

דוח לתכנית מחקר מספר 11-0177-421

שיפור הבטיחות המיקרוביולוגית של תוצרת טרייה לפני ואחרי הקטיף

Improving Microbial Safety of Fresh Produce Before and After Harvest

דוח מסכם 2009-2011

מוגש לקרן המדען הראשי של משרד החקלאות

צוות המחקר:

שלמה סלע - חוקר ראשי, מח' למדעי המזון, וולקני. דוא"ל: shlomos@volcani.agri.gov.il
נירית ברנשטיין - מכון לקרקע מים וסביבה, וולקני
סימה ירון - הפקולטה להנדסת ביוטכנולוגיה ומזון, טכניון
ויקטור רודוב - מח' לטכנולוגיה ואחסון, וולקני
דודי קניגסבוך - מח' לטכנולוגיה ואחסון, וולקני
יעקב וינוקור - מח' לטכנולוגיה ואחסון, וולקני
ריקי פינטו מח' למדעי המזון, וולקני
בתיה חורב - מח' לטכנולוגיה ואחסון, וולקני

Shlomo Sela (Principal investigator) and Riky Pinto - Microbial Food Safety Unit, Department of Food-Science, Institute of Technology of Post Harvest Produce, The Volcani Center. P.O.B 6, Bet Dagan, 50250. Email: shlomos@volcani.agri.gov.il

Nirit Bernstein- Institute of Soil, Water and Environment, The Volcani Center. P.O.B 6, Bet Dagan, 50250. Email: nirit@volcani.agri.gov.il

Sima Yaron – Department of Food Engineering and Biotechnology, Technion, Haifa. Email: simay@tx.technion.ac.il

Victor Rodov, Yakov Vinokur and Batia Horev – Institute of Postharvest Science of Fresh Produce, The Volcani Center. Email: vrodov@volcani.agri.gov.il

David Kenigsbuch - Institute of Postharvest Science of Fresh Produce, The Volcani Center. Email: davke@volcani.agri.gov.il

אוקטובר, 2012

אב תשע"א

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא



חתימת החוקר:

עמוד	תוכן עניינים
3	תקציר מדעי של תכנית המחקר
4	1. מבוא.....
4	2. מטרת המחקר.....
16-4	3. פירוט עיקרי הניסויים.....
6-4	3.1 מציאת ריכוז החיידקים המינימאלי במי ההשקיה שגורם לזיהום פטרוזיליה וריחן.....
5-4	3.1.1 זיהוי חיידקים בספירה חיה.....
6-5	3.1.2 זיהוי חיידקים ע"י qRT-PCR.....
6	3.2 מעקב אחר מספר החיידקים בחלקי הצמח השונים לאחר השקיה במים מאולחים.....
6-7	3.3 השפעת שיטת ההשקיה ומשטר ההשקיה על מידת הזיהום.....
7	3.3.1 בדיקת חיידקים על פני הצמח לאחר השקיה בריסוס בשעות היום כתלות ברמת האילוח..
7	3.3.2 השפעת השקיית יום בריסוס לעומת השקיית לילה על סלמונלה בפטרוזיליה ובריחן.....
8-7	3.3.3 השפעת השקיה בטפטוף בשעות היום על הימצאות חיידקים על פני ריחן ופטרוזיליה.....
8-9	3.3.4 מידת הזיהום בצמח כתלות בעונת הגידול.....
9	3.3.5 נוכחות סלמונלה בצמחים שהושקו במים מאולחים בריכוזים נמוכים של חיידקים.....
10-12	3.4 חדירה של חיידקי סלמונלה דרך מערכת שורשים.....
10-11	3.4.1 השפעת גיל הצמח.....
11	3.4.2 השפעת השקיה ממושכת במים מזוהמים
12	3.4.3 מיקום חיידקי הסלמונלה בצמח לאחר החדירה.....
11	3.4.4
12	3.5 הישרדות חיידקי סלמונלה על פני העלים.....
13	3.6 הישרדות החיידקים על פני הצמח לאורך הגידול.....
14-17	3.7 השפעת טיפולי חום והדמיה של הובלה אווירית וחיי מדף על הישרדות סלמונלה על עלי ריחן.
14	3.7.1 השפעת טיפול בחום על ספירה כללית של חיידקים בעלי ריחן.....
15	3.7.2 השפעת טיפול בחום על ספירת חיידקי סלמונלה בעלי ריחן.....
15	3.7.3 שחרור Eugenol ע"י עלי ריחן במהלך האחסון.....
15-16	3.7.4 השפעת תנאי ההובלה והאחסון על ספירה החיידקים על עלי פטרוזיליה.....
17-18	4. דיון
19	5. פרוט מלא של הפרסומים המדעיים
20	6. ביבליוגרפיה
21-22	סיכום עם שאלות מנחות

תקציר

הצגת הבעיה (חשיבות, מטרות)

זיהום של צמחי תבלין וירקות עליים גורם לנזק בריאותי ולהפסדים כלכליים ישירים למגדלים ולמשווקים. המטרות העיקריות של המחקר הנוכחי הינן: (1) הבנת הגורמים המשפיעים על חדירת הפתוגן סלמונלה לצמחי מאכל (פטרוזיליה וריחן) ו- (2) בחינת הישרדות הפתוגן על התוצרת בהקשר לתנאי האחסון וטיפולים לאחר הקטיף.

מהלך הניסויים, שיטות העבודה ותוצאות עיקריות

צמחי ריחן ופטרוזיליה הושקו במים המכילים סלמונלה ע"י ריסוס וע"י טפטוף ומידת הזיהום נמדדה. השקיה בריסוס גורמת לאילוח רב יותר מאשר השקיה בטפטוף. אולם, ההשקיה בטפטוף גורמת לזיהום גבוה יותר של פטרוזיליה לעומת ריחן. משטר ההשקיה (השקיית יום לעומת השקיית לילה) הינו בעל השפעה שונה על שני הגידולים. מידת הזיהום של הצמח תלויה גם בעונת הגידול ומשתנה מצמח לצמח. שימוש בשיטת זיהוי מולקולרית (qPCR) הדגים כי גם ריכוזים נמוכים יחסית של החיידק במים (כ 300 חיידקים למ"ל) יכולים לגרום לזיהום הצמח, אם כי בשכיחות נמוכה. צמחי פטרוזיליה שזוהמו בסלמונלה נשארו מזוהמים בחיידק לפחות חודש ממועד הזיהום.

נמצא כי סלמונלה מסוגלת לחדור לתוך הצמח דרך השורש, אם כי ביעילות נמוכה. בריחן החדירה הייתה תלויה בגיל הצמח. חדירה מרבית התרחשה בצמחים בוגרים. לאחר חדירה דרך השורש חיידקי הסלמונלה התפשטו בצמח והגיעו לאיברים שונים, כולל גבעולים, עלים ותפרחות. לאחר זיהום חיצוני של שטח פני העלים בחיידקי סלמונלה הפתוגן אינו שורד טוב על פני העלה. אולם ניתן לזהות את החיידק בצמח גם לאחר חודש.

טיפול תרמי מקובל של הריחן לאחר קטיף ותנאי המשלוח של התוצרת לחו"ל אינם פוגעים באיכות המיקרוביאלית של הצמח. גם בפטרוזיליה לא נראתה ירידה משמעותית באיכות המיקרוביאלית של התוצרת לאחר הדמיה של משלוח ימי או אווירי. הן בפטרוזיליה והן בריחן נצפתה ירידה במספר חיידקי הסלמונלה במהלך האחסון, אך הדוגמאות נשארו חיוביות לסלמונלה בסוף חיי המדף.

מסקנות והמלצות

צמחי ריחן ופטרוזיליה המושקים במים מזוהמים בסלמונלה עלולים להזדהם בחיידק חיצוני או פנימי. הזיהום מתרחש גם כאשר ריכוז הפתוגן נמוך יחסית. ההשלכות המעשיות הן שיש להיזהר מהשקיית ירקות עליים וצמחי תבלין במים שאינם באיכות מי שתייה. מאחר שהחיידק מסוגל לשרוד בקרקע ועל הצמח ובתוכו במהלך תקופת הגידול לפחות במשך חודש ימים, יש חשיבות גבוהה למנוע הימצאות של פתוגנים בקרקע ובמי ההשקיה. ההנחה המקובלת כי השקיה בטפטוף מהווה חסם יעיל מפני זיהום, אינה מבוססת. מאחר שאופן ההשקיה, עונת הגידול וסוג הצמח משפיעים על מידת הזיהום, עולה הצורך להעריך את סיכויי הזיהום של כל גידול (סוג צמח) בנפרד, כדי לזהות גידולים רגישים במיוחד הדורשים אמצעי בקרה מחמירים יותר. הממצא כי חיידקים יכולים להתפשט גם לאברים ווגטיביים, יכול להצביע על פוטנציאל לזיהום ורטיקלי באמצעות זיהום הזרע. החיידק אינו מסוגל להתרבות על הצמח בעת הגידול או לאחר הקטיף, לפחות בתנאים שנבדקו במחקר זה. אולם, למרות שמספר החיידקים יורד עם הזמן, גם בזמן הגידול וגם לאחר קטיף במהלך האחסון וחיי המדף, עדיין החיידק שורד על הצמח ועלול בתנאי היגיינה לא נאותים להתרבות ולגרום למחלה.

1 מבוא

בארץ ובעולם גוברת המודעות לסיכון הבטיחותי הכרוך באכילת ירקות מזוהמים ועם המודעות גוברת הדרישה לקבלת ירקות עם מטען מיקרוביאלי נמוך. אירועים כמו הריחן המזוהם בסלמונלה ששווק מישראל לאירופה, או זיהום הנבטים בא. קולי שהתרחש לאחרונה בגרמניה וגרם לאלפי חולים בגרמניה ובארצות נוספות באירופה עם עשרות מקרי מוות, פוגעים פגיעה קשה בחקלאים וביצואנים. לפיכך, הציבור הרחב ער עד מאוד לנושא הבטיחות המיקרוביאלית של התוצרת הטרייה. מפעלים שמשווקים תבלינים טריים, סלטים וירקות חתוכים ומוכנים לאכילה מנסים לעמוד בתקני איכות גבוהים ודורשים מהחקלאי ירקות ברמה מיקרוביאלית גבוהה.

