

דו"ח ביניים לתכנית מחקר מספר 20-06-0066

שנת המחקר: 4 מתוך 4 שנים

שימוש בבקטריופאגים לבקרה ביולוגית של חיידקי ויבריו בחקלאות ימית

Using bacteriophage for biological control of *Vibrio* pathogens in Mariculture

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

אור שפירא המכון לאחסון איכות ובטיחות תוצרת חקלאית ומזון, מנהל המחקר החקלאי
גלית שרון המכון הלאומי לחקלאות ימית, חקר ימים ואגמים לישראל

Orr Shapiro, ARO, HaMacabbim Rd. 68, P.O.B. 15159 Rishon LeZion 7505101. E-mail: orr@agri.gov.il

Galit Sharon, NCM (IOLR), Eilat. E-mail: galit.sharon@ocean.org.il

תקציר: המטרה המרכזית של המחקר היתה פיתוח גישה חליפית לשימוש באנטיביוטיקה בחקלאות ימית. במסגרת המחקר נבחן השימוש בבקטריופאגים בעלי פעילות ספציפית כנגד פתוגנים מסוג ויבריו לצורך מניעת הדבקה בדגי דניס. הצעת המחקר המקורית נחלקה למספר תת-משימות: א) בידוד בקטריופאגים בעלי פעילות ספציפית כנגד פתוגנים מסוג ויבריו אשר בודדו מדגים מסביבות חקלאות מים בישראל; ב) אפיון זיקת בקטריופאגים לשכבת הריר הסמוכה לעור הדג; ג) פיתוח מערכות הדבקה בתרביות תאים לבדיקת אפקטיביות בקטריופאגים במניעת הדבקה. ד) בחינת פעילות בקטריופאגים נבחרים במערכת הדבקה המבוססת על דגי דניס. בתום שנת המחקר הראשונה התמקדנו בתבדיד המזוהה כ-*Vibrio owensii*, אשר מוכר כיום כפתוגן שכיח במערכות חקלאות ימית בעולם. על סמך תוצאות חלקיות שהתקבלו במהלך המחקר נראה כי פתוגן זה נמצא באופן יציב במתקני הגידול במלח"י או במי הים הנשאבים, ופעילותו הינה תלויית טמפרטורה. בהתאם למטרות המחקר נבנה מאגר בקטריופאגים הפעילים כנגד פתוגן זה ממי מערכות הגידול במלח"י וכן ממי הים התיכון. ניסיונות חוזרים לבדוד בקטריופאגים משכבת הריר בדגים לא צלחו ועל כן לא המשכנו בכיוון זה במהלך המחקר. הבטקרופאגים שבודדו אופיינו מבחינת טווח המאחסן על בסיס אוסף תבדידי ויבריו פתוגניים שבודדו מסביבות חקלאות ימית בישראל. לאור עיכובים בהקמת מערכת הדבקה בתרביות תאים, ותוצאות מאכזבות שהתקבלו ממערכת זו לכשהוקמה, נבנתה מערכת הדבקה נוספת בארטמיות אשר הפכה למערכת מרכזית במחקר. מערכת זו מאפשרת סריקה מהירה של בקטריופאגים כנגד חיידקי ויבריו פתוגניים ובחינת הפוטנציאל שלהם למניעת הדבקה על ידי הפתוגן הנבדק in-vivo. על בסיס מערכת זו הצלחנו באפיון כמותי של פעילות בקטריופאגים הן באופן פרטני והן בטיפול משולב (קוקטייל). השלב האחרון והעיקרי במחקר היה מבוסס על בחינת פעילות בקטריופאגים שנבחרו על סמך תוצאות המערכת המעבדתית במניעת הדבקה בדגי דניס. כמובן שחלק זה של המחקר היה תלוי בהעמדת מערכת הדבקה בדגי דניס. לצערנו ניסיונות חוזרים להעמיד מערכת הדבקה כזו לא צלחו. התוצאות שהתקבלו הצביעו על ריכוז חיידקים גבוה באופן בלתי סביר (כ- 10^8 חיידקים למ"ל), בשילוב עם עקה משמעותית, הנדרשים לקבלת הדבקה. הדירות נמוכה של התוצאות שהתקבלו, בשילוב עם תמותות בקבוצת הביקורת עקב העקה אליה נחשפו הדגים וכן כשלים במערכת ההסגר במלח"י, הביאו לכך שאין בידינו תוצאות בעלות תוקף מדעי ממערכת זו. למרות הקשיים שבהם נתקל המחקר יש ערך לתוצאות שהתקבלו בו. מערכת הארטמיות שהוקמה במהלך המחקר הינה כלי מחקרי חשוב שיאפשר מחקרים דומים בפתוגנים נוספים בעתיד. הפתוגן שנבחר, *V. owensii*, אמנם לא נמצא כבעל פעילות משמעותית כנגד דגי דניס בתנאים שנבחנו אך הוא בעל חשיבות רבה במערכות מדגה אחרות, לדוגמה בתעשיית השרימפס העולמית. יצויין כי על סמך תוצאות המחקר נוצר קשר עם חברת פיברו-אקווה במטרה להעמיד מערכת הדבקה בשרימפס שבה נוכל לבחון את פעילות הבקטריופאגים שבודדו, והחברה אף גילתה עניין בבחינת הגישה שפותחה כנגד פתוגנים נוספים בעלי חשיבות במדגה העולמי.

הצהרת החוקר הראשי:

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא (מחק את המיותר)

חתימת החוקר  תאריך: 29.5.22

הגידול האינטנסיבי של דגים בחקלאות הימית בעולם סובל מהתפרצויות של מחלות הגורמות לפגיעה בכושר הייצור של מערכות אלו ולנזקים כלכליים לחקלאים (Bondad-Reantaso *et al.*, 2005). אבדן תוצרת עולמי בתחום החקלאות הימית, בשל מחלות חידקיות ואחרות, מוערך בלמעלה מ-6 מיליארד דולר בשנה. בגידולים מסוימים עשויים האבדנים כתוצאה ממחלות לעלות על 40% מכושר הייצור השנתי, ונחשבים למחסום העיקרי בהתרחבות הענף (Stentiford 2017). מבין הפתוגנים המזדמנים, חיידקים מן הסוג *Vibrio* הינם האלימים ביותר והגורמים למירב האבדנים בחקלאות מים מליחים בדגש על תחום החקלאות הימית (Toranzo *et al.* 2005). בנוסף, ישנם מספר מיני *Vibrio* אשר הינם זואונוטיים ועלולים להוות סכנה גם לבני אדם (Gauthier 2015; Zhang *et al.*, 2016; Jacobs-Slifka *et al.* 2017). חיידקים אלה נמצאים פעמים רבות כחלק מן המיקרופלורה הטבעית של עור הדג ושל סביבת הגידול, כאשר התפרצות המחלה מתרחשת בדרך כלל במצבי עקה, לדוגמה בעקבות צפיפות גבוהה או ירידה באיכות המים. במינים רבים עולה הוירולנטיות של הפתוגן עם עלייה בטמפרטורת המים (Toranzo *et al.*, 2005).

הכלי העיקרי לצמצום התפרצויות של חיידקי *Vibrio* כיום הוא מתן טיפול אנטיביוטי מניעתי בסמוך להיווצרות העקה, או טיפול ארוך טווח בעקבות התפרצות המחלה. יחד עם זאת, מתקיים כיום מאמץ כלל עולמי לצמצום שימוש בתכשירים אנטיביוטיים בחקלאות ככלל ובחקלאות מים בפרט (Pruden *et al.* 2013; Reverter *et al.*, 2014), וזאת לאור התפתחות והתפשטות של זני חיידקים עמידים לאנטיביוטיקה. חיידקים אלה נחשבים לאחד האיומים העיקריים בתחום הרפואה, וזאת עקב ירידה מתמדת ביעילות האנטיביוטיקות הנמצאות בידינו כנגד זיהומים בקטריאליים. מחקרים רבים מצביעים על קשר סיבתי בין שימוש-יתר בתכשירים אנטיביוטיים בחקלאות הימית לעלייה בשכיחות עמידויות לאנטיביוטיקה, וחומרים אנטיביוטיים עשויים גם להצטבר בשריר דגי המאכל ועלולים להוות גורם שלילי מבחינה רפואית (Cabello, 2006; Romero Ormazábal *et al.*, 2012). כתוצאה מההליכים אלה ישנו צמצום מתמיד בכלים הנתונים בידי החקלאי על מנת להתמודד עם חיידקים פתוגניים במערכת. למעשה נותרו כיום בידי חקלאי המדגה בארץ רק שלושה תכשירים אנטיביוטיים מותרים לשימוש (oxytetracycline, Florfenicol and Sulphadiazine), כאשר תקנות דומות מיושמות באירופה וארצות הברית בהן השימוש באנטיביוטיקה בדגי מאכל מוגבל מאוד.

בקהר ביולוגית של פתוגנים בסביבת הגידול עשויה לשמש אלטרנטיבה ידידותית לסביבה להקטנת השימוש הנרחב באנטיביוטיקה. בקרה ביולוגית מבוססת בקטריופאגים כבר מיושמת כיום בתחום שימור מזון טרי (Endersen *et al.* 2014), ויישומה נבחן בענפים חקלאיים רבים. טיפול בעזרת בקטריופאגים יוכל לפגוע באופן סלקטיבי בפתוגנים תוך פגיעה מינימלית באוכלוסייה המיקרוביאלית הטבעית. השימוש בבקטריופאגים כנגד פתוגנים, שהוצע לראשונה לפני כ-100 שנה (D'Herelle 1917), נחשב כיום לאחד הכלים בעלי הפוטנציאל הרב ביותר במאבק כנגד התפתחות עמידות לאנטיביוטיקה בחיידקים (Sulakvelidze *et al.* 2001). המטרה המרכזית של המחקר הנוכחי היתה בדיקת היתכנות לפיתוח גישה לבקרה ביולוגית מבוססת בקטריופאגים כנגד פתוגנים מסוג *Vibrio* בחקלאות ימית בארץ, כאשר בבסיסה עומד השימוש בבקטריופאגים בעלי פעילות ספציפית ככלי להפחתת עומס החיידקים הפתוגניים בסביבת הגידול. כפי שדווח במהלך המחקר, ויפורט בגוף הדו"ח, ישנם מספר חלקים בהצעת המחקר המקורית אשר לא עמדנו בביצועם בשל סיבות שונות. יחד עם זאת, בתום תקופת המחקר יש בידינו אוסף של בקטריופאגים פעילים כנגד פתוגן בעל חשיבות בתעשיית חקלאות המים העולמית, וכן פיתחנו מערכת מעבדתית מבוססת ארטמיות המאפשרת סריקה מהירה ואפיון כמותי של פעילות בקטריופאגים *in-vivo* כנגד פתוגנים מסוג ויבריו. תוצאות אלה עשויות לפתוח את הדרך לקראת מחקרים נוספים בתחום חשוב זה, הן בפיתוח תכשיר כנגד הפתוגן שנבדק והן בבידוד ואפיון בקטריופאגים כנגד פתוגנים נוספים לקראת פיתוח תכשירים דומים בעתיד.

