

האם מספוא מושקה במי קולחים מהווה מקור לעמידות לאנטיביוטיקה במשק החי?

**Is treated wastewater-irrigated forage a source of antibiotic resistance in
?livestock**

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות – "חקלאות אקולוגית וגדולי-שדה" (02-4682)
מומן כתכנית התכנות לשנה אחת

אדי סיטרין, חוקר בתקן, המכון למדעי הקרקע, המים והסביבה מנהל המחקר החקלאי, בית דגן
צבי וינברג, חוקר בתקן, המחלקה לחקר איכות מזון ובטיחות, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן
שלמה סלע, חוקר בתקן, המכון למדעי הקרקע, המים והסביבה מנהל המחקר החקלאי, בית דגן

מרץ 2015

אדר התשע"ה

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא


_____ חתימת החוקר *

רשימת פרסומים

1. J. Kraut-Cohen, V. Tripathi, Y., J. Gatica, Chen, V., S. Sela, Z.G. Weinberg and E. Cytryn. Comprehensive assessment of microbial communities in industrial silage facilities. *In preparation*
2. J. Kraut-Cohen, Y. Chen, V. Volchinski, I. Dromi, S. Sela, Z.G. Weinberg and E. Cytryn. Is silage a potential driver of antibiotic resistance in cattle? *In preparation*

1.....	דף שער.....
2.....	תוכן עניינים.....
3.....	תקציר.....
4.....	מבוא.....
7.....	פירוט עיקרי הניסויים.....
14.....	דיון.....
15.....	פירוט מלא של הפרסומים המדעיים.....
16.....	ביבליוגרפיה.....
18.....	טופס סיכום עם שאלות מנחות.....

תקציר

הימצאות חיידקים בעלי עמידות לאנטיביוטיקה בשרשרת המזון ובמערכת העיכול של בני אדם ובעלי חיים עלולה להוות מקור למעבר גנים לעמידות לחיידקים פתוגניים לאדם ולבעלי החיים. התפתחות עמידות לאנטיביוטיקה מהווה סכנה לבריאות הציבור בשל העדר טיפולים אלטרנטיביים כנגד פתוגנים, בייחוד כשמדובר בזנים בעלי עמידות למספר אנטיביוטיקות שונות בו זמנית מצב המכונה multidrug resistance (MDR). מחקרים רבים בעולם בחנו את רמות העמידות לאנטיביוטיקה של חיידקים בזבלי בעלי חיים ובבשר כתוצאה ממתן תרכובות אנטיביוטיות כמשרני גדילה במשק החי. למרות שמחקרים רבים מוכיחים שזבלי על קשר בין שימוש בתרכובות אלה ושכיחות העמידות לאנטיביוטיקה מחקרים רבים אחרים מוכיחים שזבלי בע"ח מעושרים בחיידקים עמידים לאנטיביוטיקה גם בהעדר טיפול אנטיביוטי. ממצאים ראשוניים שהתקבלו במעבדתו של פרופ' צבי ויינברג הצביעו על כך שתחמיצים המשמשים למאכל בהמות מכילים רבות גבוהות של חיידקים עמידים לאנטיביוטיקה. בשל כך, הנחת העבודה של מחקר זו הייתה שתחמיצים יכולים לשמש כמקור לעמידות לאנטיביוטיקה אשר עוברת דרך הבהמות לשרשרת המזון ולסביבה. לעיתים קרובות מספוא המשמש להכנת תחמיץ מושקה בהמטרה במי קולחים באיכות נמוכה. לכן, אחת השאלות של מחקר זו הייתה שהקולחים מהווים מקור לעמידות בתחמיצים. במרכזי מזון מסחריים, באזורי השוליים ישנה חדירה של אוויר אשר גורם לעליה משמעותי ברמת החומציות ו"קלקול" של התחמיץ. הנחה נוספת של המחקר הייתה שמוקדים אלה יכולים גם הם להוות מקור לחיידקים עמידים לאנטיביוטיקה. מטרת המחקר הזו היו (א) לבחון את הרכב האוכלוסיות המיקרוביאליות (המיקרוביום) של תחמיצים שהוכנו מגידולי חורף וקיץ באזורים "שמורים" ו"מקולקלים" של בורות תחמיץ מסחריים כתלות בתכונות הפיזיו-כימיות של התחמיצים; ו(ב) לבחון את רמת העמידות לאנטיביוטיקה בתחמיצים במוקדים אלה עם דגש על חיידקי MDR בעלי פוטנציאל אפידמיולוגי מוגבר.

במהלך המחקר בחנו את הרכב האוכלוסיות המיקרוביאליות ואת רמת העמידות לאנטיביוטיקה בשמונה פרופילים שונים משלושה מרכזים מזון מסחריים (באר טוביה, משואות יצחק ונצר סירני). בין הפרופילים השונים היו תחמיצים אשר הוכנו מגידולי קיץ וגידולי חורף. נלקחו דוגמאות מהמרכז ומהקיר של בור התחמיץ (אזורים "שמורים" בעלי רמות גבוהות של חומצה לקטית ומעט קלקול) ומהכתף של בור התחמיץ (השוליים, המאופיינים בערכי pH ניטרליים ו"קלקול" רב). כדי לבחון את מטרה (א) יישמו שיטות מולקולריות מתקדמות (ללא תלות בבידוד פיזי) על מנת לקבל תמונה רחבה של הרכב החיידקים בתחמיצים. בכל דוגמא בחנו כ- 30000 רצפי של גן ה-16S rRNA, ובעזרת תוכנות ביואינפורמטיות הגדרנו את ההרכב המיקרוביאלי של כל דוגמא. האזורים ה"שמורים" (שנלקחו ממרכז המאגר) מכל הפרופילים שנבחנו, הכילו רק חיידקים גרם חיוביים. הייתה דומיננטיות מוחלטת של אוכלוסיות *Lactobacillus* אשר לעיתים היוו מעל 95% מסך החיידקים בדוגמא. שאר החיידקים בדוגמאות אלה היו גם הם חיידקי תסיסה - *Sporolactobacillus*, *Weissella*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus*. האזורים ה"מקולקלים" התאפיינו במעט מאוד חיידקי *Lactobacillus* (לעיתים פחות מ-1%) וברמות שונות ומגוון גבוה הרבה יותר מאשר האזורים ה"שמורים". נצפו רמות יחסית גבוהות של חיידקים גרם שליליים, כולל

Enterobacteriaceae ששכיחותם השתנה באופן מהותי בפרופילים השונים. בניגוד למצופה, לא היה קשר ברור בין תחמיצים שהוכנו מגידולי בעל לעומת כאלה שהושקו במי קולחים ולא היה קשר ברור בין הרכב האוכלוסיות המיקרוביאליות למרכזי המזון השונים. אולם הייתה מגמה שבה אזורים "מקולקלים" היו מעושרים בחיידקי גרם חיובים בעונות האביב והקיץ וייתכן שעובדה זו נובעת מהיכולת של חיידקים יוצרי נבגים לשרוד בטמפרטורות גבוהות. כדי לבחון את מטרה (ב), בחנו את רמת העמידות של כ-400 תבדידים ממשפחות ה- *Lactobacillus* ו- *Enterobacteriaceae* כנגד שבעה אנטיביוטיקות שונות, בתחמיצים שהוכנו מגידולי בעל ותחמיצים שהוכנו מגידולים מושקים במי קולחים. באופן מפתיע, כמעט כל ה- *Lactobacillus* (98%) היו עמידים לכל שבעת האנטיביוטיקה שנבחנו. לעומת זאת ה- *Enterobacteriaceae* היו עמידים ל-1-5 מהאנטיביוטיקות שנבחנו. למרות שרמת MDR הייתה גבוהה בכל התבדידים שנבחנו, תבדידים מתחמיצי תירס (מושקים במי קולחים) התאפיינו בטווח עמידות רחבה ותר מאשר בתחמיצי חיטה (גידול חורף), דבר אשר מצביע על כך שהשקיה במי קולחים עלולה לתרום לרמת ה-MDR בתחמיצים. על מנת לבחון האם העמידות הנצפית נובעת מעמידות "אינטרינסית" או שהיא בעלת יכולת לעבור במעבר אופקי, נבדקה הנוכחות של חמישה גנים המקודדים לבטה לקטמאזות (אנזימים המפרקים אנטיביוטיקות ממשפחת הפנצלינים). הן ב- *Lactobacillus* והם ב- *Enterobacteriaceae* מצאנו נוכחות של גנים מהמשפחות blaTEM, blaSHV, blaCTX-M, דבר המצביע על פוטנציאל מעבר של עמידות בין חיידקי התחמיץ, ואולי גם על פוטנציאל העברה לחיידקים בסביבות אחרות (בחיות המשק ובסביבה).