לאחר שהוכחנו בעבודות קודמות כי חיידק הסלמונלה מסוגל לעבור ממי ההשקיה לחלקים האכילים של צמחים שונים, ברצוננו לזהות גורמים משפיעים על תהליך זה. לאור המגמה של הרחבת השימוש במים מטופלים בדרגות שונות לחקלאות, אנו מניחים שבתנאים הקיימים כיום, קיימות אפיוזדות של השקיה חד פעמית או רציפה במים בעלי מטען מיקרוביאלי גבוה שמכילים גם פתוגנים לאדם. הבנת הגורמים שמשפיעים על המעבר של החיידק מן הירק לצמח תאפשר בראש ובראשונה את הורדת הסיכון הבריאותי הגבוה הנובע מקיום של פתוגנים על ירקות. לאחר שהראנו כי חיידקי סלמונלה יכולים לזהם צמחי ריחן ופטרוזיליה ע"י מעבר ממי ההשקיה לחלקים האכילים של הצמח עולה השאלה לגבי גורלם לאחר קטיף ועד תום חיי המדף. צמח שזוהם בעת הגידול עלול לשאת עליו חיידקים לאורך זמן ואפילו עד לקטיף. צמחים מזוהמים יגרמו לזיהום צולב של אגדים אחרים בעת הטיפול לאחר קטיף, האריזה ובמהלך האחסון. מגדלים רבים עורכים טיפול תרמי (38 מ"צ) לצמחי הריחן למשך 8 שעות במטרה למנוע ריקבונות ולהאריך את חיי המדף של התבלין. מאחר שחיידקי סלמונלה מסוגלים להתרבות היטב בתנאים אלה עלתה השאלה האם טיפולים אלה עלולים לסכן את בטיחות התוצרת, קרי, לעודד התרבות הפתוגן במקרה שהגיע לצמח ממקור כלשהו. בנוסף, עד לצרכן עוברים התבלינים אחסון בתנאים שונים אשר לא ידוע השפעתם על האיכות המיקרוביאלית שלהם.

2 מטרת המחקר

- א. הבנת הגורמים המשפיעים על הימצאותו של הפתוגן סלמונלה וחדירתו לצמחי מאכל (פטרוזיליה וריחן).
- ב. בחינת הישרדות הפתוגן על התוצרת בהקשר לתנאי האחסון וטיפולים לאחר הקטיף.

3 פירוט עיקרי הניסויים

3.1 מציאת ריכוז החיידקים המינימאלי במי ההשקיה שגורם לזיהום פטרוזיליה וריחן

3.1.1 זיהוי חיידקים בספירה חיה

ככדי למצוא את ריכוז החיידקים המינימאלי שגורם לזיהום הירק יש תחילה לקבוע מהי השיטה הרגישה ביותר לספירת חיידקי סלמונלה על פני הצמח. לשם כך, אולחו עלים של פטרוזיליה בכמויות ידועות של חיידקים (10^6 - 10^2 cfu/g). העלים יובשו באוויר למשך 45 דקות, ולאחר מכן נוסו שיטות שונות לספירת החיידקים. השיטות שאותן ניסינו הן:

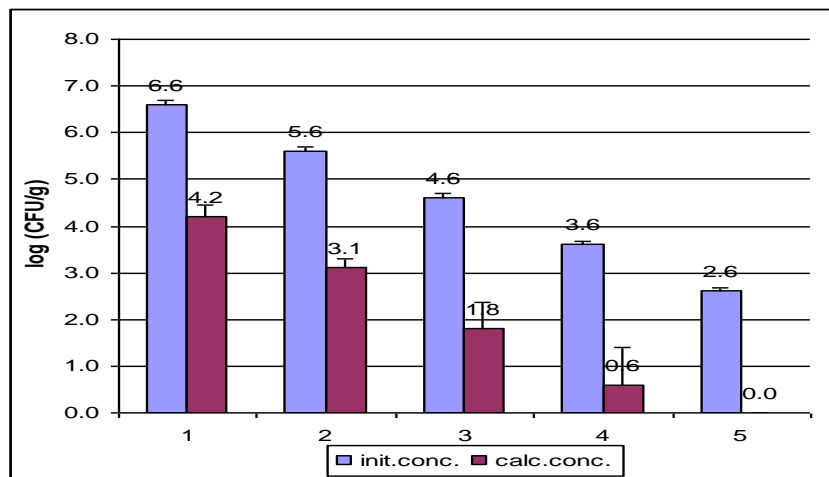
- הכנסת העלים ל 40 מ"ל סליין (עם/בלי Tween 20), ריסוק בסטומכר 3 דקות, איסוף התסנין וזריעה על מצע LB.
- הכנסת העלים ל 20 מ"ל סליין. ריסוק באמצעות מכתש ועלי, איסוף התסנין וזריעה על מצע LB.

- הכנסת 0.1 גר' עלים ל 0.9 מל' סליין והימגון בהומוגניזר למשך 30 שניות. איסוף התסנין וזריעה של המהולים על מצע LB.

- הכנסת העלים ל 20 מל' סליין וסוניקציה עדינה. איסוף נוזל עליון וזריעת החיידקים לשם ספירה. - זיהוי סלמונלה בעלים על פי הפרוטוקול המפורט בתו תקן 7-885 (בשל שלב ההעשרה השיטה היא שיטה איכותית ולא כמותית).

כאשר בוצעה ספירה של החיידקים לאחר הפרדה שלהם מן העלה, השיטות שהראו את המספר הקרוב ביותר למספר החיידקים שהונחו על העלה היו השיטות שבהן החיידקים הופרדו באמצעות סטומכר או באמצעות מכתש ועלי. באיור מספר 1 מוצגות תוצאות הספירות לאחר שיטת הריסוק בסטומכר, שהייתה פשוטה יותר לביצוע. כפי שניתן לראות, גם בשיטה זו ניתן לספור רק כ 1% מכלל החיידקים שהיו על העלה. כשמספר החיידקים נמוך מ 10^3 cfu לא ניתן היה לזהות את החיידקים כלל. שטיפה עם Tween20 בריכוזים של 0.05-5.0% לא שינתה את הספירות של החיידקים. בדיקת החיות של החיידקים על פני העלה הראתה כי לפחות 40% מן החיידקים הם חיים, מכאן ששיטות הספירה המקובלות כיום להערכת סלמונלה על פני הירק המבוססות על ספירה חיה נותנות ערכים שמהווים כ 2% ממספר החיידקים שמצויים באמת על העלה, ואינן מספיק רגישות לזהות חיידקים בריכוז נמוך מאלף חיידקים לגרם. מתוך תוצאות אלו שיטת הספירה ששמשה אותנו להערכה כמותית של חיידקים בפטרוזיליה ובריהן לאחר השקיה במים מאולחים הייתה ספירה חיה לאחר הפרדת החיידקים מרקמת העלה באמצעות סטומכר. יש לקחת בחשבון ששיטה זו מדווחת על ריכוזים נמוכים בהרבה (2% מהחיידקים החיים) ביחס לכמות המקורית ששימשה לאילוח הצמח, אולי מכיוון שלא כל החיידקים הספוחים לרקמת הצמח אכן שוחררו מן הרקמה.

איור 1: ספירה חיה של סלמונלה בעלי פטרוזיליה, לאחר ריסוק העלים בסטומכר. כחול: לוג של מספר החיידקים שטופטפו על גרם עלים. באדום: לוג של מספר החיידקים שנספרו. התוצאות הן ממוצע של לפחות 3 ניסיונות, כל ניסוי בשתי חזרות.



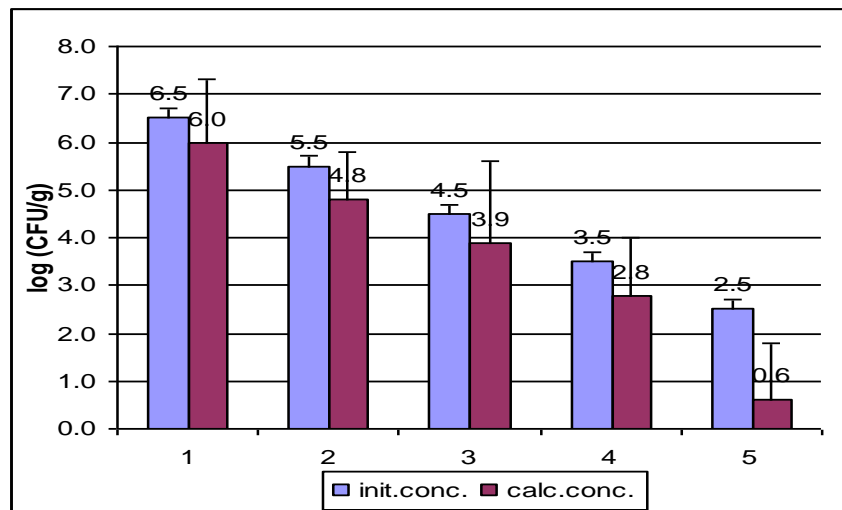
3.1.2 זיהוי חיידקים ע"י qRT-PCR

בשל חוסר היכולת להעריך את המספר האמיתי של החיידקים באמצעות ספירה חיה, במיוחד בריכוזים הנמוכים נעשו ניסיונות להערכה כמותית בשיטה מולקולרית המבוססת על qRT-PCR. דנ"א בקטריאלי הופק ישירות מן העלה בשיטה המבוססת על ה ZR Soil Microbe DNA kitTM ובוצע כימות של החיידקים באמצעות qRT-PCR תוך שימוש בפריימרים ספציפיים ל 16SrDNA של סלמונלה. במקביל ניסינו לבצע qRT-PCR ישירות על חיידקים שהורחקו מן העלים בהרתחה למשך 30 דקות.

ניסיונות המבוססים על qRT-PCR הראו תוצאות טובות יותר. הרתחה של העלים לצורך הפרדה וליזיס של החיידקים הייתה פשוטה מאוד, והערכים שהתקבלו לאחר ראקציית PCR היו נמוכים בסדר גודל אחד בלבד ביחס לכמות החיידקים המקורית על העלה. בשיטה זו ניתן היה לזהות חיידקים גם בריכוז של 3.5 לוג לגרם. הפקה של דנ"א בקטריאלי אמנם קצת יותר יקרה ומורכבת, אך במקרה זה התקבלו התוצאות הטובות ביותר הן מבחינת היחס בין מספר החיידקים שהוכנס למספר שנספר והן מבחינת הרגישות של השיטה, כפי שניתן לראות באיור מספר 2. בשיטה זו ניתן היה לזהות את החיידקים כשהם נמצאים במספרים נמוכים מ 1000 cfu לגרם, וזוהו מעל 20% מהחיידקים שטופטפו על העלים. החיסרון הוא, שלא ניתן לדעת האם החיידקים חיים או מתים. בהתאם לכך, נשתמש בשיטה זו בהמשך המחקר כדי לזהות האם חיידקים עברו ממי ההשקיה לצמח לאחר השקיה עם מים מאולחים בריכוזים נמוכים, מתוך הנחה שאם התוצאה חיובית, יש לה משמעות עצומה – גם אם חלק מן החיידקים מתים.

