

## DA LI *Pseudomonas aeruginosa* PERZISTIRA U BILJKAMA?

Slobodan Vlajić<sup>1</sup>, Vesna Lalošević<sup>1</sup>, Simonida Đurić<sup>1</sup>, Mira Mihajlović–  
Ukropina<sup>2</sup>, Zora Jelesić<sup>2</sup>, Ana Takač<sup>3</sup>

**Izvod:** Mogućnost perzistencije patogenih bakterija u biljkama, predstavlja veliku opasnost po zdravlje ljudi, pogotovo kod biljaka koje se koriste u ishrani bez termičke obrade. Cilj istraživanja bio je da se utvrdi da li postoji mogućnost perzistencije humanog izolata *Pseudomonas aeruginosa* u krastavcu, kupusu, paprici i paradajzu. *Pseudomonas aeruginosa* izolovan je iz svih 12 biljaka krastavca i kupusa, iz 9 paradajza i 7 paprika. Na osnovu rezultata rada, u navedenom povrću postoji mogućnost perzistencije *P. aeruginosa*.

**Gljučne reči:** *Pseudomonas aeruginosa*, perzistencija, biljka, izvor infekcije

### Uvod

*Pseudomonas aeruginosa* se nalazi u zemljištu, vodi i na biljnom materijalu naseljavajući ga epifitski kao saprofit (Arsenijević, 1997) i jedna je od najprisutnijih gram–negativnih oportunističkih humanih patogena (Britigan i sar., 1997). Izaziva alimentarne infekcije i smatra se jednim od glavnih uzročnika intrahospitalnih infekcija kod imunokompromitovanih pacijenata (Bodey i sar., 1983). *Pseudomonas aeruginosa* je zabeležen i kao uzročnik patoloških promena na salati, duvanu, bananama, luku i drugim biljkama (Lebeda i sar., 1984). Sposobnost nekih sojeva *P. aeruginosa* da izaziva infekcije ljudi, životinja i biljka zasniva se na velikom broju faktora virulencije, mogućnošću stvaranja biofilma (Costerton i sar., 1999) i različitim mehanizmima za razvoj rezistencije na antimikrobne lekove (Chuanchuen i sar., 2001).

Utvrđivanje primarnog izvora infekcije je veoma važan korak u izučavanju epidemiologije uzročnika nekog oboljenja. U epidemiološkim studijama zabeležena je pojava pseudotuberkuloze, jersinioze, listerioze i crevnih infekcija pri upotrebi sirovog povrća, voća i jela od njih (Đukić i sar., 2011). Istraživanja Kominosa i sar. (1972), ukazuju na postojanje visoke kontaminacije ovom bakterijom izolovanom iz sirovog povrća pripremljenog u bolničkoj kuhinji iz čega se može zaključiti da je povrće primarni izvor infekcije ovom bakterijom. Značajno smanjenje pojave alimentarnih infekcija pseudomonasom u bolnicama usledilo je nakon eliminacije svežeg povrća iz ishrane pacijenata (Green i sar., 1974). Stoga konzumiranje povrća koje je kontaminirano ovom bakterijom može ozbiljno uticati na zdravlje ljudi.

---

<sup>1</sup> Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Trg Dositeja Obradovića 8, Novi Sad, Srbija (svlajic89@gmail.com)

<sup>2</sup> Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet, Hajduk Veljkova 3, Novi Sad, Srbija (mmukropina@gmail.com)

<sup>3</sup> Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Nemanjina 6, Zemun, Srbija (ancitakac@gmail.com)

Cilj rada je bio eksperimentalna provera mogućnosti perzistencije humanog izolata *P. aeruginosa* u biljkama koje se mogu termički neobrađene koristiti u ljudskoj ishrani.

