

**משרד החקלאות - דו"ח לתוכניות מחקר  
לקרן המדען הראשי**

<b>קוד זיהוי</b>	<b>א. נושא המחקר (בעברית)</b>
817- 0059 -10	פיתוח עמידות והגברת אלימות בפטריות ובחיידקים התוקפים תוצרת חקלאית טרייה לאחר הקטיפה כתוצאה מחשיפה לשמנים אתריים בריכוזים תת-קטלניים

<b>ג. כללי</b>	
מוסד מחקר של החוקר הראשי	
הפקולטה לחקלאות	
<b>סוג הדו"ח</b>	<b>תאריכים</b>
מסכם	תקופת המחקר
	עבורה מוגש הדו"ח
	התחלה
סיום	המיקום
שנה 2009	שנה 2012
חודש 04	חודש 09
שנה 2012	שנה 2012
חודש 10	חודש 10

<b>ב. צוות החוקרים</b>		
<b>שם פרטי</b>	<b>שם משפחה</b>	<b>חוקר ראשי</b>
רוני	שפירא	1 2 3 4 5 6 7
סמיר	דרובי	

<b>ד. מקורות מימון עבורם מיועד הדו"ח</b>		
שם מקור המימון	קוד מקור מימון	סכום שאושר למחקר בשנות תיקצוב הדו"ח בשקלים
מדען ראשי	02-4882	90,000
מוסד המחקר	04-047	90,000

**ה. תקציר שים לב - על התקציר להיכתב בעברית לפי סעיף ה' שבהנחיות לכתובת דיווחים**

מודעות הציבור וערנות הרשויות לקשר בין חומרים חיסוי כימיים וסיכונים בריאותיים חמורים הביאה לדחיקת מרבית הפונגיצידים והכימיקלים המסורתיים. במקביל גובר העניין בחומרי טבע ובעיקר בשמנים אתריים כחומרים טבעיים המוכרים כ GRAS כאלטרנטיבה בטוחה יותר. יתרה מזו, לא מכבר פותחו טכנולוגיות בארץ ובעולם ליישום שמנים אתריים במגוון פירות וירקות למניעת התפתחות ריקבונות ממקורות מיקרוביאליים. עד כה לא דווח על התפתחות עמידות כנגד שמנים אתריים וכן לא ידוע על שינויים באלימות של מיקרואורגניזמים הנחשפים לריכוזים תת-קטלניים של שמנים אתריים.

בתקופת המחקר הנוכחית נבדקה השפעתם של שמנים אתריים על 2 מיקרואורגניזמים הגורמים למחלות צמחים החיידק *Pectobacterium carotovorum* והפטריה *Penicillium digitatum* וכן על החיידק הפתוגני לאדם *Pseudomonas aeruginosa*. בנוסף נבדקה השפעתו של הפוליפנול העיקרי הנמצא בתה *Epigallocatechin gallate* על החיידק הנפוץ במזון והפתוגני לאדם *Staphylococcus aureus*. נמצא כי מנטול, טימול ולימונן בפאזה נדיפה גורמים להגדלת השטח הנקרוטי פי 5 אותו יוצר החיידק *P. carotovorum* על עלי כרוב וסלרי. בנוסף החשיפה לשלושת החומרים מגבירה גם ייצור אנזימים פקטוליטיים ומחשישה את קצב השחייה של החיידק. בפטריה *P. digitatum* מצאנו שמעכבי חלבוני G, אדנילט ציקלאז ו cAMP עיכבו את זירוז הנביטה ע"י אדי לימונן. חשיפה לריכוזים תת-קטלניים של שמנים אתריים גרמה לעליה ניכרת ומובהקת בגורמי הפתוגניות בחיידק *P. aeruginosa* כמו ביופילם ופולסכריד חוץ תאי, סידרופור הקושר ברזל ומתחרה עם ההמוגלובין ואלאסטאז- אנזים המפרק את הדבק הבין-תאי ברקמות אנימליות. כיוון שבשמנים האתריים הקבוצה הפונקציונאלית היא פנול פנינו לבדוק השפעת פוליפנול על החיידק *S. aureus*. נמצא כי חשיפת החיידק גורמת לעמידות צולבת עם חומרים אנטיביוטיים הפוגעים בדופן, עליה בעמידות לחום ולאור UV ועליה בפעילות המוליזין –אנזים המפרק כדוריות דם אדומות. תוצאות המחקר מצביעות על הסכנה בחשיפת מיקרואורגניזמים במזון לחומרי טבע אנטימיקרוביאליים המתבטאת בהגברת האלימות הן לצמח והן לאדם ולחי.

## 1. אישורים

הנני מאשר שקראתי את ההנחיות להגשת דיווחים לקרן המדען הראשי והדו"ח המצ"ב מוגש לפיהן

חוקר ראשי	מנהל המחלקה	מנהל המכון (פקולטה)	אמרכלות (רשות המחקר)	רשות המחקר	תאריך (שנה) (יום)	(חודש)
-----------	-------------	------------------------	----------------------------	---------------	-------------------------	--------

פיתוח עמידות והגברת אלימות בפטריות ובחיידקים התוקפים תוצרת חקלאית טרייה  
לאחר הקטיף כתוצאה מחשיפה לשמנים אתריים בריכוזים תת-קטלניים

### **Development of resistance and enhancement of virulence of fungi and bacteria pathogenic to harvested fresh agricultural commodities following exposure to sub-lethal concentrations of essential oils**

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

ע"י

רוני שפירא      ביוכימיה ומדעי המזון, רחובות  
סמיר דרובי      מדעי המזון, מנהל המחקר החקלאי, בית דגו

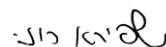
Shapira Roni, Biochemistry and Food Science, Faculty of Agriculture, P.O. B. 12  
Rehovot 76100. E-mail: [shapira@agri.huji.ac.il](mailto:shapira@agri.huji.ac.il)

Samir Droby, Food Science, ARO, The Volcani Center, P.O.B. 6 Bet Dagan  
50250. E-mail: [samird@volcani.agri.gov.il](mailto:samird@volcani.agri.gov.il)

אוקטובר 2012

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא



חתימת החוקר:

## תוכן העניינים

עמוד	
2	א. שם ההצעה
3	ב. תקציר
3	ג. מבוא ומטרות המחקר
5	ד. עיקרי הניסויים והתוצאות
16	ה. סיכום

### ב. תקציר

מודעות הציבור וערנות הרשויות לקשר בין חומרים חיטוי כימיים וסיכונים בריאותיים חמורים הביאה לדחיקת מרבית הפונגיצידיים והכימיקלים המסורתיים. במקביל גובר העניין בחומרי טבע ובעיקר בשמנים אתרים כחומרים טבעיים המוכרים כ GRAS כאלטרנטיבה בטוחה יותר. יתרה מזו, לא מכבר פותחו טכנולוגיות בארץ ובעולם ליישום שמנים אתריים במגוון פירות וירקות למניעת התפתחות ריקבונות ממקורות מיקרוביאליים. עד כה לא דווח על התפתחות עמידות כנגד שמנים אתרים וכן לא ידוע על שינויים באלימות של מיקרואורגניזמים הנחשפים לריכוזים תת-קטלנים של שמנים אתריים.

בתקופת המחקר הנוכחית נבדקה השפעתם של שמנים אתריים על 2 מיקרואורגניזמים הגורמים למחלות צמחים החיידק *Pectobacterium carotovorum* והפטריה *Penicillium digitatum* וכן על החיידק הפתוגני לאדם *Pseudomonas aeruginosa*. בנוסף נבדקה השפעתו של הפוליפנול העיקרי הנמצא בתה *Epigallocatechin gallate* על החיידק הנפוץ במזון והפתוגני לאדם *Staphylococcus aureus*. נמצא כי מנטול, טימול ולימונן בפאזה נדיפה גורמים להגדלת השטח הנקרטי פי 5 אותו יוצר החיידק *P. carotovorum* על עלי כרוב וסלרי. בנוסף החשיפה לשלושת החומרים מגבירה גם ייצור אנזימים פקטוליטיים ומחישא את קצב השחייה של החיידק. בפטריה *P. digitatum* מצאנו שמעכבי חלבוני G, אדנילט ציקלאז ו cAMP עיכבו את זירוז הנביטה ע"י אדי לימונן. חשיפה לריכוזים תת-קטלניים של שמנים אתרים גרמה לעליה ניכרת ומובהקת בגורמי הפתוגניות בחיידק *P. aeruginosa* כמו ביופילם ופולסכריד חוץ תאי, סידרופור הקושר ברזל ומתחרה עם ההמוגלובין ואלאסטאז- אנזים המפרק את הדבק הבין-תאי ברקמות אנימליות. כיוון שבשמנים האתריים הקבוצה הפונקציונאלית היא פנול פנינו לבדוק השפעת פולפנול על החיידק *S. aureus*. נמצא כי חשיפת החיידק גורמת לעמידות צולבת עם חומרים אנטיביוטיים הפוגעים בדופן, עליה בעמידות לחום ולאור UV ועליה בפעילות המוליזין –אנזים המפרק כדוריות דם אדומות. תוצאות המחקר מצביעות על הסכנה בחשיפת מיקרואורגניזמים במזון לחומרי טבע אנטימיקרוביאליים המתבטאת בהגברת האלימות הן לצמח והן לאדם ולחי.

