

## דוח מסכם לתכנית מחקר מספר 421-0193-10

### חדירת פתוגנים לעלים: לימוד היקף הבעיה ומניעתה

#### Contamination of leaves by human pathogens

מוגש לקרן המדען הראשי  
מדעי המזון – טיפול לאחר קטיף

#### צוות המחקר:

**שלמה סלע (חוקר ראשי) וריקי פינטו** - המעבדה לבטיחות מיקרוביאלית של מזון, מח' לאיכות המזון ובטיחותו, מכון לחקר אחסון תוצרת חקלאית ומזון, מרכז וולקני, מנהל המחקר החקלאי.  
**דוד גרנות** - המכון למדעי הצמח, מרכז וולקני, מנהל המחקר החקלאי.

**Shlomo Sela** (Principal investigator) and **Riky Pinto** - Microbial Food Safety Unit, Department of Food Quality & safety, Institute of Postharvest and Food Science, Volcani Center, ARO. P.O.B 6, Bet Dagan, 50250.  
Email: shlomos@volcani.agri.gov.il

**David Granot** – Institute of Plant Sciences, ARO, Volcani Center.  
POB 6, Bet Dagan, 50250.

15 מאי, 2011

י"א אייר תשע"א

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא



חתימת החוקר:

## **תקציר**

### **הצגת הבעיה (חשיבות, מטרות)**

זיהום ירקות עלים בפתוגנים של האדם מהווה איום לחקלאות ולתעשיית הירקות המעובדים חלקית ומוכנים אכילה. במחקר שבוצע לאחרונה במעבדתנו זיהינו מנגנון חדש בו יכולים פתוגנים של האדם לזהם ירקות עלים. מצאנו כי הפתוגן סלמונלה מסוגל לחדור לתוך רקמת האפופלסט של עלי חסה אייסברג דרך הפיוניות. חיידקים הנמצאים בתוך הרקמה מוגנים מפני חיטוי ויכולים להתרבות בתנאים מתאימים ולגרום למחלה. המטרה הכללית של מחקר זה היא להבין את המשמעות והיקף תופעת החדירה של חיידקים אנטרו-פתוגנים לעלים בגידולים שונים ולפתח מימשי גידול וטיפול אשר ימנעו או יקטינו את החדירה. לאחר צמצום המחקר לשנה אחת, הוצבו היעדים הבאים: א. בחינת חדירה בריכוזי סלמונלה נמוכים. ב. בחינת מעורבות כמוטקסיס בתהליך החדירה. ג. בחינת חדירה של סלמונלה לעלים של ירקות אחרים.

### **מהלך הניסויים, שיטות העבודה ותוצאות עיקריות**

חיידקי סלמונלה מסומנים בחלבון הזרחני GFP הודגרו עם פיסות עלי חסה אייסברג, או עלים שלמים של ירקות שונים ויכולת החדירה נבחנה ע"י אנליזה במיקרוסקופ קונפוקלי. בניסויים מסוימים, נקבע מספר החיידקים בעלה, גם לאחר מיצוי הרקמה, לפני ואחרי חיטוי פני השטח. בריכוזים נמוכים של חיידקים לא ניתן היה לעקוב אחר תהליך החדירה באמצעות המיקרוסקופ. בדיקת החדירה בוצעה בשיטה עקיפה ע"י עידוד התרבות בתוך הרקמה בתנאי איחסון של 30 מע"צ, למשך 24 שעות. נמצא שחיידקי סלמונלה התרבו בתוך ולא על פני רקמת העלה. מעורבות כמוטקסיס בתהליך החדירה נבדקה כבר בעבר. מצאנו כי מוטנטים הפגועים ביכולת ייצור השוטונים (fliGHI), או בבקר מרכזי המעורב בתהליך כמוטקסיס (cheY), אינם מסוגלים לחדור לפיוניות. חדירה לתוך רקמת העלה נמצאה גם בעלים של ירקות שונים. שיעור חדירה גבוה נמצא בעלי רוקט (ארוגולה) וריחן (בזיל) ואילו שיעור נמוך נמצא בחסה רומית ובחסה מסולסלת. בעלי עגבנייה ופטרוזיליה לא התרחשה חדירה כלל.

### **מסקנות והמלצות**

חדירה אל תוך העלה יכולה להוות מסלול של זיהום הצמח, עוד בשלב הגידול בשדה, או במהלך עיבוד התוצרת החקלאית. תוצאות מחקר זה תומכות בהיפותזה שחדירה של סלמונלה לעלים מתרחשת גם בריכוזים נמוכים של החיידק, הרלוונטיים לסביבה החקלאית. החדירה תלויה בתנועה של חיידקים אל נוטריונטים בתוך הרקמה ועל כן, גישות לפגיעה בתנועה או בכמוטקסיס יכולות להקטין את הזיהום התוך רקמתי. חדירה של סלמונלה לעלים הינה תהליך כללי המתרחש בירקות עלים שונים. לפיכך, מומלץ לברור זנים בעלי עמידות גבוהה לחדירה, בעיקר, בירקות המיועדים לעיבוד חלקי ולמכירה כ"מוכנים לאכילה".

## 1.0 מבוא ותאור הבעיה

### 1.1 מעורבות תוצרת טרייה בהתפרצות מחלות

זיהום תוצרת חקלאית טרייה ע"י פתוגנים של האדם מהווה בעיה הולכת ומחריפה בעולם (1-3). התפרצויות של מחלות כתוצאה מאכילה של ירקות ופירות גורמות לתחלואה ולתמותה בעולם. בארה"ב בשנתיים האחרונות חלו אלפי צרכנים כתוצאה מאכילה של עלי תרד, עגבניות ופלפל חריף אשר היו מזוהמים בחיידקי א. קולי (*Escherichia coli*) פתוגניים. לפי הדו"ח האחרון של ארגון (CSPI) Center for Science in the Public Interest, בראש רשימת גורמי המזונות המפוקחים אשר גרמו למחלות בארה"ב בשנים 1990-2006 נמצאים ירקות עלים, אשר היו מעורבים ב-363 התפרצויות ו-13,500 מקרי מחלה מדווחים (4). גם תוצרת טרייה מישראל היתה מעורבת בהתפרצויות של מחלה. משלוחים של עלי ריחן טריים שיוצאו מישראל היו מעורבים בהתפרצות סלמונלה (*Salmonella*) באנגליה ובמספר ארצות נוספות באירופה (5). מקרה זה גרם לפגיעה כלכלית כבדה בחקלאים ובחברת השיווק המעורבת. לאור אירוע זה החלו הגורמים המייבאים באירופה להחמיר את הבדיקות המיקרוביאליות לתוצרת המיובאת מישראל ובמספר מקרים אכן נמצאו משלוחים המזוהמים בחיידקי א. קולי ובסלמונלה. הימצאות פתוגנים בתוצרת פוגעת ישירות ביכולת הייצוא של החקלאים וגורמת להפסדים כספיים מיידיים בנוסף לפגיעה במוניטין של החקלאות הישראלית.

### 1.2 מקורות הזיהום

התוצרת החקלאית יכולה להזדהם בכל אחד משלבי שרשרת הייצור מהשדה דרך בית האריזה, ההובלה והאחסון ועד לבית הצרכן. המקורות הפוטנציאליים העיקריים לזיהום כוללים: מי השקיה באיכות ירודה, שימוש בזבל אורגני לא מטופל, היגיינה נמוכה של העובדים בזמן הקטיף ועיבוד התוצרת בתנאים היגייניים נמוכים (1-3, 6).