### Materijal i metode rada

Ispitivanjem su obuhvaćene četiri biljne povrtarske vrste: krastavac (*Cucumis sativus* L.), kupus (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.), paradajz (*Lycopersicon esculentum* Mill.) i paprika (*Capsicum annum* L.), sortno seme Instituta za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu. Upotrebljeni soj *P. aeruginosa* izolovan je iz humanog brisa guše i identifikovan u Centru za mikrobiologiju Instituta za javno zdravlje Vojvodine. Ogled je postavljen u Laboratorijama za mikrobiologiju i parazitologiju Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu.

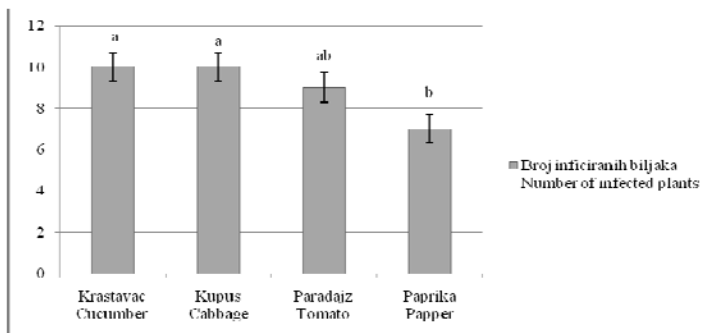
Za izvođenje ogleda upotrebljeni su setveni kontejneri sa 56 mesta, koji su popunjeni sterilnim supstratom (autoklaviran 45 min. na 121°C pri pritisku od 1,2 atm). Ogled je postavljen u tri ponavljanja sa po 4 biljke. Pre setve seme je dezinfikovano potapanjem 15 min. u 75% alkohol, a zatim u sterilnu destilovanu vodu 10 min. i ispirano 5 min. destilovanom vodom. Seme svih biljnih vrsta je posejano 16.12.2013. god. a po pojavi kotiledonih listova (kupus i krastavac 10 dana, paradajz 19 dana, paprika 25 dana od setve) vršeno je ubrizgavanje bakterijske suspenzije u zonu korenovog sistema biljaka. Za pripremanje bakterijske suspenzije u infuzionom rastvoru koncentracije  $6 \times 10^8$  ćel  $\text{ml}^{-1}$  (2 skala po McFarland (Klement i sar., 1990) upotrebljene su prekonocne kulture. Količina bakterijske suspenzije iznosila je 2 ml, a ubrizgavanje je vršeno medicinskim špricem i iglom. Biljke su gajene u fitotronu sa redovnim zalivanjem sterilnom vodom.

Nakon 15 dana od ubrizgavanja suspenzije u zonu korenovog sistema, izvršeno je odvajanje nadzemnog dela biljaka bez dodira supstrata. Odstranjeni biljni materijal, maceriran je u avanu sa 1 ml sterilne destilovane vode, i potom zasejan na hranljivi agar. Primoizolacija je vršena 24 sata na 37°C. Osetljivost na antimikrobne lekove urađena je sa primarnim humanim izolatom i izolatima iz macerata biljaka standardnom disk-difuzionom tehnikom na sledeće antibiotike: piperacilin/tazobaktam, ceftazidim, cefepim, imipenem, meropenem, doripenem, gentamicin, amikacin i ciprofloksacin.

Obrada podataka izvršena je pomoću Statistica 10 softvera, primenom Tukey HSD testa, na nivou značajnosti  $p=0,05$ .

### Rezultati istraživanja i diskusija

Ovo istraživanje ukazuje da bakterije prodiru u nadzemne delove biljaka preko korenovog sistema, a da pri tom nisu uočene patološke promene na njima. Izolacijom je utvrđeno prisustvo *P. aeruginosa* kod svih 12 biljaka krastavaca i kupusa (100%), kod 9 biljaka paradajza (75%) a kod 7 paprika (58,3%) (Graf. 1). Sojevi izolovani iz biljaka, menjali su boju podloge u zelenkasto i imali karakterističan miris lipe. Analizom broja inficiranih biljaka, uočava se statistički značajna razlika ( $p=0,05$ ) u inficiranosti između paprike i ostalih ispitivanih biljnih kultura (Graf. 1).



