

## *E. coli*:s dolda liv: sockersug och kurragömma

BEATRIX ALSANIUS<sup>1</sup>, SOFIA WINDSTAM<sup>1,2</sup>, RAHEL HARTMANN<sup>1</sup>, SIV AHRNÉ<sup>3</sup>, GÖRAN MOLIN<sup>3</sup>

<sup>1</sup> INSTITUTIONEN FÖR BIOSYSTEM OCH TEKNOLOGI, HORTIKULTURELL MIKROBIOLOGI;

<sup>2</sup> STATE UNIVERSITY OF NEW YORK, DEPT OF BIOLOGICAL SCIENCES, OSWEGO, NY, USA;

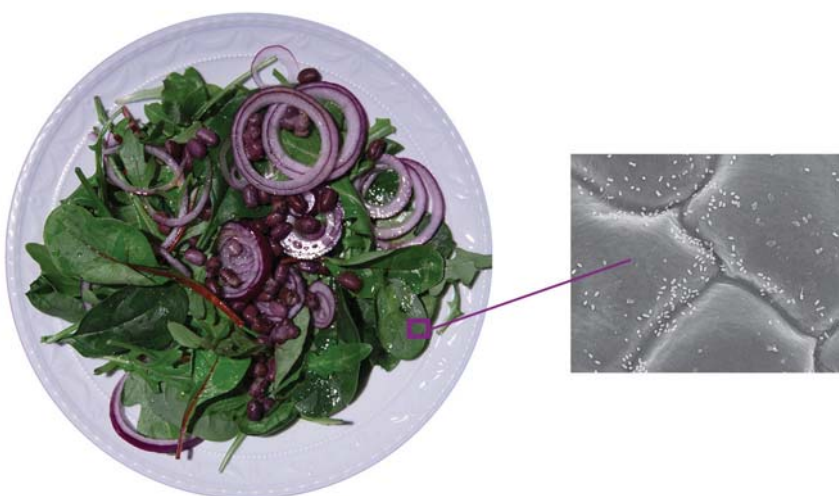
<sup>3</sup> LUNDS UNIVERSITET, LTH, AVDELNINGEN FÖR INDUSTRIELL NÄRINGSLÄRA; LIVSMEDELSHYGIEN, LUND

### Sammanfattning

Frukt och grönsaker ingår i en hälsosam kost. Dessa konsumeras antingen i rå eller tillredd form. Ett ökat antal utbrott av tarmsmittor har dock relaterats till frukt och grönsaker för direktkonsumtion eller konsumtion med minimal tillredning, både i Sverige och utomlands. Ofta förknippas magsmittor på frukt och grönt med importerade varor. Det tragiska utbrottet av EHEC, en mycket aggressiv grupp av *E. coli* (serotyp O157:H7), sensommaren 2005 satte problematiken på den svenska kartan. För att skapa förutsättningar för att förebygga spridning av humanpatogena sjukdomsalstrare (såsom EHEC, *Salmonella*, *Campylobacter*) under odlingen till produkten har vi undersökt hur *E. coli* O157:H7 förökas på ytan av bladgrönsaker och i vilken omfattning den förmår att krypa in och gömma sig i bladvävnaden. Invasion i bladvävnaden innebär att den blir oåtkomlig vid tvättning. För bladgrönt fann vi att

- *E. coli* O157:H7
  - kan invadera både oskadd växtvävnad och växtvävnad som skadats antingen mekaniskt eller genom sjukdomsangrepp,
  - förmår att överleva och att växa till på ytan av intakta och tryckskadade, skurna och strimlade blad och
  - tillväxten är växtspecifik.
- Glukos och fruktos var de främsta sockerarterna på bladytan av intakta eller tryckskadade blad.
- Glukos, fruktos, sukros och galaktos förekom i stora mängder på skurna resp. sönderdelade blad.
- Ett mycket starkt samband mellan tillväxt av *E. coli* och sockerhalten konstaterades.