בשנים האחרונות, ישנה עלייה משמעותית בצריכה וייצוא של תוצרת טרייה מעובדת חלקית ומוכנה לאכילה (7). תוצרת זו עוברת טיפולי שטיפה וחיטוי, אולם מחקרים רבים הראו כי יעילות החיטוי הינה מוגבלת ואינה מספקת לקטילה מוחלטת של פתוגנים (8-11). יעילות החיטוי הנמוכה נקשרה להימצאות החיידקים במצב של ביופילם, או הימצאותם במיקרו-סביבה מוגנת על פני רקמת הצמח (12,3,2). בשנים האחרונות, רבו הדיווחים (כולל שלנו) המצביעים על יכולתם של פתוגנים הומניים לחדור מתמיסת הקרקע אל הצמח דרך השורשים ולהתפשט בתוך הצמח בדומה לפתוגנים של הצמח (13-17). עם זאת, קיימים גם דיווחים סותרים לגבי עצם החדירה (18) והיקף התופעה אינו ברור. במחקר שבוצע לאחרונה במעבדתנו זיהינו מנגנון חדש בו יכולים פתוגנים של האדם לזהם ירקות עלים (19). מצאנו כי חיידקי סלמונלה מסוגלים באמצעות השוטונים לחדור באופן אקטיבי לתוך עלי חסה מסוג אייסברג דרך פתחי הפיוניות. מאחר שחסה היא בין הירקות המעורבים בהתפרצויות של סלמונלה (20-22), ממצא זה יכול להצביע על דרך זיהום חדשה של העלים, אשר יכולה להסביר ולו חלקית, את כישלון חיטוי שטח הפנים של העלים בקטילת פתוגנים.

## מטרת המחקר

המטרה הכללית של המחקר היא להבין את המשמעות והיקף תופעת החדירה של חיידקים אנטרו-פתוגניים לעלים בגידולים שונים ולפתח מימשקי גידול וטיפוליים אשר ימנעו או יקטינו את החדירה.

לצורך השגת מטרה זו נקבעו מטרות ספציפיות לתקופת מחקר של שלוש שנים, כדלקמן:

1. להעריך את השפעת תהליך החדירה על יעילות חיטוי של עלים
2. לבחון את השפעת תנאי האיחסון על הישרדות סלמונלה בתוך העלה
3. לבחון את יכולת החדירה של פתוגנים שונים לעלים של ירקות ותבלינים טריים
4. לזהות את גורמי המשיכה של סלמונלה לתוך רקמת העלה ולמצוא מעכבים מתאימים
5. להעריך את יכולת החדירה של סלמונלה לעלים בזמן הגידול ולבחון את השפעת תנאי הגידול על החדירה.

הוועדה המדעית אשר דנה בתכנית צמצמה את היקף המחקר לשנה אחת והעמידה את היעדים הבאים:

- א. להוכיח כי תהליך החדירה לעלים מתרחש גם בריכוז נמוך של סלמונלה.
- ב. להוכיח כי תופעת החדירה תלויה בכמוטקסיס.
- ג. לבחון האם חדירה של סלמונלה לפיוניות היא תהליך הייחודי לחסה אייסברג.

## 2.0 פירוט עיקרי הניסויים

### 2.1 בדיקת חדירה לעלי חסה בריכוז נמוך של סלמונלה.

חדירה של סלמונלה לעלי חסה דרך הפיוניות הודגמה לאחר הדגרה של פיסות עלים עם חיידקים בריכוז גבוה ( $10^8$  CFU/ml) (19). על מנת לוודא שתופעת החדירה אינה ארטיפקט מעבדתי הקשור לריכוז הגבוה של הפתוגן, קיים צורך לחזור על הניסויים בריכוזים נמוכים יותר כדי לוודא שאכן תופעה זו מתרחשת גם בריכוזים דומים לריכוזי הפתוגן בסביבה.

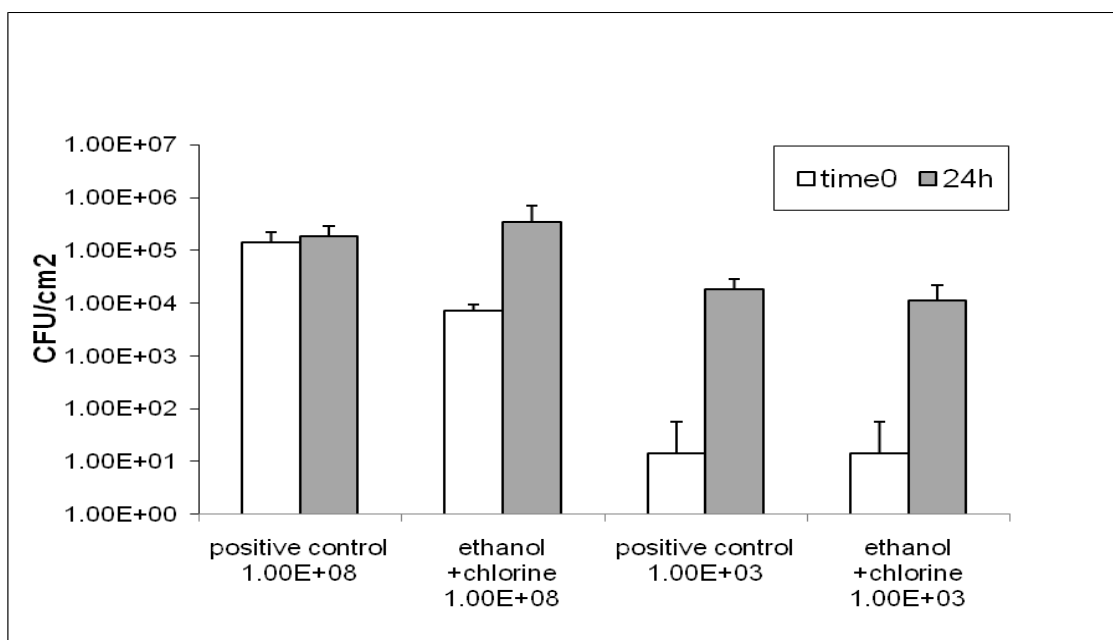
### בדיקת חדירה במיקרוסקופ קונפוקלי

ניסויי החדירה נערכו כמתואר בעבודתנו הקודמת (19), כאשר פיסות עלי חסה אייסברג (3x3 ס"מ) נחשפו לאור למשך שעה ואח"כ נטבלו בתרחיף של חיידקי סלמונלה מסומנים בחלבון הזרחני GFP בריכוז גבוה ( $10^8$  CFU/ml) ובריכוז נמוך ( $10^3$  CFU/ml), למשך שעותיים נוספות. העלים נשטפו היטב במים לסילוק חיידקים שלא נצמדו ונלקחו לתצפית במיקרוסקופ קונפוקלי. חיידקי סלמונלה נראו אך ורק על עלים שנטבלו בתרחיף בריכוז גבוה ולא נראו על עלים שנטבלו בתרחיף חיידקים בריכוז נמוך (תוצאות לא מוצגות). מניסויים אלה ברי כי לא ניתן לבחון במיקרוסקופ קונפוקלי חדירה של חיידקים כאשר ריכוזם ההתחלתי נמוך.

### הישרדות סלמונלה בתוך רקמת העלה

מאחר שבדיקה ישירה של חדירה במערכת הקיימת אינה אפשרית בריכוזים המדוברים, נערכה בדיקה עקיפה. חיידקי סלמונלה בריכוזים שונים הודגרו עם עלי חסה, כמתואר לעיל, ולאחר מכן עברו חיטוי כפול ע"י טבילה באתנול 70% למשך 10 דקות, שטיפה במים ואח"כ טבילה בתמיסת

היפוכלורית (200 ppm), למשך 2 דקות. בתנאים אלה צפוי שחיידקים הנמצאים על פני שטח העלה ייקטלו אם אינם מצויים בנישה מוגנת. במצב זה, במידה שהתרחשה חדירה, חיידקים שיהיו בתוך הרקמה ייחשפו לנוטריינטים המצויים באפופלסט (למשל, סוכרים) ובטמפרטורה מתאימה, לאחר זמן מתאים, יוכלו להתרבות. לעומתם, חיידקים שנשארו על פני השטח ולא נקטלו, לא יתרבו בשל הסביבה הדלה בנוטריינטים על פני העלה. כדי לבחון בשיטה זו את החדירה נערכה סדרת ניסויים בזמנים שונים. תוצאות של ניסוי מייצג מוצגות באיור 1.



