

דוח מסכם לתכנית מחקר מספר 301-0683-11

השפעת השקיה בקולחין על הגברת העמידות לאנטיביוטיקה של חיידקי הקרקע, ובחינת דרכים למיגור התופעה

Effect of Treated Wastewater Irrigation on Proliferation of Antibiotic Resistance in Agricultural Soils

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות – השפעות סביבתיות של השקיה בקולחין על זיהום הקרקע, התווך הלא-רווי, מי-תהום ומים עיליים
ע"י

אדי סיטרין המכון למדעי הקרקע, המים והסביבה מינהל המחקר החקלאי, בית דגן
אדוארד יורקביץ המחלקה למחלות צמחים ומיקרוביולוגיה, הפקולטה לחקלאות, מזון וסביבה,
האוניברסיטה העברית בירושלים

Eddie Cytryn, Institute of Soil, Water and Environmental Sciences, ARO, , P.O.B.
6 Bet Dagan, 50250. E-mail: eddie@volcani.agri.gov.il

Edouard Jurkevitch, Department of Plant Pathology and Microbiology, Robert H.
Smith Faculty of Agriculture, Food and Environment, The Hebrew University of
Jerusalem, POB 12, Rehovot 76100. E-mail: jurkevi@agri.huji.ac.il

מרץ 2013

ניסן התשע"ג

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא

Q2/c

חתימת החוקר

*

רשימת פרסומים

Negreanu, Y., Pasternak, Z. Jurkevitch E. and **Cytryn E.** Impact of treated wastewater irrigation on antibiotic resistance in agricultural soils. *Environmental Science and Technology*. 46 (9), 4800-4808.

Gatica, J., and **Cytryn, E.** 2013. Impact of treated wastewater irrigation on antibiotic resistance in the soil microbiome. *J. Environmental Science and Pollution Research*, 1-10

תוכן עניינים

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

תקציר

עמידות חיידקים לאנטיביוטיקה היינה אחד האתגרים המשמעותיים של עולם הרפואה במאה הנוכחית עקב העלייה הדרמטית בפתוגנים בעלי טווח עמידות רחב (multi drug resistance). קיימת היום הבנה שתופעת העמידות נובעת בין היתר מהשפעות אנטרופוגניות כתוצאה משחרור תרכובות אנטיביוטיות וחיידקים וגנים עמידים לאנטיביוטיקה לסביבה, היוצרת מוקדים של עמידות מוגברת. מטרת מחקר זה הייתה לבחון את השפעת ההשקיה בקולחים על רמת העמידות לאנטיביוטיקה בחיידקי קרקע. היא נבחנה בשני מישורים: בניסויי שדה אשר עקבו אחר שכיחות חיידקים עמידים וגנים לעמידות בקרקעות מושקות בקולחים בהשוואה למים שפירים; ובניסויי מיקרוקוסמוס אשר בחנו השפעות של השקיה בסוגי וריכוזי אנטיביוטיקה שונים על פעילות והרכב אוכלוסיות מיקרוביאליות ורמת העמידות בחיידקי קרקע. בשני המקרים שולבו שיטות מיקרוביולוגיות קלאסיות ושיטות מולקולאריות המאפשרות מעקב אחר אוכלוסיות חיידקי קרקע וגנים לעמידות ללא צורך בבידוד. ניסויי השדה בוצעו במטע אבוקדו בעכו, בניסויי הדריים בליזומטרים בשפד"ן, במטה זיתים בקדמה ובשדה חיטה בגילת. כל האתרים הכילו חלקות שהושקו בקולחים וחלקות מקבילות שהושקו במים שפירים. בעזרת שיטות קלאסיות בחנו את רמת העמידות של תבדידים מהקרקעות השונות לאריטרומיצין טטראציקלין וציפרופלוקסצין. במקביל בעזרת שיטת ה- real-time PCR, עקבנו אחר שכיחות גנים נבחרים המקנים עמידות לאנטיביוטיקה בשלבים שונים של תהליך הטיפול בשפכים, במי ההשקיה ובקרקעות המושקות במי קולחים ובמים שפירים. המעקב המולקולארי התמקד ב-6 גנים שונים לעמידות (*tetO*, *ermB*, *ermF*, *sul1* and *sul2*, *qnrA*). ניסויי מיקרוקוסמוס בוצעו בכלים של 300 מ"ל בשלוש קרקעות שונות. נבחנה רמת העמידות ושינויים בהרכב אוכלוסיות החיידקים לאורך זמן כתלות בהשקיה בתוספות ריכוזים שונים של האנטיביוטיות ציפרופלוקסצין (משפחת הפלורוקווינולונים) וספטריתקסון (משפחת ה-בטה לקטמים). ניתן לסכמם את ממצאי המחקר בכמה מסכנות עיקריות כדלקמן: (1) השקיה בקולחים אינה מעלה את רמת העמידות לאנטיביוטיקה בקרב חיידקי הקרקע, למרות רמות גבוהות של חיידקים עמידים לאנטיביוטיקה ושל גנים לעמידות הקיימות בקולחים. (2) חיידקים בקרקעות חקלאיות מאופיינות ברמות גבוהות מאוד של עמידות טבעית לאנטיביוטיקה ללא קשר לאיכות מי ההשקיה. (3) לחץ סלקטיבי כתוצאה מחשיפת חיידקי קרקע לאנטיביוטיקה (גם בריכוזים הגבוהים בשני סדרי גודל מהמקובל בקולחים), אינו משפיע על רמת העמידות או על הרכב החיידקים בקרקעות. ניתן לסכם בזהירות רבה שהשקיה בקולחים אינה מעלה באופן משמעותי את רמת העמידות של חיידקי קרקע. אם זאת, יש צורך לבחון באופן ספציפי גנים לעמידות הנישאים על מנגנונים גנטיים ניידים (פלסמידים, אינטגרונים וכו'), בעלות פוטנציאל מעבר גבוה מהקרקע לסביבת האדם.