שיטות וחומרים

בידוד ואפיון פתוגנים מסוג ויבריו – דגימות מטחול, כילה וכבד נלקחו מזני דגים שונים שהובאו למעבדה לפתוביולוגיה לדיגום בקטריולוגי. הדגימות בודדו על מצע TSA ומצע סלקטיבי לחיידקי *Vibrio sp.* -TCBS. המצעים עברו אינקובציה בטמפרטורה של $1 \pm 24^{\circ}$ למשך 72 שעות. בהמשך, כל מושבה עברה 2 בידודים נוספות עד לקבלת מושבות נקיות. לזיהוי סוגי החיידקים, התבצע הפקת DNA והגברה מהמושבות השונות, בעזרת פריימרים אוניברסליים של גן ה-S-16. תוצרי ה-PCR עברו טיהור וניקוי ע"י "QIAquick PCR Purification Kit" (QIAGEN Hilden, Germany, לפי הוראות יצרן, ונישלחו לריצוף וזיהוי במעבדות "חי" (HyLabs). כל החיידקים שזוהו כאחד ממיני ה- *Vibrio sp.* על פי ריצוף הגן ל-rRNA-16S. כלל הזנים נשמרים בהקפאה ב- 80°C לצורך המשך המחקר והועברו למעבדת דר' שפרא במנהל המחקר החקלאי לטובת בידוד בקטריופאגים וניסויי הדבקה.

בידוד בקטריופאגים בעלי פעילות כנגד פתוגנים מסוג ויבריו – דגימות מים נאספו במספר תאריכים מאתרים שונים כמפורט בטבלה 2. העשרה ראשונית של בקטריופאגים בדגימות אלה כנגד תבדיד מסוים בוצעה על ידי הדגרה overnight ב- 30°C של ריכוז גבוה (10^6 תאים למ"ל או יותר) של תבדיד זה בלפחות 100 מ"ל מים מסוננים (0.22 מיקרון) מאותה הדגימה שעברו סינון ב-0.22 מיקרון. בתום ההדגרה סוננה התרבית פעם נוספת ב-0.22 מיקרון. נוכחות בקטריופאגים בתסנין נבדקה בשיטת האגר הרך (Shapiro et al 2009) במיהולים שונים. פלאקים בודדים הועברו לתרבית נקייה של החיידק המארח. במידה והתקבלה הצלחה סוננה התרבית פעם נוספת לקבלת הבקטריופאגי הנקי. אחידות הפלאקים בתסנין נבדקה פעם נוספת בשיטת האגר הרך, בקטריופאגים מבודדים הועברו להקפאה ב- 80°C לצורך המשך המחקר.

מערכת מודל להדבקה מבוססת תרביות תאים – השתמשנו בקו תאים של דג הדניס, *Sparus aurata* (חברת קוואקס) לצורך המחקר. התאים גודלו באינקובטור בטמפרטורה של $1 \pm 28^{\circ}\text{C}$ בפלאסקים של 25 מ"ל עם מדיום גדילה מסוג Leiboviz L-15 (Gibco) בתוספת של 10% Fetal Bovine Serum, L-glutamine (300 mg/liter), וקאנמיצין (10,000 מ"ג/מ"ל). קווי התאים פוצלו ביחס של 1:3, והועברו לפלסקים חדשים כל שבוע עד 10 ימים. לאחר שבוססה מערכת קווי התאים במעבדה, נעשו ניסיונות גידול של התאים ברמות מליחות שונות. פלאסקים עם אחוז כיסוי תאים של 80-90% עם מדיום גדילה, L-15, נשטפו ב-PBS ובמקום המדיום הוספו 3 מ"ל של מי ים מסוננים ב-0.22 מיקרון ומעוקרים, במינוני מליחות שונים (0,10,15,20,30 ppt) אשר הושגו על ידי מיהול במים מזוקקים פעמיים. נעשה מעקב בעזרת מיקרוסקופ הפוך (Olympus CKS41, Tokyo, Japan) לצורך קביעת אחוז הכיסוי של התאים לאחר 24 ו 48 שעות. במקביל נבדקה השפעת מליחות על גידול חיידקי ה-*Vibrio communis* (26NCM) שכנגדו נמצאו בקטריופאגים פעילים. החיידק נזרע בצלחת 96 באריות אשר הכילה TSB ב-6 ריכוזי מליחות שונים (7.5,10,20,30,40,47.5%). הוספנו ריכוז קבוע של חיידקים (10^5) למדיומיים השונים בטרופליקטים, וניקרא ה-OD600 כתלות בזמן כל 15 ד"ק למשך 24 שעות ב-Plate reader ספקטרוטומטר (Bio Tek, Power wave X5, USA) בהשוואה ל-TSB חיידקים (control). **בדיקת פוטנציאל בקרה ביולוגית על ידי בקטריופאגים שבודדו בתרבית תאים.** בהתבסס על LD50 שהוגדר, בוצעו ניסויי הדבקה של תרבית תאים על ידי *V. owensii* (10^3 CFU/ml) כמתואר לעיל. לבדיקת השפעת בקטריופאגים הוספו בקטריופאגים שבודדו במסגרת המחקר ביחסי הדבקה (MOI) שבין 0.1 ו-1000. שרידות התאים נבדקה לאורך 48 שעות כמתואר לעיל.

מציאת ריכוז החיידקים שיגרמו לתמותה של כ- 50% מהתאים (LD50). קו תאים מסוג *Sparus aurata* אשר גודל על פי הפרוטוקול המתואר מעלה, עד לכיסוי של כ- 80% מהפלאסק, נשטף והוספו לתוכו מי ים מליחות של 10 ו-15 ppt אשר לא הראו נזק לתאים במהלך 48 שעות. חיידקים אשר גודלו ב TSB נשטפו משאריות המדיה, והוספו לפלסקים השונים במינונים הולכים ויורדים מ- 10^6 ועד 10^2 בדופליקטים. הפלסקים נבדקו כל 12 שעות תחת מיקרוסקופ הפוך (Olympus CKS41, Tokyo, Japan) וחושבו אחוזי הכיסוי של התאים בפלאסק בהשוואה ל- control ללא חיידקים ע"י תוכנת: (Image processing and analysis in java Wayne Rasband, National Institute of Health, USA). בנוסף, נעשה ניסוי זהה בו ריכוז החיידקים שגרמו לתמותה של כ- 50% מהתאים בפלסקים (LD50) נבדק בקווי תאים המכילים את המדיה המקורית לגידול Leiboviz L-15 (Gibco).

מערכת מודל להדבקה מבוססת *Artemia salina* – עבור כל ניסוי, מובקעות ארטמיות מביצי קיימה על ידי הדגרה במשך 72 שעות במי ים סטריליים, טמפ' 25 מעלות, 12×12 אור חושך. ארטמיות שבקעו נאספות בעזרת פיפטת פסטר ומועברות לפלטות של 24 באריות, 20 ארטמיות לבארית ב-1 מ"ל מי ים סטריליים שאליהם הוספו 10^6 תאי *E. coli* מומתים ושטופים כמקור מזון. הדבקה מתבצעת על ידי הוספת הפתוגן *Vibrio communis* בריכוז סופי של 10^3 CFU לבארית (בפועל 10^3 CFU/ml). הגנה מבוססת בקטריופאגים נבחנת על ידי הוספת בקטריופאגים שבדודו כנגד הפתוגן לבארית בריכוז סופי של 10^5 PFU/ml במקביל להוספת הפתוגן (MOI = 100). כל בקטריופאג' נבחן בשלוש באריות, כאשר בכל ניסוי כלולות 3 באריות ביקורת ו-3 באריות הדבקה ללא בקטריופאג' כבקרות. שרידות הארטמיות נבדקת אחת ליום לאורך 72 שעות (הדגרה בתנאים זהים להבקעה) על ידי ספירה של הארטמיות החיות בכל בארית אחת ליום בעזרת בינוקולר.

מערכת הדבקה בזגי דניסולברק – בסה"כ נעשה שימוש ב-50 דגי לברק (*Dicentrarchus labrax*) של ~16 גר' ו-640 דגי דניס (*Sparus aurata*) בין 5 ל-20 גר'. דגים אילו שימשו לכל נסיונות האילוח לחישוב ה LD50 וכן לניסויי הגנה בפאגים. נעשה שימוש בדגים נאיביים (ללא מחלות) שעברו בדיקה פתוביולוגית מקיפה. הדגים הוחזקו באקווריום של 1000 ליטר מי ים (40ppt; 10 החלפות מים ביום) שעברו טיפול UV, עם הספקת אויר רצופה. בטמפרטורת החדר (RT), במתקן ההסגר של המרכז הלאומי לחקלאות ימית (NCM). פרמטרי איכות המים (טמפרטורה, pH וחמצן) נוטרו מדי שבוע ונשמרו בתנאים מתאימים. הדגים הוזנו מדי יום ב-2% ממשקל גופם במזון מסחרי (רענן פישפיד בע"מ, ישראל). כל הפרוטוקולים של היסויים ותנאים הבריאות של הדגים בוצעו בהתאם לאקדמיה הלאומית למדע (2011), ולעקרונות המחקר הביו-רפואי הכוללים ניסויים בעלי חיים, שהוקמה על ידי ועדת מכון וולקני לטיפול אתי ושימוש בבעלי חיים.

V. owensii - החיידק תורבת תחילה ב-Tryptic Soy Agar (TSA, DIFCO), הוכן עם 25% מי ים סטריליים והודגר ב-24 מעלות צלסיוס $\pm 1^\circ$ למשך 48 שעות, ולאחר מכן הועבר ל-Tryptic Soy Broth (TSB, DIFCO), שהוכן עם 25% מי ים סטריליים והודגר ב-26 מעלות צלסיוס $\pm 1^\circ$ למשך 72 שעות עד לריכוז הרצוי. החיידק נקצר באמצעות צנטריפוגה (Eppendorf Centrifuge 5417R, המבורג - גרמניה) לאחר מכן החיידק נמהל במי ים סטריליים לריכוז הרצוי, צפיפות חיידקים נמדדה ב-OD 600 באמצעות ספקטרופוטומטר של מיקרו-פלט (PowerWave TMXS, BioTek, Winooski, VT) וכן בספירת מושבות (CFU) על גבי מצע אגר.

