



U početnom delu kanal, u *kanalu Galovica* na 6. km. broj ukupnih koliformnih bakterija je, prosečno 1.17×10^2 CFU/100ml, a fekalne koliformne bakterije su detektovane samo tokom jednog uzorkovanja vode (2.50×10^1 CFU/100ml) (Grafik 21).

U ovom delu kanala Galovica, uzorkovanje vode nije bilo moguće u novembru 2009. i martu 2010.g. zbog obilnih atmosferskih padavina.

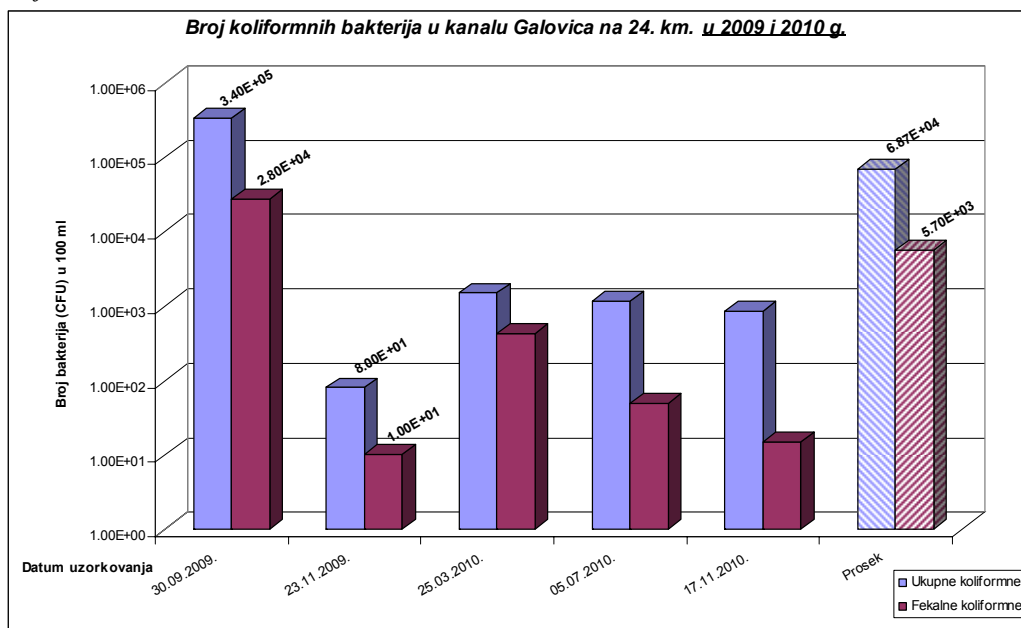
U ovom delu kanala Galovica najveća brojnost je *Aeromonas spp.*, (prosek 4.13×10^4 CFU/100ml). Prosečna vrednost za *E. coli* je 1.20×10^2 CFU/100ml, za *E. coli* O157:H7 2.60×10^2 CFU/100ml i *Salmonella spp.* 7.80×10^2 CFU/100ml (Tabela 26).

Tabela 26. Broj patogenih bakterija u kanalu Galovica na 6. km.

Datum uzorkovanja	Broj patogenih bakterija (u 100 ml)			
	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>Salmonella spp.</i>	<i>Aeromonas spp.</i>
30. 09. 2009.	1.0×10^2	1.0×10^2	2.3×10^3	3.9×10^3
23. 11. 2009.	-	-	-	-
25. 03. 2010.	-	-	-	-
05. 07. 2010.	0	2.0×10^2	4.0×10^1	1.2×10^5
17. 11. 2010.	2.6×10^2	4.8×10^2	0	0
Prosek	1.20×10^2	2.60×10^2	7.80×10^2	4.13×10^4

U kanalu Galovice na 24. km. ukupne i fekalne koliformne bakterije su bile prisutne u celom periodu ispitivanja, a prosečan broj ukupne koliformne bakterije je 6.87×10^4 CFU/100ml a fekalnih koliformnih 5.70×10^3 CFU/100ml. Najveći broj je septembru 2009. godine (Grafik 22).

Grafik 22.



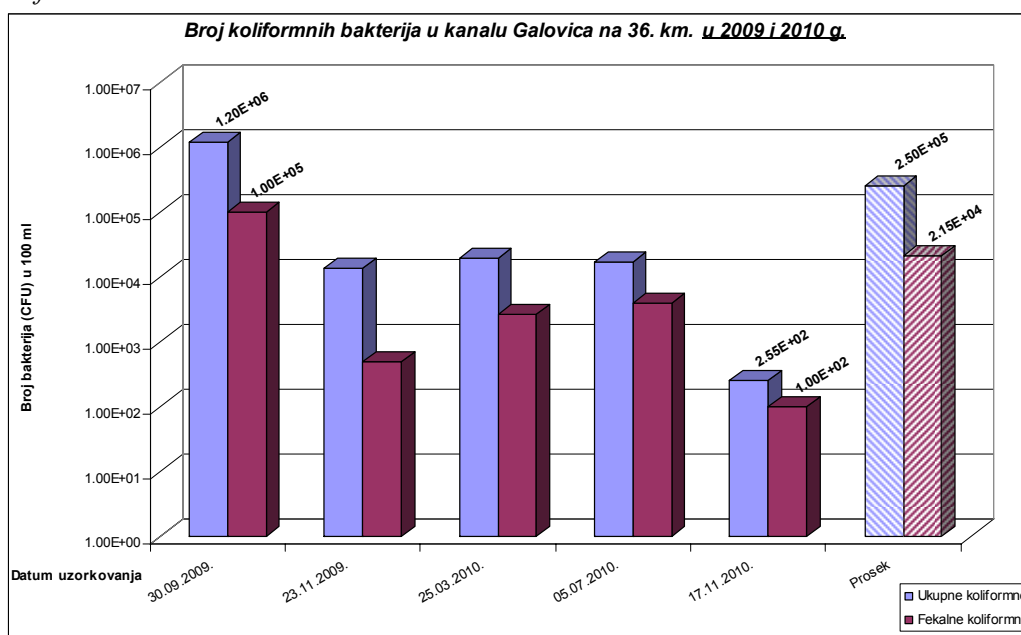
U ovoj vodi najbrojniji je *Aeromonas spp.*, (u proseku 7.00×10^4 CFU/100ml), dok su prosečne vrednosti *E. coli*, i *Salmonella spp.* približno slične i iznose 5.42×10^2 CFU/100ml (*E. coli*) i 4.42×10^2 CFU/100ml (*Salmonella spp.*). Najmanje brojna je *E. coli* O157:H7 (Tabela 27).

Tabela 27. Broj patogenih bakterija u kanalu Galovica na 24. km.

Datum uzorkovanja	Broj patogenih bakterija (u 100 ml)			
	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>Salmonella spp.</i>	<i>Aeromonas spp.</i>
30. 09. 2009.	1.3×10^3	5.0×10^1	1.2×10^3	2.6×10^3
23. 11. 2009.	4.6×10^2	0	5.0×10^1	1.2×10^3
25. 03. 2010.	7.0×10^2	3.0×10^2	2.0×10^1	0
05. 07. 2010.	2.0×10^2	4.0×10^2	2.0×10^2	3.2×10^5
17. 11. 2010.	5.0×10^1	1.0×10^1	7.4×10^2	2.6×10^4
Prosek	5.42×10^2	1.52×10^2	4.42×10^2	7.00×10^4

U kanalu Galovica na 36. km. (završetak kanala) utvrđen je broj ukupnih koliformnih od 2.55×10^2 do 1.20×10^6 CFU/100ml (prosečno 2.50×10^5 CFU/100ml), i fekalnih koliforma od 1.00×10^2 CFU/100ml do 1.00×10^5 CFU/100ml, u proseku 2.15×10^4 CFU/100ml (Grafik 23).

Grafik 23.



U ovom delu kanala Galovice detektovana je prisustvo *E.coli* (1.61×10^3 CFU/100ml) i *E.coli* O157:H7 (4.73×10^3 CFU/100ml), *Salmonella spp.*, u proseku 1.43×10^3 CFU/100ml, dok je broj *Aeromonas spp.* prosečno bio 2.39×10^5 CFU/100ml (Tabela 28).

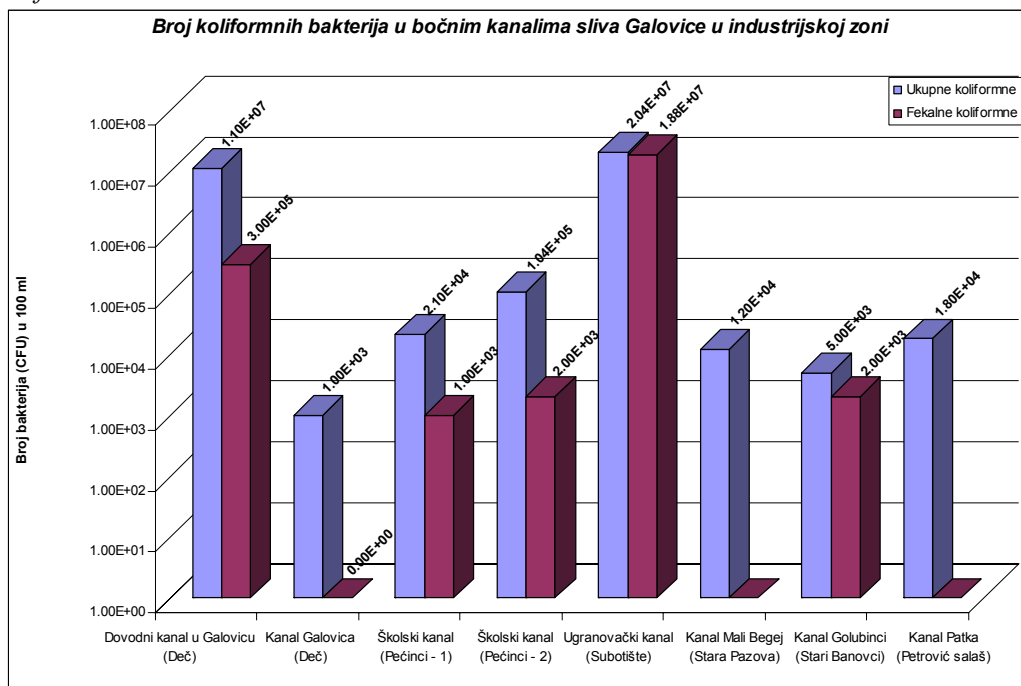
Tabela 28. Broj patogenih bakterija u kanalu Galovica na 36. km.

Datum uzorkovanja	Broj patogenih bakterija (u 100 ml)			
	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>Salmonella spp.</i>	<i>Aeromonas spp.</i>
30. 09. 2009.	8.5×10^2	1.5×10^4	3.7×10^3	6.3×10^5
23. 11. 2009.	6.5×10^2	1.1×10^3	1.0×10^2	8.0×10^3
25. 03. 2010.	2.3×10^3	5.0×10^3	1.2×10^3	1.5×10^5
05. 07. 2010.	4.0×10^3	8.8×10^2	8.0×10^2	4.0×10^5
17. 11. 2010.	2.6×10^2	1.5×10^3	1.4×10^3	5.3×10^3
Prosek	1.61×10^3	4.73×10^3	1.43×10^3	2.39×10^5

U bočnim kanalima sliva Galovice u industrijskoj zoni najveći broj ukupnih i fekalnih koliformnih bakterija je konstatovan u ugranovačkom kanalu u Subotištu gde se ispuštaju otpadne vode. Broj ukupnih koliforma je iznosio 2.04×10^7 CFU/100ml, a fekalnih 1.88×10^7 CFU/100ml. Takođe, izrazito veliki broj ukupnih koliformnih bakterija je konstatovan u dovodnom kanalu u Galovicu na lokaciji Deča gde se takođe ispuštaju otpadne vode (1.10×10^7 CFU/100ml). U ovom kanalu broj fekalnih koliforma je 3.00×10^5 CFU/100ml.

U ostalim bočnim kanalima, broj ukupnih koliformnih bakterija se kretao od 1.0×10^3 (kanal Galovica u Deču) do 1.04×10^5 CFU/100ml (Školski kanal u Pećincima - 2). Broj fekalnih koliformnih bakterija u ovim kanalima je u opsegu 1.0×10^3 CFU/100ml (Školski kanal u Pećincima-1) 2.0×10^3 CFU/100ml (Školski kanal u Pećincima-2 i kanal Golubinci u Starim Banovcima), a nisu detektovane u kanalu Galovica u Deču, kanalu Mali Begej u Staroj Pazovi i kanalu Patka kod Petrović salaša. Za razliku od fekalnih koliformnih bakterija, ukupne koliformne bakterije su detektovane u svim ispitivanim kanalima (Grafik 24).

Grafik 24.



Patogene bakterije su bile prisutne u najvećem broju u ugranovačkom kanalu u Subotištu gde dospevaju otpadne vode. Najveća brojnost je konstatovana za *E. coli* (2.1×10^6 CFU/100ml) i *Salmonella spp.* (2.0×10^6 CFU/100ml), *E. coli* O157:H7 (1.5×10^5 CFU/100ml), *Aeromonas spp.* (2.5×10^4 CFU/100ml). U vodi kanala Golubinci na lokaciji Stari Banovci (ranije ispuštane otpadne vode), detektovana je velika brojnost *Salmonella spp.* (3.1×10^7 CFU/100ml). Broj *E. coli* je bio 1.0×10^3 CFU/100ml, *Aeromonas spp.* 1.0×10^4 CFU/100ml, dok *E. coli* O157:H7 nije detektovana. U ostalim kanalima nije detektovano prisustvo *E. coli* O157:H7 i *Salmonella spp.*, dok je *Aeromonas spp.* bio prisutan u svim ispitivanim kanalima (Tabela 29).

Tabela 29. Broj patogenih bakterija u bočnim kanalima sliva Galovice u industrijskoj zoni

Lokacija uzorkovanja vode	Broj patogenih bakterija (u 100 ml)			
	<i>E. coli</i>	<i>E. coli O157:H7</i>	<i>Salmonella spp.</i>	<i>Aeromonas spp.</i>
Dov. kan. u Galovicu (Deč)	3.0×10^3	0	0	4.9×10^5
Kanal Galovica (Deč)	0	0	0	2.5×10^4
Školski kanal (Pećinci – 1)	2.0×10^3	0	0	3.5×10^4
Školski kanal (Pećinci – 2)	1.0×10^3	0	0	6.0×10^4
Ugranovački kanal (Subotište)	2.1×10^6	1.5×10^5	2.0×10^6	2.5×10^4
Kanal Mali Begej (Stara Pazova)	0	0	0	1.5×10^4
Kanal Golubinci (Stari Banovci)	1.0×10^3	0	3.1×10^7	1.0×10^4
Kanal Patka (Petrović salaš)	0	0	0	3.0×10^4

5.1.8. Identifikacija patogenih bakterija u vodi kanala sliva "Donje polje" i kanala "Galovica"

Morfologija kolonija- vrste *E. coli* 2 su stvarale karakteristične indigo-plave kolonije sa mehurićima gasa na petri-filmu, što je karakteristika svih laktoza-pozitivnih bakterija. Ostale koliformne bakterije (npr. *Citrobacter freundii*) su obrazovale sitne kolonije crvene boje, takođe sa mehurićima gasa pored same kolonije.

Na hranljivoj podlozi McConkey Agar, *E. coli O157:H7* je obrazovala sitne roze kolonije, dok je na visoko selektivnoj hromogenoj hranljivoj podlozi ChromID™ O157:H7 Agar, stvarala tipične kolonije zelene boje sa tamnim centrom. Na ovoj hromogenoj podlozi, jasno se razlikuju vrste *E. coli*, koja daje tamno-ljubičaste do indigo-plave kolonije, zatim *Citrobacter spp.* sa crvenim kolonijama i *Proteus spp.* sa žutim kolonijama. Karakteristično je da je *Proteus spp.* na hranljivom agaru obrazovao neprozirne, krupne bele kolonije koje prerastaju podlogu u vidu navlake i imaju izbrazdanu površinu. Kolonije *Salmonella spp.* na SS agaru stvaraju crne, na hranljivom

agaru sjajne i glatke, 2–5 mm u prečniku, a u hranjivom bujonu se stvaralo zamućenje i obilan talog.

U pogledu *morfologije ćelija*, sojevi izolovanih bakterija su štapićastog oblika, osim sojeva *Citrobacter freundii* čije su ćelije kokobacil. Svi sojevi su imali asporogene ćelije, Gram-negativne i pokretne. Veličina ćelija za *Salmonella spp.* je bila 0.6-1.0 x 1.5-3.0 μm , a za *Proteus spp.* 0.5x1.8 μm .

Ispitivanje *ekoloških karakteristika* izolovanih bakterija je pokazalo da se sojevi *Salmonella spp.* razvijaju u opsegu pH 6.0–8.0, dok koncentracija NaCl veća od 2% sprečava njen rast. Dobro raste i razvija se na temperaturama od 25°C do 44°C u odnosu na kiseonik je fakultativni anaerob. Sojevi *Proteus spp.* su se dobro razvijali u prisustvu 2%, 5% i 7% NaCl, i temperaturama od 25°C do 44°C. U odnosu na kiseonik su aerobne bakterije.

Biohemijske osobine izolovanih sojeva bakterija su karakteristične za identifikovane vrste bakterija.

U ovoj vodi identifikovane su *E. coli 2*; *E. coli O157 :H7*; *Aeromonas hydrophila 1*; *Citrobacter freundii*; *Salmonella spp.*; *Shigella spp.*; *Proteus spp.* Prema API testovima i API-WEB softveru, tačnost identifikacije sojeva je bila preko 99.5%.

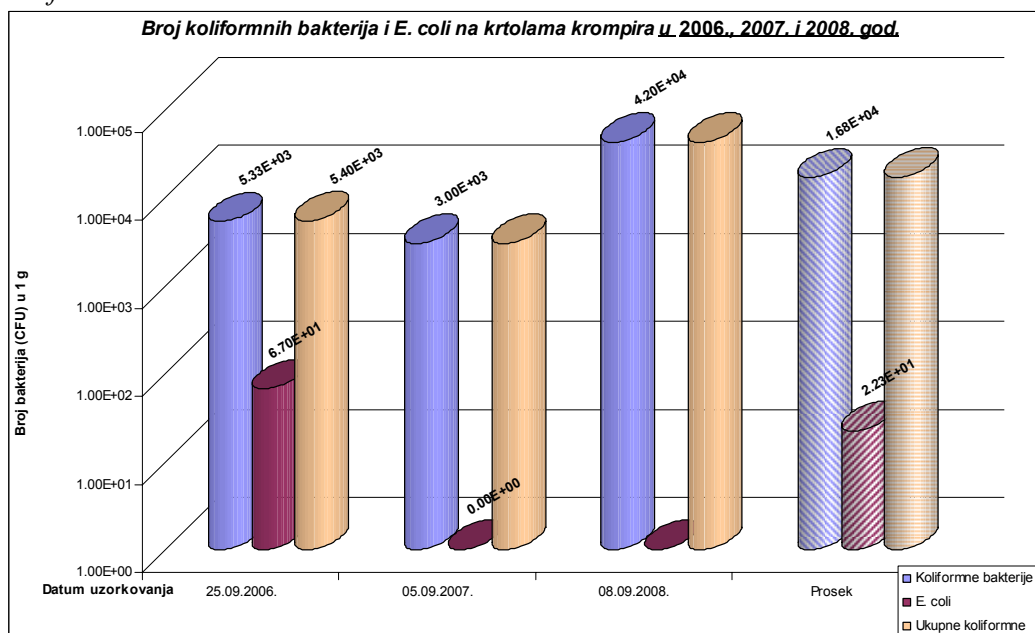
5.2. Prisustvo i identifikacija patogenih bakterija na biljkama

5.2.1. Ogljedna parcela u Surčinu

Tokom tri eksperimentalne godine (2006, 2007 i 2008.), na krtolama krompira najveća brojnost koliformnih bakterija je yabele'ena 2008. godini (4.20×10^4 CFU/g,) a najmanja 2007. g. (3.00×10^3 CFU/g). U 2006. godini broj koliformnih bakterija je iznosio 5.33×10^3 CFU/g. Prosečna vrednost za tri godine je 1.68×10^4 CFU/g.

Prisustvo *E. coli* na krtolama krompira je konstatovano samo u 2006. godini (6.70×10^1 CFU/g). (Grafik 25).

Grafik 25.



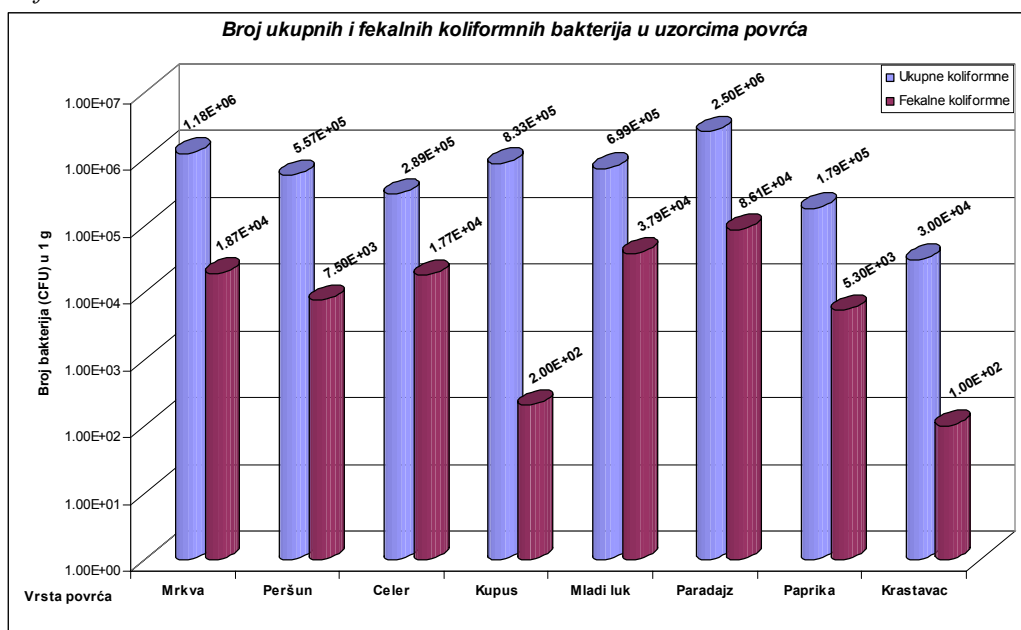
Identifikovane vrste patogenih bakterija na krtolama krompira – Na krtolama krompira, koji je gajen na oglednoj parceli u Surčinu, identifikovane su vrste *E. coli* 2 i *E. vulneris*. Po svojim morfološkim osobinama kolonija i ćelija, kao i ekološkim i biohemijskim karakteristikama, izolovani sojevi su veoma slični sojevima izolovanim iz vode kojom su biljke krompira navodnjavane.

5.2.2. Individualno gazdinstvo u Negotinu

Kod korenasto-krtolastih biljaka (mrkva, peršun, celer), najveća brojnost ukupnih (1.18×10^6 CFU/g) i fekalnih koliformnih (1.87×10^4 CFU/g) bakterija je detektovana kod mrkve, od zeljastog povrća (kupus, mladi luk) kod mladog luka broj fekalnih koliformnih bakterija je 3.79×10^4 CFU/g.

Ukupne i fekalne koliformne bakterija su najbrojnije kod plodovitog povrća, paradajza, dok je kod krastavca najmanji broj koliformnih bakterija (3.00×10^4 CFU/g i 1.00×10^2 CFU/g) (Grafik 26).

Grafik 26.



Kod ispitivanih povrtarskih biljaka konstatovano je i prisustvo *E. coli*, *E. coli O157:H7*, *Salmonella spp.*. Prisustvo *E. coli* je utvrđeno kod mrkve, mladog luka, paradajza i paprike. Soj *E. coli O157:H7* je izolovan sa korena mrkve, kod peršuna i paradajza. *Salmonella spp.* je konstatovana na korenu peršuna, mladom luku, i plodovima paradajza i paprike (Tabela 30).

Tabela 30. Vrste patogenih bakterija prisutne na ispitivanom povrću

Biljna vrsta	Vrste patogenih bakterija		
	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>Salmonella spp.</i>
Mrkva	+	+	-
Peršun	-	+	+
Celer	-	-	-
Kupus	-	-	-
Mladi luk	+	-	+
Paradajz	+	+	+
Paprika	+	-	+
Krastavac	-	-	-

Identifikovane vrste patogenih bakterija na povrću – Sa ispitivanih povrtarskih biljaka, koje su gajene na individualnom gazdinstvu u Negotinu, izolovane su i identifikovane *E. coli*, *E. coli* O157:H7 i *Salmonella spp.*

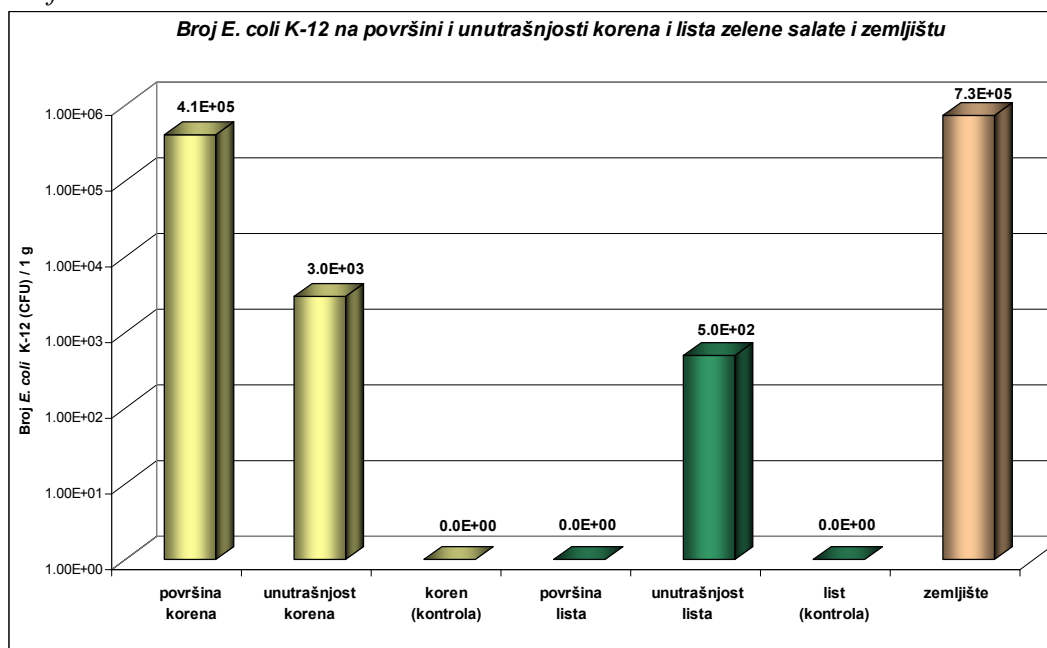
Morfološke karakteristike kolonija izolovanih sojeva su indentične identifikovanim sojevima izolovanim iz vode melioracionog kanala u Negotinu. U pogledu morfoloških osobina čelija, kod sojeva izolovanih sa biljaka nisu konstatovane veće razlike u odnosu na sojeve poreklom iz vode. Kada su u pitanju biohemijske osobine, svi identifikovani sojevi bakterija su pokazali karakteristične reakcije za datu vrstu.

5.3. Prenos *E. coli* K-12 iz vode za navodnjavanje do biljaka zelene salate

Tretiranjem zelene salate (*Lactuca sativa*) vodom kontaminiranom *E. coli* K-12 uticalo je na povećanje broja *E. coli* K-12 u unutrašnjosti korena i lista biljaka.

Najveći broj *E. coli* K-12 je konstatovan na površini korena (4.1×10^5 CFU/g), a najmanji u unutrašnjosti listova (5.0×10^2 CFU/g), dok je visoka brojnost ovih bakterija detektovana u samoj unutrašnjosti korena biljke (3.0×10^3 CFU/g). Bakterije *E. coli* K-12 su bile najzastupljenije u rizosfernom zemljištu (7.3×10^5 CFU/g). Ispitivane bakterije nisu pronađene na površini listova tretiranih biljaka zelene salate, kao ni kod kontrolnih biljaka (Grafik 27).

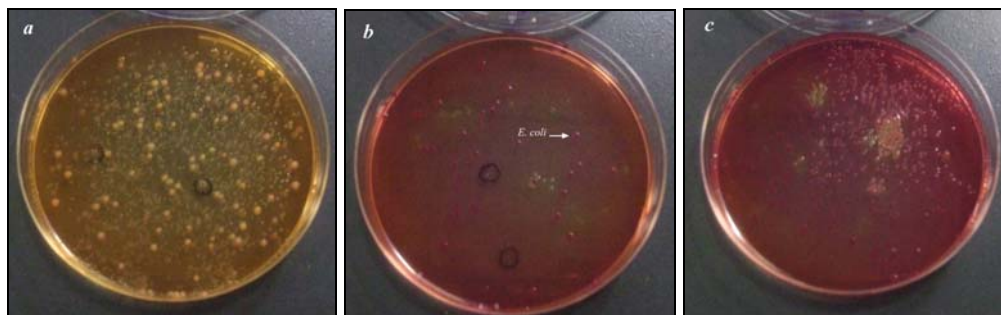
Grafik 27.



Mikrobiološkim analizama je dokazano da *E. coli* K-12, izolovana iz biljnog tkiva i rizosfernog zemljišta, fermentiše laktozu, a na selektivnoj hranljivoj podlozi MacConkey Agar daje tipične sitne i glatke roze (pink) kolonije, kružnog oblika, okružene mutnom zonom precipitata žućnih soli i pokazuju rast koji se širi (Slika 18).

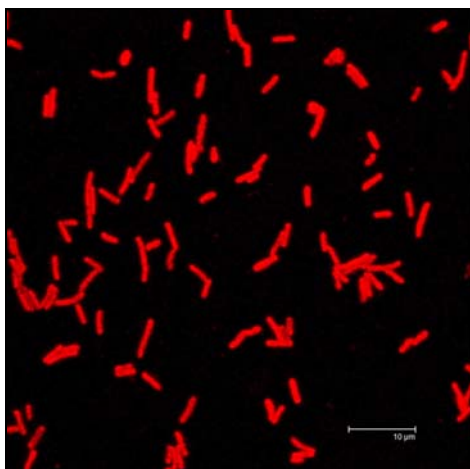
Izolovane kolonije autohtonih bakterija iz rizosfere zelene salate, koje su bile prisutne kod tretiranih i kontrolnih (ne tretiranih) biljaka, su u morfološkom pogledu bile potpuno drugačije od kolonija *E. coli* K-12. Na selektivnoj hranljivoj podlozi

MacConkey Agar, bile su žute boje, ne tipične za *E. coli* sojeve i jasno su se mogle razlikovati od soja *E. coli* K-12.



Slika 18. Karakteristične pink kolonije *E. coli* K-12 na MacConkey Agar (a – kolonije izolovane iz korena kontrolnih biljaka; b – pink kolonije izolovane sa površine korena tretiranih biljaka; c - pink kolonije izolovane iz unutrašnjosti korena tretiranih biljaka)

Što se tiče morfoloških osobina, ćelije soja *E. coli* K-12 su Gram-negativni, asporogeni, štapići, prosečne veličine $2.0 \times 0.8 \mu\text{m}$ i pokretne. To su fakultativno anaerobne bakterije, pripadaju familiji *Enterobacteriaceae*, poseduju adhezivne fimbrije i mogu opstati dug vremenski period u životnoj sredini (*Slika 19*).



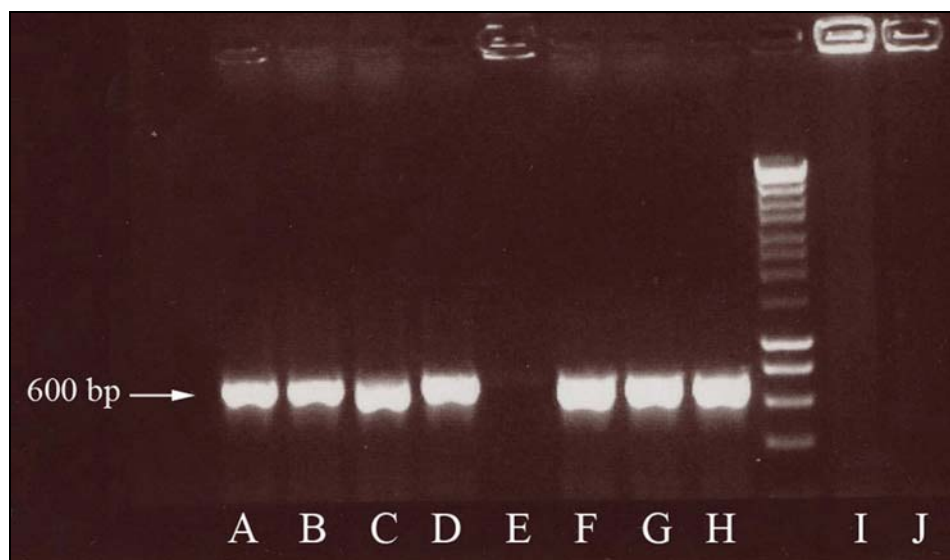
Slika 19. Mikrografija ćelija bakterije *E. coli* K-12 obojene propidijum jodidom

Biohemijski testovi su potvrdili da je izolovani soj *E. coli* K-12, koji je i korišćen za inokulaciju vode za navodnjavanje. Rezultati biohemijskih reakcija su karakteristični za soj *E. coli* K-12 (*Tabela 31*).

Tabela 31. Biohemijske osobine *E. coli* K-12 izolovane iz zelene salate (*L. sativa*)

Reakcija	Rezultat	Reakcija	Rezultat
beta-galactosidase	+	glucose	+
arginine dihydrolase	-	mannitol	+
lysine decarboxylase	+	inositol	-
ornithine decarboxylase	-	sorbitol	+
citrate utilization	-	rhamnose	+
H ₂ S production	-	sucrose	-
urea hydrolysis	-	melibiose	+
deaminase	-	amygdalin	-
indole production	+	arabinose	+
acetoin production	-	oxidase	-
gelatinase	-		

PCR analizom je dokazano da bakterije (koje daju pink kolonije na McConkey Agar) izolovane sa površine i unutrašnjosti korena, kao i unutrašnjosti lista, pripadaju soju *E. coli* K-12 (Slika 20).



Slika 20. PCR detekcija *E. coli* K-12 izolovane iz korena i lista zelene salate (A i B - *E. coli* K-12 izolovana sa površine korena; C i D - *E. coli* K-12 izolovana iz unutrašnjosti korena; E - ne tipične kolonije izolovane sa površine lista; F i G - *E. coli* K-12 izolovana iz unutrašnjosti lista; stubac H - *E. coli* K-12 kontrolni soj (pozitivna kontrola); stubac I - ne tipične kolonije izolovane iz korena; stubac J - ne tipične kolonije izolovane iz lista)

Sojevi bakterija sa netipičnim kolonijama za *E. coli*, izolovani iz biljnog materijala, nisu dali PCR produkt koji je karakterističan za *E. coli* K-12, što znači da ne pripadaju ovom soju (stubac I i J). PCR produkt u stupcu H je pozitivna kontrola

(kontrolni soj *E. coli* K-12 W3110) i isti je kao u stupcima: A, B, C, D, F i G, a iznosi oko 600 bp.

Primenjeni prajmer nije doveo do amplifikacije i stvaranja PCR produkta kod ne tipičnih kolonija bakterija izolovanih sa korena i lista.

