

דוח לתכנית מחקר מספר 421-0142-07

הערכת פוטנציאל החדירה וההישרדות של חיידקים פתוגנים לאדם בגידולים
חקלאיים שונים

Evaluation of internalization and survival potential of human pathogens
in agricultural crops

דוח מסכם

מוגש לקרן המדען הראשי של משרד החקלאות

צוות המחקר:

שלמה סלע וריקי פינטו – היחידה לבטיחות מיקרוביאלית של מזון, המחלקה למדעי המזון, המכון לטכנולוגיה

ואחסון, מנהל המחקר החקלאי

נירית ברנשטיין – המכון למדעי הקרקע המים והסביבה, מנהל המחקר החקלאי

Shlomo Sela, 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

Riky Pinto, Microbial Food Safety Unit, Department of Food-Science, Institute of
Technology of Post Harvest Produce. P.O.B 6, Bet Dagan, 50250.
Email: riky@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

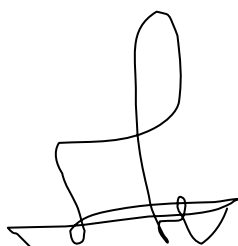
אפריל , 2008

כה ניסן תשס"ח

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא

חתימת החוקר:



תקציר

1. הצגת הבעיה (חשיבות, מטרות)

אחת הסכנות העיקריות בשימוש בקולחים או בדישון בזבל ממקור בע"ח הנה בריאות הציבור. פתוגנים המצויים בקרקע עלולים לזהם את הגידולים ולהגיע לצרכן. מקובל לחשוב כי מיקרואורגניזמים אינם מסוגלים לחדור לשורש ולעבור לחלקי צמח עליונים נאכלים. לכן, היתרי השקיה בקולחים מחייבים העמדת חסמים שמטרתם למנוע מגע ישיר בין הקולחים לבין הרקמה הצמחית הנאכלת. בניגוד לדעה המקובלת, דווח לאחרונה כי חיידקים מחוללי מחלות באדם מסוגלים לחדור מהקרקע לשורש, ומשם לרקמות צמח נוספות. הדאגה לבריאות הציבור והצורך לעמוד בתקנים מיקרוביאליים מחמירים, לצורך ייצוא, מדגישים את הצורך בבחינה מחודשת של אפשרות זיהום חלקי צמח שונים הנאכלים חי ע"י פתוגנים הנמצאים בקרקע, גם כאשר לא קיים מגע ישיר של הקולחים עם הרקמה הנאכלת. רק לאחרונה, גרם זיהוי של סלמונלה בדגימות ריחן (בזיל) שיוצאו מישראל לאנגליה נזק כלכלי ותדמיתי גבוה. במחקר קודם הראנו כי חיידק הסלמונלה מסוגל לעבור לשתילי חסה מתמיסת הקרקע ע"י חדירה דרך השורש. מטרות המחקר הנוכחי היו לבסס את ממצאי המחקר הראשוני ולבחון השפעת גורמים צמחיים (גיל הצמח, גיל העלים) וריכוז החיידקים בקרקע על חדירת סלמונלה לצמחי חסה. מטרה נוספת הייתה לבחון הישרדות חיצונית של סלמונלה על פני עלי חסה.

2. מהלך ושיטות עבודה

המחקר בוצע בחממה בטיחותית אשר הוכשרה למחקר עם פתוגנים. מערכת המודל כללה שתילי חסה רומית (נוגה) אשר נשתלו בעציצים של 1 ליטר עם כ-800 גרם מצע שתילה. השתילים אולחו בכמויות שונות של חיידק סלמונלה והימצאות הפתוגן בחלקי הצמח העליונים נבדקה בשיטות בקטריולוגיות, ע"י זריעה ישירה ולאחר העשרה. כמו כן, נבדקה החדירה לצמחי חסה בגילים שונים ולעלים שונים (מבוגרים וצעירים) באותו הצמח. בניסויים אחרים, נערך אילוח חיצוני של העלים ע"י כמויות שונות של חיידק הסלמונלה ומספר החיידקים על פני העלים נבדק לאורך זמן הגידול.

3. תוצאות עיקריות

ברכיכוז חיידקים קטן או שווה ל- $4 \cdot 10^4$ CFU לגרם קרקע לא הובחנה חדירה של סלמונלה לצמחים בגיל 29 יום. החיידק חדר לשתילי חסה בגילים שונים, באופן לא קבוע, כאשר חדירה מירבית נמצאה בגיל 51-72 יום. חדירת החיידק נמצאה גם בעלים מבוגרים וגם בצעירים ללא הבדל משמעותי. החיידק נמצא בעיקר בדגימות מאזור העורקים בעלה ופחות באזורים אחרים של הטרף. כאשר זוהמו פני העלים של שתילי חסה בני 50 יום בריכוזים נמוכים של החיידק (10^3 CFU לעלה), נמצאו חיידקים על פני העלה עד 27 יום לאחר הזיהום. כאשר זיהום העלים היה בכמות גדולה של חיידקים (10^9 CFU לעלה), נמצאו חיידקים על העלים עד סוף הניסוי (41 יום לאחר הזיהום).