Våra resultat visar att hög hygien måste råda i hela produktionskedjan från jord till bord. Att skölja grönsakerna innan förtäring har begränsad effekt och når inte de skadeorga-



Figur 1. Färska frukter och grönsaker förtärs med en levande biota (mikroflora). Den elektronmikroskopiska förstoringen till höger visar är ytan av ett spenatblad och de cylinderformade stavarna är bakterier. (Bild: B. Alsanius; K. Brismar; arrangemang: B. Alsanius)

nismerna som har trängt in i växtvävnaden.

Studien har genomförts inom ramen av Tvärlivs-projekt "Risker för humanpatogener i frukt och grönt i en globaliserad värld och strategier att bemästra dem", samt Partnerskap Alnarp projektet "Förekomst av tarmsmittor i bladgrönt under processing", båda i samarbete med Sydgrönt ek. för.

### Bakgrund

Inom ramen för detta faktablad presenterar vi nya rön om uppförkning av *E. coli* O157:H7 på bladgrönt relaterad till processning och organismens förmåga att tränga in i bladens inre (*internaliserar*). Detta för att främja hälsa och välmående för ett långt liv, öka konsumenternas tillit till hela värdekedjan från jord till bord samt verkar för etiska och uthålliga produktionsmetoder.

Växter i natur eller kultur är aldrig ensamma. Växternas yta och inre är naturligt ko-

loniserade av mikroorganismer (bakterier, svampar). Majoriteten av dessa organismer utgör ingen fara för konsumentens hälsa. Några av dessa kolonisatorer kan äventyra växternas hälsa (*växtpatogener*). Smittor som orsakar magsjuka kan dock dyka upp i alla delar av produktionskedjan från jord till bord och fästa vid växtytan. Djur- och humana exkrement är en huvudsmittkälla. Det är viktigt att bryta smittcykeln. Viktiga riskmoment för smittspridning i frilands- och växthuskulturer (2, 3, 5) är organiskt gödsel, ohygieniskt bevattningsvatten och djur i produktionsmiljön (både vilda djur, ohyror eller sällskaps- och husdjur).

Korskontaminering kan också ske genom människor som vistas i produktionsmiljön. God hygien och personalens hälsostatus är därför grundläggande för att minska smittspridningsrisken (3). Bland vattenrelaterade magsmittor i frilandskulturer är shigatoxin-producerande *Escherichia coli* (EHEC).

Tabell 1. Uppfödning av *E. coli* O157:H7gfp+ (% av absoluta antal) på intakta och tryckskadade blad av romansallad, rucola, röd mangold och spenat direkt efter behandling respektive efter 24 h lagring.

Växtslag	Intakt	Tryckskadat
Romansallad	40.62	46.65
Rucola	2.23	11.22
Röd mangold	7.34	27.13
Spenat	6.69	10.85

t.ex. *E. coli* O157:H7) särskilt betydelsefulla i och med att de framkallar allvarliga sjukdomstillstånd vid mycket låg infektiös dos och motstår ogynnsamma miljöbetingelser. Vi valde en oskadlig typ av *E. coli* O157:H7 som modellorganism som är markerad med ett grönt fluorescerande protein (*gfp*) (1, 4, 6). Detta för att kunna känna igen den vid reisolering från bladytan och i bladens inre vid undersökning i konfokalmikroskopet.