Artemia salina - נאופליי של ארטמיה בני יומיים נקצרו, נשטפו במי ים סטריליים, תוך שמירה על רמות חמצן מתאימות, ב-25 מעלות צלזיוס ובמליחות של 20 עד 30 ppt, לפני השימוש בהן בניסויי האילוח השונים של הדגים. **פאגים** – על מנת לקבל פאגים במי ים ללא מצע גידול, *V. owensii* גודל במצע Zobel (Himedia) בנפח קטן, נשטף, והוסף למיכלים בנפח ליטר שהכיל כ- 10^6 נאופליי של *A. salina* שלב 3 (לאחר התפתחות מעי) במי ים מלאכותיים סטריליים בריכוז חיידקים של כ- 10^6 חיידקים (CFU) למ"ל. ארטמיות וחיידקים הודגרו בטמפרטורת החדר בטלטול, לאחר 24 שעות הוסף פאג' מתאים למיכל בריכוז של כ- 10^7 PFU והמיכל הודגר באותם התנאים למשך 24 שעות נוספות. בתום ההדגרה סוננו המים במיכל סינון גס דרך נייר סינון להפרדת הארטמיות ולאחר מכן בפילטר steri-cup (Merck) של 0.22 מיקרון לקבלת פאגים נקיים. ריכוז הפאגים במי הים נבדק בשיטת אגר רך ונמצא כ- 10^{10} PFU/ml.

דיגום מים במהלך ניסוי הדבקה - דגימות מים נאספו במבחנות של 15 מ"ל לפני, שעה ו-24 שעות לאחר הוספת הטיפול המתאים בכל אחד מהאקווריום בכדי לספור מושבות חיידקים בכל שלב. כל אחת מדגימות המים דוללה לשמונה דילולים סדרתיים של פי עשר. נזרעו 4 צלחות אגר TCBS (תיסולפט-ציטראט-מלחי מרה-סוכרוז; Difco™) מכל דילול (10 µl), הצלחות הודגרו ב- 24 מעלות צלזיוס למשך 24 שעות לפני ספירת המושבות (CFUs). סך ה-CFU חושב על פי מספר המושבות הקיימות כפול גורם הדילול.

אנליזה בקטריולוגית - אנליזה בקטריולוגית מדגימות מים, כמו גם מדגימות רקמה (כבד, טחול וכליות) של דגים טריים מתים/חולים נאספו במנדף סטרילי ונזרעו על אגר TSA ב-1±24°C למשך 48 שעות. דגימות חיוביות עם גידול חיידקים בודדו, ודגימות DNA חולצו ממושבה בודדת לפי פרוטוקול (Wayne for AFLP) AIMS. כמות ואיכות DNA (יחס 280:260A2) נמדדו והוגברו לאחר מכן באמצעות PCR של הגן (Weisburg et al., 1991) 16S rRNA, באמצעות פריימרים (5'-TACGGCTACCTTGTACGACTT-3') 1492R (5'-AGAGTT TGATCCTGGCTCAG-3') 27F. תוצרי ה-PCR טוהרו ורצפו במעבדות חיי בע"מ (Hylabs, רחובות, ישראל). רצפים שהתקבלו מה-PCR של הגן 16S rRNA זוהו במסד הנתונים BLAST מ-GenBank לזיהוי חיידקים ולאחר מכן השושו לרצפים של ה-*Vibrio owensii* בו השתמשנו במהלך הניסויים השונים.

תוצאות

בידוד ואפיון פתוגנים מסוג ויבריו – רשימת התבדידים שבודדו או שנעשה בהם שימוש במסגרת המחקר מובאת בטבלה 1. סה"כ בודדו עד כה 28 זנים שונים, מתוכם 9 המשתייכים למיני המטרה כפי שהוגדרו בהצעת המחקר המקורית (*V. harveyi*, 1 *parahaemolyticus*, 1 *Vulnificus*). 2 תבדידים אשר זוהו תחילה כ-*V. harveyi* זוהו בהמשך כשתייכים למין *V. communis*. לאור קרבתו של מין זה ל-*V. harveyi*, ולאור ממצאים חדשים ממלח"י המצביעים על מין זה כפתוגן חשוב בגידול דגיגי בורי, הוחלט להוסיפו לרשימת זני המטרה של המחקר.

טבלה 1: אוסף זני פתוגנים מסוג ויבריו אשר שימש במסגרת המחקר הנוכחי לצורך בידוד בקטריופאגיים

NCM#	Species (by 16S rRNA)	source-fish sp.	TCBS (+/-)	NCM#	Species (by 16S rRNA)	source-fish sp.	TCBS (+/-)
1	<i>V. sinaloensis</i>	Mugil cephalus	+	15	<i>V. alginolyticus</i>	<i>Epinephelus aeneus</i>	-
2	<i>V. harveyi</i>	Mugil cephalus	+	16	<i>V. harveyi</i>	<i>Oreochromis</i> sp.	+
3	<i>V. alfacensis</i>	Mugil cephalus	-	17	<i>V. alginolyticus</i>	Mugil cephalus	+
4	<i>V. harveyi</i>	<i>Sparus aurata</i>	-	18	<i>V. harveyi</i>	<i>Sparus aurata</i>	+
5	<i>V. alfacensis</i>	<i>Sparus aurata</i>	+	19	<i>V. harveyi</i>	Mugil cephalus	+
6	<i>V. vulnificus</i>	<i>Sparus aurata</i>	?	20	<i>V. harveyi</i>	Mugil cephalus	+
7	<i>V. scophthalmi</i>	Mugil cephalus Eggs	?	21	<i>V. alfacensis</i>	<i>Sparus aurata</i>	-?
8	<i>V. crassostreae</i>	<i>Thunnus thynnus</i> Eggs	-	22	<i>V. fortis</i>	Water (Hatchery)	+
9	<i>V. parahaemolyticus</i>	Rotifers	+	23	<i>V. rotiferianus</i>	Mugil cephalus	+
10	<i>V. communis</i>	<i>Sparus aurata</i>	+	24	<i>V. ponticus</i>	<i>Sparus aurata</i>	+
11	<i>V. ponticus</i>	<i>Sparus aurata</i>	+	25	<i>V. cumnunis</i>	<i>Epinephelus aeneus</i>	+
12	<i>V. Pelagius</i>	<i>Sparus aurata</i> Larva	+	26	<i>V. harveyi</i>	<i>Sparus aurata</i>	+
13	<i>V. proteolyticus</i>	Water (Quarantine)	-	27	<i>V. natriegens</i>	<i>Euplotes</i>	+
14	<i>V. fischeri</i>	Water (Rotifers)	-	28	<i>V. vulnificu</i>	<i>Scarus</i> sp.	?

בחירת *Vibrio oewnsii* כמערכת מודל - בסה"כ סרקנו במהלך שנת המחקר הראשונה 28 זני ויבריו פתוגניים במטרה למצוא בקטריופאגיים כנגדם. המספר הגדול ביותר של בקטריופאגיים נמצא כנגד תבדיד NCM25, אשר זוהה במקור על סמך הגן ל-16s rRNA כ-*V. communis*, אחד ממיני המטרה שהגדרנו בתחילת המחקר. תבדיד זה היה יחיד עבורו הצלחנו למצוא בקטריופאגיים משכבת הריר של דגי דניס ובהמשך אף נמצא כבעל וירולנטיות גבוהה כנגד *Artemia salina*. על סמך מכלול תוצאות אלה נבחר תבדיד זה כזן המודל בו התרכזו מרבית מאמצי המחקר. בשנת המחקר השנייה ביצענו אפיון מולקולרי נוסף של תבדיד זה, כולל ריצוף הגנום שלו, אשר הביא להגדרתו מחדש כ-*V. oewnsii* (Cano-Gomez et al 2010; Chimetto et al 2011; Urbanczyk et al 2013). מין זה ידוע כפתוגן אלים של סרטנים ואורגניזמים נוספים בסביבות חקלאות מים, חלקם בעלי עמידות רחבה לאנטיביוטיקה, לדוגמא (Liu et al 2017; Nishiki et al 2018; Amalina et al 2019; Liang et al 2020). לאור חשיבותו של מין זה הן בחקלאות העולמית והן כפתוגן של דגיג בורי במלח"י הוחלט להמשיך ולהתמקד בו כמערכת מודל.

טבלה 2. הבדלים בטווח מאכסן בין בקטריופאג'ים שונים כנגד NCM25

	V. oewnsii	V. harveyi	V. harveyi	V. rotiferianus	V. oewnsii
	NCM 25	NCM 2	NCM 16	NCM 23	NCM 10
NAF-N 1	+	+	+	+	+
NAF-N 2	+	+	+	+	+
NAF-N 3	+	+	+	+	+
NAU-N 1	+	+	+	+	+
NAU-N 2	+	+	+	+	+
NAU-D 3	+	+	+	+	+
MBF-N 3	+	+	+	+	+
EE 1	+	+	+	+	-
EE 2	+	+	+	+	-
EE 3	+	+	+	+	-
NAF-D 2	+	+	+	+	-
MBF-N 2	+	+	+	+	-
NAF-D 1	+	+	+	-	-
NAF-D 3	+	+	+	-	-
NAU-N 3	+	+	+	-	-
NAU-D 1	+	+	+	-	-
NAU-D 2	+	+	+	-	-
MBF-N 1	+	+	+	-	-
MBF-D 1	+	+	+	-	-
MBF-D 2	+	+	+	-	-
MBF-D 3	+	+	+	-	-
MBU-D 1	+	+	+	-	-
MBU-D 2	+	+	+	-	-
MBU-D 3	+	+	+	-	-

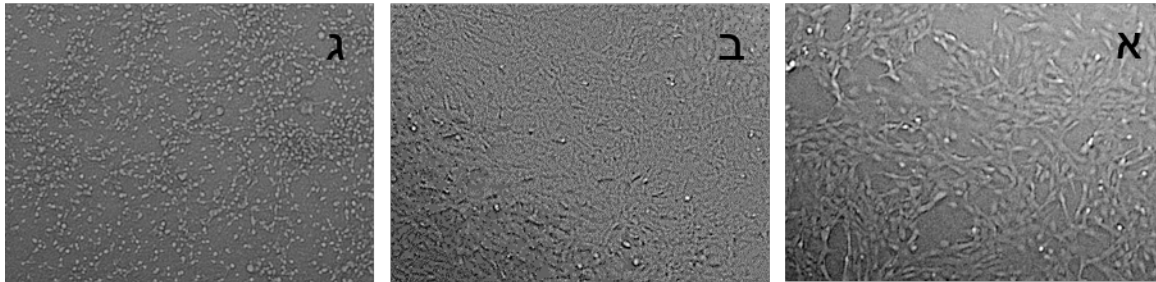
בידוד בקטריופאגיים בעלי פעילות כנגד *V. oewnsii* -

בהתבסס על תוצאות שנת המחקר הראשונה, ובפרט תופעה שדווחה של התפתחות מהירה של זנים עמידים של תבדיד NCM25 לבקטריופאגיים שבודדו כנגדו, התמקדו מאמצי בידוד הבקטריופאגיים במהלך שנת המחקר השנייה במציאת בקטריופאגיים נוספים, הן כנגד תבדיד זה והן כנגד זנים עמידים שבודדו. עקב קשיים טכניים ולוגיסטיים, מרבית מאמץ הדיגום, הן בים תיכון והן בים האדום ובמתקני מלח"י התבצע בחודשים נובמבר 19-פברואר 20. בסה"כ במהלך תקופה זו בודדו כ-20 בקטריופאגיים נוספים הפעילים כנגד זן האב, אך לא נמצאה פעילות שלהם כנגד הזנים העמידים.