התוצאות של חלק זה של המחקר מראות כי ניתן לספור בספירה חיה חיידקי סלמונלה בריכוז מכסימלי של 4×10^3 חיידקים לגרם. כימות באמצעות דנ"א כסמן הוא רגיש אף יותר (לפחות פי 10), אולם אינו מספק מידע האם החיידקים שמצויים על העלים אכן חיים.

איור 2. הערכה כמותית של סלמונלה לאחר ראקציית qRT-PCR על דנ"א חיידקי שהופק מעלי הפטרוזיליה. כחול: לוג של מספר החיידקים שטופטפו על גרם עלים. באדום: טרנספורמציה ללוג של מספר החיידקים בהתאם לעקום הכיול של ראקציית ה-PCR. 3 ניסיונות, כל ניסוי נעשה בשתי חזרות.



3.2 מעקב אחר מספר החיידקים בחלקי הצמח השונים לאחר השקיה במים מאולחים

מעקב אחר הימצאות החיידקים בשורשים, גבעולים ובעלים לאחר אילוח בסלמונלה בוצע לאחר אילוח בשיטות ההשקיה השונות ועל כן התוצאות מוצגות יחד עם התוצאות המתארות את השפעת שיטת ההשקיה ומשטר ההשקיה על מידת הזיהום (ראה להלן).

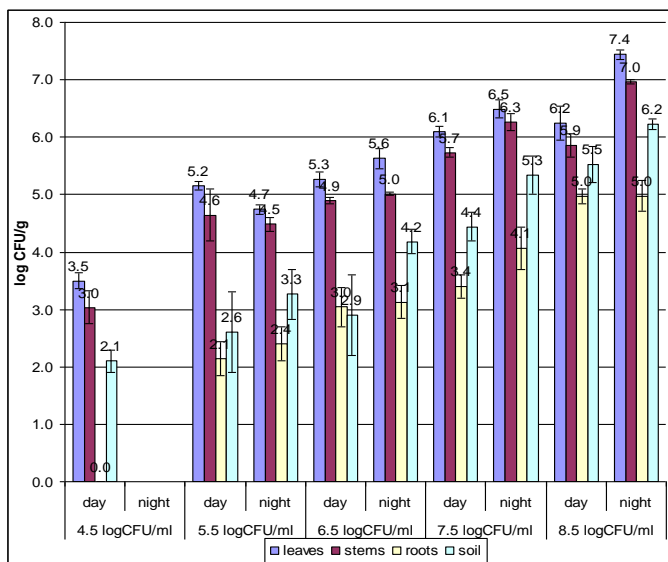
3.3 השפעת שיטת ההשקיה ומשטר ההשקיה על מידת הזיהום

בחלק זה של המחקר בחנו האם השקיה במים מזוהמים בסלמונלה תביא לזיהום של הצמח. ההשקיה התבצעה עם שני גידולים של צמחי תבלין: פטרוזיליה וריחן כמתואר בעבודה קודמת (1). בקצרה, השתילים גודלו בחממה עד הגיעם לצמח בוגר והושקו 3 פעמים במים מזוהמים בחיידק סלמונלה המסומן פלואורסנטית עם GFP בהפרשים של 3 ימים בין השקיה להשקיה. יומיים לאחר ההשקיה השלישית נקצרו השתילים ונלקחו דוגמאות מן האדמה והשורשים לצורך ספירה מיקרוביאלית. הדוגמאות של רקמת הצמח או האדמה רוסקו בסטומכר, נמהלו ונזרעו על פלטות שמכילות את

האנטיביוטיקה אמפיצילין, לצורך ספירה של מושבות ירוקות זוהרות של סלמונלה. המשתנים שנבחנו: השקיה בטפטוף לעומת השקיה בריסוס, השקיית יום לעומת השקיית לילה, והשקיה של אדמה יבשה לעומת אדמה לחה. עבור כל אחד מן המשתנים בחנו האם ההשקיה גורמת להימצאותם של חיידקי סלמונלה באדמה, בשורשים ובחלקים העליונים (הנאכלים) של הצמח. כמו כן נבדק מהו הריכוז המינימאלי במי ההשקיה שעדיין מאפשר לזוהות חיידקים בצמח.

3.3.1 בדיקת הימצאות חיידקים על פני הצמח לאחר השקיה בריסוס בשעות היום כתלות ברמת האילוח

השקית יום בריסוס עם מים מאולחים הביאה לזיהום של העלים הן בפטרוזיליה והן בריחן בכל הריכוזים שנבדקו מעל 10^4 cfu/ml. בהשקיה עם ריכוזים נמוכים יותר לא נמצאו חיידקים בחלקי הצמח. אולם בעוד שהספירות באדמה היו פחות או יותר דומות עבור שני הצמחים (כנראה כתוצאה ממים שטפטפו לאדמה), היה הבדל משמעותי בין הספירות בפטרוזיליה ובריחן. עבור כל ריכוז היו פי 100-1000 יותר חיידקים בעלים או בגבעולים של הפטרוזיליה לעומת ריחן (איורים 3 ו-4).



איור 3. סלמונלה על חלקי הצמח של פטרוזיליה לאחר השקיה בריסוס בשעות היום או הלילה.

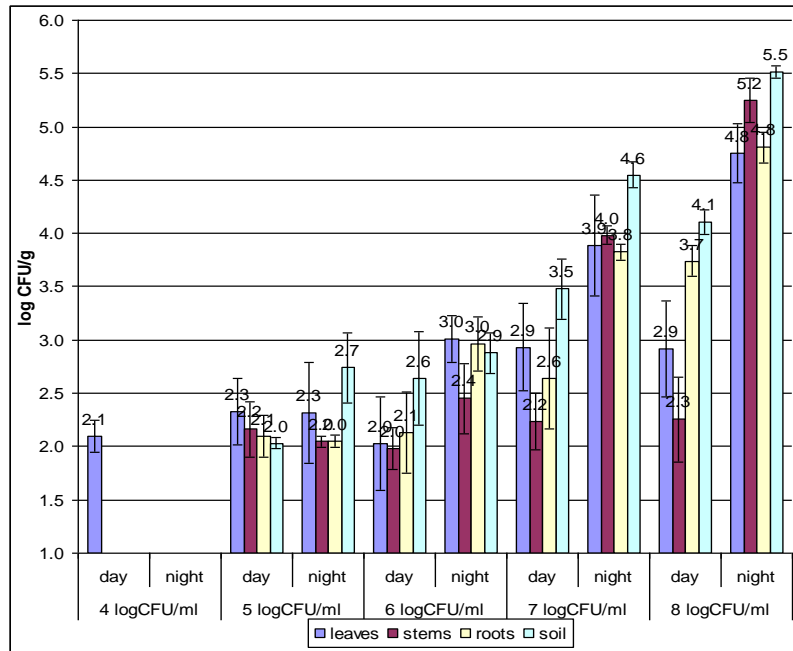
3.3.2 השפעת השקית יום בריסוס לעומת השקיית לילה על הימצאות סלמונלה בפטרוזיליה ובריחן

מאיורים 3 ו 4 ניתן לראות שבעוד שבפטרוזיליה לשעת ההשקיה לא הייתה משמעות לגבי מספר

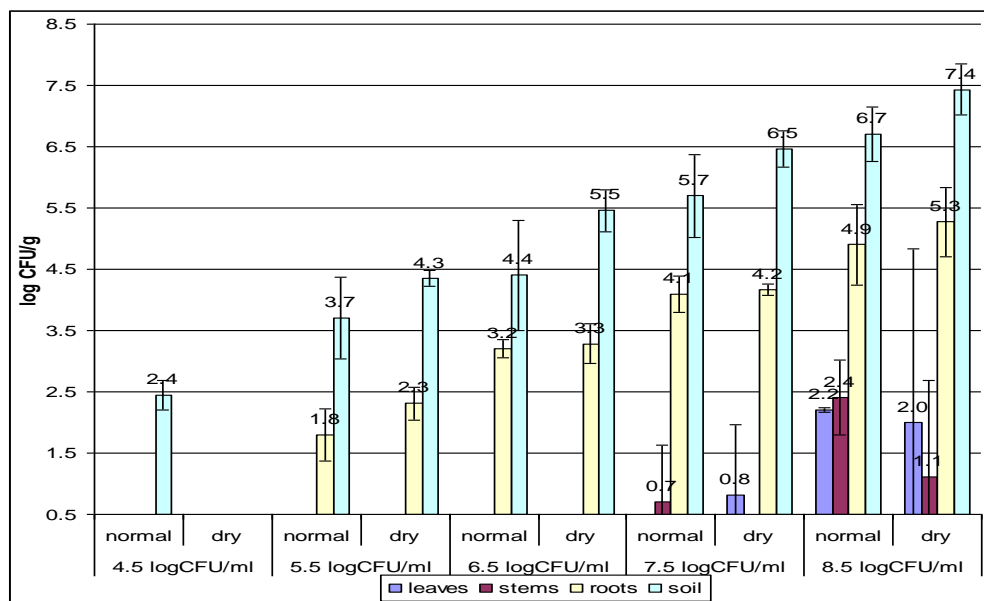
החיידקים על פני הצמח, בריחן התקבלו ערכים גבוהים יותר דווקא כשההשקיה בוצעה בלילה. ההבדלים היו משמעותיים יותר ככל שהריכוז בתמיסת האילוח היה גבוה יותר.

3.3.3 השפעת השקיה בטפטוף בשעות היום על הימצאות חיידקים על פני ריחן ופטרוזיליה

כפי שניתן לראות באיור מספר 5, השקיה של ריחן בטפטוף (ללא מגע ישיר עם העלים) גורמת להימצאות סלמונלה על פני החלקים העליונים של הצמח רק בהשקיה בריכוזים גבוהים ביותר, למרות שהחיידק נמצא באדמה ובשורשים. ממצא זה מעיד על חדירה לכאורה של החיידק מהקרקע דרך השורש אל העלים. בכל ריכוז של חיידקים במים, השקיה בטיפטוף הביאה למספרים נמוכים באופן משמעותי על פני חלקי הצמח העליונים ביחס להשקיה בריסוס, וזאת למרות שבאדמה ובשורשים מספר החיידקים היה דומה או גבוה יותר דווקא לאחר ההשקיה בטיפטוף. לא נמצאו הבדלים משמעותיים בין השקיה של אדמה לחה והשקיה של אדמה יבשה.