מחקר זה מומן כמחקר התכנות לשנה אחת על מנת לבחון באופן ממוקד את הפוטנציאל של התחמיצים להוות מקור עמידות לאנטיביוטיקה במשק החי. העובדה שמצאנו רמות גבוהות במיוחד של חיידקים עמידים לאנטיביוטיקה בתחמיצים והנוכחות של חיידקים בעלי פוטנציאל פתוגני, אכן מצביעים על כך שתחמיצים עלולים להוות מקור לעמידות לאנטיביוטיקה בשרשרת המזון. לכן, אנו רואים במחקר פרלימינארי זה שלב ראשוני בהבנת הקשר בין שרשרת המזון לעמידות לאנטיביוטיקה במשק החי, ומאמינים שהוא יהווה בסיס למחקרים מקיפים בנושא זה בעתיד אשר ישלבו גורמים במשרד הבריאות ובשירותים הווטרינריים.

מבוא

בעשורים האחרונים חלה עלייה מתמדת בעמידות של חיידקים גורמי מחלה לאנטיביוטיקה, המיוחסת לשימוש מופרז באנטיביוטיקה ברפואה ובחקלאות (13). עלייה זו מהווה איום חמור על הרפואה המודרנית וכתוצאה מכך הוקמו וועדות לאומיות ובין לאומיות שונות, כולל ע"י ארגון הבריאות העולמי, האיחוד האירופי ורשויות הבריאות של ארה"ב (9). מחלות הנגרמות ע"י חיידקים עמידים קשות לריפוי, מאריכות את זמן המחלה ועלולות לגרום למוות. עלייה בעמידות מקשה במיוחד על הטיפול הרפואי בחולים לאחר ניתוח, חולים אונקולוגיים ומאושפזים בטיפול נמרץ (8, 14). בעולם מדווחים מידי שנה כ-

440,000 מקרים חדשים של מחלת השחפת הנגרמת ע"י חיידקי שחפת עמידים למספר סוגי אנטיביוטיקה וגורמים 150,000 מקרי מוות בשנה (21). עלייה בעמידות של חיידקים מתבטאת, בין היתר, בהופעה של זנים העמידים ליותר מאנטיביוטיקה אחת ומכונים (MDR ; multi-drug-resistant). תופעה זאת מתאפשרת במידה רבה הודות להעברה אופקית של גנים לעמידות, אשר יכולים לנוע בין קבוצות טקסונומיות שונות ולהיקלט על ידי חיידקים פתוגנים וכך להגביר את טווח עמידותם (5)- ראה למטה). עמידות לאנטיביוטיקה בחיידקים מתפתחת ע"י שלושה מנגנונים עיקריים (13). (א) הפעלת מנגנונים אנזימטיים כדוגמת הבטה-לקטמאזות, המפרקים תרכובות אנטיביוטיות; (ב) מנגנוני אינאקטיבציה עקב קישור לאתר המטרה של האנטיביוטיקה ועיכוב פעילותה ו (ג) העלאת הביטוי של משאבות תאיות הנקראות multidrug efflux pumps המאפשרות הוצאה של מספר סוגי אנטיביוטיקה אל מחוץ לתא. . כבר כיום ישנם דיווחים על זני חיידקים העמידים לכל סוגי האנטיביוטיקה הניתנים לשימוש רפואי (7, 19). אחד הפתוגנים הידועים לשמצה בהקשר זה הוא חיידק ה- *Staphylococcus aureus* העמיד למתיצילין (MRSA), אנטיביוטיקה אשר פותחה כנגד זנים המפרקים נגזרות שונות של פניצילין. חיידק ה-MRSA עמיד כיום גם לאמינוגליקוזידים, מקרולידיים, טטרציקלינים, כלורמפניקול ולינקוסמידים. גם חיידקים גרם שליליים, כמו *Acinetobacter* ו- *Pseudomonas* וסוגים שונים של *Enterobacteriaceae* פתחו עמידות רחבה מאוד למרבית האנטיביוטיקות המצויות היום בשימוש רפואי (9) וקיימת סכנה אמיתית לעלייה במספר המקרים של כישלון הטיפול התרופתי.

התפתחות העמידות לאנטיביוטיקה נגרמת כאמור עקב שימוש מופרז באנטיביוטיקה ברפואה ובחקלאות. בהקשר החקלאי, נאסר באירופה השימוש בזרזי גדילה לגידול בעלי חיים. בדנמרק, למשל, נמצא כי הפסקת השימוש באנטיביוטיקה לזירוז גידול בעלי חיים הראתה ירידה ברמת העמידות למספר אנטיביוטיקות, כולל ונקומיצין ב-*enterococci* בחזירים ובעופות (1).

מאגרי עמידות סביבתיים- בעשור האחרון שלל עדויות מצביע על קשר בין עמידות קלינית לבין "מוקדי עמידות" סביבתיים (4, 10, 17). מקורות אנטרופוגנים כגון מי קולחים, בוצות שפכים וזבל בע"ח המשתחררים לסביבה, עלולים לתרום למוקדי עמידות כתוצאה משחרור: (א) תרכובות אנטיביוטיות יציבות העלולות להפעיל לחץ סלקטיבי על חיידקים סביבתיים; (ב) חיידקים עמידים העלולים להתבסס בסביבות טבעיות; ו (ג) גנים המקנים עמידות לאנטיביוטיקה, העלולים לעבור במעבר גנטי אופקי (horizontal gene transfer) מחיידקי סביבה לחיידקים פתוגנים. החשש מעלייה בשכיחות העמידות לאנטיביוטיקה בסביבה גובר בשל העובדה שגנים לעמידות נמצאים לעיתים קרובות על גבי אלמנטים ניידים (mobile genetic elements- MGE) אשר מתניידים בין סביבות וקבוצות טקסונומיות שונות (16). לאחרונה, קיים בעולם דיון נוקב בהקשר לעמידות לאנטיביוטיקה במשק החי ובסכנת העברת עמידויות לאדם דרך בשר וחלב. עמידות זו יכולה להתגבר כתוצאה משימוש נרחב במגוון גדול של סוגי אנטיביוטיקה המשמשים לטיפול ומניעת מחלות וכזרזי גידול, כמו גם משימוש במזון לבע"ח אשר עלול להכיל רמות גבוהות של חיידקים וגנים עמידים. גם קולחים המשתחררים ממתקנים לטיפול בשפכים מהווים מקור משמעותי של חיידקים עמידים וגנים לעמידות המשתחררים לסביבה, וקיים חשש שהם יכולים לעבור לסביבת האדם דרך מקורות מים ומזון המושקה בהם (12).

בעלי חיים מעלי הגירה אשר מגודלים במשק מקבלים במנתם בליל המתאים לצרכיהם, לקיום ולייצור. הבליל מכיל מזון מרוכז (גרעיני דגנים עתירי אנרגיה וכן כופתאות עתירות חלבון) ומזון גס שכולל תחמיצים וחציר. המזון הגס שעתיר במרכיבי דופן תא נחוץ לפעילות תקינה של המיקרואורגניזמים בכרס מעלי הגירה והם הופכים את המרכיבים האלה לחומצות שומן נדיפות המשמשות כמקור אנרגטי לבעלי החיים. המשק המודרני האינטנסיבי מבוסס על אספקה רציפה של מספוא באיכות טובה ואחידה. לכן מגדלים את צמחי המספוא הגס בעונתם וקוצרים אותם כאשר היבול והאיכות התזונתית מיטביים. הארץ מאופיינת בשטחי מרעה מצומצמים ובשנות בצורת תכופות ולכן רוב המזון המרוכז מיובא ואילו המספוא הגס מגודל בארץ. הממשק שהתפתח בארץ כולל גידול דגני מספוא כגון חיטה לתחמיץ ושיבולת שועל לחציר בחורף, בבעל (על מי גשמים) ואילו המספוא הגס הקיצי שכולל תירס וסורגום לתחמיץ מושקים בקולחים מטופלים. בעוד שגידולים למאכל אדם דורשים קולחים באיכות גבוהה, שדות לגידול מספוא המשמש למזון בהמות עלולים להיות מושקים בקולחים ברמת טיהור נמוכה אשר בעצמם מכילים ריכוזים גבוהים של חיידקים ממקור צואתי וגנים לעמידות לאנטיביוטיקה.