Graf. 1: Broj inficiranih biljaka po kulturama  
 Graph. 1: Number of infected plants per culture

Izolati poreklom iz inokuisanih biljaka, osetljivi su na sve upotrebljene antibiotike, kao i ubrizgani humani izolat. Na osnovu ove činjenice može se smatrati da izolati iz biljaka vode poreklo od ubrizganog humanog izolata i da se isti bakterijski soj nalazi u nadzemnim vegetativnim delovima biljaka.

Dijapazon bakterija koje su sposobne da žive kako u biljkama, tako i u organizmu čoveka, dosta je širok i raznolik (Đukić i sar., 2011). Mogućnost zaražavanja ljudi, životinja i biljaka od strane iste vrste bakterija, govori o njenoj polipatogenosti. Primer za to su pojedini sojevi *P. aeruginosa* kao što je soj UCBPP-PA14 (PA14) koji je uzročnik oboljenja kod biljaka (Rahme i sar., 1995), insekata (Jander i sar., 2000), miševa (Rahme i sar., 1995), i nematoda (Mahajan-Miklos i sar., 1999). Mogućnost da bakterije poseduju sposobnost održavanja u biljkama, otvara pitanje da li biljke mogu biti rezervoari humanih i animalnih patogena? Ova činjenica je veoma značajna, pogotovo kod povrtarskih vrsta koje se koriste bez prethodne termičke obrade, te stoga mogu biti direktan izvor alimentarnih infekcija. Prenosjenje patogenih bakterija do biljaka moguće je upotrebom kontaminirane vode, neadekvatnog komposta, svežeg stajnjaka, osoke i izmetom divljih životinja (Natvig i sar., 2002; Santamaria i Toranzos, 2003; Tyrrel i sar., 2006).

Smatra se da dva faktora virulencije *P. aeruginosa*, egzotoksin A i fosfolipaza C, utiču na pojavu i sistemsko širenje infekcije kod sisara i *Arabidopsis*-a (Rahme i sar., 1995). Mišljenja su da trehaloza ima ključnu ulogu kao faktor virulencije tokom infekcije lišća biljaka (Djonović i sar., 2013). Pretpostavlja se da *P. aeruginosa* parazitira u parenhimskom tkivu biljaka (Plotnikova i sar., 2000).

### Zaključak

Na osnovu izvedenog ogleada može se zaključiti da *P. aeruginosa* ima sposobnost perzistencije u krastavcu, kupusu, paradajzu i paprici. Svi izolati iz inokuisanih biljaka vode poreklo od ubrizganog humanog izolata, što ukazuje na mogućnost migracije bakterije iz korena u nadzemni vegetativni deo. Konzumiranje zaraženih biljaka može da bude značajan put inficiranja ljudi i domaćih životinja sa *P. aeruginosa*.

## Napomena

Istraživanja su deo projekta pod nazivom: "Kontrola zdravlja životinja u lancu proizvodnje zdravstveno bezbedne hrane" br. 1144512230–201104, koji finansira Pokrajinski sekretarijat za nauku i tehnoloski razvoj AP Vojvodine.

