

EHEC's öde på frilandsodlade grönsaker

BEATRIX ALSANIUS, STEPHEN BURLEIGH, CHRISTINE LARSSON, ANNELI SUVINEN, ANNA KARIN GUSTAFSSON, MALIN HULTBERG

Sjukdomsutbrott orsakade av tarmsmittor (t.ex. *Salmonella*, *Campylobacter*, *E. coli*, *Shigella*, *Norovirus*) har tidigare främst förknippats med animaliska produkter. Under de senaste åren har dock utbrott relaterade till frukt och grönt ökat; 49 frukt- och grönt relaterade utbrott med ca 2500 sjukdomsfall registrerades under tiden 1997-2009. Mörkertalet är dock stort och kan beroende på sjukdomsalstraren vara 4-10 gånger högre. Fram till 2004 klassades hotet från frukt och grönt som ringa. Det svenska utbrottet av EHEC, en aggressiv form av *E. coli*, i samband med produktion av isbergssallad under hösten 2005, satte problemet med fekal förorening i frukt och grönt på den svenska agendan. Smittorna kan överföras i hela kedjan från jord till bord och problemet är mest påtagligt för frukt och grönt som konsumeras rå eller med minimal tillredning. Organisk gödsel och bevattningsvatten har identifierats som huvudsakliga smittkällor vid odling av frilandskulturer, men det finns även andra smittkällor, t.ex. vilda djur, husdjur och människor. För att förhindra dessa utbrott är det viktigt att bryta smittcykeln. Vi har studerat om *E. coli*, i synnerhet EHEC, överlever på grönt, när smittan överförs med bevattningsvatten. Vi använde oss av en EHEC-stam som inte kan framkalla sjukdom, men som i övrigt har de för EHEC unika miljömässiga egenskaperna (biokemisk EHEC). Enligt våra resultat minskar förekomsten av biokemisk EHEC med ökande tidsintervall mellan bevattnings- och skördetillfälle. Minskningen beror på halten av biokemisk EHEC i bevattningsvattnet. Val av *E. coli*-stam för provokation och analysätt är väsentliga. För att undvika sjukdomsutbrott i samband med odling av persilja, ska ett intervall av 72 timmar mellan bevattning med smittat bevattningsvatten och skörd inte underskridas.



Figur 1. Bevattning på friland (foto: Beatrix Alsanius)

Odling av frukt, bär och grönsaker på fält och under kontrollerade betingelser kräver konstbevattning. Som vattenkällor används borr-, kommunalt eller ytvatten. Dessa vattenkällor håller både hygieniskt och kemiskt olika kvalitet. Användning av ytvatten som bevattningsvatten vid odling av frilandsgroönsaker är mycket vanligt. Denna vattenkälla kan dock medföra en förhöjd risk för spridning av tarmsmittor. Magsjuka relaterad till frukt och grönt härrör främst från fekala föroreningar (tarmsmittor). Sjukdomsalstrarna förekommer i tarmen av varmblodiga djur, inkl människor. Djuren behöver inte tvunget visa symptom utan kan vara smittbärande utan att det märks.

Bland sjukdomsalstrare finns virus (t.ex. norovirus som orsakar vinterkräksjukan, och hepatit A), parasiter (t.ex.

Giardia och *Cryptosporidium*), och bakterier (t.ex. *Salmonella*, *Campylobacter*, verotoxinproducerande stammar av *E. coli* (EHEC, VTEC), *Shigella*, *Yersinia*, samt *Aeromonas* och *Listeria*). De två sistnämnda bakterierna kan även överleva i andra miljöer än tarmen; de klarar dessutom låga temperaturer och delvis också ett brett pH-spektrum samt betingelser med lite tillgängligt vatten. Allvaret kring sjukdomstillstånd orsakade av dessa organismer varierar; vissa orsakar enbart rejäla diarréer och/eller kräkning, medan andra, såsom EHEC, kan leda till njursvikt och i svåra fall vara dödliga.