כמויות המספוא שנקצר בממשק זה בעונה המתאימה מחייבות את שימורו למשך כל תקופת ההאבסה. מטרת השימור כוללות צמצום הפסדי אחסון ומניעת התפתחות מיקרואורגניזמים מקלקלים או פתוגניים לבעלי החיים ולאדם. החלופות לשימור מספוא כוללות ייבוש לחציר (שחת) או החמצה. לא כל צמח מתאים לייבוש בגלל מבנה עבה וכמו כן קיים סיכון לנזקי גשם.

שלבי הכנת תחמיץ כוללים קציר המספוא, קיצוץ והעברתו למתקן, כגון בור תחמיץ, או מגדל החמצה, הידוקו ואיטומו ביריעת פלסטיק. לעתים, משתמשים בתוספים שמשפרים את תהליך ההחמצה. לאחר שהאוויר בין חלקיקי הצמח אוזל מתפתחים בתחמיץ חיידקי חומצת החלב שהופכים סוכרים מסיסים לחומצות אורגניות, בעיקר חומצת חלב. כתוצאה מכך ה-pH יורד והתחמיץ נשמר כל עוד לא חדר לתוכו אוויר. כאשר הרכב הצמח אינו מתאים להחמצה (לח מידי או יבש מידי, תכולה נמוכה של סוכרים מסיסים או כושר התרסה גבוה) תהליך ההחמצה יהיה לקוי והתחמיץ יתקלקל. כאשר ממשק ההחמצה אינו תקין ובמיוחד כאשר אוויר חודר לתחמיץ הוא עלול להתקלקל. בבורות תחמיץ השכבה העליונה והסמוכה לדפנות היא המועדת ביותר לקלקול. הקלקול מתבטא בשינויי צבע, מירקם וריח, התחממות, הופעת מוקדי עובש ולפעמים גם התפתחות מיקרואורגניזמים מזיקים אחרים (קלוסטרדיה, אנטרובקטריות, ליסטריה).

בארץ, הבלילים כוללים כשני שליש מזון מרוכז וכשליש מזון גס – תחמיץ וחציר. בעולם מקובל ממשק הזנה שונה, ובאירופה ובארה"ב היחסים בין מזון מרוכז וגס הפוכים. לכל אחת משלוחות הרפת (חולבות, עגלות, עגלים, פרות יבשות) מכינים בלילים בהרכב המתאים לצרכי בעלי החיים. בארץ הפרות החולבות הן גבוהות תנובה ורווחיות ענף החלב תלויה במידה רבה באיכות המספוא ובטיחותו מבחינת העדר חומרים מזיקים.

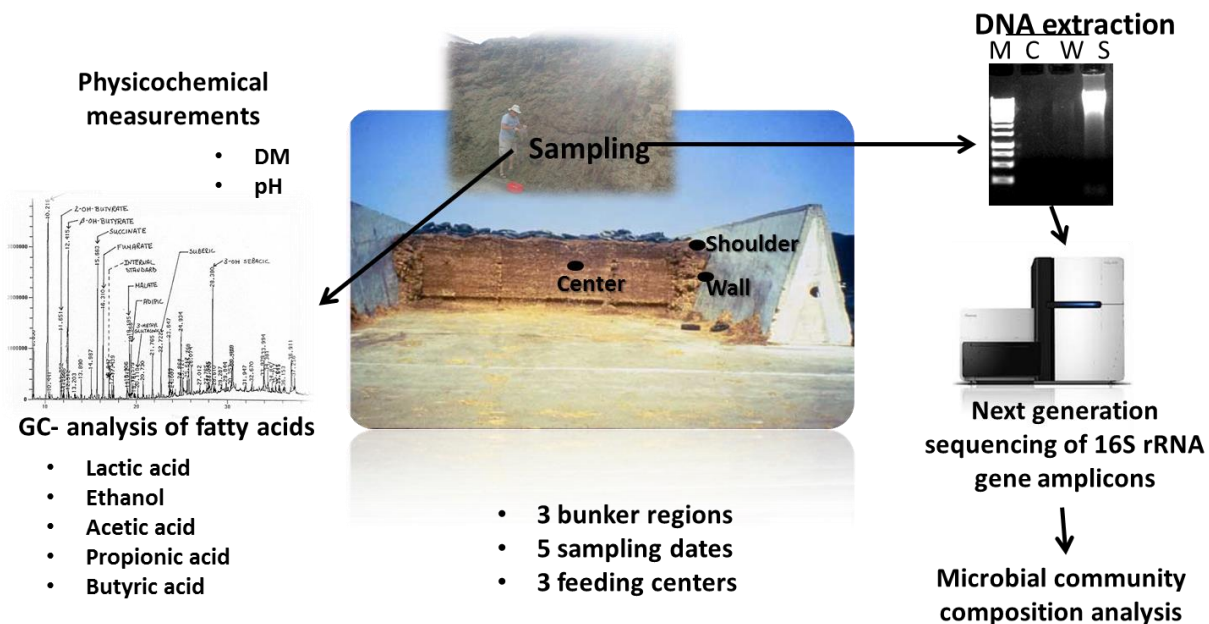
ממצאים ראשוניים שהתקבלו במעבדתו של פרופ' צבי ויינברג הצביעו על כך שתחמיצים מכילים רמות גבוהות של חיידקים עמידים לאנטיביוטיקה. בשל כך, הנחת העבודה של מחקר זה הייתה שתחמיצים יכולים לשמש כמקור לעמידות לאנטיביוטיקה אשר מועברת דרך הבהמות לשרשרת המזון ולקרקעות

ומקורות מים דרך זיבול. כיוון שלעיתים קרובות מספוא המשמש להכנת תחמיץ מושקה בהמטרה במי קולחים באיכות נמוכה, אחת השאלות של מחקר זו הייתה שמי הקולחים מהווים מקור עמידות לאנטיביוטיקה בתחמיצים אלו. הנחה נוספת של המחקר הייתה שאזורים "מקולקלים" של בורות התחמיץ יכולים להוות מקור לחיידקים פתוגנים עמידים לאנטיביוטיקה. מטרת המחקר הזו היו (א) לבחון את הרכב האוכלוסיות המיקרוביאליות (המיקרוביום) של תחמיצים שהוכנו מגידולי חורף וקיץ באזורים "שמורים" ו"מקולקלים" של בורות תחמיץ מסחריים כתלות בתכונות הפיזיו-כימיות של התחמיצים; ו(ב) לבחון את רמת העמידות לאנטיביוטיקה בתחמיצים במוקדים אלה.

פירוט עיקרי הניסויים

א'- אפיון אוכלוסיות מיקרוביאליות במקדים שונים של בורות תחמיץ ממרכזי מזון מובילים

איור 1 מסכם את מהלך העבודה אשר יושמה לצורך ביצוע מטרה זו. דוגמאות נלקחו משמונה פרופילים מבורות תחמיץ ממרכזי מזון מסחריים (באר טוביה, משואות יצחק ונצר סירני) במרכז הבור (Center), בקיר (Wall) ובכתף (Shoulder) כפי שמתואר באיור 1. פרוט תאריכי הדיגום וסוגי הגידול אשר שימשו להכנת התחמיצים בכל דוגמה מופיעים **בטבלה 1**, אשר מציג גם את רמות הסיבים (%DM), ערכי ה-pH ורמות של חומצות שומן נדיפות במוקדים השונים אשר נבחנו. ניתן לראות קשר ברור בין רמות החומציות ורמות חומצות החלב בדוגמאות המרכז והכתף אשר מתנהגים לרוב כ"שמורות" ו"מקולקלות", בהתאמה, ואילו הדוגמאות השונות מהקיר היו חלוקות בתכונותיהם.