אפיון פעילות הבקטריופאגיים כנגד 19 תבדידים מאוסף הויבריו של NCM הראה כי כלל הבקטריופאגיים היו פעילים כנגד NCM25 שעליו בודדו וכן שני תבדידים נוספים, NCM16 ו-NCM2, המזוהים כ-*V. harveyi*. עבור חלק מהבקטריופאגיים נמצאה פעילות גם כנגד תבדידים NCM23 ו-NCM10 המזוהים כ-*V. rotiferianus* ו-*V. oewnsii*, בהתאמה (טבלה 2).

אפיון בקטריופאגיים משכבת הריר של דגי דניס - השערה מרכזית בהצעת המחקר היתה כי שכבת ריר הדג של דגי הדניס תאופיין באוכלוסייה ייחודית של בקטריופאגיים בעלי אפיניות גבוהה ל-mucins, רב-סוכרים המרכיבים שכבה זו. השערה זו התבססה על מספר מאמרים שפורסמו בשנים שקדמו להצעת המחקר (Barr et al. 2013; Carda-Diequez 2015). למרות מספר דיגומים של ריר מדגי דניס במתקני מלח"י, כולל בתקופות בהן נמצאו בקטריופאגיים במי מערכת הגידול, נמצאה רק דגימת ריר אחת שהכילה בקטריופאגיים כנגד תבדיד NCM25, כאשר כנגד שאר התבדידים שנסקרו לא נמצאו כלל בקטריופאגיים בשכבת הריר. אפיון פעילות וטווח המאכסן של בקטריופאג'ים זה לא מצא הבדל בינו לבין בקטריופאגיים שבודדו מדגימת מים שנלקחה ממיכל הגידול. לאור זאת החלטנו לוותר על הניסויים שהוצעו לבדיקת זיקה של בקטריופאגיים משכבת הריר ל-Mucins.

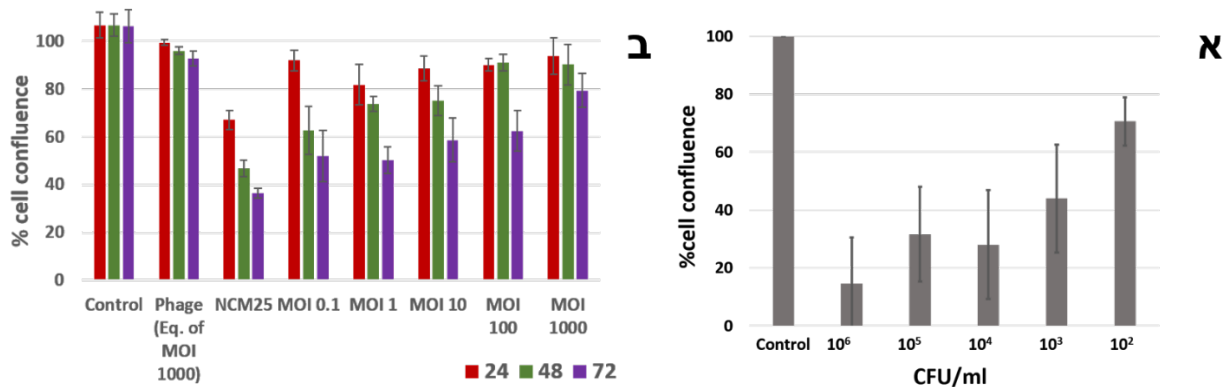
מערכת מודל להדבקה מבוססת תרביות תאים – במהלך שנת המחקר הראשונה העמדה מערכת תרבית תאי דניס (*Sparus aurata*) ובוצעו ניסויים ראשוניים בשימוש במערכת תרבית התאים כמודל *in-vitro* להדבקה בחיידקי ויבריו. איור 1 מראה השפעה ברורה של חיידקי *V. owensii* על שרידות תרבית התאים לאחר 24 שעות. ניתן לראות כי בעוד שצפיפות התאים בבארית הביקורת (ב) עולה ביחס לזמן '0' (א), הוספת החיידקים מביאה לקריסת התרבית המתבטאת בהתכדררות התאים וניתוקם ממצע הגידול (ג).



איור 1: השפעת *V. owensii* על תרבית תאי דניס. א. תרבית תאים בזמן '0' ללא הוספת הפתוגן. ב. תרבית תאים לאחר הדגרה של 24 שעות ללא הוספת הפתוגן. ג. תרבית תאים לאחר הדגרה של 24 בתוספת 10^2 תאי *V. communis*. ריכוז המלח במצע 7.5 ppt אשר הודגם בניסוי קודם כי הינו אידיאלי לתאים אך מעכב במקצת גידול הפתוגן. ניתן לראות ניתוק והתאים מן המשטח והתכדררות בהשפעת הפתוגן המצביע על עקה.

במהלך שנת המחקר השנייה בוצעה אופטימיזציה נוספת של מערכת תרבית התאים וכיילנו מערכת לאנליזת תמונה לכימות שרידות התאים, המבוססת כשטח המכוסה בתאים צמודי מצע. בעזרת מערכת זו ביצענו סדרה של ניסויים להגדרת ריכוז הפתוגן המביא לירידה של 50% בשרידות התאים לאחר 24 שעות (LD50). תוצאות הניסויים הצביעו על 10^3 CFU/ml כערך LD50 עבור תבדוד NCM25 (איור 2א).

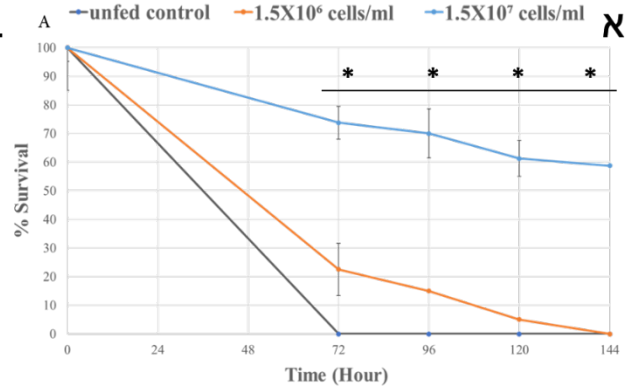
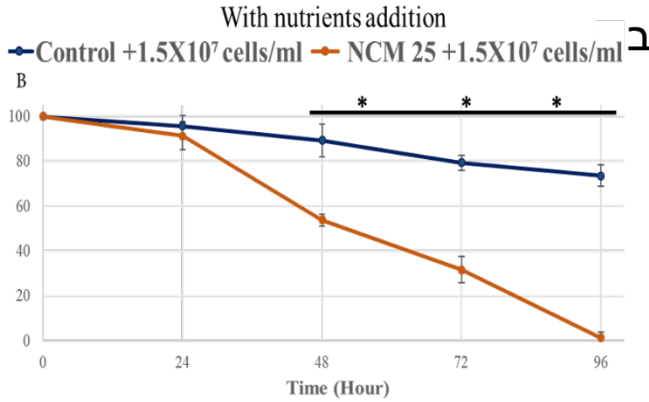
על סמך תוצאות אלה ביצענו סדרת ניסויים על מנת לבדוק את היכולת של בקטריופאגים שבודדו כנגד תבדוד NCM25 לעכב את הדבקה התאים במערכת. איור 2ב' מציג תוצאה מייצגת מניסוי כזה, כאשר % כיסוי התאים נבדק לאורך 72 שעות לאחר ההדבקה. כלל הטיפולים הביאו לירידה משמעותית בכיסוי התאים ביחס לביקורת הלא מטופלת (two-tailed *t*-Test, $P < 0.01$).



איור 2: קביעת LD50 של *V. owensii* כנגד תרבית תאי דניס ובדיקת השפעת בקטריופאגים. א. קביעת LD50. העמודות מייצגות אחוז כיסוי תאים 24 שעות לאחר הוספת ריכוז ידוע של תאי הפתוגן. הביקורת ללא טיפול. קווי השגיאה מייצגים standard deviation עבור 3 חזרות לכל טיפול. ניתן לראות כי אחוז הכיסוי לאחר 24 שעות תלוי בריכוז החיידקים ההתחלתי שהוסף לבארית. על סמך מספר חזרות על ניסוי זה הוגדר ריכוז 10^3 CFU/ml כ-LD50 במערכת זו. **ב. השפעת בקטריופאגים כנגד *V. owensii* על שרידות תרבית תאי דניס.** העמודות מייצגות אחוז כיסוי תאים 24-72 שעות לאחר הוספת 10^3 CFU/ml של הפתוגן. הביקורת ללא טיפול. קווי השגיאה מייצגים standard deviation עבור 3 חזרות לכל טיפול. הוספה של בקטריופאגים בכל הריכוזים הביאה לשיפור מובהק סטטיסטית בשרידות התאים ביחס לפתוגן בלבד בכל נקודות הזמן שנבדקו (2-tailed t-Test, $p < 0.05$). ב-72 שעות שרידות התאים בטיפול MOI 1000 גבוהה משמעותית מטיפולים בריכוזים נמוכים יותר ($p < 0.024$).