## Literatura

- Arsenijević M. (1997). Bakterioze biljaka. S print, Novi Sad. Treće izmenjeno i dopunjeno izdanje, 299–301 str.
- Bodey GP., Bolivar R., Fainstein V., Jadega L. (1983). Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Reviews of Infectious Diseases 5: 279–313.
- Britigan BE, Rasmussen GT, Cox CD (1997). Augmentation of oxidant injury to human pulmonary epithelial cells by the *Pseudomonas aeruginosa* siderophore pyochelin. Infection and Immunity, 63, 1071–1076.
- Chuanchuen R., Beinlich K., Hoang TT., Becher A., Karkoff-Schweizer RR., Schweizer HP. (2001). Cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by multidrug efflux pumps: exposure of a susceptible mutant strain to triclosan selects nfxB mutants over expressing MexCD-OprJ. Antimicrob Agents Chemother, 45, 428–432.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science, 284, 1318–1322.
- Djonović S., Urbach JM., Drenkard E., Bush J., Feinbaum R. et al. (2013). Trehalose Biosynthesis Promotes *Pseudomonas aeruginosa* Pathogenicity in Plants. PLoS Pathog 9(3): e1003217. doi:10.1371/journal.ppat.1003217.
- Đukić D., Jemcević V., Mandić G. (2011). Sanitarna mikrobiologija zemljišta. Agronomski fakultet Čačak, 1–502.
- Green SK., Schroth MN., Cho JJ., Kominos SD., Vitanza-Jack VB. (1974). Agricultural Plants and Soil as a Reservoir for *Pseudomonas aeruginosa*. Applied microbiology, 28 (6), 987–991.
- Jander G., Rahme LG., Ausubel FM. (2000). Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. Journal of Bacteriology, 182, 3843–3845.
- Klement Z., Rudolph K., Sands DC. (1990). Methods in Phytobacteriology (Eds). Acadèmiai Kiadó, Budapest, Hungary.
- Kominos SD., Copeland CE., Grosiak B., Postic B. (1972). Introduction of *Pseudomonas aeruginosa* into a hospital via vegetables. Applied Microbiology, 24, 567–570.
- Lebeda A., Kudela V., Jedličkov Z. (1984). Pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* for plant and animals. Acta Phytopatologica Acad. Sci. Hung., 19 (3-4), 271–284.
- Mahajan-Miklos S., Tan MW., Rahme LG., Ausubel FM. (1999). Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*–*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. Cell, 96, 47–56.
- Natvig EE., Ingham SC., Ingham BH, Cooperband LR., Roper TR. (2002). *Salmonella enterica* serovar typhimurium and *Escherichia coli* contamination of root and leaf

- vegetables grown in soils with incorporated bovine manure. Applied Environmental Microbiology, 68 (6), 2737–2744.
- Plotnikova JM., Rahme LG., Ausubel FM. (2000). Pathogenesis of the Human Opportunistic Pathogen *Pseudomonas aeruginosa* PA14 in Arabidopsis. Plant Physiology, 124, 1766–1774.
- Rahme LG., Stevens EJ., Wolfort SF., Shao J., Tompkins RG., Ausubel FM. (1995). Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. Science, 268, 1899–1902.
- Santamaria J., Toranzos GA. (2003). Enteric pathogens and soil: a short review. International Microbiology, 6 (1), 5–9.
- Tyrrel SF., Knox JW., Weatherhead EK. (2006). Microbiological water quality requirements for salad irrigation in the United Kingdom. Journal of Food Protection, 69, (8), 2029–2035.

### DID *Pseudomonas aeruginosa* PERSISTS IN PLANTS?

*Slobodan Vlajić<sup>1</sup>, Vesna Lalošević<sup>1</sup>, Simonida Đurić<sup>1</sup>, Mira Mihajlović-Ukropina<sup>2</sup>, Zora Jelesić<sup>2</sup>, Ana Takač<sup>3</sup>*

#### Abstract

Persistence of pathogenic bacteria in plants, is a major threat to human health, especially in plants that are used in food with no heat treatment. The aim of this study was to determine whether there is a possibility of persistence of human isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in cucumbers, cabbage, peppers and tomatoes. In cucumber and cabbage *P. aeruginosa* was isolated from all 12 plants, tomato by 9 and 7 of pepper plants. Based on the results, there is the possibility of persistence *P. aeruginosa* in the above vegetables.

**Key words:** *Pseudomonas aeruginosa*, persistence, plants, source infection

---

<sup>1</sup> University of Novi Sad, Faculty of Agriculture, Trg Dositeja Obradovića 8, Novi Sad, Serbia (svlajic89@gmail.com)

<sup>2</sup> University of Novi Sad, Medical Faculty, Hajduk Veljkova 3, Novi Sad, Serbia (mmukropina@gmail.com)

<sup>3</sup> University of Belgrade, Faculty of Agriculture, Nemanjina 6, Zemun, Serbia (ancitakac@gmail.com)