2. מסקנות והמלצות

תוצאות המחקר מבססות את הממצאים הקודמים לגבי חדירה של סלמונלה מתמיסת הקרקע אל תוך רקמות הצמח. יעילות החדירה והישרדות החיידק על הצמח תלויה בגיל הצמח ובריכוז החיידקים. יש להרחיב את המחקר לבחינת הגורמים האחראים לחדירה והישרדות החיידק בסביבת הצמח וכן לבחון את יכולת החדירה וההישרדות של סלמונלה במגוון רחב של ירקות ותבלינים על מנת לזהות גידולים רגישים במיוחד.

1. מבוא ותאור הבעיה

מים שפירים הנם משאב יקר שכמותו הולכת ומצטמצמת. בשנים האחרונות, קיימת עלייה מתמדת בכמות המים המושבים (קולחים) המשמשים להשקיה וכן בסוג הגידולים החקלאיים המותרים להשקיה במים אלו. אחת הסכנות העיקריות בשימוש בקולחים הנה בריאות הציבור. מיקרואורגניזמים מחוללי מחלות המצויים בקולחים עלולים לזהם את הגידול ולהיות מועברים לצרכן. על מנת למנוע אפשרות זו, קבע משרד הבריאות עקרונות למתן היתרים להשקיה בקולחים (דו"ח הלפרין, 1999). משרד הבריאות נקט בעמדה מחמירה יותר מזו של ארגון הבריאות העולמי (Blumenthal et al., 2000) ואישר השקיה בלתי מוגבלת של ירקות הנאכלים חי, הגדלים מעל הקרקע, בקולחים המכילים פחות מ-10 חיידקי קולי צואתיים במאה מיליליטר. יחד עם זאת, הנחיות משרד הבריאות מתירות להשקות בקולחים בעלי איכות מיקרוביאלית נמוכה יותר בהתחשב בגורמים נוספים (חסמים) המסוגלים למנוע העברה של גורמי מחלות מהקולחים, אל הירק או הפרי. העקרונות לאישור השקיה בקולחים מתבססים ברובם על ההנחה שמיקרואורגניזמים פתוגניים עלולים לזהם רקמות חיזוניות של הצמח כתוצאה ממגע ישיר בין הקולחים לחלקי צמח עליונים חשופים. מקובל לחשוב כי חיידקים המגיעים מהקולחים לקרקע אינם מסוגלים לחדור לשורש ולעבור לחלקי צמח עליונים נאכלים, במידה והשורש איננו פגוע. לכן, היתרי השקיה בקולחים מחייבים העמדת חסמים שמטרתם למנוע מגע ישיר בין הקולחים לבין הרקמה הצמחית הנאכלת. חסמים אלו מנצלים, לדוגמא, את אפקט הסינון והספיחה של הקרקע ע"י שימוש בטפטוף טמון. מאמרים שפורסמו לאחרונה בספרות העולמית (Guo et al., 2002; Solomon et al., 2002 Warriner et al., 2003) מדגימים לראשונה, כי בניגוד לדעה הרווחת, חיידקים פתוגניים לאדם מסוגלים לחדור מהקרקע לשורש, ומשם להיות מובלים בתוך הצמח עד לנוף. בעבודה קודמת הראנו כי פתוגנים של האדם (א. קולי וסלמונלה) מסוגלים לחדור לחלקי הצמח העליונים (Bernstein et al., 2007 a, b).

מטרות המחקר

תכנית המחקר המקורית כללה מטרות עבור **תכנית תלת-שנתית**, כדלקמן:
א. לבחון חזירה של חיידקים דרך מערכת השורשים לצמחים שונים ואברים שונים המיועדים למאכל בשלבי התפתחות שונים של הגידול, כמפורט להלן:

1. לבדוק האם תופעת החזירה מתרחשת בגידולים חקלאיים שונים.
 2. לקבוע האם החזירה מתאפשרת לאברים נוספים פרט לעלווה כדוגמת פרי (בעגבנייה ופלפל).
 3. לקבוע האם יכולת החזירה והנדידה תלויות בשלבי התפתחות / גיל הצמח או איבריו.
 4. לקבוע האם החזירה תלויה בריכוז סף של חיידקים בסביבת השורש.
- ב. לבחון הישרדות של חיידקים פתוגניים בחלקי הצמח השונים.
- לבדוק את זמן ההישרדות של חיידקים פתוגניים בחלקי הצמח השונים, ויכולתם להתרבות ברקמה הצמחית.

***מאחר שאושרה תכנית לשנה אחת בלבד, בחרנו לעבוד עם גידול אחד (חסה) ולבחון גורמים המשפיעים על חזירה ועל הישרדות של סלמונלה בצמח.**

מטרות המחקר לשנת המחקר שאושרה היו:

1. בדיקת השפעת ריכוז החיידקים בתמיסה על יכולת החדירה
2. השפעת גיל הצמח על יכולת החדירה של חיידקי סלמונלה דרך השורשים
3. בדיקת מיקום החיידקים בעלים לאחר חדירתם לצמח
4. הישרדות סלמונלה על עלי חסה

2. שיטות וחומרים

חומר צמחי ותנאי גידול

שתילי חסה (נוגה) בני 25 יום התקבלו ממשלת "חישתיל" והועברו לעציצים בנפח 1 ליטר עם עם תערובת גידול (כ-800 גרם). לאחר אילוח הקרקע (ראה להלן) העציצים כוסו ביריעת ניילון (פוליפרופילן חלבי, 15 סמ"ר) מחזור (10 נקבי סיכה לעציץ) באמצעות גומייה על מנת לאפשר אוורור ולמנוע מגע של עלוות הצמח עם הקרקע המאולחת. בכל ניסוי נעשה חתך באורך של כ-3 סמ' אשר שימש למעבר הגבעול. בכל ניסוי הושו עציצים מאולחים ולא מאולחים. כל ניסוי בוצע ב- 4-5 חזרות (עציצים). טמפרטורות מינימום ומקסימום ממוצעות במהלך הניסויים בחממה היו 10 ו-27°C, בהתאמה.