### Bakterier på bladytan

Sfären som påverkas av bladet kallas *fyllosfär*. Antalet bakterier i fyllsfären skattas till en miljon bakterieceller per g bladfärskvikt. Bakteriernas val av koloniseringsplats och dess förehavande på blad kan jämföras med människans övervägande vid val av, och förehavanden på, hennes boplatser. Människan vill främst bo på platser som kan underlätta tillvaron; det gäller klimatet (hellre Malaga än Grönland), närhet till livsnödvändiga faktorer/livsmedel (hellre bördiga slätter än öken), lätthet att införskaffa förnödenheter (nära kust eller infrastruktur), eller där likasinnade finns (favoriserade stadsdelar). Bakterier fungerar i många avseenden på ett liknande sätt: för att överleva krävs det tillgång på näring och vatten. Utöver detta måste miljön matcha bakteriernas krav på temperatur och luftfuktighet. Bladet är utsatt för stora temperatursvängningar mellan dag och natt, kraftig torka, nederbörd, som tidvis kan vara mycket häftiga, vind, elektromagnetisk strålning (t.ex. UV-strålning). Det är alltså tufft för bakterier att vistas där. Förstås spelar också bladens egenskaper roll, såsom ålder, position på växten, topografi och bladvinkel samt ytskiktets (*kutikula*) beskaffenhet. Bladet skyddar sig mot uttorkning genom ett vaxskikt. Detta är vattenfrånstötande (*hydrofob*), vilket betyder att bakterierna måste kunna

övervinna detta för att inte glida av med dagg eller regnvatten.

Bakterier delar utrymmet på bladet med andra mikroorganismer. Bakterier kan vara fientligt inställda sinsemellan.

Näringsrika platser på bladet är nära klyvöppningarna (*stomata*), körteelhår (*trichoma*) eller i vävnadssår. En ensam bakterie klarar sig inte särskilt väl; kolonisering sker tillsammans med likasinnade. Då antalet likasinnade har nått en viss kritisk massa, bildas det aggregat (biofilm). Biofilmen hjälper bakterierna att effektivt fästa vid bladytan. Den ger skydd mot uttorkning, men också möjlighet att förändra boplatserns förutsättningar, t.ex. kan glipor i kutikulan kolonieras effektivt och då också bättre tillgång till föda. Det finns en social struktur inom biofilmen, och vissa bakterier ger upp sin rörelseförmåga och blir sedentära celler, medan andra behåller sin rörlighet vilket bidrar till dynamiska förändringar. Då tillgång på föda på en intakt bladyta är konstant, måste bakterieceller flytta ut ur biofilmen, för att bereda plats åt tillresande – i fall de är välkomna. I motsats till mänskliga samhällen, är individerna i ett bakteriellt samhälle inte ut efter att bekräfta sig själva genom att vara likriktade, utan bakteriella samhällen vill vara "multi-kulti" för att vara framgångsrika (heller Berlin än Djursholm), dock inte på bekostnad av den egna överlevnaden. Likt vissa mänskliga boplatser kan livsstilen vara rå för att bibehålla sitt existensberättigande – man tar kål på varandra.

Tarmsmittor brukar inte räknas till växtens naturliga mikrobiota. Finns de inte på plats på det groende fröet, så måste de spridas till växten genom marken, vatten, vind, djur (inkl. människa) eller odlingsåtgärder.

Vi ville veta:

- Påverkas *E. coli* O157:H7gfp+ av olika processningsåtgärder?
- Finns det skillnader mellan växtslag?
- Vilka kolhydratkällor finns på bladytan?
- Hur påverkas *E. coli* O157:H7gfp+ av dessa sockerkällor?

### Genomförande

Rucola, röd mangold, spenat och romansallad odlades upp i växthus. Blad skördades och förvarades vid 4 °C i högst 24 h innan behandlingen. Romansalladens yttersta blad togs bort och enbart de inre bladen användes i försöket. Bladen doppades i 3 s i en suspension med *E. coli* O157:H7gfp+ och överskottssuspensionen fick sedan rinna av. En till två trycksår skapades mekaniskt med en pincett, antingen vid bladspetsen eller i interkostalfälten utan att skada bladnerverna. Oskadda blad användes som kontroll. Bladen inkuberades vid 28 °C och förekomsten av den inokulerade stammen bedömdes direkt efter inokulering samt 2 h, 4 h och 24 h efter inokulering.