### ג. מבוא

בשנים האחרונות אנו עדים להתחזקות הדרישה להפחתת השימוש בחומרי הדברה כימיים בחקלאות. דרישה זו תמשיך ותתחזק כתוצאה ממודעות הולכת וגוברת של הציבור ושלטונות הבריאות לסכנות

הכרוכות בהמשך השימוש הנרחב בחומרים הכימיים להדברת מחלות צמחים. לבעיית השימוש בחומרי הדברה כנגד מחלות לאחר הקטיף של תוצרת חקלאית טרייה יש חשיבות מיוחדת בגלל שאיריות החומרים בתוצרת, ואפשרות החשיפה הישירה של הצרכנים לחומרים אלה. מיקרואורגניזמים (חיידקים ועובשים) המזהמים/המתפתחים במהלך אחסון פירות ירקות, צמחי תבלין ופרחים גורמים לנזקים גדולים בקיצור חיי המדף, בהשמדת חלק גדול מהיבול, ובהשקעת אנרגיה ומשאבים רבים לצמצום הנזק. הדרכים המקובלות כיום בטיפול בתוצרת חקלאית לאחר הקטיף מתבססות על שלוב של טמפרטורת נמוכות, אורח מתואמת, מעכבי אתילן וטיפולים בפונגיצידים או חיטוי וניקוי בכלור או מים חמים. במקביל גובר העניין בשימוש בשמנים אתרים כחומרים טבעיים המוכרים כ- GRAS כאלטרנטיבה בטוחה יותר. יתרה מזו, לא מכבר פותחו טכנולוגיות בארץ ובעולם ליישום שמנים אתריים במגוון פירות וירקות למניעת התפתחות רקבונות ממקורות מיקרוביאליים. עד כה לא דווח על התפתחות עמידות כנגד שמנים אתרים וכן לא ידוע על שינויים באלימות של מיקרואורגניזמים הנחשפים לריכוזים תת-קטלניים של השמנים. שימוש בשמנים אתריים, המופקים בעיקר מצמחי רפואה ותבלין, למניעת התפתחות גורמי מחלות בצמחים ובבני אדם נחקרה רבות. למרות המחקרים הרבים, היישום המעשי של שמנים אתריים לא הגיע למימוש נרחב. הסיבה העיקרית היא היעדר פורמולוציות מתאימות והריכוזים הגבוהים הנדרשים למתן השפעה ברמה מספקת שגרמו לשינויים אורגנולפטיים. ממחקרים שונים עולה שחשיפת פירות וירקות לריכוזים נמוכים של שמנים אתריים בצורה נדיפה יכולה להיות שיטה מתאימה לעיכוב והדברה של מגוון פתוגנים.

ממחקרים מוקדמים במעבדתנו (ר. שפירא) עולה שחשיפת גזע פתוגני לאדם של החיידק *E. coli* לשמן אתרי מעלי מנטה או למרכיב העיקרי שבו מנטול בריכוזים נמוכים גרמה להופעת חיידקי אדפטאנטים העמידים לחומר פי 10 יחסית לגזע הבר. יתרה מזו החיידקים שנחשפו גילו גם עמידות רבה יותר לשמן אתרי המופק מטימין או למרכיב העיקרי שבו. זאת ועוד נמצא שהחיידקים האדפטנטים עמידים גם למספר חומרים אנטיביוטים וכן נתגלתה בהם יצירה מוגברת של חומר חוץ תאי – ביופילם. שני הגורמים האחרונים נחשבים כפטריות חיוניים בהעצמת אלימות החיידק. חשיפה של נבגי העובשים *Penicillium digitatum* ו- *Penicillin italicum* הפוגעים בפרי הדר במהלך האחסון (ס. דרובי), לריכוזים נמוכים של שמנים אתריים מקליפת הדרים וגם למרכיב הדומיננטי שבהם הלימונן, עודדה נביטה של נבגי פטריות אלה אך עיכבה את נביטת הנבגים של גורמי עובש שאינם תוקפים הדרים *Botrytis cinerea* ו- *Penicillium expansum*. דבר המצביע על מעורבות אפשרית של שמנים אלה בהתקפת הפטריות הפתוגניות לפרי הדר. מתוצאות שהתקבלו בשתי המערכות נראה שחשיפת מיקרואורגניזמים לריכוזים תת-קטלניים מעלה את הפוטנציאל להגברת אלימות, עמידות צולבת ועידוד של מינים הפתוגנים לתוצרת חקלאית מאוחסנת ולאדם.

#### מטרות המחקר:

1. השפעת החשיפה לריכוזים תת-קטלניים של שמנים אתריים על חיידקים פתוגניים לצמח ולאדם.
2. השפעת החשיפה על ביטוי גורמי אלימות (אנזימים פקטוליטיים וביופילם)

3. השפעת החשיפה של הפטריה לריכוזים תת-קטלניים של שמנים אתריים על הפתוגניות.

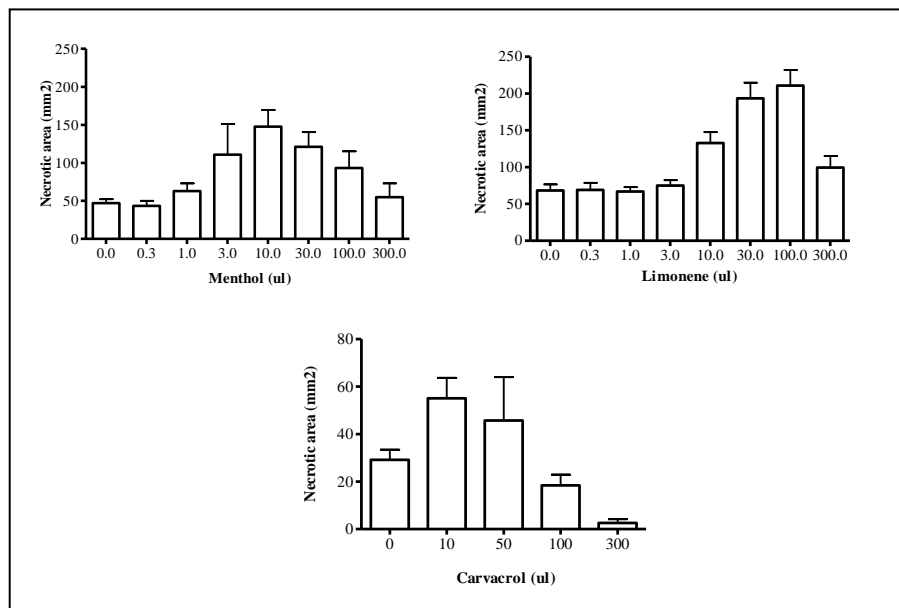
4. לימוד מנגנונים תאיים המתווכים ומבקרים את התגובה המיקרוביאלית.

## ד. עיקרי הניסויים ותוצאות

### 1. השפעת חשיפת חיידקי *P. carotovorum* למנטול, לימונן או תימול על אלימות החיידק

בעקבות התוצאות הראשוניות, שהראו הגברה בנקרוזה הנגרמת לדסקיות עלי כרוב ע"י החיידק *P. carotovorum*, בעת חשיפה לרמות תת-קטלניות של מנטול ביקשנו לברר האם תופעה זו הינה יחודית למנטול או שמא לחומרי טבע בעלי מבנה דומה תהיה השפעה דומה. חיידקי *P. carotovorum* מתרבית over-night נמהלו 1:500 וגודלו עד  $O.D. (600) = 0.5$ . נפח של  $10 \mu\text{l}$  מתמיסות אלו שימש להדבקה של דסקיות עלי כרוב. מאחר ומנטול, לימונן ותימול הינם חומרים נדיפים הישרנו בצלחות איריה של החומר, ע"י טפטוף של  $10 \mu\text{l}$  תמיסת 6M של החומר על דסקית נייר סופג (Whatman No. 3, 10mm diameter) שנמצא במכסה הצלחת. הדסקיות הודגרו ב- $24^{\circ}\text{C}$  למשך 24 שעות. ולאחריהן נמדד שטח הרקב בעזרת תוכנת ImageJ.

מצאנו כי גם חשיפת חיידקי *P. carotovorum* לרמות תת-קטלניות של לימונן או תימול מגבירה את הנקרוזה הנגרמת ע"י חיידקים אלו לדסקיות עלי כרוב. כמו כן, הראנו כי בדומה למצב בעקבות חשיפת החיידקים לרמה תת-קטלנית של מנטול, הרי שגם לגבי לימונן ותימול מדובר בתופעה תלוית ריכוז.

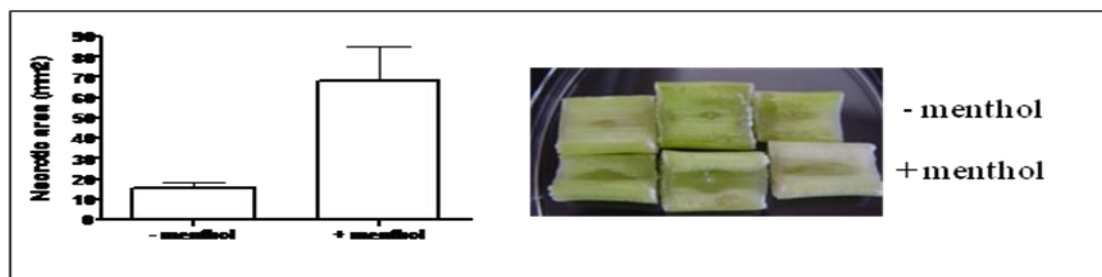


איור 1: השטח הנקרטי המתקבל בעת הדבקה של עלי כרוב ע"י חיידקי *P. carotovorum* בנוכחות או העדר אווירה של מנטול, לימונן או תימול.