**איור 1.** הישרדות של סלמונלה בעלי חסה. חיידקי סלמונלה בריכוזים שונים הודגרו עם עלי חסה אייסברג שנחשפו שעתיים לאור, למשך שעתיים נוספות ב- 30 מע"צ. בעלים נשטפו במים ארבע פעמים ועברו חיטוי ע"י אתנול (70%, 10 דקות; 200 ppm היפוכלורית, pH=7.8). ריכוז החיידקים ברקמת העלה נקבע מייד לאחר החיטוי (זמן אפס) ולאחר הדגרה של 24 שעות ב- 30 מע"צ, לאחר ריסוק רקמת העלה ע"י עלי ומכתש. התוצאות מייצגות ממוצעים של מספר החיידקים וסטיית התקן בניסוי מייצג שבוצע בשלוש חזרות.

מאחר שחיידקים עלולים להתרבות באזור החתך של הרקמה דבר העלול למסך בדיקה של התרבות תוך-רקמתית, לפני כל ספירה מיקרוביאלית נלקחה דוגמת רקמה ממרכז פיסת העלה. כאשר נערכה הדבקה בריכוז חיידקים גבוה, ללא חיטוי לא נמצא הבדל בין מספר החיידקים לסמ"ר עלה, לפני ואחרי הדגרה של 24 ש. החיטוי הכפול, הוריד חלק גדול מהחיידקים על פני השטח (למעלה מסדר גודל) ולאחר הדגרה נוספת חלה התרבות של חיידקים, כנראה בתוך הרקמה. בהדבקה בריכוז נמוך של חיידקים ( $10^3$  CFU/ml), נמצאו בעלה מעט מאוד חיידקים (כ- 10 לסמ"ר) וריכוזם לא השתנה גם לאחר חיטוי. לאחר 24 שעות חלה התרבות של חיידקים וריכוזם עלה ל- $10^5$  לסמ"ר. כדי להעריך האם החיידקים שהתרבו מצויים על פני הקוטיקולה או בתוך הרקמה, נערכה "הטבעה" של פיסות העלים על גבי צלחת אגר עשיר (LB), לפני מיצוי החיידקים מהרקמה בזמן אפס (לאחר ניסוי חדירה של שעתיים) ולאחר 24 שעות ב-30C. בשני המקרים, עם וללא חיטוי, לא צמחו חיידקים לאחר ההטבעה.

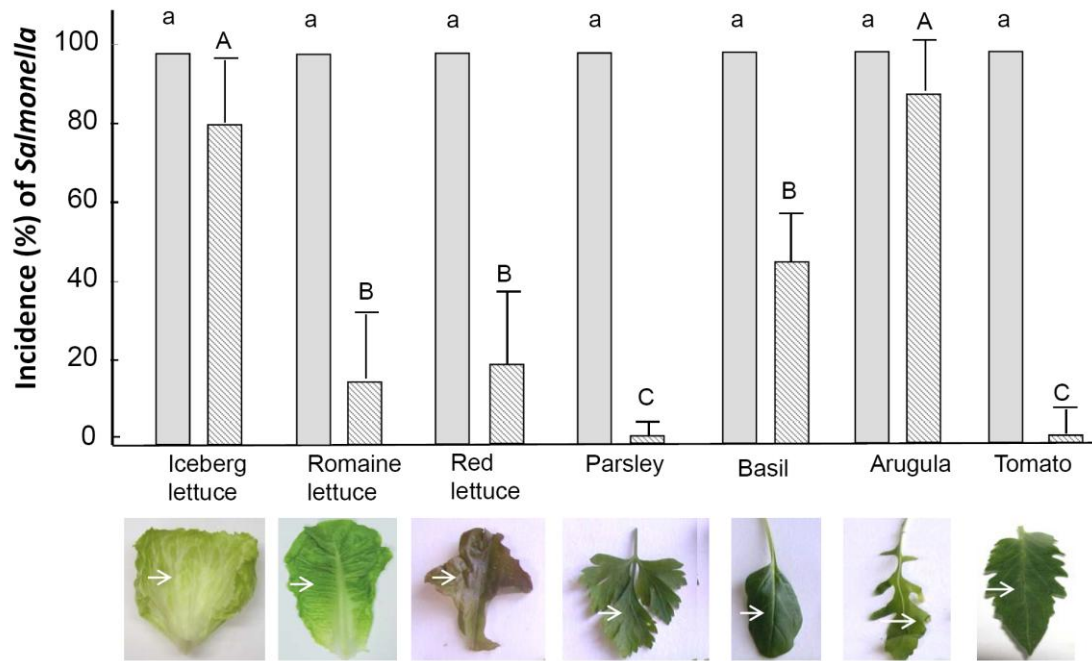
ממצאים אלה מצביעים כי התרבות החיידקים מ-10 לסמ"ר ל- $10^5$  לסמ"ר התרחשה בתוך רקמת העלה ולא על פני השטח ולפיכך תומכים בהשערה כי חיידקי סלמונלה מסוגלים לחדור לעלי חסה אייסברג גם בריכוזים נמוכים הקרובים לריכוזם בסביבה החקלאית. יתר על כן, ניסויים אלה מדגישים את הסכנה לבטיחות התוצרת הטמונה ביכולת ההתרבות של החיידקים, כאשר העלים נשמרים בתנאי איחסון שאינם תקינים (30C), למשך 24 שעות.

## 2.2 מעורבות של כמוטקסיס בתהליך החדירה לעלים.

הוכחת הקשר בין החדירה לעלים ותהליך הכמוטקסיס בוצעה כבר בעבודה קודמת שפרסמנו בשנת 2009, בעיתון Applied and Environmental Microbiology (19) של האגודה האמריקאית למיקרוביולוגיה. אי לכך, לא ברורה לנו מהות הדרישה של וועדת השיפוט, לבחון קשר זה. כדי לענות על דרישה הוועדה, אנו חוזרים ומביאים בפרק זה את עיקרי הממצאים שפרסמנו בעניין מעורבות מנגנוני התנועה והכמוטקסיס בחדירה של סלמונלה לפיוניות של חסה אייסברג. ניסויים שנערכו עם חיידקי סלמונלה מסומנים בחלבון הזרחני GFP העלו כי חיידקי הסלמונלה נעים על פני העלה לכיוון הפיוניות, מתרכזים בסביבתם וחודרים אל תוכן לעומק של עשרות מיקרומטרים. רמת החדירה עלתה לאחר הארה של העלים ועוכבה בתנאי חושך. הסיבה להבדלים אלה לא נבעה מהבדלים במידת הפתיחה של הפיוניות, בתנאי ההארה השונים, שכן בתנאי חושך, בנוכחות החומר פוזיקוקסין, המאלץ את הפיוניות להיפתח גם בחושך, לא נצפתה כל חדירה. ממצאים אלה העלו את ההשערה כי חדירת החיידקים לתוך רקמת הצמח תלויה בנוכחות של חומרי מזון (מוטמעים), הנוצרים בכלורופלסטים המצויים בתאי השמירה של הפיוניות וברקמת המזופיל בתהליך הפוטוסינתזה (19). תהליך החדירה התבצע רק עם חיידקים חיים ולא עם מתים דבר המצביע על תהליך אקטיבי. מוטנטים איזוגניים של סלמונלה הפגועים בשוטונים או בבקר מרכזי של תהליך הכמוטקסיס (CheY) אבדו את יכולת החדירה. יתר על כן, הדגרה מוקדמת של סלמונלה עם סוכרים שונים, או עם מיצוי מעלי חסה, עיכבה באופן מובהק את תהליך החדירה. ממצאים אלה תומכים בכך כי סלמונלה חודרת אל חלל האפופלסט מתחת לפיונית במנגנון בו מעורבים תנועה וכמוטקסיס.