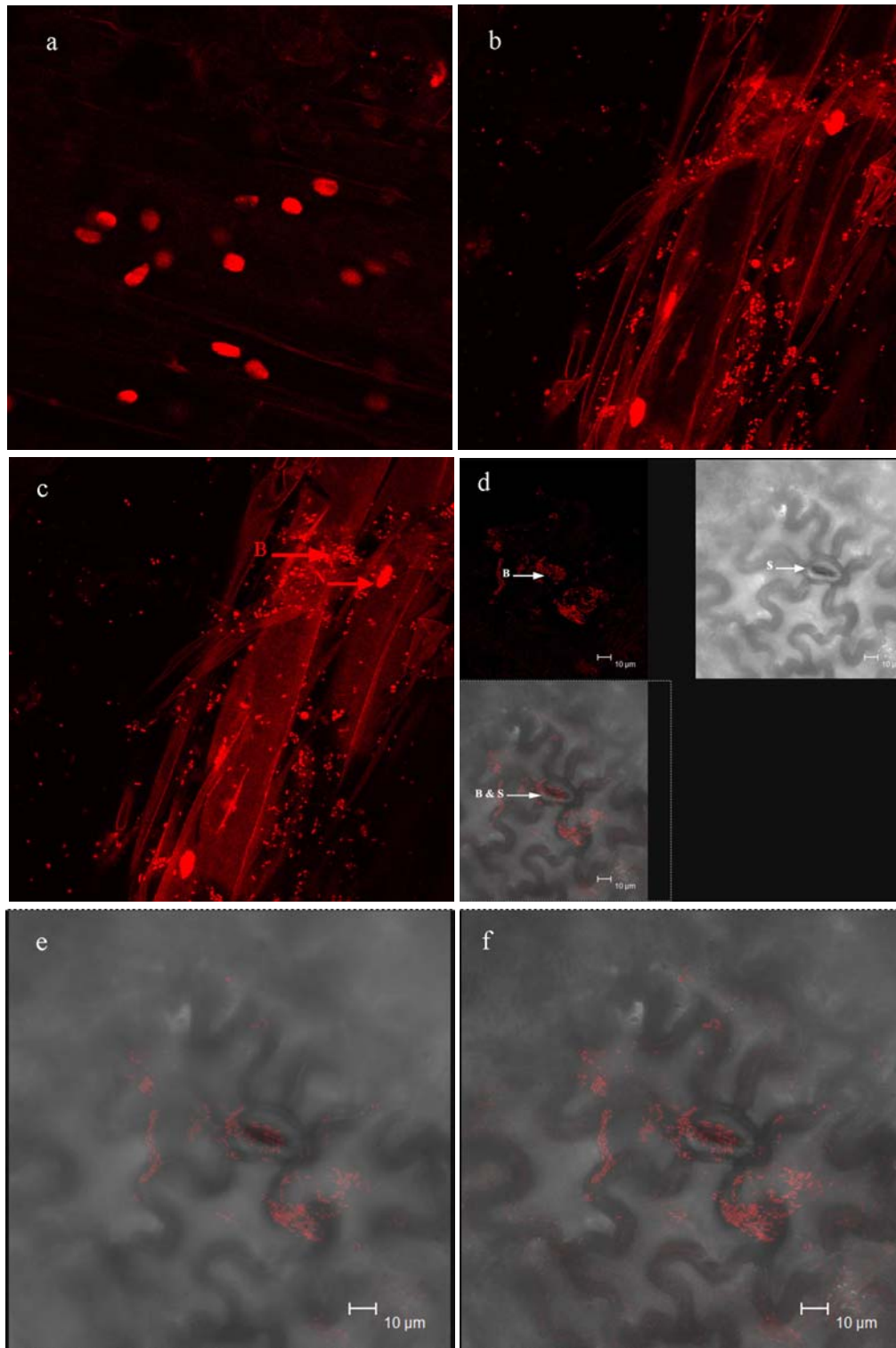
Pregledom biljnog materijala (korena i lista) konfokal laser skening mikroskopijom (CLSM), potvrđeno je prisustvo *E. coli* K-12 u unutrašnjosti korena i listova biljaka zelene salate (*Lactuca sativa*) koje su navodnjavane kontaminiranom vodom (Slika 21). *E. coli* K-12 nije detektovana u unutrašnjosti korena kontrolnih biljaka koje su navodnjavane mikrobiološki ispravnom vodom, što se jasno vidi na mikrofotografiji (Slika 21 - a). U korenu tretirane zelene salate, mogu se jasno uočiti ćelije *E. coli* K-12 u samim sprovodnim sudovima korena biljke (Slika 21 - b, c).

Takođe, mikroskopijom su uočene ćelije *E. coli* K-12 u unutrašnjosti lista biljke i da su formirale mikrokolonije ispod površine lista. Ćelije *E. coli* K-12 su locirane u neposrednoj blizini stoma (Slika 21 - d, e, f).

Na mikrografiji tkiva korena zelene salate, prve ćelije *E. coli* K-12 su se pojavile na dubini od 10 μ m od same površine korena i mogu se videti do dubine od 22 μ m. Najveća koncentracija bakterija u tkivu korena biljke je uočena u sloju dubine 19-20 μ m. U ovom sloju tkiva korena je bila i najbolja uočljivost ćelija *E. coli* K-12 u vaskularnom sistemu biljnog korena.

Na mikrografiji tkiva lista zelene salate, ćelije *E. coli* K-12 su se pojavile na dubini 6 μ m od površine lista i vidljive su do dubine od 16 μ m, a najbolja vidljivost u lisnom tkivu bila je na dubini od 11 μ m.

Na samoj površini listova biljaka zelene salate, koje su zalivane kontaminiranom vodom, mikroskopijom nije utvrđeno prisustvo *E. coli* K-12.



Slika 21. Mikrografija korena i lista zelene salate kolonizovanih sa *E. coli* K-12 (a – koren kontrolne biljke; b i c – koren biljaka zalivanih sa *E. coli* kontaminiranom vodom, dubina 19 i 20 μm; d, e i f - list biljaka zalivanih sa *E. coli* kontaminiranom vodom, dubina 11 μm; B – bakterijske ćelije; N – jedro biljne ćelije; S - stoma)

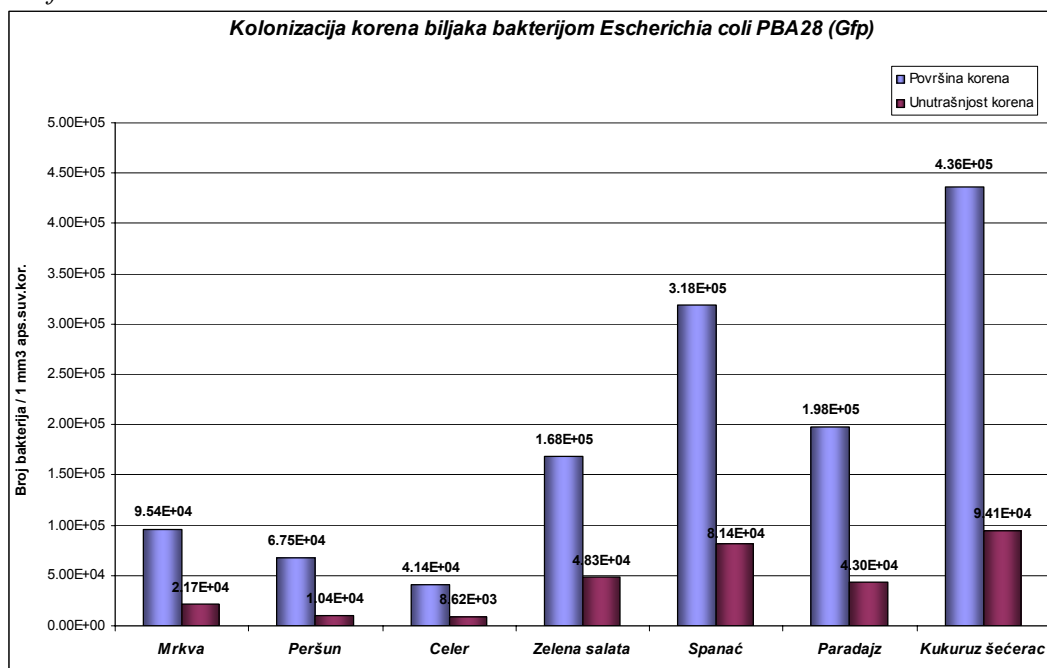
5.4. Kolonizacija biljaka patogenim bakterijama

U "monoxenic" modelu sistema gajenja je praćena površinska i endofitna kolonizacija bilnog korena. Na osnovu mikrografija, dobijenih pomoću konfokal-laser-skening mikroskopije (CLSM), utvrđena je lokacija bakterijskih ćelija u biljnom tkivu.

E. coli PBA28 (Gfp)

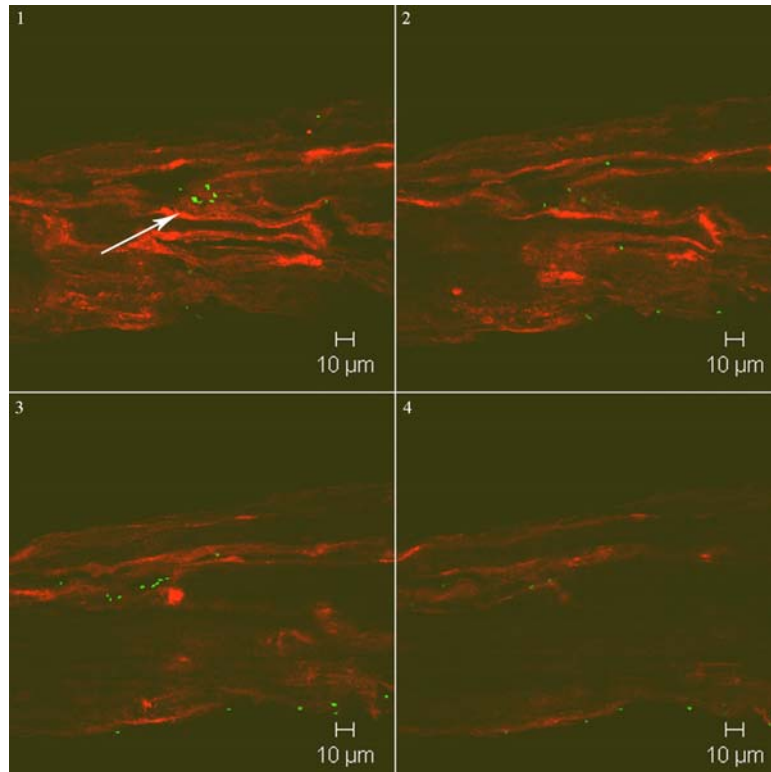
Bakterija *E. coli* PBA28 (Gfp) je površinski (4.36×10^5 ćelija/mm³ apsolutno suvog korena) i endofitno (9.41×10^4 ćelija/mm³ apsolutno suvog korena) kolonizovala koren kukuruza šećerca. Takođe, veliki stepen kolonizacije je konstatovan kod spanaća, gde je u površinskom sloju detektovano 3.18×10^5 ćelija/mm³ apsolutno suvog korena, i u unutrašnjosti korena 8.14×10^4 ćelija/mm³ apsolutno suvog korena. Kod korenastokrtolastih biljaka (mrkva, peršun, celer) je najmanji stepen kolonizacije korena (Grafik 28).

Grafik 28.

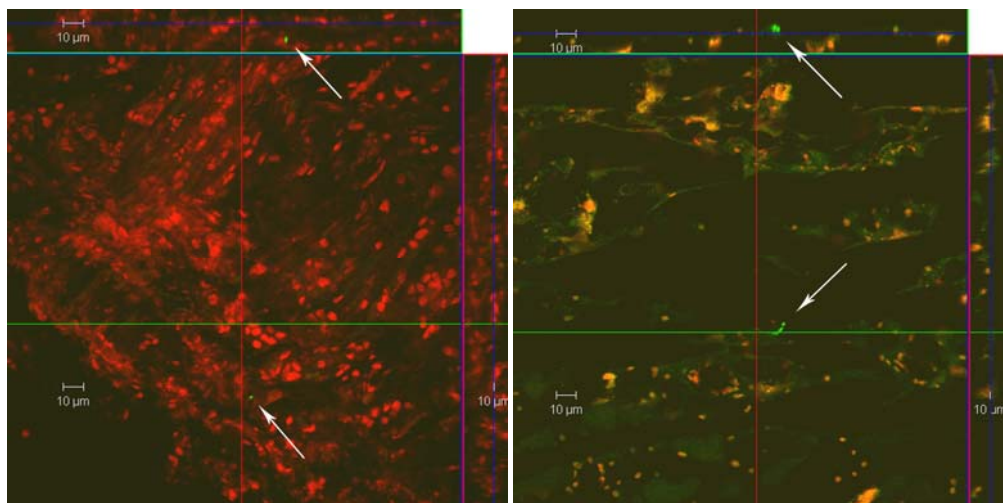


Konfokal-laser-skening mikroskopijom je detektovano prisustvo bakterija *E. coli* u samoj unutrašnjosti korena zelene salate i to blizu sprovodnih sudova, odnosno

ksilema (Slika 22). Takođe, konstatovano je da bakterije u unutrašnjosti korena obrazuju mikrokolonije od 10–20 ćelija. Mikrografije dokazuju prisustvo ovih bakterija u listovima zelene salate i peršuna (Slika 23).

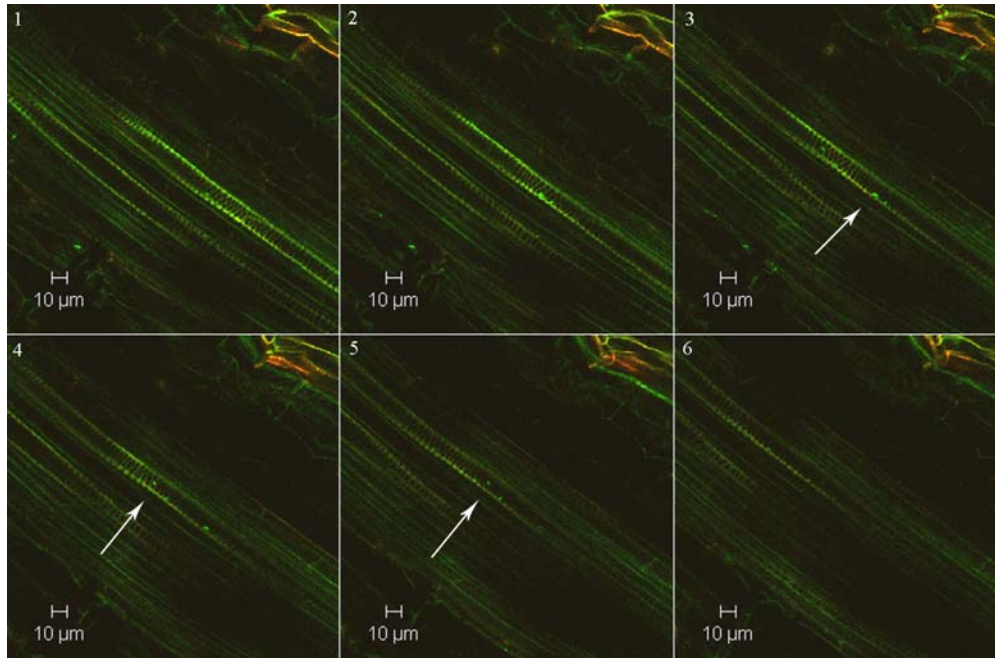


Slika 22. Mikrografija kolonizacije korena zelene salate sa *E. coli* pBA28 (Gfp) (zelene ćelije)

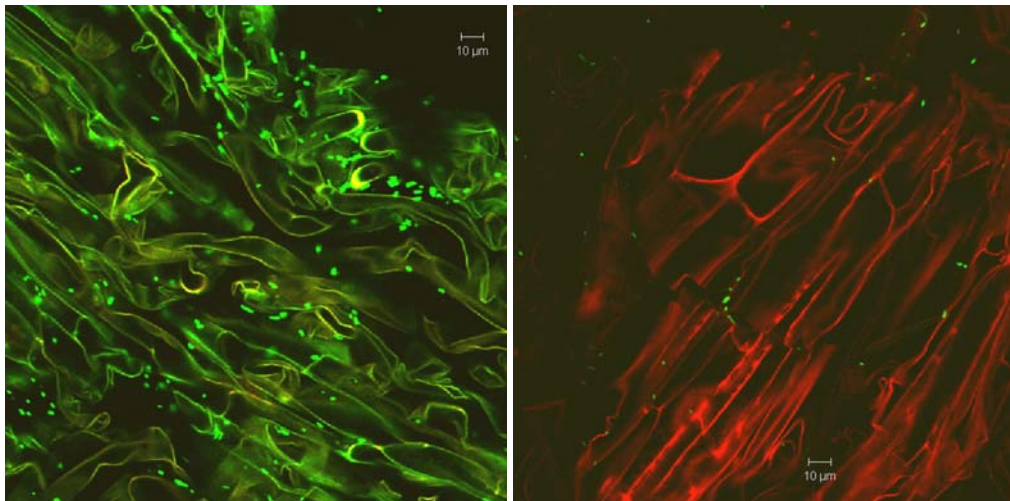


Slika 23. Mikrografija kolonizacije lista zelene salate (levo) i peršuna (desno) sa *E. coli* pBA28 (Gfp) (zelene ćelije)

Kod kukuruza šećerca vidi se pojedinačno prisustvo ćelija *E. coli* u sprovodnim sudovima (ksilemu) korena biljke (Slika 24). Takođe, ovde je izražena i površinska kolonizacija korena, odnosno korenovih dlačica kukuruza šećerca, a bakterije *E. coli* su bile vidljive u intercelularnim prostorima samog korena biljke (Slika 25).

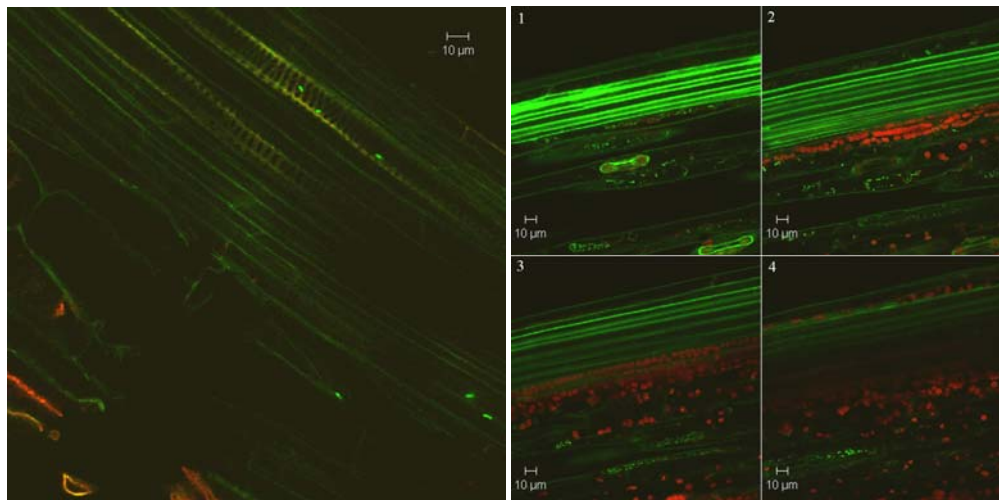


Slika 24. Mikrografija kolonizacije korena kukuruza šećerca sa *E. coli* pBA28 (Gfp) (zelene ćelije)



Slika 25. Mikrografija površinske (levo) i endofitne (desno) kolonizacije korena kukuruza šećerca sa *E. coli* pBA28 (Gfp) (zelene ćelije)

Značajna koncentracija bakterija *E. coli* je konstatovana i u unutrašnjosti listova kukuruza šećerca gde su bakterije bile najviše locirane oko stoma (*Slika 26*).



Slika 26. Mikrografija endofitne kolonizacije korena (levo) i lista (desno) kukuruza šećerca sa *E. coli* pBA28 (Gfp) (zelene ćelije)

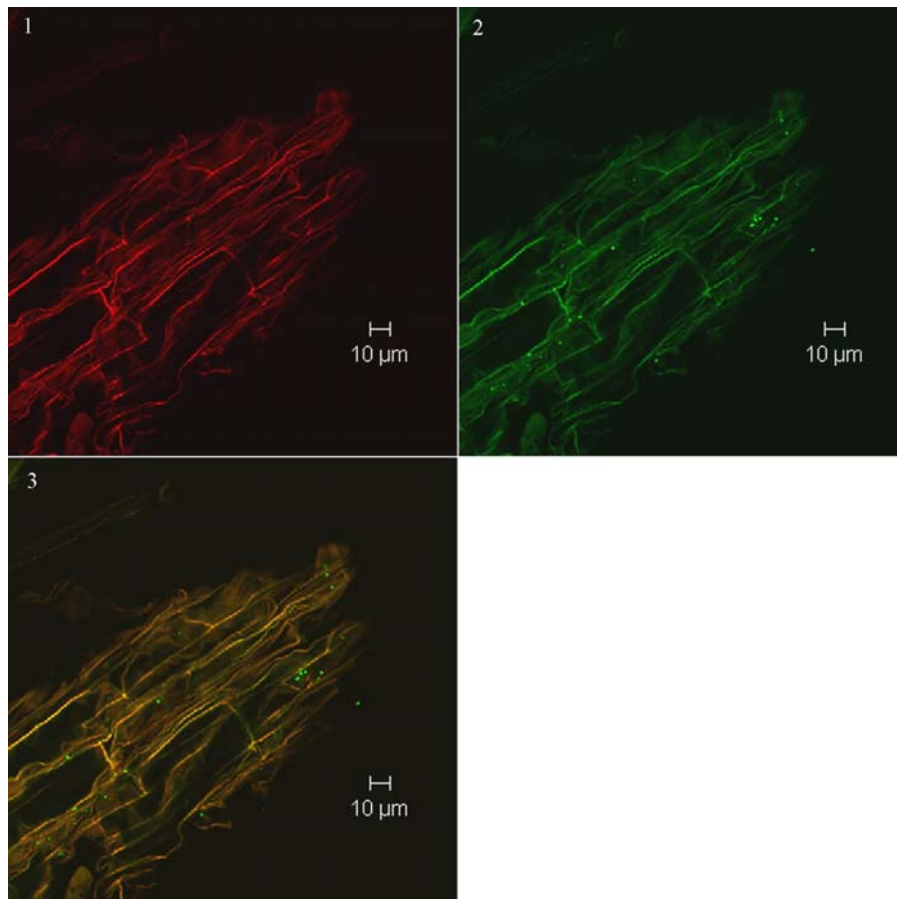
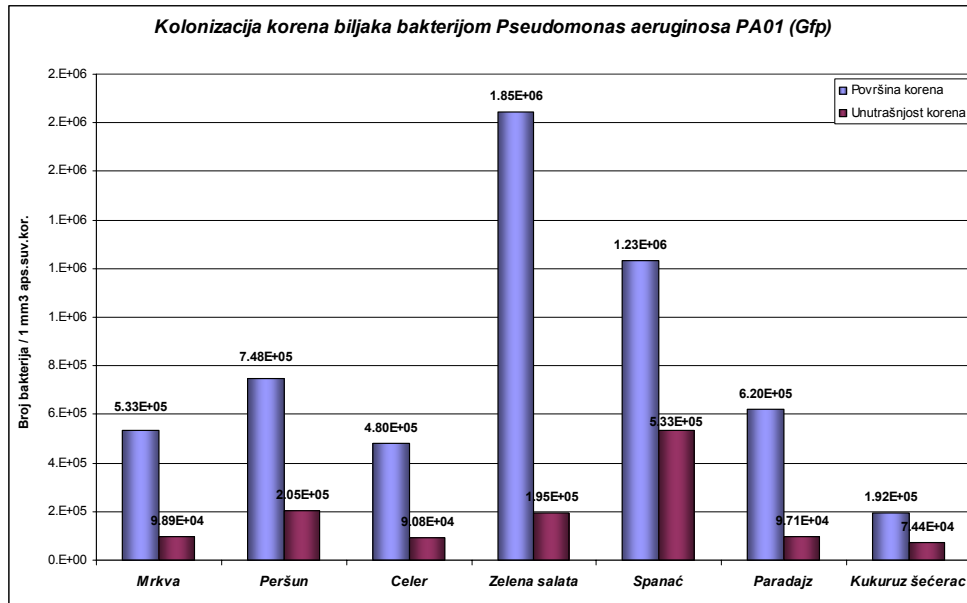
Pseudomonas aeruginosa PA01 (Gfp)

Rezultati ispitivanja kolonizacije korena biljaka bakterijom *Pseudomonas aeruginosa* PA01 (Gfp) su pokazali da je najveća brojnost ove bakterije bila kod zelene salate i spanaća, kako u površinskom sloju, tako i u unutrašnjosti korena. Broj *P. aeruginosa* PA01 (Gfp) u unutrašnjosti korena spanaća je 5.33×10^5 ćelija/mm³ apsolutno suvog korena, a visoka brojnost bakterija je detektovana i na površini korena paradajza (6.20×10^5 ćelija/mm³ apsolutno suvog korena).

Kod korenasto-krtolastog povrća, najveća brojnost bakterija je konstatovana u površinskom sloju (7.48×10^5 ćelija/mm³ apsolutno suvog korena) i unutrašnjosti (2.05×10^5 ćelija/mm³ aps. suv. korena) korena peršuna. *P. aeruginosa* PA01 (Gfp) je u najmanje površinski i endofitno, kolonizovao koren kukuruza šećerca (*Grafik 29*).

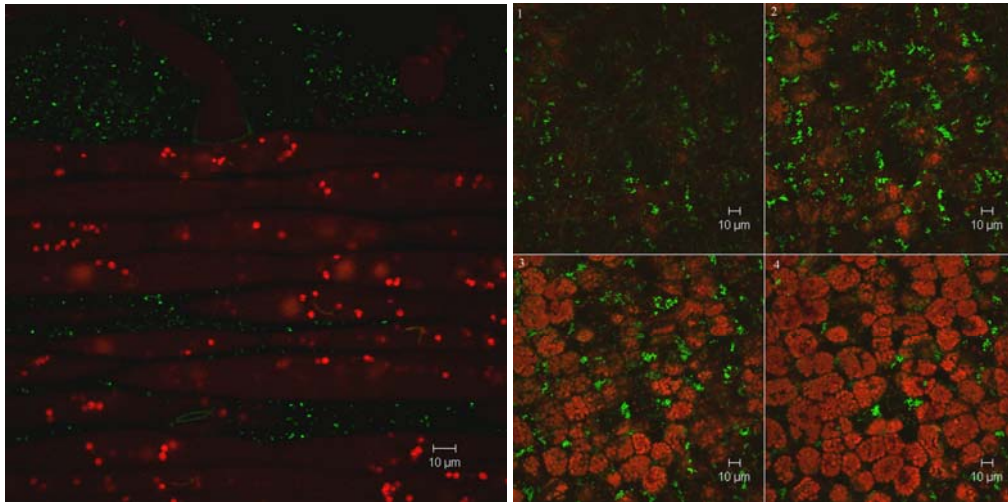
Ćelije *P. aeruginosa* PA01 (Gfp) su vidljive, na površini i u unutrašnjosti korena paradajza gde se nalaze pojedinačno, ali i kao manje mikrokolinije. Ćelije su, uglavnom, locirane u intercelularnim prostorima korena (*Slika 27*).

Grafik 29.

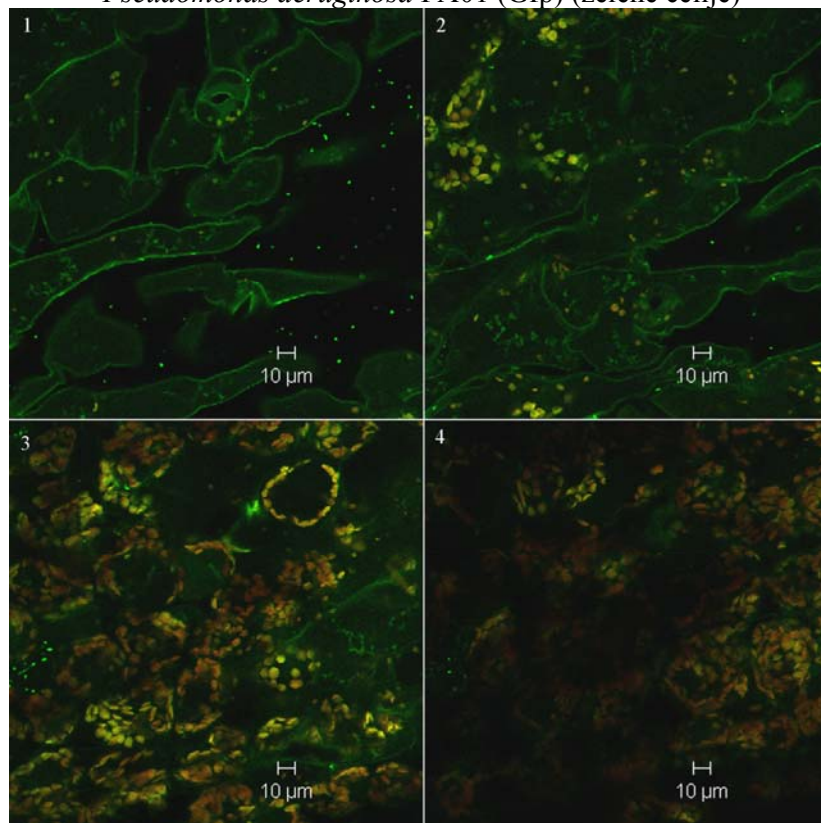


Slika 27. Mikrografija kolonizacije korena paradajza sa *Pseudomonas aeruginosa* PA01 (Gfp) (zelene ćelije)

Konfokalnom mikroskopijom je utvrđeno prisustvo ćelija *P. aeruginosa* PA01 (Gfp) u unutrašnjosti stabla biljaka paradajza, u parenhimu i nisu formirale mikrokolonije.



Slika 28. Mikrografija kolonizacije stabla (levo) i lista (desno) paradajza sa *Pseudomonas aeruginosa* PA01 (Gfp) (zelene ćelije)



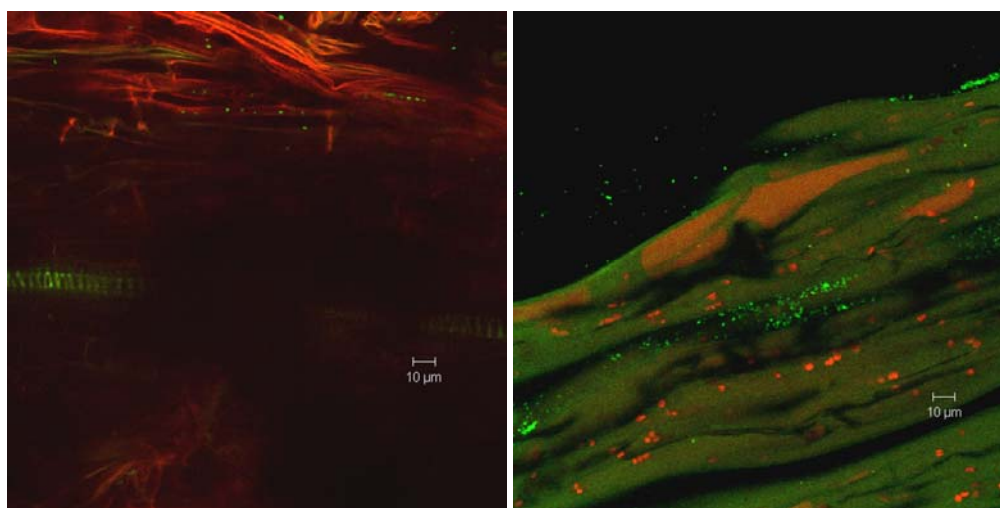
Slika 29. Mikrografija kolonizacije lista spanaća sa *Pseudomonas aeruginosa* PA01 (Gfp) (zelene ćelije)

U unutrašnjosti lista paradajza detektovan je veliki broj ćelija ove bakterije, oko stominih otvora koje formiraju mikrokolonije od većeg broja ćelija. Takođe, mikrokolonije su konstatovane u dubljim slojevima lista, odnosno intercelularnim prostorima lisnog parenhima (Slika 28).

U unutrašnjosti lista spanaća, ćelije *Pseudomonas aeruginosa* PA01 (Gfp) su bile pretežno locirane u zoni stoma, kao i u dubljim slojevima lista. Ćelije su se javljale pojedinačno ili su formirale manje mikrokolonije (Slika 29).

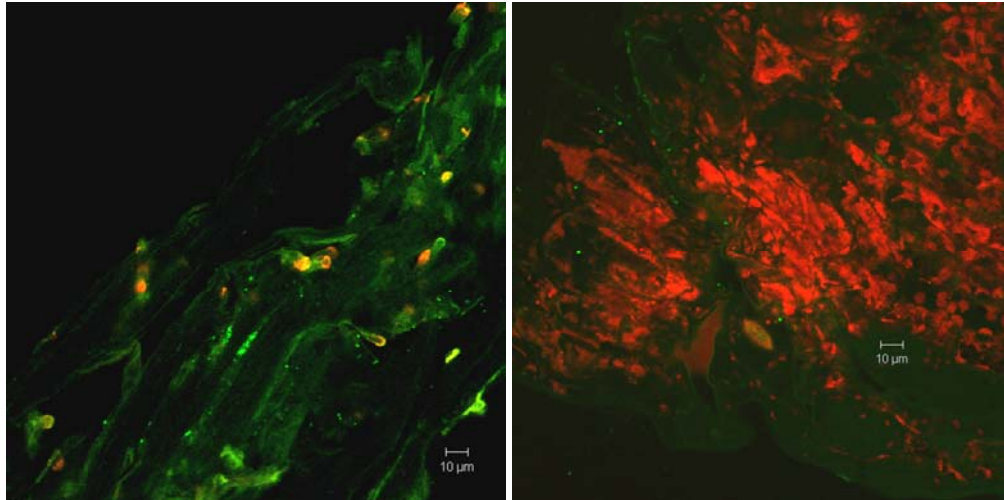
Kod korena spanaća se vidi površinska i endofitna kolonizacija bakterijom *Pseudomonas aeruginosa* PA01 (Gfp), i ćelije su locirane u neposrednoj blizini sprovodnih sudova korena.

Ćelije *Pseudomonas aeruginosa* PA01 (Gfp), formiraju mikrokolonije (biofilm) na površini stabla, a u intercelularnim prostorima se javljaju pojedinačno ili obrazuju mikrokolonije (Slika 30).



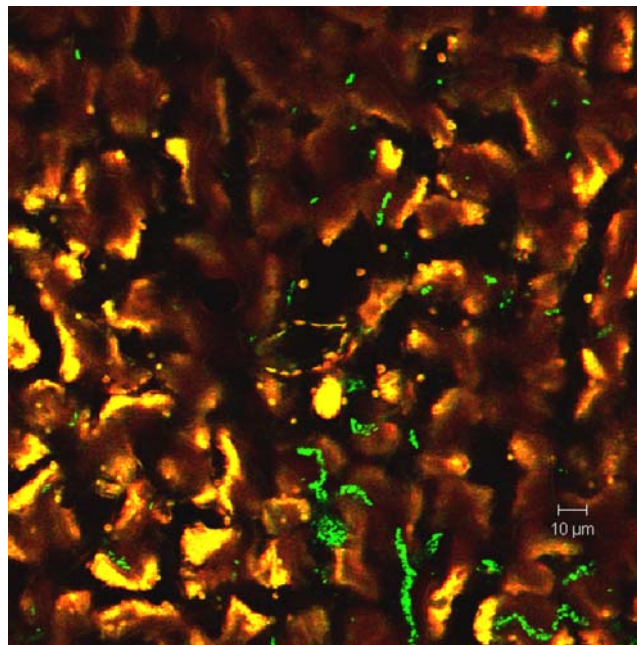
Slika 30. Mikrografija kolonizacije korena (levo) i stabla (desno) spanaća sa *Pseudomonas aeruginosa* PA01 (Gfp) (zelene ćelije)

Analizom mikrografija, vidi se da ćelije *Pseudomonas aeruginosa* PA01 (Gfp) kolonizuju korenove dlačice biljaka peršuna, ali i unutrašnjost korena. U unutrašnjosti stabla peršuna ćelije bakterija su pojedinačne u intercelularnim prostorima parenhima (Slika 31).