מבוא

השקיה במי קולחים הינה תופעה מתעצמת באזורים צחיחים לאור הדרישה הגוברת למי השקיה והירידה במקורות מים טבעיים. בישראל, כ- 70% ממי הקולחים מנוצלים לחקלאות והם מהווים כ-50% מסך מי ההשקיה לחקלאות. למרות החיסכון האדיר במים, ישנה דאגה מהשפעות בריאותיות וסביבתיות שליליות הכרוכות בהשקיה במי קולחין (11, 12). השפעה אחת היא ריבוי עמידות לתרכובות אנטיביוטיות בקרב חיידקים בקרקעות מושקות קולחים. תופעה זו עלולה להתרחש בשל לחץ סלקטיבי משאריות של תרכובות אנטיביוטיות המגיעות לקרקע ממתקני טיפול בשפכים, וממערב אופקי של גנים המקנים עמידות לאנטיביוטיקה מחיידקי שפכים לחיידקי קרקע, כפי שמתואר בספרות בקרקעות חקלאיות בהן מיושמות בוצות בע"ח (7-3). מנגנוני עמידות לאנטיביוטיקה עלולים לעבור מחיידקי קרקעות חקלאיות לחיידקים המאכלסים חקלאים, תוצרת חקלאית ובע"ח וכך לתרום להגברת רמת העמידות החיידקית לאנטיביוטיקה בקהילה, אחת התופעות האפידימיולוגיות המדאיגות בעולם הרפואי היום (2, 5, 10, 13, 15). למרות הסכנות הכרוכות בהעשרת מנגנוני עמידות בחיידקי קרקע, תקני הבטיחות המיקרוביאליים הקיימים בישראל ובשער העולם קובעים תקנים לגבי כמות הקוליפורמים הצואתיים המותרים בקולחים להשקיה, אך אינם מתייחסים לכמות החיידקים העמידים בקרקע (11). מטרת המחקר המוצע הינו לבחון את השפעת ההשקיה במי-קולחים על רמת העמידות לאנטיביוטיקה בחיידקי קרקע. במהלך המחקר נעקוב אחר רמות חיידקים וגנים עמידים לאנטיביוטיקה במי השקיה ובקרקעות מושקות במי קולחים ביחס לרמות תרכובות אנטיביוטית; ונבחן את השפעתם של ריכוזי אנטיביוטיקה שונים על רמת העמידות לאנטיביוטיקה בחיידקי קרקע בניסוי מעבדה מבוקרים. אנו מצפים שמחקר זה יתרום באופן משמעותי להבנת השפעת השקיה במי קולחים (ותהליכים אנתרופוגניים חקלאיים נוספים) על עמידות לאנטיביוטיקה בחיידקי קרקע, דבר שיאפשר קביעת תקנים שיאפשרו השקיה בת-קיימא בקולחים. בהמשך מתוארות תוצאות ומסקנות ראשוניות מהשנה הראשונה של המחקר.

פירוט עיקרי הניסויים

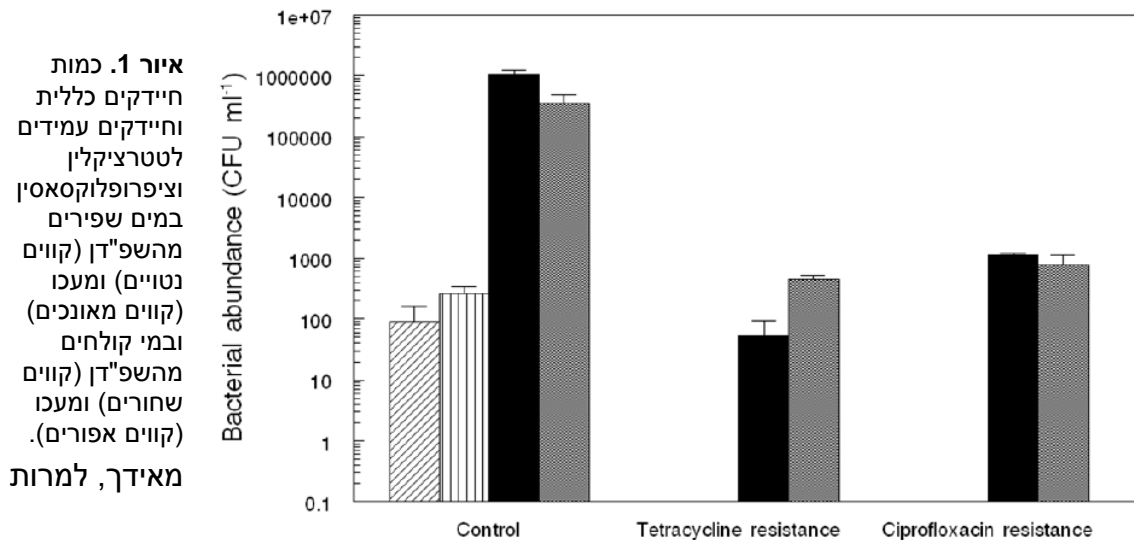
ניסויי השדה בחנו לעומק ארבע מערכות ניסוי (טבלה 1): (א) מטע אבוקדו השייך למו"פ צפון באזור עכו (קרקע גרומוסול)- המושקה במקביל במי קולחים ברמת טיהור שניונית ובמים שפירים; (ב) ניסוי ליזומטרים המכילים פומליות (קרקע חולית) בשפד"ן המושקים במקביל במי קולחים ברמת טיהור שניונית ובמי קולחים ברמת טיהור שלישונית (לאחר החדרה); (ג) שדה קרקעת לס באזור גילת בו מגדלים כותנה וחיטה המושקה במקביל במי קולחים ברמת טיהור שניונית ובמים

שפירים; ו (ד) מטה זיתים (קרקע חרסיתית) בקדמה המושקה במקביל במי קולחים ברמת טיהור שניונית ובמים שפירים.

<u>Experimental Site/geographic Location</u>	<u>Soil type</u>	<u>TWW quality</u>	<u>FW quality</u>	<u>Irrigation period</u>	<u>Crop</u>	<u>Plot type</u>	<u>Duration of TWW irrigation</u>
Akko (Western Galilee)	Vertisol (60% clay)	Secondary effluent Shomrat-Agamit WWTP	Well water coastal aquifer	April-October	Avocado	Orchard	12 years
Rishon LeZion (Central Coast)	Dune quartz sand	Secondary effluent Shafdan WWTP	Aquifer injected TWW (*)	Year-round	Oroblanco Citrus trees	200 L steel barrel lysimeters	12 years
Gilat (Northern Negev Desert)	Loam (20% clay)	Secondary effluent Sde-Timan WWTP	Fresh water	April-October	Cotton and wheat	Field	15 years
Kedma (Central Plain)	Vertisol (52% clay)	Secondary effluent Jerusalem Sorek WWTP	Well water coastal aquifer	April-October	Olive trees	Orchard	6 years