### 2. השפעת חשיפת חיידקי *P. carotovorum* למנטול, לימונן או תימול על אלימות החיידק

במערכת מודל של סלרי.

על מנת לברר אם תופעת הגברת האלימות הינה ספציפית לכרוב או האם מדובר בתופעה כללית חזרנו על ניסויי ההדבקה במערכת של גבעולי סלרי. חיידקי *P. carotovorum* גודלו בתנאים המפורטים מעלה ושימשו להדבקת גבעולי סלרי בנוכחות אוירה של מנטול.

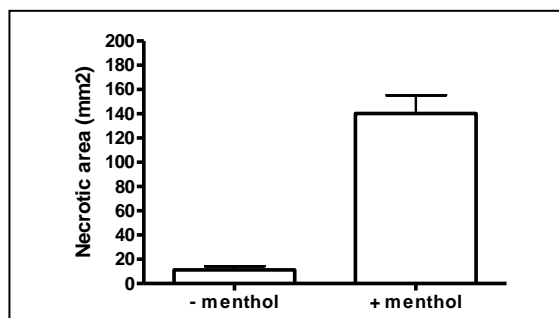


איור 2: הדבקה של גבעולי סלרי ע"י חיידקי *P. carotovorum* בנוכחות או העדר אוירה של מנטול.

כפי שניתן לראות שטח הנקרואה על גבעולי הביקורת היה במוצע  $15.47 \text{ mm}^2$ , בעוד ששטח הנקרואה במערכת שנחשפה למנטול הייתה גבוהה פי 4.4,  $68.29 \text{ mm}^2$  (איור 2). תוצאות דומות התקבלו בשימוש גם בשימוש בלימון או תימול.

### 3. השפעת חשיפת חיידקי *P. atrosepticum* למנטול, לימון או תימול על אלימות החיידק *P. atrosepticum*.

ככדי לוודא שהתופעה אינה אופינית לזן חיידק אחד בלבד הדבקנו גבעולי סלרי בחיידקי *P. atrosepticum* בנוכחות רמה תת-קטלנית של מנטול, לימון או תימול. חיידקי *P. atrosepticum* גודלו בתנאים המפורטים מעלה ושימשו להדבקת גבעולי סלרי בנוכחות אוירה של מנטול.

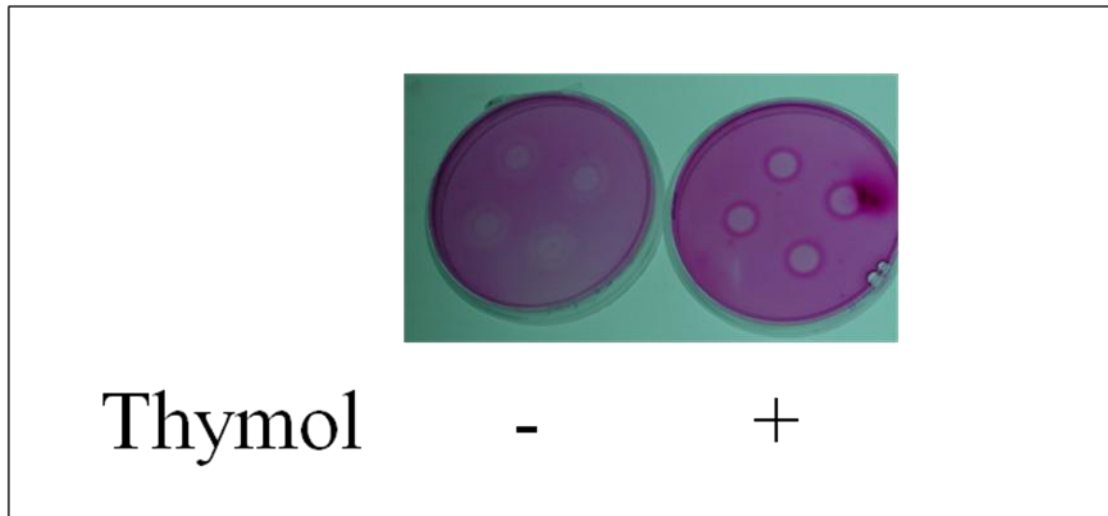


איור 3: הדבקה של גבעולי סלרי ע"י חיידקי *P. atrosepticum* בנוכחות או העדר אוירה של מנטול.

גם בניסויים אלו התקבלה עליה בשטח הנקרואה על גבעולי הסלרי. שטח הנקרואה בגבעולי הביקורת היה במוצע  $11.19 \text{ mm}^2$ , בעוד ששטח הנקרואה במערכת שנחשפה למנטול הייתה גבוהה פי 12.5,  $140.22$  (איור 3). תוצאות דומות התקבלו גם בשימוש בלימון או תימול.

4. השפעת חשיפת חיידקי *P. carotovorum* ללימון או תימול על יצור אנזימים פקטינוליטיים כיון שהגורם המרכזי ביצירת נקרואה בעלים היא הפרשת אנזימים המפרקים פקטין הועלתה ההשערה שהחשיפה גורמת לייצור ביתר של אנזימים אלה. תוצאות קודמות הראו כי בנוכחות מנטול הוגברה

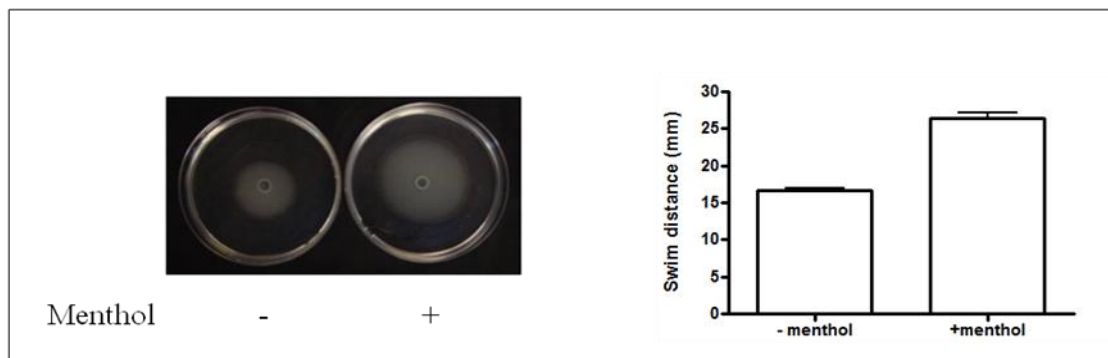
הפרשת אנזימים אלו. לבדיקה במערכת המבודדת מהצמח יתרון כיון שהיא מסוגלת לבודד את הגורמים לתופעה. חיידקי *P. carotovorum* מתרבית over night נמהלו 1:500 וגודלו עד  $O.D_{(600)}=0.5$ . נפח של  $101\mu$  מתמיסות אלו שימש לאילוח צלחות המכילות פקטין במצע הגידול. מכסה הצלחות הכיל נייר סינון ספוג בלימוני, תימול או במים (ביקורת). לאחר אינקובציה נצבע המצע ב- ruthenium red הנקשר רק לפקטין ובכך מאפשר לזהות פעילות פקטינוליטית. פקטין-ליאזות יפרקו את הפולימר וכך יתקבלו אזורים ללא צבע. פעילות של פקטין-מטיל-אסטראזות תגדיל את יכולת קשירת הצבע ותיתן אזורים כהים. פעילות של פוליגלקטורונאז אפשרית רק לאחר פעילות פקטין-מטיל-אסטראז ותתבטא באזור כהה המקיף אזור חסר צבע. כפי שניתן לראות באיור 4 החשיפה לרמות תת-קטלניות של לימוני או תימול מגבירה את פעילות הפקטין-מטיל-אסטראז ויתכן גם את פעילות הפוליגלקטורונאז.



איור 4: פעילות פקטינוליטית של חיידקי *P. carotovorum*. בנוכחות או העדר אווירה של תימול. תוצאות דומות התקבלו עבור לימוני.

**5. חשיפת חיידקי *P. fluorescens* או *P. carotovorum* לרמות תת-קטלניות של מנטול משפיעה על קצב השחיה שלהם.**

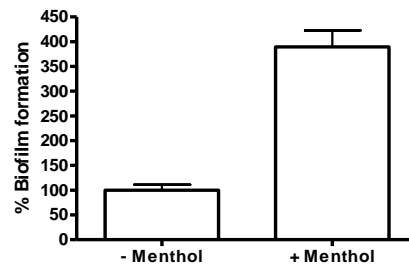
חיידקי *P. carotovorum* מתרבית over night נמהלו 1:500 וגודלו עד  $O.D_{(600)}=0.8$ . נפח של  $11\mu$  מתמיסות אלו שימש לאילוח צלחות המכילות מצע המעודד שחיה. מכסה הצלחות הכיל נייר סינון ספוג במנטול או במים (ביקורת). לאחר אינקובציה נמדד קוטר המושבה שהתקבלה, המעיד על המרחק אותו שחו החיידקים.