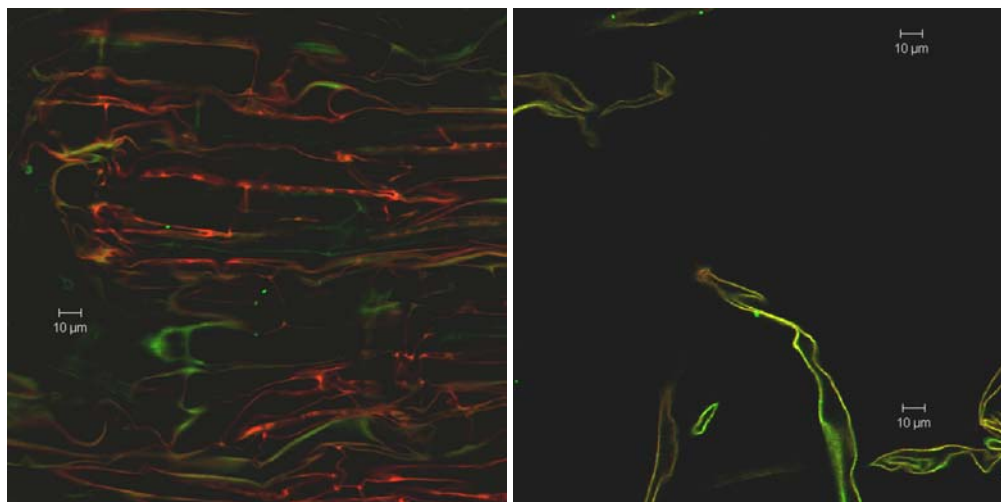
Slika 31. Mikrografija kolonizacije korena (levo) i stabla (desno) peršuna sa *Pseudomonas aeruginosa* PA01 (Gfp) (zelene ćelije)

U unutrašnjosti lista peršuna, ćelije *Pseudomonas aeruginosa* PA01 (Gfp) su u vidu brojnih mikrokolonija u dubljim slojevima od stoma. Nalaze se u intercelularnim prostorima, a njihove mikrokolonije se sastoje od više desetina ćelija (Slika 32).



Slika 32. Mikrografija kolonizacije lista peršuna sa *Pseudomonas aeruginosa* PA01 (Gfp) (zelene ćelije)

Kod korena kukuruza bakterije se vezuju za korenove dlačice a u dubljim slojevima korena, bakterije su koncentrisane u intercelularnim prostorima (Slika 33).



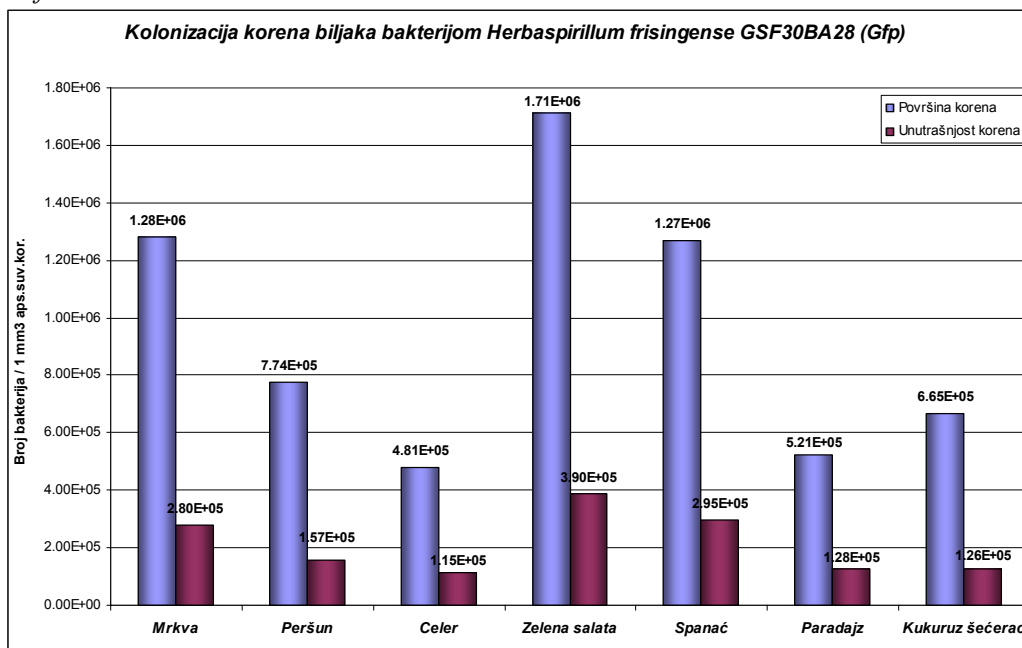
Slika 33. Mikrografija kolonizacije korena kukuruza šećerca sa *Pseudomonas aeruginosa* PA01 (Gfp) (zelene ćelije)

Herbaspirillum frisingense GSF30BA28 (Gfp)

Najveća brojnost *H. frisingense* GSF30BA28 (Gfp) u površinskom sloju (1.71×10^6 ćelija/mm³ apsolutno suvog korena) i unutrašnjem delu korena (3.90×10^5 ćelija/mm³ aps.suv.korena) je kod zelene salate. Broj bakterija kod spanaća i mrkve je približno ujednačen i nešto manji u odnosu na zelenu salatu. Broj bakterija na korenu spanaća je 1.27×10^6 ćelija/mm³ apsolutno suvog korena a 2.95×10^5 ćelija/mm³ aps.suv.korena u unutrašnjosti, a na korenu mrkve 1.28×10^6 ćelija/mm³ aps.suv.korena. Takođe, visok stepen kolonizacije je konstatovan kod korena ostalih ispitivanih biljaka (Grafik 30).

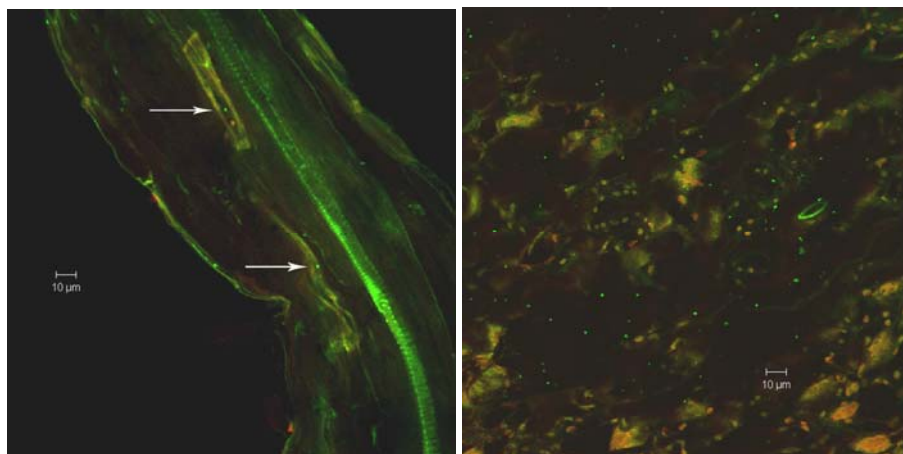
Bakterija *Herbaspirillum frisingense* GSF30BA28 (Gfp) je u korenu zelene salate locirana duboko u unutrašnjosti korena i to pored samog ksilema i na mikrografajima se vide formirane mikrokolonije. U listu ove bakterije se vide kao pojedinačne ćelije, locirane u dubljim slojevima lista i pored samih stoma.

Grafik 30.

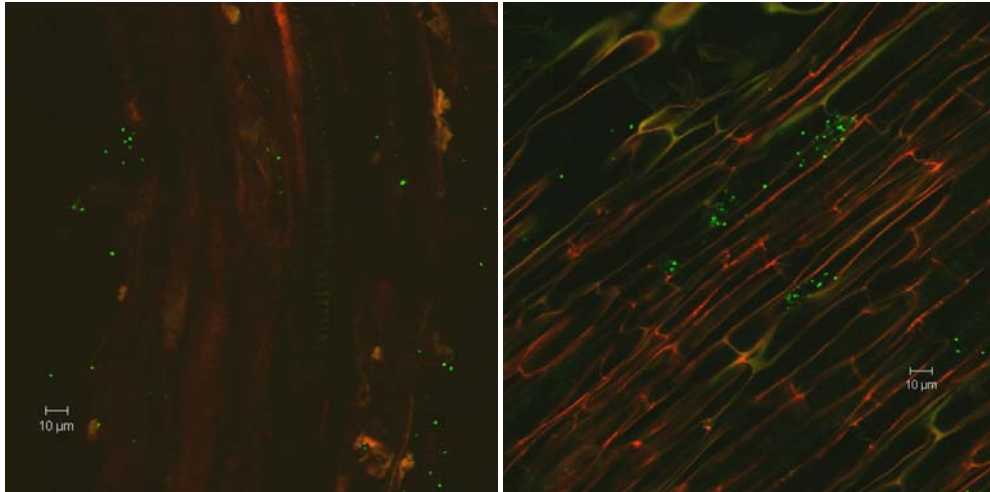


Kod korena peršuna se vidl endofitna, i površinska kolonizacija, posebno korenovih dlačica. U stablu peršuna, bakterije su prisutne u intercelularnim prostorima, ne stvarajući mikrokolonije. Pojedinačne ćelije *Herbaspirillum frisingense* GSF30BA28 (Gfp) su detektovane u intercelularnim prostorima lista peršuna.

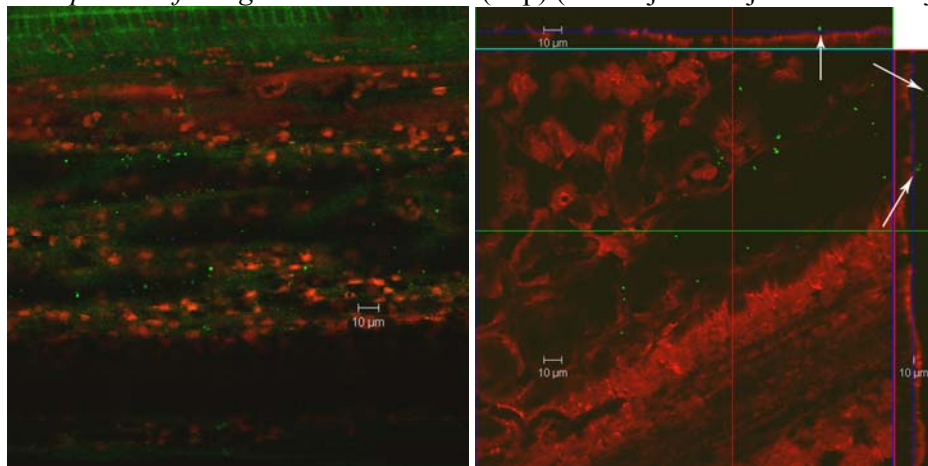
U korenu kukuruza šećerca bakterije su formirale mikrokolonije u međucelijskim prostorima (10–20 ćelija). Na površini stabla, bakterije obrazuju biofilm, dok se u unutrašnjosti stabla pojedinačne (Slike 34, 35, 36).



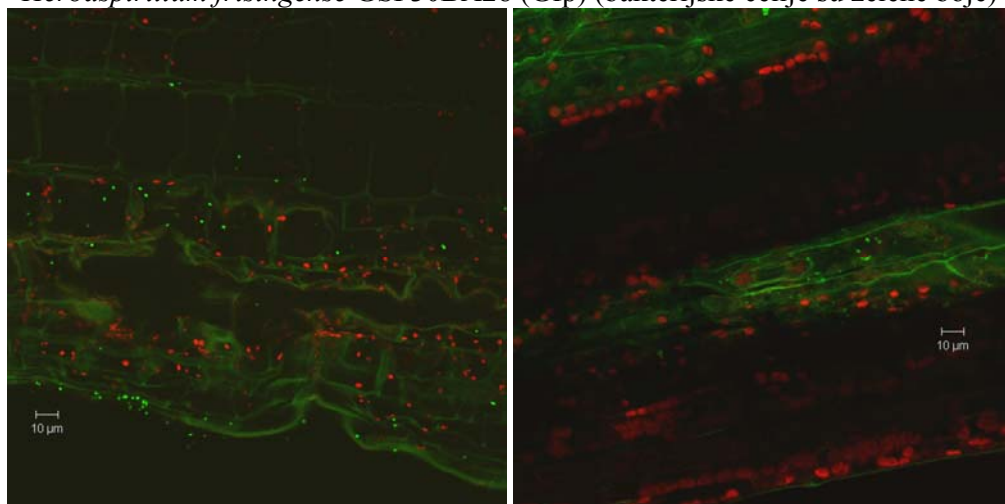
Slika 34. Mikrografija kolonizacije korena (levo) i lista (desno) zelene salate sa *Herbaspirillum frisingense* GSF30BA28 (Gfp) (bakterijske ćelije su zelene boje)



Slika 35. Mikrografija kolonizacije korena peršuna i kukuruza šećerca sa *Herbaspirillum frisingense* GSF30BA28 (Gfp) (bakterijske ćelije su zelene boje)



Slika 36. Mikrografija kolonizacije stabla (levo) i lista (desno) peršuna sa *Herbaspirillum frisingense* GSF30BA28 (Gfp) (bakterijske ćelije su zelene boje)



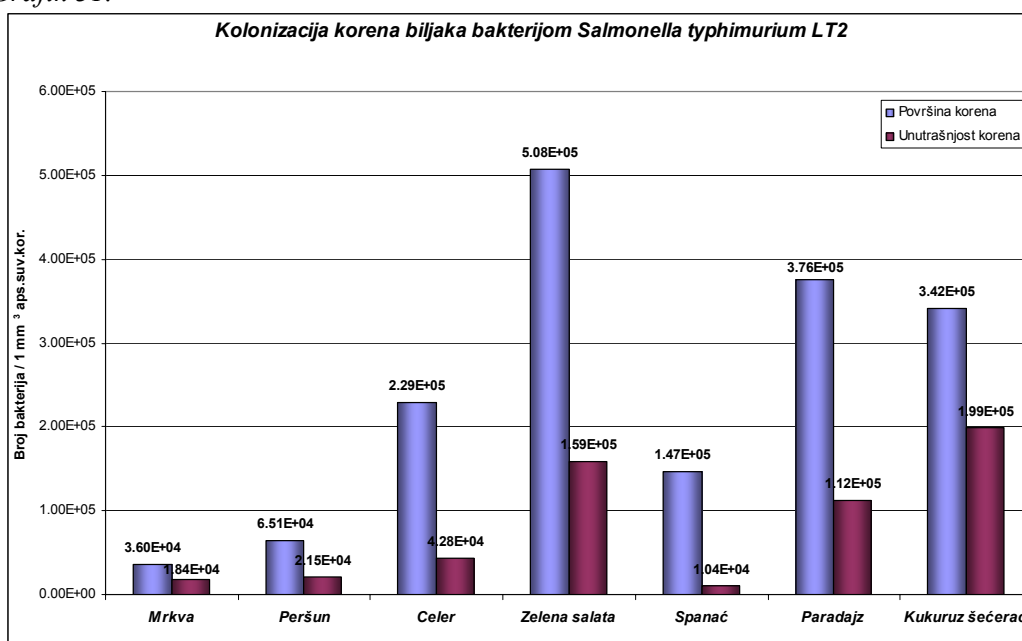
Slika 37. Mikrografija kolonizacije stabla (levo) i lista (desno) kukuruza šećerca sa *Herbaspirillum frisingense* GSF30BA28 (Gfp) (bakterijske ćelije su zelene boje)

U listu kukuruza šećerca, bakterije su uglavnom, licirane pored stominih otvora (Slika 37).

Salmonella enterica serotip *typhimurium* (LT2, S1, ATCC14028)

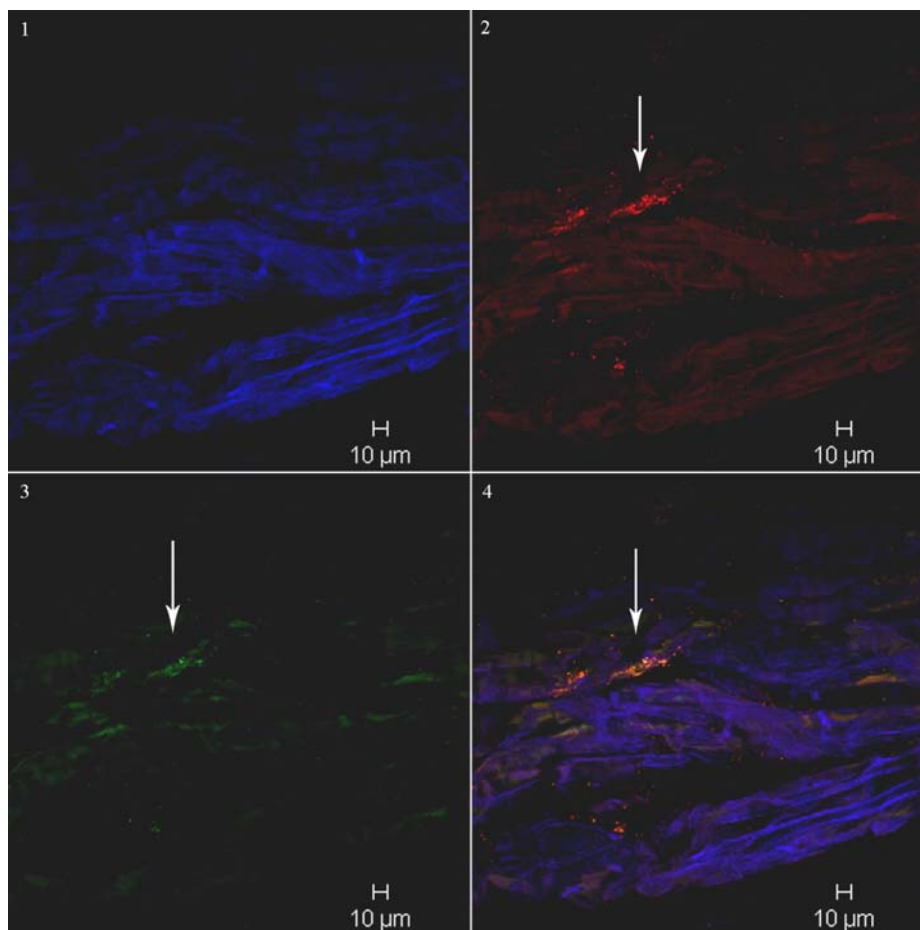
Salmonella typhimurium LT2 je u najvećoj meri kolonizovala površinu korena zelene salate (5.08×10^5 ćelija/mm³ aps.suv.korena).

Grafik 31.



Visok stepen površinske kolonizacije korena je konstatovan kod paradajza i kukuruza šećeraca (3.76×10^5 ćelija/mm³ aps.suv.korena i 3.42×10^5 ćelija/mm³ aps.suv.korena). *S. typhimurium* LT2 je endofitno najbrojnija kod korena kukuruza šećerca (1.99×10^5 ćelija/mm³ aps.suv.korena), zelene salate (1.59×10^5 ćelija/mm³ aps.suv.korena) a kod paradajza je 1.12×10^5 ćelija/mm³ aps.suv.korena (Grafik 31).

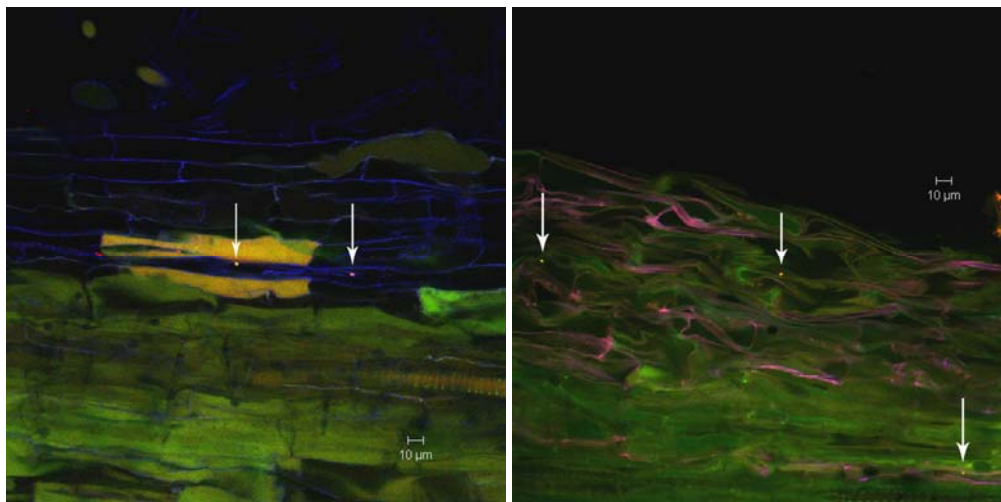
U unutrašnjim slojevima korena zelene salate, ćelije *Salmonella typhimurium* LT2 su pojedinačne ili obrazuju mikrokolonije. Ćelije su locirane isključivo u intercelularnim prostorima i mogu dospeti veoma blizu sprovodnih sudova korena (Slika 38).



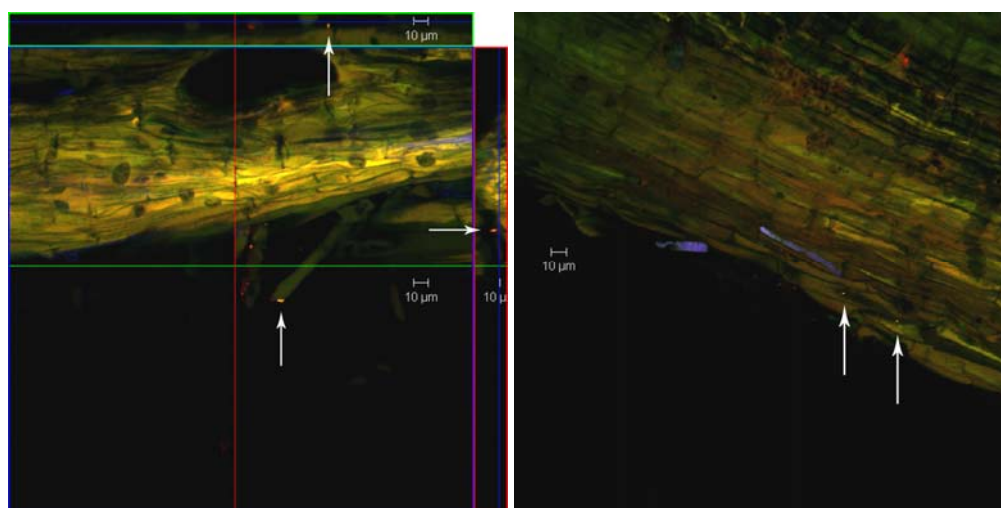
Slika 38. Mikrografija kolonizacije korena zelene salate sa *S. typhimurium* LT2

Kod plodovitog povrća, odnosno paradajza i kukuruza šećerca, konfokalnom mikroskopijom je utvrđeno da ćelije ove bakterije mogu dospeti veoma duboko u unutrašnjost korena, odnosno do samog ksilema, što se jasno vidi na mikrografijama (Slika 39).

Ćelije *Salmonella typhimurium* LT2 u velikom stepenu kolonizuju površinu korenovih dlačica, kao i površinu samog korena. Takođe, ćelije su detektovane u intercelularnim prostorima dubljih slojeva korena ovih biljaka (Slika 40).



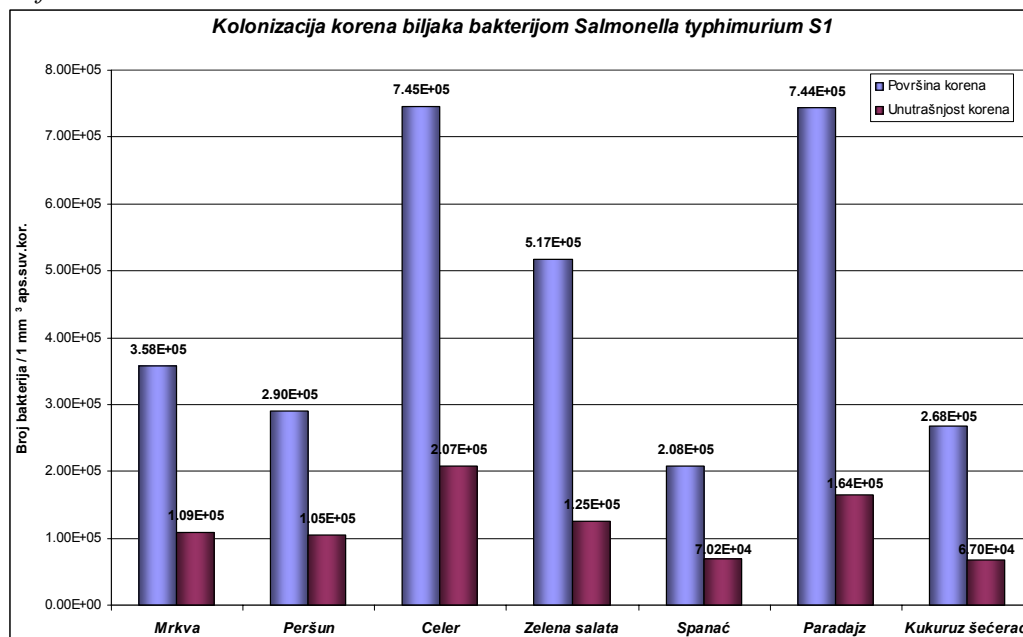
Slika 39. Mikrografija kolonizacije korena paradajza (levo) i kukuruza šećerca (desno) sa *Salmonella typhimurium* LT2



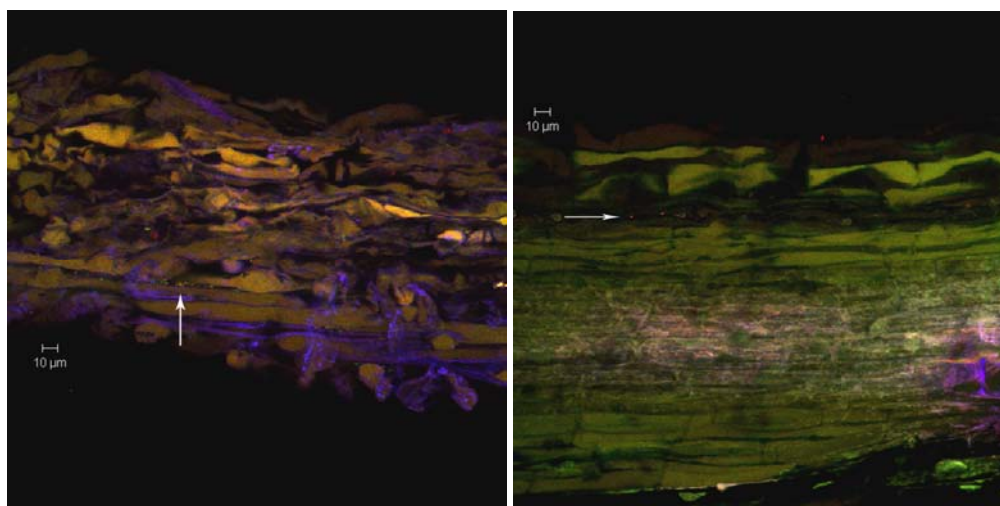
Slika 40. Mikrografija kolonizacije korena celera (levo) i mrkve (desno) sa *Salmonella typhimurium* LT2

Površinska i endofitna kolonizacija korena *Salmonella typhimurium* S1 je najizraženija kod celera i paradajza. Broj bakterija u površinskom sloju i unutrašnjosti korena celera je 7.45×10^5 ćelija/mm³ aps.suv.korena i 2.07×10^5 ćelija/mm³ aps.suv.korena, a kod paradajza 7.44×10^5 ćelija/mm³ aps.suv.korena (površina) i 1.64×10^5 ćelija/mm³ aps.suv.korena (unutrašnjost). Konstatovana je i velika brojnost *S. typhimurium* S1 na površini korena zelene salate (5.17×10^5 ćelija/mm³ aps.suv.korena). Najmanja kolonizacija je na površini i unutrašnjosti korena spanaća i kukuruza šećerca (Grafik 32).

Grafik 32.



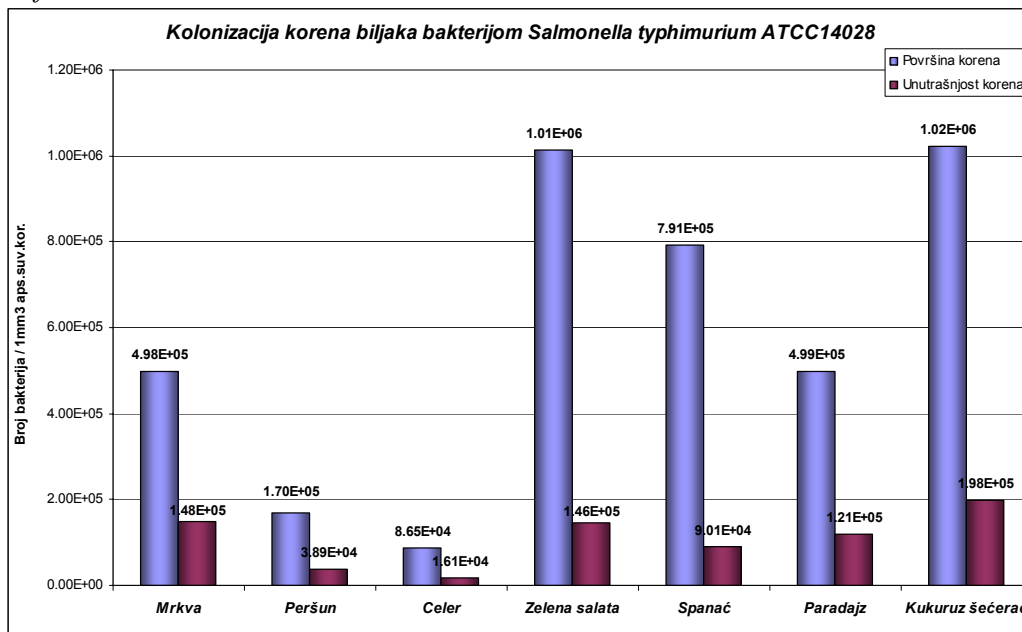
Ćelije *Salmonella typhimurium* S1 u velikom stepenu kolonizuju koren zelene salate i peršuna, obrazujući brojne mikrokolonije, agregacije u intercelularnim prostorima (Slika 41).

Slika 41. Mikrografija kolonizacije korena zel. salate i peršuna sa *S. typhimurium* S1

Brojnost bakterija soja *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 je najveća na korenu lisnatih i plodovitih povrtarskih vrsta, dok je kod korenasto-krtolastih biljaka bila nešto manja. Tako, najveći broj *S. typhimurium* ATCC 14028 je detektovan u

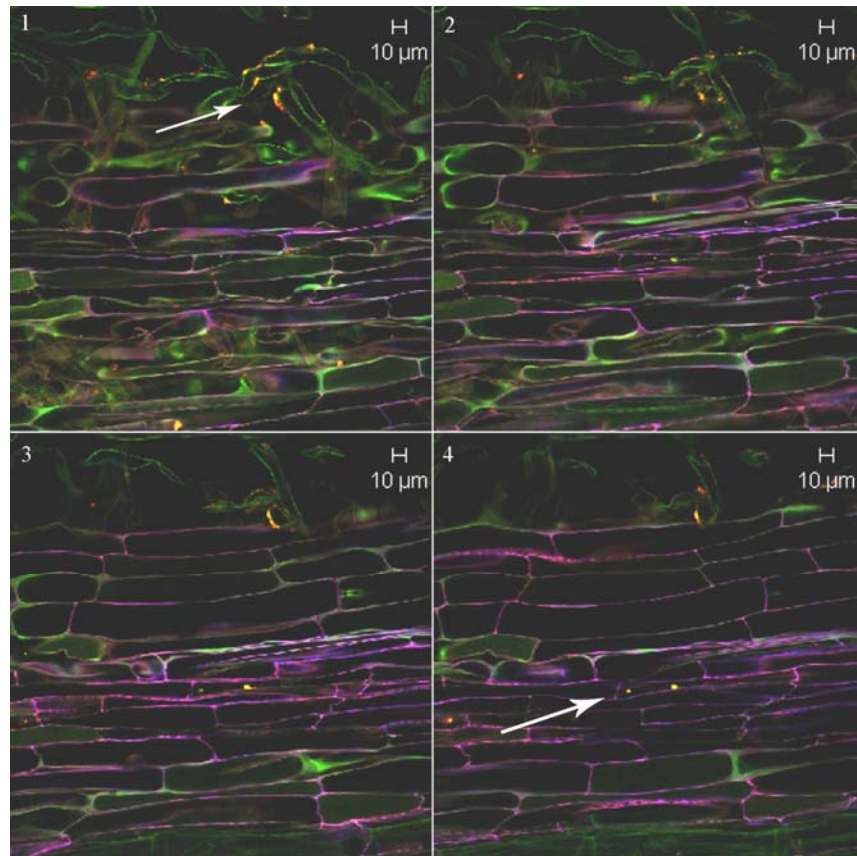
površinskom delu korena zelene salate i kukuruza šećerca (1.01×10^6 ćelija/mm³ aps.suv.korena i 1.02×10^6 ćelija/mm³ aps.suv.korena). Takođe, bakterije su i endofitno kolonizovale ove biljne vrste. Kod korenasto-krtolastih biljnih vrsta, *S. typhimurium* ATCC 14028 je najbrojnija na površini korena (4.98×10^5 ćelija/mm³ aps.suv.korena) i unutrašnjosti korena (1.48×10^5 ćelija/mm³ aps.suv.korena) mrkve (Grafik 33).

Grafik 33.

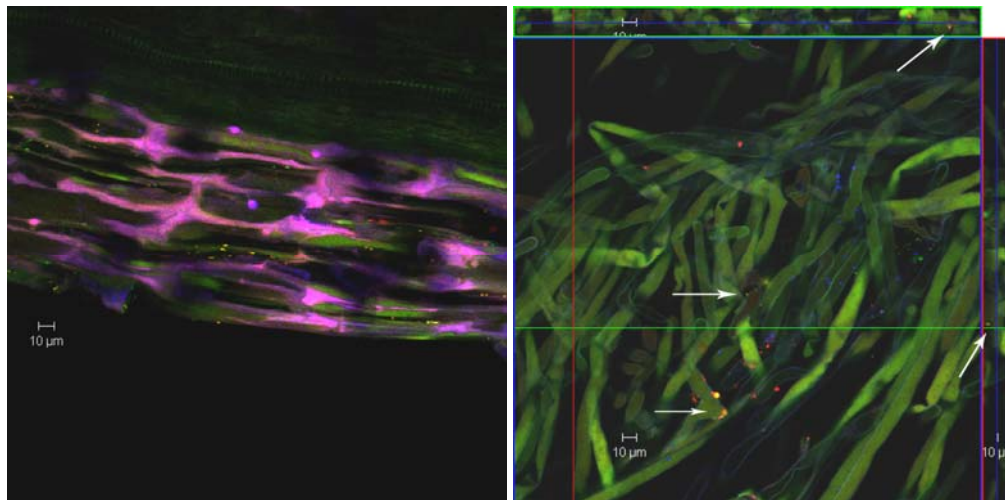


Ćelije bakterije *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 su intenzivno kolonizovale površinu korenovih dlačica kukuruza šećeraca i obrazovale su agregacije, odnosno biofilm na njihovoj površini. U dubljim slojevima korena, ćelije su pojedinačne u intercelularnim prostorima (Slika 42).