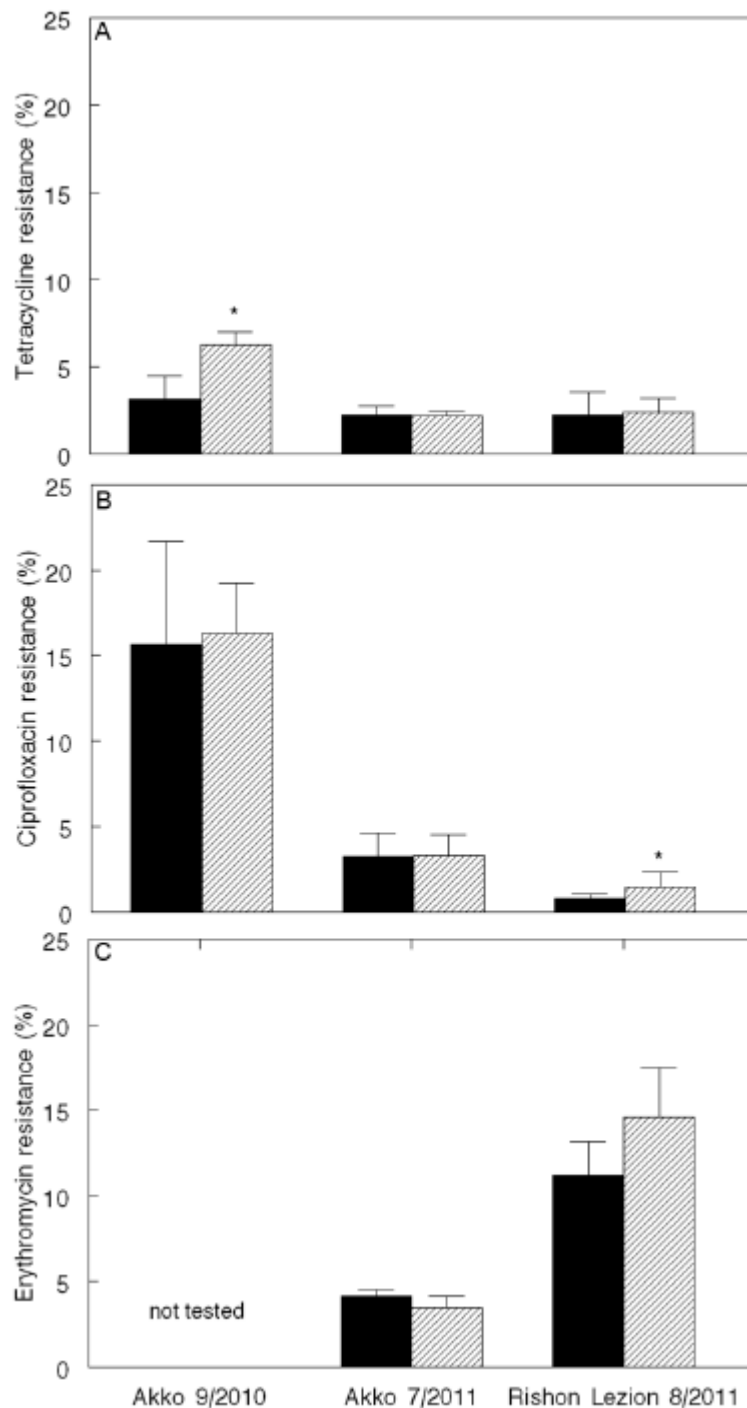
טבלה 1. חלקות חקלאיות אשר נחקרו במהלך העבודה עם נתונים על תכונות הקרקעות, טיב המים ומשך ההשקיה

נבחנה עמידות לארבעה קבוצות של תרכובות אנטיביוטיות: (א) טטרציקלין; (ב) ציפרופלוקסצין (ג) אריטרומיצין ו- (ד) סלפונאמיד. עמידות החיידקים המבודדים (culturable bacteria) נבחנה במי קולחים ובקרקעות מעכו והשפד"ן. כמות החיידקים בקולחים הייתה גדולה ב- 3 עד 4 סדרי גודל מאשר במים שפירים. בנוסף לכך נספרו 100 עד 1000 חיידקים עמידים למ"ל בקולחים לאומת המים השפירים שבהם כמות החיידקים העמידים הייתה מתחת לסף הדטקציה (איור 1).



מאידך, השקיה בקולחים לא העלה את שכיחות החיידקים העמידים לשלושת אנטיביוטיות בקרקעות מעכו והשפד"ן ובמקרים מסוימים דווקא נצפתה רמות עמידות גבוהות יותר בקרקעות אשר הושקו במים שפירים (איור 2).

איור 1. אחוז עמידות לאנטיביוטיקה בחיידקים מבודדים מקרקעות מושקות במים שפירים (אפור) ומי קולחים (שחור) מעכו (9.2010 ו 7.2011) וראשל"צ (8.2011). עמידות לטאטרציקלין (A), ציפרופלוקסצין (B), ואריטרקומיצין (C) בקרקעות



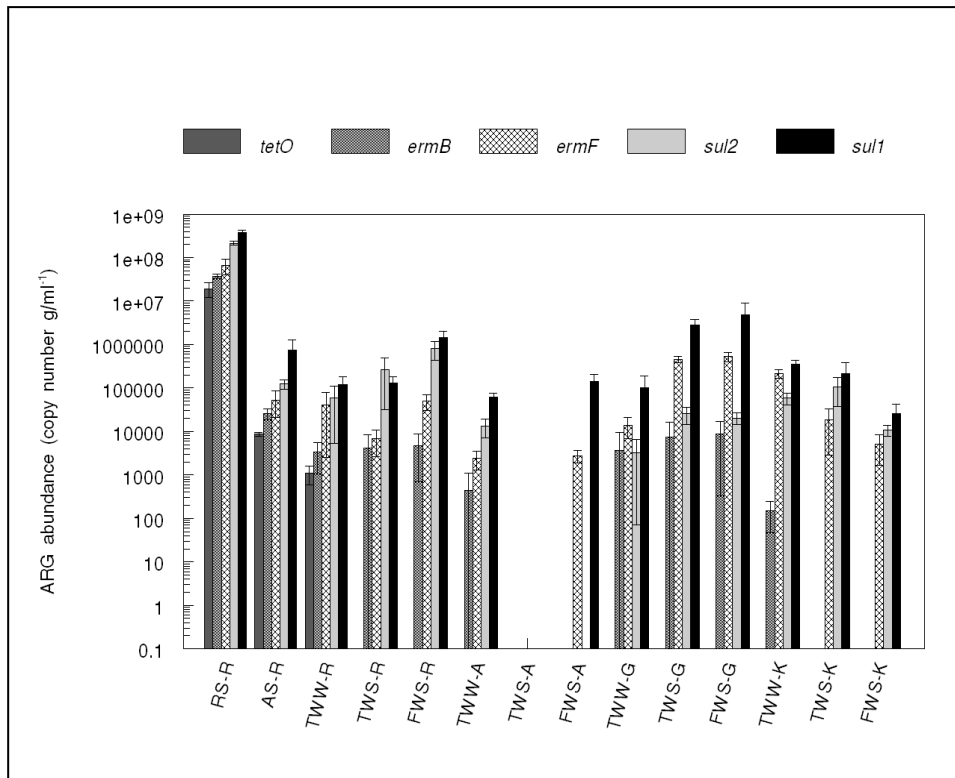
במקביל לשיטות בידוד קלאסיות של חיידקים קרקע, יושמו שיטות מולקולאריות המבוססות על real-time PCR (שאינן מצריכות בבידוד) בכל ארבעת הקרקעות המצוינות למעלה, במי

ההשקיה (קולחים שניוניים) ובביוב הגולמי ובבוצה המשופעלת ממתקן טיהור השפכים בשפד"ן. יוֹשֵׁמו תחלים המגבירים רצפים חלקיים מ- 6 גנים לעמידות שונים - *ermB*, *ermF*, *sul1*, *tetO*, *qnrA*, *qnrA* (טבלה 2).