איור 5: מרחק שחיה ע"י חיידקי *P. carotovorum* בנוכחות או העדר רמה תת-קטלנית של מנטול. כפי שניתן לראות חיידקי הביקורת שחו למרחק של 16.66mm בעוד מרחק השחיה במערכת שנחשפה למנטול היה גבוה פי 1.6, 26.42 mm (איור 5). תוצאות דומות התקבלו גם עבור חיידקי *P. fluorescence*.

## 6. חשיפת חיידקי *P. carotovorum* לרמות תת-קטלניות של מנטול משפיעה על יכולתם ליצור ביופילם.

חיידקי *P. carotovorum* מתרבי over night נמהלו עד  $O.D_{(600)}=0.05$  במצע המעודד יצירת ביופילם. החיידקים הודגרו ב- $26^{\circ}C$  למשך 24 שעות וכמות הביופילם שנוצרה נמדדה ע"י צביעה ב-crystal violet

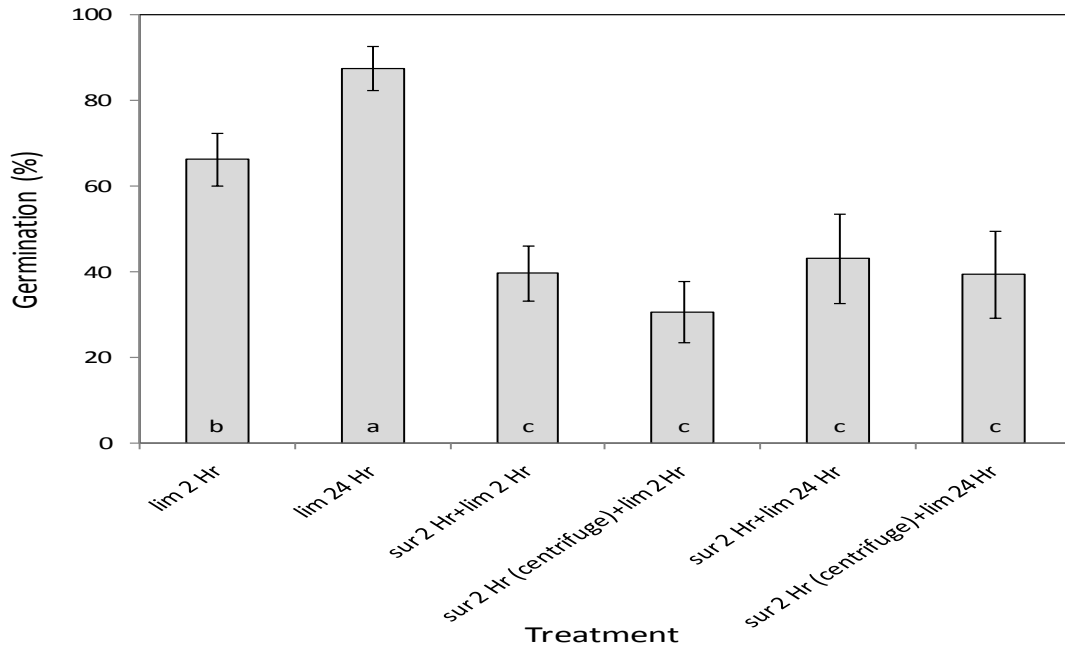


איור 6: יצירת ביופילם ע"י חיידקי *P. carotovorum* בנוכחות או העדר רמה תת-קטלנית של מנטול. ניתן לראות כי החיידקים שנחשפו למנטול יצרו פי 4 ביופילם בהשוואה לחיידקי הביקורת.

## 7. השפעת מולקולות המעכבות מעבר אותות תוך תאיים על נביטה בנוכחות חומרים נדיפים.

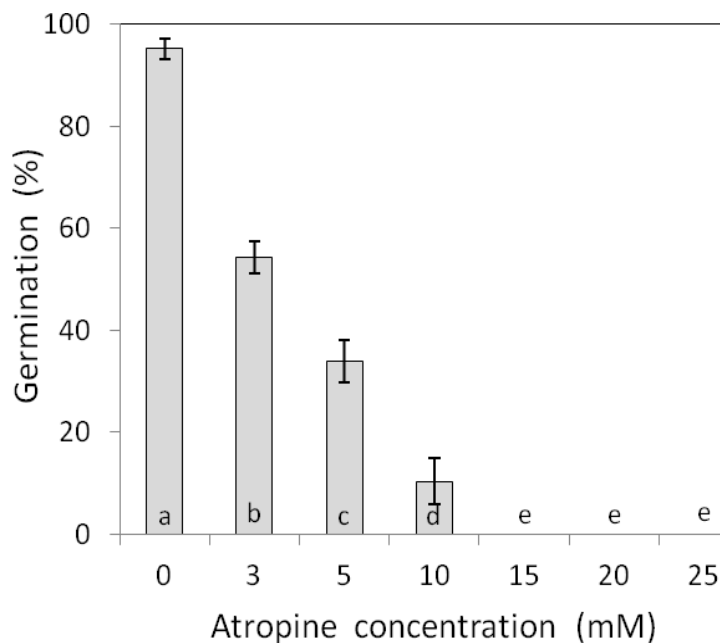
בתקופת המחקר הקודמת מצאנו שמלבד לימון חומרים נדיפים רבים גורמים להאצת נביטה בפטריה *P. digitatum*. זאת ועוד נמצא שהתופעה סגולית ל *P. digitatum* ואינה מתרחשת בפטריות פוטופוטוגניות אחרות אפילו כאלה הקרובות פילוגנטית. העלתה היפותזה שחלבוני G מתווכים את עידוד הנביטה ע"י חומרי טבע נדיפים. כדי להוכיח מעורבות זאת השתמשנו במעכבים ספציפיים למערכת זאת. Suramin - מנגנון הפעולה העיקרי הוא עיכוב האסוציאציה בין תת יחידה  $\alpha$  של חלבון G לבין הדימר שבנוי מתת יחידות  $\beta$  ו- $\gamma$ , מבלי להפריע לאתר קישור הקולטן על גבי תת יחידה  $\alpha$  של חלבון G. חשיפת הנבגים ל-suramin למשך שעתיים ובהמשך ללימון גם כן למשך שעתיים עיכבה את הנביטה באופן משמעותי (39.65%) לעומת הביקורת (64.53%) (איור 7). גם לאחר חשיפת תרחיף הנבגים ל-suramin למשך שעתיים ולאחר מכן ללימון למשך 24 שעות התקבל עיכוב משמעותי (43.02%) ביחס לביקורת (87.45%). מגמה דומה התקבלה גם לאחר הרחקת ה-suramin מתרחיף הנבגים באמצעות צנטריפוגה וחשיפת התרחיף ללימון למשך שעתיים או 24 שעות. בנוסף, ניתן לראות כי תוצאות שיעורי הנביטה שהתקבלו עבור הטיפולים השונים היו קרובות אחת לשנייה ולא נמצאו הבדלים סטטיסטיים. על מנת לוודא כי הנבגים שנחשפו ל-suramin לא מתו בעקבות הטיפול, לאחר האינקובציה עם המעכב הם נזרעו על מצע מזון מוצק (PDA). גם במקרה זה התקבלה נביטה מלאה.





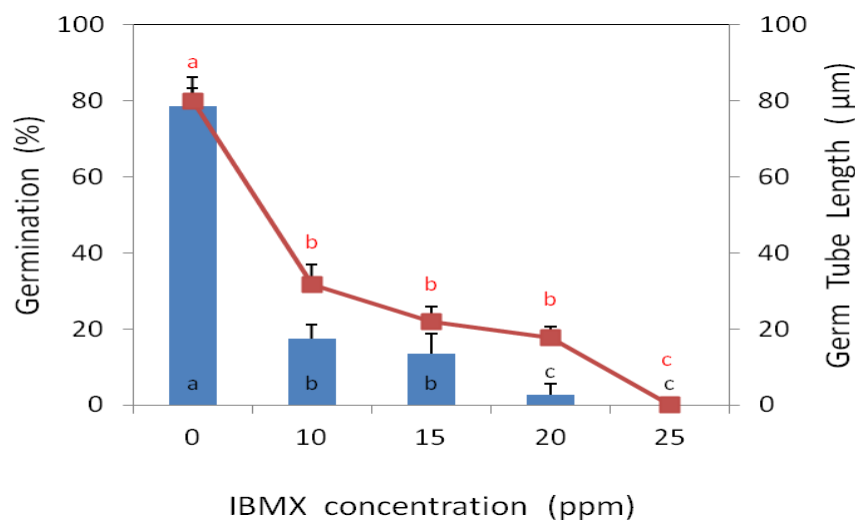
איור 7: השפעת suramin על שיעור הנביטה של נבגי *P. digitatum* במצע אגר מים. הערכים מוצגים כממוצע ושגיאת תקן של 3 חזרות. האותיות מייצגות הבדלים סטטיסטיים בין הערכים ( $p < 0.05$ ).