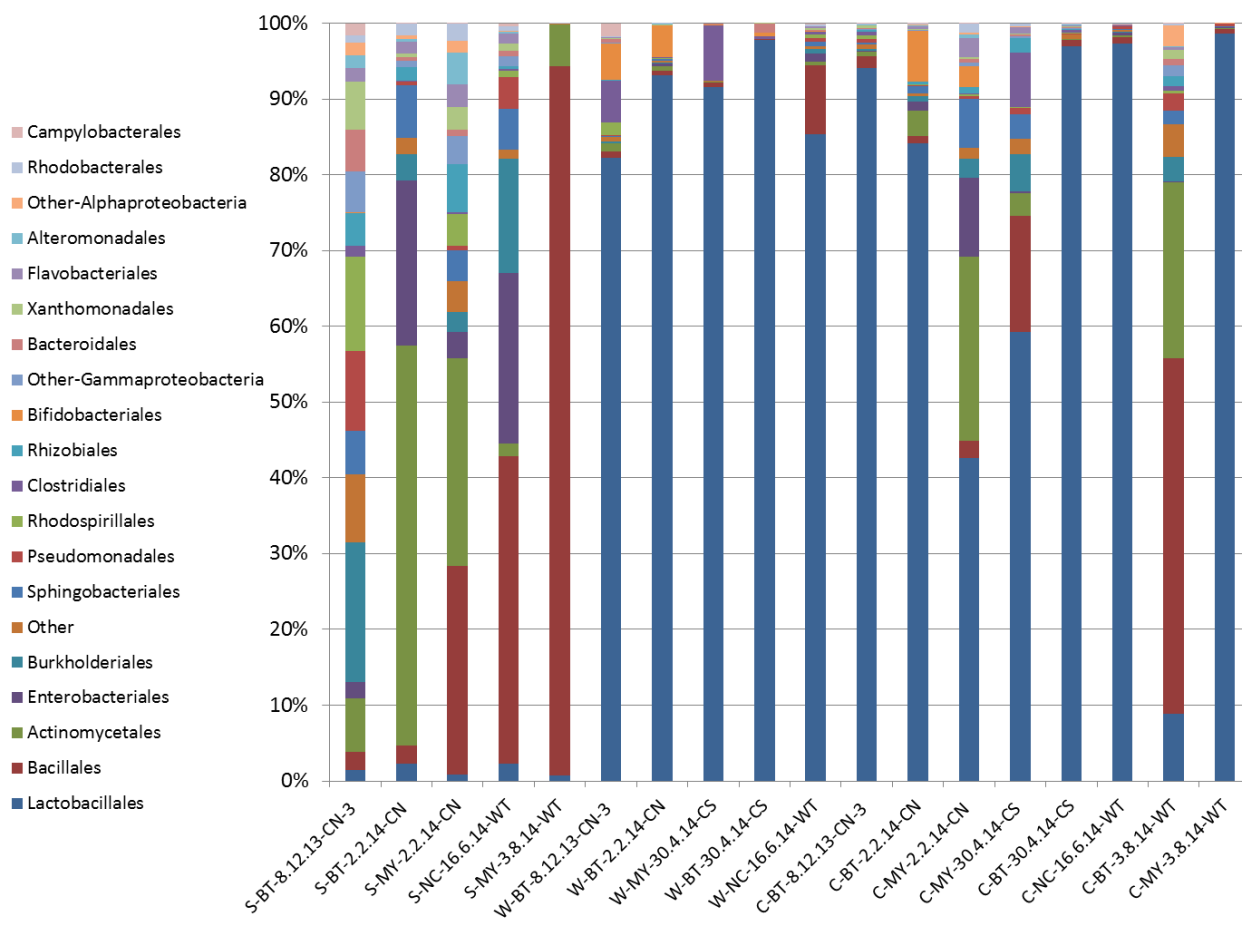
איור 1. סקירת הדיגום ומהלך העבודה של חלק א'. Shoulder - אזור הכתף; Wall - אזור הקיר; Center - אזור מרכז בור התחמיץ.

Feeding center	Date/ crop	Area	% DM	pH	Lactic acid	Ethanol	Acetic acid	Propionic acid	Butyric acid
BT	8.12.13 Corn	Center	32.5	3.7	3.8	0.2	3.9	0.2	0.2
		Wall	30.5	4.5	3.0	0.3	3.3	0.2	0.7
		Shoulder	18.4	8.2	0	0.05	1.5	0.4	0.2
BT	2.2.14 Corn	Center	44.5	4.0	2.1	0.1	2.4	0.2	0.1
		Wall	35.8	4.5	1.3	0.1	2.5	0.4	0.2
		Shoulder	39.0	8.7	0	0	0.7	0.05	0
Masuot	2.2.14 Corn	Center	37.7	3.9	2.3	0.2	2.3	0.2	0
		Wall	35.4	4.1	1.3	0.1	2.0	0.2	0.1
		Shoulder	33.3	8.6	0.2	0	1.1	0.2	0
BT	30.4.14 Corn+Sorgum	Center	34.6	3.9	3.9	0.5	6.0	0.1	0.3
		Wall	25.7	3.8	5.7	0.4	4.1	0.3	0.4
		Shoulder	28.0	6.8	0.4	0.1	1.7	0.1	0.3
Masuot	30.4.14 Corn+Sorgum	Center	38.2	3.8	3.7	0.9	3.1	0.3	0.3
		Wall	27.4	3.6	3.7	0.4	6.5	0.9	2.3
		Shoulder	34.6	3.9	2.5	0.1	1.1	0.2	0.4
NS	16.6.16 Wheat	Center	39.1	3.9	3.7	0.2	2.2	0.1	0.2
		Wall	41.3	3.9	3.5	0.2	1.2	<0.05	0.3
		Shoulder	37.1	4.4	3.0	0.1	0.9	<0.05	0.1
BT	3.8.14 Wheat	Center	51.1	4.0	3.7	0.1	0.5	0	0
		shoulder	39.3	7.6	0.3	0.1	0.3	0	0
Masuot	3.8.14 Wheat	Center	31.4	4.2	2.1	0.4	3.6	0.2	0
		shoulder	40.6	4.2	2.0	0.3	1.5	0.1	0.1

טבלה 1. פרמטרים פיזיוכימיים במוקדים ובתאריכים שונים של בורות תחמיץ ממרכזי מזון מסחריים. BT - באר טוביה; MASUOT - משואות יצחק; NS - נצר סירני.

על מנת לקבל תמונה רחבה של הרכב החיידקים במוקדים השונים של בורות התחמיץ (טבלה 1), יישמו גישה המבוססת על אנליזה מולקולריות כמתואר באיור 1. ראשית כל, דנ"א גנומי הופק מהתחמיצים בעזרת קיט מסחרי (Gene-all soil DNA extraction kit) לאחר טחינה בחנקן נוזלי. בשלב זה, הוכפל האזור הואריאבילי (V4) של גן ה- 16S rRNA והפרגמנטים המשוכפלים הורצפו באופן מאסיבי בעזרת שיטת ה- lon torrent, שהניבה כ- 30000 רצפים בממוצע לדוגמא כאשר כל רצף מייצג באופן עקרוני

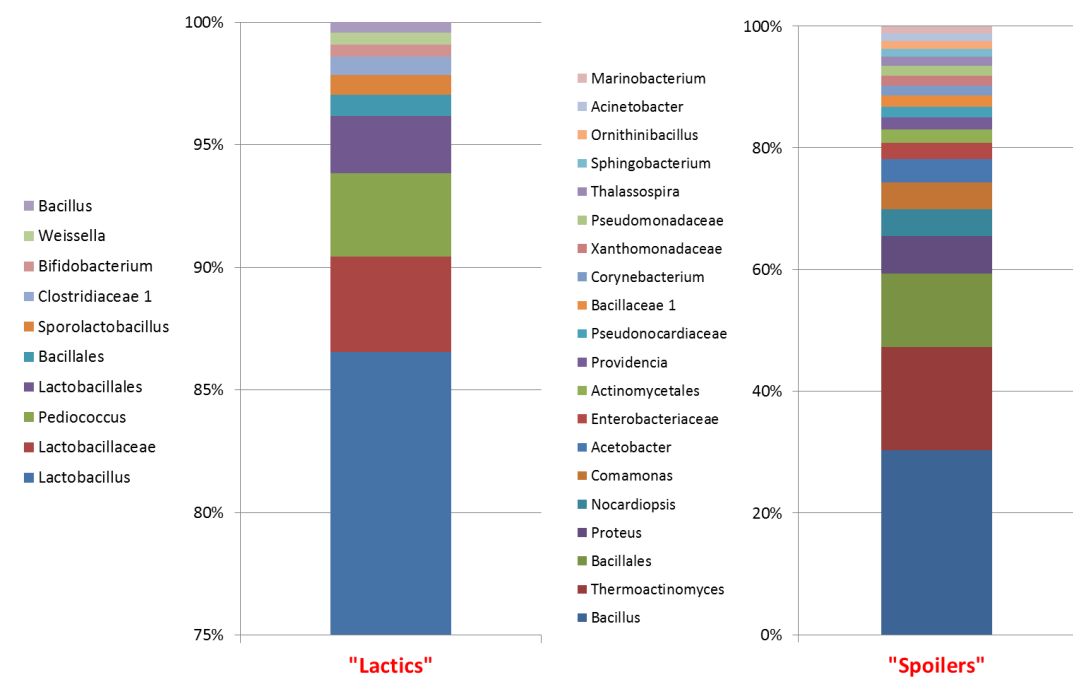
חיידק בודד בתוך אוכלוסייה שלמה. בעזרת תוכנות ביואינפורמטיות וביוסטטיסטיות הכלולות בחבילת Qiime-Qiime הגדרנו את ההרכב המיקרוביאלי (המיקרוביום) בכל דוגמא, את מגוון החיידקים (alpha-diversity) ואת רמת הקרבה בין הפרופילים (beta-diversity). - איור 2 מתאר באופן רחב את הרכב החיידקים בדוגמאות השונות.