זן החיידק ותנאי גידול

חיידק סלמונלה (*Salmonella enterica* serovar Newport) אשר בודד מנבטים של אספסת התקבל מ-M. Brandl (Microbiology Research Unit, Albany, CA USDA-ARS, Produce Safety and) ושימש בכל הניסויים. החיידק נשמר כסטוק גליצרול ב-80°C ולצורך גידולו נזרע על מצע LB (Luria broth) והודגר למשך 24 ש' ב-37°C. החיידק נזרע על צלחת אגר סלקטיבי (XLD) ומושבה בודדת שמשה להכנת מזרע טרי. חיידקים שגדלו לאחר 24 ש' נשטפו ונמהלו במים מעוקרים לריכוז המבוקש.

בדיקות בקטריולוגיות

לבדיקות ריכוז החיידקים בקרקע, דגימת קרקע במשקל של כ-1 גרם הוכנסה למבחנת פוליפרופילן קונית (50 מל') והורחפה ב-9 מל' בופר מי-פפטון. הדוגמאות עברו הומוגניזציה ע"י וורטקס 2x1 min וטלטול נוסף במטלטלת למשך 1 שעה בטמפ' החדר. בדיקת נוכחות הסלמונלה נעשתה ע"י זריעת דוגמאות במיהולים עשרוניים שונים על צלחות סלקטיביות המכילות מצע XLD. מושבות של סלמונלה על מצע זה הינן בצבע שחור. מכל דוגמת קרקע נזרעו 100µl של נוזל המיצי (מקור ומיהולים עשרוניים) על צלחות XLD. הצלחות הודגרו בטמפרטורה של 37°C למשך 24-72 שעות. במידה ולא נתגלו מושבות חשודות הועברה הדוגמה המקורית למבחן העשרה.

פרוטוקול העשרה (תקן ישראלי 855, חלק 7; 1999).

1. הרחפת דוגמה מקורית עם תמיסת מי-פפטון ביחס 1:9 והדגרה O/N ב-37°C.
2. העברת דוגמה ממי-הפפטון ל-2 מצעים ברירניים (ראה להלן) ביחס של 1:9 והדגרה O/N;
א. (TBG) Tetrathionate Brilliant Green broth, הדגרה ב-37°C.
ב. (RV) Rappaport Vassiliadis, הדגרה ב-43°C.
3. זריעת דוגמה על פלטה סלקטיבית מסוג XLD והדגרה O/N ב-37°C.

4. מושבות חשודות כחיוביות הועברו למבחן מאשר ע"י זריעתן על מבחנות מסוג :

א. מצע ברזל 3 סוכרים אגר Triple Sugar Iron (TSI).

ב. מצע ליזין-ברזל אגר Lysin-Iron Agar (LI).

לבדיקת נוכחות חיידקים ברקמה הצמחית העל-קרקעית, השתילים נחתכו כ-1 סמ' מעל הניילון (המכסה את הקרקע) בעזרת מספריים סטריליים והושמו בשקית סטומכר נפרדת. כל שתיל עבר חיתוך נוסף לחתיכות קטנות של כ-1 ס"מ על מנת לאפשר מיצוי מקסימלי. משקל הדוגמה נקבע ע"י שקילת השקיות לפני ולאחר הוספת הדגימות. לכל שקית הוספו 50 מ"ל מי-פפטון והדגימה עברה הומוגניזציה במכשיר סטומכר, למשך 2 דקות. תוכן השקית עבר, בנוסף, מעיכה ידנית עד שנתקבל נוזל בעל מרקם אחיד בצבע ירוק. נוזל המיצוי נזרע במיהולים עשורניים על צלחות ברירניות מסוג XLD שהודגרו ב- 37°C למשך 24-72 שעות. נוזל המיצוי עבר, במקביל, העשרה, כפי שתואר לעיל. בהעדר מושבות חשודות בזריעה הישירה, נבדקה נוכחות הסלמונלה לאחר העשרה והתקבלה תשובה איכותית לנוכחות או העדר הפתוגן.

בדיקת השפעת ריכוז החיידקים בתמיסה על יכולת החדירה

חיידקי סלמונלה שגודלו כמתואר לעיל, נשטפו במים סטריליים והורחפו ב-10 מ"ל מים סטריליים. החיידקים עברו מיהולים עשורניים, לקבלת תרחיפים בריכוזי חיידקים הבאים: 10^3 , 10^6 , 10^9 (CFU/ml).