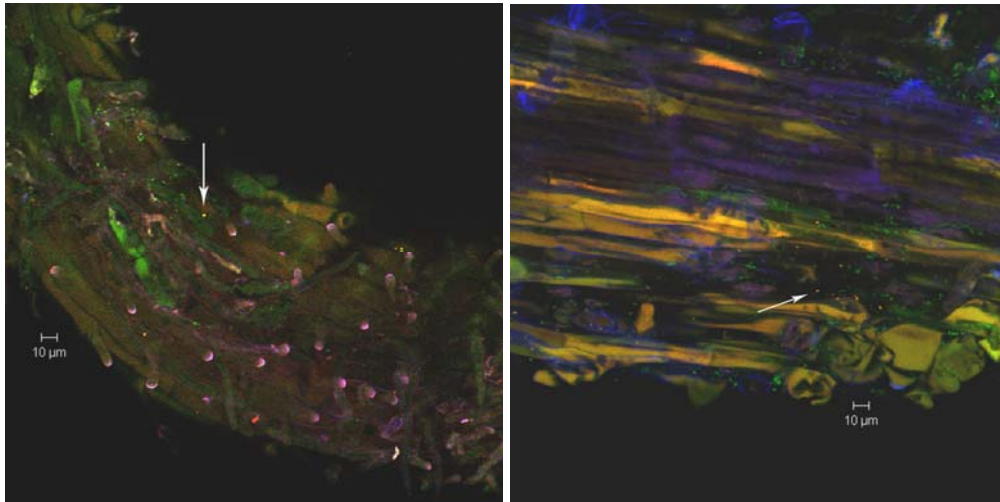
Karakteristično je da su kod zelene salate, ćelije bakterija detektovane unutar korena formirajući mikrokolonije u intercelularnim prostorima u blizini ksilemskih sudova. Kod spanaća bakterije su čvrsto vezana za korenove dlačice formirajući njima biofilm (Slika 43).



Slika 42. Mikrografija kolonizacije korena kukuruza šećerca sa *Salmonella typhimurium* ATCC 14028

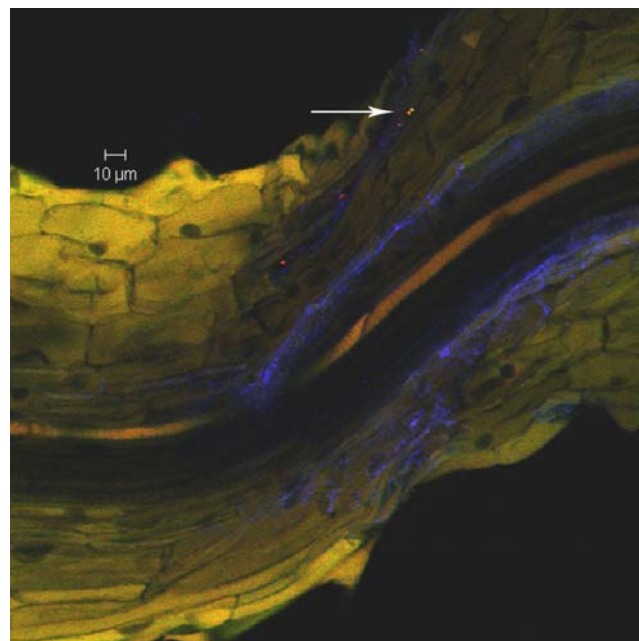


Slika 43. Mikrografija kolonizacije korena zelene salate (levo) i spanaća (desno) sa *Salmonella typhimurium* ATCC 14028



Slika 44. Mikrografija kolonizacije korena peršuna (levo) i mrkve (desno) sa *Salmonella typhimurium* ATCC 14028

Kada su u pitanju korenasto-krtolaste biljne vrste, ćelije *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 su locirane na samoj površini korena peršuna, dok su ređe zastupljene na korenovim dlačicama. Kod mrkve i celera ćelije bakterija se nalazile u intercelularnim prostorima veoma duboko u korenu, blizu sprovodnih sudova (Slike 44, 45).

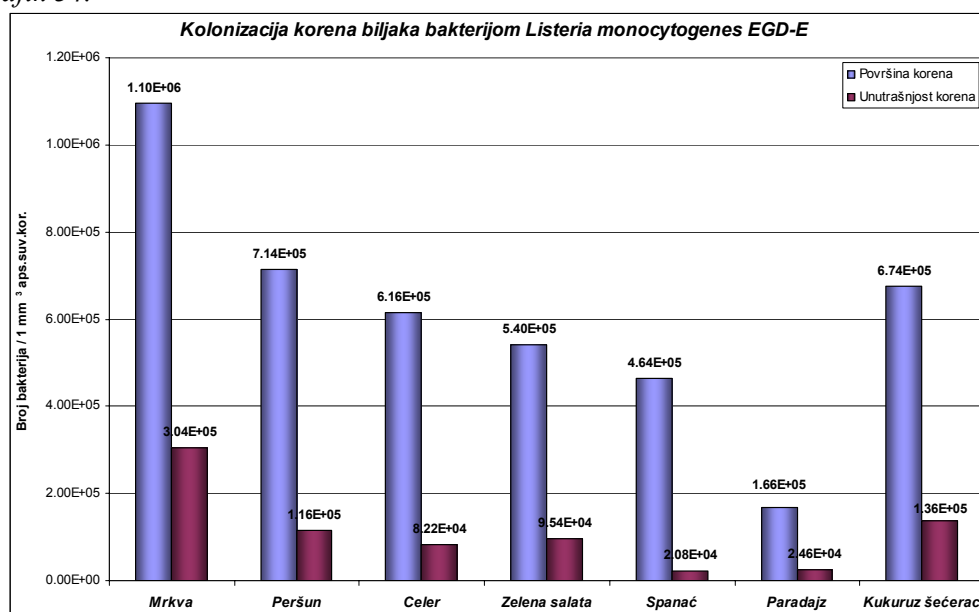


Slika 45. Mikrografija kolonizacije korena celera sa *S. typhimurium* ATCC 14028

Listeria monocytogenes (EGD-E, SV4B)

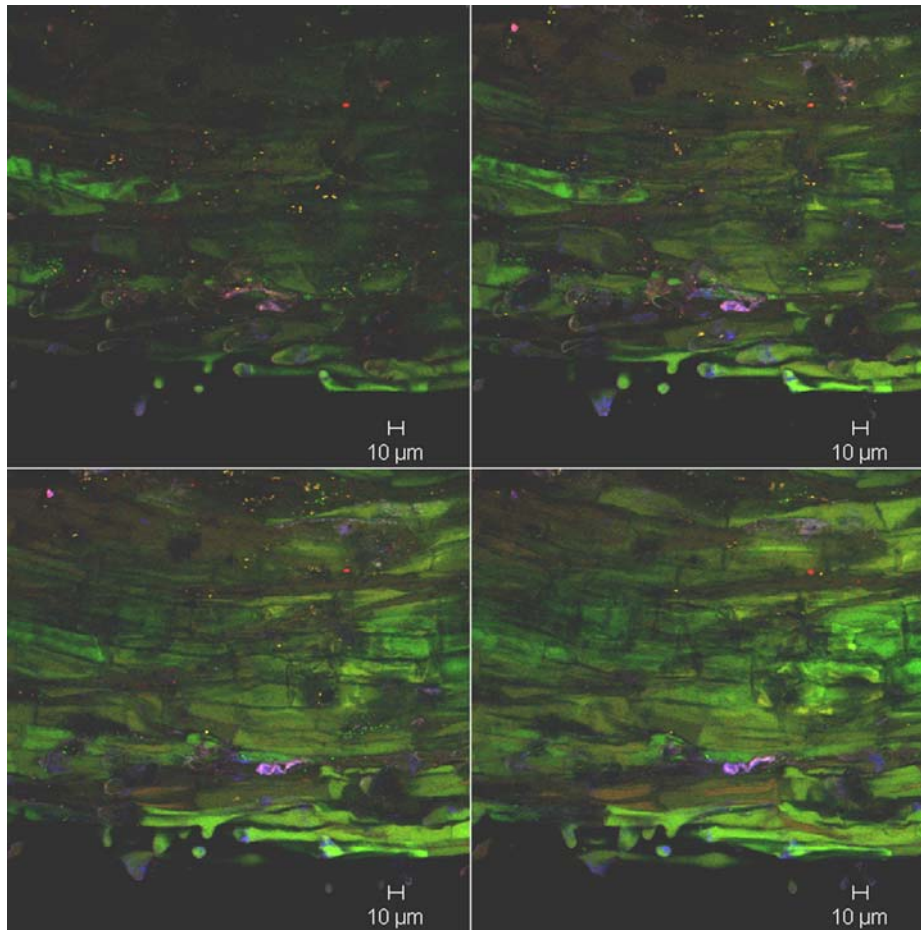
Listeria monocytogenes EGD-E je površinski i endofitno kolonizovala koren mrkve, takođe, visoka sposobnost kolonizacije je konstatovana kod peršuna i celera. Od ostalih biljnih vrsta, značajan broj *L. monocytogenes* EGD-E je detektovan u površinskom sloju i unutrašnjosti korena (6.74×10^5 ćelija/mm³ aps.suv.korena i 1.36×10^5 ćelija/mm³ aps.suv.korena) kukuruza šećerca (Grafik 34).

Grafik 34.

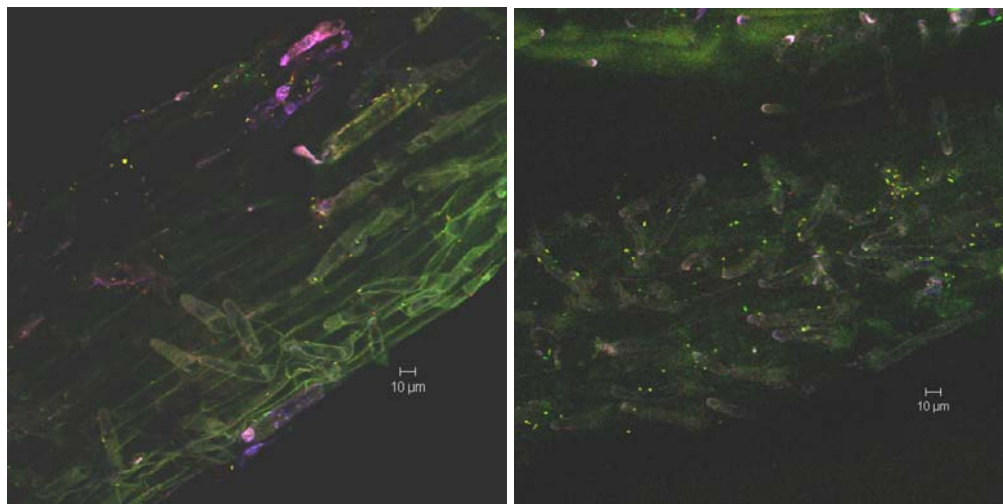


Na osnovu dobijenih mikrografija, utvrđeno je da se ćelije *Listeria monocytogenes* EGD-E vezuju za površinom korena mrkve, a slabije se nalaze na korenovim dlačicama. U unutrašnjim slojevima korena, bakterijske ćelije su naseljavale intercelularne prostore i uglavnom kao pojedinačne ćelije (Slika 46).

Na korenu ostalih ispitivina korenasto-krtolastih biljnih vrsta, celera i peršuna, bakterijske ćelije su detektovane na korenovim dlačicama. U dubljim slojevima korena, bakterije su pojedinačne u međućelijskim prostorima i veoma blizu sprovodnih sudova korena (Slika 47).



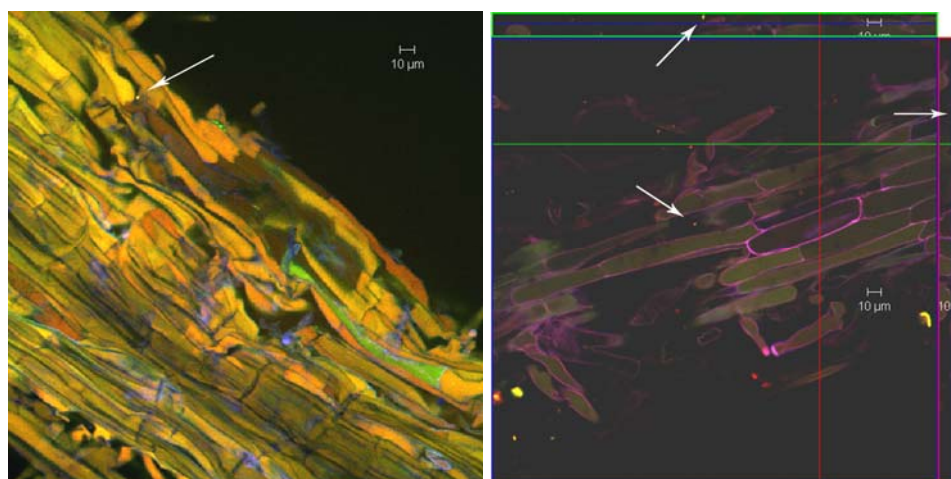
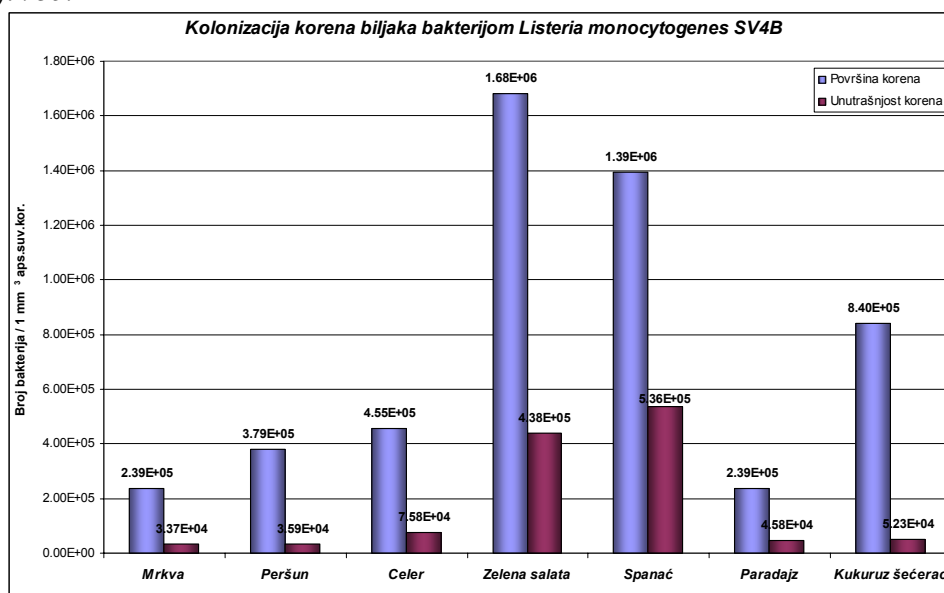
Slika 46. Mikrografija kolonizacije korena mrkve sa *Listeria monocytogenes* EGD-E



Slika 47. Mikrografija kolonizacije korena celera (levo) i peršuna (desno) sa *Listeria monocytogenes* EGD-E

Kolonizacija korena sa *Listeria monocytogenes* SV4B je najizraženija kod zeljastih povrtarskih biljaka (zelena salata i spanać). Broj bakterija na površini korena zelene salate je 1.68×10^6 ćelija/mm³ aps.suv.korena, u unutrašnjosti korena 4.38×10^5 ćelija/mm³ aps.suv.korena. Na površini korena spanaća broj *L. monocytogenes* SV4B je 1.39×10^6 ćelija/mm³ aps.suv.korena, međutim ova bakterija je endofitno najviše kolonizovala koren spanaća u poređenju sa ostalim ispitivanim biljnim vrstama. Visok stepen površinske kolonizacije korena je konstatovan i kod kukuruza šećerca. *Listeria monocytogenes* SV4B je najslabije kolonizovala korenasto-krtolasto povrće (Grafik 35).

Grafik 35.



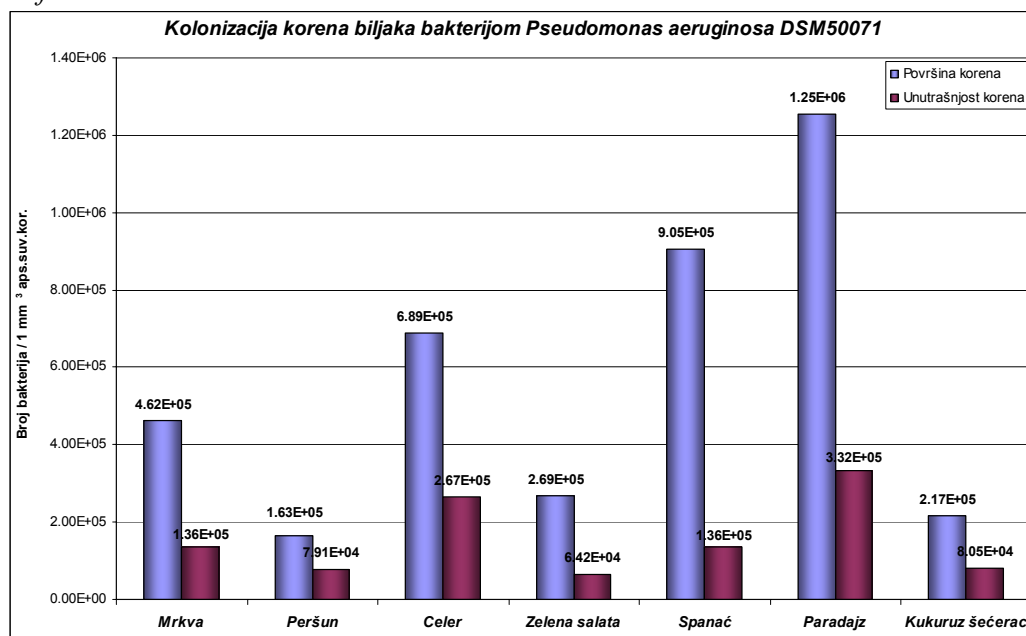
Slika 48. Mikrografija kolonizacije korena celera (levo) i kukuruza šećerca sa *Listeria monocytogenes* SV4B

Bakterijske ćelije *Listeria monocytogenes* SV4B su pojedinačno zastupljene u endofitnoj kolonizaciji celera i kukuruza šećerca (Slika 48).

Pseudomonas aeruginosa DSM50071

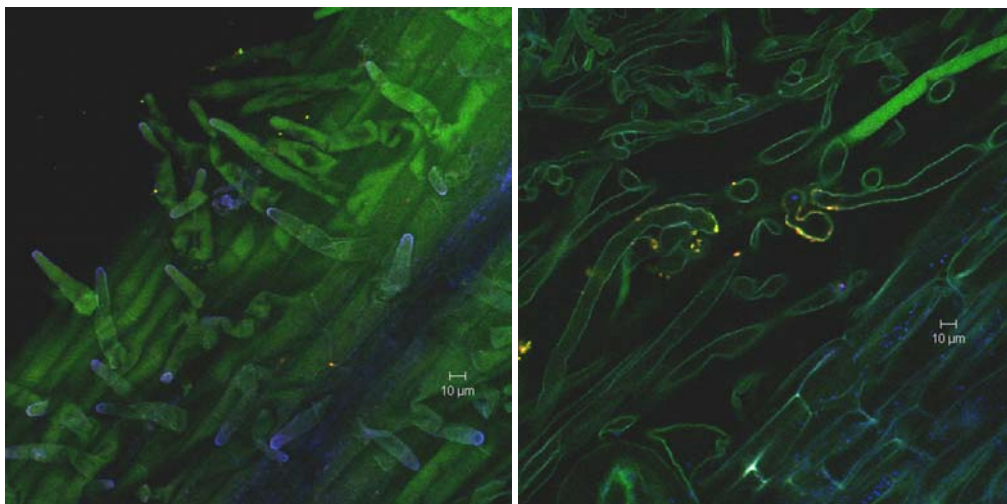
Vrsta *Pseudomonas aeruginosa* DSM50071 je najviše površinski i endofitno kolonizovala korena paradajza. U površinskom delu korena broj *P. aeruginosa* DSM50071 je 1.25×10^6 ćelija/mm³ aps.suv.korena, dok je u unutrašnjim slojevima korena njegov broj iznosio 3.32×10^5 ćelija/mm³ aps.suv.korena.

Grafik 36.



Visok stepen površinske kolonizacije korena ovom bakterijom je zapažen i kod spanaća (9.05×10^5 ćelija/mm³ aps.suv.korena), celera (6.89×10^5 ćelija/mm³ aps.suv.korena) i mrkve (4.62×10^5 ćelija/mm³ aps.suv.korena). Broj *P. aeruginosa* DSM50071 u unutrašnjim slojevima korena spanaća je 1.36×10^5 ćelija/mm³ aps.suv.korena, a kod celera 2.67×10^5 ćelija/mm³ aps.suv.korena (Grafik 36).

Za *Pseudomonas aeruginosa* DSM50071 je karakteristično formiranje biofilma na samoj površini korenovih dlačica a endofitno ćelije bakterija su pojedinačne (Slika 49).



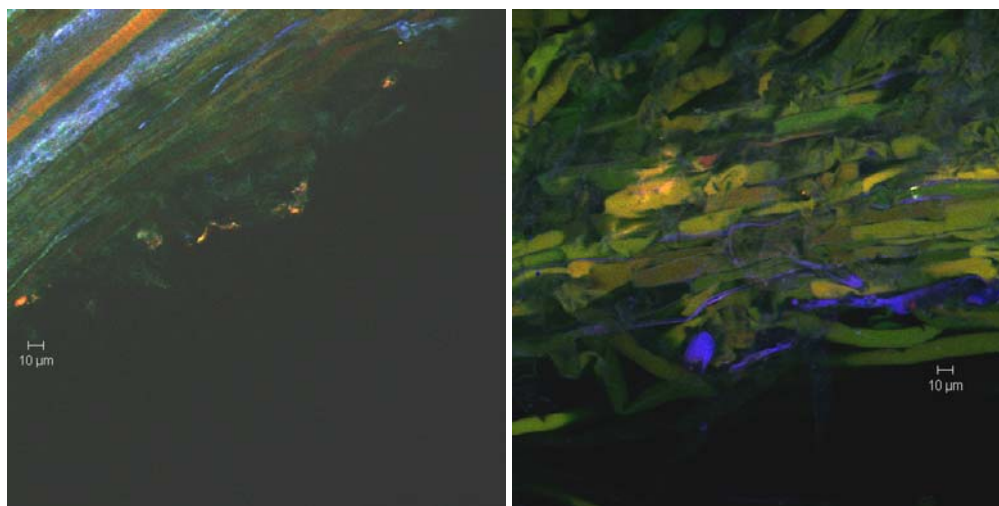
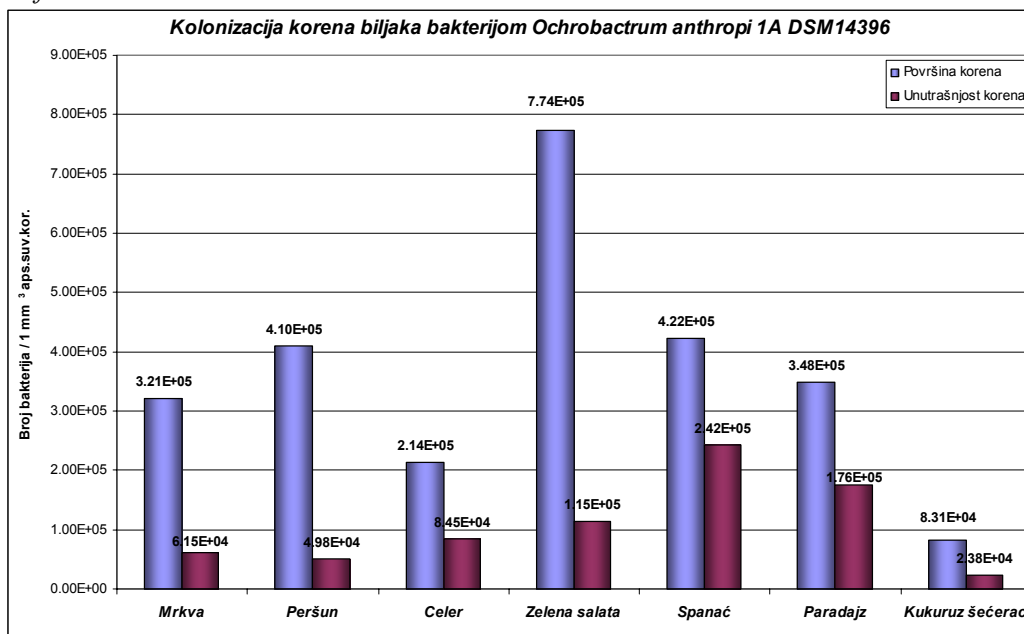
Slika 49. Mikrografija kolonizacije korena celera (levo) i spanaća (desno) sa *Pseudomonas aeruginosa* DSM50071

Ochrobactrum anthropi 1A DSM14396

Bakterija *Ochrobactrum anthropi* 1A DSM14396 je površinski kolonizovala koren zelene salate (7.74×10^5 ćelija/mm³ aps.suv.korena), spanaća (4.22×10^5 ćelija/mm³ aps.suv.korena) i peršuna (4.10×10^5 ćelija/mm³ aps.suv.korena). Endofitno je naviše kolonizovala koren spanaća (2.42×10^5 ćelija/mm³ aps.suv.korena), a zatim koren paradajza i zelene salate (1.76×10^5 ćelija/mm³ aps.suv.korena i 1.15×10^5 ćelija/mm³ aps.suv.korena). Najmanja kolonizacije korena je konstatovana kod kukuruza šećerca (Grafik 37).

Bakterijske ćelije *Ochrobactrum anthropi* 1A DSM14396 su obrazovale biofilm na površini korena. To je naročito izraženo kod korenasto-krtolastih i zeljastih biljnih vrsta. Endofitna kolonizacija je naročito izražena kod zeljastog i plodovitog povrća, gde su se bakterijske ćelije prisutne u intercelularnim prostorima formirajući mikro-agregacije. U dubljim slojevima korena, bakterije se javljaju pojedinačno (Slika 50).

Grafik 37.



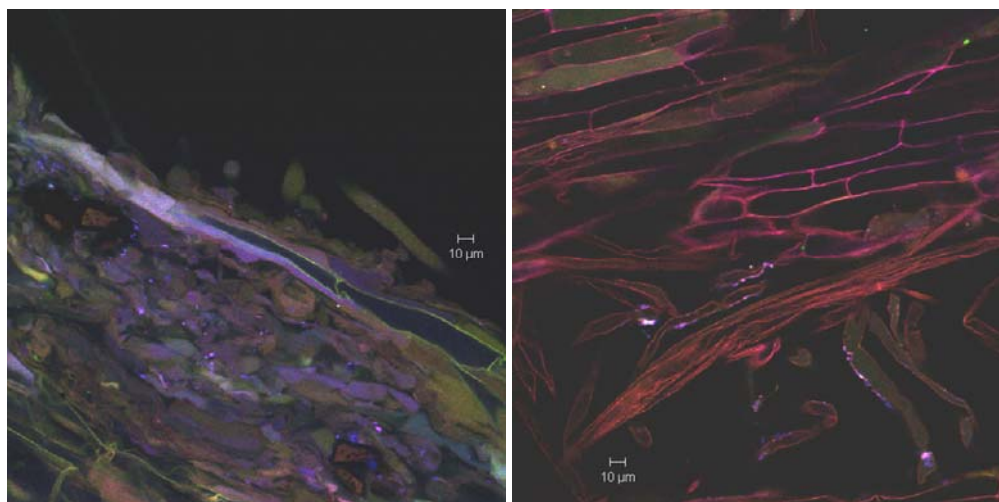
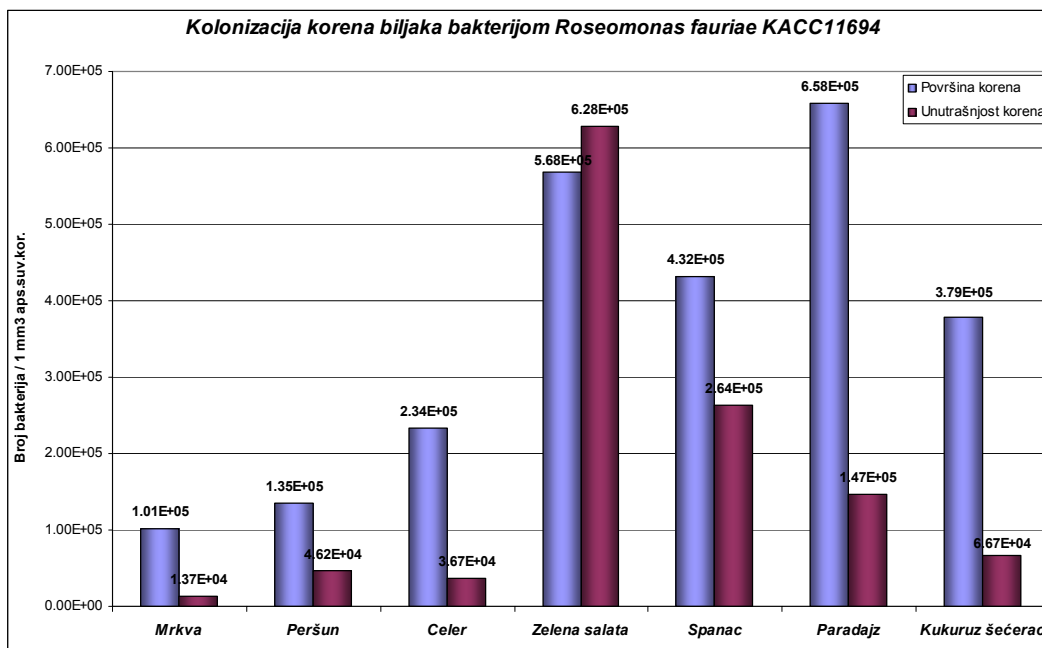
Slika 50. Mikrografija kolonizacije korena celera (levo) i zelene salate (desno) sa *Ochrobactrum anthropi* 1A DSM14396

Roseomonas spp.

Vrsta *Roseomonas fauriae* KACC11694 je površinski i endofitno kolonizovala koren zeljastog i plodovitog povrća. Broj *R. fauriae* KACC11694 je najveći na površini korena paradajza (6.58×10^5 ćelija/mm³ aps.suv.korena), dok je endofitno ova bakterija najbrojnija u korenu zelene salate (6.28×10^5 ćelija/mm³ aps.suv.korena). Najmanji stepen

kolonizacije je konstatovan kod korenasto-krtolastog povrća (mrkva, peršu i celer) (Grafik 38).

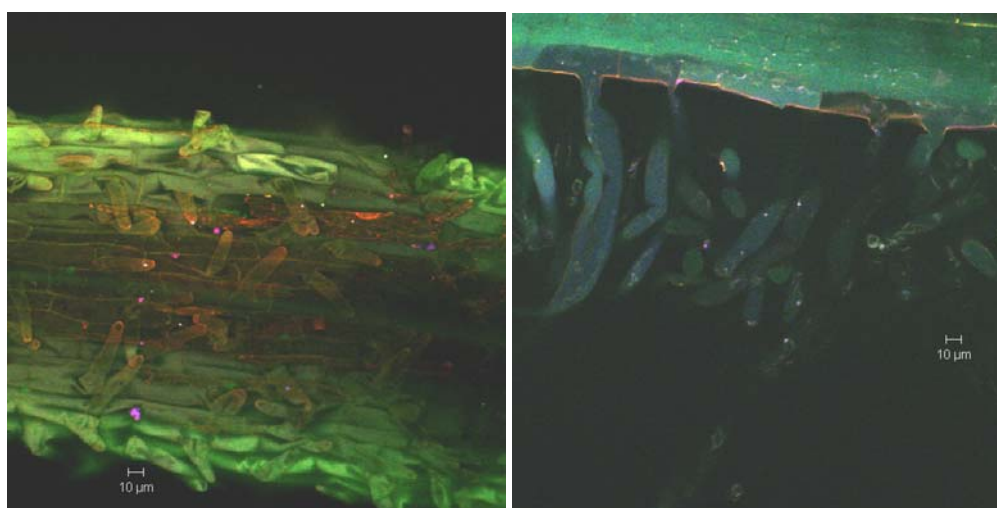
Grafik 38.



Slika 51. Mikrografija kolonizacije korena paradajza (levo) i kukuruza šećeraca (desno) sa *Roseomonas fauriae* KACC11694

Rezultati konfokalne mikroskopije su pokazali da ćelije *Roseomonas fauriae* KACC11694 formiraju mikrokolonije na površinskom delu korena i korenovih dlačica kukuruza šećerca i paradajza, dok se u dubljim slojevima korena pretežno se javljaju kao pojedinačne ćelije u intercelularnim prostorima (Slika 51).