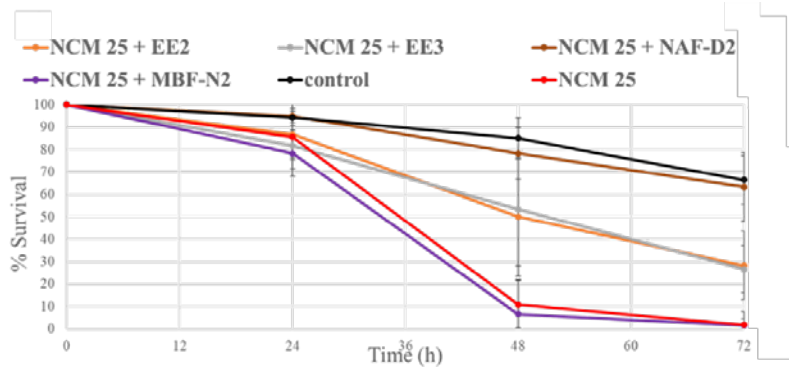
הוספה של הבקטריופאג בלבד, בריכוז של 10^6 PFU/ml, גרמה לירידה של כ-10% באחוז הכיסוי, ייתכן עקב אנומיים חוץ תאיים שהופרשו על ידי הפתוגן בזמן ייצור הבקטריופאגים. הוספת הפתוגן (10^3 CFU/ml) הביאה לירידה של למעלה מ-60% בכיסוי התאים לאורך 72 שעות. הוספה של הפתוגן ביחד עם ריכוזים שונים של הבקטריופאג (MOI 0.1-1000, שווה ערך ל- 10^2 - 10^6 PFU/ml) הביאה לשיפור של 15-42% בכיסוי התאים כתלות בריכוז הבקטריופאגים. לאחר 72 שעות, שרידות התאים הייתה גבוהה משמעותית עבור כל ריכוזי הבקטריופאגים בהשוואה לטיפול בפתוגן בלבד ($P < 4 \times 10^{-3}$), למעט עבור MOI 0.1 ($P = 0.037$). השרידות בתאים שטופלו ב-MOI 1000 הייתה גבוהה משמעותית בהשוואה לטיפול בריכוזים נמוכים יותר של בקטריופאגים ($P < 0.02$). השרידות בטיפול זה היתה נמוכה בכ-13% מן השרידות בהוספת בקטריופאג בלבד, אך במובהקות סטטיסטית נמוכה ($P = 0.05$). למרות תוצאות אלה, מערכת תרבית התאים נמצאה בעייתית לעבודה. המאמץ הנדרש להעמדת תרביות התאים לא איפשר ביצוע ניסויים רבים הנדרשים לאפיון פעילות כלל הבקטריופאגים באוסף. בנוסף הדירות תוצאות המערכת לא היתה משביעת רצון, בעיקר בשל יכולת הפתוגן להתרבות במהירות במדיום הגידול המשמש להחזקת התאים. מאחר וכל שינוי בתנאי הגידול, בפרט שינוי בערך ההגבה של המצע, פוגע בתאים הרגישים וגורם להתנתקותם מפני השטח, לא ניתן היה לקבוע בודאות שהפנוטיפ שהתקבל אכן נבע מהדבקה פתוגנית. לאור זאת, ולמרות התוצאות שהתקבלו מן המערכת ועלו בקנה אחד עם השערת המחקר, בחרנו שלא להסתמך עליה כמערכת מרכזית בפרויקט.

מערכת מודל להדבקה מבוססת *Artemia salina* – לאור העיכובים שהסתמנו בביסוס מערכת תרבית התאים בשנה א', וכן החששות ממהימנות התוצאות ממערכת זו כאמור לעיל, פותחה מערכת אלטרנטיבית מבוססת *A. salina*. ניסויים שערכנו במערכת זו בשנה א' הראו כי שרידות הארטמיות במי ים נקיים מוגבלת ועומדת על בין 0 ל-20% בלבד בתוך 72 שעות מתחילת הניסוי. שרידות זו מספקת על מנת להראות הדבקה פתוגנית על ידי ויבריו, אך מקשה על קבלת תוצאות מובהקות בבדיקת שרידות מעבר ל-48 שעות כפי שנדרש בעבודה עם בקטריופאגים. על מנת להתגבר על בעיה זו בוצע מאמץ מרוכז בתחילת שנת המחקר השנייה לפתח פרוטוקול הזנה של הארטמיות. על סמך ניסויים אלה נמצא כי תוספת של 10^7 תאי *E. coli* לבארית מעלה את שרידות הארטמיות לכ-70% ב-96 שעות וכ-60% ב-144 שעות (איור 3א'). השימוש בפרוטוקול זה מאפשר לעקוב אחר תוצאות הדבקה בוויבריו לאורך מספר ימים (איור 3ב'), ובכך פותח את הדרך לבדיקת יעילות בקטריופאגים בעיכוב ההדבקה לאורך זמן.



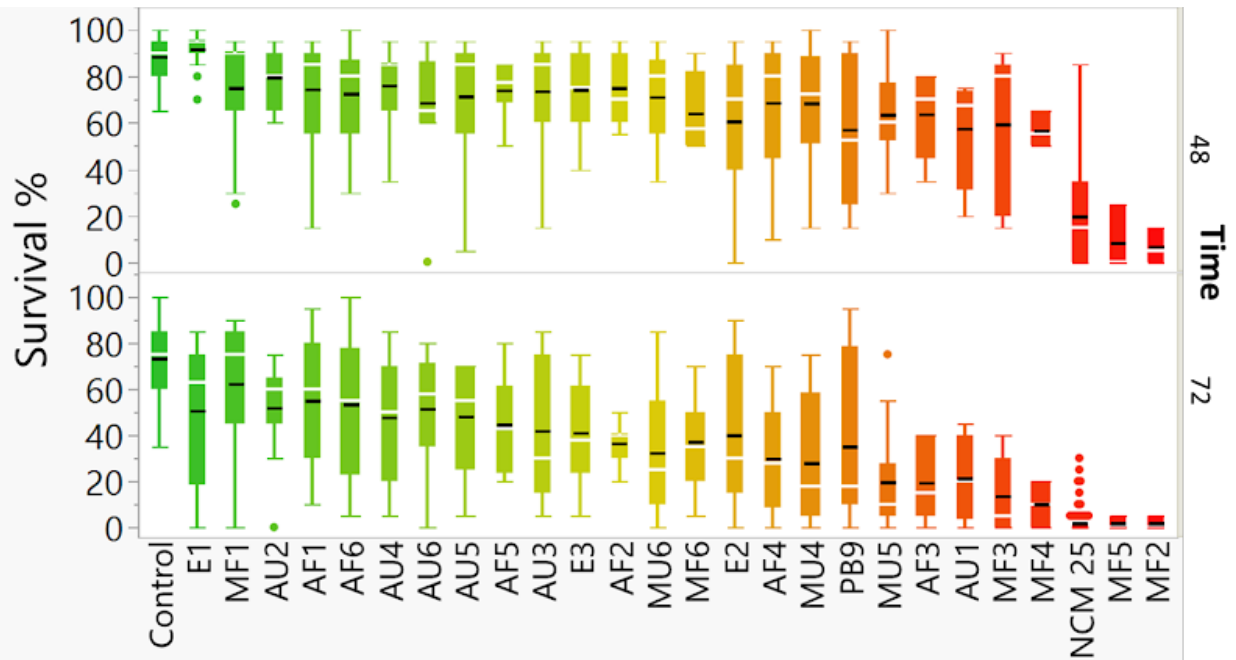
איור 3: השפעת האכלה על שרידות הארטמיות במערכת הניסוי. א. שרידות תרבית ארטמיות עם וכלי האכלה. ניתן לראות כי בניסוי זה השרידות בבאריות הביקורת (ללא האכלה) ב-72 שעות עמדה על 0%. הוספה של $E. coli 10^5$ למייל העלתה את השרידות בזמן זה ל-20%. הוספה של 10^7 תאים מומתים שיפרה את השרידות ב-72 שעות ל-למעלה מ-70%, ולכ-60% ב-144 שעות. קווי השגיאה מייצגים standard deviation עבור 3 חזרות לכל טיפול, מבחן t-test מצא הבדל מובהק ($P < 0.01$) בנקודות הזמן 72-144 שעות בין האכלה בריכוז חיידקים גבוה לריכוז חיידקים נמוך או ללא האכלה. **ב. הדבקה בחיידקי ויבריו NCM25 ביחד עם האכלה.** ניתן לראות הבדל מובהק בין הטיפולים כבר ב-48 שעות, כאשר ב-96 שעות הדבקה בחיידק הויבריו מביאה ל-0% שרידות לעומת כ-70% שרידות בהאכלה ללא הדבקה. קווי השגיאה מייצגים standard deviation עבור 3 חזרות לכל טיפול, מבחן t-test מצא הבדל מובהק ($P < 0.01$) בנקודות הזמן 48-72 שעות בין הדבקה לקבוצת הביקורת.

יעילות בקטריופאגים במניעת הדבקה במערכת ארטמיות - על סמך פרוטוקול ההזנה שפותח בוצעו מספר רב של בדיקות פעילות בקטריופאגים כנגד הדבקת ארטמיות על ידי *V. owensii*. איור 4 מציג תוצאות מייצגות המתקבלות מבדיקה זו. כלל ההדבקות בוצעו בהוספת 1000 תאי ויבריו לבארית בנפח מייל, כאשר הבקטריופאגים הוספו בריכוז של 10^5 PFU למייל, כלומר מכפיל הדבקה (MOI) של 100.



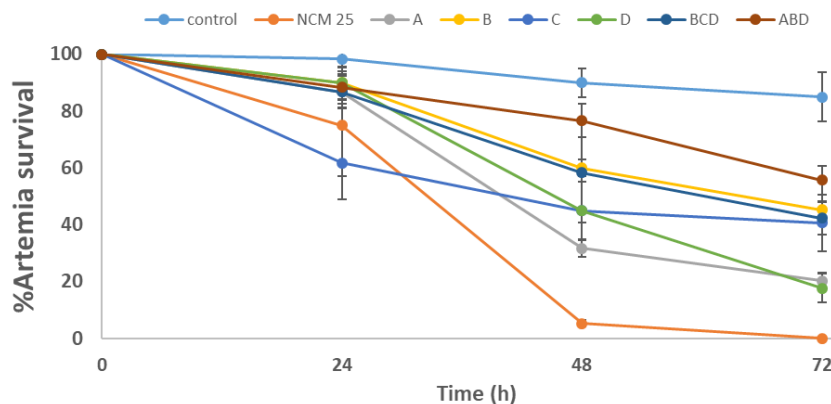
איור 4: דוגמה להשפעת בקטריופאגים שונים על הדבקה של ארטמיות בידי *V. owensii* הקיים השחור והאדום מייצגים ביקורת ללא הדבקה וביקורת עם הדבקה ללא פאגים, בהתאמה. קוי השגיאה מייצגים Standard deviation של 3-6 חזרות.

מאיור 4 ניתן לראות כי הבקטריופאגים שבודדו שונים זה מזה ביכולתם להגן על הארטמיות מפני הדבקה. על מנת להשוות את פעילות כלל הבקטריופאגים שנבחנו בוצע מספר גדול של ניסויי הגנה על פי מתאר דומה לזה שמוצג באיור 4. כל פאגי נבחן לפחות ב-3 ניסויים נפרדים, כאשר בכל ניסוי אותו הפאגי מוסף ל-3 או 4 באריות שונות. פאגים שנמצאו כבעלי פעילות גבוהה (כלומר שרידות גבוהה של הארטמיות) נבחנו בעוד 3 ניסויים לפחות על מנת לוודא את התוצאות. כלל תוצאות הניסויים עבור 25 פאגים שונים שנבחנו במהלך שנות המחקר השניה והשלישית מוצגו באיור 5. ההצגה בצורת Box and Whiskers מאפשרת השוואה כמותית של פעילות הפאגי לאורך 72 השעות הראשונות בהשוואה לקבוצת הביקורת החיובית והשלילית.