Endast romansallad användes för att undersöka effekten av processning på förekomsten av *E. coli* O157:H7gfp+. För detta skapades antingen fem trycksår med hjälp av en pincett enligt ovan, eller skars bladen i grova remsor (4 cm bredd) eller strimlades (1 cm bredd). Intakta (oskadda) blad användes som kontroll. För att kunna översätta resultaten till kommersiella betingelser, tog vi bladgrönsaksprover från kommersiell processning, där vi jämförde överlevnaden av *E. coli* O157:H7gfp+ på bladmaterial innan processning, som enbart lagrats vid 4 °C och efter processning, som hade tvättats, torkats och strimlats maskinellt.

För insamling av socker från bladytan behandlades bladen enligt ovan. Bladen tvättades av med 1.5 ml sterilt vatten antingen direkt efter behandlingen eller efter 2 h, 4 h eller 24 h efter interventionen. Provet frystorkades och bereddes och analyserades därefter gaskromatografiskt (GC-MS).

### Resultat

Tryckskador inverkar inte på förekomsten av *E. coli* O157:H7gfp+ under de första 4 h efter interventionen. Däremot ökade *E. coli*'s förekomst 11 gånger för rucola och spenat och 27 gånger resp. 47 gånger för röd mangold resp. romansallad, då halten jämfördes vid tidpunkten direkt efter med halten 24 h efter behandlingen (Tabell 1).



Figur 2. Visualisering av *E. coli* O157:H7gfp<sup>+</sup>-celler (grön), markerade genom vita pilar, i vävnaden (röd) av oskadade, abiotiskt och biotiskt skadade blad. (Bild: R. Hartmann).

Samtliga skillnader 24 h efter interventionen var signifikanta. Tryckskadade ruco-lablad härbärgerade ett signifikant högre antal *E. coli* O157:H7gfp<sup>+</sup> än oskadade blad, i motsats till motsvarande jämförelse med spenat, röd mangold och romansallad, där inga skillnader konstaterades. Också processningsmetoderna inverkar på *E. coli* s förökning. Tryckskador, sönderdelning i remsor och strimlande stödde tillväxt av *E. coli* O157:H7gfp<sup>+</sup> redan 4 h efter interventionen och signifikanta skillnader konstaterades för sönderdelade och strimlade blad både efter 4 h och 24 h. *E. coli* O157:H7gfp<sup>+</sup> växte betydligt bättre i processade kommersiella prover jämfört med innan processning. Tillväxten var mest uttalad för rucola och röd mangold, där förekomsten efter 24 h inkubation ökade med 28 gånger resp. 9 gånger på blad innan processning och 182 resp. 61 gånger efter processning. Låg tillväxt konstaterades på romansallad, medan inga skillnader fastställdes för spenat (Tabell 2).

Glukos och fruktos var de främsta sockerarterna på tryckskadade och intakta blad då prov togs direkt efter försöksstart eller efter 2 h inkubation. Inget socker kunde konstateras vid senare provtagning. Spektret och mängd sockerarter skilde sig ifrån detta när romansalladsblad sönderdelades, där utöver glukos och fruktos också påtagliga mängder sukros och galaktos fanns. Tillväxten av *E. coli* O157:H7gfp<sup>+</sup> var korrelerad till tillgänglig fruktos ( $R^2=0.98$ ), sukros ( $R^2=0.98$ ) och galaktos ( $R^2=0.92$ ).

### Bakterier i bladvävnaden

Även växtens inre är mikrobiellt koloniserad. Denna sfär kallas för *endosfär*; antalet bakterier i endosfären skattas till 100.000 celler per g friskvikt. Tillvaron i endosfären är avsevärt mindre tuff än på bladytan. En stor fördel med att vistas i växtvävnaden är att det finns en ur bakterieperspektiv oändlig tillgång till föda. Förutom detta ger växtvävnaden skydd mot snabba förändringar i miljön och till viss del mot parasitering. I och med att tarmsmittor inte alstrar sjukdomar på växten, är de inte utrustade med verktyg för att aktivt skada växtvävnaden. De måste förlita sig på andra mekanismer för att tränga in växtvävnaden. Naturliga öppningar, såsom klyvöppningar är en väg att nå växtens inre. Glipor i kutikulan en annan. Mekaniska sår, exempelvis orsakade av hagel, häftigt regn eller mekanisk bearbetning, eller sår orsakade av skadealstrare är en annan väg för att tränga in i växtvävnaden.