איור 4. סלמונלה על חלקי הצמח של ריחן לאחר השקיה בריסוס בשעות היום או הלילה.

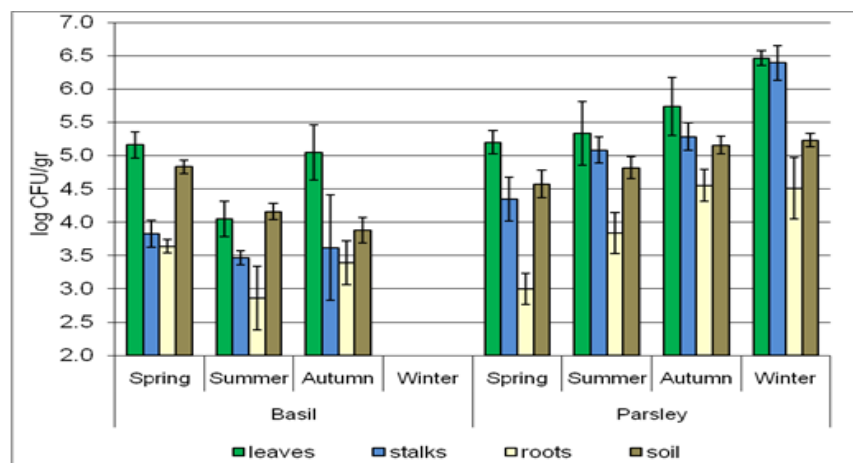


איור 5. סלמונלה על ריחן כתלות במספר החיידקים במי ההשקיה לאחר השקיה בטפטוף לאדמה יבשה או לחה.

3.3.4 מידת הזיהום בצמח כתלות בעונת הגידול

עונת הגידול יכולה להיות גורם נוסף המשפיע על מידת הזיהום של הצמח. כדי לבדוק אפשרות זו, הושקו צמחי בזיל ופטרוזיליה בריסוס עם מים מזוהמים בסלמונלה בעונות שונות של השנה: פטרוזיליה ב 4 עונות, ובזיל שאינו גדל טוב בחורף ב 3 עונות. הצמחים הושקו 3 פעמים (אחת ל-3 ימים) במים שמכילים כ- 8 לוג סלמונלה למ"ל, ויומיים לאחר ההשקיה השלישית נקצרו לצורך ספירות מיקרוביאליות של סלמונלה. כפי שניתן לראות באיור מספר 6,

סלמונלה שורדת על שני הצמחים בכל עונות השנה. בפטרוזיליה ערכי הזיהום הגבוהים ביותר התקבלו בחורף, ואילו בריחן הספירות הנמוכות ביותר התקבלו בקיץ. בקיץ גם היה ההבדל המשמעותי ביותר בין צמחי הפטרוזיליה לצמחי הריחן, יכול להיות שהבדל זה נובע מקיומם של חומרים נדיפים אנטימיקרוביאליים בצמח הריחן כדוגמת לינולול.



איור 6. השפעת עונת השנה על מידת הזיהום בסלמונלה בצמחי פטרוזיליה וריחן.

3.3.5 נוכחות סלמונלה בצמחים שהושקו במים מאולחים בריכוזים נמוכים של חיידקים

בשנה הראשונה למחקר השקנו צמחי פטרוזיליה וריחן במים שמכילים ריכוזים שונים של חיידקים, והערכנו את כמות חיידקי הסלמונלה בצמח באמצעות ספירות מיקרוביאליות. בשיטה זו לא ניתן היה לזהות באופן ודאי חיידקים בצמח שהושקה במים שמכילים פחות מ-30,000 חיידקים למ"ל. לפיכך, כוילה שיטה מולקולרית לזיהוי ריכוזים נמוכים של סלמונלה על פני הצמח המבוססת על qPCR ובדקנו האם ניתן יהיה ליישם שיטה זו בשטח לכימות סלמונלה בריכוזים נמוכים על פני הצמח. שתילים של פטרוזיליה הושקו בריסוס במים שמכילים 1.5-5.5 לוג חיידקי סלמונלה למ"ל, כמתואר לעיל. 48 שעות לאחר ההשקיה השלישית הצמחים נקצרו, דנ"א מיקרוביאלי הופק מהצמחים, ובוצע PCR כמותי על מספר גנים ספציפיים לסלמונלה. כל ניסוי בוצע פעמיים על חמש דוגמאות. בטבלה מספר 1 ניתן לראות כי השיטה המולקולרית אכן שיפרה את רגישות המדידה, ואפשרה לזהות צמחים מזוהמים בריכוזים נמוכים יותר. סלמונלה נמצאה בשכיחות גבוהה בצמחים שהושקו במים שמכילים כ-3,000 חיידקים במ"ל בלבד, ובשכיחות נמוכה בהשקיה במים שמכילים כ-300 חיידקים בלבד. מכיוון שישנם מקרים שמי ההשקיה מכילים כמות של מאות קוליפורמים למ"ל, ריכוזים אלו של פתוגנים עלולים להימצא במים ולזהם את הצמח.

טבלה 5. זיהוי סלמונלה בפטרוזיליה שהושקתה עם ריכוזים שונים של החיידק באמצעות qPCR.

Initial level of <i>Salmonella</i> in water (log CFU/ml)	5.5	4.5	3.5	2.5	1.5
Frequency	5/5	5/5	3/5	0.5/5	0/5
Calculated concentration on leaves (log CFU/g)	5.3±0.5	4.3±0.4	3.2±0.8*	-	-

* Calculation is based on the positive samples

3.4 חדירה של חיידקי סלמונלה דרך מערכת שורשים

בעבודות קודמות דיווחנו כי חיידקי סלמונלה מסוגלים לחדור אל תוך רקמות הצמח דרך מערכת השורשים (2-4). בניסויים הבאים בחנו את ההשפעה של גורמים שונים על יכולת הפתוגן לחדור ולשרוד בתוך הצמח. הגורמים שנבחנו בעבודה הנוכחית היו גיל הצמח והשפעה של השקיה ממושכת במים מזוהמים לעומת זיהום חד-פעמי. בנוסף,



נבדק מיקום חיידקי הסלמונלה בתוך הצמח לאחר חדירתם דרך מערכת שורשים.

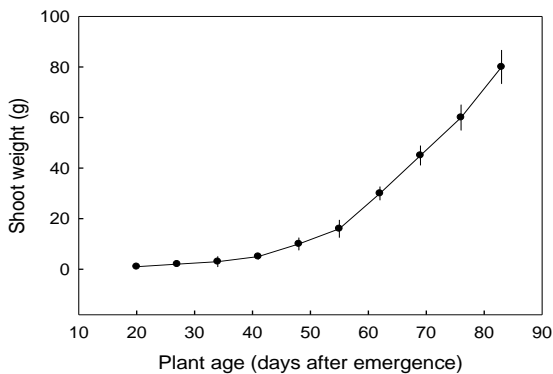


איור 7. התפתחות הצמחים במהלך ימי הניסוי. תמונה של צמחי ריחן בגילאים שונים לאחר הנביטה.

3.4.1 השפעת גיל הצמח

יכולת החדירה של חיידקי סלמונלה דרך מערכת השורשים נבחנה במהלך התפתחות הצמח, משלב השתיל בגיל 20 יום לאחר הנביטה, עד לשלב הצמח הבוגר (כולל שלב הפריחה) בגיל 83 יום לאחר הנביטה (איור מס' 7). ההתפתחות המורפולוגית של הצמחים וצבירת הביומסה היו אופייניים לצמחי ריחן ועקומת הגדילה של הצמחים הייתה מעריכית, כמוצג באיור מס' 8.

בדיקות החדירה שבוצעו במהלך התפתחות הצמח במשך 10 שבועות הראו כי רגישות הצמחים לחדירת חיידקי סלמונלה דרך השורשים הייתה שונה בגילאים שונים. בשלבים מוקדמים של התפתחות, לפני תחילת ההתפתחות



המהירה של הגבעול (20-40 ימים לאחר הנביטה), חלקים על-קרקעיים של הצמחים נשארו נקיים מחיידקי סלמונלה למרות נוכחות החיידקים בקרקע ($7.3 \times 10^5 \pm 1.3 \times 10^5$ CFU/g soil) (טבלה 2). בשלבים מוקדמים של ההתפתחות, לא נמצאו חיידקי סלמונלה בתוך הצמחים הצעירים בזריעה ישירה וגם לאחר העשרה.

איור 8. התפתחות ביומסה בצמחי הריחן במהלך הניסוי. התוצאות מייצגות ממוצע וסטיית התקן בחמש חזרות.

לאחר התחלת הגדילה המואצת בצמחים, בגיל 50 יום, נמצאו חיידקי סלמונלה בתוך כל הצמחים שנבדקו. ממצאים אלה מצביעים על עלייה ביכולת החדירה של חיידקי סלמונלה לתוך הצמחים בשלב זה של התפתחות הצמח. צמחי ריחן בוגרים התגלו כרגישים יותר לחדירת חיידקי סלמונלה מאשר צמחים צעירים. במהלך הדיגומים של צמחים בוגרים, חיידקי סלמונלה נמצאו בחלקים העליונים של הצמח רק בחלק מהצמחים המאולחים. במהלך הניסוי לא נמצאו חיידקי סלמונלה בצמחי ביקורת ועל פני העלים שעברו חיטוי חיצוני, כך שניתן להניח כי חיידקי סלמונלה

שהתגלו בבדיקות הבקטריולוגיות מקורם בחיידקים שחדרו מהקרקע דרך השורשים והם נמצאים בתוך רקמות הצמח.

טבלה 2. חדירת חיידקי סלמונלה לתוך צמחי ריחן בגילאים שונים.

Penetration of Salmonella into basil leaves via the roots		Bacterial count in the soil (CFU/g soil) ^a	
Plant age	Percentage of plants with penetration (%) ^b	Total bacterial count	Salmonella
20	0	$8 \times 10^6 \pm 3.2 \times 10^6$	$7.5 \times 10^5 \pm 1.2 \times 10^5$
30	0	$9.5 \times 10^6 \pm 2.3 \times 10^6$	$8.2 \times 10^5 \pm 1.7 \times 10^5$
40	0	Not tested	Not tested
50	100	$6.9 \times 10^6 \pm 3.5 \times 10^6$	$7.3 \times 10^5 \pm 1.3 \times 10^5$
60	60	Not tested	Not tested
70	40	$7.2 \times 10^6 \pm 3.1 \times 10^6$	$6.9 \times 10^5 \pm 1.7 \times 10^5$
80	25	Not tested	Not tested

^a הקרקע אולחה 24 שעות לפני הדיגום עם 10^6 CFU *Salmonella*/g. התוצאות הן ממוצע \pm סטיית תקן של 5 חזרות.