איור 5: פוטנציאל הגנה של 25 בקטריופאגים שונים כנגד הדבקה של בידי *V. owensii* התוצאות מייצגות שרידות ארטמיות בטיפולים השונים ב-48 ו-72 שעות (פאנל עליון ותחתון בהתאמה) לאחר הדבקה בויבריו. הביקורת השלילית (Control) הינה ממוצע של שרידות כלל באריות הביקורת בניסויים שנכללו באנליזה, ובדומה הביקורת החיובית (NCM25) מייצגת תוצאות כלל הבאריות אליהן הוסף NCM25 ללא פאג'. עבור כל פאג' מוצג ממוצע (קו שחור), חציון (קו לבן), ה"קופסא" מייצגת את שני הרבעונים המרכזיים וה"שפמות" את נקודות הקיצון. נקודות חורגות מוצגות כנקודה מחוץ לשפמות.

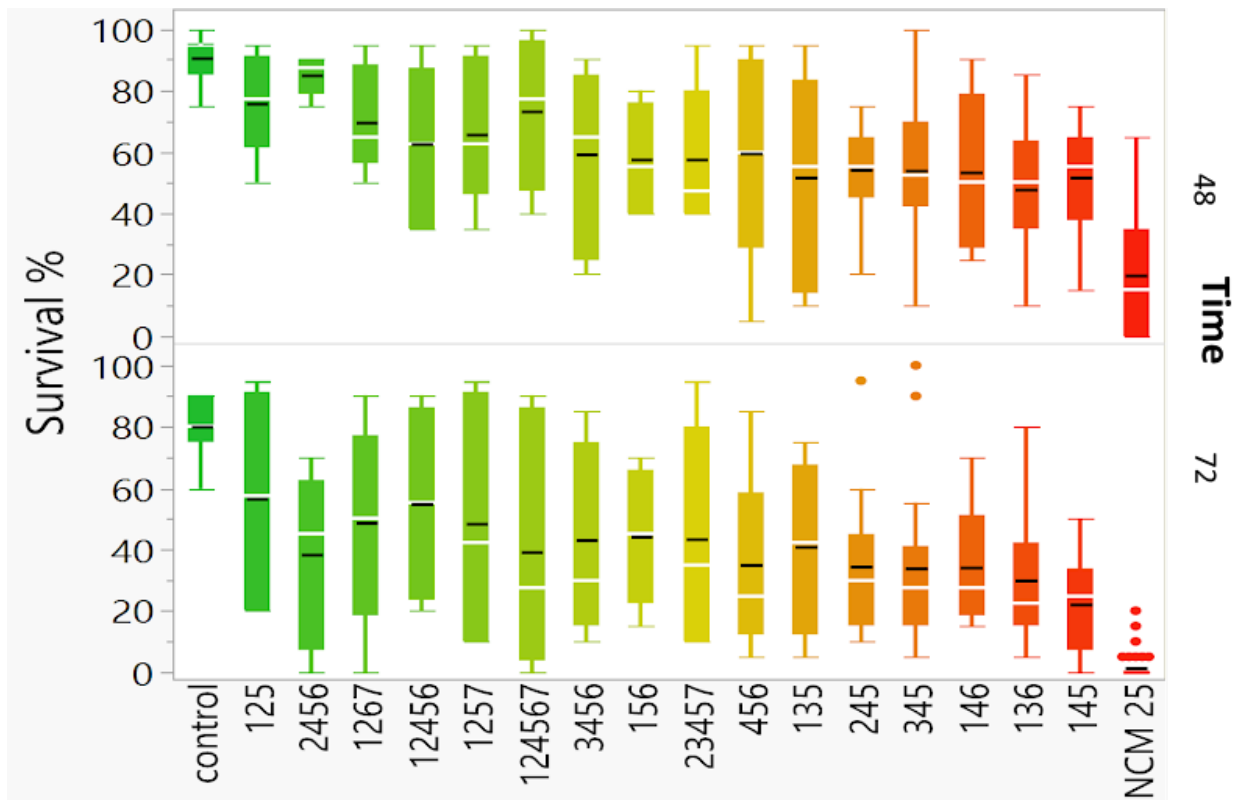
פעילות תערובות בקטריופאגים (קוקטיילים) כנגד חיידקי *V. owensii* בעיה מרכזית בטיפולים מבוססי פאגים היא היכולת של פתוגנים לפתח עמידות כנגד פאג' בזמן קצר. על מנת להתגבר על תופעה זו מקובל להשתמש בתערובות פאגים כך שהסיכוי לפתח עמידות כנגד כל הפאגים בו זמנית פוחת משמעותית. יחד עם זאת, לא כל "קוקטייל" כזה בהכרח משפר את יכולת ההגנה המתקבלת ועל כן נדרש לאפיין פעילות של קוקטיילים רבים. איור 6 מציג דוגמה לטיפול כזה תוך שימוש בתערובת של 4 פאגים שונים אשר נבחנו בהרכבים של שלושה פאגים בכל פעם. ניתן לראות כי פאג' B באיור זה נותן את ההגנה הטובה ביותר לאורך זמן. יחד עם זאת, בעוד שקוקטיל אחד שנבחן (ABD) נותן שיפור ברור בשרידות הארטמיות, עבור הקוקטייל השני המוצג (BCD) לא התקבל כל שיפור.



איור 6: שימוש בקוקטיילים של בקטריופאגים למניעת הדבקה של ארטמיות בידי *V. owensii* הקו הכחול העליון והקו הכתום התחתון מייצגים ארטמיות ללא הדבקה ועם הדבקה לא פאג', בהתאמה. מוצגות תוצאות מטיפולי ב-4 פאגים בודדים ושני שילובים של 3 מתוך הארבעה. שני הקוקטיילים שנבחנו נתנו הגנה שווה או טובה יותר מכל אחד מן הפאגים בנפרד.

כפי שדווח בדו"ח הביניים, במסגרת המחקר ניסינו לבנות מערכת in-vitro המאפשרת לסרוק מספר גדול של קוקטיילים דוגמת אלה שנבחנו באיור 6 ומנבאת תוצאות in-vivo. לצורך כך הועמדה מערכת ניסוי מבוססת פלטות 96 באריות הבוחנת את יכולת הפתוגן להתאושש לאחר הדבקה בפאג' (למעשה הסיכוי להתפתחות זנים עמידים) או בקוקטייל פאגיים. תוצאות ניסויים אלה הראו ירידה בתדירות ה"בריחה" של הפתוגן וכן דחיית הזמן עד להופעת העמידות (בפועל גידול של זנים עמידים מעבר לסף הדטקציה של המערכת). בשל קוצר מקום תוצאות ניסויים אלה לא מוצגות, בשלב זה לא ניתן לומר עד כמה מצליחה מערכת זו בניבוי הצלחת הטיפול ונדרשים ניסויים נוספים על מנת לבחון נקודה זו.

על סמך התוצאות המוצגות באיור 5 נבחרו 7 בקטריופאגיים שהראו פעילות הדירה ביותר כנגד NCM25 אשר נבחנו בהרכבים של בין שלושה לשישה פאגיים בכל פעם. תוצאות ניסויים אלה מוצגות באיור 7. כל קוקטייל נבחן בלפחות 3 ניסויים נפרדים בלפחות 3 באריות בכל ניסוי. ניתן לראות כי כלל הקוקטיילים שנבחנו נתנו הגנה מסוימת מפני הפתוגן בטווח זמן של 72 שעות אך אף אחד מן הקוקטיילים לא נותן הגנה מלאה. ככלל, רמות ההגנה הממוצעות שהתקבלו בסדרת ניסויים אלה נמוכות מאלו שהתקבלו מן הפאגיים הבודדים, אנו משערים כי הדבר נובע מהחלפת מנת ביצי הארטמיות בה נעשה שימוש. לאור זאת התייחסנו לתוצאות אלה כעומדות בפני עצמן וללא השוואה לתוצאות קודמות.



איור 7: פוטנציאל הגנה של קוקטיילים של בקטריופאגיים כנגד הדבקת ארטמיות בידי *V. owensii*. התוצאות מייצגות שרידות ארטמיות בטיפולים השונים ב-48 ו-72 שעות (פאנל עליון ותחתון בהתאמה) לאחר הדבקה בויבריו. הביקורת השלילית (Control) הינה ממוצע של שרידות כלל באריות הביקורת בניסויים שנכללו באנליזה, ובדומה הביקורת החיובית (NCM25) מייצגת תוצאות כלל הבאריות אליהן הוסף NCM25 ללא פאג'. עבור כל פאג' מוצג ממוצע (קו שחור), חציון (קו לבן). ה"קופסא" מייצגת את שני הרבעונים המרכזיים וה"שפמות" את נקודות הקיצון. נקודות חורגות מוצגות כנקודה מחוץ לשפמות.

ניסויי הדבקה והגנה בדגים

השלב האחרון במחקר התמקד בניסויי הגנה על דגי דניס בעזרת קוקטייל בקטריופאגיים שאופיין בניסויים במערכת הארטמיות.

קביעת LD50

בשלב ראשון נדרשנו לאפיין רגישות דגי דניס ל-NCM25 וקביעת ריכוז נדרש לתמותה של מחצית הדגים (LD50). בשל סיבות שונות ניסויים אלה הגיעו בשלב מאוחר של המחקר, לקראת סוף השנה שלישית, ונדרשה שנת הארכה להשלמתם. בוצעו 4 ניסויים לקביעת ריכוז אפקטיבי של הפתוגן אך ניסויים אלה לא נתנו תוצאות חד משמעיות. הסיבה המרכזית לכך היא פתוגניות נמוכה של *V. owensii* כנגד דגי דניס (וכן דגי לברק שנבחנו באחד הניסויים). סיבות נוספות שתרמו לחוסר ההזירות הינן חוסר היכולת לשמור על טמפרטורה קבועה במערכות הניסוי וכן בעיות באספקת מים למערכת הניסוי שגרמו לעיתים לעקה לא מתוכננת שבחלק מן המקרים הביאה לתמותות עודפות ללא קשר להדבקה בפתוגן.