Primer	target	Sequences	Annealing temp (°C)	Amplicon size (bp)	References
sul1-FW	<i>sul1</i>	CGCACCGGAAACATCGCTGCAC	55.9	163	(14)
sul1-RV		TGAAGTTCGCCGCAAGGCTCG			
sul2-FW	<i>sul2</i>	TCCGGTGGAGGCCGGTATCTGG	60.8	191	(1)
sul2-RV		CGGGAATGCCATCTGCCTTGAG			
TetO-FW	<i>tetO</i>	ACGGARAGTTTATTGTATAACC	60	171	(8)
TetO-RV		TGGCGTATCTATAATGTTGAC			
erm(F)-189f	<i>ermF</i>	CGA CAC AGC TTT GGT TGA AC	56	309	(8)
erm(F)-497r		GGA CCT ACC TCA TAG ACA AG			
erm(B)-91fc	<i>ermB</i>	GAT ACC GTT TAC GAA ATT GG	58	364	(9)
erm(B)-454rc		GAATCGAGACTTGAGTGTGC			
qnrA32F	<i>qnrA</i>	AGGATTTCTCACGCCAGGATT	57	124	(9)
qnrA155R		CGCTTCAATGAAACTGCA			

טבלה 2. רשימת התחלים שיושמו במהלך המחקר

שכיחות הגנים השונים לעמידות לאנטיביוטיקה בדוגמאות השונות מתוארת באיור 3.



איור 3. שכיחות גנים לעמידות לאנטיביוטיקה בביוב גולמי בוצה (RS), משופעלת (AS), מי קולחים מושקה במי קולחים (TWW), מושקה במי קולחים (TWS), קרקע מושקה במים שפירים (FWS); בראשון לציון (R), ענו (A), גילת (G) וקדמה (K).

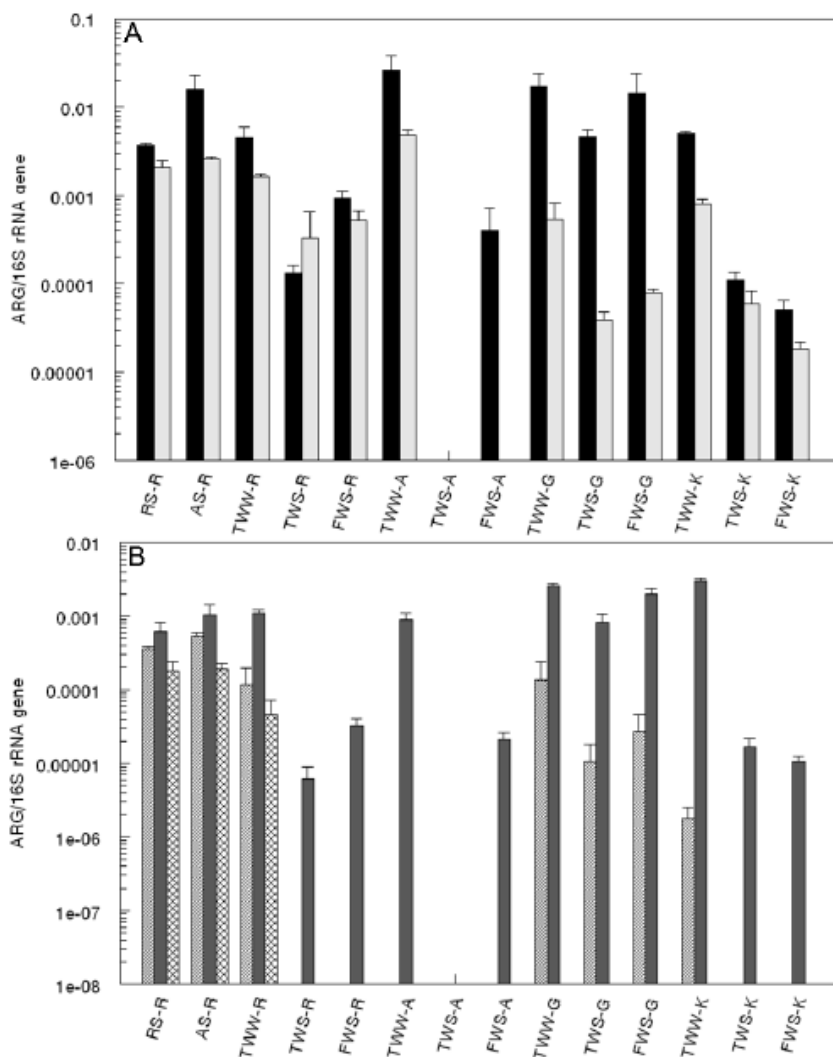
עקב שונות ביעילות ההפקה ותוכנות הקרקעות השונות שכיחות כל אחד מהגנים אשר נבחנו שוקללה לשכיחות החיידקים הכללית בדוגמאות שנמדדה על סמך שכיחות גן ה- 16S rRNA אשר מהווה מדד לסה"כ החיידקים בדוגמה כלשהי. שכיחות החיידקים הכללית בכל אחד מהדוגמאות מתוארת בטבלה 3.

Site	Bacterial abundance (16S rRNA copy number/ml (water) or gram (soil and sludge))				
	Influent sewage (Shafdan WWTP)	Activated sludge (Shafdan WWTP)	TWW	TWW-irrigated soil	FW- irrigated soil
Reshon Lezion	$1.0 \cdot 10^{11} \text{ g}^{-1}$	$4.8 \cdot 10^7 \text{ ml}^{-1}$	$36 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$	$1.1 \cdot 10^9 \text{ g}^{-1}$	$1.5 \cdot 10^9 \text{ g}^{-1}$
Akko Gilat	-	-	$2.7 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$	$2.2 \cdot 10^9 \text{ g}^{-1}$	$1.4 \cdot 10^9 \text{ g}^{-1}$
Kedma	-	-	$5.4 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$	$0.7 \cdot 10^9 \text{ g}^{-1}$	$0.3 \cdot 10^9 \text{ g}^{-1}$
	-	-	$70 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$	$1.8 \cdot 10^9 \text{ g}^{-1}$	$1.3 \cdot 10^9 \text{ g}^{-1}$

טבלה 3. הערכת כמות החיידקים הכללית בדוגמאות מט"ש, מים וקרקעות בעזרת מדידת שכיחות עותקי גן ה- 16S rRNA.