איור 2. הרכב הטקסונומי (ברמת המשפחה) בדוגמאות השונות מבורות התחמיצים. S- אזור הכתף; W- אזור הקיר; C- אזור המרכז. BT- באר טוביה; MY- משואות יצחק; NC- נצר סירני, CN-תירס, CS- תירס וסורגום, WT- חיטה.

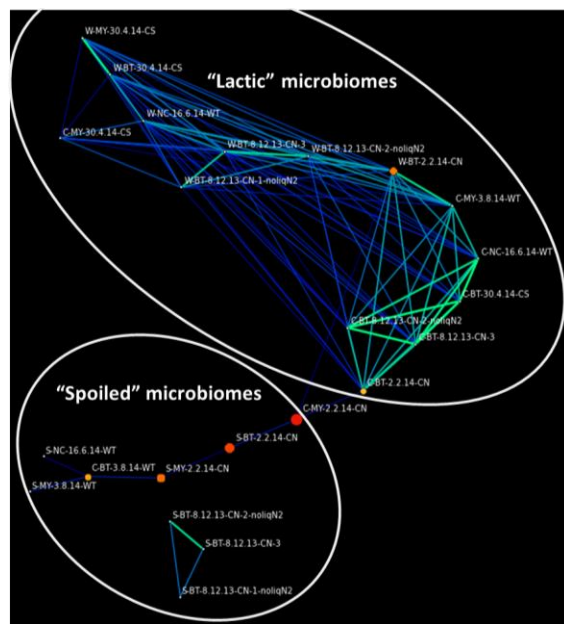
ניתן לראות שבאזורים ה"שמורים" בכל הפרופילים שנבחנו, היתה דומיננטיות מוחלטת של אוכלוסיות *Lactobacillus* אשר היוו לעיתים מעל 95% מסך כל החיידקים בדוגמא. לעומת זאת, דוגמאות האזורים ה"מקולקלים" התאפיינו במעט מאוד חיידקי *Lactobacillus* וברמות שונות ומגוון גבוה הרבה יותר מאשר האזורים ה"שמורים". איור 3 משכלל את כלל התוצאות מאזורים ה"שמורים" וה"מקולקלים", בהתאמה. ניתן לראות שבאזורים השמורים נצפו רק חיידקים גרם חיוביים. בנוסף ל- *Lactobacillus* זוהו באזורים אלה חיידקי תסיסה נוספים בהם *Sporolactobacillus*, *Weissella*, *Bifidobacterium* ו- *Pediococcus* אשר הופיעו בכל הפרופילים מסוג זה. לעומת זאת, בדוגמאות ה"מקולקלות" חיידקי *Lactobacillus* היוו פחות מ- 1% מכלל החיידקים. רמת השונות בפרופילים אלה הייתה גבוהה מאוד

ונצפו רמות יחסית גבוהות של חיידקים גרם שליליים וביניהם חיידקים ממשפחת ה- *Enterobacteriaceae* ששכיחותם השתנה באופן מהותי בפרופילים השונים. בניגוד למצופה, לא היה קשר ברור בין תחמיצים שהוכנו מגידולי בעל לעומת כאלה שהושקו במי קולחים ולא היה קשר ברור בין הרכב האוכלוסיות המיקרוביאליות למרכזי המזון השונים. הייתה מגמה שהאזורים ה"מקולקלים" היו מעושרים בחיידקים גרם חיובים באביב ובקיץ וייתכן שעובדה זו נובעת מיכולת השרדות גבוה יותר של חיידקים יוצרי נבגים בטמפרטורות גבוהות (איור 2).



איור 3. שכלול כלל התוצאות מאזורים ה"שמורים" (צד שמאל) וה"מקולקלים" (צד ימין).

בעזרת תוכנה ביוסטטיסטית המכונה Edennetwork (<http://becs.aalto.fi/edenetworks>), בנינו מערך המתאר את הקרבה בין כלל אוכלוסיות החיידקים בדוגמאות השונות שנבחנו (איור 4).

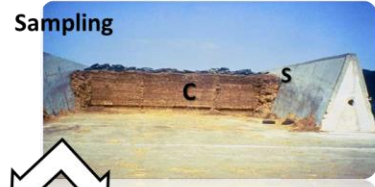


איור 4. יחסי גומלין בין אוכלוסיות חיידקים בדוגמאות השונות מבורות התחמיץ. הנקודות מייצגות אוכלוסיות מיקרוביאליות וקווים מייצגים משותפות בין הדוגמאות. ניתן לראות סרגציה גבוהה בין המיקרוביומים האופייניים לאזורים ה"שמורים" (Lactic) לאומת האזורים ה"מקולקלים" (Spoiled).

ב'- בחינת חיידקים עמידים לאנטיביוטיקה

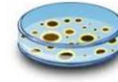
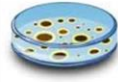
על מנת לבחון קיום של MDR בתחמיצים ולהעריך את הפוטנציאל שלהם להוות מוקד להעברת עמידות לאנטיביוטיקה דרך שרשרת המזון, בחנו עמידות לאנטיביוטיקה בחיידקי *Lactobacillus*, המייצגים מוקדים "שמורים" ובחיידקי *Enterobacteriaceae* המייצגים חיידקים טיפוסיים באזורים "מקולקלים". בחרנו להתמקד בחיידקי *Enterobacteriaceae* עקב שכיחותם הגבוהה בחלק מהפרופילים ה"מקולקלים" ובשל העובדה שנציגים רבים ממשפחה זו הינם פתוגנים לבע"ח ולאדם. **איור 5** מסכם את מהלך העבודה אשר יושם לצורך ביצוע מטרה זו.

Ab	Concentration in µg/ml
Ampicillin	1000
Ciprofloxacin	1000
Tetracycline	500
Erythromycin	500
Vancomycin	5000
Kanamycin	200
Ceftriaxone	5000