אטרופין- מעכב ספציפי של פעילות Adenylate cyclase שהינו אנזים מפתח שמעורב בסינתזת השליח המשני, cAMP. תרחיף נבגים הודגר בנוכחות אטרופין ונחשף ללימונן למשך 19 שעות על מצע אגר מים, התקבל עיכוב בנביטה בהשוואה לביקורת שבה אחוזי הנביטה עמדו על 95.2%. עיכוב מוחלט בנביטה התקבל החל מריכוז של 15 mM. הערכים שהתקבלו נבדלו מהביקורת באופן מובהק (איור 8).



איור 8: שיעור הנביטה של *P. digitatum* לאחר חשיפה לאטרופין. הערכים מוצגים כממוצע ושגיאת תקן של 4 חזרות. האותיות מייצגות הבדלים סטטיסטיים בין הערכים ( $p < 0.05$ ) של שיעור הנביטה.

IBMX - הוא מעכב של c-AMP. ניתן לראות כי ל-IBMX יש השפעה מעכבת מובהקת על נביטת נבגי *P. digitatum* לעומת הביקורת. כבר בריכוז של 10mM IBMX ו-728 ppm לימון התקבל עיכוב משמעותי בנביטה (17.34%) ביחס לביקורת (78.57%) (איור 9). IBMX גרם לעיכוב מלא בריכוז של 25mM. בנוסף, ניתן לראות כי IBMX השפיע גם על אורך הקורים באופן משמעותי ביחס לביקורת.

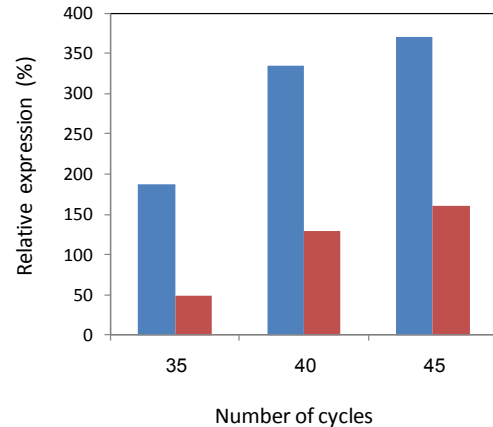
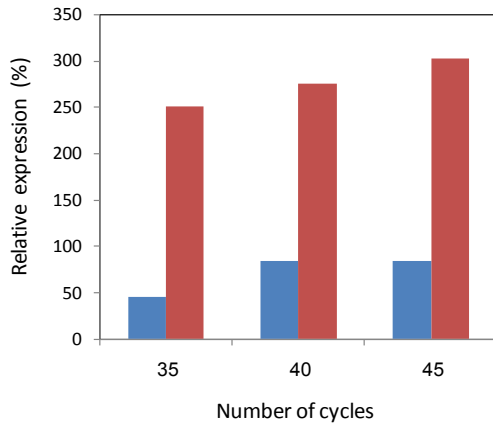


איור 9: שיעור נביטה ואורך נחשון הנביטה של *P. digitatum* לאחר חשיפה ל-IBMX. הערכים מוצגים כממוצע ושגיאת תקן של 4 חזרות. האותיות מייצגות הבדלים סטטיסטיים בין הערכים ( $p < 0.05$ ).

### 9. רמת הביטוי הגן המקודד לתת היחידה $G\alpha$ בהשפעת אדי לימון בנבגי *P. digitatum* ו-*P. expansum*

כדי לבדוק האם החשיפה ללימון מעורבת בהגברת ביטוי של מערכת מעבר האותות נעשה PCR חצי כמותי תוך שימוש בתחלים לתת היחידה  $G\alpha$  ולחלבון אקטין כבקורת. חלוקת עוצמת הפס נתנה מקדם שנקרא RE או relative expression. נבחנו מספר מחזורי PCR כדי להגיע לאופטימזציה. מטרת ניסוי זה הייתה לבחון את פרופיל ביטוי הגן המקודד לתת יחידה  $\alpha$  של חלבון G בנבגי הפטרייה הפתוגנית *P. digitatum* לעומת הפטרייה הלא פתוגנית, *P. expansum*.

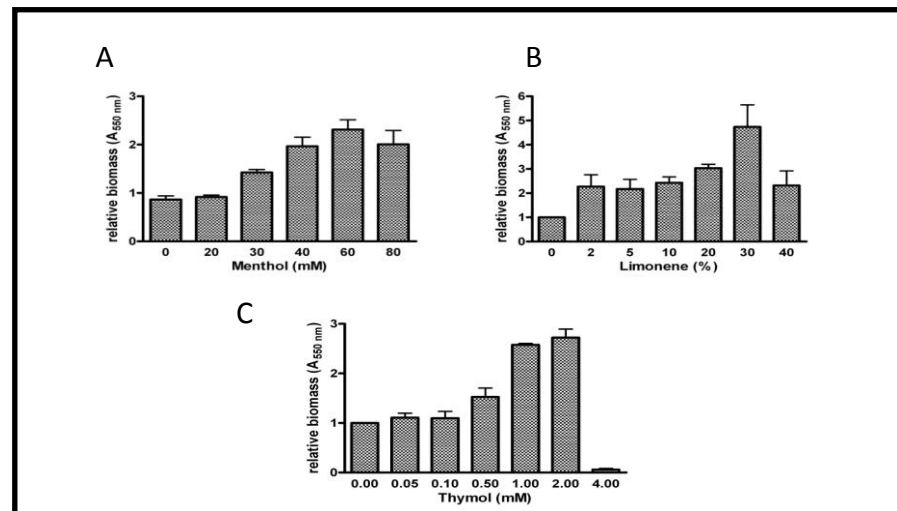
ניתן לראות כי בעקבות חשיפת נבגי *P. digitatum* ללימון חלה עלייה גדולה ברמות ביטוי הגן המקודד לתת יחידה  $\alpha$  של חלבון G, בהשוואה לביקורת (איור 10, שמאל). ההשפעה של לימון על נבגי *P. expansum* הייתה הפוכה מזו שהתקבלה על *P. digitatum*. חשיפת נבגי *P. expansum* ללימון הובילה לירידה ברמות ביטוי הגן המקודד לתת יחידה  $\alpha$  של חלבון G, בהשוואה לביקורת (איור 10, ימין).



איור 10: פרופיל ביטוי הגן המקודד לתת יחידה  $\alpha$  של חלבון G בנבגי הפטריות *P. digitatum* ו-*P. expansum*. שלא נחשפו ללימוןן (■) ובנבגים שנחשפו ללימוןן למשך שעותיים (■).

10. חשיפת חיידקי *P. aeruginosa* לרמות תת-קטלניות של מנטול, לימוןן או טימול מגבירה יכולתם ליצור ביופילם.

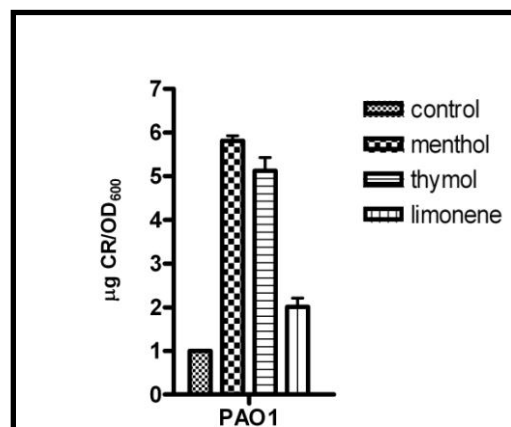
חיידקי *P. aeruginosa* מתרבי over night נמהלו עד  $O.D_{(600)}=0.05$  במצע המעודד יצירת ביופילם. החיידקים הודגרו ב- $37^{\circ}C$  למשך 24 שעות וכמות הביופילם שנוצרה נמדדה ע"י צביעה ב-cristal violet.



איור 11: יצירת ביופילם ע"י חיידקי *P. carotovorum* בנוכחות או העדר רמה תת-קטלנית של מנטול (A). לימוןן (B) או טימול (C). חשיפה לרמה תת-קטלנית של מנטול, טימול או לימוןן הגבירה את יצור הביופילם פי 2.5, 2.5 ו-5 בהתאמה.

11. חשיפת חיידקי *P. aeruginosa* לרמות תת-קטלניות של מנטול, לימוןן או טימול מגבירה יכולתם ליצור פוליסקריד חוץ תאי (EPS).