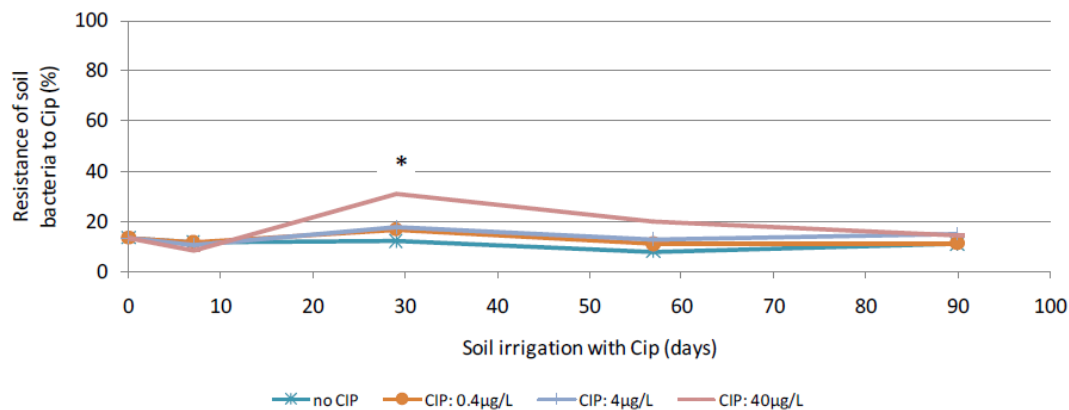
שכיחות גני העמידות לאנטיביוטיקה המשוקללים לגן ה- 16S rRNA מתוארים באיור 4.

איור 4. שכיחות יחסית של גנים לעמידות לאנטיביוטיקה (משוקלל לכמות עותקי גן ה- 16S rRNA) נמדדו בעזרת PCR כמותי בביוב גולמי (RS), בוצה משופעלת (AS), מי קולחים (TWW), קרקע מושקה במי קולחים (TWS), קרקע מושקה במים שפירים (FWS); בראשון לציון (R), עכו (A), גילת (G) וקדמה (K). **גרף (A)** - *sul1* (עמודים שחורים), *ermB* (עמודים משובצים), *ermF* (עמודים אפורים) (עמודים בהירים) (עמודים לבנים); **גרף (B)** - *tetO* (עמודים שחורים), *ermB* (עמודים משובצים), *ermF* (עמודים אפורים) (עמודים בהירים) (עמודים לבנים).



ניתן לראות רמות יחסית גבוהות של גנים בביוב הגולמי ואפילו עלייה בשכיחות היחסית של הגנים בבוצה המשופעלת, המצביע על העשרה של חיידקים עמידים במהלך תהליך הטיפול בשפכים (איור 4). ניתן גם לראות הבדלים משמעותיים בשכיחות היחסית של הגנים בקרקעות השונות. אולם, בכל ארבעת הקרקעות למעט קרקעות מקדמה, שכיחות הגנים העמידים הייתה גבוהה יותר בקרקעות שהושקו במים שפירים ביחס לקרקעות מקבילות אשר הושקו במי קולחים.

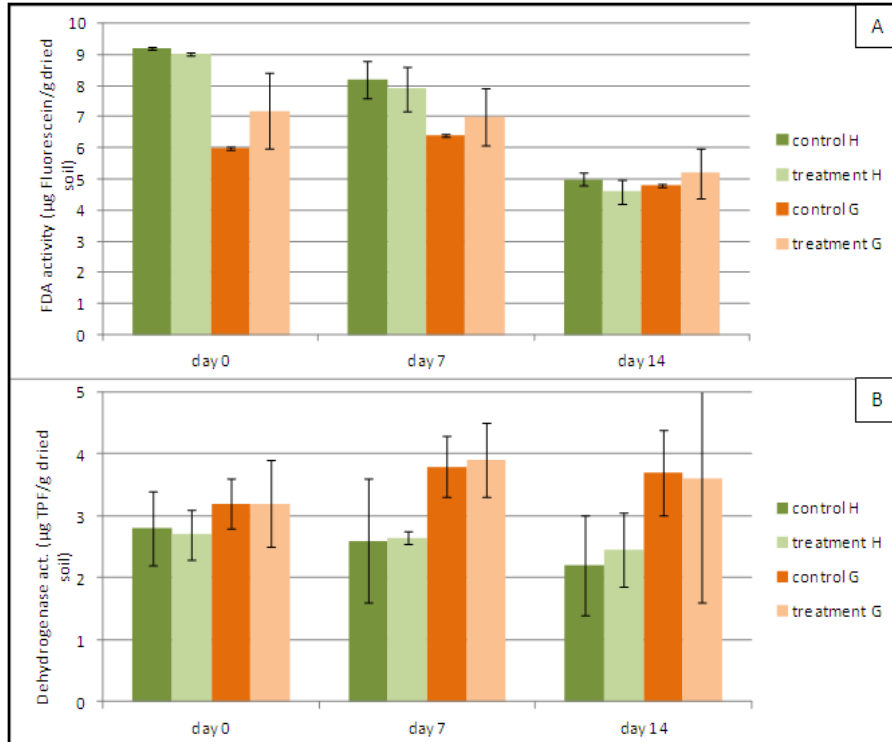
בניסוי מיקרוקוסמוס. חלק זה של המחקר בחן האם תרכובות אנטיביוטיות במי השקיה מעלה את שכיחות החיידקים העמידים לאנטיביוטיקה בקרקע. דהיינו, האם חשיפת חיידקי קרקע ללחץ סלקטיבי בצורת תרכובות אנטיביוטיות גרם לעלייה בשכיחות היחסית של החיידקים העמידים. בניסוי ראשון (איור 5), הושקו קרקעות עכו בריכוזים שונים של ציפרופלוקסצין ונבחנו לאורך זמן כמות החיידקים העמידים. למעט בדיגום שנלקח 30 יום לאחר תחילת הניסוי בתוספת מינונים של $40 \mu\text{g/L}$ ציפרופלוקסצין, לא היה הבדל מובהק ברמת החיידקים העמידים. יש לציין שריכוזי ציפרופלוקסצין בקולחים הם לרוב בטווח של $0.4\text{--}2 \mu\text{g/L}$ (עובדיה לב מדידות ממט"ש ירושלים). כלומר העלייה נצפתה רק כאשר ריכוזי האנטיביוטיקה היו פי-20 מהרמות הצפויות בקולחים.



איור 5. השפעת השקיה ברמות ציפרופלוקסצין שונות על השכיחות היחסית של חיידקי הקרקע העמידים לציפרופלוקסצין.