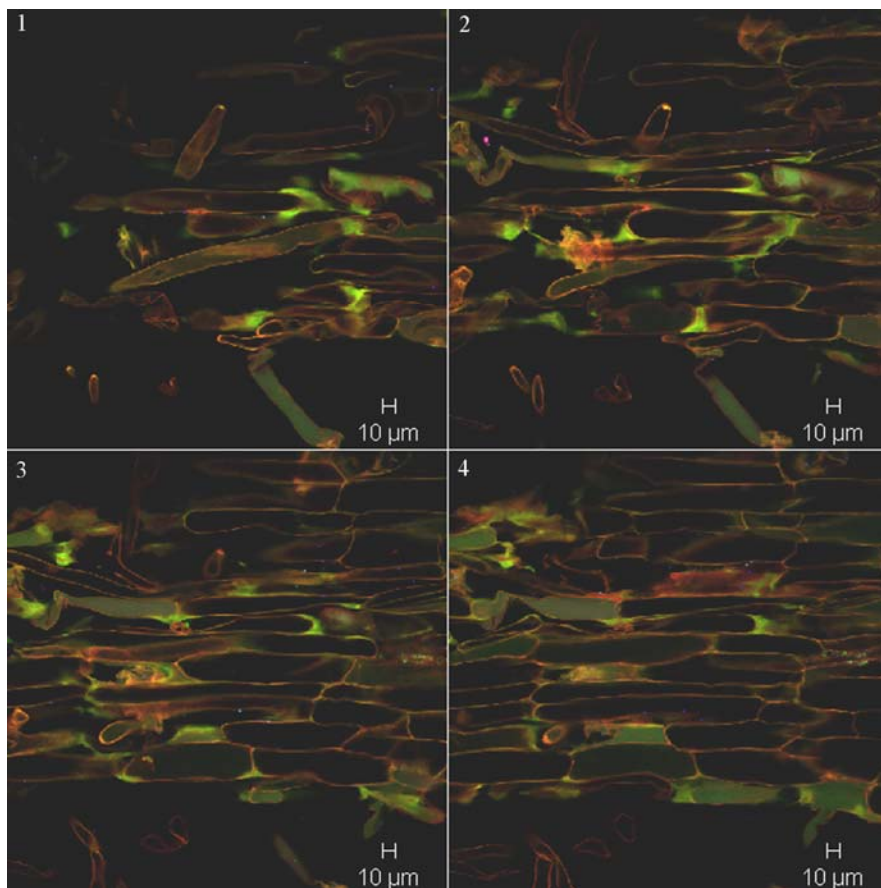
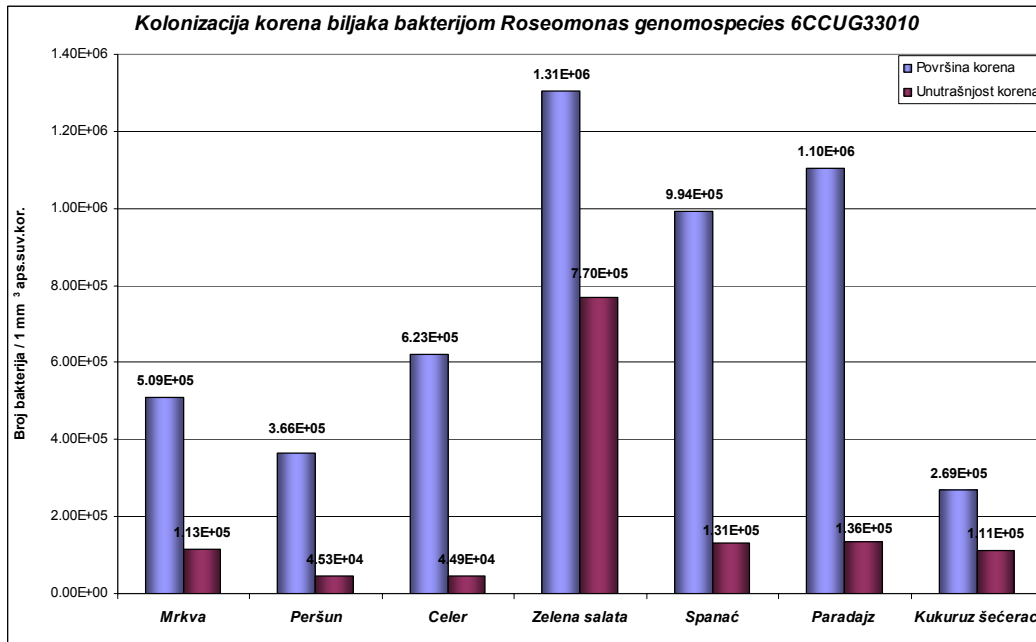
Na korenu biljaka celera i zelene salate, konstatovano je da su bakterijske ćelije bile pojedinačne i čvrsto vezane, kako za samu površinu korena, tako i za površinu korenovih dlačica. U unutrašnjem delu korena ovih biljaka, bakterije su bile pojedinačno zastupljene u intercelularnim prostorima u blizini ksilema (Slika 52).

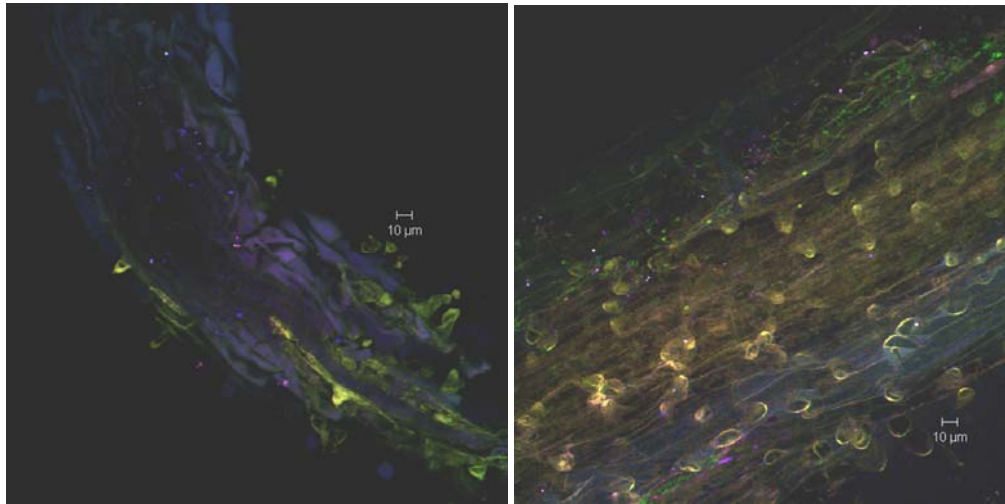


Slika 52. Mikrografija kolonizacije korena celera (levo) i zelene salate (desno) sa *Roseomonas fauriae* KACC11694

Broj bakterija vrste *Roseomonas genomospecies* 6CCUG33010 je najveći kod korena zelene salate, 1.31×10^6 ćelija/mm³ aps.suv.korena u površinskom delu korena i u unutrašnjem delu 7.70×10^5 ćelija/mm³ aps.suv.korena. Velika brojnost *R. genomospecies* 6CCUG33010 je konstatovana i na površini korena paradajza (1.10×10^6 ćelija/mm³ aps.suv.korena). Ova bakterija su najmanje površinski kolonizovale koren kukuruza šećerca (2.69×10^5 ćelija/mm³ aps.suv.korena), a endofitno koren peršuna i celera (4.53×10^4 ćelija/mm³ aps.suv.korena i 4.49×10^4 ćelija/mm³ aps.suv.korena). (Grafik 39).

Grafik 39.

Slika 53. Mikrografija kolonizacije korena kukuruza šećerca sa *Roseomonas genomospecies* 6CCUG33010



Slika 54. Mikrografija kolonizacije korena peršuna (levo) i mrkve (desno) sa *Roseomonas genomospecies* 6CCUG33010

Roseomonas genomospecies 6CCUG33010, nije formirao agregacije na površini i unutrašnjosti korena kukuruza šećerca. Čelije su pojedinačno i locirane u intercelularnim prostorima, što se veoma jasno vidi na mikrografijama (Slika 53).

Kod korenasto-krtolastih biljnih vrsta, peršuna i mrkve, bakterijske čelije kolonizovale su površinu korena i nisu formirale nikakve agregacije (Slika 54).

6. DISKUSIJA

6.1. Patogene bakterije u površinskim vodama

Navodnjavanje može biti izvor patogenih organizama i odgovorno za neke epidemije (Gerba, 2009), a US FDA (2009) ističe da smanjenje kontaminacije svežeg povrća pre berbe je od presudnog značaja u smanjenju rizika bolesti koje se prenose hranom. Transport patogenih mikroorganizama na površinu biljaka preko vode za navodnjavanje od ključnog je značaja u biljno mikrobnj ekološki i osnov za pojavu bolesti koje se prenose hranom (Mandrell, 2011; Pachepsky i sar., 2011). Stoga je u radu ispitan mikrobiološki kvalitet površinskih voda koje se koriste za navodnjavanje, ili bi se potencijalno mogle koristiti za navodnjavanje, imajući u vidu očekivanja da će nestašica vode postati sve veći problem u budućnosti, a kao glavni razlog ističe se smanjenje kvaliteta voda.

Procena mikrobiološkog kvaliteta voda je vršena na osnovu prisustva ukupnih i fekalnih koliformnih bakterija, i patogenih bakterija kao indikatora mikrobiološke kontaminacije voda.

Prema U.S. Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual, koliformne bakterije se definišu kao Gram-negativni štapići koji produkuju kiselinu i gas kao rezultat fermentacije laktoze. *E. coli* je koliformna bakterija, ali za razliku od ostalih koliformnih bakterija, većina sojeva ove bakterije produkuje enzim β -glukuronidaza (β -glucuronidase). Ukupne koliformne bakterije su indikator zagađenja koje se odnosi na duži vremenski period, a fekalne koliformne bakterije su indikator trenutnog dospevanja materija fekalnog porekla u vodu, odnosno trenutnog stanja voda.

U gornjem i donjem delu vodotoka "Šugavac", na lokaciji O.Š.D. Radmilovac, prosečne vrednosti ukupnih koliformnih bakterija, u dvogodišnjem periodu ispitivanja, iznosile su od 5.31×10^3 do 4.89×10^5 CFU/100ml, a prosečne vrednosti fekalnih koliformnih bakterija su od 1.67×10^3 do 4.31×10^5 CFU/100ml.

U poređenju sa nemačkim standardom DIN 19650, koji se odnosi na vodu za navodnjavanje, voda ovog vodotoka se ne mogu preporučiti za navodnjavanje bez predhodnog tretmana, a posebno za navodnjavanje povrća koje se konzumira bez termičke obrade (Stauffer i sar., 2001.). Ovaj standard preporučuje odsustvo *E. coli* i

enterokoka u vodi koja se koristi za navodnjavanje bez ograničenja. Za navodnjavanje biljaka koje se konzumiraju sveže, ovaj standard preporučuje manje od 200 *E. coli* i manje od 100 enterokoka u 100 ml vode, dok za navodnjavanje povrća do 2 nedelje pre žetve i biljaka koje se konzumiraju sveže do vremena fruktifikacije, preporučuje se manje od 2000 *E. coli* i manje od 400 enterokoka u 100 ml vode (Tabela 3).

Prema pravilniku "Guidelines for Water Reuse" koji je izdala U.S. Environmental Protection Agency, u vodi koja se koristi za navodnjavanje biljaka koje se konzumiraju sveže, ne smeju biti prisutne fekalne koliformne bakterije (Anonymous, 1992.). Poštujući ovaj kriterijumu ova voda se ne mogue preporučiti za navodnjavanje useva koji se konzumiraju u svežem stanju.

U vodotoku "Šugavac" broj koliformnih bakterija je veći u donjem toku, sobzirom da motel "Radmilovac" ispušta otpadne i kanalizacione vode u ovaj deo vodotoka. Veći broj koliformnih bakterija je konstatovan tokom 2005. godini (Tabela 12).

Na istoj lokaciji, u otvorenom i zatvorenom bunaru broj koliformnih bakterija je manji u odnosu na tekuće vode. Takođe, broj bakterija je nešto veći u zatvorenom bunaru u odnosu na oba otvorena bunara (Tabela 15). Ispitivanja mikrobiološkog kvaliteta površinskih voda, koje se koriste za navodnjavanje, u Alberti (Kanada) su pokazala da je 8% uzoraka imalo više od 100 fekalnih koliforma u 100 ml uzorka vode (Cross, 1997).

U vodi javne česme, dvogodišnji prosek za ukupne koliforme je iznosio 4.45×10^3 CFU/100ml, a za fekalne 1.22×10^2 CFU/100ml. Ovo je veliki broj bakterija, obzirom da pravilnik U.S. EPA preporučuje da u vodi za piće ne sme uopšte biti prisustva fekalnih kolifoma u 100 ml uzorka vode (Anonymous, June 2002.). Takođe, po našem pravilniku o higijenskoj ispravnosti vode za piće ("Sl. list SRJ", br. 42/98 i 44/99), u vodi ne smeju biti prisutni: salmonela vrste, šigela vrste, vibrio-kolere i drugi patogeni mikroorganizmi, koliformne bakterije i streptokoke fekalnog porekla, proteus-vrste, *Pseudomonas aeruginosa*.

U podzemnim vodama prisustvo koliformnih bakterija je bilo najizraženije u pijezometru br. 4. Prosečne vrednosti ukupnih koliformnih bakterija u podzemnim vodama su od 1.33×10^1 – 7.99×10^3 CFU/100ml. Fekalne koliformne su detektovane samo u pijezometru br. 4 i njihov prosečan broj je 1.75×10^3 CFU/100ml.

U Kanadi, gde se pretežno za navodnjavanje koriste površinske ili podzemne vode (Martin et al., 2000), prema kanadskom pravilniku kvaliteta vode za zaštitu korišćenja poljoprivrednih voda (*Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Agricultural Water Uses*) dozvoljeno je maksimalno 1000 ukupnih koliformnih bakterija i 100 fekalnih koliforma u 100 ml uzorka vode za navodnjavanje (Anonymous, 1999.).

Prisustvo koliformnih bakterija u podzemnim vodama se objašnjava činjenicom da je u blizini locirano naselje koje nema izgrađen kanalizacioni sistem već individualne septičke jame (Petković i sar., 2011). Naselje se nalazi na uzvišenju tako da se otpadna i kanalizaciona voda proceđuje kroz samo zemljište i dospeva u podzemne vode koje kontaminira patogenim bakterijama. U poređenju sa svetskim pravilnicima o mikrobiološkom kvalitetu vode za navodnjavanje, podzemne vode na lokaciji Radmilovca se ne bi smele koristiti u ovu svrhu bez predhodnog tretmana prečišćavanja.

U ispitivanim vodama na lokaciji O.Š.D. Radmilovac dokazano je prisustvo patogenih bakterija: *Escherichia coli* 1, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aeromonas hydrophila* 1, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. Prisustvo ovih bakterija u vodi dokazuje njenu kontaminaciju sa materijama fekalnog porekla. To je naročito izraženo u donjem delu vodotoka "Šugavac" posle izlivanja kanalizacione i otpadne vode motela "Radmilovac" u ovaj vodotok.

Mnogi autori ukazuju na prisustvo patogenih vrsta bakterija u površinskim i podzemnim vodama. Tako, *Salmonella* spp. je izolovana iz reke Kornovalis u Novoj Škotskoj (Kanada) i to nizvodno od fabrika za preradu mesa i živine (Menon, 1985). Prisustvo ove bakterije je detektovano u 6.2% uzoraka površinske vode u Grčkoj (Arvanitidou i sar., 1997). Šiga-toksin-produkujuća *E. coli* serotip O121 je izolovana iz jezerske vode u Konektikatu (McCarthy i sar., 2001), a *E. coli* serotip O157:H7, je izolovana iz jezera u Oregonu (Keene i sar., 1994).

U melioracionom kanalu u Surčinu broj koliformnih bakterija bio u toku 2008.g. 1.33×10^4 CFU/100ml (2008.), a u 2009. g. je bio 1.80×10^4 CFU/100ml.

U periodu naših istraživanja, ova voda se koristila za navodnjavanje krompira, a prema pravilnik U.S. EPA koji se odnosi na vode kojima se zalivaju biljke koje se prerađuju (ne konzumiraju se u svežem stanju), preporuka je da u vodi bude manje od 200 fekalnih koliformnih bakterija u 100 ml uzorka vode (Anonymous, 1992.).

Međutim, naše analize su pokazale da ispitivana voda sadrži veći broj koliforma nego što je to dozvoljeno navedenim pravilnikom.

Nasuprot pravilniku U.S. EPA, "Izmenjen pravilnik za bezbednu upotrebu otpadnih voda" (*Revised Guidelines for the Safe Use of Wastewater and Excreta in Agriculture and Aquaculture*) koji preporučuje svetska zdravstvena organizacija (WHO) dopušta prisustvo do 1000 fekalnih koliformnih bakterija u 100 ml uzorka vode kada se radi o vodi za navodnjavanje useva koji se konzumiraju sveži (povrće i voće). Prema WHO, voda ovakvog mikrobiološkog kvaliteta se može koristiti za navodnjavanje orošavanjem. Ovako kriterijumi WHO u odnosu na druge standarde se objašnjavaju činjenicom da je u svetu trend smanjena resursa vode zadovoljavajućeg mikrobiološkog kvaliteta, dok potreba za intenzivnom poljoprivrednom proizvodnjom svakim danom raste, tako da je stanovništvo primorano da koristi i vode lošijeg kvaliteta za navodnjavanje. Takođe, WHO svojim pravilnikom obuhvata i najsiromašnije i najnerazvijenije zemlje, posebno zemlje u Africi, gde su resursi vode za navodnjavanje jako ograničeni. Isti pravilnik (WHO) dozvoljava i prisustvo do 100000 ukupnih koliforma u 100 ml uzorka vode za neograničeno navodnjavanje useva koji se prerađuju pre konzumiranja (Blumenthal i sar., 2000a).

U vodi melioracionog kanala na lokaciji Surčin broj *E. coli*, je bio najveći u 2006. g. (9.75×10^2 CFU/100ml). Barrell i sar., (2000), Edberg i sar., (2000) smatraju da je *E. coli* bolji indikator fekalne kontaminacije vode, obzirom da ukupne i fekalne koliformne bakterije mogu predstavljati i bakterije ne fekalnog porekla. U našim istraživanjima u melioracionom kanalu u Surčinu brojnost *E. coli* ukazuje na opterećenost vode fekalnim materijama.

U ovoj vodi konstatovano je prisustvo *E. coli* 2, *E. vulneris*, *E. adecarboxylata*, *Vibrio fluvialis*, *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila* 1. Takođe, neprerađene otpadne vode antropogenog porekla mogu sadržati veliki broj patogenih mikroorganizama. Tako, 1 litar gradske kanalizacije u zemaljama u razvoju može da sadrži i do 7000 CFU *Salmonella spp.*, 7000 CFU *Shigella spp.*, 1000 CFU *V. cholerae* (Feachem i sar., 1983).

Literaturni podaci ukazuju da je brojnost patogenih bakterija u vodi mnogo veća za vreme letnjih meseci, tako Stanley i Jones (2003) su pokazali da je brojnost

Campylobacter spp. najveća leti i u jesen, dok su Chapman i sar. (1993) utvrdili veću brojnost *E. coli* u proleće i leto.

Rezultati naših istraživanja ukazuju na veliku brojnost ukupnih koliformnih bakterija u letnjim mesecima, ali i tokom zimskog perioda u melioracionom kanalu na lokaciji opštine Negotin. Velika brojnost bakterija ukazuje na veliko prisustvo organske materije, odnosno organskih zagađivača u ovoj vodi.

Na mestu izlivanja gradske kanalizacije (obuhvata i otpadne vode medicinskog centra u Negotinu) u melioracioni kanal konstatno je visok broj koliformnih bakterija (2.02×10^6 CFU/100ml). Na lokaciji gde su ispuštane otpadne vode sa farme svinja, prosečan broj koliforma je 1.89×10^6 CFU/100ml. Može se zaključiti da su ovo dva najveća zagađivača melioracionog kanala.

Prema standardima koje propisuje U.S. EPA (U.S. Environmental Protection Agency) vrednosti broja koliforma na ovim lokacijama melioracionog kanala su mnogo veće čak i za navodnjavanje biljaka koje se prerađuju ili koriste za stočnu hranu (Anonymous, 1992.). Prema kanadskom pravilniku kvaliteta vode za zaštitu korišćenja poljoprivrednih voda (*Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Agricultural Water Uses*) voda iz ovog dela melioracionog kanala se ne bi smela koristiti za bilo kakvu vrstu navodnjavanja bez predhodnog tretmana (Anonymous, 1999.).

Prema pravilniku svetske zdravstvene organizacije (WHO) koji se odnosi na neograničeno navodnjavanje useva koji se prerađuju pre konzumiranja (Blumenthal i sar., 2000a), otpadne vode koje dospaveju u melioracioni kanal (kanalizaciona i voda sa farme svinja) su kontaminirane i ne mogu se preporučiti za navodnjavanje bez predhodnog tretmana.

U vodi melioracionog kanala u Negotinu detektovane su: *E. coli* 1, *E. coli* O157:H7, *Citrobacter freundii*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Proteus spp.*, *Aeromonas hydrophila* 1. Prisustvo ovih vrsta patogenih bakterija u vodi kanala predstavlja veliku opasnost po okolno stanovništvo, jer mnoge studije ukazuju da mnogi patogeni, kao što je i *E. coli* O157:H7 mogu duži vremenski period da opstanu u rečnim vodama (Maule, 2000; Wang i sar., 1996). U vodi na mestu izlivanja gradske kanalizacije velika brojnost bakterija u zimskom periodu godine, uprkos niskim temperaturama, je verovatno

posledica nižeg vodostaja kanala i konstantnog izlivanja velike količine fekalnih materija u melioracioni kanal.

U uzorcima vode iz kanala na lokaciji kod farme svinja, broj pomenutih bakterija takođe je konstantno bio visok, osim u julu 2006. godine, što se i može očekivati zbog uzgoja svinja tokom cele godine. Farma, samim time, predstavlja stalni izvor velike kontaminacije vode melioracionog kanala.

Najmanja brojnost ukupnih koliformnih bakterija je na početku melioracionog kanala, tj. u delu pre svih izvora zagađenja. U ovom delu kanala njihov broj je ipak iznad dozvoljenog prema onome što preporučuju svetski standardi o kvalitetu vode (U.S. Environmental Protection Agency; Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Agricultural Water Uses; World Health Organization) (Anonymous, 1992; Anonymous, 1999; Blumenthal i sar., 2000a). Ovo može da bude posledica ispaše stoke na okolnim poljima (Hilborn i sar., 1999) i đubrenja oranica pored kanala đubrivima organskog porekla (Beuchat 1996; Natvig i sar., 2002). Tome, doprinosi i povremeni boravak stanovništva u okolnim kućama pretežno u letnjem periodu godine, kao i ne postojanje izgrađene kanalizacione mreže.

Najveći broj koliformnih bakterija na lokaciji kanala posle svih izvora kontaminacije bio je u periodu oktobar 2007. i mart 2008. godine. To je direktna posledica kontinuiranog ispuštanja fekalnih materija sa farme svinja i gradske kanalizacije, kao i viših temperatura koje odgovaraju razvoju bakterija. Takođe, njihova velika brojnost je uslovljena i mogućnošću opstanka koliformnih bakterija u sedimentima, odakle, i posle više meseci nakon primarnog zagađenja, dovode do povećanja koncentracije pomenutih bakterija u vodi (Sherer i sar., 1992).

Kontaminaciji kanala doprinosi i lokalno stanovništvo sa stvaranjem sporadičnih deponija otpada pored kanala ili odlaganjem tog otpada direktno u kanal.

Porast broja ukupnih koliformnih bakterija, kao posledica izlivanja kanalizacione vode i otpadne vode sa farme svinja, direktno dovodi do porasta kontaminacije na kraju melioracionog kanala koji se uliva u Timok, i dalje u Dunav.

Prisustvo koliformnih bakterija u velikom broju, kao i prisustvo *E. coli* u uzorcima vode melioracionog kanala u Negotinu ukazuje na potencijalno prisustvo patogenih bakterija, pa se voda ovoga kanala ne bi smela koristiti za navodnjavanje useva, jer bi samim tim došlo i do kontaminacije povrća. Postoje podaci gde jestivi deo

biljke, koja se zaliva kontaminiranom vodom, iako može izgledati neoštećeno bude kontaminiran sa *E. coli* (Wachtel i sar., 2002a). Takođe, *E. coli* O157:H7 se može dugo zadržati na/u biljkama posle primarne infekcije biljke, odnosno njene kontaminacije (Solomon i sar., 2003).

U ispitivanom periodu za sliv "Donje Polje", broj ukupnih koliformnih bakterija se kretao u intervalu 1.14×10^3 - 2.06×10^6 CFU/100ml, a fekalnih koliformnih bakterije od 9.09×10^1 - 1.84×10^4 CFU/100ml)(*Grafikoni 12-19*).

Prema pravilniku "Guidelines for Water Reuse" (U.S. Environmental Protection Agency) voda ovoga sliva se ne bi smela koristiti za navodnjavanje useva, pre svega povrća koje se konzumira u svežem stanju. Prema standardima svetske zdravstvene organizacije (WHO), na jednom delu lokacija ovoga sliva, vrednosti fekalnih koliforma su veće od dozvoljenih (Blumenthal i sar., 2000a).

Najmanja brojnost ukupnih koliforma je detektovana u kanalu Galovica kod C.S. "Galovica", (1.14×10^3 CFU/100ml), na ostalim lokacijama prosečan broj ovih bakterija prelazio vrednosti veće od 1000 CFU/100ml.

Izrazito velika brojnost ukupnih koliforma je registrovana u kanalu Galovica na lokaciji ispod naselja Surčin (2.06×10^6 CFU/100ml), što je posledica ulivanja kanalizacione vode iz naselja Surčin. Takođe, na istoj lokaciji je konstatovana i najveća brojnost fekalnih koliformnih bakterija 1.84×10^4 CFU/100ml. Na ostalim lokacijama prosečne vrednosti fekalnih koliforma su uglavnom bile veće od 100 CFU/100ml.

U bočnim kanalima sliva Petrac 1 na lokaciji "Donje Polje" najveća brojnost ukupnih i fekalnih koliformnih bakterija je u kanalu "Smrdljivac" na lokaciji ispod naselja Surčin (*Grafik 20*). Visoka brojnost koliformnih bakterija je svakako rezultat kontaminacije uzrokovane antropogenim faktorom, odnosno otpadne fekalne materije poreklom sa okolnih farmi se direktno upuštaju u ovaj vodotok.

Tokom istraživanja u vodama sliva "Donje Polje" konstatovano je prisustvo *E. coli*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella spp.* i *Aeromonas spp.*

Na osnovu prosečnih vrednosti, broj *E. coli* u ispitivanim vodama kretao se od 10^1 do 10^3 CFU/100ml u zavisnosti od lokacije uzorkovanja vode. Izuzetak je bila voda kanala Galovica na lokaciji ispod naselja Surčin gde je prosečan broj *E. coli* bio čak 2.02×10^5 CFU/100ml.

Broj *E.coli* O157:H7 se kretao u granicama 10^2 - 10^4 CFU/100ml, *Salmonella* spp. od 10^1 - 10^3 CFU/100ml i *Aeromonas* spp. između 10^3 i 10^5 CFU/100ml. U kanalu Galovica ispod naselja Surčin je povećan broj ovih vrsta patogenih bakterija.

Prisustvo *Salmonella* spp. je registrovano u rekama u Kanadi (Menon, 1985), površinskim vodama u Grčkoj (Arvanitidou i sar., 1997). *E. coli* O121 i *E. coli* O157:H7 iz jezerske vode u U.S.A. (McCarthy i sar., 2001; Keene i sar., 1994).

Obzirom da neki autori (Barrell i sar., 2000; Edberg i sar., 2000) smatraju *E. coli* boljim indikatorom fekalnog opterećenja voda (kontaminacije voda) u odnosu na koliformne bakterije, prisustvo ovih bakterija u vodi ispitivanih kanala nam potvrđuje kontaminaciju voda fekalnim materijama.

U bočnim kanalima sliva Petrac 1 na lokaciji "Donje Polje" najveća kontaminacija je detektovana u kanalu "Smrdljivac" gde je broj *E. coli* i *Salmonella* spp. bio veći od 10^4 CFU/100ml, *E.coli* O157:H7 iznad 10^5 , a *Aeromonas* spp. iznad 10^6 CFU/100ml.

U vodi kanala Galovice, duž celog njegovog toka, utvrđena je prisustvo koliformnih bakterija i patogenih bakterija (*Grafikoni* 21-23). Na samom početku kanala Galovica, na osnovu broja koliformnih bakterija, kao i vrsta patogenih bakterija, može se konstatovati da voda ne prelazi granice dozvoljene svetskim standardima o mikrobiološkom kvalitetu vode za navodnjavanje (World Health Organization; Canadian Council of Ministers of the Environment; U.S. Environmental Protection Agency). Prema ovim standardima, voda ovog dela kanal se može preporučiti za navodnjavanje useva.

U srednjem toku kanala Galovica, na 24. km njenog toka, detektovana je znatno veća brojnost koliformnih bakterija nego na početku kanala. Ovo je rezultat ulivanja kontaminiranih voda preko bočnih kanala koji prolaze kroz naseljena mesta i sakupljaju atmosferske i otpadne vode koje se ulivaju u kanal Galovica.

Najveći stepen kontaminacije vode je konstatovan na kraju kanala Galovica, odnosno na 36. km njegovog toka. Ovo je rezultat kontaminacije vode u srednjem toku kanala Galovica, kao i kontaminacije koje dolazi od strane bočnih kanala koji prolaze kroz naseljena mesta i ulivaju se u kanal Galovicu.

Voda srednjeg i krajnjeg toka kanala Galovica ne zadovoljava kriterijume o mikrobiološkoj ispravnosti, po pravilniku WHO (World Health Organization), pa se ne može preporučiti za navodnjavanje useva.

Poredeći svetske pravilnike o mikrobiološkom kvalitetu voda, može se uočiti velike razlike, što prvenstveno zavisi od raspoloživih resursa vode u toj državi.

Značajno je istaći propise Kalifornije, države sa dugom tradicijom ponovne upotrebe otpadnih voda u navodnjavanju. Njihov pravilnik propisuje <2.2 UK i 0 FK u 100 ml uzorka vode koja se koristi za navodnjavanje biljaka koje se konzumiraju sveže (Blumenthal i sar., 2000b). Ovaj standard je sličan sa standardom U.S. EPA koji preporučuje za vodu za piće (Anonymous, June 2002.).

Treba svakako naglasiti da primena ovih standarda mora biti u saglasnosti sa načinom uzorkovanja vode. Prema svim ovim navedenim standardima, u proceni mikrobiološkog kvaliteta vode, podrazumeva se da geometrijska sredina najmanje 5 uzoraka uzetih u poslednjih 30 dana ne treba da bude veća od 1000 UK i 200 FK u 100 ml uzorka vode. Takođe, i kod ne više od 20% analiziranih uzoraka u bilo kom mesecu ne bi trebalo da bude veći broj ovih bakterija od navedenih vrednosti. Isto, bilo koji uzorak, uzet bilo kog dana, ne bi trebao da sadrži više od 2400 UK.

Ovo su pravila koja se moraju poštovati da bi se mogli primeniti gore navedeni standardi i donela pravilna procena o mikrobiološkom kvalitetu ispitivane vode.

Broj ispitivanih vrsta patogenih bakterija u kanala Galovica bio je najmanji u njegovom početnom delu, odnosno na 6. km. toka kanala. Na osnovu prosečnih vrednosti za ispitivani period, broj *E. coli*, *E. coli* O157:H7 i *Salmonella spp.* je u rasponu 10^2 – 10^3 CFU/100ml, *Aeromonas spp.* iznad 10^4 CFU/100ml.

Najveća brojnost patogenih bakterijama je u donjem toku kanala Galovica (na 36. km. toka) gde su prosečne vrednosti za ispitivani period za *E. coli*, *E. coli* O157:H7 i *Salmonella spp.* bile iznad 10^3 CFU/100ml, a za *Aeromonas spp.* iznad 10^5 CFU/100ml. Ovi rezultati o broju ispitivanih patogenih bakterija po vrstama su u saglasnosti sa rezultatima koji se odnose na brojnost koliformnih bakterija (ukupnih i fekalnih) u vodi kanala Galovica.

Prema ispitivanim parametrima, voda ovog kanala ne zadovoljava kriterijume mikrobiološkog kvaliteta za navodnjavanje useva, prema svetskim standardima, obzirom da u našoj zemlji ti standardi ne postoje.

U bočnim kanalima u slivu Galovica, na lokaciji industrijske zone je detektovano prisustvo koliformnih bakterija u vodi.

Broj ukupnih i fekalnih koliformnih bakterija je bio visok u ugranovačkom kanalu u Subotištu, a broj koliformnih bakterija je bio veći od 10^7 CFU/100ml. Takođe visoka brojnost koliformnih bakterija je u dovodnom kanalu u Galovicu na lokaciji Deča. Broj ukupnih koliforma je bila veća od 10^7 CFU/100ml, i fekalnih iznad 10^5 CFU/100ml. Ovo su visoke vrednosti i ukazuju na kontaminaciju vode, a to je posledica ispuštanja ne tretiranih fabričkih voda u prirodne vodotoke, odnosno u životnu sredinu, koje bi morale biti tretirane pre ispuštanja u recipijent. Kanalizaciona voda može u 1000 ml da sadrži više od 10^3 CFU *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* i enterovirusa (Feachem i sar., 1983). Naši rezultati su u potpunoj saglasnosti sa literaturom i ovde se zaista radi o ne tretiranim vodama koje se ispuštaju iz ovih fabrika.

Rezultati ispitivanja brojnosti patogenih bakterija po vrstama su pokazali da je u ugranovačkom kanalu u Subotištu veliki broj *E. coli*, *Salmonella spp.* i *E. coli* O157:H7 (Tabela 29). Ovo ukazuje na veliku potencijalnu opasnost, ne samo sa aspekta zagađenja voda, već i zbog činjenice da iz fabrike mesne industrije mogu patogene bakterije da dospeju u životnu sredinu i time ugroze zdravlje stanovništva okolnih mesta.

U dovodnom kanalu u Galovicu na lokaciji Deča, broj *E. coli* je 3.0×10^3 CFU/100ml, i *Aeromonas spp.* 4.9×10^5 CFU/100ml.

U vodama sliva Donje Polje i Galovica, detektovane su vrste patogenih bakterija: *E. coli* 2, *E. coli* O157:H7, *Aeromonas hydrophila* 1, *Citrobacter freundii*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* i *Proteus spp.* Voda, posebno ako je opterećena organskom materijom, predstavlja povoljnu sredinu za dugotrajan opstanak patogena u njoj (Pasetto Falcao i sar., 1998; Rhodes i sar., 1986; Thomson i sar., 1998; Venkateswaren i sar., 1989).

6.2. Patogene bakterije na biljkama

U novije vreme se sve više pažnje posvećuje saznanjima da sveže i polupreradeno povrće i voće može biti izvor patogenih bakterija (CDC, 2006b; CDC, 2006c; Pezzoli i sar., 2007; Anon, 2007).

Humani patogeni kao *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, enterohemoragična *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, su najčešće izolovani sa svežeg povrća i ukazuju na skorašnju kontaminaciju fekalnim materijama (Tabela 5) (Beuchat, 2002).

Postoji mnogo načina dospevanja patogena do svežeg povrća, a jedan od načina je preko kontaminirane vode za navodnjavanje (Beuchat i Ryu, 1997).

U našim ispitivanjima se pokazalo da koliformne bakterije, i *E. coli*, mogu dospeti iz vode za navodnjavanje do krtola krompira, što potvrđuju i istraživanja (Steele i Odumeru, 2004; Forslund i sar., 2010).

Brojnost koliformnih bakterija na krtolama krompira gajenim na oglednoj parceli u Surčinu je najveća 2008. g. (4.20×10^4 CFU/g krtola krompira). U 2006. godini broj koliformnih bakterija je bio 5.33×10^3 CFU/g dok je u 2007 i 2006. g, bio manji (Grafik 25). Krompir je izabran kao model biljka jer se najviše gaji u Evropi. Značajno je istaći da je potencijalni rizik od konzumiranja kontaminiranog krompira niži u odnosu na ostalo povrće, jer se ne konzumira u svežem stanju, ali kontaminirani krompir predstavlja potencijalni rizik od unakrsne kontaminacije drugog svežeg povrća u prerađivačkoj industiji i domaćinstvu. Pored toga povećana potražnja za novim i postojećim proizvodima od krompira ukazuje na značaj obezbeđenja njegove mikrobiološke bezbednosti (Doan i Da Vidson, 2000)

Prisustvo *E. coli* na krtolama krompira je detektovano samo u 2006. godine a u ostale dve istraživačke godine njeno prisustvo nije registrovano. Ovo ukazuje da se krtole krompira mogu bezbedno koristiti u ljudskoj ishrani iako su navodnjavane vodom lošijeg mikrobiološkog kvaliteta.

Mnogi podaci ukazuju da *E. coli* može da kontaminira i druge biljke, npr. lisnati deo biljke kupusa, iako je zalivan samo koren (Wachtel i sar., 2002a). Takođe, *Salmonella typhimurium*, poreklom iz vode za navodnjavanje, može da kontaminira mrkvu i rotkvice. Solomon i sar. (2003) su pokazali da *E. coli* O157:H7 može kontaminirati listove zelene salate, iako nije bilo direktnog kontakta kontaminirane vode sa listovima biljke. Sve ovo ukazuje da treba voditi računa o mikrobiološkom kvalitetu vode za navodnjavanje kada su u pitanju biljke koje se konzumiraju sveže.