Isolation of Enterobacteria
on selective VRBA media

Isolation of Lactobacillus on
selective Rogosa/MRS media



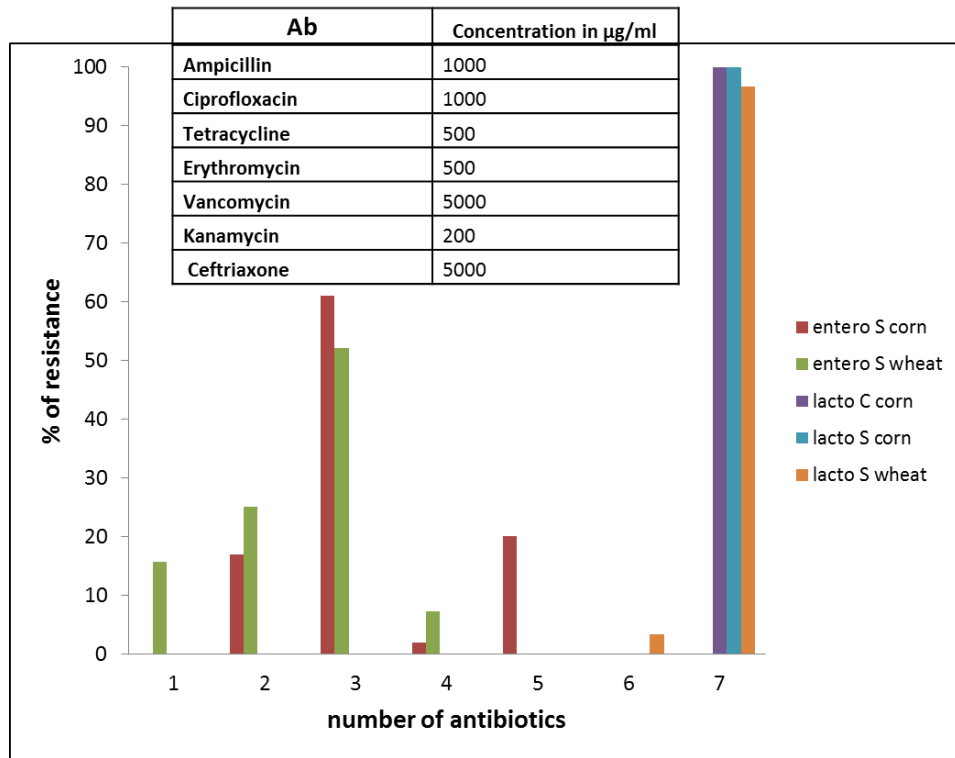
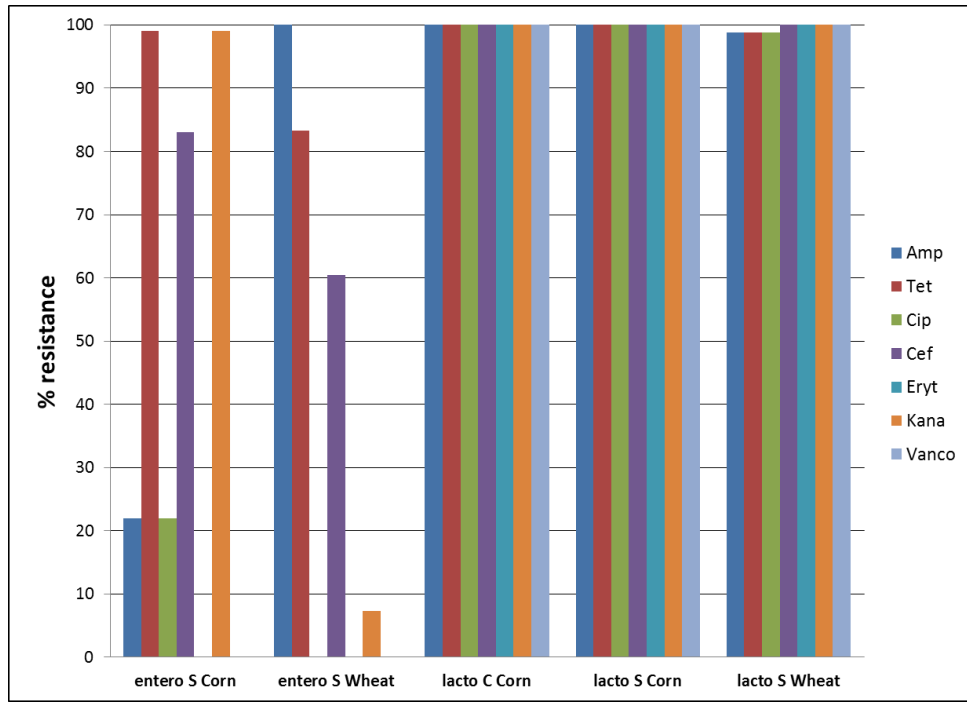
Compile AR lactobacillus and enterobacteria isolate libraries

DNA extraction and PCR
screening of selected
ESBLs (from colonies and
directly from silage DNA)

Screening of libraries on 7 different ABs
For detection of MDR strains

איור 5. סקירת מהלך הדיגום של ניסויי הבידוד. הטבלה בפניה השמאלית מציינת את סוגי וריכוזי האנטיביוטיקה אשר נבחנו.

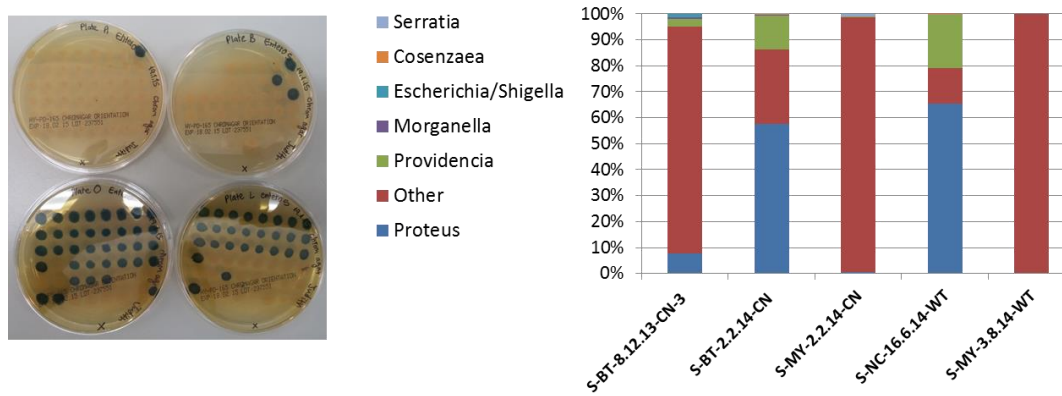
סה"כ בחנו את רמת העמידות של כ- 200 תבדידים מכל קבוצה, וסרקנו אותם על שבעה אנטיביוטיקות שונות (איור 6) בשני סבבים- הראשון בתחמיצי תירס מושקים במי קולחים, ובשני מתחמיצי חיטה. באופן מפתיע, כמעט כל ה- *Lactobacillus* (98%) היו עמידים לכל שבעת האנטיביוטיקה שנבחנו. לעומת זאת ה- *Enterobacteriaceae* היו עמידים ל- 1-5 מהאנטיביוטיקות שנבחנו. למרות שרמת העמידות לאנטיביוטיקה הייתה גבוהה בכל התבדידים שנבחנו, הייתה מגמה ברורה של עמידות בתבדידים מתחמיצי התירס, דבר אשר מצביע על כך שהשקיה במי קולחים עלולה לתרום לרמת העמידות לאנטיביוטיקה בתחמיצים.



איור 6. שכיחות החיידקים העמידים מתחמיצי תירס וחיטה. שכיחות ה- *Enterobacteriaceae* (entero) ו- *Lactobacillus* (lacto) העמידים לכל אחת משבעת התרכובות האנטיביוטיות שנסקרו (גרף העליון). רמות ה-MDR בכל אחד מאוספי התבדידים (הגרף התחתון). הטבלה מציינת את סוגי וריכוזי האנטיביוטיקה אשר נבדקו. Amp -ampicillin ;tet -tetracycline ;cip -ciprofloxacin ;cef -ceftriaxone ;eryt -erythromycin ;kana -kanamycin ;vanco -vancomycin.

משפחת ה- *Enterobacteriaceae* מתאפיינת בפתוגנים רבים העלולים להוות סכנה לבעלי חיים ולאדם. עקב כך היה חשוב לאפיין את התבדידים שהשתייכו למשפחה זו. למטרה זו, זרענו את התבדידים מהספריות השונות על צלחות סלקטיביות Chromagar orientation (www.chromagar.com), בהם בעזרת מבחנים ביוכימיים נוצרות ריאקציות צבע מבדילות בין קבוצות *Enterobacteriaceae* שונות. מהתוצאות שהתקבלו (איור 7), ניתן לראות שכמעט כל החיידקים השתייכו לקבוצת ה- *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* או ל- *Proteus-Morganella-Providencia*, כאשר רוב התבדידים מתחמיצי התירס השתייכו לקבוצה הראשונה ואילו רוב תבדידי תחמיצי החיטה השתייכו לקבוצה השנייה. שיטות מולקולאריות המבוססות על סריקת גן ה- *rRNA 16S* לא מצליחים להגדיר באופן אמין חיידקי *Enterobacteriaceae* עקב הדמיון הגבוה בקרב קבוצה זו. אם זאת, ניתן לראות שניתוח המיקרוביום המתואר בסעיף א, מצביע על כך שרוב החיידקים שזוהו עד לרמת הסוג השתייכו ל- *Proteus* ול- *Providencia*, בהתאמה לנתוני ה- chromagar.