מהלך הניסוי:

1. שתילי חסה בני 25 יום הועברו לעציצים בנפח 1 ליטר עם עם תערובת גידול (כ-800 גרם) שהושקתה מראש (24 ש') ב-250 מ"ל מים כדי להביאה לקיבול שדה של 90%. לפני השתילה נטבל כל שרש (כ-5 ס"מ) בתרחיף חיידקים שהוכן מראש. בכל ריכוז חיידקים נטבלו 5 שתילים, כאשר טבילה במים בלבד, שימשה כביקורת. סה"כ הניסוי כלל 20 שתילים. ביום האילוח הצמחים הושקו ב-25 מ"ל מים (כשעתיים לאחר השתילה) והעציצים נשקלו. תיאור מפורט של מערכת הניסוי מופיע בחיבורנו הקודם בנושא (Bernstein et al., 2007c).

2. במשך היומיים הבאים הצמחים הושקו ב-20 מ"ל מים (לפי הפרשי המשקל שנמדד) על מנת להחזיר לקרקע את המים שאבדו בבהתאדות בתהליך הטרנספירציה ולהביא את הקרקע חזרה לקיבול שדה של 90%. ביום השלישי לניסוי לא היתה השקיה.

3. ביום הרביעי הצמחים נקצרו ונבדקו לנוכחות חיידקי סלמונלה בתוך הצמח לפי פרוטוקול המוזכר במאמר, לעיל. באותו יום נלקחו גם דגימות קרקע מאזור בית השורשים (לאחר דיגום הצמחים) ונוכחות של סלמונלה בקרקע נבדקה לפי הפרוטוקול שתואר בעבודתנו הקודמת (Bernstein et al., 2007b) ופורט לעיל.

השפעת גיל הצמח על יכולת החדירה של חיידקי סלמונלה דרך השורשים

שתילי חסה הועברו לעציצים של 1 ליטר, כמתואר לעיל, ללא אילוח מיידי. בשלבי התפתחות שונים של הצמח נערך אילוח ע"י השקיית העציץ ב-10 מ"ל תמיסת חיידקים בריכוז 10^9 CFU/ml. ההשקיה בוצעה סביב השתיל, בעזרת פיפטור, על מנת למנוע מגע של תרחיף החיידקים עם הנוף. העציצים כוסו

ביריעת ניילון (כמתואר לעיל) להקטנת האפשרות לזיהום הנוף ע"י חלקיקי קרקע מאולחים (Bernstein et al., 2007b). מידי שבוע, נבדקו 10 צמחים: 5 שהושקו על חיידקים ו-5 שהושקו במים בלבד (ביקורת). לפני כל אילוח בוצעה השקייה במי ברז (100-200 מ"ל, בהתאם לגודל הצמח), כך שיחד עם ההשקיה בתרחיף החיידקים לא ייווצר נקז של מים בתחתית העציץ. לאחר 24 שעות ממועד האילוח נדגמו כל הצמחים לפי הפרוטוקול שתואר בעבודתנו הקודמת (Bernstein et al., 2007b). בעבודה הנוכחית הכנסנו שלב נוסף של חיטוי חיצוני של הנוף, לפני מיצוי החיידקים, על מנת למנוע חשש שחיידקים שזיהמו את פני העלים ייחשבו בטעות כחיידקים שחדרו לצמח. החיטוי בוצע ע"י טבילה של החומר הצמחי בתמיסה של 1% $AgNO_3$ למשך 5 שניות. שאריות חומר חיטוי סולקו ע"י שתי שטיפות במים סטריליים. ביום הדיגום נעשתה בדיקה ליעילות החיטוי החיצוני, כדלקמן: עלה לפני ואחרי חיטוי הונחו על גבי מצע אגר LB, הצלחות הודגרו ב-37 מ"צ למשך 24 שעות ומספר החיידקים שגדלו נקבע. יעילות החיטוי נבדקה על עלים מצמחים בגיל 44 ו-65 יום. מספר החיידקים הממוצע בשני הניסויים היה 75 ± 25 CFU לעלה, לפני חיטוי, לעומת אפס חיידקים לאחר חיטוי.

בדיקת מיקום החיידקים בעלים לאחר חדירתם לצמח

חמישה צמחי חסה בוגרים בגילים 72, 79 ו-92 יום אולחו עם 10 מ"ל תמיסת חיידקים בריכוז 10^{10} /ml ע"י השקיה. לאחר 24 שעות נדגמו עלים שונים מהצמח. העלים שנדגמו היו: (א) עלים מבוגרים (עלים תחתונים שהתחילו להצהיב); (ב) עלים בוגרים (עלים אמצעיים, מפותחים היטב); (ג) עלים צעירים (עלים קטנים באורך של כ-10-5 ס"מ). העלים הבוגרים חולקו לשני חלקים: טרף העלה והעורק המרכזי. סה"כ מכל צמח נלקחו 4 דוגמאות (4 עלים בכל קבוצה), כדלקמן: (א) עלים מבוגרים, (ב) טרף של עלים בוגרים (ללא עורק מרכזי), (ג) עורק של עלים בוגרים ו- (ד) עלים צעירים. הדוגמאות הועברו לשקיות סטומכר עם 100 מ"ל BPW ועברו מיצוי במכשיר סטומכר למשך דקה. דגימות של $100 \mu\text{l}$ מהנוזל נזרעו על צלחות XLD ושאר הנוזל הועבר להעשרה, כמתואר לעיל.