להערכת רמת הפרשת EPS החיידקים שגודלו O.N. נמהלו 1:500 במצע LB טרי לכדי 10% מנפח הכלי והודגרו בטמפ' של 37°C בטלטול של 220 rpm עד להגעה ל- OD<sub>600</sub> של 0.5 CFU/ml (10<sup>8</sup>). החיידקים נמהלו פי 10 לתוך מצע LB המכיל thymol, menthol או limonene והודגרו O.N. בקצב של 220 rpm. למחרת נלקח נפח של 2 מ"ל מכל דוגמא וסורכו בצנטריפוגה לצורך שיקוע החיידקים. הנוזל העליון נשאב ומשקע החיידקים הורחף מחדש ב-1 מ"ל של מצע טריפטון המכיל (CR) Condo red בריכוז של 40 µg/ml ששימש לצביעת EPS. החיידקים עורבבו בוורטקס והודגרו בטמפ' של 37°C בטלטול של 250 rpm למשך שעתיים. לאחר מכן הדוגמאות סורכו לצורך שיקוע התאים ו-CR שלא נקשר. כמות ה-CR בנוזל העליון נלקחה למדידת בליעה באורך גל של 490 nm ספקטרופוטומטר. לצורך קביעת ריכוז ה-CR שנקשר לתאי החיידקים ב-µg/ml נבנה עקום כיוול על סמך מיהולים שונים של מצע פפטון עם CR. הערכים שחושבו מעקום הכיוול הופחתו מריכוז ה-CR ההתחלתי (40µg/ml) על מנת לקבל ריכוזי CR שנקשר ל-EPS. הריכוזים שהתקבלו נורמלו לריכוז התאים בכל דוגמא על סמך בליעה ב- OD<sub>600</sub>. הריכוז שחושב מהווה מדד עקיף לרמת ה-EPS המופרשים מהתאים בדוגמאות השונות.

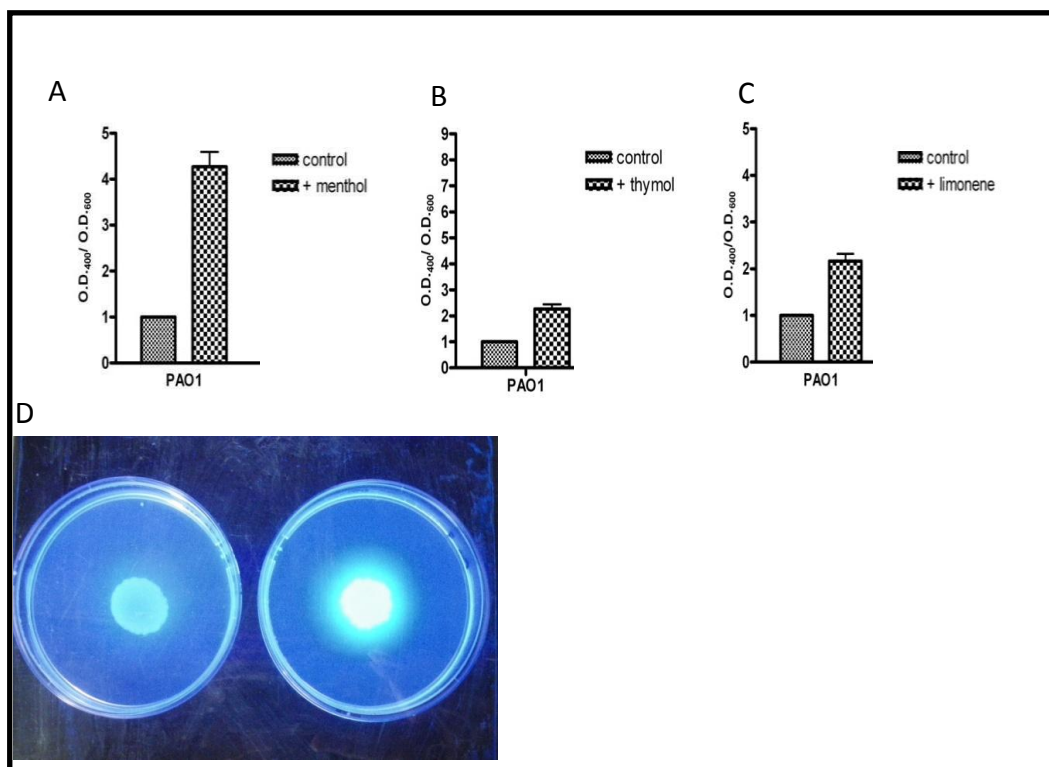


**איור 12:** רמת הפרשת EPS בקרב חיידקי *P. aeruginosa* בתגובה לחשיפה לריכוזים תת קטלניים של thymol, menthol ו-limonene. הערכים המוצגים הם לאחר נירמול לכמות החיידקים בכל דוגמא וביחס לדוגמת הביקורת בכל ניסוי. ניתן לראות כי חשיפה לרמה תת-קטלנית של מנטול, לימוןן או תימול מגבירה את הפרשת ה-EPS פי 2,5,6 בהתאמה.

**12. חשיפת חיידקי *P. aeruginosa* לרמות תת-קטלניות של מנטול, לימוןן או טימול מגבירה יכולתם להפריש את הפיגמנט הפלורוצנטי (PVD) pyoverdine.**

הפיגמנט הפלורוצנטי (PVD) pyoverdine, הוא הסידרופור המרכזי המופרש ע"י חיידקי PA, כחלק ממערכת קשירת ברזל בסביבת המאחסן בתנאי מחסור. נמצא כי רמת יצורו קשורה ליכולת הפתוגנית של החיידק. החיידקים שגודלו O.N. נמהלו 1:100 במי פפטון ונשטפו פעמיים ע"י מי פפטון ושיקוע בצנטריפוגה. מכל תמיסת חיידק טופטפה טיפה של 10 µl (כ-10<sup>6</sup> CFU חיידקים) על גבי צלחות אגר

טריפטון שהכילו כל אחת בנפרד ריכוזים שונים של thymol, menthol או limonene בנוסף לצלחת ביקורת (ללא תוספת חומר נבדק). הצלחות הודגרו בטמ' של 37°C למשך כ-48 שעות. עם סיום ההדגרה חורצו מקטעי הגידול בצלחות וטולטלו ב-5 מ"ל של DW למשך כשעה לצורך מיצוי ה-pyoverdine ממצע הגידול. רמת ה-pyoverdine נקבעה בעזרת מדידת בליעת הדוגמאות הממוצות באורך גל של 400 nm. בנוסף נערכה עבור כל דוגמא מדידת בליעה באורך גל של 600 nm לצורך הערכת כמות החיידקים. רמת ה-pyoverdine עבור כל דוגמא נורמלה לריכוז החיידקים שנמדד.

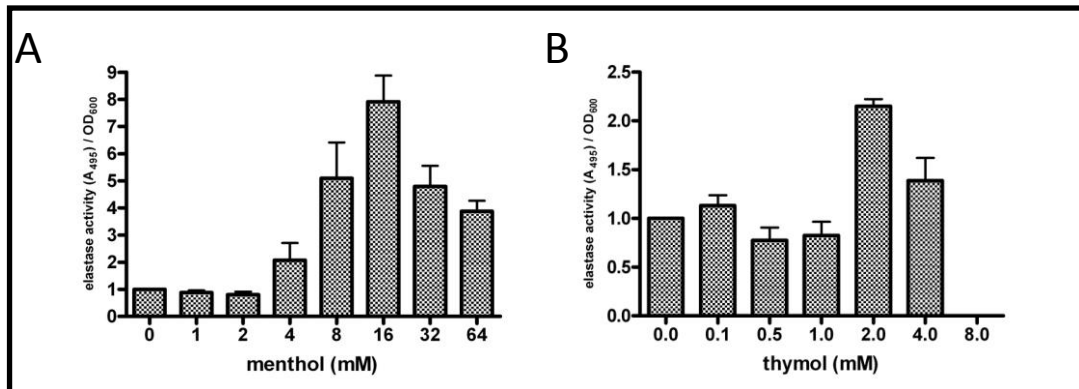


איור 13: רמת הפרשת PVD בקרב חיידקי *P. aeruginosa* בתגובה לחשיפה לריכוזים תת-קטלניים של menthol (גרף A), thymol (גרף B) ו-limonene (גרף C). הערכים המוצגים הם לאחר נירמול לכמות החיידקים בכל דוגמא וביחס לדוגמת הביקורת בכל ניסוי. ניתן לראות שחשיפה לרמות תת-קטלניות של מנטול, טימול או לימוןגן נותנת הגברה של פי 2,2,4 בהפרשת PVD בהתאמה. D- צילום מושבות PAOI שהודגרו על גבי צלחות אגר ללא menthol (משמאל) ובנוכחות menthol (מימין) למשך 48 שעות. הצלחות הוקרנו במנורת UV לצורך בדיקת פלורוצנסיות. המושבה בצלחת המכילה menthol נראית פלורוצנסית יותר בשל נוכחות מוגברת של PVD מופרש.

### 13. חשיפת חיידקי *P. aeruginosa* לרמות תת-קטלניות של מנטול או טימול מגבירה את רמת הפרשת האנזים elastase.

האנזים הפרוטאוליטי elastase הוא אחד מגורמי האלימות המופרשים ע"י חיידקי PA בתהליכי זיהום בבע"ח, ומשמש בהרס ואינאקטיבציה של רקמות ומערכות חיסוניות. החיידקים שגודלו O.N. נמהלו 1:500 במצע LB טרי לכדי 10% מנפה הכלי והודגרו בטמ' של 37°C בטלטול של 220 rpm עד להגעה ל- OD<sub>600</sub> של 0.5. החיידקים נמהלו פי 10 לתוך מצע LB המכיל menthol, thymol או limonene והודגרו O.N. בקצב של 220 rpm.