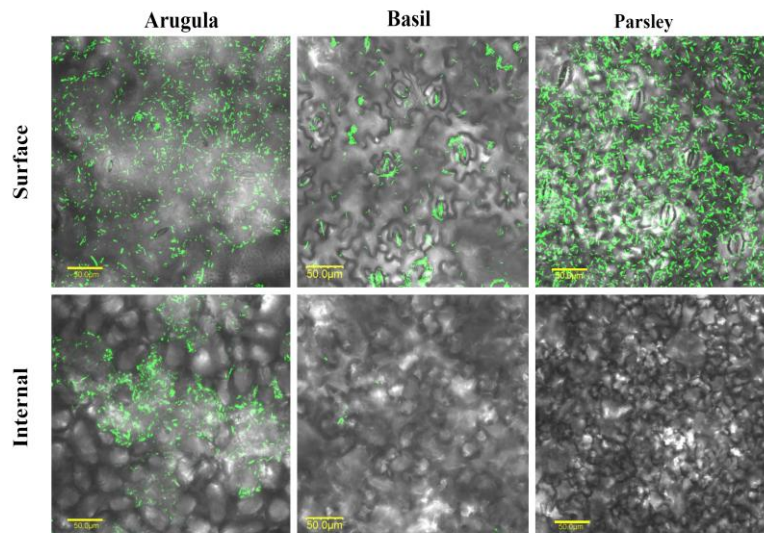
## 2.3 האם חדירה של סלמונלה לפיוניות היא ייחודית לחסה אייסברג?

כדי לבחון האם חדירה של סלמונלה לעלים של ירקות היא תופעה ייחודית לחסה אייסברג, או תופעה נפוצה יותר, השתמשנו בחיידקי סלמונלה מסומנים ב-GFP, כמתואר בעבודתנו הקודמת (19) ובדקנו את מידת החדירה באמצעות מיקרוסקופ קונפוקלי בחסות שונות (חסה רומית/ערבית; חסה אדומה), פטרוזיליה, ריחן, ארוגולה ועלים של עגבנייה. תוצאות הניסויים מסוכמות באיורים 2,3 ובטבלה 1.



**איור 2.** היצמדות וחדירה של סלמונלה לעלי ירקות שונים. התוצאות מייצגות ממוצע של 4 ניסויים שונים בתאריכים שונים, כל אחד ב-3 חזרות. עמודות אפורות ומקווקוות מייצגות את שיעור החיידקים על פני שטח העלה ובתוכו, בהתאמה. אותיות שונות מייצגות הבדלים משמעותיים ( $P < 0.05$ ) בין הערכים. חיצים לבנים מצביעים על האזור בו נבדקה החדירה. עיבוד סטטיסטי נערך באמצעות ANOVA בתכנת Instat 3.0.6. הבדלים מובהקים נחשבו כאשר  $p < 0.05$ .

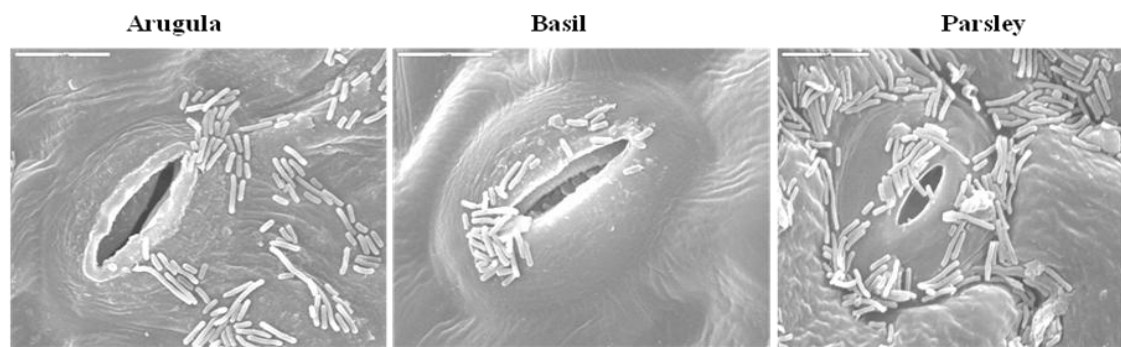
**איור 3.** תמונות מייצגות של מיקרוסקופ קונפוקאלי המראות את מיקום חיידקי הסלמונלה על העלים (Surface) ובתוך הרקמות הפנימיות (Internal). שיעור החדירה בעלי ארוגולה היה 88%, בריחן (basil) 46% ובפטרוזיליה 1.9%. תמונות ה-"Internal" מורכבת מאוסף תמונות אשר כל אחת נלקחה בהפרש של  $1.2 \mu\text{m}$ , עד לעומק רקמה של  $100 \mu\text{m}$ .



ניתן לראות שבעלי חסה עגולה ובעלי ארוגולה הייתה מידת החדירה הגבוהה ביותר, בעוד שבעלי חסה רומית, חסה אדומה וריחן (basil), מידת החדירה הייתה נמוכה משמעותית ( $P < 0.05$ ). בעלי עגבנייה ופטרוזיליה כמעט ולא הייתה חדירה. ההבדל בחדירה לא נבע מהבדלים ברמת ההיצמדות

של החיידק לעלים השונים, שכן נצפו חיידקים רבים מאוד על עלי הפטרוזיליה ולמרות זאת לא נראתה כל חדירה. יש לציין, כי בעלי ארוגולה ופטרוזיליה, שלא כמו בחסה עגולה ובריחן, חיידקי הסלמונלה לא התרכזו סביב הפיוניות. דוגמאות לאנליזה תלת-ממדית של תמונות מיקרוסקופ קונפוקלי של עלי ארוגולה, בהם הייתה חדירה גבוהה ושל עלי פטרוזיליה, בהם לא הייתה כלל חדירה, מוצגות באיורים 4 ו-5, בהתאמה.

על מנת לבחון האם ההבדל ביכולת חדירה נובע מהבדלים אנטומיים של סביבת הפיוניות בעלים השונים, נעשה שימוש במיקרוסקופ אלקטרוני סורק (SEM). נבדקו עלים של פטרוזיליה המייצגים חדירה נמוכה, חדירה בינונית בעלי ריחן (basil) וחדירה גבוהה בעלי ארוגולה (איור 6). אמנם ניתן לראות הבדלים מורפולגיים ומבניים בפיוניות משלושת הצמחים, אך לא כאלה שיסבירו את ההבדל ביכולת החדירה. בפטרוזיליה, בה נצפתה חדירה נמוכה מאוד, נראו חיידקים רבים בקרבת הפיונית.