3.4.2 השפעת השקיה ממושכת במים מזוהמים

בניסוי זה נבחנה ההשערה לפיה באילוח ממושך תתקבל חדירה רבה יותר של חיידקי סלמונלה לתוך הצמח. מתוצאות הניסוי (טבלה 3) עולה כי אילוח ממושך לא גרם לעליה בהחדירה של החיידקים לתוך הצמחים, אלא להיפך, לאחר שלושה שבועות של השקיות אילוח, לא נמצאו כלל חיידקי סלמונלה בצמחים (קבוצת ניסוי 3). תוצאות ניסויי הישרדות מראות שבצמחים מקבוצה 1 אשר קיבלה השקיה אחת בלבד בשבוע הראשון, לא התגלו חיידקי סלמונלה שבועיים ושלושה שבועות לאחר מכן. בעציצים שקיבלו השקיות מרובות בתמיסת חיידקי סלמונלה לא נמצאו שינויים מובהקים בריכוז של חיידקי הסלמונלה בצמח או בקרקע. (טבלה 3). כמו כן, לא נמצאו הבדלים מובהקים בריכוז כלל החיידקים בתוך רקמות הצמח במהלך הניסוי.

טבלה 3. חדירה והישרדות של חיידקי סלמונלה בתוך הצמח באילוח מתמשך.

Group	Weeks	No. of irrigations	Bacterial count in plant (CFU/g plant)		Bacterial count in soil (CFU/g soil) ^a	
			Percentage of plants with penetration ^c	Total bacterial count ^b	<i>Salmonella</i>	Total bacterial count
1	1	1	40	$\times 10^2 \pm 8.5 \times 10^1$	$3 \times 10^5 \pm 6 \times 10^4$	$1.8 \times 10^6 \pm 5.3 \times 10^5$
1		1	0	$7.5 \times 10^2 \pm 1.8 \times 10^2$	$\times 10^5 \pm 5.4 \times 10^4$	$\times 10^5 \pm 3 \times 10^4$
2	2	2	20	$\times 10^2 \pm 5 \times 10^1$	$\times 10^5 \pm 3.4 \times 10^4$	$\times 10^6 \pm 2.1 \times 10^5$
3		4	40	$\times 10^3 \pm 3.5 \times 10^1$	$\times 10^5 \pm 2 \times 10^5$	$\times 10^5 \pm 2.7 \times 10^5$
1		1	0	$\times 10^2 \pm 3.5 \times 10^1$	$\times 10^5 \pm 7.6 \times 10^4$	$\times 10^6 \pm 1.8 \times 10^5$
2	3	3	0	$\times 10^2 \pm 4.2 \times 10^1$	$\times 10^5 \pm 2.9 \times 10^4$	$\times 10^5 \pm 3.8 \times 10^4$
3		7	0	$\times 10^2 \pm 7.5 \times 10^1$	$\times 10^5 \pm 4.7 \times 10^5$	$\times 10^6 \pm 5.2 \times 10^5$

^a הקרקע אולחה ב- 10^6 CFU *Salmonella*/g soil. ^b התוצאות הן ממוצע \pm סטיית תקן של 5 חזרות. ^c אחוז הצמחים בהם נמצאו חיידקי *Salmonella* לאחר העשרה.

3.4.3 מיקום חיידקי הסלמונלה בצמח לאחר החדירה

כדי לבחון את פיזור החיידקים בין האברים השונים של הצמח, לאחר חדירה דרך השורש, צמחים בגיל 80 ימים אולחו ע"י השקיה עם הפתוגן ולאחר 24 שעות נקטפו באופן אספטי וחולקו לעלים, גבעולים ותפרחות. נוכחות של סלמונלה נבדקה בכל רקמה בנפרד. חיידקים התגלו רק לאחר העשרה ולא זוהו בזריעה ישירה. החיידקים התגלו בכל הרקמות שנבדקו, אך בתדירות נמוכה יותר באברים רפרודוקטיביים (תפרחות) מאשר באברים וגטיביים (עלים וגבעולים) (טבלה 4).

טבלה 4. מיקום חיידקי סלמונלה בחלקים שונים של צמחי ריחן לאחר חדירתם דרך מערכת השורשים.

Plant tissue	Salmonella in plant tissues		bacterial count in soil ^a (CFU/g)	
	Control (not inoculated)	Soil inoculated	Total count	Salmonella
	Percentage of samples with Salmonella	Percentage of samples with Salmonella ^b		
Leaves	0	40		
Stems	0	40	7×10 ⁶	7.1×10 ⁵
Inflorescences	0	20	±3.1×10 ⁶	±1×10 ⁵

^a אילוח הקרקע עם סלמונלה (10⁶ CFU/g), 24 ש' לפני הדיגום. ^b אחוז הצמחים המזוהמים בחיידק (10=N).

3.5 הישרדות חיידקי סלמונלה על פני העלים

בעוד שזיהום הצמח דרך השורש דורש ריכוז גבוה של חיידקים ומתרחש ביעילות נמוכה, זיהום הצמח יכול להתרחש גם ע"י מגע ישיר של מים מזוהמים עם העלווה. כדי לבחון את גורל חיידקי הסלמונלה על העלים לאחר אילוח, נבחנה הישרדות סלמונלה על פני עלים לאחר זיהום טיפתי. הישרדות החיידקים נבדקה על שני צדי העלה. האילוח בוצע עם כמות גבוהה יחסית של חיידקים (10⁷ CFU/leaf) על מנת לאפשר מעקב מתמשך אחר ירידה אפשרית במספרם במהלך המעקב. הניסוי נמשך 8 ימים במהלכם כמות החיידקים ירדה משמעותית עד לרמה של כ- 10² CFU/g leaf (טבלה 5). בארבעת הדיגומים ראשונים נצפה הבדל מובהק בין כמות החיידקים עם פני צדדים שונים של העלים. בסך הכול, נראה כי חיידקי סלמונלה אינם שורדים היטב על העלים וכמותם יורדת עם הזמן בלמעלה מ- 5 לוגים.

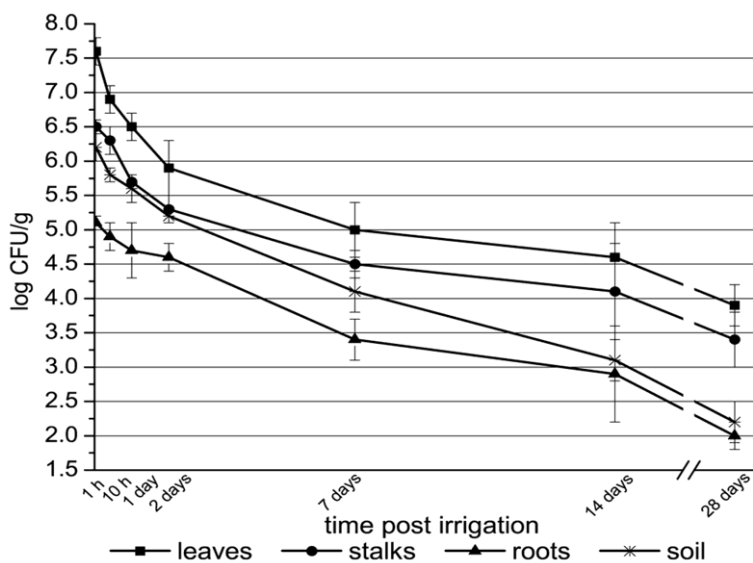
טבלה 5. הישרדות חיידקי סלמונלה על עלי ריחן.

Salmonella (log CFU/g leaf)		Time post inoculation (days)
Abaxial side of the leaf	Adaxial side Of the leaf	
7.23 ±0.06 a	7.34 ±0.03 a	0
5.55 ±0.06 a	3.81 ±0.08 b	1
4.63 ±0.17 a	2.06 ±0.31 b	2
4.42 ±0.10 a	2.25 ±0.26 b	3
2.14 ± 0.40 a	1.59 ±0.28 b	6
1.68 ± 0.18 a	1.59 ±0.14 a	8

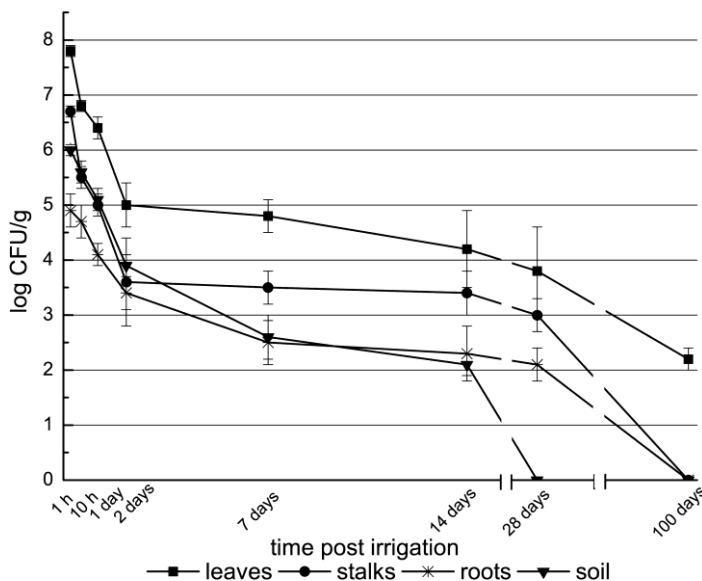
התוצאות הן ממוצע ± סטיית תקן של 5 חזרות. אותיות שונות ליד הממוצעים בשורה מסוימת מסמנות מובהקות סטטיסטית, לפי מבחן Tukey ברמת מובהקות של α=0.05.

3.6 הישרדות החיידקים על פני הצמח לאורך הגידול

בוצע מעקב רציף אחר ההישרדות של סלמונלה על פני הפטרוזיליה וריחן במהלך שני הימים הראשונים לאחר ההשקיה במים מזוהמים (בריסוס) ובמהלך 28 ימים (בפטרוזיליה) ו 100 ימים (בריחן) (איורים 9 ו 10). ניתן לראות ירידה משמעותית בספירות על פני החלקים השונים של הצמח בשעות הראשונות לאחר ההשקיה, ירידה שמתמתנת אחר יומיים. בקרקע מסתמנת ירידה מתונה יותר לכל אורך התקופה. אולם לאחר יומיים הירידה במספר החיידקים מתמתנת. שני הצמחים נשארו מזוהמים בחיידקים חיים גם לאחר חודש, בריחן שנדגם גם לאחר 100 ימים עדיין נצפו מעט חיידקים חיים בעלים. חיידקים חיים נמצאו גם בקרקע של שני הצמחים שבועיים לאחר ההשקיה, אולם לאחר חודש נדגמו חיידקים חיים רק בקרקע של הפטרוזיליה.