הישרדות של חיידקי סלמונלה על עלי חסה

על חסה משתילים בגיל 50 יום אולחו, חיצונית, ע"י פיזור של $50 \mu\text{l}$ מתרחיף החיידקים בעזרת מחט זריעה בקטריולוגית אשר בקצהה כדורון פלסטיק. הפיזור נערך על שטח של כ-1 סמ"ר משני צידי העלה (בעלים שונים) והנוזל התייבש תוך מספר דקות. בניסוי השתמשנו בשני ריכוזי חיידקים (10^9 CFU/ml ו- 10^3 CFU/ml), אשר הכילו חומר משטח (0.01 % Tween 20) להקלת הפיזור. החיידקים פוזרו בכל עלה באיזור המסומן בתמונה 1.



תמונה 1. מקום פיזור החיידקים על פני חלקו העליון של העלה. מקום הפיזור על פני החלק התחתון היה באזור מקביל.

לצורך הניסוי שמשו 60 צמחים. מכל צמח נבחרו 4 עלים בוגרים ומפותחים היטב וסומנו במדבקות לצורך זיהויים בעתיד (תמונה 2). מתוך 4 העלים שסומנו, 2 עלים אולחו בחיידקים בצדם התחתון ו-2 עלים, בצדם העליון. סה"כ אולחו צמחים 30 עם תמיסת חיידקים בריכוז נמוך ו-30 צמחים עם תמיסת חיידקים בריכוז גבוה. טמפרטורת החממה במהלך הניסוי היו בין 7 ל-29 מ"צ. דיגומים נעשו 24 שעות לאחר אילוח (זמן אפס) ובהמשך, אחת לשבוע. בכל מועד דיגום נבחנו 10 צמחים (5 שאולחו עם חיידקים בריכוז נמוך ו-5 עם חיידקים בריכוז גבוה). בכל צמח נדגמו 4 עלים מאולחים וכל 2 עלים עם אילוח באותו צד הועברו יחדיו לשקית סטומכר. סה"כ היו 20 דוגמאות בכל דיגום. החיידקים מוצו ב- 50 מ"ל BPW ומספרם נבדק, כמתואר לעיל.



תמונה 2. מערכת השתילים שמשו בניסוי האילוח על פני העלים. עלים שאולחו מסומנים ע"י מדבקה.

3. תוצאות ודיון

3.1 השפעת ריכוז החיידקים בתמיסה על יכולת החדירה לתוך צמחי חסה

שורשים של שתילי חסה אולחו ע"י טבילה בריכוזים עולים של סלמונלה ומספר החיידקים בקרקע ובנוף נקבע 4 ימים לאחר האילוח (טבלה 1). בתנאי הניסוי, ריכוזי החיידקים בקרקע נעו בין 4 ל-4000 חיידקי סלמונלה לגרם. בתנאים אלה, המייצגים מצב של אילוח נמוך, לא הייתה חדירה של חיידקים לנוף. עם זאת, בניסוי זה לא נבדקה נוכחות החיידק בשורש ועל כן אי אפשר לשלול את האפשרות כי הייתה חדירה לשורש, ללא מעבר לנוף. כמו כן, לא ניתן לשלול את האפשרות כי הייתה חדירה לנוף, זמן קצר לאחר האילוח, אך החיידקים לא שרדו עד היום הרביעי לבדיקה. אפשרות זו נתמכת בתוצאותינו בניסיונות קודמים, בהם הראנו שניתן לזהות סלמונלה בנוף לאחר 48 ש', אך לא לאחר שבוע (Bernstein et al., 2007b).

Table 1. Presence of *Salmonella* in aerial parts of plants and in soil 4 days post inoculation.

<i>Salmonella</i> inoculum concentration (CFU/ml)	<i>Salmonella</i> in plants and in soil	
	No. of positive plant samples out of six	CFU/g soil
0	0	0
10 ³	0	4.2±5
10 ⁶	0	4.7×10 ² ±2×10 ²
10 ⁹	0	4.2×10 ³ ±2.2×10 ³

- התוצאות המספריות מייצגות 6 חזרות לכל בדיקה. מספר החיידקים מוצג כממוצע וסטיית תקן.

3.2 השפעת גיל הצמח על יכולת החדירה של חיידקי סלמונלה דרך השורשים

מאחר שבעבודה קודמת מצאנו חדירה של סלמונלה בשתילים בני 33 יום, אך לא באלה של 17 או 20 יום (Bernstein et al., 2007b), הועלתה השערה שהחדירה תלויה במצב ההתפתחותי של הצמח. בניסוי זה נבדקה השפעת גיל הצמח על יכולת החדירה של סלמונלה. מערכת הניסוי מוצגת בתמונה 3 ותוצאות הניסוי מפורטות בטבלה 2.



תמונה 3. מערכת הניסוי לבחינת השפעת המצב ההתפתחותי של הצמח על יכולת החדירה של סלמונלה.

Table 2. Correlation between plant age and presence of *Salmonella*.

Age (days)	30	37	44	51	58	65
Plant weight (g)	2.4	6.5	14.2	56.7	114.8	158.0
No. leaves per plant	7	11	15	20	26	27
Presence of <i>Salmonella</i> -positive samples out of 5 replications	3	1	0	5*	2	1

*- In two samples, salmonella cells were directly recovered without enrichment (106 and 406 CFU/g leaf).