U nerazvijenim i zemljama u razvoju, prisustvo patogena na povrću je mnogo veće, jer se za navodnjavanje koriste pretežno vode lošeg mikrobiološkog kvaliteta.

Prisustvo *L. monocytogenes* je detektovano u 10.6% detaljno opranih uzoraka svežih proizvoda na pijacama u Indiji (Pingulkar i sar., 2001), zatim 7.8% uzorka povrća u Španiji (De Simon i sar., 1992).

Pri uzorkovanju lisnatog povrća u Brazilu, visoka brojnost fekalnih koliforma je detektovana u 17% uzorka, a *Salmonella spp.* u 3.1% uzorka (Takayanagui i sar., 2000). Takođe, *Salmonella spp.* je dokazana u 68% uzoraka zelene salate i 72% uzoraka mirođije koji potiču iz radnji u Italiji, kao i u 8.7% klijanaca pasulja u Tajlandu (Jerngklinchan i Saitanu, 1993).

Istraživanja u Hrvatskoj su pokazala da je *E. coli* izolovana iz 37% uzoraka lisnatog povrća, 25% uzoraka plodovitog povrća i 31% korenastog povrća od 229 ukupno uzetih uzoraka (Pavić i sar., 2005).

Najveći broj ukupnih koliformnih bakterija, na individualnom gazdinstvo u Negotinu kod krtolastog povrća je kod mrkve (1.18×10^6 CFU/g), dok je kod lisnatog povrća najveća brojnost kod mladog luka 3.79×10^4 CFU/g (Grafik 26).

Najveći broj ukupnih i fekalnih koliformnih bakterija je konstatovan kod paradajza (Grafik 26). Velika brojnost ovih bakterija je detektovana i kod paprike, dok je kod krastavca utvrđen najmanji broj koliformnih bakterija.

Kod ispitivanog povrća je detektovano prisustvo patogenih bakterija (*E. coli*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella spp.*). Tako je *E. coli*, u uzorcima povrća, konstatovana na mrkvi, mladom luku, paprici i paradajzu. Soj *E. coli* O157:H7 je izolovan sa korena peršuna i mrkve, kao i ploda paradajza. *Salmonella sp.* je detektovana na korenu peršuna, mladom luku, plodu paprike i paradajza.

Zabeleženo je da među biljkama postoje razlike u rizicima kontaminacije patogenim bakterijama. Hamilton i sar., (2006) navode da postoji veći rizik za kontaminaciju i opstanak *E. coli* O157:H7 na paradajzu nego na krastavcu, što je u saglasnosti i sa rezultatima našeg istraživanja. Nijedan od pomenuta tri soja bakterija nije detektovana kod krastavca, celera i kupusa, dok je kod paradajza zabeleženo prisustvo sva tri soja (*E. coli*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella spp.*). Na korenu peršuna nije zabeleženo prisustvo samo *E. coli*, a na korenu mrkve *Sallmonella sp.* Za razliku od ostala dva soja, *E. coli* O157:H7 nije pronađena u uzorcima mladog luka i ploda paprike.

Fekalne koliforme bakterije, *Salmonella spp.* i *Shigella spp.* mogu da opstanu oko 15 dana na površini biljaka (Feachem i sar., 1983). Dužem vremenu preživljavanja patogena na biljkama doprinosi i formiranje biofilma (Beuchat, 2002). Sa druge strane, neki autori ukazuju na redukciju u vremenu broja patogenih bakterija na povrću koje je navodnjavano kontaminiranom vodom (Armon i sar., 1994; Bastos i Mara, 1995), što objašnjavaju izloženošću patogena sunčevom zračenju, a time i isušivanju patogena na površini biljaka. Niže temperature, takođe utiču na preživljavanje patogena na biljkama. Tako, *E. coli* O157:H7 opstaje na površini ubrane zelene salate do 15 dana na temperaturi od 4°C (Beuchat, 1999). Stine i sar. (2003) su pokazali da *E. coli* O157:H7 može da opstane duže od 2 nedelje na površini dinje. Zelna salata navodnjavana sa *E. coli* O157:H7 kontaminiranom vodom je imala veliku koncentraciju bakterija i posle više nedelja gajenja (Wachtel i sar., 2002a,b; Solomon i sar., 2002). Islam i sar. (2004) su detektovali *E. coli* O157:H7 kod mrkve, đubrene kontaminiranim stajnjakom, posle 84 dana gajenja i kod luka posle 49 dana gajenja. Na vremenski period opstanka *S. enterica* na listovima korijandera u mnogome utiče temperatura i relativna vlažnost (Brandl i Mandrell, 2002). Ova bakterija može da opstane duže od 60 dana na zelenoj salati i 230 dana na listu peršuna u poljskim uslovima, a slično je i sa mrkvom i rotkvicom (Islam i sar., 2004). U listovima rukole, *S. enterica* Typhimurium može da opstane oko 17 nedelja tokom gajenja (Natvig i sar. 2002).

Sva ova istraživanja ukazuju na sposobnost opstanka enteropatogena u produženom vremenskom periodu na biljkama, odnosno jestivim biljnim delovima, ukoliko dođe do adherencije bakterija za biljno tkivo.

6.3. Kontaminacija biljaka zelene salate sa *E. coli* K-12 iz vode za navodnjavanje

Eksperimentalni rezultati su pokazali da *E. coli* K-12 može dospeti u unutrašnjost korena mladih biljaka zelene salate i takođe može biti transportovana sve do listova biljke (Slika 21). Direktni kontakt između listova biljaka i kontaminirane vode za navodnjavanje nije neophodan da bi bakterije bile integrisane u listovima zelene salate. Sve ovo ukazuje da navodnjavanje biljaka sa *E. coli*-kontaminiranom vodom može rezultirati kontaminacijom biljaka gajenim u poljskim uslovima.

Solomon i sar. (2002), su utvrdili da primena stajskog đubiva, kontaminiranog sa *E. coli* O157:H7, može dovesti do kontaminacije useva gajenih u poljskim uslovima. Izvor kontaminacije može biti stajsko đubrivo, kao i kontaminirana voda (Ključev i Raičević, 2006; Dulić i sar., 2008). Neka proučavanja su pokazala da humane patogene bakterije, posebno *E. coli*, može da preživi dug vremenski period u vodi (Wang i Doyle, 1998; Chalmers i sar., 2000). Takođe, humane patogene bakterije mogu preživeti dug vremenski period u animalnim đubrivima i zemljištu, kao i na biljnom tkivu (Fukushima i sar., 1999; Gagliardi i sar., 2002).

Za sada, publikacije koje pokazuju da humane patogene bakterije mogu ostvariti čvrstu vezu i kolonizovati tkivo biljaka fokusirana su uglavnom na *E. coli* (*E. coli* O157:H7) i *Salmonella* (Berger i sar., 2010) ali i *Listeria monocytogenes* i *Staphylococcus aureus* (Collignon i Korsten., 2010; Brandl i Mandrell, 2002).

Naši rezultati su pokazali da su biljke zelene salate, koje su tokom svog razvića (od početka klijanja do faze pet stalnih listova) navodnjavane kontaminiranom vodom, bile pozitivne na prisustvo *E. coli* K-12, odnosno njihovi jestivi delovi (listovi). Ovo ukazuje da listovi postaju kontaminirani kao rezultat transporta patogenih bakterija (*E. coli* K-12) kroz samu biljku od korenovog sistema pa sve do listova i to bez direktnog izlaganja listova bakterijama.

U zavisnosti od vrste biljke, korenski eksudati sadrže različita jedinjenja kao što su ugljeni hidrati, amino kiseline i druga amino jedinjenja, organske kiseline, masne kiseline i sterole. Dakle, površina biljnog korena je zona veoma intenzivne mikrobne aktivnosti (Solomon i sar., 2006). Patogene bakterije, kao što je *E. coli* O157:H7, mogu biti prenete, ne samo iz kontaminirane vode za navodnjavanje, već takođe i iz kontaminiranog stajnjaka do jestivih delova biljaka zelene salate (Solomon i sar., 2002).

Primenjena koncentracija bakterija *E. coli* K-12 za inokulaciju vode za navodnjavanje, korišćena u ovim istraživanjima, je mnogo veća od one koja bi se mogla spontano naći u poljskim uslovima. Veliki broj, odnosno koncentracija, bakterija je uzeta da bi se omogućila lakša, bolja i preciznija detekcija bakterija u ispitivanim delovima biljaka zelene salate. Međutim, u prirodnim uslovima, čak i nizak nivo koncentracije (mali broj) patogenih bakterija u životnoj sredini može predstavljati značajan rizik za ljudsko zdravlje. Tako, infektivna doza patogene bakterije *E. coli* O157:H7 može biti čak manja od 50 ćelija (Ackers i sar., 1998).

Kod klijanaca zelene salate, sojevi *E. coli* O157:H7, odgovorni za epidemije izazvane konzumiranjem svežih proizvoda, se vezuju za koren zelene salate u proseku 10 puta bolje nego 2 od 5 nepatogenih sojeva *E. coli* (Wachtel i sar., 2002a,b). Tako, postoji veoma velika varijabilnost u sposobnostima vezivanja za biljku (attachment) kod različitih sojeva bakterija, kao i među različitim modelima gajenja biljaka. Objašnjenje ovih razlika moglo bi biti posledica više različitih mehanizama bakterijskog vezivanja (bacterial attachment) (Solomon i sar., 2006). Treba imati u vidu da preživljavanje i kolonizacija humanih patogena na povrću i voću zavisi pre svega od njihove sposobnosti da se adaptiraju na ekološku nišu van domaćina (Collignon i Korsten, 2010).

Naša istraživanja ukazuju da bakterijske ćelije (*E. coli* K-12) egzistiraju u unutrašnjosti biljaka zelene salate, odnosno endofitno kolonizuju biljku, što potvrđuju i ranija istraživanja (Beuchat, 1999; Taormina et al., 1999). Nepristupačnost mnogih endofitnih bakterija u biljnom tkivu, kao posledica njihove podpovršinske i unutrašnje lokalizacije, je možda razlog za nedostatak efikasnog delovanja površinsko-sanitizacionih tretmana kontaminiranih biljaka (Solomon i sar., 2002).

Navodnjavanje kontaminiranom vodom može dovesti da *E. coli* K-12 i druge patogene bakterije postanu združene sa zelenom salatnom ali priroda te zajednice još uvek nije dovoljno istražena.

6.4. Mogućnosti kolonizacije biljaka patogenim bakterijama

U ovom radu kolonizacija korena biljaka je posmatrana kao površinska i endofitna i rezultati su predstavljeni na *grafikonima od broja 28 do 39*, a lokacija ćelija je potvrđena konfokal-laser-skening mikroskopijom (*Slike od broja 22 do 54*).

***E. coli* PBA28 (Gfp)**

Istraživanja su pokazala da *E. coli* PBA28 (Gfp) površinski kolonizuje kukuruz šećerac i lisnato povrće. Na površini korena lisnatog povrća i kukuruza šećerca broj ove bakterije je iznad 10^5 ćelija/mm³ aps.suv.korena.

Sposobnost kolonizacije unutrašnjosti biljaka sa *E. coli* pokazala su istraživanja Dong i sar. (2003). Tyler i Triplett, (2008). Endofitna kolonizacija se javlja kao rezultat infekcije korena biljke ili kontaminacije semena biljke (Cooley i sar., 2003). Step en ove

kolonizacije je određen genetskim kodom oba organizma, bakterija sa jedne strane i biljke domaćina sa druge strane (Tyler i Triplett, 2008).

E. coli O157:H7 u blizini stoma ili unutar stominih otvora kod biljaka zelene salate, detektovali su Seo i Frank, (1999); Takeuchi i Frank, (2001). Itoh i sar., (1998) su dokazali unutrašnju kolonizaciju *E. coli* O157:H7 kod klijanaca rotkvice.

Endofitna kolonizacija *E. coli* PBA28 je na lisnatom povrću i kukuruзу šećercu bila $>10^4$ ćelija/mm³ aps.suv.korena. *E. coli* PBA28 (Gfp) je najmanje površinski i endofitno kolonizovala korenasto-krtolasto povrće (Grafik 28).

Gfp-transformisani soj *E. coli* O157:H7 može da kolonizuje unutrašnjost zelene salate, dospevajući iz kontaminiranog zemljišta preko korena i biva transportovan do listova kroz sistem sprovodnih sudova biljke (Franz i sar., 2007; Solomon i sar., 2002). *E. coli* O157: H7 je detektovana u eksperimentu u kome je ova bakterija dodata preko stajnjaka i vode za navodnjavanje u zemljište i u periodu od 9 nedelja tokom jeseni, odnosno 7 u proleće, ova bakterija je registrovana na površini i unutrašnjosti lista zelene salate (Oliveira i sar., 2012).

Suprotno ovim istraživanjima, dve druge studije su ukazale da *E. coli* O157:H7 nije sposobna da kolonizuje jestivi deo biljke spanaća, (Hora i sar., 2005) i listove zelene salate (Johannessen i sar., 2005). Iako nisu došli do konstatacije o endofitnoj kolonizaciji, ovi autori su, u svojim istraživanjima, dokazali prisustvo *E. coli* O157:H7 u rizosferi i na površini korena ispitivanih biljaka.

***Pseudomonas aeruginosa* PA01 (Gfp)**

U našem eksperimentu, bakterija *Pseudomonas aeruginosa* PA01 (Gfp) je detektovana u velikom broju na površini lisnatog povrća (više od 10^6 ćelija/mm³ aps.suv.korena), dok je na površini korena kukuruza šećerca, registrovana najmanja brojnost bakterija (graf). Literaturni podaci pokazuju da Gfp-transformisane bakterije *Pseudomonas putida* VM1450 i *P. putida* VM1450, koje endofitno kolonizuju topolu (*Populus sp.*) i da kolonizacija zavisi od primenjenog metoda inokulacije, vrste, odnosno bakterijskog soja i biljne vrste (Germaine i sar., 2004, 2006).

Endofitno, *P. aeruginosa* PA01 (Gfp) je u najvećem stepenu kolonizovao koren spanaća, (više od 10^5 ćelija/mm³ aps.suv.korena), dok je u unutrašnjosti korena kukuruza šećerca broj ove bakterije bio nešto iznad 10^4 ćelija/mm³ aps.suv.korena.

Kod biljne vrste *Arabidopsis thaliana*, utvrđeno je da bakterija *Pseudomonas aeruginosa* PA14 može da se čvrsto veže za površinu listova, zatim da formira agregacije i mikrokolonije pored stominih otvora, kao i da uzrokuje oštećenja biljnog tkiva. Takođe, ova bakterija može prodreti u unutrašnjost samih listova i kolonizovati intercelularne prostore lista (Plotnikova i sar., 2000). Značajno je pomenuti sposobnost ove bakterije da pravi cirkularne perforacije u zidovima mezofilnih biljnih ćelija, čime se omogućava prodiranje bakterijskih ćelija u biljku. Vezano za ova proučavanja, može se zaključiti da je *Pseudomonas aeruginosa* PA14 fakultativni patogen za biljku *A. thaliana*, jer može uzrokovati lokalnu i sistemičnu infekciju koja može rezultirati i uginućem biljke.

***Herbaspirillum frisingense* GSF30BA28 (Gfp)**

Naša istraživanja su pokazala da je *Herbaspirillum spp.* energičan endofitni kolonizator ispitivanih biljaka. Najveća brojnost ove bakterije je detektovana na površini i unutrašnjosti korena lisnatog povrća i mrkve (Grafik 30). Površinska kolonizacija korena celera je manja od 10^5 ćelija/mm³ aps.suv.korena, a unutrašnja kolonizacija korena celera je $\approx 10^5$ ćelija/mm³ aps.suv.korena. U proučavanju endofitne kolonizacije biljaka, James i sar. (2002) su koristili β -glucuronidase (GUS) sistem detektovanja bakterijskog signala (GUS-oboženi soj *Herbaspirillum seropedicae* Z67) kojim su inokulisali klijance pirinča i konstatovali prodiranje na mestu oštećenja korena koja su rezultat pojave lateralnih korenčića. *Herbaspirillum seropedicae* Z67 u korenu prvo kolonizuje intercelularne prostor, a zatim aerenhim i ćelije koteksa korena i prodire u vaskularno tkivo korena. Dokazano je da ove bakterije endofitno kolonizuju i ksilemske sudove u listovima i stablu inokulisanih biljaka.

Kutter i sar. (2006) su utvrdili da bakterija *Herbaspirillum sp.* N3 endofitno kolonizira koren biljaka ječma. Ona veoma intenzivno i brzo kolonizira biljne ćelije centralnog cilindra korena biljke, uglavnom kao pojedinačne ćelije.

***Salmonella enterica* serotip *typhimurium* (LT2, S1, ATCC14028)**

Naši istraživanja ukazuju da sojevi *Salmonella spp.* imaju različitu sposobnost kolonizacije biljnih vrsta. *Salmonella enterica* serotip *typhimurium* LT2 površinski i endofitno najviše kolonizuje koren zelene salate a najmanje koren mrkve (Grafik 31).

Dobijeni rezultati ukazuju da humani patogen *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* (*S. typhimurium*) veoma efikasno endofitno kolonizuje različite biljne vrste i aktivno ulaziti u tkivo korena i razmnožava se u intercelularnim prostorima korena.

Proučavanja Schikora i sar. (2008.) su pokazala da *Salmonella typhimurium* dospeva čak u unutrašnjost samih ćelije biljne vrste *Arabidopsis thaliana* i razmnožava se u njima. Mada infekcija biljaka *Arabidopsis thaliana* aktivira imuni odgovor biljke, koji je sličan imunom odgovoru kod drugih fitopatogenih bakterija, izgleda da *S. typhimurium* ima sposobnost da prevaziđe odbranbene mehanizme domaćina i razmnožava se u biljkama. Naši rezultati, u skladu sa literaturnim podacima, su pokazali da *Salmonella typhimurium* može biti tipičan biljni endopatogen.

Površinska kolonizacija korena ispitivanih biljaka, *Salmonella enterica* serotip *typhimurium* S1 je najizraženija kod paradajza, zelene salate i celera ($>10^5$ ćelija/mm³ aps.suv.korena), a najmanja kod spanaća. Endofitna kolonizacija je, takođe najveća kod paradajza i celera a kod spanaća je $>10^4$ ćelija/mm³ aps.suv.korena).

Sojevi *S. typhimurium* LT2 i DT104 mogu endofitno kolonizovati klijance i izdanke ječma gajenjem u "axenic" sistemu i primenom FISH analize ustanovljeno je prisustvo *Salomonella typhimurium* u unutrašnjosti biljnog tkiva (Kutter i sar., 2006).

Istraživanja, vezana za "odgovor" zelene salate (*Lactuca sativa*) na kolonizaciju *Salmonella enterica* serovar Dublin, su pokazala da je 43% biljaka, koje su bile površinski sterilisane, kolonizovano ovom bakterijom, dok je 93% nedezinfikovanih biljaka zelene salate bilo kolonizovano ovim sojem (Klerks i sar., 2007).

Soj *Salmonella enterica* serotip *typhimurium* ATCC14028 je izrazito dobro kolonizovao korena ispitivanih biljnih vrsta. Najveća brojnost ove bakterija u površinskom sloju korena je konstatovana kod zelene salate i kukuruza šećerca (10^6 ćelija/mm³ aps.suv.korena), ali i kod spanaća, paradajza i mrkve ($>10^5$ ćelija/mm³ aps.suv.korena). Najmanja površinska kolonizacije je kod korena peršuna i celera. Endofitna kolonizacija kod zelene salate i kukuruza šećerca je $\approx 10^5$ ćelija/mm³ aps.suv.korena, a kod celera $\approx 10^4$ ćelija/mm³ aps.suv.korena).

Proučavajući kolonizacije u funkciji vremena, Klerks i sar. (2007) su utvrdili da je najveći broj bakterija detektovan 12. dana od početka inokulacije a kod nedezinfikovanih biljaka, najveća brojnost je 18. dana nakon inokulacije.

Naša istraživanja pokazuju da je *Salmonella typhimurium* kolonizovala sve ispitivane biljne (Grafici 31, 32, 33; Slike 38-45).

Ukoliko patogene bakterije dospeju u unutrašnjost lista, sposobne su da se umnožavaju, uazuju naši eksperimenti, sa Gfp-transformisanim sojevima, što je u skladu i sa literaturnim podacima (Dong i sar., 2003; Iniquez i sar., 2005). Mnoga istraživanja su pokazala da *Salmonella spp.* može biti prisutna u apoplastu (intercelularni prostori) i obrazovati biofilm, kod biljke peršuna (Lapidot i sar., 2006).

Infekcija ljudi i životinja sa *S. typhimurium* zavisi od različitih faktora i poznat je mehanizam prodora ove bakterije u epitelne ćelije domaćina sisara (Fields i sar., 1986). Sposobnost preživljavanja *Salmonella spp.* u životnoj sredini, odnosno van organizma domaćina, još nije potpuno razjašnjena, ali je evidentno da su ove bakterije veoma adaptibilne kada su u pitanju niska pH vrednost i visoke temperature (Samelis i sar., 2003). Prema istraživanjima Nicholson i sar. (2005), u samom zemljištu *Salmonella spp.* ne može opstati duže od 900 dana posle inokulacije.

Istraživanja pokazuju da kontaminirano zemljište, na kome se uzgajaju usevi, posebno oni koji se konzumiraju u svežem stanju, može biti uzrok infekcija patogenim bakterijama (Brandl, 2006). *Salmonella spp.* dospevaju u zemljište najčešće putem stajnjaka, otpadnih voda, kao i drugih otpadnih materija organskog porekla.

Naši rezultati pokazuju da biljke, koje su endofitno kolonizovane bakterijom *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*, predstavljaju veoma dobar model sistem za dalje proučavanje mehanizama kolonizacije i patogenosti *Salmonella spp.* u biljkama.

***Listeria monocytogenes* (EGD-E, SV4B)**

U našim istraživanjima, *Listeria monocytogenes* EGD-E veoma intenzivno kolonizuje koren mrkve i u površinskom sloju korena njen broj iznosi 10^6 ćelija/mm³ aps.suv.korena. Takođe, ova bakterija je detektovana i u unutrašnjosti korena (Slika 46). *Listeria spp.* spada u kosmopolitske bakterije u životnoj sredini, jer se može naći i izolovana iz zemljišta, biljaka, fecesa domaćih životinja, biljaka navodnjavanih kontaminiranom vodom i dr. Mogućnost da *Listeria spp.*, poreklom iz životne sredine (environmental *Listeria spp.*), kontaminira sveže proizvode, odnosno povrće i voće, i dovede do enterične infekcije je već odavno poznata (Blakeman, 1985).

Najveća brojnost ove bakterije je u unutrašnjosti korena mrkve (10^5 ćelija/mm³ aps.suv.korena), dok je najslabija kolonizacija korena paradajza.

Po nekim istraživanjima, pojava infekcija i epidemija izazvanih sa *Listeria spp.* se dešava tokom postupaka prerade i manipulacije svežih proizvoda (Harvey i Gilmour, 1993). Međutim, ima mnogo izveštaja (Arumugaswamy i sar., 1994; MacGowan i sar., 1994; De Simon i sar., 1992; Vahidy, 1992) koji dokazuju prisustvo *Listeria monocytogenes* na krastavcu, paprici, krompiru, rotkvici, lisnatom povrću, klijancima i izdancima pasulja, brokoli, paradajzu, kupusu i to u momentu prodaje ovih proizvoda (point-of-sale). pokazalo se da populacija *Listeria monocytogenes* opada na rendanoj mrkvi za 2-loga za više od 9 dana (Farber i sar., 1998).

Generalno, kolonizacija biljaka sa *Listeria spp.* je najzastupljenija kod korenasto-krtolastih povrtarskih biljaka i prema Heisick i sar. (1989), razlog je direktan kontakt biljke sa kontaminiranim zemljištem. McLauchlin i sar. (2004) smatraju da velika infektivna doza, koja iznosi $\approx 10^6$ ćelija, za *L. monocytogenes*, varijacije u osetljivosti populacije na infekciju i dug inkubacioni period, mogu dati objašnjenje nedostatka dokazanih epidemija izazvanih konzumiranjem svežih proizvoda kontaminiranih ovom bakterijom.

Soj *Listeria monocytogenes* SV4B, najbolje površinski i endofitno kolonizuje koren lisnatog povrća (Slika 48). Najmanji broj bakterija je konstatovan na površini i u unutrašnjosti korena mrkve i paradajza.

Za razliku od naših rezultata, proučavanja Jablasone i sar. (2005) su pokazala da *Listeria monocytogenes* ne može da proдре u unutrašnjost klijanaca biljaka, već da ova bakterija ima samo sposobnost površinske kolonizacije biljaka i da može da opstane na površini biljaka tokom celog perioda njenog uzgajanja. Takođe, Kutter i sar. (2006) ispitujući kolonizaciju ječma sojevima *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua* primenom FISH metoda sa specifičnim oligonukleotidnim probama za ovu bakteriju, nisu detektovali endofitnu kolonizaciju, ali su konstatovali intenzivnu kolonizaciju korenovih dlačica i smatraju da je to glavno područje kolonizacije korena sa *Listeria spp.* Po njima, kolonizacija površine korena ječma sa sojevima *Listeria spp.* se javljala retko i sporadično i to sa samo nekoliko pojedinačnih bakterijskih ćelija.

***Pseudomonas aeruginosa* DSM50071**

Pseudomonas aeruginosa DSM50071 je najintenzivnije kolonizovao koren paradajza (Grafik 36). Kolonizacije je registrovan i kod spanaća, celera i mrkve (Slika 49). Najmanji stepen kolonizacije je detektovan kod korena peršuna.

Buddrus-Schiemann i sar. (2010) su takođe proučavali kolonizaciju korena ječma, sa bakterijom *Pseudomonas sp.* DSMZ 13134, gde su primenili FISH metod u kombinaciji sa laser-skening-konfokalnom mikroskopijom i Gfp-transformisane sojeve ove bakterije. Njihovi rezultati su pokazali da je *Pseudomonas sp.* DSMZ 13134 kolonizovao sve delove korena ječma i da su bakterijske ćelije najviše bile lokalizovane u zoni korenovih dlačica. Najveća koncentracija bakterija je bila registrovana na samoj površini korena ječma, odnosno površini korenovih dlačica.

***Ochrobactrum anthropi* 1A DSM14396**

Ochrobactrum anthropi 1A površinska kolonizacije korena zelene salate, spanaća, paradajza, mrkve i peršuna (10^5 ćelija/mm³ aps.suv.korena). Iste biljke je *Ochrobactrum anthropi* 1ADSM14396 i endofitno kolonizovao (Slika 50). Najmanja brojnost bakterija je utvrđena na površini i unutrašnjosti korena kukuruza šećerca.

Brojne i raznovrsne oportunističke patogene bakterije, *Burkholderia sp.*, *Enterobacter sp.*, *Herbaspirillum sp.*, *Ochrobactrum sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Staphylococcus sp.*, su prepoznatljivi kolonizatori rizosfernog zemljišta, i celih biljaka (Berg i sar., 2005) i prisutni su u različitim staništima.

Roseomonas spp.

Roseomonas genomospecies 6CCUG33010 je površinski najviše kolonizovao koren lisnatog povrća (10^6 ćelija/mm³ aps.suv.korena), a najmanje korena kukuruza šećerca.

Na osnovu ispitivanja kolonizacije biljaka od strane dve različite vrste *Roseomonas spp.*, ustanovljeno je da je *Roseomonas fauriae* KACC11694 površinski i endofitno najbolje kolonizovao lisnato i plodovito povrće, a najmanje korenastokrtolasto (Slike 51 i 52).

Interesantno je da je broj *Roseomonas fauriae* KACC11694 bio čak za oko 60000 ćelija veći u unutrašnjosti korena zelene salate nego na njegovoj samoj površini.

Značajno je istaći da su bakterijske ćelije ovih sojeva detektovane i u samim biljnim ćelijama, odnosno u njihovoj unutrašnjosti (citoplazmi).

Mikrobno-biljna interakcija još uvek nije dovoljno istražena i na nju utiču mnogi faktori. Krause i sar., (2006) smatraju da na ovu interakciju utiču faktori koji su kodirani od strane BH72 genoma. Tu spadaju pili tip IV, površinski polisaharidi, proteinski sekrecioni sistem tip I i II, flagele, hemotaksis i siderofore. Ovaj BH72 genom je

značajan u sagledavanju biologije i ekologije endofitnih bakterija. Karakterizacija genomske sekvence endofitnih bakterija doprineće razjašnjenju mehanizama endofitne kolonizacije biljaka od strane humanih patogenih bakterija.

Značajno je istaći da su endofitne niše važna mesta za horizontalni transfer gena (HGT), što su pokazala i istraživanja Taghavi i sar. (2005). Oni su ustanovili da plazmid za degradaciju ksenobiotika, pTOM-Bu61 može biti prirodno prenošen među različitim endofitnim bakterijama. Tako, aktivnost HGT-a poboljšava mnogo efikasniju degradaciju toluena na mestima gde se biljka topola koristi za fitoremedijaciju. Ovo saznanje imaju važnu praktičnu primenu, jer prirodne endofitne populacije bakterija, sa visokom sposobnošću degradacije polutanata, mogu se efikasno koristiti u uklanjanju ksenobiotika i njihovih metabolita akumulirajući ih u biljci domaćinu.

Upotrebom Gfp-transformisanih sojeva bakterija, kao i primenom FISH analize, naša istraživanja su dokazala površinsku i endofitnu kolonizaciju korena biljaka patogenim bakterijama. Pojedine dobijene mikrografije (*Slika 53*) ukazuju na prisustvo bakterijskih ćelija u samoj unutrašnjosti ćelija (citoplazmi) korena biljaka, ali ostaje nerazjašnjen mehanizam dospevanja bakterija u citoplazmu biljnih ćelija.

Na osnovu eksperimentalnih rezultata, Schikora i sar. (2008) tvrde da *Salmonella spp.* može da naseljava citoplazmu biljnih ćelija *Arabidopsis thaliana*, jer su primenom konfokalne mikroskopije utvrdili pomeranje bakterija u citoplazmi biljne ćelije. Oni su konstatovali da samo 3 časa od inkubacije, bakterije su bile prisutne u korenovim dlačicama, a posle 17 sati u rizodermalnim ćelijama. Opreznost u interpretaciji ovih rezultata je svakako neophodna, jer još uvek nije razjašnjen tačan mehanizam kako patogene bakterije prodiru kroz ćelijski zid biljaka.

U našoj zemlji, još uvek ne postoji pravilnik koji definiše mikrobiološki kvalitet vode koja se može koristiti za navodnjavanje, što predstavlja problem u proizvodnji zdravstveno bezbedne hrane, s obzirom da je navodnjavanje prepoznato kao izvor patogenih organizama. Postojanje standarda koji obavezuje na mikrobiološku ispravnost vode za navodnjavanje u značajnom stepenu bi smanjilo rizik od mikrobiološke kontaminacije svežeg povrća i voća

Kao jedna od strategija u cilju proizvodnje bezbedne hrane, jeste stroga kontrola mikrobiološkog kvaliteta organskih đubriva i vode za navodnjavanje. Takođe, možda bi trebalo razmišljati o selekciji biljaka sa povećanim stepenom odbrane od humanih

patogena, što bi možda pomoglo u sprečavanju infekcija izazvanim patogenim bakterijama na nivou biljaka.

U našim istraživanjima smo pokazali da ispitivane biljke mogu biti kontaminirane patogenim bakterijama, pa se one mogu i smatrati "međufaznim" domaćinom za širenje bolesti u ljudskoj populaciji. Smatramo da i druge endofitne patogene bakterije mogu na sličan ili čak isti način kolonizovati i kontaminirati razne biljne vrste. U cilju daljeg razjašnjavanja ove problematike, smatramo da bi trebalo pokloniti veliku pažnju istraživanju sposobnosti ostalih patogenih bakterija, koje izazivaju bolesti čoveka i toplokrvnih životinja, da koriste biljke kao alternativnog domaćina. Potpuno poznavanje ove naučne oblasti zahteva dalja istraživanja u cilju procene rizika, a samim tim i sprečavanja epidemija izazvanih mikrobiološki kontaminiranim svežim proizvodima.

Sve ovo ukazuje na neophodnost stalnog monitoringa mikrobiološkog kvaliteta vode za navodnjavanje i povrća, posebno onog koje se konzumira u svežem stanju i implementacija principa dobre agronomske prakse može obezbediti proizvodnju zdravstveno bezbedne hrane.

7. ZAKLJUČAK

Na osnovu eksperimentalnih rezultata mogu se izvesti zaključci:

- Broj koliformnih bakterija u svim ispitivanim vodama na lokacijama: Radmilovca, Surčina, Negotina i Srema je veći nego što dozvoljavaju standardi: Pravilnik "Uputstva za ponovnu upotrebu vode" (*Guidelines for Water Reuse*), koji je izdala američka agencija za zaštitu životne sredine (U.S. Environmental Protection Agency), zatim "Izmenjen pravilnik za bezbednu upotrebu otpadnih voda i otpada u poljoprivredi i vodoprivredi" (*Revised Guidelines for the Safe Use of Wastewater and Excreta in Agriculture and Aquaculture*) koji je izdala svetska zdravstvena organizacija (World Health Organization), zatim "Kanadski pravilnik kvaliteta vode za zaštitu korišćenja poljoprivrednih voda" (*Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Agricultural Water Uses*), koji je izdao kanadski savet ministarstva za životnu sredinu (Canadian Council of Ministers of the Environment) i Nemački standard DIN 19650 za vodu za navodnjavanje.
- Prema "Guidelines for Water Reuse" (U.S. E.P.A.) za navodnjavanje biljaka koje se konzumiraju sveže ne preporučuju se sve ispitivane vode sa lokacija Radmilovca, Surčina, Negotina i sliva Galovice, a za navodnjavanje biljaka koje se prerađuju mogu se koristiti vode iz pijezometra br. 3 na lokaciji Radmilovca, zatim voda u početnom delu melioracionog kanala u Negotinu i voda u početnom delu kanala Galovica.
- Prema pravilniku "Revised Guidelines for the Safe Use of Wastewater and Excreta in Agriculture and Aquaculture" (WHO), za navodnjavanje biljaka koje se konzumiraju u svežem stanju mogu se koristiti vode otvorenih bunara, javne česme i pijezometara na lokaciji Radmilovca, zatim voda kanala u Surčinu, voda početnog dela melioracionog kanala u Negotinu, vode kanala sliva Donje polje, a ne preporučuju se za navodnjavanje voda kanala Galovica kod naselja Surčin, kao i vode kanala Galovica u njenom srednjem i donjem toku. Za navodnjavanje

useva koji se prerađuju mogu se koristiti sve vode na lokaciji Radmilovca, voda melioracionog kanala u Surčinu, voda početnog i srednjeg dela melioracionog kanala u Negotinu, voda kanala slivova Donje polje i Galovica, a ne preporučuje se voda dodjeg toka melioracionog kanala u Negotinu i otpadnih voda koje se ulivaku u ovaj kanal, kao i vode bočnih kanala slivova Petrac 1 i Galovice u industrijskoj zoni.