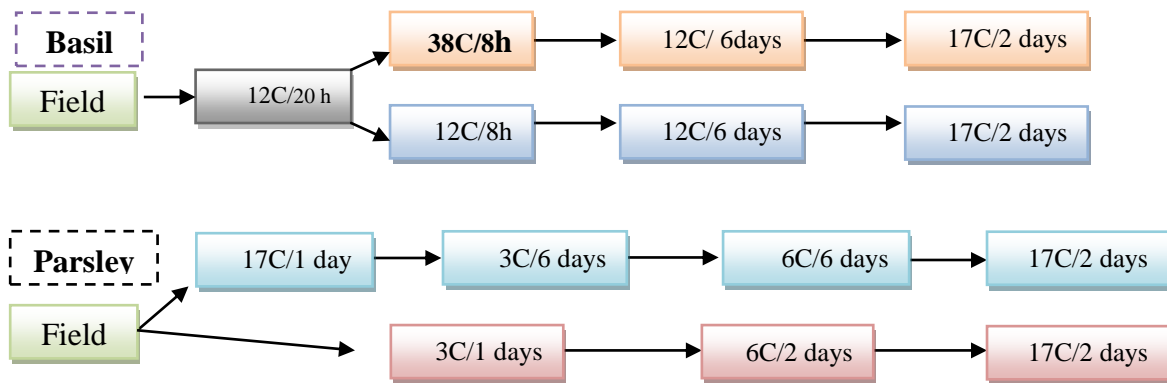
איור 9. הישרדות של סלמונלה על חלקי הצמח השונים של פטרוזיליה ובקרקע שעה עד 28 ימים לאחר האילוח.



איור 10. הישרדות של סלמונלה על חלקי הצמח השונים של בזיל ובקרקע שעה עד 100 ימים לאחר האילוח.

3.7 השפעת טיפולי חום והדמיה של הובלה אווירית וחי מדף על הישרדות סלמונלה על עלי ריחן

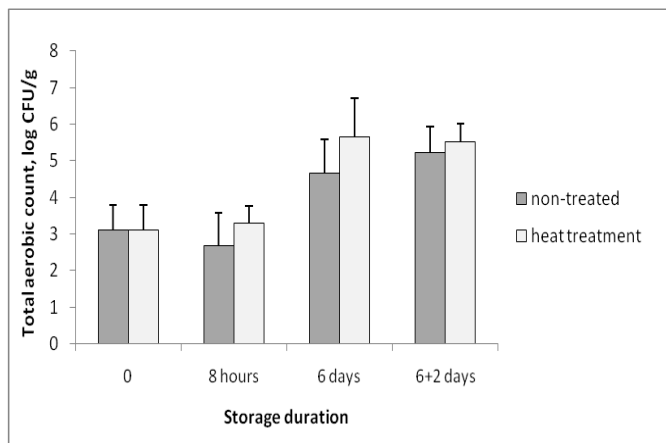
לאחר שבחנו את אילוח הצמחים בשדה ואת הגורמים המשפיעים על האילוח, נערכו ניסויים לבחינת הזיהום בשלבים שלאחר הקטיפה. הניסויים נערכו עם אגדים של ריחן ופטרוזיליה במשקל של כמאה גרם, כל אחד, הארוזים בתוך שקיות ניילון אשר מונחות בקרטון של 1 ק"ג באריזות משלוח מקוריות של "מגדלי ערבה". בכל קרטון אולחו טיפתית עלים משלוש שקיות אשר הוחזרו לקרטון לאחר ייבוש. כל ניסוי בוצע בשתי חזרות. על מנת לבחון את השפעת הטיפול בחום על הפלורה המיקרוביאלית בצמחי ריחן ופטרוזיליה (פטרזיליה) וכן יומיים נוספים של חי מדף ב-17 מאולחות) ע"י הדגרה של 8 שעות ב-38 מ"צ. האריזות נדגמו לאחר הטיפול והועברו לתנאי אחסון המייצגים סימולציה של הובלה אווירית (ריחן ופטרוזיליה) והובלה ימית (פטרוזיליה) וכן יומיים נוספים של חי מדף ב-17 מ"צ. תרשים של תנאי הסימולציה של שני סוגי המשלוח מוצג באיור 11. סדרה נפרדת של אריזות מאולחות ובלתי מאולחות לא עברה טיפול תרמי והועברה ישירות לאחסון בתנאי הסימולציה (ביקורת טיפול).



איור 11. תרשים זרימה המתאר את שלבי הטיפול ותנאי האחסון של ריחן ופטרוזיליה בסימולציה של משלוח אווירי (ריחן ופטרוזיליה) ומשלוח ימי (פטרוזיליה).

3.7.1 השפעת טיפול בחום על ספירה כללית של חיידקים בעלי ריחן

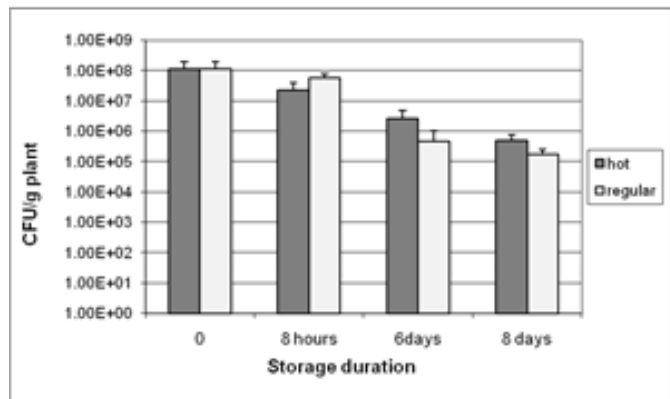
ספירה כללית של חיידקים אירוביים התבצעה בדגימות של עלי ריחן טריים אשר נשמרו למשך 20 שעות ב-12 מ"צ. לא נמצאו הבדלים משמעותיים ברמת הפלורה הכללית בצורות שעברו טיפול תרמי לעומת צורות שלא עברו את הטיפול (באיור 12).



איור 12. ספירה כללית של חיידקים על עלי ריחן שעברו טיפול בחום (38 מ"צ) למשך 8 שעות (עמודות לבנות) לעומת עלי ביקורת שלא עברו טיפול (עמודות אפורות). התוצאות מייצגות ממוצע וסטיית התקן של 3 חזרות.

3.7.2 השפעת טיפול בחום על ספירת חיידקי סלמונלה בעלי ריחן

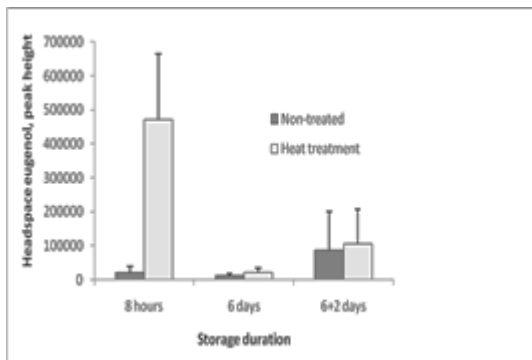
צורות של ריחן אולחו בחיידקי סלמונלה ע"י טבילה בתרחיף חיידקים בשני ריכוזים $\log 4$ ו- $\log 8$ CFU/ml. הריכוז הגבוה נועד לעקוב אחר קטילה של הפתוגן במהלך האיחסון ואילו הריכוז הנמוך נועד לבחון התרבות אפשרית של הפתוגן במהלך הטיפול התרמי. ספירה של חיידקי סלמונלה בניסויי אילוח עם ריכוז גבוה של החיידק מובאות באיור 13. נראה כי מספר החיידקים יורד עם הזמן עד למכסימום של כשני סדרי גודל בסוף חיי המדף. הטיפול בחום לא גרם להתרבות של החיידק. לאחר הדבקה בריכוז נמוך של סלמונלה, המייצג מספרים יותר רלוונטים של החיידק בסביבה החקלאית, לא נמצאו כלל חיידקים בספירה ישירה. אולם, בכל הדגימות ניתן היה למצוא חיידקי סלמונלה לאחר העשרה. ממצאים אלה מצביעים על כך שחיידקי הסלמונלה אמנם אינם מתרבים במהלך הטיפול בחום אולם גם במספרים נמוכים הם עדיין שורדים לאורך זמן המשלוח וחי המדף.



איור 13. ספירה של חיידקי סלמונלה על עלי בזיל בסימולציה של תנאי טיפול בחום ומשלוח אווירי. התוצאות מייצגות ממוצע וסטיית התקן של 3 חזרות.

3.7.3 שחרור Eugenol ע"י עלי ריחן במהלך האיחסון

Eugenol הוא שמן אתרי המצוי בעלי ריחן אשר יוחסה לו פעילות אנטיביוטית. כדי לבחון אם רמת ה-eugenol באריזות משפיעה על רמת החיידקים במהלך האיחסון, נבדקה רמת הנדיף באווירה של שקיות האריזה בקרטונים שעברו טיפול חום ובביקורת (ללא טיפול). התוצאות מוצגות באיור 14. לאחר 8 שעות של טיפול נראה שיחרור מוגבר של הנדיף, שלא התרחש באיחסון בקור (ביקורת). למרות העלייה ברמת ה-eugenol, לא נראתה קטילה של חיידקי הפלורה הכללית, או חיידקי סלמונלה (איורים 12, 13).



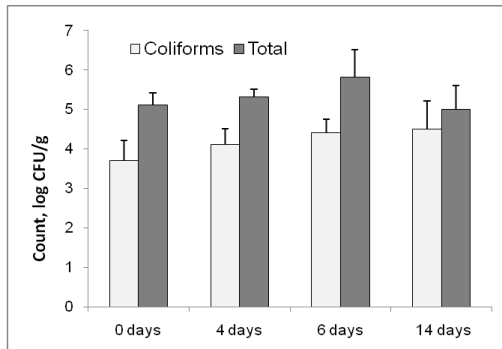
איור 14. שחרור eugenol מאריזות של צורות ריחן במהלך סימולציה של טיפול בחום לעומת ביקורת ללא טיפול. התוצאות מייצגות ממוצע וסטיית התקן של 6 חזרות.