Det finns flera anledningar till de senaste årens ökade antal utbrott av magsjuka relaterade till frukt och grönt. Bland dessa finns egentligen enbart en positiv förklaring, nämligen en intensivare epidemiologisk

övervakning. Övriga anledningar är

- ändrade strukturer inom produktionen (inkl. intensifiering och centralisering av produktionen, längre och fler långväga transporter och distribution samt import och introduktion av nya produkter med minimal tillredning)
- ändrade konsument- och matvanor, inkl. en högre konsumtion av råa produkter resp. produkter med minimal tillredning
- ett högre antal av individer inom riskzonen, dvs. äldre personer eller personer med nedsatt immunförsvar
- en högre förekomst av sjukdomsalstrare som orsakar sjukdom i låg dos.

Frukt och grönt kan smittas i samtliga delar av produktionskedjan, från jord till bord. Det är en utopi att förhindra smittan helt. Däremot kan man tillämpa metoder för att minska risken för att sprida sjukdomsalstrarna. En åtgärd för att minska smittspridning är bevattningsvatten av god kvalitet.

I Sverige finns ett antal standarder för bedömning av vattenkvalitet. Dessa avser kvalitet av t.ex. dricksvatten, buteljerat vatten och badvatten. Däremot finns inget regelverk som avser bevattningsvatten. Frågeställningar rörande standard för bevattningsvatten bearbetas inom andra projekt vid Enheten för Hortikulturell Mikrobiologi, Område Hortikultur, SLU Alnarp. För att kunna sätta en standard är det dock viktigt att ha kunskap om sjukdomsalstrarnas öde på produkten. EHEC är en sjukdomsalstrare som framkallar allvarliga sjukdomstillstånd vid förekomst i mycket låg dos. Man anser att 1 till 10 celler är tillräckliga för att bli sjuk. Därför valde vi icke virulenta (icke sjukdomsframkallande) stammar av *E. coli* som modellorganismer inom ramen för våra studier.

Inom ramen för detta faktablad redovisar vi resultat från inledande studier

rörande säkring av hygienisk standard i bevattningsvatten till frilandsodlade grönsaker. Våra studier är uppdelade i två avsnitt, nämligen (1) val av modellorganism samt analysmetod och (2) effekt av intervall mellan bevattning med kontaminerat vatten och skörde-tillfälle hos krusbladig persilja.

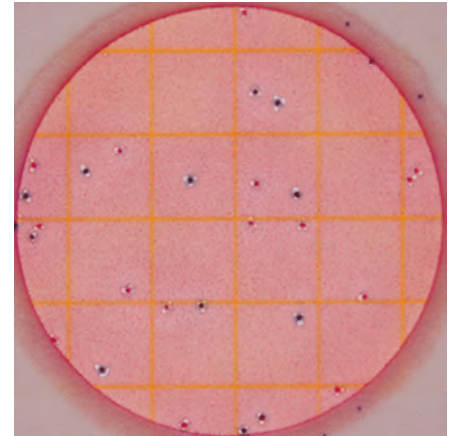
Modellorganism och analysmetod

Escherichia coli (*E. coli*) användes som modellorganism. *E. coli* är vanligt förekommande i ytvattenkällor som används för bevattning av frilandsgrödor. I tidigare undersökningar har vi sett halter upp till över 1000 kolonier per ml vatten. I två inledande studier sprayades organismen i halter på 10, 100 och 1000 kolonier per ml på antingen spenat eller persilja som odlades i en låst växthuskammare.

I huvudförsöket med krusbladig persilja valde vi halter på 100, 1000 och 10000 kolonier per ml. Vi analyserade förekomsten av *E. coli* i bevattningsvattnet och på plantorna direkt före samt 3, 24, 48 och 72 timmar efter bevattning med smittat vatten.