%	<i>Klebsiella-Enterobacter-Serratia</i>	<i>Proteus-Morganella-Providencia</i>	others
entero S Corn	5	91.25	3.75
entero S Wheat	65.625	34.375	0

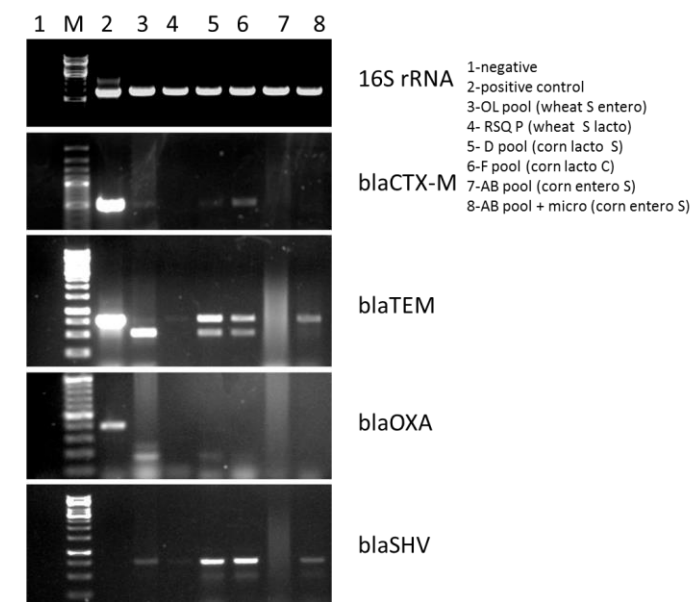


איור 7. הגדרת חיידקים ממשפחת ה- *Enterobacteriaceae* בעזרת זריעה על צלחות chromagar (טבלה עליונה ותמונה משמאל); ועל סמך נתוני המיקרוביום (גרף תחתון).

סריקת תבדידים לנוכחות של גנים המקנים עמידות לאנטיביוטיקה

על מנת לבחון האם העמידות הנצפית נובעת מעמידות "אינטרינסית" או שהיא בעלת יכולת לעבור במעבר אופקי, בחנו נוכחות של חמישה גנים המקודדים לבטתה-לקטמאזות (אנזימים המפרקים אנטיביוטיקות ממשפחת הפנצלינים). בחירה זאת נעשתה עקב: (א) החשיבות הקלינית של גנים אלה בפתוגנים וטרינרים ואנושיים; (ב) השכיחות הגבוהה של גנים אלה במנגנונים גנטיים ניידיים (MGE); ו (ג) התאחיזה בין גנים אלה לגנים המקנים עמידות לאנטיביוטיקות אחרות, או במילים אחרות התפוצה הגבוהה של גנים אלה בקרב חיידקי MDR. הכפלה בעזרת PCR הצביע על נוכחות גנים מהמשפחות *blaTEM*, *blaSHV*,

blaCTX-M בחיידקי *Enterobacteriaceae* וגם ב- *Lactobacillus* (איור 8). ממצא זה מפתיע כיוון שלמיטב ידיעתנו לא דווח קודם בספרות נוכחות של גנים ממשפחות אלה ב- *Lactobacillus*. בזמן כתיבת דו"ח זה אנו עמלים על הרצפת תוצרי ריאקציות ה-PCR על מנת לוודא אם אכן ממצאים ראשוניים אלה אכן נכונים.



איור 8. סריקת נוכחות של גנים מסוג ESBL בתבדידי *Enterobacteriaceae* ו- *Lactobacillus*. דנ"א נלקח מספריות חיידקים מאוחדים על סמך המקרא. 1- ביקורת שלילית; M- סמן גדלים; 2- ביקורת חיובית; 3- אוסף *Enterobacteriaceae* מתחמיצי חיטה (כתף); 4 אוסף *Lactobacillus* מתחמיצי חיטה (אמצע); 5- אוסף *Lactobacillus* מתחמיצי תירס (כתף); 6- אוסף *Lactobacillus* מתחמיצי תירס (מרכז); 7 ו 8- אוסף *Enterobacteriaceae* מתחמיצי תירס (כתף).

דין

המחקר הצביע על כך שה- "מיקרוביום" של תחמיצים מתחלק לשתי קבוצות ייחודיות- (א) באזורים ה- "שמורים" בהם יש תנאים אירוביים ותהליכי הפרמנטציה מתרחשים באופן מיטבי ויש שליטה מוחלטת של חיידקי *Lactobacillus* ונוכחות דלה יותר של חיידקי תסיסה אחרים- קבוצה זו היא יחסית הומוגנית ורמת השונות בה נמוכה (ללא קשר בסוג חומר הגלם, בעונה או במרכז מזון); ו (ב) קבוצה המאפיינת אזורים "מקולקלים" מתאפיינים בחדירה של חמצן עלייה ברמת ה- pH וירידה בחומצות שומן נדיפות, בהן השכיחות היחסית של חיידקי- *Lactobacillus* נמוכה מאוד ויש עלייה משמעותית במגוון החיידקים. חלק מהדוגמאות האלה התאפיינו בריכוזים גבוהים של חיידקים גרם שליליים ובתוכם לעיתים רמות גבוהות של חיידקי *Enterobacteriaceae*, אולם רמת השונות בין דוגמאות אלה הייתה גבוהה מאוד ולא הצלחנו להגדיר בהן גורמים ספציפיים אשר השפיעו על הרכב האוכלוסיות למעט אולי טמפ'- כאשר שכיחות חיידקים גרם חיוביים עלתה בעונות חמות יותר בדוגמאות אלה. התחמיצים שנבדקו התאפיינו ברמות

גבוהות של חיידקי *Enterobacteriaceae* עמידים לאנטיביוטיקה ובאופן מפתיע, רמות גבוהות של חיידקי *Lactobacillus* בעלי טווח עמידות רחב ביותר. בשלב זה יש צורך לבחון אילו מנגנוני עמידות יש לחיידקים אלה ומה פוטנציאל ההעברה שלהם לחיידקים אחרים. כזכור, מחקר זה מומן כתכנית התכנות לשנה אחת, במטרה לבחון את הפוטנציאל של התחמיצים להוות מקור עמידות לאנטיביוטיקה במשק החי. הרמות חסרות התקדים של חיידקים עמידים לאנטיביוטיקה בתחמיצים והנוכחות של חיידקים בעלי פוטנציאל פתוגני, אכן מצביעים על כך שתחמיצים עלולים להוות מקור לעמידות לאנטיביוטיקה בשרשרת המזון. לכן, אנו רואים במחקר פרלימינארי זה שלב ראשוני בהבנת הקשר בין שרשרת המזון לעמידות לאנטיביוטיקה במשק החי, ומאמינים שהוא יהווה בסיס למחקרים מקיפים בנושא זה בעתיד אשר ישלבו גורמים במשרד הבריאות ובשירותים הווטרינריים.

פירוט מלא של הפרסומים המדעיים

פרסומים:

1. J. Kraut-Cohen, V. Tripathi, Y., J. Gatica, Chen, V., S. Sela, Z.G. Weinberg and E. Cytryn. Comprehensive assessment of microbial communities in industrial silage facilities. *In preparation*
2. J. Kraut-Cohen, Y. Chen, V. Volchinski, I. Dromi, S. Sela, Z.G. Weinberg and E. Cytryn. Is silage a potential driver of antibiotic resistance in cattle? *In preparation*

תקצירים לכנסים:

1. J. Kraut-Cohen, Y. Chen, Vijay Tripathi, V. Volchinski, I. Dromi, S. Sela, Z.G. Weinberg and E. Cytryn, The Silage Microbiome: a potential driver of antibiotic resistance in cattle?. The 6th Congress of the Federation of the Israel Societies for Experimental Biology – Annual Meeting of the Israeli Society of Veterinary Microbiology and Immunology, Invited Lecture, Bet Dagan, Israel, 2015.
2. J. Kraut-Cohen, Y. Chen, Vijay Tripathi, V. Volchinski, I. Dromi, S. Sela, Z.G. Weinberg and E. Cytryn. The Silage Microbiome: Food for Thought for Bovines and Humans. Annual Meeting of the Israel Society of Microbiology, Invited Lecture, Bar Ilan University, 2015.
3. J. Kraut-Cohen, Y. Chen, Gatica J, V. Volchinski, S. Sela, Z.G. Weinberg and E. Cytryn, Is silage can be a source for antibiotic resistance? The Israeli society for ecology and environmental sciences. Poster presentation. Bar Ilan university, 2014.