3.7.4 השפעת תנאי ההובלה והאיחסון על ספירה כללית

וספירת קוליפורמים על עלי פטרוזיליה

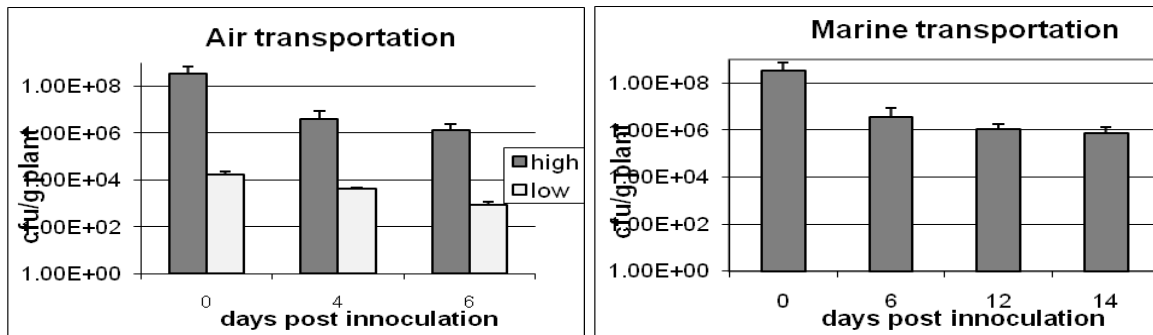
צורות של עלי פטרוזיליה נדגמו בשלבים שונים של סימולציית משלוח ימי ומשלוח אווירי ונבדקה הספירה הכללית של חיידקים אירוביים וספירת קוליפורמים (איור 15). אין שינוי משמעותי במספר החיידקים האירוביים

בעלים ונראתה עלייה קלה בקוליפורמים בסוף חיי המדף לאחר סימולציה של הובלה אווירית עם יומיים נוספים של חיי מדף.



איור 15. ספירה כללית של חיידקים אירוביים (total) וקוליפורמים בעלי פטרוזיליה בסימולציית הובלה אווירית (4 שעות), הובלה אווירית וחיי מדף של יומיים (6 ימים) ולאחר הובלה ימית וחיי מדף (14 יום).

ההבדלים בהתנהגות הפלורה הכללית על ריחן (ירידה) ופטרוזיליה (ללא שינוי), קשורים כנראה לסוג התבלין, או לחילופין לטמפרטורת האחסון (12 מ"צ בריחן לעומת 3 מ"צ בפטרוזיליה). בניסויים אחרים, אולחו צורות של פטרוזיליה בחיידקי סלמונלה בשני ריכוזים, כמתואר לעיל לגבי עלי ריחן. בסימולציה של הובלה אווירית בשני הריכוזים של הפתוגן נמצאה ירידה במספר החיידקים במהלך האחסון (איור 16).



איור 16. ריכוז חיידקי סלמונלה על עלי פטרוזיליה במהלך הדמיה של משלוח אווירי וימי.

לאחר 4 ימים הייתה ירידה משמעותית במספר חיידקי הסלמונלה והמספר נשאר ללא שינוי בשני ימי המדף. לאחר אילוח בריכוז הנמוך של חיידקים, נראתה ירידה הדרגתית של כחצי סדר גודל ביום 4 וביום 6. בסימולציה של משלוח ימי, נמצאה ירידה משמעותית במספר חיידקי הסלמונלה לאחר 6 ימים אולם מספרם נשאר קבוע עד לסוף חיי המדף. כאשר האילוח נערך עם ריכוז נמוך של הפתוגן, לא נמצאו כלל חיידקים לאחר 6 ימים, כנראה בשל מספרם הנמוך. אולם, לאחר ביצוע העשרה נמצאה סלמונלה בכל הדגימות. כעבור 14 יום עדיין 50% מהדגימות היו חיוביות לסלמונלה (טבלה 6).

טבלה 6. הימצאות חיידקי סלמונלה על עלי פטרוזיליה לאחר אילוח בריכוז נמוך של החיידק.

Days post-inoculation	6	12	14
Percentage of parsley samples with Salmonella ^a	100	67	50

^a העלים אולחו עם 2×10^4 CFU/g. סה"כ בוצעו 6 חזרות.

4. זיון

זיהום של תוצרת חקלאית טרייה, בעיקר ירקות עלים ותבלינים טריים, מסכן את בריאות הציבור וגורם לנזק כלכלי כבד לסקטור החקלאי. במחקר הנוכחי ניסינו להבין את הגורמים המשפיעים על זיהום של פטרוזיליה וריחן ע"י הפתוגן סלמונלה, לעקוב אחר הישרדות החיידק בצמח הגדל וכן לאחר קטיפה ולהבין מה קורה לזיהום בסימולציות של הובלה ימית ואווירית.

הניסויים בוצעו ע"י אילוח מלאכותי של הצמחים בחיידק סלמונלה ומעקב אחר מספר החיידקים בשיטות מיקרוביולוגיות סטנדרטיות וכן בשיטה מולקולרית שפיתחנו לצורך המחקר.

בשלב ראשון בדקנו שיטות שונות לניתוק החיידק מהצמח על מנת להגדיל את רגישות הבדיקה. מצאנו כי הימגון באמצעות סטומכר וזריעה על מצע מזון סלקטיבי לזיהוי חיידק הסלמונלה על עלי צמח היא השיטה המתאימה ביותר למעקב אחר החיידק, אולם גם שיטה זו אינה רגישה מספיק, שכן מיד לאחר אילוח עם כמות חיידקים ידועה, התוצאות מראות ירידה של 2 סדרי גודל ביחס לכמות המקורית ששמשה לזיהום. כלומר, ניתן לזהות רק 1% מהחיידקים המצויים על הצמח, בהנחה שכולם נשארו חיים. תוצאות אלה יכולות להעיד על יעילות שחרור נמוכה של החיידק מהצמח. מצאנו כי השיטה המיקרוביאלית מאפשרת זיהוי של החיידק כאשר יש לפחות 4000 חיידקים לגרם רקמה. לעומת זאת, שיטה המבוססת על זיהוי הפתוגן באמצעות qPCR אפשרה רגישות גבוהה בסדר גודל, וקבלת ערכים מדויקים יותר. כמובן, שבשיטה זו לא ניתן להפריד בין חיידקים חיים ומתים וזו היא מגבלה, בעיקר כאשר נעשה בה שימוש להערכת יעילות של טיפולי חיטוי.

השקיה של הצמחים בריסוס גרמה לזיהום כל חלקי הצמח גם בפטרוזיליה וגם בריחן, אולם בפטרוזיליה הזיהום היה גבוה יותר. לא ברור מהם הגורמים להבדלים, יתכן כי מדובר בהבדלים מבניים הגורמים להעדפת היצמדות לצמח מסוים, או אולי מדובר בקטילה מוגברת של החיידקים בריחן כתוצאה מפעילות אנטימיקרוביאלית של שמנים אתריים בצמח זה.

השוואה בין השקיית יום להשקיית לילה הראתה כי השקיית לילית גרמה לזיהום גבוה יותר של הריחן לעומת השקיית יום, כאשר בפטרוזיליה לא ניכר היה הבדל במידת הזיהום. שוב, הסיבה להבדלים אלה אינה ברורה ומצביעה על כך, כי לא ניתן באופן גורף לקבוע זמני השקיה מיטביים המצמצמים את מידת הזיהום אלא יש לבחור את זמני ההשקיה המיטביים לכל צמח, באופן אמפירי. גם השקיה בטפטוף, ללא מגע ישיר בין המים לגבעול או לעלים גרמה לזיהום הצמח (ריחן). תוצאות אלה מצטרפות לעבודות קודמות של קבוצותינו אשר הראו יכולת חדירה של הפתוגנים סלמונלה וא. קולי אל תוך רקמת הצמח דרך מערכת השורשים (2-4). תוצאות אלה מחזקות את ההכרה כי תופעת החדירה של פתוגנים של האדם לתוך הצמח היא כללית ולכן יש לקחתה בחשבון בהערכת הסיכונים לזיהום התוצרת, בניגוד להערכות קודמות, כי העדר מגע בין המים לחלקי הצמח העל-קרקעיים מהווה מחסום בפני זיהום הצמח במים העלולים להכיל פתוגנים, כמו למשל מי קולחים.

מצאנו כי צמחי ריחן מבוגרים יחסית לאחר התחלת שלב הגדילה המואצת, בגיל של כ- 50 יום, היו רגישים יותר לחדירה, כאשר חיידקי הסלמונלה הצליחו לחדור אל כל הצמחים שנבדקו. ממצאים אלה מצביעים על עלייה ביכולת החדירה של חיידקי סלמונלה לתוך הצמחים בשלבים מסוימים של התפתחות הצמח. באופן כללי, צמחי ריחן בוגרים התגלו כרגישים יותר לחדירת חיידקי סלמונלה מאשר צמחים צעירים.

בדיקת הישרדות הסלמונלה על עלי ריחן הראתה ירידה של למעלה מ-5 סדרי גודל במהלך 8 ימים דבר המצביע על כך כי סביבה זו אינה אופטימלית לחיידק. בדיקה של הישרדות החיידקים לאחר השקיית צמחי פטרוזיליה וריחן במים מזוהמים, הראתה כי החיידקים נשארים על הצמח, לפחות 28 יום לאחר האילוח (ועד ל 100 ימים) וכך גם בקרקע. אולם נמצא כי הירידה במספר החיידקים בקרקע הייתה חדה יותר מאשר בצמח. תוצאות אלה מחזקות את ההנחה כי סביבת הצמח נוחה יותר לפיתוגן זה מאשר הקרקע, כנראה בשל ההגנה המוגברת שהיא מקנה לחיידק בפני עקות סביבתיות, כגון, יובש, העדר מזון וקרינת השמש.

ממצאים אלה מעודדים מצד אחד, שכן הם מראים כי לפחות בתנאים שנבדקו, החיידק אינו מסוגל להתרבות בצמח ומספר החיידקים יורד עם הזמן. יחד עם זאת, מצד שני, תוצאות המחקר ממחישות את הסיכון הקיים בהשקיה במים מזוהמים, גם אם היא מבוצעת זמן רב לפני הקציר וזאת משום שהחיידק מסוגל לשרוד תקופות ארוכות הן בקרקע והן בצמח.