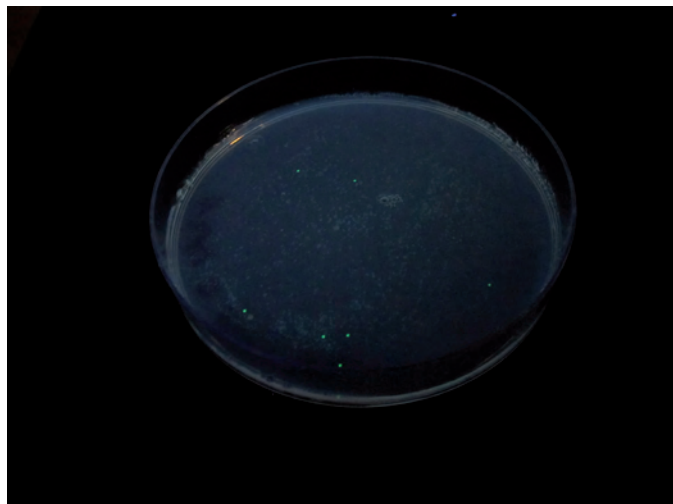
E. coli är en mycket välstuderad organism. Vid laboratoriestudier av denna organism vill man undvika att personalen insjuknar därför arbetar man med icke-patogena stammar. Den lägre aggressiviteten hos dessa icke-patogena stammar är dock ofta förknippat med en nedsatt överlevnad i miljöer utanför laboratoriet. I ett inledande försök arbetade vi med *E. coli* stammen DH5, en stam som ofta används för molekylärbiologiska studier med *E. coli*. Förekomst av DH5 kvantifierades med hjälp av petrifilm-skivor (3M™ Petrifilm™ *E. coli*/Coliform Count Plates, Artikel 6414; 3M Microbiology Products, St. Paul MN, USA). *E. coli* är gram-negativa stavar som producerar syra och gas genom

fermentation av mjölksocker (laktos). Utöver detta producerar de flesta *E. coli* stammar enzymet glucuronidas. Dessa principer utnyttjas i filmplattorna där förekomsten av *E. coli* kan bestämmas genom färgförändring (blå) och gasbildning i anslutning till *E. coli* kolonier (figur 2).

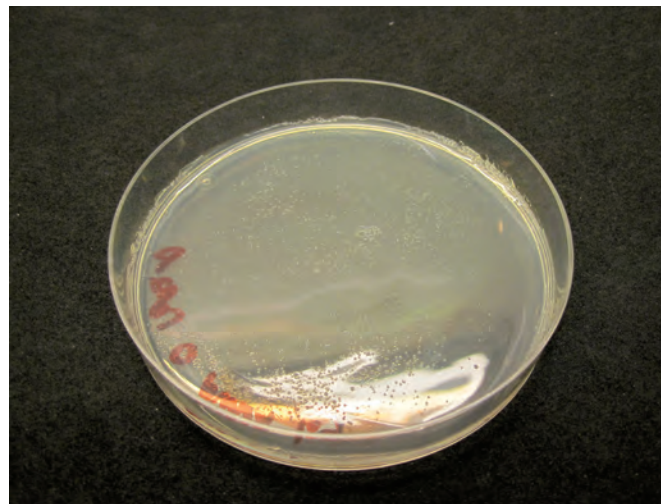


Figur 2. 3M™ Petrifilm™ för identifiering och kvantifiering av *E. coli*. *E. coli*-kolonier utmärker sig genom en blå färgförändring och en gasblåsa i anslutning till kolonien. (Foto: 3M, St Paul MN, USA)

I och med att *E. coli* DH5 i vår första inledande studie inte överlevde särskilt väl i miljön utanför laboratoriet, användes i den senare förstudien en icke-patogen stam av *E. coli* O157:H7 (E81186) som Smittskyddsinstitutet, Solna, ställde till vårt förfogande. Patogena stammar av *E. coli* O157:H7 (EHEC) har förekommit på frukt och grönt och orsakat sjukdomsutbrott världen över; det är verotoxiner, som alstrar sjukdomen. Patogena stammar av *E. coli* O157:H7 producerar två olika verotoxiner. Den icke-patogena stammen i denna studie har inte förmågan att producera verotoxiner; men har i övrigt de för EHEC unika miljömässiga egenskaper. Den kallas därför också för biokemisk EHEC. Till skillnad från DH5 producerar



Figur 3A.



Figur 3B.

Figur 3. Fluorescerande kolonier av den biokemiska *E.coli* O157:H7 stammen med biosensor (*gfp*) framför en bakgrund av andra mikroorganismer som lever på blad under UV-ljus (A) och under dagsljus (B) (foto: Stephen Burleigh).

E. coli O157:H7 ingen glucuronidas och kan därför inte kvantifieras med hjälp av filmplattor. I den andra förstudien visade det sig också att det var svårt att särskilja den biokemiska EHEC-stammen från den allmänna bakteriefloran som förekom på persiljeblad.