- Na osnovu pravilnika *''Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Agricultural Water Uses''* (Canadian Council of Ministers of the Environment), za navodnjavanje se mogu preporučiti: voda otvorenog bunara 1 i voda iz pijezometara na lokaciji Radmilovca, kao i voda početnog dela kanala Galovica, dok se ne bi se mogle preporučiti: voda iz vodotoka *''Šugavac''*, otvorenog bunara 2 i zatvorenog bunara na lokaciji Radmilovac, zatim melioracionog kanala u Surčinu, melioracionog kanala u Negotinu, kanala sliva Donje polje i voda srednjeg i donjeg toka kanala Galovica.
- Prema nemačkom standardu DIN 19650, odnosno prema prisustvu *E. coli* u vodi, za navodnjavanje biljaka koje se konzumiraju sveže, se ne bi mogle preporučiti: sve ispitivane vode na lokaciji Radmilovca, zatim voda melioracionog kanala u Surčinu, voda melioracionog kanala u Negotinu, voda kanala sliva Donje polje i voda srednjeg i donjeg toka kanala Galovica, dok se može preporučiti voda gornjeg toka kanala Galovica.
- Na osnovu brojnosti ukupnih i fekalnih koliformnih bakterija, najboljeg mikrobiološkog kvaliteta je voda u otvorenom bunaru 1 i pijezometrima na lokaciji Radmilovca, zatim u početnom delu melioracionog kanala u Negotinu i u početnom i srednjem delu kanala Galovica, a najlošijeg kvaliteta su otpadne vode koje se ulivaju u melioracioni kanal u Negotinu, zatim vode bočnih kanala sliva Petrac 1 i vode bočnih kanala sliva Galovice u industrijskoj zoni.

- U ispitivanim vodama na lokaciji "Radmilovac" je identifikovano prisustvo: *Escherichia coli* 1, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aeromonas hydrophila* 1, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp.
- U vodi melioracionog kanala u Surčinu konstatovano je prisustvo patogenih bakterija: *E. coli* 2, *E. vulneris*, *E. adecarboxylata*, *Vibrio fluvialis* (dva različita soja u pogledu biohemijskih osobina), *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila* 1.
- U vodi melioracionog kanala na lokaciji Negotina identifikovane su: *E. coli* 1, *E. coli* O157 :H7, *Citrobacter freundii*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Proteus* spp., *Aeromonas hydrophila* 1.
- U vodi kanala na lokaciji Srema, detektovane su : *E. coli* 2, *E. coli* O157 :H7, *Aeromonas hydrophila* 1, *Citrobacter freundii*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. *Proteus* spp.
- Najveći broj ukupnih i fekalnih koliformnih bakterija na individualnim gazdinstvima u Negotinu, konstatovan je kod ploda paradajza (2.50×10^6 i 8.61×10^4 CFU/g), a najmanji kod ploda krastavca (3.0×10^4 i 1.0×10^2 CFU/g). Kod ispitivanih vrsta povrća konstatovano je prisustvo *E. coli*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp.
- Koliformne bakterije na krtolama krompira su konstatovane u sve tri godine, a najveći broj je bio 2008. godini i iznosio 4.20×10^4 CFU/g, dok je najmanji broj bio u 2007. godini i iznosio 3.0×10^3 CFU/g, dok je *E. coli* u malom broju konstatovano samo u 2006. godini (6.70×10^1 CFU/g). Na krtolama krompira identifikovane su vrste *E. coli* 2 i *E. vulneris*.
- Bakterija *E. coli* K-12, poreklom iz kontaminirane vode za navodnjavanje, je površinski i endofitno kolonizovala koren zelene salate. Takođe, ova bakterija je bila transportovana do listova biljaka, gde su bakterijske ćelije formirale

mikrokolonije oko stominih otvora. Najveći broj bakterija je konstatovan na površini korena, a najmanji u unutrašnjosti listova, dok je visoka brojnost ovih bakterija detektovana i u samoj unutrašnjosti korena (3.0×10^3 CFU/g). Konfokal laser skening mikroskopijom, potvrđeno je prisustvo *E. coli* K-12 u unutrašnjosti korena i listova zelene salate (*Lactuca sativa*) koje su navodnjavane kontaminiranom vodom.

- Sojevi bakterija: *Pseudomonas aeruginosa* PA01 (Gfp), *Pseudomonas aeruginosa* DSM50071, *E. coli* PBA28 (Gfp), *Herbaspirillum frisingense* GSF30BA28 (Gfp), *Salmonella typhimurium* LT2, *Salmonella typhimurium* ATCC14028, *Salmonella typhimurium* S1, *Listeria monocytogenes* EGD-E, *Listeria monocytogenes* SV4B, *Ochrobactrum anthropi* 1ADSM14396, *Roseomonas fauriae* KACC11694, *Roseomonas genomospecies* 6CCUG33010 su površinski i endofitno kolonizovale koren, stablo i list ispitivanih biljnih vrsta.

- Sojevi *E. coli* pBA28 (Gfp), *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Listeria monocytogenes* SV4B i *Roseomonas genomospecies* 6CCUG33010 su detektovani u unutrašnjosti biljnih ćelija korena kukuruza šećerca, dok je soj *Pseudomonas aeruginosa* PA01 (Gfp) detektovan u ćelijama korena paradajza. Mehanizam transporta bakterija u unutrašnjost biljne ćelije nije razjašnjen..

8. LITERATURA

Aiat Melloul, A., and L. Hassani. 1999. *Salmonella* infection in children from the wastewater-spreading zone of Marrakesh city (Morocco). *J. Appl. Microbiol.* 87:536–539.

Ackers, M. L., B. E. Mahon, E. Leahy, B. Goode, T. Damrow, P. S. Hayes, W. F. Bibb, D. H. Rice, T. J. Barrett, L. Hutwagner, P. M. Griffin, and L. Slutsker. 1998. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with leaf lettuce consumption. *J. Infect. Dis.* 177:1588–1593.

Alaa el-din, M. M., I. M. Madany, A. al-Tayaran, A. H. al-Jubair, and A. Gomaa. 1994. Trends in water quality of some wells in Saudi Arabia. *Sci. Total Environ.* 143:173–181.

Alderisio, K. A., and N. DeLuca. 1999. Seasonal enumeration of fecal coliform bacteria from the feces of ring-billed gulls (*Larus delawarensis*) and Canada geese (*Branta canadensis*). *Appl. Environ. Microbiol.* 65:5628–5630.

Al-Hindawi N., R. Rished, Presence and distribution of *Salmonella* species in some local foods from Baghdad City, Iraq, *J. Food Prot.* 42 (1979) 877–880.

Amann R I, Zarda B, Stahl D A & Schleifer K H (1992) Identification of individual prokaryotic cells by using enzymelabeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* 58: 3007–3011.

Amann R I, Krumholz L & Stahl D A (1990) Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J Bacteriol* 172: 762–770.

Amoah, P., Drechsel, P. & Abaidoo, R. C. 2005 Irrigated urban vegetable production in Ghana: sources of pathogen contamination and health risk reduction. *Irrig. Drainage* 54, 49–61.

Anon (2003) Water for People, Water for Life: Executive Summary. United Nations World Water Development Report 2003. Paris, France: UNESCO Publ., from <http://unes.doc.unesco.org/images/0012/001295/129556e.pdf> viewed on 10/01/05.

Anon (2005a), Health Protection Agency Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food information paper ‘Microbiological Status of RTE Fruit and Vegetables’ ACM/745. London, UK: Food Standards Agency, from (accessed on 11/10/06).
<http://food.gov.uk/multimedia/pdfs/acm745amended.pdf>

Anon (2005b) Update On Salmonella Outbreak. Canada: Ministry of Health and Long-term Care, (accessed on 22/04/07)
http://www.health.gov.on.ca/english/media/news_releases/archives/nr_05/nr_121405.html

Anon (2007) Consumer Attitudes to Food Standards Report, Wave 7. London, UK: Food Standards Agency. (accessed on 24/04/07)
<http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/cas07uk.pdf>

Anonymous. 1973. Water quality criteria. Ecological Research Series. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C. EPA R3-73-033.

Anonymous. 1988. Water quality criteria for microbiological indicators: overview report. British Columbia, Ministry of Water, Land, and Air Protection, Resource Quality Section, Water Management Branch, Ministry of Environment and Parks. March 8, 1988. Accessed 13 June 2004. Available at:
<http://wlapwww.gov.bc.ca/wat/wq/BCguidelines/microbiology.html>.

Anonymous. 1992. Manual, guidelines for water reuse. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C. EPA/624/ R-92/004. Accessed 13 June 2004. Available at: <http://www.epa.gov/cgi-bin/claritgw?opDisplay&document5clserv:ORD:2025;&rank54&template5epa..>

Anonymous. 7 August 1997. Surface water quality objectives, reprinted MB110. Saskatchewan Environment. Accessed 13 June 2004. Available at: <http://www.se.gov.sk.ca/environment/protection/water/MB110pSurfacepWaterpQualitypObjectivespb.pdf>.

Anonymous. 1999a. Outbreaks of *Shigella sonnei* infection associated with eating fresh parsley—United States and Canada, July– August 1998. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 48:285–289.

Anonymous. 1999b. Outbreak of *Salmonella* serotype muenchen infections associated with unpasteurized orange juice—United States and Canada. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 48:582–585.

Anonymous. 1999. Canadian Council of Ministers of the Environment, Canadian water quality guidelines for the protection of agricultural water uses, p. 2. *In* Canadian environmental quality guidelines. CCME Publications, Winnipeg, Manitoba, Canada.

Anonymous. November 1999. Surface water quality guidelines for use in Alberta. Alberta Environment, Environmental Service, Environmental Sciences Division and Natural Resources Service, Water Management Division. November 1999. Publication no. T/483. ISBN 0-7785-0897-8. Accessed 13 June 2004. Available at: <http://www3.gov.ab.ca/env/protenf/publications/SurfWtrQual-Nov99.pdf>.

Anonymous. 2001. Canadian Food Inspection Agency, health hazard alert—fresh spinach may contain *Shigella*. 23 October 2001. Accessed 13 June 2004. Available at: <http://www.inspection.gc.ca/english/corpaffr/recarapp/2001/20010622e.shtml>.

Anonymous. June 2002. Ground water and drinking water, list of contaminants and MCLs. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C. EPA 816-F-02-013. Accessed 13 June 2004. Available at: <http://www.epa.gov/safewater/mcl.html#mcls>.

Armon, R., C. G. Dosoretz, Y. Azov, and G. Shelef. 1994. Residual contamination of crops irrigated with effluent of different qualities: a field study. *Water Sci. Technol.* 30:239–248.

Arumugaswamy, R. K., G. R. Rahamat Ali, and S. N. B. A. Hamid. 1994. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in foods in Malaysia. *Int. J. Food Microbiol.* 23:117–121.

Arvanitidou, M., A. Papa, T. C. Constantinidis, V. Danielides, and V. Katsouyannopolos. 1997. The occurrence of *Listeria* spp. and *Salmonella* spp. in surface waters. *Microbiol. Res.* 152:395–397.

Ausmees, N., K. Jacobsson, and M. Lindberg. 2001. A unipolarly located, cell surface-associated agglutinin, Rap A, belongs to a family of *RMzobium-a.dh.ermg* proteins (Rap) in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Microbiology* 147:549-559.

Barak D. J., Whitehead L. C., Charkowski A. O. Difference in Attachment of *Salmonella enterica* Serovars and *Escherichia coli* O157:H7 to Alfalfa Sprouts. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003; Vol 69, No 8:4556–4560.

Barrell, R. A. E., P. R. Hunter, and G. Nichols. 2000. Microbiological standards for water and their relationship to risk. *Commun. Dis. Public Health* 3:8–13.

Bastos, R. K. X., and D. D. Mara. 1995. The bacterial quality of salad crops drip and furrow irrigated with waste stabilization pond effluent: an evaluation of the WHO guidelines. *Water Sci. Technol.* 31:425–430.

Berg G, Eberl L, Hartmann A (2005) The Rhizosphere as a Reservoir for Opportunistic Human Pathogenic Bacteria. *Environmental Microbiology* 7: 1673-1685.

Berger, C. N., Sodha, S. V., Shaw, R. K., Griffin, P. M., Pink, D., Hand, P., & Frankel, G. (2010). Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environmental Microbiology*, 12, 2385-2397.

<http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02297.x>

Berrang M.E., R.E. Brackett, L.R. Beuchat, Growth of *Aeromonas hydrophila* on fresh vegetables stored under controlled atmosphere, *Appl. Environ. Microbiol.* 55 (1989) 2167–2171.

Beuchat, L. R. 1996. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. *J. Food Prot.* 59:204-216.

Beuchat, L. R. 1998. Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: a review. WHO/FSF/FOS/98.2. Food Safety Unit, World Health Organization, Geneva.

Beuchat, L. R. 1999. Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces applied to lettuce and the effectiveness of chlorinated water as a disinfectant. *J. Food Prot.* 62:845– 849.

Beuchat, L. R. 2002. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes and Infect.* 4: 413–423.

Beuchat, L. R., and J. H. Ryu. 1997. Produce handling and processing practices. *Emerg. Infect. Dis.* 3:459–465.

Blakeman, J. P. 1985. Ecological succession of leaf surface microorganisms in relation to biological control. In *Biological control on the phylloplane*. Edited by C.E. Windels and S.E. Lindow. APS Press, St. Paul, Minn. pp. 6–30

Blomme, B., & Handler, A. (2009). *Fluorescence In Situ Hybridization*. Retrieved from *Environmental Microbiology*:

http://filebox.vt.edu/users/chagedor/biol_4684/Methods/FISH.html

Blumenthal, U. J., D. D. Mara, A. Peasey, G. Ruiz-Palacios, and R. Stott. 2000a. Guidelines for the microbiological quality of treated wastewater used in agriculture: recommendations for revising WHO guidelines. *Bull. World Health Org.* 78:1104–1116.

Blumenthal, U. J., A. Peasey, G. Ruiz-Palacios, and D. D. Mara. 2000b. Guidelines for wastewater reuse in agriculture and aquaculture: recommended revisions based on new research evidence. WELL study. Task No. 68, part 1. WELL of the Water, Engineering and Development Centre, Loughborough University, Leicestershire, UK.

Brandl M. T. (2006) Fitness of Human Enteric Pathogens on Plants and Implications for Food Safety¹. Annual review of phytopathology.

Brandl, M. T., and R. E. Mandrell. 2002. Fitness of *Salmonella enterica* serovar Thompson in the cilantro phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:3614–3621.

Brennhovd, O., G. Kapperud, and G. Langeland. 1992. Survey of thermotolerant *Campylobacter* spp. and *Yersinia* spp. in three surface water sources in Norway. *Int. J. Food Microbiol.* 15:327–328.

Buddrus-Schiemann K., Schmid M., Schreiner K., Welzl G., and Hartmann A. (2010). Root colonization by *Pseudomonas* sp. DSMZ 13134 and impact on the indigenous rhizosphere bacterial community of barley. *Microb. Ecol.* 60: 381–393

Burdman, S., G. Dulguerova, Y. Okon, and E. Jurkevitch. 2001. Purification of the major outer membrane protein of *Azospirillum brasilense*, its affinity to plant roots, and its involvement in cell aggregation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14:555-561.

Burun B., Coban Poyrazoglu E. 2002. Embryo Culture in Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Turk. J. Biol.* 26. 175-180.

Callister S.M., W.A. Agger, Enumeration and characterization of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas caviae* isolated from grocery store produce, Appl. Environ. Microbiol. 53 (1989) 249–253.

Campbell, J. V., J. Mohle-Beotani, R. Reporter, S. Abbott, J. Farrar, M. Brandl, R. Mandrell, and S. B. Werner. 2001. An outbreak of *Salmonella* serotype Thompson associated with fresh cilantro. *J. Infect. Dis.* 183:984–987.

CDC (2005) Outbreaks of Salmonella infections associated with eating roma tomatoes – United States and Canada, 2004. *Morb Mortal Wkly Rep* 54, 325–328.

CDC 2006 Bacterial Disease: US Centers for Disease Control and Prevention. Division of Bacterial and Mycotic Diseases. Fact Sheets on Foodborne Illness and Diseases. Updated Versions Sept. 2006.

CDC (2006a) (accessed on 11/01/07).

http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/salmonellosis_2006/outbreak_notice.htm

CDC (2006b) Ongoing multistate outbreak of *Escherichia coli* serotype O157:H7 infections associated with consumption of fresh spinach – United States, September 2006. *Morb Mortal Wkly Rep* 55, 1045–1046.

CDC (2006c) Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention. (accessed on 11/01/07) <http://www.cdc.gov/ecoli/2006/december/121406.htm>

Chalmers RM, Aird A, Bolton FJ (2000). Waterborne *Escherichia coli* O157. *J. Appl. Microbiol.* 88: 124-132.

Chapman, P.A., Siddons, C.A., Wright, J.D., Norman, P., Fox, J., Crick, E., 1993. Cattle as a possible source of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157 contaminations in man. *Epidemiol. Infect.* 111, 439–447.

Charkowski, A. O.J. D. Barak, C. Z. Sarreal, and R. E. Mandrell. 2002. Differences in growth of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7 on alfalfa sprouts. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:3114-3120.

Cifuentes, E. 1998. The epidemiology of enteric infections in agricultural communities exposed to wastewater irrigation: perspectives for risk control. *Int. J. Environ. Health Res.* 8:203–213.

Cifuentes, E., U. Blementhal, G. Ruiz-Palacios, S. Bennett, and M. Quigley. 2000. Health risks in agricultural villages practicing wastewater irrigation in central Mexico: perspectives for protection. *Schriftenr. Ver Wasser. Boden. Lufthyg.* 105:249–256.

Collignon S. and Korsten L. (2010): Attachment and Colonization by *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium, and *Staphylococcus aureus* on Stone Fruit Surfaces and Survival through a Simulated Commercial Export Chain *Journal of Food Protection*, Vol. 73, No. 7, 1247–1256

Cooley, M. B., W. G. Miller, and R. E. Mandrell. 2003. Colonization of *Arabidopsis thaliana* with *Salmonella enterica* or enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and competition by *Enterobacter asburiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:4915-4926.

Croes, C. L., S. Moens, E. Van Bastelaere, J. Vanderleyden, and K. W. Michiels. 1993. The polar flagellum mediates *Azospirillum brasilense* adsorption to wheat roots. *J. Gen. Microbiol.* 139:2261-2269.

Cross, P. M. 1997. Review of irrigation district water quality. Report prepared for Canada-Alberta Environmentally Sustainable Agriculture (CAESA) Program by Madawaska Consulting, April 1997. CAESA, Edmonton, Alberta, Canada.

Cummings, K., E. Barrett, J. C. Mohle-Boetani, J. T. Brooks, J. Farrar, T. Hunt, A. Fiore, K. Komatsu, S. B. Werner, and L. Slutsker. 2001. A multistate outbreak of *Salmonella enterica* serotype baidon associated with domestic raw tomatoes. *Emerg. Infect. Dis.* 7: 1046–1048.

Daczkowska-Kozon, E., and J. Brzostek-Nowakowska. 2001. *Campylobacter* spp. in waters of three main western Pomerania water bodies. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 203:435–443.

D'Aoust, J-Y, Maurer, J. & Bailey, J. S. (2001) *Salmonella* species. In *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. (Eds. M. P. Doyle, L. R. Beuchat, & T. J. Montville), Washington, DC, ASM Press, pp. 141-78.

Del Gallo, M., M. Negi, and C. A. Neyra. 1989. Calcofluor- and lectin-binding exocellular polysaccharides of *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. *J. Bacterid.* 171:3504-3510.

Dentinger, C. M., W. A. Bower, O. V. Nainan, S. M. Cotter, G. Myers, L. M. Dubusky, S. Fowler, E. D. Salehi, and B. P. Bell. 2001. An outbreak of hepatitis A associated with green onions. *J. Infect. Dis.* 183:1273–1276.

De Simon, M., C. Tarrago, and M. D. Ferrer. 1992. Incidence of *Listeria monocytogenes* in fresh foods in Barcelona (Spain). *Int. J. Food Microbiol.* 16:153–156.

Doan C. H. and Da Vidson, P. M. (2000) Microbiology of potatoes and potato products: a review. *J Food Prot* 63, 668–683.

Dong, Y, A. L. Iniguez, B. M. Ahmer, and E. W. Triplett. 2003. Kinetics and strain specificity of rhizosphere and endophytic colonization by enteric bacteria on seedlings of *Medicago sativa* and *Medicago truncatula*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1783-1790.

Doyle, M. P., and J. L. Schoeni. 1986. Isolation of *Campylobacter jejuni* from retail mushrooms. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:449– 450.

Duffell, E., Espie, E., Nichols, T., Adak, G.K., De Valk, H., Anderson, K. and Stuart, J.M. (2003) Investigation of An Outbreak of E. coli O157 Infections Associated with A Trip to France of Schoolchildren from Somerset, England. *Eurosurveillance Weekly* 8, 81–86 (<http://www.eurosurveillance.org/em/v08n04/0804-221.asp>).

Dulić Z., Kljujev I., Raičević V., Živić I., Marković Z., Stanković M., Poleksić V.: Estimation of irrigation water quality using coliform bacteria, zooplankton and zoobenthos as indicators (Article) *Archives Of Biological Sciences*, (2008), vol. 60 br. 1, str. 11P-12P.

Edberg, S. C., E. W. Rice, R. J. Karlin, and M. J. Allen. 2000. *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. *Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol.* 29:106S– 116S.

Eldor, P. (2007). *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry*. Oxford: Academic Press is an imprint of Elsevier.

Ensink J. H. J., van der Hoek W, Matsuno Y, Munir S & Aslam M. R. (2003) The use of untreated wastewater in peri-urban agriculture in Pakistan: risks and opportunities. IWMI Research Report No. 64, International Water Management Institute, Colombo, Sri Lanka.

Ercolani, G. L. 1976. Bacteriological quality assessment of fresh marketed lettuce and fennel. *Appl. Environ. Microbiol.* 31:847–852.

Exner, M. E., and R. F. Spalding. 1985. Ground-water contamination and well construction in southeast Nebraska (USA). *Ground Water* 23:26–34.

FAO/WHO Outbreaks of Salmonellosis associated with Eating Uncooked Tomatoes: Implication for Public Health. *Newsletter* 2000a; 63:3.

FAO/WHO Multistate Outbreak of Salmonella Serotype Poona Infections Associated With Eating Cantaloupe from Mexico- United States and Canada, 2000-2002. Newsletter 2003b;74/75:7.

Farber JM, Wang SL, Cai Y, Zhang S. 1998. Changes in populations of *Listeria monocytogenes* inoculated on packaged fresh-cut vegetables. J Food Prot 61(2):192-5.

Fattal, B., Y. Wax, M. Davies, and H. I. Shuval. 1986. Health risks associated with wastewater irrigation: an epidemiological study. *Am. J. Public Health* 76:977-979.

FDA 2005: US Food and Drug Administration (US FDA). Centre for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN). Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook.

Feachem, R. G., D. J. Bradley, H. Garelick, and D. D. Mara. 1983. Sanitation and disease; health aspects of excreta and wastewater management: World Bank studies in water supply and sanitation 3. The World Bank, Washington, D.C.

Fenlon, D. R., I. D. Ogden, A. Vinten, and I. Svoboda. 2000. The fate of *Escherichia coli* and *E. coli* 0157 in cattle slurry after application to land. *Symp. Sen Soc. Appl. Microbiol.* 88:149S-156S.

Fenlow, D. R. 1985. Wild birds and silage as reservoirs of *Listeria* in the agricultural environment. *J. Appl. Bacteriol.* 59:537-544.

Fields P. I., Swanson R. V., Haidaris C. G., Heffron F. (1986). Mutants of *Salmonella* Typhimurium that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 5189-5193. doi: 10.1073/pnas.83.14.5189.

Forbes, Sahm and Weissfeld. 1998. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 10th ed. Mosby, Inc., St. Louis, Mo.

Forslund A., Ensink J. H. J., Battilani A., Kljujev I., Gola S., Raičević V., Jovanović Z., Stikić R., Sandei L., Fletcher T., Dalsgaard A. Faecal contamination and hygiene aspect associated with the use of treated wastewater and canal water for irrigation of potatoes (*Solanum tuberosum*) (Article) *Agricultural Water Management*, (2010), vol. 98 br. 3, str. 440-450.

Franz E, Visser AA, Van Diepeningen AD, Klerks MM, Termorshuizen AJ and van Bruggen AH, 2007. Quantification of contamination of lettuce by GFP-expressing *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Food Microbiol*, 24, 106-112.

Fukushima, H., K. Hoshina, and M. Gomyoda. 1999. Long-term survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* 026, O111, and 0157 in bovine feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:5177-5181.

Gagliardi J. V, and J. S. Karns. 2002. Persistence of *Escherichia coli* 0157:H7 in soil and on plant roots. *Environ. Microbiol.* 4:89-96.

Gal, M., G. M. Preston, R. C. Massey, A.J. Spiers, and P. B. Rainey. 2003. Genes encoding a cellulosic polymer contribute toward the ecological success of *Pseudomonas fluorescens* SBW25 on plant surfaces. *Mol. Ecol.* 12:3109-3121.

Gandhi, M., S. Golding, S. Yaron, and K. R. Matthews. 2001. Use of green fluorescent protein expressing *Salmonella* Stanley to investigate survival, spatial location, and control on alfalfa sprouts. / *Food Prot.* 64:1891-1898.

Garcia-Villanova Ruiz, B., A. Cueto Espinar, and M. J. Bolanos Carmona. 1987. A comparative study of strains of salmonella isolated from irrigation waters, vegetables, and human infection. *Epidemiol. Infect.* 98:271-276.

Gary, H. L., S. R. Johnson, and S. L. Ponce. 1983. Cattle grazing impact on surface water quality in a Colorado front range stream. *J. Soil Water Conserv.* March–April:124–128.

Gelvin, S. B. (2003). Agrobacterium-mediated plant transformation: The biology behind the “gene-jockeying” tool. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 16–37.

Gerba, C. P. (2009) The role of water and water testing in produce safety. In *Microbial Safety of Fresh Produce* ed. Fan, X., Niemira, B.A., Doona, C.J., Feeherty, F.E. and Gravani, R.B. pp. 129–142. Hoboken: Wiley

Gerba, C. H., Rose, J. B. & Haas, C. N. (1996) Sensitive populations: who is at the greatest risk? *International Journal of Food Microbiology*, 30, 113-123.

Germaine, K., Keogh, E., Garcia-Cabellos, G., Borremans, B., van der Lelie, D., Barac, T., Oeyen, L., Vangronsveld, J., Moore, F.P., Moore, E.R., Campbell, C.D., Ryan, D., Dowling, D.N., 2004. Colonisation of poplar trees by gfp expressing bacterial endophytes. *FEMS Microbiology Ecology* 48, 109-118.

Germaine, K.J., Liu, X., Cabellos, G.G., Hogan, J.P., Ryan, D., Dowling, D.N., 2006. Bacterial endophyte-enhanced phytoremediation of the organochlorine herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *FEMS Microbiology Ecology* 57, 302-310.

Gillespie, I.A. (2004) Outbreak of Salmonella Newport infection associated with lettuce in the UK. *Eurosurveillance Weekly* 8,
<http://www.eurosurveillance.org/ew/2004/041007.asp>.

Gorski, L.J. D. Palumbo, and R. E. Mandrell. 2003. Attachment of *Listeria monocytogenes* to radish tissue is dependent upon temperature and flagellar motility. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:258-266.

Gorski, L.J. D. Palumbo, and K. D. Nguyen. 2004. Strain-specific differences in the attachment of *Listeria monocytogenes* to alfalfa sprouts. / *Food Prot.* 67:2488-2495.

Guo, X. J. Chen, R. E. Brackett, and L. R. Beuchat. 2001. Survival of salmonellae on and in tomato plants from the time of inoculation at flowering and early stages of fruit development through fruit ripening. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:4760-4764.

Guo, X., van Iersel, M. W., Chen, J., Brackett, R. E., and Beuchat, L. R. 2002. Evidence of association of salmonellae with tomato plants grown hydroponically in inoculated nutrient solution. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol 68, No 7:3639–3643.

Hagedorn, C., S. L. Robinson, J. R. Filtz, S. M. Grubbs, T. A. Angier, and R. B. Reneau. 1999. Determining sources of fecal pollution in a rural Virginia watershed with antibiotic resistance patterns in fecal streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:5522–5531.

Haahtela, K., E. Tarkka, and T. K. Korhonen. 1985. Type 1 fimbria-mediated adhesion of enteric bacteria to grass *mots*. *Appl. Environ. Microbiol.* 49:1182-1185.

Hamilton, A.J., Stagnitti, F., Premier, R., Boland, A-M. and Hale, G. (2006) Quantitative microbial risk assessment models for consumption of raw vegetables irrigated with reclaimed water. *Appl Environ Microbiol* 72, 3284–3290.

Harvey J., A. Gilmour: Occurrence and characteristics of *Listeria* in foods produced in Northern Ireland, *Int. J. Food Microbiol.* 19 (1993) 193–205.

Hassan, A. N., and J. F. Frank. 2004. Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 grown in tryptic soy broth and nutrient broth to apple and lettuce surfaces as related to cell hydrophobicity, surface charge, and capsule production. *Int. J. Food Microbiol.* 96:103-109.

Havelaar, A. H., M. During and Versteegh, J. F. M.: Ampicillin-dextrin agar medium for the enumeration of *Aeromonas* species in water by membrane filtration. *J. Appl. Microbio.* 62: 279 – 287 (1987)

Heaton J. C. and Jones K., (2008) Microbial contamination of fruit and vegetables and the behaviour of enteropathogens in the phyllosphere: a review. *Journal of Applied Microbiology* ISSN 1364-5072. Volume 104, Issue 3, Date: March 2008, Pages: 613-626

Hedberg, C. W., F. J. Angulo, K. E. White, C. W. Langkop, W. L. Schell, M. G. Stobierski, A. Schuchat, J. M. Besser, S. Dietrich, L. Hesel, P. M. Griffin, J. W. McFarland, and M. T. Osterholm. 1999. Outbreak of salmonellosis associated with eating uncooked tomatoes: implications for public health. The investigation team. *Epidemiol. Infect.* 122:385–393.

Heisick, J. E., D. E. Wagner, M. L. Neirman, and J. T. Peeler. 1989a. *Listeria* spp. found on fresh market produce. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:1925–1927.

Heisick J.E., F.M. Harrell, E.H. Peterson, S. McLaughlin, D.E.Wagner, I.V. Wesley, J. Bryner, Comparison of four procedures to detect *Listeria* spp. in foods, *J. Food Prot.* 52 (1989b) 154–157.

Herwaldt, B. L. 2000. *Cyclospora cayetanensis*: a review, focusing on the outbreaks of cyclosporiasis in the 1990s. *Clin. Infect. Dis.* 31:1040–1057.

Hilborn, E. D., J. H. Mermin, P. A. Mshar, J. L. Hadler, A. Vortsch, C. Wojkunski, M. Swartz, R. Mshar, M. A. Lambert-Fair, J. A. Farrar, M. K. Glynn, and L. Slutsker. 1999. A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with consumption of mesclun lettuce. *Arch. Intern. Med.* 159:1758–1764.

Hirano, S. S., L. S. Baker, and C. D. Upper. 1996. Raindrop momentum triggers growth of leaf-associated populations of *Pseudomonas syringae* on field-grown snap bean plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2560-2566.

Hirano, S. S., and C. D. Upper. 2000. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*—a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64:624-653.

Ho, S. C., J. L. Wang, and M. Schindler. 1990. Carbohydrate binding activities of *Bradyrhizobium japonicum*. I. Saccharide-specific inhibition of homotypic and heterotypic adhesion. *Cell Biol.* 111:1631-1638.

Hora, R., Warriner, K., Shelp, B.J., and Griffiths, M.W. (2005) Internalization of *Escherichia coli* O157:H7 following biological and mechanical disruption of growing spinach plants. *J Food Prot*, 68(12), 2506-2509.

Horby, P.W., O'Brien, S.J., Adak, G.K., Graham, C., Hawker, J.I., Hunter, P., Lane, C., Lawson, A.J., Mitchell, R.T., Reacher, M.H., Threlfall, E.J., Ward, L.R., (2003) A national outbreak of multiresistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium definitive phage type (DT) 104 associated with consumption of lettuce. *Epidemiol. Infect.* 130, 169–178.

Howard M. B., Hutcheson S. W. Growth Dynamic of *Salmonella enterica* Strains on Alfalfa Sprouts and in Wast Seed Irrigaton Water. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003; Vol 69, No 1:548–553.

Ibekwe, A. M., P. M. Watt, P.J. Shouse, and C. M. Grieve. 2004. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in irrigation water on soils and plants as validated by culture method and realtime PCR. *Can. J. Microbiol.* 50:1007-1014.

Iniguez, A.L., Dong, Y., Carter, H.D., Ahmer, B.M., Stone, J.M., and Triplett, E.W. (2005) Regulation of enteric endophytic bacterial colonization by plant defenses. *Mol Plant Microbe Interact* 18: 169–178.

Islam, M.J. Morgan, M. P. Doyle, and X. Jiang. 2004. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in manure compost-amended soil and on carrots and onions grown in an environmentally controlled growth chamber. *J. Food Prot.* 67:574-578.

Islam, M., Morgan, J., Doyle, M.P., Phatak, S.C., Millner, P. and Jiang, X. (2004) Fate of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium on carrots and radishes grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *Appl Environ Microbiol* 70, 2497–2502.

Islam, M., Doyle, M.P., Phatak, S.C., Millner, P., Jiang, X., 2004a. Persistence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in soil and on leaf lettuce and parsley grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *J. Food Prot.* 67, 1365–1370.

Islam, M., Morgan, J., Doyle, M.P., Phatak, S.C., Millner, P., Jiang, X., 2004b. Persistence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on lettuce and parsley and in soils on which they were grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *Foodborne Pathogens Dis* 1, 27–35.

Itoh, Y., Y. Sugita-Konishi, F. Kasuga, M. Iwaki, Y. Hara-Kudo, N. Saito, Y. Noguchi, H. Konuma, and S. Kumagai. 1998. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 present in radish sprouts. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1532-1535.

Jablasone, J., Warriner, K., Griffiths, M., 2005. Interactions of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* in plants cultivated in a gnotobiotic system. *Int. J. Food Microbiol.* 99, 7–18.

James, E. K., P. Gyaneshwar, P. N. Mathan, W. L. Barraquio, P. M. Reddy, P. P. Iannetta, F. L. Olivares, and J. K. Ladha. 2002. Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *Molec. Plant-Microbe Interact.* 15:894–906.

Jjemba, P.K., Weinrich, L.A., Cheng, W., Giraldo, E. and LeChevallier, M.W. (2010) Regrowth of potential opportunistic pathogens and algae in reclaimed-water distribution systems. *Appl Environ Microbiol* 76, 4169–4178.

Jerngklinchan, J., and K. Saitanu. 1993. The occurrence of salmonellae in bean sprouts in Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 24:114–118.

Johannessen, G. S., S. Loncarevic, and H. Kruse. 2002. Bacteriological analysis of fresh produce in Norway. *Int. J. Food Microbiol.* 77:199–204.

Johannessen GS, Bengtsson GB, Heier BT, Bredholt S, Wasteson Y and Rorvik LM, 2005. Potential uptake of *Escherichia coli* O157:H7 from organic manure into crisphead lettuce. *Appl Environ Microbiol*, 71, 2221-2225.

Kaneko, K. I., H. Hayashidani, Y. Ohtomo, J. Kosuge, M. Kato, K. Takahashi, Y. Shiraki, and M. Ogawa. 1999. Bacterial contamination of ready-to-eat foods and fresh products in retail shops and food factories. *J. Food Prot.* 62:644–649.

Keawvichit, R., K. Wongworapat, P. Patsyainant, A. Silprasert, and S. Karnchanawong. 2001. Parasitic and bacterial contamination in collards using effluent from treated domestic wastewater in Chiang Mai, Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 32(Suppl. 2):240–244.