3.3 בדיקת מיקום החיידקים בעלים לאחר חדירתם לצמח

בניסוי זה ביקשנו לבחון האם יכולת החדירה של סלמונלה לעלים תלויה בסוג ובגיל העלה וכן היכן מתרכז החיידק, באזור רקמות ההובלה בעלה, או בטרף. לצורך כך, נערך ניסוי חדירה ונדגמו עלים בגילאים שונים וכן אזור "עורק" ואזור טרף (ללא עורק) בנפרד. התוצאות מוצגות בטבלה 3.

Table 3. Age and leaf distribution of *Salmonella* cells following internalization.

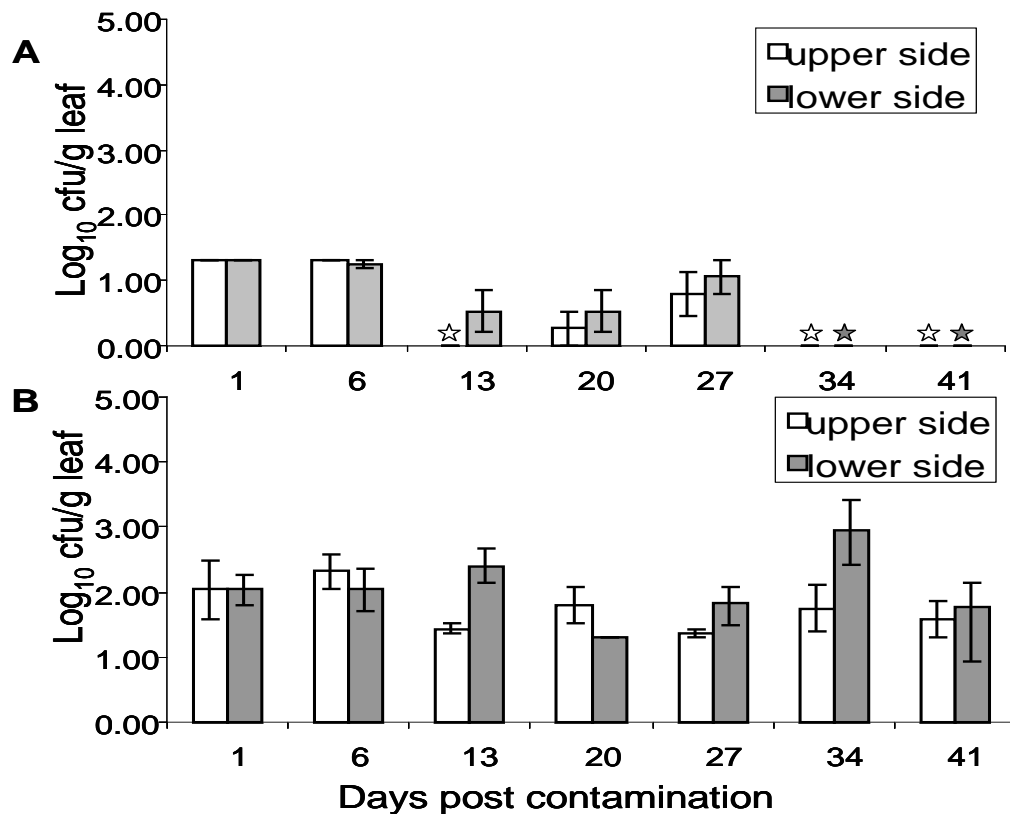
Leaf*/ age (days)	No. of <i>Salmonella</i> positive samples out of 5			
	Old	Mature (טרף)	Mature (עורק)	Young
72	4	3	5	5
79	2	3	4	3
92	4	0	3	1

*- Details of leaf age and areal distribution are described in the text.

3.4 השרדות סלמונלה על עלי חסה

אילוח צמחים בשדה יכול להיות על ידי מגע חיצוני של עלים עם חיידקים כתוצאה מהשקיה עם מים מזוהמים, הפרשות בעלי חיים בשדה, זבל אורגני שלא הוטמן כראוי, או אבק ממקור מזוהם בסביבת השדה. כדי לבחון את גורל הפתוגן לאחר מגע עם עלים, השרדות של סלמונלה על עלי חסה נבדקה לאחר אילוח עם מזרע נמוך (10^3 CFU לעלה) ומזרע גבוה (10^9 CFU לעלה), משני צידי עלים. באילוח בכמות נמוכה של חיידקים (תמונה A4), נראתה ירידה של כמעט שני סדרי גודל במספר החיידקים, לאחר 24 ש', כאשר מספר החיידקים לא השתנה עד 6 ימים. בין 13 ל-21 יום הייתה ירידה של מספר החיידקים ללא הבדל בצד העלה. העדר חיידקים בצד העליון כעבור 13 יום נובע, כנראה משונות של המערכת, שכן

בהמשך שוב מופעים חיידקים בצד העליון. לאחר חודש ומעלה, לא נמצאו עוד חיידקים על פני העלים, גם לאחר העשרה. ממצא זה מעיד על העדר יכולת גידול של החיידקים בסביבה זו. תוצאות האילוח עם מזרע גבוה 5×10^9 CFU, מראות תמותה גבוהה של כמעט 7 סדרי גודל, כבר לאחר 24 שעות, ללא קשר למיקום החיידקים על פני העלה. אולם, כמות החיידקים החיים על פני העלה נשארה קבועה לאורך תקופה של כחודש וחצי (תמונה B4).