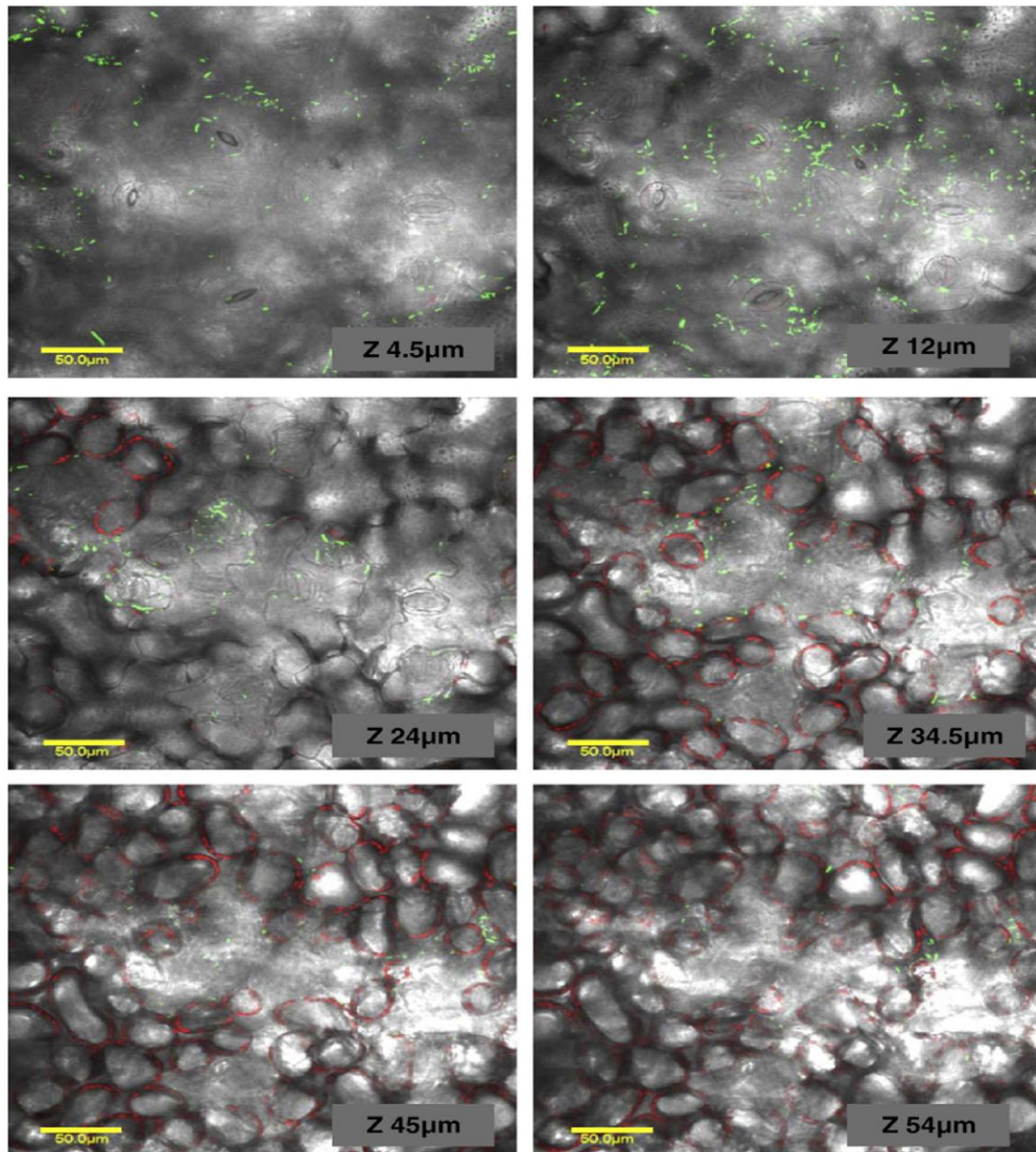
**איור 6.** תמונות מייצגות של מיקרוסקופ אלקטרוני סורק (SEM) של עלי פטרוזיליה, ריחן (basil) וארוגולה שהודבקו בחיידקי סלמונלה. ניתן לראות את הטופוגרפיה של העלה באזור הפיוניות ואת מיקום החיידקים בסביבת הפיונית, סקלה  $10 \mu\text{m}$ .



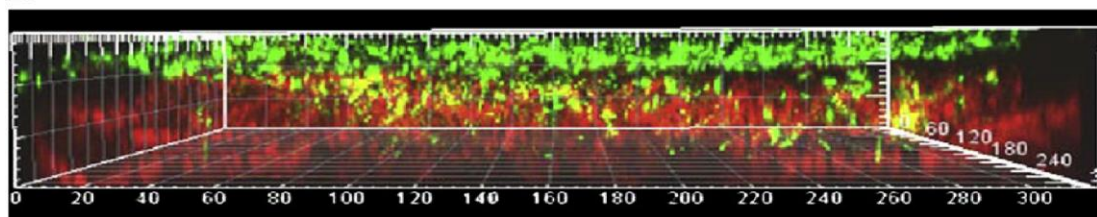
**Table 1.**Distribution of *Salmonella* in leaf tissue of various leafy vegetables and fresh herbs.

		Number of microscope fields out of 30 (percentage) harboring <i>Salmonella</i> cells <sup>a</sup>				
No. of cells per microscope field ( $\times 40$ )		0	1–10	10–50	50–100	$\geq 100$
Iceberg lettuce	Surface	0	18 $\pm$ 6.7 (60 $\pm$ 22)	7.6 $\pm$ 4.8 (25 $\pm$ 16)	3.8 $\pm$ 3.2 (12 $\pm$ 10)	0.7 $\pm$ 2 (2 $\pm$ 7)
	Internal	5.7 $\pm$ 4.9 (19 $\pm$ 16)	14.4 $\pm$ 5.7 (48 $\pm$ 19)	6.7 $\pm$ 4.7 (22 $\pm$ 16)	1.7 $\pm$ 2.7 (6 $\pm$ 9)	1.1 $\pm$ 2.2 (4 $\pm$ 7)
Romaine lettuce	Surface	0	18.4 $\pm$ 6.6 (61 $\pm$ 22)	10.1 $\pm$ 6.6 (33 $\pm$ 22)	1.5 $\pm$ 2.4 (5 $\pm$ 8)	0
	Internal	25.2 $\pm$ 4.8 (84 $\pm$ 16)	3.4 $\pm$ 3.1 (11 $\pm$ 10)	1.3 $\pm$ 3.1 (4 $\pm$ 10)	0	0
Red lettuce	Surface	0	2.2 $\pm$ 3.1 (7 $\pm$ 10)	16.9 $\pm$ 6.3 (56 $\pm$ 21)	7.3 $\pm$ 7.7 (24 $\pm$ 26)	3.3 $\pm$ 3.8 (11 $\pm$ 13)
	Internal	24.1 $\pm$ 4.5 (80 $\pm$ 15)	4.5 $\pm$ 3.4 (15 $\pm$ 11)	1 $\pm$ 1.6 (3 $\pm$ 5)	0.3 $\pm$ 1 (1 $\pm$ 3)	0
Arugula	Surface	0	0	0	0	30 $\pm$ 0 (100 $\pm$ 0)
	Internal	3.6 $\pm$ 4.1 (12 $\pm$ 14)	8.7 $\pm$ 7.6 (29 $\pm$ 5)	8.6 $\pm$ 7.6 (29 $\pm$ 25)	2.6 $\pm$ 3.3 (9 $\pm$ 11)	6.5 $\pm$ 11 (22 $\pm$ 37)
Parsley	Surface	0	0	0	0	30 $\pm$ 0 (100 $\pm$ 0)
	Internal	29.4 $\pm$ 1 (98 $\pm$ 3)	0.6 $\pm$ 1 (2 $\pm$ 3)	0	0	0
Basil	Surface	0	2.8 $\pm$ 4.8 (9 $\pm$ 16)	13.6 $\pm$ 5.4 (45 $\pm$ 18)	9.3 $\pm$ 6.3 (31 $\pm$ 21)	4.2 $\pm$ 7.6 (14 $\pm$ 25)
	Internal	16.1 $\pm$ 3.6 (54 $\pm$ 12)	11.3 $\pm$ 2.5 (38 $\pm$ 8)	2.2 $\pm$ 2.7 (7 $\pm$ 9)	0.4 $\pm$ 1 (1 $\pm$ 3)	0
Tomato	Surface	0	4.2 $\pm$ 6.8 (14 $\pm$ 23)	14.8 $\pm$ 7.8 (49 $\pm$ 26)	9.7 $\pm$ 10 (32 $\pm$ 33)	1.3 $\pm$ 2.8 (4 $\pm$ 9)
	Internal	29.8 $\pm$ 0.4 (100 $\pm$ 1)	0.2 $\pm$ 0.4 (0 $\pm$ 1)	0	0	0