בסדרת ניסויים נוספת, בחנו מיקרוקוסמוס בתוספת ספטריאקסון ($2 \mu\text{g/ml}$)- אנטיביוטיקה מקבוצת הבטה לקטמים. על מנת לעודד גידול של החיידקים ובכך להגדיל את האפקט המצופה של תוספת האנטיביוטיקה, ולחקות טוב יותר את השפעת הקולחים. השקינו בתמיסה אורגנית מהולה אשר הכיל מינון קליני של אנטיביוטיקה (כשלושה סדרי גודל יותר מהריכוזים הנמדדים בקולחים), ועקבנו אחר פעילות המיקרוביאלית והרכב האוכלוסייה החיידקית בקרקע. במקביל

בוצע ניסוי זהה בקרקעות מהוואי, בארה"ב. אומדן הפעילות המיקרוביאלית בעזרת שתי בדיקות אנזימאטיות נפוצות (FDA fluorescein diacetate hydrolytic activity) (dehydrogenase I) לא הראה הבדל בפעילות החיידקים מהמיכלים אשר הושקו באנטיביוטיקה ביחס לביקורת (איור 6).



איור 6. אומדן פעילות מיקרוביאלית בעזרת בדיקות אנזימאטיות: (A) FDA ו (B) dehydrogenase, בקרקעות מגילת (כתום) והוואי (ירוק). גוונים כהים – ללא תוספת אנטיביוטיקה. גוונים בהירים – (2 µg/ml ceftriaxone). בקרקעות

במקביל לבדיקת הפעילות המיקרוביאלית נבדק גם הרכב אוכלוסיות החיידקים בקרקעות המושקות בתחילת הניסוי, לאחר שבוע, ולאחר שבועיים בעזרת שיטה מולקולאריות חדשנית המתבססת על הפקת DNA, הגברת רצף חלקי של גן ה-16S rRNA וריצוף מסיבי בעזרת pyrosequencing. רוב חיידקים בקרקעות השתייכו למערכת ה-actinobacteria, proteobacteria, firmicutes ו acidobacteria. נצפו הבדלים בהרכב האוכלוסיות במהלך הזמן, אולם, לא היו הבדלים משמעותיים בין המערכות שהושקו באנטיביוטיקה ביחס לביקורת (טבלה 4). סרקנו בעזרת PCR נוכחות של גנים מסוג ESBL -extended spectrum beta-lactamases (המקנים עמידות לספטרטיקסון ומהווים בעיה אפידמיולוגית קשה בפתוגנים) בטיפולים השונים של ניסוי המיקרוקוסמוס. נמצאה נוכחות של גנים מסוג bla_{TEM} בכל הדוגמאות ואילו בדוגמאות קרקע החוליות מגילת נמצאו גנים מסוג bla_{CTX-M}, אחד ה-ESBLים הבעייתיים ביותר בפתוגנים גרם שליליים. אם זאת, לא הייתה העשרה של גנים אלה בטיפולים אשר קיבלו אנטיביוטיקה.

טבלה 4. השוואת הרכב האוכלוסיות המיקרוביאליות בביקורת ללא אנטיביוטיקה (C), לטיפול בספטריאקסון (A) בקרקעות משבוע (T7) ושבועיים (T14). אנליזות מסוג multi-response permutation procedures (MRPP) בוצעו בשלוש חזרות בתוכנת PC-ORD.

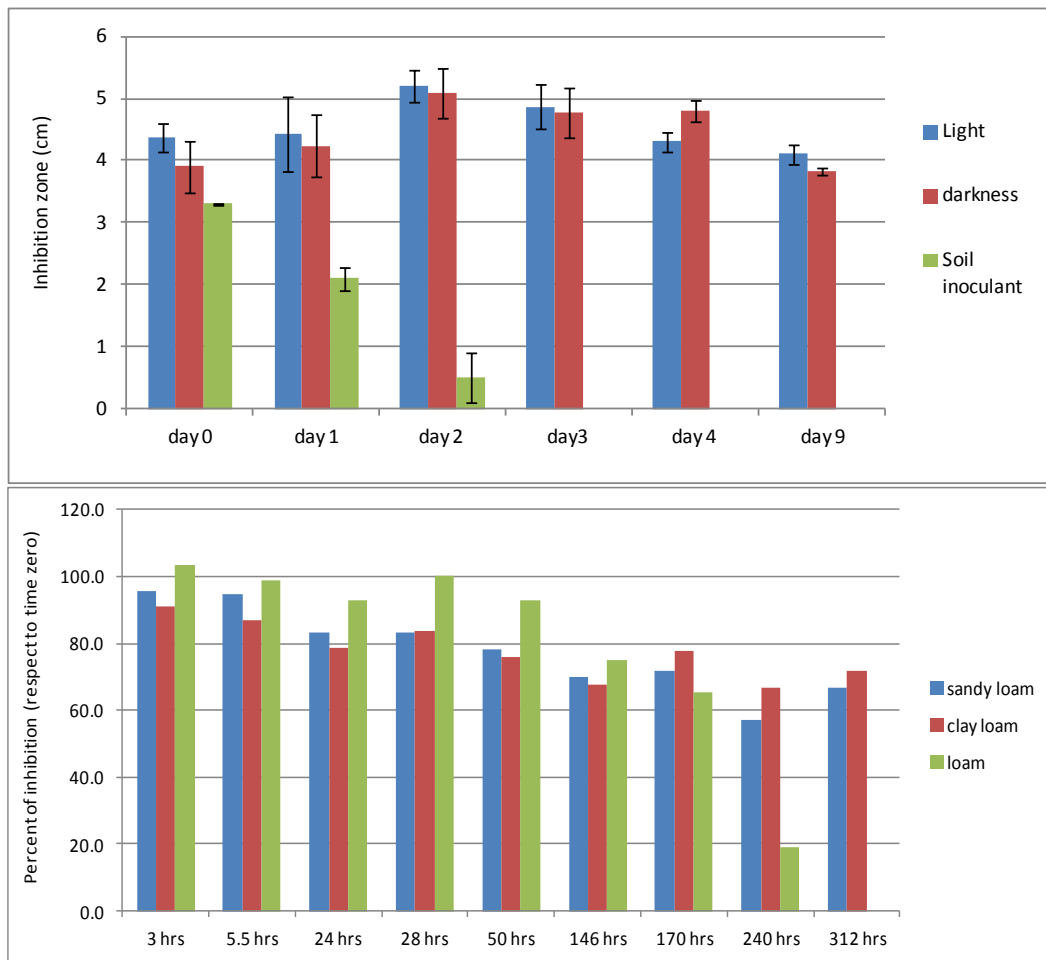
Soil	Comparison	p value
Sandy loam (Israel)	T7C vs T7A	0.25
	T14C vs T14A	0.33
(Hawaii)	T7C vs T7A	0.91
	T14C vs T14A	0.62

טבלה 5. הימצאות גנים מסוג ESBL בנקודות דיגום שונות של שלוש קרקעות מניסוי המיקרוקוסמוס.