נפח של  $50 \mu\text{l}$  מכל דוגמא סונן בפילטר בקוטר חרירים של  $0.45 \mu\text{m}$  והוסף למבחנה שהכילה  $1 \text{ ml}$  בופר תגובה ו-  $20 \text{ mg}$  של הסובסטרט Elastin Congo red (ECR). הדוגמאות הודגרו בטמפ' של  $37^\circ\text{C}$  בטלטול סיבובי למשך 18 שעות. בסיום ההדגרה הדוגמאות הושמו בקרח והוסף להם EDTA  $0.12\text{M}$  בנפח של  $100 \mu\text{l}$  לצורך הפסקת התגובה. הדוגמאות סורכזו בצנטריפוגה לצורך שיקוע ECR לא מסיס. רמת פעילות יחסית של האנזים נקבעה ע"י קריאת בליעת הנוזל באורך גל של  $495 \text{ nm}$ . כמות הצבע שנמדדה נמצאת ביחס ישר לכמות ה-Congo red שנותק מהסובסטרט ושחרר לנוזל. הערך הנמדד נורמל לריכוז התאים על סמך בליעה ב-  $D_{600}$ , שנמדדה עבור כל דוגמא טרם ההדגרה עם ECR.



איור 14: רמת פעילות elastase בקרב חיידקי *P. aeruginosa* בתגובה לחשיפה לריכוזים תת קטלניים של menthol ו-thymol. הערכים המוצגים הם לאחר נירמול לכמות החיידקים בכל דוגמא וביחס לדוגמת הביקורת בכל ניסוי. ניתן לראות כי חשיפה לרמות תת-קטלניות של מנטול או טימול מגבירה את רמת הפרשת האנזים פי 8,2 בהתאמה.

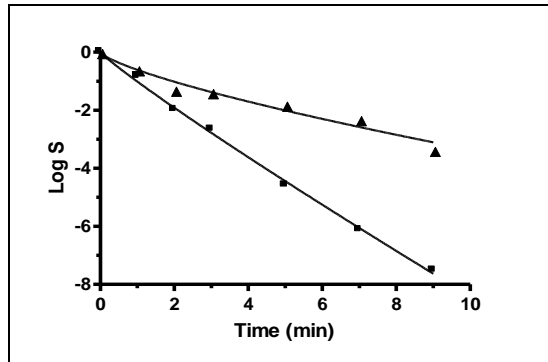
#### 14. חשיפת חיידקי *S. aureus* לרמות תת-קטלניות של הפוליפנוול EGCG גורמת לעמידות ל-EGCG ולעמידות צולבת לחומרים אנטיביוטיים הפוגעים בדופן.

לצורך קביעת ערך MIC (minimum inhibition concentration) החיידקים גודלו למשך שעתיים בנוכחות או בהעדר EGCG והגיעו לעכירות של מעל  $OD_{600 \text{ nm}}=0.3$  במכשיר ספקטרופוטומטר, שהם כ-  $10^8 \text{ CFU/ml}$  חיידקים, נשטפו פעמיים עם PBS באמצעות השקעה בצנטריפוגה, ונמהלו בבופר PBS ל-  $10^5 \text{ CFU/ml}$ . חיידקים אלו הועברו ל-  $200 \mu\text{l}$  מצע MH בצלחת micro-titer, שהכיל סדרת מיהולים פי 2 של EGCG, Vancomycin, Oxacillin, ו-Ampicillin. ערך MIC נקבע כריכוז הנמוך ביותר בו גדלו חיידקים. **טבלה 2.** ערכי MIC של אנטיביוטיקות כנגד 5 זנים של *Staphylococcus*. ערכי ה- MIC נקבעו כריכוזים הגבוהים ביותר בהם גדלו החיידקים עבור כל חומר לאחר חשיפה למשך 20 שעות ב-  $37^\circ\text{C}$  תוך טלטול ב-  $180 \text{ rpm}$ .

STRAIN		MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )			
		Vancomycin	Oxacillin	Ampicillin	EGCG
<i>S. aureus</i> Newman	Control	0.5	0.250	4	50
	Adapted	1	1	32	100

איור 15: ערכי MIC כנגד אנטיביוטיקות הפוגעות בדופן עבור חיידקי *S. aureus* שנחשפו או לא נחשפו לרמה תת קטלנית של EGCG. ניתן לראות כי התקבלה עליה של פי 2,2,8 בעמידות כנגד Vancomycin, Oxacillin, Ampicillin בהתאמה.

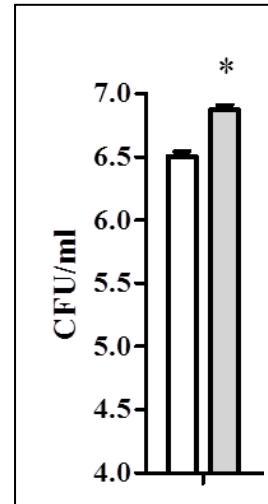
**15. חשיפת חיידקי *S. aureus* לרמות תת-קטלניות של הפוליפנוול EGCG גורמת לעמידות לחום.**  
 תרבית חיידקים גודלה במשך שעותיים בנוכחות או ללא EGCG, במהלכם הגיעה עכירות התרבית ל-  $OD_{600nm}=0.3$ , שהם כ-  $10^8$  CFU/ml. לאחר מכן נשטפה פעמיים ב- PBS בנייהן והושקעה בצנטריפוגה שולחנית (Eppendorf), ומשקע החיידקים רוכז ב- PBS ע"י הרחפה בעשירית הנפח לקבלת  $10^9$  CFU/ml. מיליליטר אחד של כל תרבית הועברה לבקבוק 250 ml, שהכיל 99 ml של PBS טרי ומחומם לטמפרטורה של  $55^{\circ}C$ . הטיפול בחום נמשך 10 דקות בטמפרטורה של  $55^{\circ}C$ , תוך כדי ערבוב באמצעות מגנט מסתובב, במהלכן הוצעו 2 ml מהתרבית כל פרק זמן, ובאופן מיידי קוררו בקרח. מספר החיידקים בפרקי הזמן השונים נקבע באמצעות זריעת סדרת מיהולים על צלחת MHA, אינקובציה ב-  $37^{\circ}C$  למשך 20 שעות וספירת המושבות.



איור 16: השפעת האדפטציה ל- EGCG על עקומת ההשרדות של *S. aureus* ב-  $55^{\circ}C$ . עקומת תמותה נקבעה עבור חיידקי ביקורת (■) וחיידקים שעברו אדפטציה ל- EGCG (▲) באמצעות מודל התפלגות של Weibull. ניתן לראות כי חיידקים שנחשפו לרמה תת קטלנית של-EGCG היו עמידים יותר לחום.

**16. חשיפת חיידקי *S. aureus* לרמות תת-קטלניות של הפוליפנוול EGCG גורמת לעמידות לקרינת UV.**

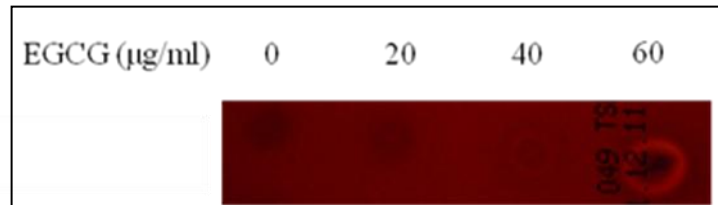
החיידקים גודלו ב BHI למשך שעותיים בנוכחות או בהעדר EGCG והגיעו לעכירות של מעל  $OD_{600}$   $nm=0.3$  במכשיר ספקטרופוטומטר (WPA) lightware, שהם כ-  $10^8$  CFU/ml חיידקים, נשטפו פעמיים עם מי פפסון 0.1% באמצעות השקעה בצנטריפוגה ב 4,000 סל"ד ב  $4^{\circ}C$  למשך 5 דקות, ונמהלו במי פפסון 0.1% ל-  $10^7$  CFU/ml. 4 ml מתרבית החיידקים הועברו לצלחת פטרי קוטר של 9 mm, כך שכל שטח הצלחת כוסה בנוזל המכיל את החיידקים. מיד לאחר מכן החיידקים נחשפו לקרינת UV בעוצמה של  $100 \text{ microjoules/cm}^2$  באורך גל של 254 nm במכשיר UV CL-1000 UV (CROSSLINKERS). מיד לאחר מכן נלקחה דגימה מכל צלחת לזריעת מושבות.



איור 17: השפעת האדפטציה ל-EGCG (■) של חיידקי *S. aureus* לעומת חיידקי ביקורת (□) על שרידות לקרינת UV בעוצמה של 100 microjoules/cm<sup>2</sup> בעלת אורך גל של 254nm.

**17. חשיפת חיידקי *S. aureus* לרמות תת-קטלניות של הפוליפנול EGCG גורמת עליה בפעילות המוליזין.**

החיידקים גודלו ב BHI למשך שעותיים בנוכחות EGCG בריכוזים 0, 20, 40 ו- 60 µg/ml או בהעדר EGCG והגיעו לעכירות של מעל OD<sub>600 nm</sub>=0.3 במכשיר ספקטרופוטומטר lightware (WPA), שהם כ- 10<sup>8</sup> CFU/ml חיידקים, נשטפו פעמיים עם מי פפטון 0.1% באמצעות השקעה בצנטריפוגה ב 4,000 סל"ד ב 4°C למשך 5 דקות, והורחפו במי פפטון 0.1% לריכוז - 10<sup>8</sup> CFU/ml. 10 ul מכל טיפול נלקח לזריעה על צלחת (Hylabs) TSBA+ 5% Defibrinated Sheep Blood. הצלחות הועברו להדגרה ב 37°C למשך 20 עד – 24 שעות. מידת ההמוליזה נקבעה על פי גודל ההילה המקיפה את המושבה.