תמונה 4. הישרדות של חיידקי סלמונלה על עלי חסה. העלים אולחו בחיידקי סלמונלה בכמות של CFU 5×10^3 (A) ו- 10^9 (B). כוכבית מסמלת העדר הימצאות של החיידק גם לאחר העשרה.

4. סיכום ומסקנות ביניים

מטרות העבודה כפי שנוסחו בהצעת המחקר המקורית (תכנית תלת-שנתית) ביקשו לבחון את יכולת החדירה של סלמונלה לצמחי מאכל שונים ואת התלות של החדירה בגיל הצמח ובריכוז החיידקים. בשל אישור המחקר לשנה אחת בלבד, התרכזנו בעבודה זו בגידול אחד, חסה.

מסקנות הביניים ממחקר זה הן:

- בריכוז חיידקים קטן או שווה ל- $4 \cdot 10^4$ CFU/g לא הובחנה חדירה של סלמונלה לעלי חסה.

- בריכוז חיידקים של- 10^7 CFU/g ~ החיידק מסוגל לחדור באופן אקראי לשתילי חסה בגילים שונים, כאשר חדירה מירבית נמצאה בגילים 51 ו-72 יום.
- החיידק חודר לעלים מבוגרים וצעירים ללא העדפה.
- החיידק נמצא בעיקר באזור העורקים ופחות באזורים אחרים של הטרף.
- תנאי המחיה על פני העלים, כפי שהיו בתנאי הניסוי, אינם מאפשרים התרבות של סלמונלה.
- הישרדות על פני העלה לאחר זיהום חיצוני יכולה להימשך עד 27 יום.
- זיהום עלים בכמות גדולה של חיידקים (10^9 CFU) יגרום לזיהום מתמשך של 41 יום.

השלכות להמשך המחקר:

1. לאור דיווחים בארץ על פוטנציאל חדירה גבוה של סלמונלה לשתילי פטרוזיליה (סימה ירון, טכניון-תקשורת אישית) וממצאים באנגליה על הימצאות סלמונלה בריחן (basil) שיוצא מישראל, דרוש מחקר מקיף לבחינת תופעת החדירה בירקות שונים (בעיקר ירקות עלים ושורש הנאכלים חי) וכן בצמחי תבלין.
2. בכל אחד מהגידולים יש לבחון את רמת הזיהום המיקטית הדרושה לקיום תופעת החדירה וכן לקבוע את המדדים המשפיעים עליה (גיל הצמח, המצב ההתפתחותי של השורש, חלקי הצמח בהם מצוי הפתוגן).
3. יש לבחון את השפעת ריכוז הסלמונלה בקרקע על יכולת האילוח.
4. יש לברר את זמני ההישרדות של סלמונלה בתוך ועל פני צמחים בוגרים לאחר קטיף, בתנאי איחסון שונים, לצורך אבחון ומניעת סיכון תברואי.
5. הישרדות של סלמונלה בקרקע מזוהמת עלולה להוות גורם לזיהום תוצרת חקלאית כתוצאה ממגע ישיר או עקיף (חרקים, נמטודות, אבק). יש לבחון את כושר ההישרדות של החיידק בקרקעות שונות ובמשטרי השקיה שונים, כולל השקיה במים מושבים בדרגות טיהור שונות.
6. יש לברר אפשרות חדירה לצמח גם במיקרואורגניזמים פתוגנים נוספים.

רשימת ספרות

דו"ח הלפרין. 1999. עקרונות למתן היתרים להשקיה בקולחים. משרד הבריאות, שירותי בריאות הציבור, המחלקה לבריאות הסביבה.

- Bernstein N., S. Sela, R. Pinto, and M. Ioffe. (2007a). Evidence for internalization of *Escherichia coli* into the aerial parts of maize via the root system. *J Food Protect.* 70:471-475.
- Bernstein, S., S. Sela, S. Neder-Lavon. (2007b). Assessment of contamination potential of lettuce by *Salmonella enterica* serovar Newport added to the plant growing medium. *J Food Protect.* 70:1717-1722.
- Bernstein, S., S. Sela, S. Neder-Lavon. (2007c). Effect of irrigation regimes on persistence of *Salmonella enterica* serovar Newport in small experimental pots designed for plant cultivation. *Irrig Sci.* 70:471-475.
- Blumenthal, U.J., Mara, D.D., Peasey, A., Ruiz-Palacios, G., and Stott, R. 2000. Guidelines for the microbiological quality of treated wastewater used in agriculture: recommendations for revising WHO guidelines. *Bulletin of the World Health*

- Organization 78 (9):1104-1116.
- 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. *Appl Environ Microbiol.* 68(1):397-400.
- Guo X., M. W. van Iersel, J. Chen, R. E. Brackett, and L. R. Beuchat. 2002. Evidence of association of *Salmonella* with tomato plants grown hydroponically in inoculated nutrient solution. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:3639-3643.
- Warriner, K., F. Ibrahim, M. Dickinson, C. Wright, and W. M. Waites. 2003. Interaction of *Escherichia coli* with growing salad spinach plants. *J Food Prot.* 66:1790-1797.

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

(בעברית ובאנגלית)

מאמרים בעברית

ש. סלע, נ. ברנשטיין, ר. פינטו. (2007). האם פתוגנים של האדם מסוגלים לעבור מתמיסת הקרקע אל תוך הצמח? מים והשקיה 493:26-31.