לאור הפתוגניות הנמוכה שנמצאה במבחנים הקודמים בחנו הוספה של הפתוגן ביחד עם ארטמיות (המשמשות כמזון חי במערכות לגידול דגיגים) מתוך הנחה שהמעבר בארטמיה גורם להגברת האלימות של הפתוגן. סה"כ נעשה שימוש בניסוי זה (הרביעי במספר) ב-30 דגיגים דניס במשקל 16 עד 20 גרם. הדגיגים חולקו לקבוצות של 10 כאשר אחת שימשה כקבוצת ביקורת, השניה נחשפה לפתוגן בלבד (10^8 CFU/ml) והשלישית נחשפה לריכוז דומה של הפתוגן אשר הודגר לפני כן במשך שעה וחצי עם כ- 10^6 ארטמיות. הדגים עברו עקה של חשיפה לאוויר ושריטה בזנב בדומה לניסויים קודמים ולאחר מכן הועברו ל-6 אקווריומים של 10 ליטר (5 דגים באקווריום) שם הוחזקו במשך שבועיים. ניסוי זה אכן הביא לתמותה של כ-40% מן הדגיגים בטיפול המשלב ארטמיות יחד עם הפתוגן לעומת כ-20% תמותה בלבד בטיפול בריכוז דומה של הפתוגן ללא ארטמיות ושרידות מלאה של קבוצת הביקורת. יחד עם זאת הדירות התוצאות בין האקווריומים השונים היתה נמוכה, ייתכן עקב מספר הדגים הקטן. יחד עם זאת, לאור קוצר הזמן והירידה בטמפרטורת מי הים עם הכניסה לעונת החורף נאלצנו להסתפק בתוצאות ניסוי זה והמשכנו בניסויי הגנה בעזרת בקטריופאגיים כנגד הדבקה.

ניסוי הגנה על ידי קוקטייל בקטריופאגיים

ניסוי ההגנה העיקרי בוצע בחודש דצמבר 2021 וכלל 300 דגיגים דניס במשקל 5 גרם אשר חולקו באופן אקראי לחמש קבוצות טיפול ב-4 חזרות לטיפול (15 דגים/לחזרה באקווריום של 20 ליטר). דגים מקבוצת הביקורת, הוטבלו במי ים שטופלו ב UV. בטיפול השני הוטבלו דגים במי ים עם פאגיים בלבד (1×10^6). בטיפול השלישי הדגים נטבלו במי ים עם חיידקים (. דגים מהטיפול הרביעי נטבלו במי ים עם חיידקים (1×10^8 CFU/L-1) ופאגיים ביחד, ובטיפול החמישי נטבלו דגים גם במי ים עם חיידקים ופאגיים ביחד (כמו בטיפול הרביעי), אך נוספה מנה נוספת של פאגיים כ-24 שעות לאחר האילוח. כל הטיפולים הוכנו במי ים סטריליים מועשרים בארטמיה בריכוז 1×10^6 . הטיפולים בהם הדגים נחשפו לחיידקים החיידקים הוספו למים כשעתיים לפני תחילת הניסוי במינון של 1×10^8 CFU/L-1. במקרה של הטיפולים שבהם הדגים נחשפו גם לפאגיים, הפאגיים נוספו בריכוז של 1×10^6 לכל טיפול כשעה לפני הניסוי עצמו. כל טיפולי הפאגיים כללו קוקטייל של 5 פאגיים שונים (קבוצה 12456 באיור 7) בריכוז של כ- 10^9 PFU/ml.

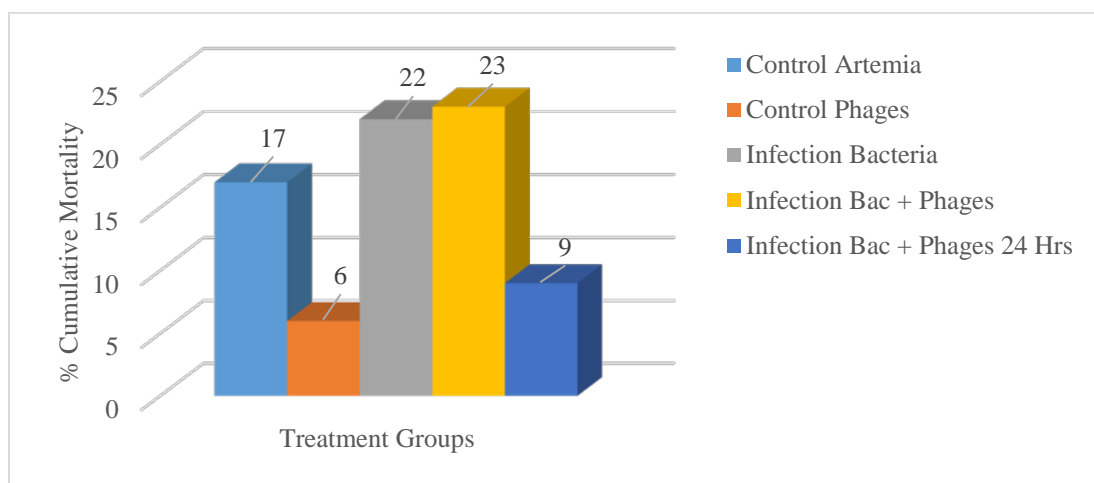
מהלך הניסוי: הדגים מקבוצות הטיפול השונות עברו עקה כפי שתואר בניסויים הקודמים הכולל שריטת הזנב ולכידה ברשת מחוץ למים למשך 3 דק'. לאחר העקה, דגים נטבלו בטיפול שלהם למשך 35 דקות ומיד לאחר מכן הועברו לאקווריום המתאים להם. טמפרטורת המים בכל אחד מהאקווריום נשמרה על 25 מעלות צלזיוס, וכ-10 החלפות מים ביום. דגימות מים נאספו לפני ושעה לאחר הוספת החיידקים לכל אחד מהאקווריום.

הניסוי עצמו נפגע עקב תקלה טכנית במערכת המים שגרמה לעצירה בתחלופת המים ולחוסר באוורור תקין בלילה הראשון לניסוי. עקה נוספת זו, בשילוב עם העקה לה נחשפו הדגים תוך האילוח וצפיפות הדגים הגבוהה יחסית הביאה לשיעורי תמותה גבוהים בכל הטיפולים במהלך 24 השעות הראשונות שלאחר ההדבקה עד כדי אבדן מלא של מספר אקווריומים, מה שהוריד מאוד את יכולת החישוב הסטטיסטי. בהתאם, אחוז התמותה המצטבר חושב על סמך הדגים

ששרדו מ- 48 שעות לאחר ההדבקה ועד 14 יום לאחריה (איור 8). התמותה בקבוצת הביקורת + ארטמיה (17%) עשויה להיות מוסברת על ידי זיהום חיידקי שנצפה בדגימות המים שנאספו בתחילת הניסוי (טבלה 3). במקרה של קבוצת הביקורת + פאגים, הייתה תמותה מצטברת של 6%, כך שניתן לפחות לשלול רעילות של תרחיף הפאגים כלפי הדגים. קבוצות הביקורת + החיידקים והקבוצה המאוגרת בחיידקים ופאגים הציגו שיעורי תמותה דומים, 22 ו-23% בהתאמה. מנגד, הקבוצה שקיבלה שתי מנות פאגים בהפרש של 24 שעות לאחר ההדבקה הראתה ירידה חדה בשיעורי התמותה (9% בלבד). כאמור, לאור התמותות הגבוהות בתחילת הניסוי לא ניתן להסיק מסקנות ברורות מתוצאה זו ויש להתייחס אליה כאינדיקציה בלבד.

טבלה 3: ספירות ויבריו בטיפולים השונים בזמן '0' ושעה אחרי האילוח

Treatments	Time 0	Time 1
Control (Artemia)	$0,8 \times 10^4$	$0,4 \times 10^4$
Control (Phages)	$0,8 \times 10^4$	$0,4 \times 10^4$
Control (Bacteria)	$3,2 \times 10^6$	3×10^6
Infection (Bac + Phages)	$3,4 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$
Infection (Bac + Phages + Phages 24 hrs)	$3,8 \times 10^6$	$2,8 \times 10^6$



איור 8: ניסוי הגנה על ידי קוקטייל בקטריופאגים כנגד הדבקת דגיני דניס על ידי *V. owensii* לאור התמותות הגבוהות עקב תקלה טכנית בתחילת הניסוי החוזק הסטטיסטי של התוצאות נמו מאוד, ועל כן לא מוצגים קווי שגיאה.

בדגים רבים ניתן היה להבחין בדלקות זנב בין היום השלישי ליום החמישי לאחר ההדבקה בכל הטיפולים, וגם כאן ניתן היה לראות פגיעה חמורה יותר בדגים שנחשפו לחיידקים בלבד (עד כדי אבדן גמור של הזנב) בהשוואה לדגים שקיבלו טיפול בפאגים. אנליזה בקטריולוגית של דגימות רקמה מדגים מתים/חולים הראה נוכחות של *V. owensii* ו-*Vibrio alginolyticus*, מה שעשוי להסביר כאמור את הפגיעה בדגים בקבוצות הביקורת.

לאור התוצאות הבלי מספקות של ניסוי 2 בוצעו 3 ניסיונות נוספים לקבל הדבקה הדירה בדגים על ידי NCM25 אך לא הצלחנו להגיע לתוצאות שמצדיקות את המאמץ והפגיעה בבעלי חיים הכרוכים בניסוי גדול נוסף. לאור זאת הוחלט לסיים את הפרויקט ללא תוצאות חד משמעיות מניסויי הדגים.

דיון

הפרויקט המוצג סבל ממספר בעיות ועיכובים משמעותיים, בין השאר עקב משבר הקורונה, שהשפיעו על התקדמות המחקר ותוצריו. יחד עם זאת ניתן להצביע על מספר הישגים שנבעו מן המחקר ואשר יהוו בסיס למחקרים עתידיים בתחום.

השערת מחקר מרכזית בהצעה המקורית היתה הימצאות אוכלוסיית בקטריופאגיים ייחודית בשכבת הריר של הדג. השערה זו מתבססת כאמור לעיל על מספר מחקרים קודמים בתחום המחקר (Barr et al. 2013; Carda-Diequez 2015). למרות מאמצים רבים שהושקעו בנושא זה במהלך השנתיים הראשונות למחקר לא הצלחנו לזהות אוכלוסייה כזו בריר דגים שנדגמו במלח"י. הסיבה לכך עשויה להיות חוסר התאמה של השיטות בהן השתמשנו לבידוד בקטריופאגיים מסביבה זו, או היעדר פאגיים בסביבת הריר בעלי פעילות כנגד הפתוגנים בהם השתמשנו. ייתכן כמובן שהשערת המחקר היתה מוטעית ביסודה, אך לתחושתנו בשלב זה לא ניתן לשלול אותה לחלוטין. יחד עם זאת, חוסר ההצלחה במשימה זו גררה איתה צורך לוותר על מספר משימות נוספות בשנות המחקר הבאות שהסתמכו על זיהוי אוכלוסיית בקטריופאגיים בשכבת הריר. לאור זאת ישנן מספר משימות ואבני דרך בהצעת המחקר המקורית שלא הושלמו (משימות 5 ו-7 בשנים ב' ו-ג', ואבני הדרך הרלוונטיות).