- .1 **Aarestrup, F. M., A. M. Seyfarth, H.-D. Emborg, K. Pedersen, R. S. Hendriksen, and F. Bager.** 2001. Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark. *Antimicrobial Agents and chemotherapy* **45**:2054-2059.
- .2 **Binh, C. T., H. Heuer, M. Kaupenjohann, and K. Smalla.** 2009. Diverse aadA gene cassettes on class 1 integrons introduced into soil via spread manure. *Research in Microbiology* **160**:427-433--
- .3 **Chen, Y., S. Sela, M. Gamburg, R. Pinto, and Z. G. Weinberg.** 2005. Fate of *Escherichia coli* during ensiling of wheat and corn. *Applied and environmental microbiology* **71**:5163-5170.
- .4 **Davies, J., and D. Davies.** 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **74**:417-433.
- .5 **de la Cruz, F., and J. Davies.** 2000. Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. *Trends in Microbiology* **8**:128-133.
- .6 **Gaze, W. H., L. Zhang, N. A. Abdousslam, P. M. Hawkey, L. Calvo-Bado, J. Royle, H. Brown, S. Davis, P. Kay, A. B. Boxall, and E. M. Wellington.** 2011. Impacts of anthropogenic activity on the ecology of class 1 integrons and integron-associated genes in the environment. *Isme Journal* **5**:1253-1261.
- .7 **Hrabak, J., J. Niemczykova, E. Chudackova, M. Fridrichova, V. Studentova, D. Cervena, P. Urbaskova, and H. Zemlickova.** 2011. KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from a Czech patient previously hospitalized in Greece and in vivo selection of colistin resistance. *Folia microbiologica* **56**:361-365.
- .8 **Livermore, D. M.** 2012. Fourteen years in resistance. *International journal of antimicrobial agents* **39**:283-294.
- .9 **Livermore, D. M.** 2004. The need for new antibiotics. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **10 Suppl 4**:1-9.
- .10 **Martinez, J. L.** 2009. The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proceedings of the Royal Society: Biological sciences* **276**:2521-2530.
- .11 **Moura, A., I. Henriques, R. Ribeiro, and A. Correia.** 2007. Prevalence and characterization of integrons from bacteria isolated from a slaughterhouse wastewater treatment plant. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **60**:1243-1250.
- .12 **Negreanu, Y., Z. Pasternak, E. Jurkevitch, and E. Cytryn.** 2012. Impact of treated wastewater irrigation on antibiotic resistance in agricultural soils. *Environmental Science & Technology* **46**:4800-4808.
- .13 **Nikaido, H.** 2009. Multidrug resistance in bacteria. *Annual review of biochemistry* **78**:119-146.

- .14 **Nordmann, P., L. Dortet, and L. Poirel.** 2012. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! Trends in molecular medicine **18**:263-272.
- .15 **Nordmann, P., L. Poirel, M. A. Toleman, and T. R. Walsh.** 2011. Does broad-spectrum beta-lactam resistance due to NDM-1 herald the end of the antibiotic era for treatment of infections caused by Gram-negative bacteria? The Journal of antimicrobial chemotherapy **66**:689-692.
- .16 **Pruden, A., R. T. Pei, H. Storteboom, and K. H. Carlson.** 2006. Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: Studies in northern Colorado. Environmental Science & Technology **40**:7445-7450.
- .17 **Silbergeld, E., M. Davis, J. Leibler, and A. Peterson.** 2008. One reservoir: Redefining the community origins of antimicrobial-resistant infections. Medical Clinics of North America **92**:1391-1407.
- .18 **Stokes, H. W., C. L. Nesbo, M. Holley, M. I. Bahl, M. R. Gillings, and Y. Boucher.** 2006. Class 1 integrons potentially predating the association with Tn402-like transposition genes are present in a sediment microbial community. Journal of bacteriology **188**:5722-5730.
- .19 **Tzouvelekis, L. S., A. Markogiannakis, M. Psychogiou, P. T. Tassios, and G. L. Daikos.** 2012. Carbapenemases in Klebsiella pneumoniae and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. Clinical microbiology reviews **25**:682-707.
- .20 **Weinberg, Z., Y. Chen, P. Khanal, R. Pinto, V. Zakin, and S. Sela.** 2011. The effect of cattle manure cultivation on moisture content and survival of Escherichia coli. Journal of animal science **89**:874-881.
- .21 **WHO.** 2012. Antimicrobial resistance, Fact sheet N°194, www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/.
- .22 **Woodford, N., E. J. Fagan, and M. J. Ellington.** 2006. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum -lactamases. Journal of Antimicrobial Chemotherapy **57**:154.

סיכום עם שאלות מנחות

<u>מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה.</u>
לבחון אוכלוסיות חיידקים ורמת העמידות של חיידקים בתחמיצים ממרכזי מזון המשמשים למזון בהמות
<u>עיקרי הניסויים והתוצאות.</u>
<p>(א) בחינת מקיפה של תכונות פיזיו-כימיות מתחמיצים ממרכזי מזון מסחריים</p> <p>(ב) בחינת מקיפה של אוכלוסיות חיידקים (המיקרוביום) בעזרת שיטות מולקולאריות בתחמיצים ממרכזי מזון מסחריים</p> <p>(ג) בחינת רמת עמידות לאנטיביוטיקה ורמת ה- (MDR) multidrug resistance בחיידקים אשר בודדו מתחמיצים ממרכזי מזון מסחריים</p>
<u>מסקנות מדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדוח?</u>
<p>תחמיצים מתאפיינים באזורים "שמורים" הנשלטים לחלוטין ע"י חיידקי לקטובצילוס ואזורי שוליים "מקולקלים" בעלי מגוון רחב של חיידקים כולל פתוגנים פוטנציאליים ממשפחת האנטרובקטריה. שתי משפחות אלה מתאפיינות בטווח רחב של עמידות לאנטיביוטיקה (multi drug resistance), דבר מצביע על כך שתחמיצים עלולים להוות מקור לעמידות לאנטיביוטיקה בשרשרת המזון במשק החי.</p>
<u>בעיות שונות לפתרון ו/או שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה; התייחסות המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנתרה לביצוע תוכנית המחקר?</u>
<ul style="list-style-type: none"> • לבחון האם החיידקים העמידים בתחמיצים יכולים לשרוד ו/או להעביר את העמידות (העברת גנים) לחיידקים בבעי"ח ובסביבות טבעיות
<u>הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח: פרסומים בכתב פטנטים - יש לציין שם ומס' פטנט; הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום, תאריך, ציטוט ביבליוגרפי של התקציר כמקובל בפרסום מאמר מדעי.</u>
<u>פרסום מאמרים בספרות מדעית:</u>
<p>J. Kraut-Cohen, V. Tripathi, Y. Chen, V., S. Sela, Z.G. Weinberg and E. Cytryn. Comprehensive assessment of microbial communities in industrial silage facilities. <i>In preparation</i></p> <p>J. Kraut-Cohen, Y. Chen, V. Volchinski, I. Dromi, S. Sela, Z.G. Weinberg and E. Cytryn. Is silage a potential driver of antibiotic resistance in cattle? <i>In preparation</i></p>
<u>תקצירים לכנסים:</u>
<p>J. Kraut-Cohen, Y. Chen, Vijay Tripathi, V. Volchinski, I. Dromi, S. Sela, Z.G. Weinberg and E. Cytryn, The Silage Microbiome: a potential driver of antibiotic resistance in cattle?. The 6th Congress of the Federation of the Israel Societies for Experimental Biology – Annual Meeting of the Israeli Society of Veterinary Microbiology and Immunology, Invited Lecture, Bet Dagan, Israel, 2015.</p> <p>J. Kraut-Cohen, Y. Chen, Vijay Tripathi, V. Volchinski, I. Dromi, S. Sela, Z.G. Weinberg and E. Cytryn. The Silage Microbiome: Food for Thought for Bovines and Humans. Annual Meeting of the Israel Society of Microbiology, Invited Lecture, Bar Ilan University, 2015.</p> <p>J. Kraut-Cohen, Y. Chen, Gatica J, V. Volchinski, , S. Sela, Z.G. Weinberg and E. Cytryn, Is silage can be a source for antibiotic resistance? The Israeli society for ecology and environmental sciences. Poster presentation. Bar Ilan university, 2014.</p>

פרסום הדוח : אני ממליץ לפרסם את הדוח : (סמן אחת מהאופציות)
ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט) ←
האם בכוונתך להגיש תוכנית המשך בתום תקופת המחקר הנוכחי? כן