איור 18: תוצאות מייצגות של מבחן המוליזה של *S. aureus* על גבי צלחת TSBA+ 5% Defibrinated Sheep Blood. ניתן לראות כי בחשיפה לרמה תת-קטלנית של EGCG מתקבלת המוליזה מוגברת.

**ה. סיכום:**

בתקופת המחקר הנוכחית נבדקה השפעתם של חומרים נדיפים על 2 מיקרואורגניזמים הגורמים למחלות צמחים החיידק *Pectobacter carotovorum* והפטריה *Penicillium digitatum*. נמצא כי מנטול בפאזה נדיפה גורם להגדלת השטח הנקרטי פי 5 אותו יוצר החיידק *P. carotovorum* על עלי כרוב. בנוסף החשיפה מגבירה גם ייצור אנזימים פקטוליטיים וביופילם ומגבירה את קצב השחיה של החיידק. בפטריה *P. digitatum* מצאנו שמלבד לימון חומרים נדיפים רבים גורמים להאצת נביטה. אופינו 2 קבוצות חומרים לפי כמות החומר הנדיף הגורם לתהליך. נמצא שהתופעה סגולית ל *P. digitatum* ומתווכת ע"י תת היחידה Gα של חלבוני G. בנוסף הראינו כי חשיפה לריכוזים תת-קטלניים של שמנים



אתרים גרמה לעליה ניכרת ומובהקת בגורמי הפתוגנית בחיידק *P. aeruginosa* כמו ביופילם ופולסכריד חוץ תאי, סידרופור הקושר ברזל ומתחרה עם ההמוגלובין ואלאסטאז- אנזים המפרק את הדבק הבין-תאי ברקמות אנימליות. כיוון שבשמנים האתריים הקבוצה הפונקציונאלית היא פנול פנינו לבדוק השפעת פולפנול על החיידק *S. aureus*. נמצא כי חשיפת החיידק גורמת לעמידות צולבת עם חומרים אנטיביוטיים הפוגעים בדופן, עליה בעמידות לחום ולאור UV ועליה בפעילות המוליזין-אנזים המפרק כדוריות דם אדומות. תוצאות המחקר מצביעות על הסכנה בחשיפת מיקרואורגניזמים במזון לחומרי טבע אנטימיקרוביאליים המתבטאת בהגברת האלימות הן לצמח והן לאדם ולחי.

**סיכום עם שאלות מנחות** נא לענות על כל השאלות, בקצרה ולעניין, ב 3 עד 4 שורות מכסימום לכל שאלה (לא תובא בחשבון חריגה מגבולות המסגרת המודפסת). שיתוף הפעולה שלך יסייע לתהליך ההערכה של תוצאות המחקר. **הערה:** נא לציין הפנייה לדו"ח אם נכללו בו נקודות נוספות לאלה שבסיכום.

<b>מטרות המחקר לתקופת הדו"ח תוך התייחסות לתוכנית העבודה.</b>
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. השפעת החשיפה לריכוזים תת-קטלניים של שמנים אתריים על חיידקים פתוגניים לצמח ולאדם.</li> <li>2. השפעת החשיפה על ביטוי גורמי אלימות (אנזימים פקטוליטיים וביופילם)</li> <li>3. השפעת החשיפה של הפטריה לריכוזים תת-קטלניים של שמנים אתריים על הפתוגניות.</li> <li>4. לימוד מנגנונים תאיים המתווכים ומבקרים את התגובה המיקרוביאלית.</li> </ol>
<p><b>עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח.</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. נמצא שמנים אתריים גורמים לעליה באלימות החיידק <i>Pectobacterium carotovorum</i></li> <li>2. תועדה עלייה במספר רב של גורמי אלימות.</li> <li>3. נמצא שלמעכבי מעבר האות התאי במסלול המערב חלבוני G בפטריה <i>Penicillium digitatum</i> חשיבות בנביטה כתוצאה מחשיפה לשמנים אתריים.</li> <li>4. חשיפה החיידק הפתוגני לאדם <i>Pseudomonas aeruginosa</i> לשמנים אתריים גרמה לעליה ניכרת בגורמי פתוגניות רבים.</li> <li>5. חשיפת החיידק <i>Staphylococcus aureus</i> לפולפנול EGCG גרמה להעלאת העמידות לחומרים אנטיביוטיים ועליה בגורמי פתוגניות רבים</li> </ol>
<p><b>המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר בתקופת הדו"ח.</b></p>
<p>מטרות המחקר הושגו במלואם ואף הורחבה היריעה לקביעת התופעה ככללית גם בחיידקים פתוגניים לאדם. נמצא כי מנטול, טימול ולימונן בפאזה נדיפה גורמים להגדלת השטח הנקרטי פי 5 אותו יוצר החיידק <i>P. carotovorum</i> על עלי כרוב וסלרי. בנוסף החשיפה לשלושת החומרים מגבירה גם ייצור אנזימים פקטוליטיים ומחישא את קצב השחייה של החיידק. בפטריה <i>P. digitatum</i> מצאנו שמעכבי חלבוני G, אדנילט ציקלאז ו cAMP עיכבו את זירוז הנביטה ע"י אדי לימונן. בחיידק <i>P. aeruginosa</i> שמנים אתריים כמו טימול ולימונן הגבירו ייצור ביופילם, פוליסכריד חוץ תאי, סידרופור הקושר ברזל ומתחרה עם ההמוגלובין ואלאסטאז- אנזים המפרק את הדבק הבין-תאי ברקמות אנימליות. חשיפת החיידק <i>S. aureus</i> ל EGCG גורמת לעמידות צולבת עם חומרים אנטיביוטיים הפוגעים בדופן, עליה בעמידות לחום ולאור UV ועליה בפעילות המוליזין-אנזים המפרק כדוריות דם אדומות.</p>

מתוצאות אלה נובע ששימוש בחומרים טבעיים בריכוזים תת-קטלניים מעלה אלימות חיידקים הן פיטופתוגניים והן פתוגניים לאדם ולחי. תופעה דומה התרחשה בפטריה הגורמת לרקב בתפוזים. תוצאות אלה מעלות את שאלת הכדאיות בשימוש בחומרים אלה.

הבעיות שנוותרו לפתרון ו/או השינויים שחלו במהלך העבודה (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים); התייחסות המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנוותרה לביצוע תוכנית המחקר.

האם הוחל כבר בהפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח - יש לפרט: פרסומים – כמקובל בביבליוגרפיה, יש לציין מס' פטנט, הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום ותאריך.

מאמרים:

Bikels-Goshen, T., Landau, E., Saguy, S. and **Shapira R.** (2010). Adaptation of epigallocatechin gallate (EGCG) in *Staphylococcus aureus* is associated with reduced susceptibility to vancomycin, oxacillin and ampicillin and increased heat tolerance. Int. J. Food Microbiol. 138:26-31.

Landau, E and **Shapira, R.** (2012). Effect of subinhibitory concentration of menthol on adaptation, morphological, and gene expression changes in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 78:5351-5367.

Levinger, O., Bikels-Goshen, T. Landau E., Fichman M. and **Shapira R.** Epigallocatechin Gallate (EGCG) Induces Upregulation of the Two-Component VraSR System by Evoking a Cell Wall Stress Response in *Staphylococcus aureus*. Appl. Environ. Microbiol. (Accepted for publication).

תקצירי כנסים:

R. Shapira and E. Landau. 2010. Vapours of Monoterpenes at Sublethal Doses Elevate Virulence of the Plant Pathogenic Bacterium *Pectobacterium carotovorum*. International Conference on Antimicrobial Research. Valladolid, Spain.

Levinger O., Bikels-Goshen., Landau, E. and Shapira R. 2010. Epigallocatechin Gallate Modulates Virulence Factors in the Pathogenic Bacterium *Staphylococcus aureus*. International Conference on Antimicrobial Research. Valladolid, Spain.

E. Landau and R. Shapira. 2011. The drawbacks in natural based preservation: Elevation of virulence in *Pectobacterium carotovorum* by essential oils vapors. 4<sup>th</sup> Congress of European Microbiologists, FEMS. Geneva, Switzerland.

Shapira R., Landau E., Levinger O., Genudi, E. and Akerman R. 2012. Subinhibitory doses of natural substances modulate bacterial virulence factors. Max Rubner Conference – Antibiotics in the Food Chain. Karlsruhe, Germany

O. Levinger, T. Bikels-Goshen, E. Landau, and R. Shapira. 2012. Epigallocatechin gallate modulates morphology and cell-wall antibiotics resistance by inducing the two-component VraSR system through evoking a cell wall stress response in *Staphylococcus aureus*. International Conference on Antimicrobial Research. Lisbon, Portugal.

<b>פרסום הדו"ח: אני ממליץ לפרסם את הדו"ח: (סמן אחת מהאופציות)</b>	
רק בספריות	←
ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט)	←
חסוי – לא לפרסם	←