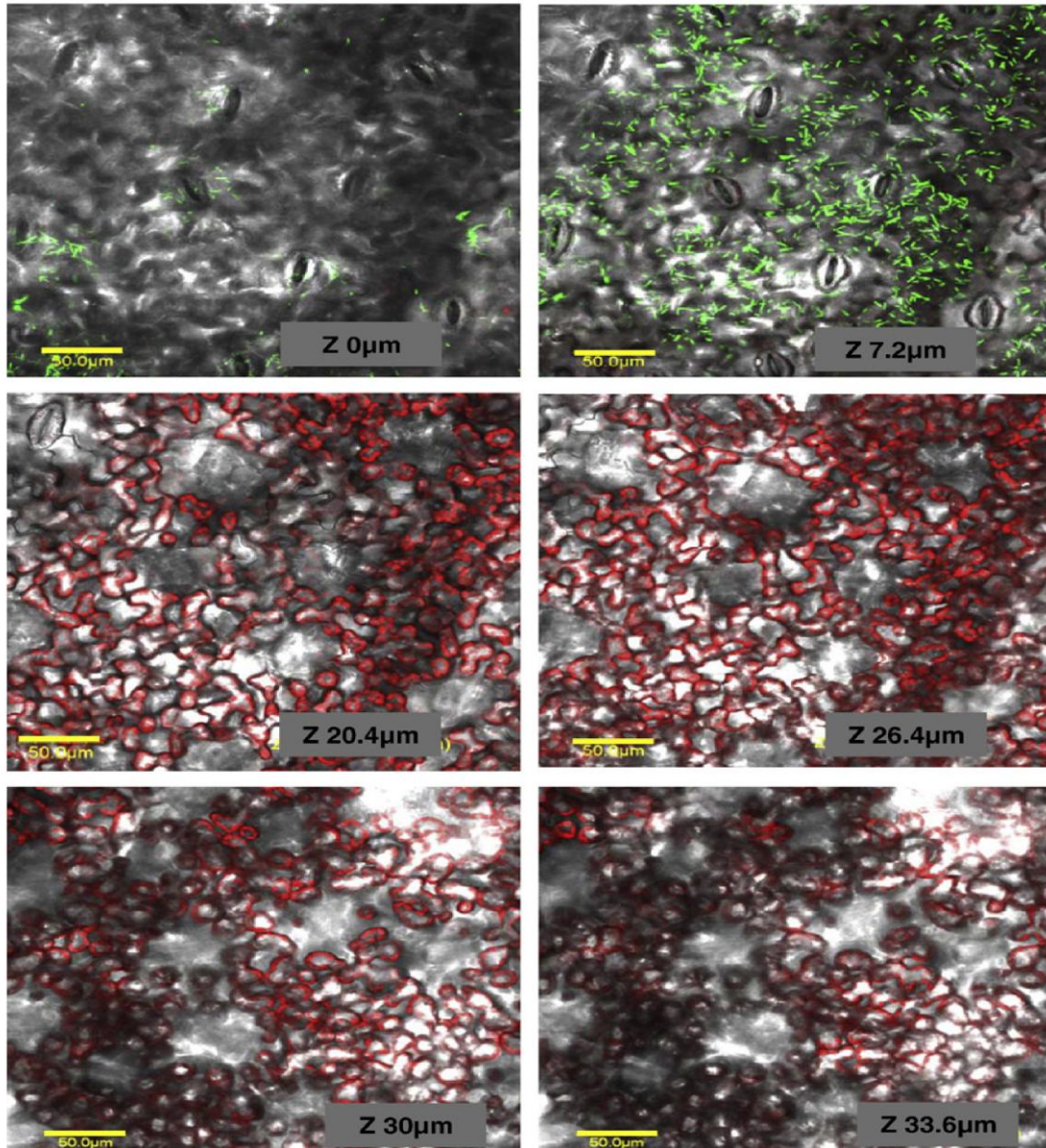
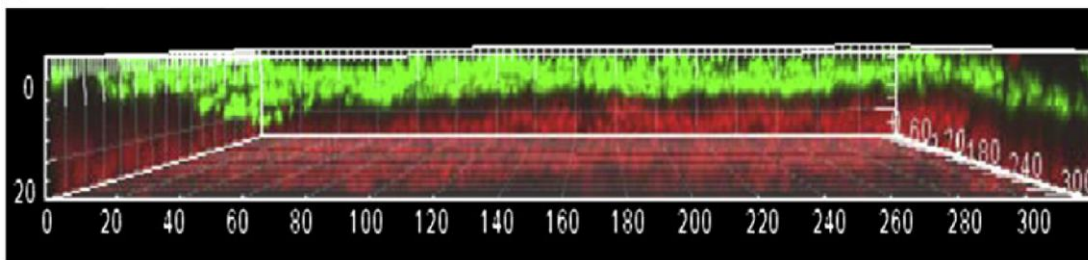
<sup>a</sup> Each experiment was performed in triplicate (three different leaves of the same plant) and repeated at least four times at different days with different plants.



**B**



**איור 4.** תמונות מייצגות של מיקרוסקופ קונפוקאלי המראות את התפלגות חיידקי הסלמונלה על פני ובתוך עלה ארוגולה (A). תמונות של חיידקים (מסומנים בירוק) מונחות על גבי תמונות phase contrast. צבע אדום מקורו בפלואורסנציה עצמית של הכלורופיל. ניתן לראות בתאי המזופיל בהם מתבצעת פוטוסינתזה. (B) עיבוד תלת-ממדי של התמונות בעומקים שונים שנלקחו מהאזור הנראה ב (A). צבע צהוב מעיד על מיקום של חיידקים בצמידות לכלורופלסטים.

**A****B**

**איור 5.** תמונות מייצגות של מיקרוסקופ קונפוקאלי המראות את התפלגות חיידקי הסלמונלה על רקמת עלה פטרוזיליה (A). תמונות של חיידקים (מסומנים בירוק) מונחות על גבי תמונות phase contrast. צבע אדום מקורו בפלואורסנציה עצמית של הכלורופיל. ניתן לראותו בתאי המזופיל בהם מתבצעת פוטוסינתזה. החיידקים נראים על פני שטח העלה בלבד ואינם נמצאים בתוך הרקמה (B) עיבוד תלת-ממדי של התמונות בעומקים שונים שנלקחו מהאיזור הנראה ב-(A). כל החיידקים נמצאים על פני השטח בלבד.

בטיחות מיקרוביאלית של ירקות עלים הינה נושא בעל חשיבות גבוהה לבריאות הציבור והשלכות כלכליות לחקלאות ולתעשיית המזון. התפרצויות של סלמונלה וא. קולי בארה"ב ובאירופה, כתוצאה מאכילה של ירקות עלים מזוהמים בפתוגנים העלתה נושא זה למודעות החקלאים והצרכנים. מאחר שלא ניתן לעקר תוצרת חקלאית טרייה ללא פגיעה פיסיקלית בצמח, השיטות המקובלות כיום להקטנת העומס המיקרוביאלי, כוללות שטיפה במים, ו/או בריכוזים נמוכים של חומרי חיטוי, כגון כלור. בתנאים אלה, אין אמנם פגיעה אורגנולפטית או פיסיולוגית בתוצרת, אולם יעילות הטיפול היא נמוכה ואינה מבטיחה קטילה מוחלטת של פתוגנים.