Vi ville veta:

- Kan *E. coli* O157:H7gfp<sup>+</sup> tränga in i oskadade (intakta) blad?
- Förändrar sig antalet *E. coli* O157:H7gfp<sup>+</sup> bladets inre om bladet skadats mekaniskt eller genom växtpatogener?

### Genomförande

Rucola och röd mangold odlades upp i växthus och skadades antingen mekaniskt med hjälp av karburundum eller med hjälp av de bakteriella växtpatogener *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (rucola) resp. *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* (mangold). Växterna spraybehandlades med *E. coli* O157:H7gfp<sup>+</sup>.

Tabell 2. Uppfödning av *E. coli* O157:H7gfp<sup>+</sup> (i % av absoluta antal) på intakta, tryckskadade, skurna respektive strimlade romansalladsblad direkt efter behandling respektive efter 24 h lagring.

Behandling	Uppfödning
Intakt	5.42
Tryckskadat	10.77
Skuren	7.63
Strimlat	39.01

24 h efter behandlingen skördades 9 cm långa blad, ytsteriliserades och analyserades med hjälp av konfokalmikroskop.

### Resultat

*E. coli* O157:H7gfp<sup>+</sup> visualiserades i konfokalmikroskop (fig. 2). Djupet och mängden *E. coli* O157:H7gfp<sup>+</sup> i bladens inre skilde sig mellan de två växtslagen. Ytsterilisering av mangoldblad påverkade verifieringen av bakterien negativt. I oskadade blad återfanns bakterien i vakuoler och intercellulära utrymme ner till 35 µm djup, medan den kunde visualiseras i kaviteter i 40 µm djup i mekaniskt skadade mangoldblad. I *Pseudomonas* angripna mangoldblad detekterades *E. coli* O157:H7gfp<sup>+</sup> i kaviteter vid intercellulära utrymmen.

Enstaka celler av *E. coli* O157:H7gfp<sup>+</sup> påvisades i oskadade ruco-lablad. Förekomsten ökade då bladen var skadade och konstaterades i 20 µm resp. 25 µm djup vid abiotisk resp. biotisk skada. Högst förekomst av smittan konstaterades i biotiskt skadade mangoldblad (med > 100 celler i ett 90 \*



90  $\mu\text{m}^2$  stort utsnitt) resp. abiotiskt skadade rucola blad (med 50–100 celler i ett 90 \* 90  $\mu\text{m}^2$  stort utsnitt).

### Diskussion och slutsatser

Shigatoxin-producerande *E. coli* O157:H7 har varit relaterat till flera utbrott av magsjukor relaterade till frukt och fruktprodukter, grönsaker, färska örter och groddar. Smittan orsakar sjukdom redan då få celler förekommer (10–100 celler). Särskilt drabbade är personer med nedsatt immunförsvar, t. ex. barn och äldre. Våra undersökningar visar att bakterien kan föröka sig på bladgrönt. Bakterien älskar socker och förökningen var mycket nära associerad med förekomsten av utvalda sockerarter. Detta resultat stöds av undersökningar från Leveau och Lindow (7). Resultatet är logiskt, då mer socker sipprar ur växtvävnaden (*exsuderar*) då växtmateriallets finfördelningsgrad ökar. Undersökningen genomfördes under skämningsbetingelser, d.v.s. vid 28 °C. Detta var en kompromiss för att tillgodose bakteriens temperaturkrav på optimal tillväxt och förvaringstemperatur. Detta innebär att uppförkning sker snabbare än vid förvaring i kylskåp, men kan jämföras med förvaring av bladsallad på köksbänken eller i en bil under en varm sommardag.