פיתוח של שיטות מדידה מולקולריות איפשר ביצוע של ניסויי השקיה עם כמויות קטנות של חיידקים המייצגות תנאים קרובים יותר למציאות החקלאית. בניסיונות אלו סלמונלה נמצאה בשכיחות גבוהה גם בצמחים שהושקו במים שמכילים כ- 3,000 חיידקים במל" בלבד. השכיחות הייתה נמוכה יותר כאשר נערכה ההשקיה במים שמכילים כ 300 חיידקים בלבד, אולם גם במקרה זה חלק מהצמחים נמצאו מזוהמים. מכיוון שישנם מקרים שמי ההשקיה מכילים כמות של מאות קוליפורמים למל", תוצאות אלה מעידות כי גם מים אלה עלולים לגרום לזיהום הצמח ולסכן את בריאות הציבור. לפיכך, ישנה חשיבות גבוהה לבדיקת איכות המים המשמשים להשקיה.

לבסוף, מצאנו כי גם עונת השנה משפיעה על מידת הזיהום. עדיין לא ברורות הסיבות לכך, אולם ייתכן כי הדבר קשור לעידוד הפרשה של חומרים אנטי-בקטריאליים, כמו שמנים אתריים, בצמח, או למצבם הפיסיולוגי של הצמחים והחיידקים.

לאחר החדירה לצמח החיידקים התגלו בכל הרקמות שנבדקו, אם כי בתדירות נמוכה יותר באברים רפרודוקטיביים (תפרחות) מאשר באברים וגטיביים (עלים וגבעולים). תוצאות אלה, מדגימות דרך העברה נוספת של הפתוגן באמצעות זיהום ורטיקלי ע"י זרעים. נושא זה לא נבדק בעבודה זו והוא אחד מהנושאים שיש להרחיב עליו את המחקר.

לאחר הקטיף עוברים הצמחים טיפולים שונים ונשלחים אל הספקים בחו"ל בהובלה אווירית או ימית. אחת השאלות החשובות היא האם הסלמונלה מסוגלת לשרוד על התוצרת גם לאחר קטיף בסימולציה של משלוח ימי או אווירי. תוצאות המחקר מצביעות על כך שחיידקי הסלמונלה אמנם אינם מתרבים במהלך הטיפול בחום, הנערך לצמחי ריחן במטרה להקטין רקבונות, אולם גם במספרים נמוכים החיידקים עדיין שורדים לאורך כל זמן המשלוח ואף עד סוף חיי המדף. מצאנו כי במהלך האיחסון מתרחשת אמנם עלייה ברמת ה-eugenol (רכיב של שמן אתרי), אולם זו לא השפיעה על קטילה של חיידקי הפלורה הכללית, או חיידקי הסלמונלה. נמצאו הבדלים בהתנהגות הפלורה הכללית על ריחן (ירידה) ופטרוזיליה (ללא שינוי), אשר קשורים, כנראה, לסוג התבלין, או לחילופין לטמפרטורת האחסון של כל צמח (12 מ"צ בריחן לעומת 3 מ"צ בפטרוזיליה). בכל הניסויים נמצאה ירידה במספר חיידקי הסלמונלה במהלך האיחסון, אולם עדיין שרדו חיידקים בסוף חיי המדף.

5. פרוט מלא של הפרסומים המדעיים - בכתב, בעל פה ופוטנטים, שנבעו מביצוע המחקר

1. Kisluk G., D. Hoover, K. E. Kneil and S. Yaron. 2012. Quantification of low and high levels of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on leaves. LWT - Food Science and Technology. 45:36-42.
2. Kisluk G., and S. Yaron. 2012. Presence and Persistence of *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium in the Phyllosphere and Rhizosphere of Spray-Irrigated Parsley. Applied and Environmental Microbiology. 78: 4030-4036.
3. Kisluk G., E. Kalily and S. Yaron. 2012. Resistance to essential oils affects survival of *Salmonella enterica* serovars in growing and harvested basil. (submitted)
4. Sela, S., R. Pinto and N. Bernstein. (In preparation)

1. Lapidot, A., and Yaron, S. 2009. Transfer of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from contaminated irrigation water to parsley is dependent on curli and cellulose, the biofilm matrix components. *J. Food Prot.* 72:618-623.
2. Solomon, E.B., Yaron, S., Matthews, K.R. 2002. Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. *App. Environ. Microbiol.* 68: 397-400.
3. Bernstein, N., Sela, S., Pinto, R., and Ioffe, M. 2007. Evidence for internalization of *Escherichia coli* into the aerial parts of maize via the root system. *J. Food Prot.* 70:471-475.
4. Bernstein, N., Sela, S., Neder-Lavon, S. 2007. Assessment of contamination potential of lettuce by *Salmonella enterica* serovar Newport added to the plant growing medium. *J. Food Prot.* 70:1717-1722.

סיכום עם שאלות מנחות

נא לענות על כל השאלות, בקצרה ולעניין, ב 3 עד 4 שורות מקסימום לכל שאלה (לא תובא בחשבון חריגה מגבולות המסגרת המודפסת).

<p>1. מטרת המחקר לתקופת הדו"ח תוך התייחסות לתוכנית העבודה.</p> <p>א. הבנת הגורמים המשפיעים על חדירת הפתוגן סלמונלה לצמחי מאכל (פטרוזיליה וריחן). ב. בחינת הישרדות הפתוגן על התוצרת בהקשר לתנאי האחסון וטיפולים לאחר הקטיף.</p>
<p>2. עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח.</p> <p>א. צמחי ריחן ופטרוזיליה הושקו במים מזוהמים בסלמונלה ע"י ריסוס וע"י טפטוף. השקיה בריסוס גורמת לאילוח רב יותר מאשר השקיה בטפטוף. אולם, ההשקיה בטפטוף גורמת לזיהום גבוה יותר של פטרוזיליה לעומת ריחן. משטר ההשקיה (השקיית יום לעומת השקיית לילה) הינו בעל השפעה שונה על שני הגידולים. מידת הזיהום של הצמח תלויה גם בעונת הגידול ומשתנה מצמח לצמח.</p> <p>ב. שימוש בשיטת זיהוי מולקולרית (qPCR) הדגים כי גם ריכוזים נמוכים יחסית של החיידק (כ 300 חיידקים למל") יכולים לגרום לזיהום הצמח, אם כי בשכיחות נמוכה.</p> <p>ג. צמחי פטרוזיליה שזוהמו בסלמונלה נשארו מזוהמים בחיידק לפחות חודש ממועד הזיהום.</p> <p>ד. סלמונלה מסוגלת לחדור לתוך הצמח דרך השורש, אם כי ביעילות נמוכה. בריחן החדירה הייתה תלויה בגיל הצמח. חדירה מרבית התרחשה בצמחים בוגרים.</p> <p>ה. לאחר חדירה דרך השורש חיידקי הסלמונלה התפשטו בצמח והגיעו לאיברים שונים, כולל גבעולים, עלים ותפרחות.</p> <p>ו. לאחר זיהום חיצוני של שטח פני העלים בחיידקי סלמונלה הפתוגן אינו שורד טוב על פני העלה. אולם ניתן לזהות את החיידק בצמח גם לאחר חודש.</p> <p>ז. טיפול תרמי של הריחן לאחר קטיף ותנאי המשלוח האווירי אינם פוגעים באיכות המיקרוביאלית של הצמח. גם בפטרוזיליה לא נראתה ירידה משמעותית באיכות המיקרוביאלית של התוצרת לאחר הדמיה של הובלה ימית.</p>
<p>המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרת המחקר בתקופת הדו"ח.</p> <p>צמחי ריחן ופטרוזיליה המושקים במים מזוהמים בסלמונלה עלולים להזדהם בחיידק חיצוני או פנימי. הזיהום מתרחש גם כאשר ריכוז הפתוגן נמוך יחסית. ההשלכות המעשיות הן שיש להיזהר מהשקיית ירקות עלים וצמחי תבלין במים שאינם באיכות מי שתייה. מאחר שהחיידק מסוגל לשרוד על הצמח ובתוכו במהלך תקופת הגידול, לפחות במשך חודש ימים, יש חשיבות גבוהה למנוע הימצאות של פתוגנים בקרקע ובמי ההשקיה. ההנחה המקובלת כי השקיה בטפטוף מהווה חסם יעיל מפני זיהום, אינה מבוססת. מאחר שאופן ההשקיה, עונת הגידול וסוג הצמח משפיעים על מידת הזיהום, עולה הצורך להעריך את סיכויי הזיהום של כל גידול (סוג צמח) בנפרד, כדי לזהות גידולים הרגישים במיוחד הדורשים אמצעי בקרה מחמירים יותר. הממצא כי חיידקים יכולים להתפשט גם לאברים ווגטטיביים, יכול להצביע על פוטנציאל לזיהום ורטיקלי באמצעות זיהום הזרע. החיידק אינו מסוגל להתרבות על הצמח בעת הגידול או לאחר הקטיף, לפחות בתנאים שנבדקו במחקר זה. אולם, למרות שמספר החיידקים יורד עם הזמן, גם בזמן הגידול וגם לאחר קטיף במהלך האחסון וחיי המדף, עדיין החיידק שורד על הצמח ועלול בתנאי הגיינה לא ראויים להתרבות ולגרום למחלה.</p>
<p>3. הבעיות שנותרו לפתרון ו/או השינויים שחלו במהלך העבודה (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים); התייחסות המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרת המחקר בתקופה שנותרה לביצוע תכנית המחקר.</p> <p>המחקר הדגים את השונות הרבה הקיימת באופן הזיהום ובמידת הזיהום בגידולים שונים ומדגיש את הצורך</p>

בהרחבתו לגידולים נוספים על מנת לזהות גידולים רגישים במיוחד לזיהום. יש צורך בפיתוח של טיפולי חיטוי יעילים, כקו הגנה אחרון לפני שהתוצרת מגיעה לצרכן. טיפולי חיטוי חדישים ידרשו הבנה טובה יותר של יחסי הגומלין בין הפתוגן לצמח.

האם הוחל כבר בהפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח – יש לפרט: פרסומים – כמקובל בביבליוגרפיה.

1. Kisluk G., D. Hoover, K. E. Kneil and S. Yaron. 2012. Quantification of low and high levels of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on leaves. LWT - Food Science and Technology. 45:36-42.
2. Kisluk G., and S. Yaron. 2012. Presence and persistence of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium in the phyllosphere and rhizosphere of spray-irrigated parsley. Applied and Environmental Microbiology. 78: 4030-4036.
3. 1. Kisluk G., E. Kalily and S. Yaron. 2012. Resistance to essential oils affects survival of *Salmonella enterica* serovars in growing and harvested basil. (submitted)
3. Sela, S., R. Pinto and N. Bernstein. *In preparation*.

פרסום הדו"ח: אני ממליץ לפרסם את הדו"ח: (סמן אחת מהאופציות)

← חסוי

← **ללא הגבלה** (בספריות ובאינטרנט)