יכולת של פתוגנים לחדור דרך פיוניות לרקמת העלה מהווה מנגנון פוטנציאלי חדש של זיהום התוצרת החקלאית. הימצאות חיידקים בתוך רקמת העלה מגנה עליהם מפני שטיפה וחומרי חיטוי ולכן יש צורך בהבנת התהליך על מנת להקטין את התופעה. אחת הביקורות המרכזיות לגבי תופעת החדירה היא כי מדובר בארטיפקט מעבדתי כאשר מבוצעים ניסויים בריכוזים גבוהים של החיידק ( $10^8$  CFU/ml), אשר אינם מייצגים את ריכוזי הפתוגן בסביבה החקלאית. ראוי לציין כי מאחר שרגישות השיטה המיקרוסקופית עליה מבוססת בדיקת החדירה אינה מאפשרת ניסויים בריכוזי חיידקים נמוכים, גם מחקרים אחרים על פתוגנים צמחיים מתבצעים בריכוזים גבוהים של חיידקים אשר מאפשרים מעקב אחריהם. עם זאת, כדי לענות השאלה בעניין הרלוונטיות של ריכוזי החיידקים, חזרנו על ניסויי החדירה בריכוזים נמוכים של חיידקים ( $10^3$  CFU/ml), כאשר ערכנו חיטוי חיצוני של הרקמה הצמחית. הטבעה של שטח העלה על מצע אגר, לפני ואחרי הדגרה של העלים ב-30 מע"צ למשך 24 ש' הראתה קיומם של חיידקי סלמונלה בודדים בלבד על פני שטח העלה. לעומת זאת, לאחר מיצוי הרקמה נמצאו חיידקי סלמונלה בריכוזים של כ-  $10^5$  לסמ"ר. ממצאים אלה מרמזים על כך כי החיידקים חדרו לתוך הרקמה והתרבו בתוכה. עבודה זו מדגישה כי תופעת החדירה אינה מוגבלת לריכוזי חיידקים גבוהים ויתר על כן, היא מצביעה על כך כי גם זיהום במספר קטן של חיידקי סלמונלה עלול לגרום למחלה עקב פוטנציאל ההתרבות של הפתוגן ברקמת העלה, כאשר האחסון נעשה בטמפרטורה גבוהה.

מצאנו כי תופעת החדירה של סלמונלה מתרחשת בעלים של ירקות שונים כאשר בחמישה מתוך שבעת סוגי העלים מצאנו חדירה משמעותית. בעלי חסה אייסברג וארוגולה נמצאה חדירה גבוהה, בעלי חסה רומית, חסה מסולסלת וריחן נמצאה חדירה בינונית ובעלים של פטרוזיליה ועגבנייה נמצאה חדירה אפסית. בשלב זה, לא ברור מהם הגורמים לשונות הגבוהה במידת החדירה בצמחים השונים. ברור שהיצמדות לקוטיקולה אינה מספקת לחדירה, שכן בפטרוזיליה הייתה הצמדות גבוהה ביותר, ללא כל חדירה. בדיקה מורפולוגית של העלים באזור הפיוניות לא גילתה הבדלים אשר יסבירו את התוצאות. חדירה אפסית בפטרוזיליה ועגבנייה יכולה להיות מוסברת בהעדר נוטריינטים מתאימים באפופלסט, או לחילופין בקיום חומרים מעכבי תנועה או כמוטקסיס בשני ירקות אלה. לא ברור עדיין מהם הגורמים בצמח המשפיעים על רמת החדירה, אולם ליכולתנו לברור זנים עמידים יותר לחדירה יכולה להיות משמעות בטיחותית פוטנציאלית.

בהסתמך על תוצאות המחקר הנוכחי יהיה צורך להעריך מחדש את השפעת תהליך החדירה על יעילות חיטוי של עלים בתעשיית ה-fresh-cut. כמו כן, יהיה צורך לבחון באופן מדוקדק את השפעת תנאי האחסון על הישרדות הסלמונלה בתוך העלה.

חשוב להעריך את יכולת החדירה לירקות עלים גם של פתוגנים נוספים, כמו א. קולי פתוגני וליסטריה, על מנת לשפר את הערכת הסיכונים בקשר למקורות זיהום פוטנציאליים. יש חשיבות להמשך המחקר להבנת מנגנוני החדירה בחיידקים ולבחינה של יכולת החדירה של סלמונלה לעלים גם בזמן הגידול של הצמח בשדה. הכרת ההשפעה של תנאי הגידול על מידת החדירה הינה חשובה לצורך פיתוח ממשקי גידול בטוחים.

נושא חשוב נוסף הוא זיהוי גורמי המשיכה של סלמונלה (ואולי פתוגנים נוספים) לתוך רקמת העלה. זיהוי הכמואטרקטנטים יכול לשמש כבסיס לפיתוח של טיפולים חדשים לעיכוב חדירה ובהתאם לכך, להגברת בטיחות התוצרת החקלאית.

1. Sivapalasingam, S., Friedman, C.R., Cohen, L., Tauxe, R.V. (2004). Fresh produce: a growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United States, 1973 through 1997. *J Food Prot.* 67:2342–2353.
2. Brandl, M.T. (2006). Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety. *Annu Rev Phytopathol.* 44:367–392.
3. Heaton, J.C., and Jones, K. (2008). Microbial contamination of fruit and vegetables and the behaviour of enteropathogens in the phyllosphere: a review. *J Appl Microbiol.* 104:613–626.
4. Klein, S., Witmer, J., Tian, A., and Smith DeWaal, C. (2009). The ten riskiest foods regulated by the U.S Food and Drug Administration. Center for Science in the Public Interest (CSPI). [http://cspinet.org/new/pdf/cspi\\_top\\_10\\_fda.pdf](http://cspinet.org/new/pdf/cspi_top_10_fda.pdf).
5. Elviss, N.C., Little, C.L., Hucklesby, L., Sagoo, S., Surman-Lee, S., de Pinna, E., Threlfall, E.J., and on behalf of the Food, Water and Environmental Surveillance Network. (2009). Microbiological study of fresh herbs from retail premises uncovers an international outbreak of salmonellosis. *Inter J Food Microbiol.* 134:83-88.
6. Beuchat, L.R., and Ryu, J.H. (1997). Produce handling and processing practices. *Emerg Infect Dis.* 3:459–465.
7. Little CL, Gillespie IA. (2008). Prepared salads and public health. *J Appl Microbiol.* 105:1729-1743.
8. Zhuang, R.Y., Beuchat, L.R., and Angulo, F.J. (1995). Fate of *Salmonella montevideo* on and in raw tomatoes as affected by temperature and treatment with chlorine. *Appl Environ Microbiol.* 61:2127–2131.
9. Beuchat, L.R., Nail, B.V., Adler, B.B., and Calvero, M.R.S. (1998). Efficacy of spray application of chlorinated water in killing pathogenic bacteria on raw apples, tomatoes, and lettuce. *J Food Prot.* 61:1305–1311.
10. Seo, K.H., and Frank, J.F. (1999). Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to lettuce leaf surface and bacterial viability in response to chlorine treatment as demonstrated by using confocal scanning laser microscopy. *J Food Prot.* 62:3-9.
11. Kroupitski, Y., Pinto, R., Brandl, M.T., Belausov, E., and Sela, S. (2009). Interactions of *Salmonella enterica* with lettuce leaves. *J Appl Microbiol.* 106:1876-1885.
12. Takeuchi, K., and Frank, J.F. (2001). Quantitative determination of the role of lettuce leaf structures in protecting *Escherichia coli* O157:H7 from chlorine disinfection. *J Food Prot.* 64:147–151.
13. Solomon, E.B., Yaron, S., and Matthews, K.R. (2002). Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. *Appl Environ Microbiol.* 68:397-400.
14. Dong, Y., Iñiguez, A.L., Ahmer, B.M.M., and Triplett, E.W. (2003). Kinetics and strain specificity of rhizosphere and endophytic colonization by enteric bacteria on seedlings of *Medicago sativa* and *Medicago truncatula*. *Appl Environ Microbiol.* 69: 1783–1790.