Vi markerade därför den biokemiska stammen med en biosensor (grönt fluorescerande protein, GFP), som ger stammen förmågan att fluorescera under UV-ljus (figur 3). GFP upptäcktes först hos maneten *Aequorea victoria*; för denna upptäckt tilldelades Martin Chalfie, Osamu Shimomura och Roger Tsien år 2008 Nobelpriset i kemi. Stammen med biosensor (*E.coli* O157:H7 *gfp*+) motsvarade i övrigt stammen utan biosensor. Den biosensor försedda stammen användes i huvudförsöket.

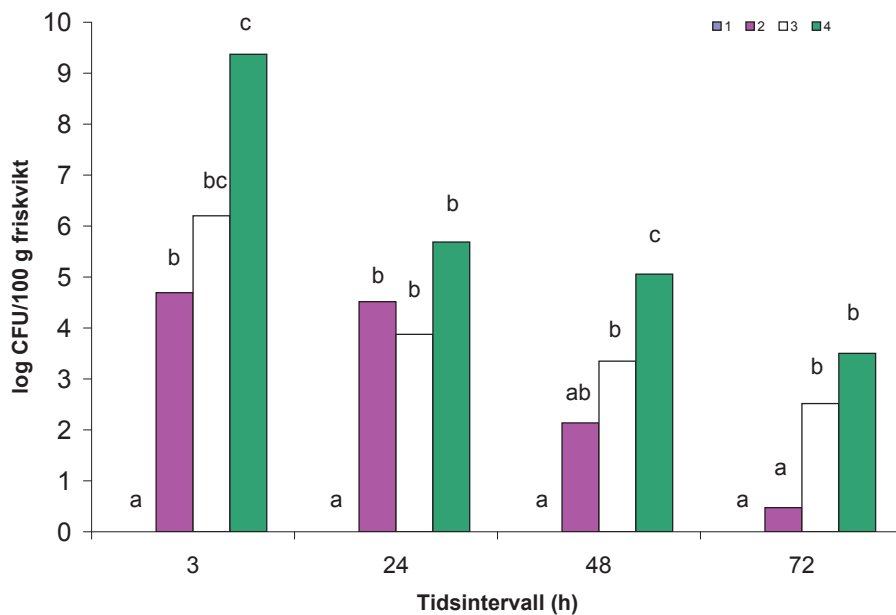
Samspel mellan halten av EHEC i bevattningsvatten och intervall mellan bevattning och skörd

För att undersöka samspelet mellan EHEC i bevattningsvatten och

intervall mellan bevattning och skörd utgick vi från en normal bevattningsvolym av 5 mm (5 liter per m²). Samspelet undersöktes i ett två-faktoriellt försök, där halten biokemisk EHEC (faktor 1) var 100, 1000 resp. 10000 celler per ml motsvarande en giva på 5 mm och där intervallet mellan bevattning och skörd (faktor 2) var 3, 24, 48 och 72 timmar. Halten biokemisk EHEC avtog undan för undan vid samtliga halter av biokemisk EHEC i bevattningsvattnet. Det fanns dock skillnader i hur snabbt halterna sjönk. Vid behandling med en låg halt av biokemisk EHEC (100 kolonier per ml) sjönk halten linjärt från 10 000 till 10 kolonier per försöksruta (parcell) inom loppet av tre dygn. Vid högre utgångshalter i bevattningsvatten sjönk antalet kolonier snabbt till en början, men minskningen stannade upp och efter 3 dygn fanns 1000 resp. 10 000 kolonier per parcell kvar. Minskningen hade vid dessa två utgångshalter ett polynomiskt resp. exponentiellt förlopp vilket innebär att halterna även långsiktigt inte kommer

att bli 0. Förklaringen till detta ligger i livsstilen på bladen. Att bakterier finns i alla miljöer är allmänt känt sedan tidigare. Flertalet mikroorganismer gör ingen skada. På blad finns i genomsnitt 10 000 000 (10⁷) till 10 000 000 000 (10¹⁰) bakteriekolonier per gram färskvikt. Antalet bakteriekolonier varierar mellan växtslag. Många bakterier som finns i bladmiljön är utrustade med mekanismer som skyddar mot de inte särskilt gästvänliga betingelserna, såsom uttorkning och UV-strålning.

Avgörande för bakteriernas överlevnad är tillgänglighet av vatten och föda. Inte alla ställen på blad tillgodoser dessa krav. Man kan likna koloniseringen av blad med kolonisering av ett landskap bestående av städer och landsbygd, där majoriteten av befolkningen bor i städer och antalet invånare på landsbygden är mycket mindre. Bakterier ligger inte på blad och skvalpar omkring utan finns i en slags biofilm som ger skydd mot uttorkning.