Soil	Treatment	blaTEM	blaSHV	blaCTX-M	blaOXA	blaVIM	blaNDM
Sandy loam	Original soil	+	-	+	-	-	-
	Control 1 (1 day)	+	-	+	-	-	-
	Antibiotic treatment 1 (1 day)	+	-	+	-	-	-
	Control 2 (2 days)	+	-	+	-	-	-
	Antibiotic treatment 2 (2 days)	+	-	+	-	-	-
	Control 7 (7 days)	+	-	+	-	-	-
	Antibiotic treatment 7 (7 days)	+	-	+	-	-	-
Clay loam	Original soil	+	-	-	-	-	-
	Control 1 (1 day)	+	-	-	-	-	-
	Antibiotic treatment 1 (1 day)	+	-	-	-	-	-
	Control 2 (2 days)	+	-	-	-	-	-
	Antibiotic treatment 2 (2 days)	+	-	-	-	-	-
	Control 7 (7 days)	+	-	-	-	-	-
	Antibiotic treatment 7 (7 days)	+	-	-	-	-	-
Loam	Original soil	+	-	-	-	-	-
	Control 1 (1 day)	+	-	-	-	-	-
	Antibiotic treatment 1 (1 day)	+	-	-	-	-	-
	Control 2 (2 days)	+	-	-	-	-	-
	Antibiotic treatment 2 (2 days)	+	-	-	-	-	-
	Control 7 (7 days)	+	-	-	-	-	-
	Antibiotic treatment 7 (7 days)	+	-	-	-	-	-

בעקבות ניסוי המיקרוקוסמוס, עלתה השאלה האם חוסר השפעה של האנטיביוטיקה על אוכלוסיות המיקרוביאליות בקרקע נבעה מפרוק ביולוגי של הספטריאקסון (פעילות בטו-לקטמית של ה-ESBLs) או לחלופין כתוצאה מחוסר היציבות של האנטיביוטיקה עצמה. בוצעה ניסוי

אינקובציה בה נחשף הספטריאקסון לאור וטמפרטורה גבוהה (30°C) ללא חיידקים ובמקביל תמציות קרקע משלושת הקרקעות הורחפו בתמיסת אנטיביוטיקה זהה לבחון פוטנציאל פרוק מיקרוביאלי. בזמנים קצובים מתחילת הניסוי, טפטפנו אנטיביוטיקה על גבי צלחות שאליהם נזרעו חיידקי E. coli, ועקבנו אחר קוטר העיכוב של החיידקים במדד לפעילות האנטיביוטית. מהתוצאות ניתן לראות בברור שפעילות האנטיביוטיקה לא הושפעה מאור או מטמפרטורה. אולם, בנוכחות קרקע לא סטרילית נצפתה ירידה מהירה בפעילות האנטיביוטיקה ולאחר יומיים כבר לא היה פעילות. מאידך, בקרקעות שעברו עיקור הירידה בפעילות הייתה נמוכה בהרבה, דבר המצביע על פרוק מיקרוביאלי.



איור 7. למעלה- אומדן פעילות אנטיביוטית בנוכחות אור (כחול), חושך (אדום) וקרקע לא סטרילית (ירוק) כתלות בזמן. למטה- אומדן פעילות אנטיביוטית בנוכחות קרקעות מעוכרות.

דין

כפי שהוזכר, מטרת מחקר זו הייתה להעריך את השפעת ההשקיה בקולחים על רמת העמידות לאנטיביוטיקה של חיידקי הקרקע. סיכום המחקר המקיף המוצג לעיל מצביע על מספר ממצאים חשובים:

- א) על סמך שיטות בידוד קונבנציונאליות, השקיה במי קולחים ברמת טיהור שניונית אינה משפיעה על רמת העמידות של חיידקי קרקע לשלוש אנטיביוטיקות מודל שנבחנו למרות נוכחות גבוהה יחסית של חיידקים עמידים וגנים לעמידות בקולחים שניוניים ששימשו להשקיה.
- ב) בקרקעות חקלאיות ישנם רמות גבוהות של חיידקים עמידים לאנטיביוטיקה ללא קשר לאיכות מי השקיה.
- ג) חשיפת חיידקי קרקע לתרכובות אנטיביוטיות (גם בסדרי גודל יותר מריכוזי הצפויים בקולחים) אינה משפיעה באופן משמעותי על הפעילות המיקרוביאלית או על הרכב אוכלוסיות החיידקים בקרקע ולא גורמת לעלייה משמעותית בשכיחות היחסית של חיידקים עמידים בקרקע. נראה שהעמידות הטבעית הגבוהה בקרקעות אחראית לכך כמו גם לפרוק המואץ שעוברות תרכובות אנטיביוטיות מסוימות בקרקע. ניתן להתייחס לתוצאות שהתקבלו במהלך המחקר באופטימיות זהירה לגבי ההשלכות הבריאותיות של השקיה בקולחים. אולם ישנם מספר שאלות פתוחות שדורשות התייחסות ראשית, יש צורך לבדוק את ההשפעה של ההשקיה בקולחים על רמת העמידות בתוצרת חקלאית כדי לשלול מכל וכל את הסכנות הכרוכות בנושא זה. כמו כן יש להתמקד בעתיד באופן ספציפי במנגוני עמידות הנישאים על גבי פלסמידים ווקטורים גנטיים אחרים העלולים להעביר גנים לעמידות בין סביבות שונות ולהגביר את סכנת העמידות לאנטיביוטיקה.

פירוט מלא של הפרסומים המדעיים

פרסומים:

1. Negreanu, Y., Pasternak, Z. Jurkevitch E. and **Cytryn E.** (2012) Impact of treated wastewater irrigation on antibiotic resistance in agricultural soils. *Environ. Sci. Technol.* 46: 4800-4808.
2. Gatica, J. and **Cytryn, E.** Impact of treated wastewater irrigation on antibiotic resistance in the soil microbiome. *Environ. Sci. Pollut. DOI 10.1007/s11356-013-1505-4.*

תקצירים לכנסים:

1. Negreanu, Y., Jurkevitch E., Pasternak, Z., Fine, P, and **Cytryn, E.** Effect of treated wastewater irrigation on proliferation of antibiotic resistance in agricultural soils. The 6th Congress of the Federation of the Israel Societies for Experimental Biology - FISEB (ILANIT), Eilat, Israel, 2011.
2. Negreanu, Y., Jurkevitch E., Pasternak, and **Cytryn, E.** Impact of treated wastewater irrigation on antibiotic resistance in agricultural soils. 26th SETAC World Congress, Berlin, Germany, 2012.
3. Gatica-Arias, J., Negreanu, Y., Yang, K. Pasternak, Z. Jurkevitch, Z. and Yan, T. and **Cytryn E.** The soil resistome: The anthropogenic, the native, and the unknown The 14th International Symposium on Microbial Ecology, Copenhagen, Denmark. 2012.
4. **Cytryn E.** NIREAS-IWRC sponsored symposium on "Wastewater reuse applications and contaminants of emerging concern", Limassol, Cyprus.2012