בעיה נוספת שעלתה במהלך המחקר היתה בשימוש בתרבית תאי דניס כמודל להדבקה בויבריו, והשימוש בו לאפיון פעילות בקטריופאגיים. מערכת כזו פעילה במלח"י בחקר וירוסים של דגים, וביצענו מספר רב של ניסויים להתאימה להדבקה בויבריו ולאפיון פעילות בקטריופאגיים שבודדו. יחד עם זאת התוצאות שהתקבלו מן המערכת לא היו מספקות ועל כן בחרנו שלא להמשיך בשימוש בה. שתי בעיות עיקריות במערכת היו הרגישות הגבוהה של התאים לשינוי בסביבת הגידול שהקשה על הפרדה בין הדבקה פעילה לפנוטיפים אחרים, וכן הקושי להפוך מבחן זה ל-high throughput על מנת לבצע את מספר הבדיקות הרב הנדרש לאפיון אוסף בקטריופאגיים כפי שנדרשנו לעשות במחקר הנוכחי. האלטרנטיבה למערכת זו היתה השימוש במערכת מבוססת ארטמיות, אשר לגביה יורחב בהמשך. בעיה שלישית, ואולי המרכזית ביותר, היתה חוסר ההצלחה במהלך שנת המחקר השלישית ותקופת ההארכה בהעמדת מערכת הדבקה בדגי דניס על מנת לבחון פעילות הבקטריופאגיים שבודדו במודל רלוונטי לחקלאות מים. בעיה זו נבעה בראש ובראשונה מהתמקדות בפתוגן אשר, בדעיכה, מסתבר כי אינו יעיל בהדבקה דג המודל שנבחן. אין ספק כי העמדת מערכת ההדבקה בשלב מוקדם יותר של המחקר היתה מצביעה על בעיה זו ומאפשרת הסטת מאמצי המחקר לפתוגן אחר. מערכת כזו לא הועמדה בשל מספר סיבות אשר לא כאן המקום לפרטן. יחד עם זאת מסקנה ברורה מנושא זה היא הצורך בהעמדת מערכת מודל כזו בשלב מוקדם ככל האפשר של המחקר (או במידת האפשר אף טרם התחלת המחקר), על מנת לוודא שניתן לבצע את הניסויים הנדרשים בתום המחקר.

למרות האמור לעיל, המרכז הניב מספר תוצאות חשובות. בראש ובראשונה יש בידינו כיום אוסף ייחודי של בקטריופאגיים פעילים כנגד תבדוד *V. owensii* ותבדודי ויבריו פתוגניים נוספים. אוסף זה יהווה משאב חשוב לכל מחקר עתידי בהקשר זה. למרות שהפתוגן שנבחר לא היה פעיל כנגד דגי דניס ולברק, יש ממצאים ממלח"י המראים כי הוא עשוי להיות פעיל כנגד דגי בורי. בנוסף, *V. owensii* ידוע כפתוגן חשוב במערכות לגידול שרימפס. מאחר ואין מערכת לגידול שרימפס במלח"י פתחנו במגע עם חברת פיברו-אקווה סמטרה לבחון פעילות הבקטריופאגיים שבודדו המערכת זו.

תוצאה חשובה נוספת של המחקר הינה העמדת מערכת ההדבקה בארטמיות. מערכת זו לא היתה חלק מהצעת המחקר המקורית, ופותחה לאור הבעיות שהתגלו במערכת מבוססת תרביות התאים. התוצאות שהתקבלו ממערכת זו מצדיקות לטעמנו את הבחירה בה. לאחר הליך האופטימיזציה, איפשרה לנו מערכת זו לבצע מספר רב של מבחני הדבקה והגנה אשר איפשרו את אפיון אוסף הבקטריופאגים, כבודדים וכקוקטיילים, באופן שלא ניתן היה לבצע בדרך אחרת. בפרט, השונות הגדולה שנמצאה ביכולת הבקטריופאגים השונים להגן על ארטמיות מפני הדבקה אפשרה לנו להתמקד באותם פתוגנים בעלי הפעילות הטובה ביותר במעבר לניסויים בדגים. לאור המשאבים המוגבלים הזמינים למחקרים מסוג זה אין היתכנות מעשית לבצע מספר רב כל כך של בדיקות בדגים, ועל כן היכולת לבצע אותן במערכת מודל *in-vivo*, בעלות נמוכה ובמספר רב של חסרות הינה משמעותית ביותר. כמובן שגם במערכת זו יש עוד מקום לשיפורים, בפרט הצורך בשיפור ההדירות במעבר בין מנות שונות של ביצי ארטמיות. ייתכן כי נושא זה קשור לשינויים במיקרוביום של הארטמיות המשפיע על רגישותן לחיידק ויבריו, ונושא זה ראוי להיחקר באופן נפרד. יחד עם זאת מערכת זו מהווה משאב מחקרי חשוב שפותח במסגרת מחקר זה וצפוי לשמש במחקרים רבים בעתיד.

ביבליוגרפיה:

- Amalina NZ, Santha S, Zulperi D, Amal MN, Yusof MT, Zamri-Saad M, Ina-Salwany MY. Prevalence, antimicrobial susceptibility and plasmid profiling of *Vibrio* spp. isolated from cultured groupers in Peninsular Malaysia. *BMC microbiology*. 2019 Dec 1;19(1):251.
- Bondad-Reantaso MG, Subasinghe RP, Arthur JR, Ogawa K, Chinabut S, Adlard R., Tan Z, Shariff M (2005) Disease and health management in Asian aquaculture. *Veterinary Parasitology* 132: 249-272.
- Bordenstein SR, Theis KR. Host Biology in Light of the Microbiome: Ten Principles of Holobionts and Hologenomes. *PLOS Biol* (2015) <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.1002226>
- Cabello FC (2006) Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture; a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology* 8: 1137-1144.
- Cano-Gomez A, Goulden EF, Owens L, Høj L. *Vibrio owensii* sp. nov., isolated from cultured crustaceans in Australia. *FEMS microbiology letters*. 2010 Jan 1;302(2):175-81.
- Carda-Diéguez, M., Mizuno, C.M., Ghai, R., Rodriguez-Valera, F. and Amaro, C., 2015. Replicating phages in the epidermal mucosa of the eel (*Anguilla anguilla*). *Frontiers in microbiology*, 6, p.3.
- Chimetto LA, Cleenwerck I, Alves Jr N, Silva BS, Brocchi M, Willems A, De Vos P, Thompson FL. *Vibrio communis* sp. nov., isolated from the marine animals *Mussismilia hispida*, *Phyllogorgia dilatata*, *Palythoa caribaeorum*, *Palythoa variabilis* and *Litopenaeus vannamei*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2011 Feb 1;61(2):362-8.
- d'Hérelle F. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentérique. *Acad Sci Paris*. (1917) 165:373
- Endersen L, O'Mahony J, Hill C, Ross RP, McAuliffe O, Coffey A. (2014) Phage Therapy in the Food Industry *Annu Rev Food* 5:327-349
- Gauthier DT (2015) Bacterial zoonoses of fishes: A review and appraisal of evidence for linkages between fish and human infections. *The Veterinary Journal* 203: 27–35
- Jacobs Slifka KM, Newton AE, Mahon BE. *Vibrio alginolyticus* infections in the USA, 1988-2012. *Epidemiol Infect* (2017) doi:10.1017/S0950268817000140

- Liang X, Zhou L, Yan S, Wang Y. Complete genome sequence analysis of the *Vibrio owensii* strain SH-14 isolated from shrimp with acute hepatopancreatic necrosis disease. *Archives of microbiology*. 2020 Feb 10:1-0.
- Liu L, Jiang L, Yu Y, Xia X, Pan Y, Yan S, Wang Y. Rapid diagnosis of *Vibrio owensii* responsible for shrimp acute hepatopancreatic necrosis disease with isothermal recombinase polymerase amplification assay. *Molecular and cellular probes*. 2017 Jun 1;33:4-7.
- Nishiki I, Minami T, Murakami A, Hoai TD, Fujiwara A. Multilocus sequence analysis of Vibrionaceae isolated from farmed amberjack and the development of a multiplex PCR assay for the detection of pathogenic species. *J Fish Dis*. (2018); doi:10.1111/jfd.12823
- Pruden A, Larsson DG, Amezcua A, Collignon P, Brandt KK, Graham DW, Lazorchak JM, Suzuki S, Silley P, Snape JR, Topp E, Zhang T, Zhu YG (2013) Management options for reducing the release of antibiotics and antibiotic resistance genes to the environment. *Environmental health perspectives* 121(8):878-85
doi:10.1289/ehp.1206446
- Rakers S, Gebert M, Uppalapati S, Meyer W, Maderson P, Sell AF, Kruse C Paus R (2010) 'Fish matters': the relevance of fish skin biology to investigative dermatology. *Experimental Dermatology* 19: 313–324
- Reverter M, Bontemps N, Lecchini D, Banaigs B, Sasal P (2014) Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives. *Aquaculture* 433: 50-61
- Romero Ormazábal JM, Feijóo CG, Navarrete Wallace PA (2012) Antibiotics in aquaculture-use, abuse and alternatives. In Carvalho ED, David JS, Silva RJ (Eds.) *Health and Environment in Aquaculture*. ISBN: 978-953-51-0497-1, InTech, pp. 159. Available from: <http://www.intechopen.com/books/health-and-environment-in-aquaculture/antibioticsin->
- Shapiro OH, Kushmaro A, Brenner A. Bacteriophage predation regulates microbial abundance and diversity in a full-scale bioreactor treating industrial wastewater. *The ISME journal* (2010) 4.3: 327-336.
- Stentiford GD, Sritunyaluksana K, Flegel TW, Williams BAP, Withyachumnarnkul B, et al. (2017) New Paradigms to Help Solve the Global Aquaculture Disease Crisis. *PLOS Pathogens* 13(2): e1006160.
- Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG (2001) Bacteriophage therapy. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 45(3):649-659
- Toranzo AE, Magarinos B, Romalde JL. A review of the main bacterial fish diseases in Mariculture systems. *Aquaculture* (2005) 246:37-61.
- Zhang Q, Dong X, Chen B, Zhang Y, Zu Y, Li W. Zebrafish as a useful model for zoonotic *Vibrio parahaemolyticus* pathogenicity in fish and human. *Develop Comp Immunol* (2016) 55:159-168.
- Urbanczyk H, Ogura Y, Hayashi T. Taxonomic revision of Harveyi clade bacteria (family Vibrionaceae) based on analysis of whole genome sequences. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2013 Jul 1;63(7):2742-51.