15. 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 Protect.* 70:471-475.
16. Bernstein, S., Sela, S., and Neder-Lavon, S. (2007). Assessment of contamination potential of lettuce by *Salmonella enterica* serovar Newport added to the plant growing medium. *J Food Protect.* 70:1717-1722.
17. Klerks, M.M., Franz, E., van Gent-Pelzer, M., Zijlstra, C., and Van Bruggen, A.H. (2007). Differential interaction of *Salmonella enterica* serovars with lettuce cultivars and plant-microbe factors influencing the colonization efficiency. *ISME J.* 1:620–631.
18. Johannessen, G.S., Bengtsson, G.B., Heier, B.T., Bredholt, S., Wasteson, Y., and Rørvik, L.M. (2005). Potential uptake of *Escherichia coli* O157:H7 from organic manure into crisphead lettuce. *Appl Environ Microbiol.* 71:2221-2225.
19. Kroupitski, Y., Golberg, D., Belausov, E., Pinto, R., Swartzberg, D., Granot, D., and Sela, S. (2009). Internalization of *Salmonella* in leaves is induced by light and involves chemotaxis and penetration through open stomata. *Appl Environ Microbiol.* 75:6076-6086.
20. Horby, P.W., O'Brien, S.J, Adak, G.K., Graham, C., Hawker, J.I., Hunter, P., Lane, C., Lawson, A.J., Mitchell, R.T., Reacher, M.H., Threlfall, E.J., and Ward, L.R. (2003). A national outbreak of multi-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium definitive phage type (DT) 104 associated with consumption of lettuce. *Epidemiol Infect.* 130:169-178.
21. Gillespie, I.A. (2004). Outbreak of *Salmonella* Newport infection associated with lettuce in the UK. *Euro Surveill.* 8: 2562.
22. Takkinen, J.U., Nakari, M., Johansson, T., Niskanen, T., Siitonen, A., and Kuusi, M. (2005). A nationwide outbreak of multiresistant *Salmonella* Typhimurium in Finland due to contaminated lettuce from Spain. *Euro. Surveill.* 10:E0506.30.1.
23. Lindow, S.E., and Brandl, M.T. (2003). Microbiology of the Phyllosphere. *Appl Environ Microbiol.* 69:1875-1883.

**פרוט מלא של הפרסומים המדעיים - בכתב, בעל פה ופטנטים, שנבעו מביצוע המחקר**

**(בפרסומים בכתב (בעברית ובאנגלית))**

1. Golberg, D., Kroupitski, Y., Belausov, E., Pinto, R., and Sela, S. (2011). *Salmonella* Typhimurium internalization is variable in leafy vegetables and fresh herbs. *Int. J. Food Microbiol.* 145:250-257.

## סיכום עם שאלות מנחות

<b>מטרות המחקר לתקופת הדו"ח תוך התייחסות לתוכנית העבודה.</b>
<p>א. בחינת חדירה של סלמונלה לעלים בריכוזי חיידק נמוכים. ב. בחינת מעורבות כמוטקסיס בתהליך החדירה.</p> <p>ג. בחינת חדירה של סלמונלה לעלים של ירקות אחרים.</p>
<b>עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח.</b>
<p>חיידקי סלמונלה מסומנים בחלבון הזרחני GFP הודגרו עם פיסות עלי חסה אייסברג, או עלים שלמים של ירקות שונים ויכולת החדירה נבחנה ע"י אנליזה במיקרוסקופ קונפוקלי. בניסויים מסוימים, נקבע מספר החיידקים בעלה, גם לאחר מיצוי הרקמה, לפני ואחרי חיטוי פני השטח. בריכוזים נמוכים של חיידקים לא ניתן היה לעקוב אחר תהליך החדירה באמצעות המיקרוסקופ. בדיקת החדירה בוצעה בשיטה עקיפה ע"י עידוד התרבות בתוך הרקמה בתנאי איחסון של 30 מע"צ, למשך 24 שעות. נמצא שחיידקי סלמונלה התרבו בתוך ולא על פני רקמת העלה. מעורבות כמוטקסיס בתהליך החדירה נבדקה כבר בעבר. מצאנו כי מוטנטים הפגועים ביכולת ייצור השוטונים (<i>fliGH</i>), או בבקר מרכזי המעורב בתהליך כמוטקסיס (<i>cheY</i>), אינם מסוגלים לחדור לפיוניות. חדירה לתוך רקמת העלה נמצאה גם בעלים של ירקות שונים. שיעור חדירה גבוה נמצא בעלי רוקט (ארוגולה) וריחן (בזיל) ואילו שיעור נמוך נמצא בחסה רומית ובחסה מסולסלת. בעלי עגבנייה ופטרוזיליה לא התרחשה חדירה כלל.</p>
<b>מסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר בתקופת הדו"ח.</b>
<p>תוצאות מחקר זה תומכות בהיפותזה שחדירה של סלמונלה לעלים מתרחשת גם בריכוזים נמוכים של החיידק, הרלוונטיים לסביבה החקלאית. החדירה תלויה בתנועה של חיידקים אל נוטריינטים בתוך הרקמה ועל כן, גישות לפגיעה בתנועה או בכמוטקסיס יכולות להקטין את הזיהום התוך רקמתי. חדירה של סלמונלה לעלים הינה תהליך כללי המתרחש בירקות עלים שונים, אולם קיימת שונות רבה ביכולת החדירה בצמחים שונים.</p>
<b>הבעיות שנתרו לפתרון ו/או השינויים שחלו במהלך העבודה (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים); התייחסות המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנתרה לביצוע תוכנית המחקר.</b>
<p>בהסתמך על תוצאות המחקר יהיה צורך להעריך מחדש את השפעת תהליך החדירה על יעילות חיטוי של עלים בתעשיית ה-fresh-cut. כמו כן, יהיה צורך לבחון באופן מדוקדק את השפעת תנאי האחסון על הישרדות הסלמונלה בתוך העלה. יהיה חשוב לקבוע האם גם פתוגנים נוספים מסוגלים לחדור לירקות עלים בדרך זו, על מנת לשפר את הערכת הסיכונים בקשר למקורות זיהום פוטנציאליים. יש חשיבות להמשך המחקר להבנת מנגנוני החדירה בחיידקים ולבחינה של יכולת החדירה של סלמונלה לעלים גם בזמן הגידול של הצמח בשדה. הכרת ההשפעה של תנאי הגידול על מידת החדירה, יחד עם ברירה של זנים בעלי עמידות גבוהה לחדירה, בעיקר, בירקות המיועדים לעיבוד חלקי ולמכירה כ"מוכנים לאכילה", חיונית לצורך פיתוח ממשקי גידול מתאימים והבטחת בטיחות התוצרת. נושא חשוב נוסף הוא זיהוי גורמי המשיכה של סלמונלה לתוך רקמת העלה. מידע זה יוכל לשמש כבסיס לפיתוח של טיפולים חדשים לעיכוב חדירה ובהתאם לכך, להגברת בטיחות התוצרת החקלאית.</p>
<b>האם הוחל כבר בהפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח – יש לפרט: פרסומים – כמקובל בביבליוגרפיה, פטנטים – יש לציין מסי' פטנט, הרצאות וימי עיון – יש לפרט מקום ותאריך.</b>
<p>Golberg, D., Kroupitski, Y., Belausov, E., Pinto, R., and Sela, S. (2011). <i>Salmonella</i> Typhimurium internalization is variable in leafy vegetables and fresh herbs. <i>Int. J. Food Microbiol.</i> 145:250-257.</p>
<b>פרסום הדו"ח: אני ממליץ לפרסם את הדו"ח: (סמן אחת מהאופציות)</b>
<p>ללא הגבלה </p>