Vi visar också att *E. coli* O157:H7 $gfp+$  kan tränga in i bladgröntens inre. Betydelsen av vävnadsskador som port till växtens inre är uppenbar. Bilderna i figur 2 visar mycket små utsnitt ur blad, mindre än en  $\text{mm}^2$ . Antalet celler i blad skadade på de två sätten räcker till för att en person skulle insjukna i en EHEC infektion. Risken är mindre, dock inte utesluten då blad är oskadda (intakta). Detta understryker två mycket väsentliga punkter, nämligen att

- Tarmsmittor inte alltid är åtkomliga genom förebyggande åtgärder, såsom skölj-

ning, även om biofilmen på bladets yta besejras och att

- Hygieniska betingelser måste råda under hela produktionskedjan från jord till bord.

Två parametrar skiljs åt vid riskbedömning: probabilitet och skada (*impact*). Risken att råka ut för en EHEC-infektion (probabilitet) är inte särskilt stor. Däremot är skadan mycket stor. Detta exemplifierades mycket tydligt under utbrott av EHEC genom *E. coli* O104:H4 relaterat till bokhornsklövergroddar med 3842 registrerade fall; av dessa utvecklade 855 personer HUS och 53 personer dog. Frukt och grönt produceras inte i sterila miljöer och med en levande biota. På grund av produktionssystemets komplexitet kan utbrott inte uteslutas. En hög grad av medvetande och ändamålsenliga hygienåtgärder krävs i hela produktionskedjan från jord till bord för att tillhandahålla säkra frukt- och gröntprodukter.

### Litteratur

1. Alam, M., Ahlström, C., Burleigh, S., Olsson, C., Ahrné, S., El-Mogy, M. M., Molin, G., Jensen, P., Hultberg, M., and Alsanus, B. W. 2014. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 on spinach and rocket as affected by inoculum and time to harvest. *Scientia Horticulturae* 165:235–241.
2. Alsanus, B. W. 2014. Hygien och bevattning. Swedish University of Agricultural Sciences, Alnarp.
3. ———. 2014. Mikrobiologiska faror i grönsakskedjan under primärproduktion. SLU, Alnarp.
4. Alsanus, B. W., Burleigh, S., Larsson, C., Suivinen, A., Gustafsson, A. K., and Hultberg, M. 2010. EHEC's öde på frilandsodlade grönsaker. LTJ-fakultetens faktablad 2010:8:1–4.

5. Alsanus, B. W., Von Essen, E., Hartmann, R., Vågsholm, I., Doyle, O., Schmutz, U., Fricke, A., Stützel, H., and Dorais, M. 2016. The One Health-concept and organic production of vegetables and fruits. *Acta Horticulturae* in press.
6. El-Mogy, M. M., and Alsanus, B. W. 2012. Cassia oil for controlling plant and human pathogens on fresh strawberries. *Food Control* 28:157–162.
7. Leveau, J. H. J., and Lindow, S. E. 2001. Appetite of an epiphyte: Quantitative monitoring of bacterial sugar consumption in the phyllosphere. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 98 (6):3446–3453.

- 
- Faktabladet är utarbetat inom LTV-fakultetens Institutionen för Biosystem och Teknologi, Enhet Hortikulturell Mikrobiologi.
  - Projektet är finansierat av Tvärlivs (genom Formas) och Partnerskap Alnarp (projekt 663), båda i samarbete med Sydgrönt ek. för.
  - Projektansvarig/författare: Beatrix Alsanus; email: beatrix.alsanus@slu.se; Enhet för Hortikulturell Mikrobiologi, Box 103, 230 53 Alnarp
  - [epsilon.slu.se](http://epsilon.slu.se)