Keene, W. E., J. M. McNulty, F. C. Hoesly, L. P. Williams, K. Hedberg, G. L. Oxman, T. J. Barret, M. A. Pfaller, and D. W. Fleming. 1994. A swimming-associated outbreak of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella sonnei*. *N. Engl. J. Med.* 331:579–584.

Keraita, B., Konradsen, F., Drechsel, P. & Abaidoo, R. C. 2007 Effect of low-cost irrigation methods on microbial contamination of lettuce irrigated with untreated wastewater. *Tropical Med. Int. Health* 12(s2), 15–22.

Kilian M., Bulow P. (1979). *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B* 87, pp. 271-276.

Kljujev I. i Raičević V. (2006): Dynamics in Coliform Bacteria Count in Waters from the Experimental Fields of Faculty of Agriculture, Belgrade, Serbia and Montenegro. The International scientific conference BALWOIS 2006 - Conference on Water Observation and Information System for Decision Support. www.balwois.org.accueil.html

Klerks, M. M., M. van Gent-Pelzer, E. Franz, C. Zijlstra and A. H. C. van Bruggen: Physiological and molecular response of *Lactuca sativa* to colonization by *Salmonella enterica* serovar Dublin, PhD (2007).

Knudsen, D. M., S. A. Yamamoto, and L. J. Harris. 2001. Survival of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 on fresh and frozen strawberries. *J. Food Prot.* 64:1483–1488.

Korhonen, T. K, E. Tarkka, H. Ranta, and K. Haahtela. 1983. Type 3 fimbriae of *Klebsiella* sp.: molecular characterization and role in bacterial adhesion to plant roots. / *Bacteriol.* 155:860-865.

Krause A, Ramakumar A, Bartels D, Battistoni F, Bekel T, Boch J, Böhm M, Friedrich F, Hurek T, Krause L, Linke B, McHardy AC, Sarkar A, Schneiker S, Syed AA, Thauer R, Vorhölter FJ, Weidner S, Pühler A, Reinhold-Hurek B, Kaiser O, Goesmann A (2006) Complete genome of the mutualistic, N(2)-fixing grass endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *Nat Biotechnol* 24:1385–1391

Kumar, A., R. K. Agarwal, K. N. Bhilegaonkar, B. R. Shome, and B. N. Bachhil. 2001. Occurrence of *Campylobacter jejuni* in vegetables. *Int. J. Food. Microbiol.* 67:153–155.

- Kutter, S., Hartmann, A. and Schmid, M. (2006). Colonization of barley (*Hordeum vulgare*) with *Salmonella enterica* and *Listeria* spp. *FEMS Microbiology Ecology* 56: 262-271
- Lapidot, A., Romling, U., & Yaron, S. (2006). Biofilm formation and the survival of *Salmonella typhimurium* on parsley. *International Journal of Food Microbiology*, 109, 229–233.
- Lee, J. V., D. Basford, T. Donovan, A. Furniss, and D. West. 1982. The incidence of *Vibrio cholerae* in water, animals, and birds in Kent, England. *J. Appl. Bacteriol.* 52:281–291.
- Leifson, E. : New selenite enrichment media for the isolation of typhoid and paratyphoid (*Salmonella*) bacilli. - *Am. J. Hyg.*, 24; 423-432 (1936).
- Levin, M. 1921. Bacteria fermenting lactose, the significance in water analysis. *Bull.* 62. Iowa State College Eng. Exp. Sta., Ames, Iowa.
- Lindow, S.E., Brandl, M.T., 2003. Microbiology of the phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1875–1883.
- Lipp, E. K., S. A. Farrah, and J. B. Rose. 2001. Assessment and impact of microbial fecal pollution and human enteric pathogens in a coastal community. *Mar. Pollut. Bull.* 42:286–293.
- Little, C., D. Roberts, E. Yongs, and J. de Louvois. 1999. Microbiological quality of retail imported unprepared whole lettuces: a PHLS Food Working Group study. Public Health Laboratory Service. *J. Food Prot.* 62:325–328.
- Loh J. T., S. C. Ho, A. W. de Feijter J. L. Wang, and M. Schindler. 1993. Carbohydrate binding activities of *Bradyrhizobium japonicum*: unipolar localization of the lectin BJ38 on the bacterial cell surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3033-3037.

Long, S. M., G. K. Adak, S. J. O'Brien, and I. A. Gillespie. 2002. General outbreaks of infectious intestinal disease linked with salad vegetables and fruit, England and Wales, 1992–2000. *Commun. Dis. Public Health* 5:101–105.

Ludwig W., Amann R., Martinez-Romero E., Schönhuber W., Bauer S., Neef A. and Schleifer K.-H. (1998). rRNA based identification and detection systems for *Rhizobia* and other bacteria. *Plant and Soil* 204: 1–19, 1998

Luechtfeld, N., M. Blaser, L. Reller, and W. Wang. 1980. Isolation of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* from migratory wildfowl. *J. Clin. Microbiol.* 12:406–408.

MacConkey, A. 1905. Lactose-fermenting bacteria in feces. *J. Hyg.* 5:333-378.

MacConkey. 1908. *J. Hyg.* 8:322.

MacGowan A.P., K. Bowker, J. McLauchlin, P.M. Bennet, D.S. Reeves, The occurrence and seasonal changes in the isolation of *Listeria* spp. in shop bought food stuffs, human faeces, sewage and soil from urban sources, *Int. J. Food Microbiol.* 21 (1994) 325–334.

Mahon, B. E., A. Ponka, W. N. Hall, K. Komatsu, S. E. Dietrich, A. Siitonen, G. Cage, P. S. Hayes, M. A. Lambert-Fair, N. H. Bean, P. M Griffin, and L. Slutsker. 1997. An international outbreak of *Salmonella* infections caused by alfalfa sprouts grown from contaminated seeds. *J. Infect. Dis.* 175:876–882.

Mandrell, R. E., M. A. Apicella, R. Lindstedt, and H. Leffler. 1994. Possible interaction between animal lectins and bacterial carbohydrates. *Methods Enzymol.* 236:231-254.

Mandrell, R. E. (2011) Tracing pathogens in fruit and vegetable production chains. In *Tracing Pathogens in the Food Chain* ed. Brul, S., Fratamico, P.M. and McMeekin, T. pp. 548– 595. Cambridge: Woodhead Publishing.

Manz W., Amann R., Ludwig W., Wagner M. and Schleifer K.-H. (1992). Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions. *Syst. Appl. Microbiol.* 15: 593 - 600.

Marteau, S. A., J. Alberino, J. L. Ripoli, and M. E. Rosato. 1998. Quality of water wells in an agricultural area in the city of La Plata, Argentina. *Water Air Soil Pollut.* 106:447–462.

Martin C., Colin P., Fanjat N. and al. - Evaluation of O157 :H7 ID, a new chromogenic medium for isolation and detection of *Escherichia coli* O157 :H7 - 9th ECCMID Berlin, 1999, March 22-24.

Martin, F. R. J., A. Bootsma, D. R. Coote, B. G. Fairley, L. J. Gregorich, J. Lebedin, P. H. Milburn, B. J. Stewart, and T. W. Van der Gulik. 2000. Canada's rural water resources, p. 5–14. *In* D. R. Coote and L. J. Gregorich (ed.), The health of our water. Minister of Public Works and Government Services Canada publication 2020/E. Cat. no. A15-2020/2000E. ISBN 0-662-28489-5. Agriculture and Agri-Food Canada, Ottawa, Ontario, Canada.

Massone, H. E., D. E. Martinez, J. L. Conchi, and E. Bocanegra. 1998. Suburban areas in developing countries and their relationship to groundwater pollution: a case study of Mar del Plata, Argentina. 1998. *Environ. Manage.* 22:245–254.

Matthews, K. R. (Editor). 2006. Emerging Issues in Food Safety. Microbiology of Fresh Produce. American Society for Microbiology. ISBN: 978-1-55581-357-4

Matthysse, A. G. 1987. Characterization of nonattaching mutants of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 169:313-323.

Matthysse, A. G., K. V. Holmes, and R. H. G. Gulrlitz. 1981. Elaboration of cellulose fibrils by *Agrobacterium tumefaciens* during attachment on carrot cells. *J. Bacteriol.* 145: 583-595.

Matthysse, A. G., and S. McMahan. 2001. The effect of the *Agrobacterium tumefaciens attR* mutation on attachment and root colonization differs between legumes and other dicots. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1070-1075.

Maule, A. 2000. Survival of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157:H7 in soil, water, and on surfaces. *Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol.* 29:71S–78S.

McCarthy, T. A., N. L. Barrett, J. L. Hadler, B. Salsbury, R. T. Howard, D. W. Dingman, C. D. Brinkman, W. F. Bibb, and M. L. Cartter. 2001. Hemolytic-uremic syndrome and *Escherichia coli* O121 at a lake in Connecticut, 1999. *Pediatrics* 108:E59.

McLauchlin, J., Mitchell, R.T., Smerdon, W.J., Jewell, K., 2004. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterization for use in microbiological risk assessment of foods. *International Journal of Food Microbiology* 92, 15–33.

McMahon, M. A., and I. G. Wilson. 2001. The occurrence of enteric pathogens and *Aeromonas* species in organic vegetables. *Int. J. Food Microbiol.* 70:155–162.

Menon, A. S. 1985. *Salmonellae* and pollution indicator bacteria in municipal and food processing effluents and the Cornwallis river. *Can. J. Microbiol.* 31:598–603.

Michino, H., K. Araki, S. Minami, S. Takaya, N. Sakai, M. Miyazaki, A. Ono, and H. Yanagawa. 1999. Massive outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in school children, Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. *Am. J. Epidemiol.* 150:787–796.

Monge, R., and M. L. Arias. 1996. Presence of various pathogenic microorganisms in fresh vegetables in Costa Rica. *Arch. Latinoam. Nutr.* 46:292–294.

Moter, A., & Gobel, U. (2000). Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualisation of microorganisms. *Jurnal of Microbiological Methods* , 85-112.

Nachamkin, I. (2001) *Campylobacter jejuni*. In *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. (Eds. M. P. Doyle, L. R. Beuchat, & T. J. Montville), Washington, DC, ASM Press, pp. 179-92.

Natvig, E.E., Ingham, S.C., Ingham, B.H., Cooperband, L.R., Roper, T.R., 2002. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli* contamination of root and leaf vegetables grown in soils with incorporated bovine manure. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2737–2744.

Nicholson, F. A., S. J. Groves, and B. J. Chambers. 2005. Pathogen survival during livestock manure storage and following land application. *Bioresour. Technol.* 96:135–143.

Nygaard, K., Y. Andersson, P. Lindkvist, C. Ancker, I. Asteberg, E. Dannetun, R. Eitrem, L. Hellstrom, M. Insulander, L. Skedebant, K. Stenqvist, and J. G. Giesecke. 2001. Imported rocket salad partly responsible for increased incidence of hepatitis A cases in Sweden. *Euro. Surveill.* 6:151–153.

Nygaard, K., Lassen, J., Vold, L. and Aavitsland, P. (2004) Outbreak of Salmonella Thompson infections caused by contaminated rucola (rocket) salad – update. *Eurosurveillance Weekly* 8, <http://www.eurosurveillance.org/ew/2004/041216.asp>.

Obuobie, E., Keraita, B., Danso, G., Amoah, P., Cofie, O. O., Raschid-Sally, L. & Drechsel, P. 2006 Irrigated Urban Vegetable Production in Ghana: Characteristics Benefits and Risks. IWMI-RUAF-CPWF, Accra, Ghana, www.ruaf.org/node/1046.

Odumeru, J. A., S. J. Mitchell, D. M. Alves, J. A. Lynch, A. Yee, S. L. Wang, S. Styliadis, and J. M. Farber. 1997. Assessment of the microbiological quality of ready-to-use vegetables for healthcare food services. *J. Food Prot.* 60:954–960.

Ojanen-Reuhs, T., N. Kalkkinen, B. Westerlund-Wikstrom, J. van Doom, K. Haahtela, E. L. Nurmiaho-Lassila, K. Wengelnik, U. Bonas, and T. K. Korhonen. 1997. Characterization of the *fimA* gene encoding bundle-forming fimbriae of the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Bacteriol.* 179:1280-1290.

Oliveira M, I. Vinas, J. Usall, M. Anguera, M. Abadias. (2012) Presence and survival of *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce leaves and in soil treated with contaminated compost and irrigation water. *International Journal of Food Microbiology* 156 133–140

Ong, C., W. Moorehead, A. Ross, and J. Isaac-Renton. 1996. Studies of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in two adjacent watersheds. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2798–2805.

Ono, K., H. Tsuji, S. K. Rai, A. Yamamoto, K. Masuda, T. Endo, H. Hotta, T. Kawamura, and S. Uga. 2001. Contamination of river water by *Cryptosporidium parvum* oocysts in western Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:3832–3836.

Ortega, Y. R., C. R. Roxas, R. H. Gilmanm, N. J. Miller, L. Cabrera, C. Taquiri, and C. R. Sterling. 1997. Isolation of *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayetanensis* from vegetables collected in markets of an endemic region in Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 57: 683–686.

Pachepsky, Y., Shelton, D., McLain, J.E.T., Patel, J. and Mandrell, R.E. (2011) Irrigation waters as a source of pathogenic microorganisms in produce: a review. *Adv Agron* 113, 71–136.

Park, C. E., and G. W. Sanders. 1992. Occurrence of thermophilic campylobacters in fresh vegetables sold at farmers' outdoor markets and supermarkets. *Can. J. Microbiol.* 38:313–316.

Pasetto Falcao, D., W. Rogerio Lustri, and T. M. Bauab. 1998. Incidence of non-O1 *Vibrio cholerae* and *Aeromonas* spp. in fresh water in Araraquara, Brazil. *Curr. Microbiol.* 37:28–31.

Pavić S., Smoljanović M., Ropac D., Danja Laštre, Elizabeta Cetinić, Hadžiosmanović M., Mioković B., Lidija Kozačinski. (2005). Povrće i voće kao vehikulumi salmoneloza. *Infektološki glasnik* 25:1, 17–22 (2005)

Petković S., Gregorić E., Slepčević V., Blagojević S., Gajić B., Kljujev I., Žarković B., Đurović N., Drašković R.: Contamination of local water supply systems in suburban Belgrade (Article) *Urban Water Journal*, (2011), vol. 8 br. 2, str. 79-92

Pezzoli, L., Elson, R., Little, C., Fisher, I., Yip, H., Peters, T., Hampton, M., De Pinna, E. et al. (2007) International outbreak of *Salmonella* Senftenberg in 2007. *Eurosurveillance Weekly* 12, (accessed on 15/06/07)
<http://www.eurosurveillance.org/ew/2007/070614.asp>

Pignato S., Giammanco G., Giammanco G. – Rambach agar and SM-ID medium sensitivity for presumptive identification of *Salmonella* subspecies I-VI. – *J. Med. Microbiol.*, 1995, vol. 43 , p. 68-71.

Pingulkar, K., A. Kamat, and D. Bongiwar. 2001. Microbiological quality of fresh leafy vegetables, salad components and ready-to-eat salads: an evidence of inhibition of *Listeria monocytogenes* in tomatoes. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 52:15–23.

Plotnikova J. M., Rahme L. G., Ausubel F. M. (2000) Pathogenesis of the human opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* PA14 in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 124: 1766-1774

Quessy, S., and S. Messier. 1992. *Campylobacter* spp. and *Listeria* spp. in ring-billed gulls (*Larus delawarensis*). *J. Wildl. Dis.* 28: 525–531.

Rhodes, J. B., H. L. Smith, Jr., and J. E. Ogg. 1986. Isolation of non-O1 *Vibrio cholerae* serovars from surface waters in western Colorado. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:1216–1219.

Robertson, L. J., and B. Gjerde. 2001. Occurrence of parasites on fruit and vegetables in Norway. *J. Food. Prot.* 64:1793–1798.

Robins-Browne, R. M. (2001) *Yersinia enterocolitica*. In *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. (Eds. M. P. Doyle, L. R. Beuchat, & T. J. Montville), Washington, DC, ASM Press, pp. 383-409.

Rojas, C. M., J. H. Ham, W. L. Deng, J. J. Doyle, and A. Collmer. 2002. HecA, a member of a class of adhesins produced by diverse pathogenic bacteria, contributes to the attachment, aggregation, epidermal cell killing, and virulence phenotypes of *Erwinia chrysanthemi* EC16 on *Nicotiana clevelandii* seedlings. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:13142-13147.

Romantschuk, M. 1992. Attachment of plant pathogenic bacteria to plant surfaces. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30:225-243.

Rosef, O., G. Rettedal, and L. Lageide. 2001. Thermophilic campylobacters in surface water: a potential risk of campylobacteriosis. *Int. J. Environ. Health Res.* 11:321–327.

Rude, R. A., G. J. Jackson, J. W. Bier, T. K. Sawyer, and N. G. Risty. 1984. Survey of fresh vegetables for nematodes, amoeba, and *Salmonella*. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 67:613–615.

Rudolf, D., and M. Goss (ed.). 1993. Ontario farm groundwater survey. Prepared for Agriculture Canada under the Federal-Provincial Land Management Assistance Program, 1992. ISBN 0-662- 20879-X. Agriculture and Agri-Food Canada, Ottawa, Ontario, Canada.

Sagoo, S. K., C. L. Little, and R. T. Mitchell. 2001. The microbiological examination of ready-to-eat organic vegetables from retail establishments in the United Kingdom. *Lett. Appl. Microbiol.* 33: 434–439.

Samelis, J., J.S. Ikeda and J.N. Sofos, 2003. Evaluation of the pH-dependent, stationary-phase acid tolerance in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* DT104 induced by culturing in media with 1% glucose: A comparative study with *Escherichia coli* O157: H7. *J. Applied Microbiol.*, 95: 563-575.

Satchell F.B., P. Stephenson, W.H. Andrews, L. Estela, G. Allen, The survival of *Shigella sonnei* in shredded cabbage, *J. Food Prot.* 53 (1990) 558–562 624.

Savill, M. G., H. A. Ball, J. D. Klena, P. Scholes, R. J. Whyte, R. E. McCormik, and D. Jankovik. 2001. Enumeration of *Campylobacter* in New Zealand recreational and drinking waters. *J. Appl. Microbiol.* 91:38–46.

Scott C. A., Faruque N. I., Reschid-Sally L. (2004). Wastewater Use in Irrigated Agriculture: Management Challenges in Developing Countries. Waste Water Use in Irrigated Agriculture: Confronting The Livelihood and Environmental Realities. Edited by C.A. Scott, N.I. Faruque And L. Reschid-Sally.

Schikora, A. et al. (2008) The dark side of the salad: *Salmonella Typhimurium* overcomes the innate immune response of *Arabidopsis thaliana* and shows an endopathogenic lifestyle. *PLoS ONE* 3, e2279

Schlech W.F., P.M. Lavigne, R.A. Bostolussi, A.C. Allen, E.V. Haldane, A.J. Wort, A.W. Hightower, S.E. Johnson, S.H. King, E.S. Nicholls, C.V. Broome, Epidemic listeriosis – evidence for transmission by food, *N. Engl. J. Med.* 308 (1983) 203–206.

Semenov, A.V., Franz, E., van Overbeek, L., Termorshuizen, A.J., van Bruggen, A.H.C., 2008. Estimating the stability of *Escherichia coli* O157:H7 survival in manure amended soils with different management histories. *Environmental Microbiology* 10, 1450–1459.

Seo, K. H., and J. F. Frank. 1999. Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to lettuce leaf surface and bacterial viability in response to chlorine treatment as demonstrated by using confocal scanning laser microscopy. *Journal of Food Protection*. 62: 3-9.

Seymour, I. J., and H. Appleton. 2001. A review: foodborne viruses and fresh produce. *J. Appl. Microbiol.* 91:759–773.

Sherer, B. M., J. R. Miner, J. A. Moore, and J. C. Buckhouse. 1992. Indicator bacterial survival in stream sediments. *J. Environ. Qual.* 21:591-595.

Shuval, H., Y. Lampert, and B. Fattal. 1997. Development of a risk assessment approach for evaluating wastewater reuse standards for agriculture. *Water Sci. Technol.* 35:15–20.

Siebert S, J. Burke, J. M. Faures, K. Frenken, J. Hoogeveen, P. Döll, and F. T. Portmann (2010): Groundwater use for irrigation – a global inventory, *Hydrol. Earth Syst. Sci.*, 14, 1863–1880.

Smit, G., J. W. Kijne, and B. J. Lugtenberg. 1987. Involvement of both cellulose fibrils and a Ca^{2+} -dependent adhesin in the attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hair tips. *J. Bacteriol.* 169:4294-4301.

Smit, G., J. W. Kijne, and B. J. Lugtenberg. 1989. Roles of flagella, lipopolysaccharide, and a Ca^{2+} -dependent cell surface protein in attachment of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* to pea root hair tips. *Bacteriol.* 171:569-572.

- Smith, H. V. & Grimason, A.M. (2003) *Giardia* and *Cryptosporidium* In *The Handbook of Water and Wastewater Microbiology*. (Eds. D. Mara & N. Horan) Amsterdam, Academic Press, pp. 695-756.
- Soderstrom, A., Lindberg, A. and Andersson, Y. (2005) EHEC O157 outbreak in Sweden from locally produced lettuce, August–September 2005. *Eurosurveillance Weekly* 10, E050922.1. (<http://www.eurosurveillance.org/ew/2005/050922.asp#1>).
- Solomon, E. B. , Yaron, S., Matthews, K. R. 2002a. Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:397–400.
- Solomon, E. B., C. J. Potenski, and K. R. Matthews. 2002. Effect of irrigation method on transmission to and persistence of *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce. *J. Food Prot.* 65:673–676.
- Solomon, E.B., Pang, H-J and Matthews, K.R. (2003) Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce plants following spray irrigation with contaminated water. *J. Food Prot.* 66, 2198–2202.
- Solomon, E.B., Brandl, M., Mandrell, R.E. 2006. Behavior of human pathogens on produce. In: Matthews, K.R., editor. *Emerging Issues in Food Safety: Microbiology of Fresh Produce*. Washington, D.C.:ASM Press. p. 55-83.
- Soriano, J. M., H. Rico, J. C. Molto, and J. Manes. 2000. Assessment of the microbiological quality and wash treatments of lettuce served in university restaurants. *Int. J. Food Microbiol.* 58:123– 128.
- Stanley, K.N. and Jones, K. (2003) Cattle and sheep farms as reservoirs of *Campylobacter*. *J Appl Microbiol* 94, 104S–113S.

Stauffer F., Makristathis A., Hassl A., Nowotny S., Neudorfer W. (2001) Microbiological irrigation water quality of the Marchfeld Canal system. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 203, 445-450.

Steele, M. and Odemeru, J. (2004) Irrigation water as a source of foodborne pathogens on fruit and vegetables. *J Food Prot* 67, 2839–2849.

Stine, S. W., I. Song, C. Y. Choi, and C. P. Gerba. 2003. Effect of environmental conditions on the survival of microbial pathogens on the surface of cantaloupe, abstr. P-092, p. 125. *Abstr. 103rd Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol.* American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Stoffels M., Castellanos T., and Hartmann A. (2001). Design and application of new 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes for the *Azospirillum-Skermanella-Rhodocista*-cluster. *System. Appl. Microbiol.* 24: 83-97

Strachan, N. J., Fenlon, D. R. & Ogden, I. D. (2001) Modelling the vector pathway and infection of humans in an environmental outbreak of *Escherichia coli* O157. *FEMS Microbiology Letters*, 203, 69-73.

Sudakevitz, D., A. Imberty, and N. Gilboa-Garber. 2002. Production, properties and specificity of a new bacterial L-fucose- and D-arabinose-binding lectin of the plant aggressive pathogen *Ralstonia solanacearum*, and its comparison to related plant and microbial lectins. *Biochem.* 132:353-358.

Sudakevitz, D., N. Kostlanova, G. Blatman-Jan, E. P. Mitchell, B. Lerrer, M. Wimmerova, D. J. Katcoff, A. Imberty, and N. Gilboa-Garber. 2004. A new *Ralstonia solanacearum* high-affinity mannose-binding lectin RS-IIL structurally resembling the *Pseudomonas aeruginosa* fucose-specific lectin PA-IIL. *Mol. Microbiol.* 52:691-700.

Swaminathan, B. (2001) *Listeria monocytogenes*. In *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. (Eds. M. P. Doyle, L. R. Beuchat, & T. J. Montville), Washington, DC, ASM Press, pp. 383-409.

Swart, S., B. J. Lugtenberg, G. Smit, and J. W. Kijne. 1994. Rhicadhesin-mediated attachment and virulence of *Agrobacterium tumefaciens chvB* mutant can be restored by growth in a highly osmotic medium. *Bacteriol.* 176:3816-3819.

Szabo, E. A., K. J. Scurrah, and J. M. Burrows. 2000. Survey for psychrotrophic bacterial pathogens in minimally processed lettuce. *Lett. Appl. Microbiol.* 30:456-460.

Taghavi S, Barac T, Greenberg B, Borremans B, Vangronsveld J, van der Lelie D. Horizontal gene transfer to endogenous endophytic bacteria from poplar improves phytoremediation of toluene. *Appl Environ Microb.* 2005;71:8500-8505.

Takayanagui, O. M., L. H. Febrionio, A. M. Bergamini, M. H. Okino, A. A. Silva, R. Santiago, D. M. Capuano, M. A. Oliveira, and A. M. Takayanagui. 2000. Monitoring of lettuce crops of Ribeirao Preto, SP, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 33:169-174.

Takeuchi, K. and J. F. Frank. 2001. Quantitative determination of the role of lettuce leaf structures in protecting *Escherichia coli* O157:H7 from chlorine disinfection. *J. Food Prot.* 64:147-151.

Takkinen, J., Nakari, U-M., Johansson, T., Niskanen, T., Siitonen, A. and Kuusi, M. (2005) A nationwide outbreak of multiresistant *Salmonella* Typhimurium var. Copenhagen DT104B infection in Finland due to contaminated lettuce from Spain, May 2005. *Eurosurveillance Weekly* 10, (accessed on 16/01/07).

<http://www.eurosurveillance.org/ew/2005/050630.asp>

Tamminga, S. K., R. R. Beumer, and E. H. Kampelmacher. 1978. The hygienic quality of vegetables grown in or imported into The Netherlands: a tentative study. *J. Hyg. (Lond.)* 80:143-154.

- Taormina, P. J., L. R. Beuchat, and L. Slutsker. 1999. Infections associated with eating seed sprouts: an international concern. *Emerg. Infect. Dis.* 5:626–634.
- Teoh, Y. L., K. T. Goh, K. S. Neo, and M. Yeo. 1997. A nationwide outbreak of coconut-associated paratyphoid A fever in Singapore. *Ann. Acad. Med. Singapore* 26:544–548.
- Thomson, C. J., M. V. Jesudason, V. Balaji, B. Malathi, U. Mukundan, and G. B. Amyes. 1998. The prevalence of *Vibrio* spp. in drinking water and environmental samples in Vellore South India. *Epidemiol. Infect.* 121:67–76.
- Thunberg, R. L., T. T. Tran, R. W. Bennett, R. N. Matthews, and N. Belay. 2002. Microbial evaluation of selected fresh produce obtained at retail markets. *J. Food Prot.* 65:677–682.
- Tyrell, S.F., Knox, J.W. and Weatherhead, E.K. (2006) Microbiological water quality requirements for salad irrigation in the United Kingdom. *J Food Prot* 69, 2029–2035.
- Tyler H. L., Triplett E. W. (2008) Plants as a Habitat for Beneficial and/or Human Pathogenic Bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 46: 53-73.
- US FDA (2009) Guidance for Industry: Guide to Minimize Microbial Food Safety Hazards of Leafy Greens; Draft Guidance. Available at: <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/ProductSpecificInformation/FruitsVegetablesJuices/FDAProduceSafetyActivities/ucm174086.htm>.
- Vahidy R., Isolation of *Listeria monocytogenes* from fresh fruits and vegetables, Abstract, *HortScience* 27 (1992) 628–628.
- Vasickova, P., Dvorska, L., Lorencova, A. & Pavlik, I.: (2005) Viruses as a cause of foodborne diseases: a review of the literature. *Vet Med-Czech*, 50, 89-104.

Venkateswaren, K., C. Kiiyukia, M. Takaki, H. Nakano, H. Matsuda, H. Kawakami, and H. Hashimoto. 1989. Characterization of toxigenic *Vibrios* isolated from the freshwater environment of Hiroshima, Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:2613–2618.

Vesper, S.J. 1987. Production of pili (fimbriae) by *Pseudomonas fluorescens* and correlation with attachment to corn roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:1397-1405.

Virto I, P. Bescansa, M.J. Imaz, and A. Enrique (2006) Soil quality under food-processing wastewater irrigation in semi-arid land, northern Spain: Aggregation and organic matter fractions, *Journal of Soil and Water Conservation*, 61. 6, 398-407

Viswanathan, P., and R. Kaur. 2001. Prevalence and growth of pathogens on salad vegetables, fruit and sprouts. *Int. J. Environ. Health* 203:205–213.

Wachtel, M. R., L. C. Whitehand, and R. E. Mandrell. 2002a. Association of *Escherichia coli* O157:H7 with preharvest leaf lettuce upon exposure to contaminated irrigation water. *J. Food Prot.* 65: 18–25.

Wachtel, M. R., L. C. Whitehand, and R. E. Mandrell. 2002b. Prevalence of *Escherichia coli* associated with a cabbage crop inadvertently irrigated with partially treated sewage wastewater. *J. Food Prot.* 65:471–475.

Wagner M, Schmid M, Juretschko S, Trebesius K-H, Bubert A, Goebel W & Schleifer K-H (1998) In situ detection of a virulence factor mRNA and 16S rRNA in *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol Lett* 160: 159–168.

Wallace, J. S., T. Cheasty, and K. Jones. 1997. Isolation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 from wild birds. *J. Appl. Microbiol.* 82:399–404.

Wallis, P. M., S. L. Erlandsen, J. L. Isaac-Renton, M. E. Olson, W. J. Robertson, and H. van Keulen. 1996. Prevalence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts and characterization of *Giardia* spp. isolated from drinking water in Canada. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2789–2797.

Wang, G., and M. P. Doyle. 1998. Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in water. *J. Food Prot.* 61:662–667.

Wang, G., R. Zhao, and M. P. Doyle. 1996. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2567–2570.

Warriner, K., Ibrahim, F., Dickinson, M., Wright, C., Waites, W.M., 2003a. Interaction of *Escherichia coli* with growing salad spinach plants. *J. Food Prot.* 66, 1790–1797.

Warriner, K., S. Spahiolas, M. Dickinson, C. Wright, and W. M. Waites. 2003b. Internalization of bioluminescent *Escherichia coli* and *Salmonella* Montevideo in growing bean sprouts. *J. Appl. Microbiol.* 95:719-727.

Watanabe, Y., K. Ozasa, J. H. Mermin, P. M. Griffin, K. Masuda, S. Imashuka, and T. Sawada. 1999. Factory outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in Japan. *Emerg Infect. Dis.* 5:424–428.

Westcot, D. W. 1997. Quality control of wastewater for irrigated crop production. Water report 10. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. Available at: <http://www.fao.org/docrep/W5367E/W5367E00.htm>. Accessed 13 June 2004.

Williamson, D. A. 2001. Manitoba water quality objectives, standards, and guidelines. Technical draft. 1 February 2001. Manitoba Conservation, Water Quality Management Section. Available at: <http://www.gov.mb.ca/conservation/watres/mwqsogp2002.pdf>. Accessed 13 June 2004.

Xiao, L., A. Singh, J. Limor, T. K. Graczyk, S. Gradus, and A. Lal. 2001. Molecular characterization of *Cryptosporidium* oocysts in samples of raw surface water and wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1097–1101.

Yu, K., M. C. Newman, D. D. Archbold, and T. R. Hamilton-Kemp. 2001. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 on strawberry fruit and reduction of the pathogen population by chemical agents. *J. Food Prot.* 64:1334–1340.

Zepeda-Lopez, H., M. Ortega-Rodriguez, E. I. Quionez-Ramirez, and C. Vazquez-Salinas. 1995. Isolation of *Escherichia coli* O157: H7 from vegetables. Annual meeting of the American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Zogaj, X., W. Bokranz, M. Nimtz, and U. Romling. 2003. Production of cellulose and curli fimbriae by members of the family *Enterobacteriaceae* isolated from the human gastrointestinal tract. *Infect. Immun.* 71:4151-4158.

Zogaj, X., M. Nimtz, M. Rohde, W. Bokranz, and U. Romling. 2001. The multicellular morphotypes of *Salmonella Typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol. Microbiol.* 39:1452-1463.

<http://www.fda.gov/>

Biografija autora

Mr Igor S. Kljujev je rođen 28. 02. 1968. godine u Nikšiću, opština Nikšić. Srednju školu prirodno-matematičkog smera završio je u Nikšiću 1988. godine. Na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu, diplomirao je 1997. godine. Iste godine upisao je poslediplomske studije na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu, grupa Mikrobiologija. Magistarsku tezu pod naslovom: "Bakterijske populacije u rizosferi paradajza (*Lycopersicon esculentum* Mill.)" odbranio je 2006. godine na Poljoprivrednom fakultetu, Univerziteta u Beogradu. Zaposlen je na Poljoprivrednom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, na Katedri za ekološku mikrobiologiju. Za asistenta za predmet *Mikrobiologija* izabran je 2006. godine.

Igor Kljujev je bio učesnik na tri međunarodna projekta:

1. *WaterWeb - Water Resource Strategies and Drought Alleviation in Western Balkan Agriculture.*
2. *SAFIR - Safe and High Quality Food Production Using Low Quality Waters and Improved Irrigation Systems and Management.*
3. *CROPWAT - Centre for Sustainable Crop -Water management*

Tokom 2007., 2008. i 2009. godine, Mr Igor Kljujev je proveo mesec i po dana na stručnom usavršavanju na University for Life Sciences, Danska, zatim dva i po meseca na University of Reading, Engleska i mesec i po dana u National Research Center for Environment and Health, Nemačka.

Mr Igor Kljujev je bio angažovan na nacionalnim projektima Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj i to:

1. Multidisciplinarni pristup upravljanja vodom za potrebe proizvodnje zdravstveno-bezbedne hrane i ublažavanja efekta suše u poljoprivredi(20025).
2. Biodegradacija specifičnog agroindustrijskog i komunalnog otpada i kvalitet životne sredine(20104).

Mr Igor Kljujev učestvuje u realizaciji nastave na osnovnim akademskim studijama iz predmeta Osnovi Mikrobiologije zemljišta, Hemija i Mikrobiologija voda, Mikrobiologija zemljišta.

Прилог 1.

Изјава о ауторству електронске верзије
докторског рада

Потписани

Игор С. Кљујев

Број уписа

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

Контаминација биљака патогеним бактеријама из воде за наводњавање

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

У Београду, 02.07.2012

Потпис докторанта

Igor Klujev

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије
докторског рада**

Име и презиме аутора

Игор С. Кљујев

Број уписа

Студијски програм

Еколошка микробиологија

Наслов рада

Контаминација биљака патогеним бактеријама из воде за наводњавање

Ментор

Др Вера Раичевић, редовни професор, Пољопривредни факултет,
Универзитет у Београду

Потписани Игор С. Кљујев

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао за објављивање на порталу Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране докторског рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду, 02. 07. 2012

Потпис докторанта

Игор Кљујев

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Контаминација биљака патогеним бактеријама из воде за наводњавање

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Београду, 02. 07. 2012.

Потпис докторанта

Јован Ђукић