Figur 4. Förekomst av biokemisk *E. coli* O157:H7 per 100 g färskvikt av persilja 3, 24, 48 och 72 timmar efter bevattning med smittat bevattningsvatten. Det smittade bevattningsvattnet innehöll 0 (blå stapel), 100 (10^2) (mangenta stapel), 1000 (10^3) (vit stapel) resp. 10000 (10^4) (grön stapel) kolonier *E. coli* O157:H7 per ml bevattningsvatten motsvarande en vattengiva av 5 mm. Antalet kolonier (CFU; colony forming units) uppges som logaritmsk värde per 100 g friskvikt där log 0 = 1 koloni, log 1 = 10 kolonier, log 2 = 100 kolonier, log 3 = 1 000 kolonier, log 4 = 10 000 kolonier, log 5 = 100 000 kolonier, log 6 = 1 000 000 kolonier etc. Avvikande bokstav ovanför stapeln vid samma skördetillfälle indikerar att halterna skiljer sig signifikant.

När en enskild bakterie träffar bladytan via bevattningsvattnet är det inte säkert att den hamnar på en plats med god tillgänglighet till vatten och föda över tid. Den kan heller inte ensamt skydda sig mot uttorkning. Den ensamme resenären kommer förmodligen att dö efter ett tag. Det är det vi ser när biokemisk EHEC tillfördes i en låg halt med bevattningsvattnet. Finns det däremot högre halter av biokemisk

EHEC i vattnet, är dels chansen större att de hamnar på platser med god tillgänglighet av vatten och föda och dels kan organismerna skydda sig och varandra, genom att bilda en slags biofilm – de bildar alltså en ny stad.

Figur 4 visar förekomsten av biokemisk EHEC på 100 g färskvikt av krusbladig persilja vid olika halter i bevattningsvatten och olika skördetillfällen. Halterna var påtagligt höga

fortfarande tre dygn efter bevattning med smittat vatten, då högre doser av smittämnet förekom. Bakterierna hade dock inte försvunnit helt då bevattningsvattnet enbart innehöll motsvarande 100 kolonier per ml vid en vattengiva av 5 mm.

I föreliggande undersökning arbetade vi med en icke-patogen stam av EHEC (biokemisk EHEC). Förutom att inte framkalla sjukdom brukar icke patogena stammar ha ett mindre aggressivt koloniseringssätt – alltså en mer fredlig livsstil. Hade undersökningen genomförts med en patogen EHEC-stam hade den förmodligen koloniserat bladverket i minst samma utsträckning. Därför drar vi slutsatsen att man definitivt inte ska underskrida ett bevattningsintervall av tre dygn mellan bevattning och skörd när ytvatten används som källa för bevattning av krusbladig persilja.

Undersökningen visar också vikten av hygieniskt hög kvalitet för bevattningsvatten. Vattenkällor med hög standard är kommunalt vatten och grundvatten för djupborrh, samt regnvatten om det uppsamlats på rätt sätt. Renhet från dessa vattenkällor kan dock äventyras av föroreningar i ledningsnätet. Inte alla odlare av frilandsgronsaker har tillgång till kommunalt eller grundvatten utan måste använda sig av ytvattenkällor (t.ex. vatten från uppsamlingsdamm, sjö, bäck). Det finns ett antal åtgärder för att säkerställa vattenhygien från dessa källor.

Faktabladet är utarbetat inom LTJ-fakultetens område Hortikultur (www.microhort.se)

Projektet är finansierat av Partnerskap Alnarp tillsammans med Sydgrönt ek.fören. (projekt 240: Hygien och bevattningsvatten till frilandsodlade grönsaker) och FINDUS AB (projekt 276: Säkring av hygienisk standard i bevattningsvatten till frilandsodlade kryddväxter).

Valda delar av projektet har fått stöd av SLF (projekt V0856456).

Projektansvarig/författare: Beatrix Alsanius E-mail: beatrix.alsanius@ltj.slu.se
Område Hortikultur, Enhet för hortikulturell mikrobiologi, Box 103, 230 53 Alnarp
<http://epsilon.slu.se>