- .1 **Aminov, R. I., N. Garrigues-Jeanjean, and R. I. Mackie.** 2001. Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins. *Applied and environmental microbiology* **67**:22-32.
- .2 **Aminov, R. I., and R. I. Mackie.** 2007. Evolution and ecology of antibiotic resistance genes. *FEMS microbiology letters* **271**:147-161.
- .3 **Avisar, D., Y. Lester, and D. Ronen.** 2009. Sulfamethoxazole contamination of a deep phreatic aquifer. *Science of The Total Environment* **407**:4278-4282.
- .4 **Baquero, F., J. L. Martinez, and R. Canton.** 2008. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology* **19**:260-265.
- .5 **Binh, C. T., H. Heuer, M. Kaupenjohann, and K. Smalla.** 2008. Piggery manure used for soil fertilization is a reservoir for transferable antibiotic resistance plasmids. *FEMS microbiology ecology* **66**:25-37.
- .6 **Canton, R.** 2009. Antibiotic resistance genes from the environment: a perspective through newly identified antibiotic resistance mechanisms in the clinical setting. *Clinical Microbiology and Infection* **15**:20-25.
- .7 **Chee-Sanford, J. C., R. I. Mackie, S. Koike, I. G. Krapac, Y. F. Lin, A. C. Yannarell, S. Maxwell, and R. I. Aminov.** 2009. Fate and transport of antibiotic residues and antibiotic resistance genes following land application of manure waste. *Journal of Environmental Quality* **38**:1086-1108.
- .8 **Chen, J., Z. Yu, F. C. Michel Jr, T. Wittum, and M. Morrison.** 2007. Development and application of real-time PCR assays for quantification of erm genes conferring resistance to macrolides-lincosamides-streptogramin B in livestock manure and manure management systems. *Applied and Environmental Microbiology* **73**:4407.
- .9 **Cummings, D. E., K. F. Archer, D. J. Arriola, P. A. Baker, K. G. Faucett, J. B. Laroya, K. L. Pfeil, C. R. Ryan, K. R. U. Ryan, and D. E. Zuill.** 2011. Broad dissemination of plasmid-mediated quinolone resistance genes in sediments of two urban coastal wetlands. *Environmental Science & Technology* **45**:447-454.
- .10 **Davies, J., and D. Davies.** 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **74**:417-433.
- .11 **Inbar, Y.** 2007. New standards for treated wastewater reuse in Israel. *Wastewater Reuse–Risk Assessment, Decision-Making and Environmental Security*:291-296.
- .12 **Jueschke, E., B. Marschner, J. Tarchitzky, and Y. Chen.** 2008. Effects of treated wastewater irrigation on the dissolved and soil organic carbon in Israeli soils. *Water Science and Technology* **57**:727-733.
- .13 **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.
- .14 **Pei, R., J. Cha, K. H. Carlson, and A. Pruden.** 2007. Response of antibiotic resistance genes (ARG) to biological treatment in dairy lagoon water. *Environmental Science & Technology* **41**:5108-5113.
- .15 **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.

סיכום עם שאלות מנחות

<u>מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה.</u>
להעריך את השפעת ההשקיה בקולחים על רמת העמידות לאנטיביוטיקה בחיידקי קרקע.
<u>עיקרי הניסויים והתוצאות.</u>
הערכת רמת העמידות של חיידקי קרקע (בעזרת שיטות בידוד קונבנציונאליות ומולקולאריות אשר אינן דורשות בידוד) ארבע קרקעות שונות המושקות במקביל בקולחים ובמים שפירים. עיקר ממצאי העבודה הם: (א) בהתבסס על שיטות בידוד קונבנציונאליות ואנליזות מולקולאריות לא תלויות-בידוד, השקיה בקולחים אינה גורמת לעלייה ברמת העמידות בקרב חיידקי הקרקע. זאת למרות רמות גבוהות של חיידקים עמידים לאנטיביוטיקה ושל גנים לעמידות הקיימות במי הקולחים. (ב) קרקעות חקלאיות מתאפיינות ברמות גבוהות של חיידקים עמידים לאנטיביוטיקה ללא קשר לאיכות מי ההשקיה. (ג) חשיפת קרקעות לריכוזי אנטיביוטיקה אופניים לקולחים אינה משפיעה על רמת העמידות של חיידקי הקרקע.
<u>מסקנות מדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדוח?</u>
נכון לעכשיו לא נראה שיש השפעה של השקיה במי-קולחים על רמת העמידות לאנטיביוטיקה בקרקע, אולם יש צורך במספר ניסויים נוספים ע"מ לקבוע שאכן זה המצב.
<u>בעיות שונות לפתרון ו/או שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה; התייחסות המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנותרה לביצוע תוכנית המחקר?</u>
<ul style="list-style-type: none"> • האם וכיצד השקיה בקולחים משפיעה על רמת העמידות בתוצרת חקלאית. • האם השקיה בקולחים מעשיר את הקרקע בגנים לעמידות לאנטיביוטיקה הנישאים על גבי ווקטורים גנטיים ניידים כגון פלסמידים, אשר יכולים לתרום באופן משמעותי לתופעת העמידות לאנטיביוטיקה.
<u>הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח: פרסומים בכתב - ציטט ביבליוגרפי כמקובל בפרסום מאמר מדעי; 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>
Negreanu, Y., Pasternak, Z. Jurkevitch E. and Cytryn E. (2012) Impact of treated wastewater irrigation on antibiotic resistance in agricultural soils. <i>Environ. Sci. Technol.</i> 46: 4800-4808. Gatica, J. and Cytryn, E. Impact of treated wastewater irrigation on antibiotic resistance in the soil microbiome. <i>Environ. Sci. Pollut. DOI 10.1007/s11356-013-1505-4.</i>
<u>תקצירים לכנסים:</u>
Negreanu, Y., Jurkevitch E., Pasternak, Z., Fine, P, and Cytryn, E. Effect of treated wastewater irrigation on proliferation of antibiotic resistance in agricultural soils. The 6th Congress of the Federation of the Israel Societies for Experimental Biology - FISEB (ILANIT), Eilat, Israel, 2011. Negreanu, Y., Jurkevitch E., Pasternak, and Cytryn, E. Impact of treated wastewater irrigation on antibiotic resistance in agricultural soils. 26th SETAC World Congress, Berlin, Germany, 2012. Gatica-Arias, J., Negreanu, Y., Yang, K. Pasternak, Z. Jurkevitch, Z. and Yan, T. and Cytryn E. The soil resistome: The anthropogenic, the native, and the unknown The 14th International Symposium on Microbial Ecology, Copenhagen, Denmark. 2012. Cytryn E. NIREAS-IWRC sponsored symposium on "Wastewater reuse applications and contaminants of emerging concern", Limassol, Cyprus.2012.
<u>פרסום הדוח: אני ממליץ לפרסם את הדוח: (סמן אחת מהאופציות)</u>
<input type="radio"/> ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט)
האם בכוונתך להגיש תוכנית המשך בתום תקופת המחקר הנוכחי? כן