ש. סלע, נ. ברנשטיין, ר. פינטו. (2008). תובנות חדשות בנושא בטיחות מיקרוביאלית של ירקות ופירות טריים. עלון הנוטע 62:695-698.

מאמרים באנגלית

Bernstein, S., S. Sela, S. Neder-Lavon. (2007). Effect of irrigation regimes on persistence of *Salmonella enterica* serovar Newport in small experimental pots designed for plant cultivation. *Irrig Sci.* 70:471-475.

Bernstein, S., S. Sela, S. Neder-Lavon. (2007). Assessment of contamination potential of lettuce by *Salmonella enterica* serovar Newport added to the plant growing medium. *J Food Protect.* 70:1717-1722.

הבעת תודה

החוקרים מבקשים להודות לקרן המדען הראשי על התמיכה במחקר זה.

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.

מטרות המחקר לתקופת הדו"ח תוך התייחסות לתוכנית העבודה.
א. לבחון חדירה של חיידקים דרך מערכת השורשים לצמחים שונים ואברים שונים המיועדים למאכל בשלבי התפתחות ב. לבחון הישרדות של חיידקים פתוגנים בחלקי הצמח השונים
עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח.
בריוז חיידקים קטן או שווה ל- $4 \cdot 10^4$ CFU לגרם קרקע לא הובחנה חדירה של סלמונלה לצמחים בגיל 29 יום. החיידק חדר לשתילי חסה בגילים שונים, באופן לא אחיד, כאשר חדירה מירבית נמצאה בגיל 51 – 72 יום. חדירת החיידק נמצאה גם בעלים מבוגרים וגם בצעירים ללא הבדל משמעותי. החיידק נמצא בעיקר בדגימות מאזור העורקים בעלה ופחות באזורים אחרים של הטרף. כאשר זוהמו פני העלים של שתילי חסה בני 50 יום בריוזים נמוכים של החיידק (10^3 CFU לעלה), נמצאו חיידקים על פני העלה עד 27 יום לאחר הזיהום. כאשר זיהום העלים היה בכמות גדולה של חיידקים (10^9 CFU לעלה), נמצאו חיידקים על העלים עד תום הניסוי (41 יום לאחר הזיהום).
המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר בתקופת הדו"ח.
חיידקי סלמונלה המצויים בקרקע בריוז של 10^7 CFU/g ~ מסוגלים לחדור לשתילי חסה בגילים שונים. תוצאות הניסויים תומכות בכל שהחיידקים מגיעים לחלקי הצמח העליונים דרך מערכות ההובלה (עצה). חדירת חיידקים אינה תלויה בגיל העלה. אילוח חייוני של עלי חסה בשדה עלול לאפשר הישרדות של הסלמונלה עד הקטיף ואולי אף לאחרי. בשל הזמן הקצר שהוקצב למחקר (שנה אחת במקום שלוש שנים) והעדר משאבים מתאימים, לא הושגו כל מטרות המחקר. דרוש מימון נוסף לבחינת זיהום גידולים נוספים.
הבעיות שנתרו לפתרון ו/או השינויים שחלו במהלך העבודה (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים); התייחסות המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנתורה לביצוע תוכנית המחקר.
- עדיין לא ברור כמה זמן שורדת הסלמונלה בתוך העלים לאחר חדירה - חסר מידע על גורל החיידק במקרה של זיהום הזרעים - חסר מידע על אפשרות חדירה של הפתוגן לירקות ותבלינים אחרים - חסר מידע על הישרדות הסלמונלה בתוך ועל פני עלים בתנאי איחסון שונים לאחר קטיף השלמת המידע דרושה לקבלת נתונים לצורך ביצוע הערכת סיכונים ודורשת מחקר נוסף.
האם הוחל כבר בהפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח – יש לפרט: פרסומים – כמקובל בביבליוגרפיה, פטנטים – יש לציין מס' פטנט, הרצאות וימי עיון – יש לפרט מקום ותאריך.
מאמרים בעברית
ש. סלע, נ. ברנשטיין, ר. פינטו. (2007). האם פתוגנים של האדם מסוגלים לעבור מתמיסת הקרקע אל תוך הצמח? מים והשקיה 493:26-31.
ש. סלע, נ. ברנשטיין, ר. פינטו. (2008). תובנות חדשות בנושא בטיחות מיקרוביאלית של ירקות ופירות טריים. עלון הנוטע 62:695-698.

מאמרים באנגלית

Bernstein, S., S. Sela, S. Neder-Lavon. (2007). Effect of irrigation regimes on persistence of *Salmonella enterica* serovar Newport in small experimental pots designed for plant cultivation. *Irrig Sci.* 70:471-475.

Bernstein, S., S. Sela, S. Neder-Lavon. (2007). Assessment of contamination potential of lettuce by *Salmonella enterica* serovar Newport added to the plant growing medium. *J Food Protect.* 70:1717-1722.

הרצאה

הרצאה מוזמנת בכנס השנתי של האגודה הישראלית למיקרוביולוגיה. הפקולטה לחקלאות, האוניברסיטה העברית, רחובות (15 לאפריל, 2008).

Bernstein, S., S. Sela, E. Gorbatsevich and R. Pinto. Potential for contamination of plants by food-borne pathogens originated from irrigation water.

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

חסוי – לא לפרסם <