

דו"ח לתכנית מחקר מספר 20-03-0028

שנת המחקר: 3 מתוך 3 שנים

פיתוח גישה לבקרה ביולוגית של פתוגנים חיידקיים כאמצעי להפחתת שימוש באנטיביוטיקה בחקלאות מים מקיימת

Development of novel biocontrol-based approach of for reduction of antibiotic use in aquaculture

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

| | |
|--------------|--|
| אדי סיטרין | המכון לקרקע ומים, מנהל המחקר החקלאי |
| אור שפירא | המכון לאחסון איכות ובטיחות תוצרת חקלאית ומזון, מנהל המחקר החקלאי |
| עיינה בנט | תחנה לחקר המדגה בדור |
| ריטה סמירנוב | מעבדה לבריאות דגים בניר דוד |

אדי סיטרין, מנהל המחקר החקלאי, דרך המכבים 68, ראשון לציון. ת.ד. 15159 eddie@volcani.agri.gov.il

תוכן עניינים

| | |
|----|---|
| 2 | תקציר |
| 3 | מבוא |
| 4 | פירוט עיקרי הניסויים ותוצאות המחקר: |
| 4 | אפיון אוסף תבדידי <i>atypical Aeromonas salmonicida</i> |
| 7 | בידוד ובחינת יכולת אנטגוניסטית של תבדידים משכבת הריר כנגד AAS |
| 8 | אפיון המיקרוביום של ריר הדג, מי בריכת הדגים וכיבים נגועים ב-AAS |
| 10 | בניית אוסף בקטריופאג'ים התוקפים תבדידי <i>A. salmonicida</i> ואפיון טווח מאחסן. |
| 11 | אפיון ספיחת פאג'ים לריר |
| 11 | מערכות הדבקה: |
| 14 | דיון |
| 15 | ביבליוגרפיה |

הצהרת החוקר הראשי:

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא

31.08.21

תאריך:

חתימת החוקר

תקציר

ענף חקלאות המים בישראל נמצא היום בתחילתו של תהליך שמטרתו הקטנת טביעת הרגל הסביבתית, וזאת כחלק מהשאיפה למעבר לחקלאות מקיימת. אחד האתגרים העומדים בפניו הענף הינו מציאת חלופות לתכשירים אנטיביוטיים, וזאת לאור החשש כי שימוש יתר באנטיביוטיקה תורם להתפתחות עמידות לאנטיביוטיקה בחיידקים ולהפצתן בסביבה. החיידק *Aeromonas salmonicida* יוצר כיבים בדגי קרפיון וגורם נזק לענף הדייג בארץ, ובמשקים רבים יש שימוש טיפולי ואף טיפול מניעתי רחב באנטיביוטיקה כדי למגר את התופעה. מטרת העל של מחקר זו הייתה לפתח גישה לבקרה ביולוגית המשלבת חיידקים פרוביוטים ובקטריופאגים להפחתת עומס ורמת התחלואה מחיידקי *A. salmonicida* בדגי קרפיון כתחליף לטיפול אנטיביוטי. כדי לעמוד במטרה זו, ביצענו סדרת ניסויים מקיפים אשר שילבה שימוש בשיטות בידוד קלאסיות, גנטיות, גנומיות וביואינפורמטיות חדישות. ראשית כל, אפיינו ביוכימית וגנומית תבדידי *A. salmonicida* אשר בודדו בעשור האחרון במעבדה למחלות דגים בניר דוד. תבדידים אלה התחלקו לשתי קבוצות בעלות דמיון רב. על מנת להבין את הקשר בין הרכב קהילת החיידקים בריר הדג (המיקרוביום) לתחלואה ב- *A. salmonicida*, עקבנו במשך שנה שלמה אחר שינויים במיקרוביום בריר דגי קרפיון, במים של בריכת הדגים ובכיבים הנגועים ב- *A. salmonicida* (בעזרת amplicon sequencing של רצפי גן ה-16S rRNA). מצאנו שהמיקרוביום של הריר מושפע באופן משמעותי מהחיידקים במים ושיש נוכחות קבוע אך נמוכה של חיידקי *A. salmonicida* בריר גם בדגים בריאים. בודדנו מגוון רחב של בקטריופאגים בעלי פעילות אנטיגוניסטית כנגד שתי קבוצות ה- *A. salmonicida* שהוגדרו. כמו כן, בודדנו מגוון רחב של חיידקים משכבת הריר של דגי קרפיון, אך לא נמצאו תבדידים בעלי פעילות אנטיגוניסטית משמעותית כנגד *A. salmonicida* בניסויי *in-vitro* ולכן הוחלט להתמקד בבקטריופאגים ולזנוח את הטיפול הפרוביוטי. פיתחנו מערכת בריכות להדבקת קרפיונים ב- *A. salmonicida*, ואף ביצענו ניסוי מוצלח עם תערובת בקטריופאגים אשר הפחיתה את רמת הנגיעות בדגים חיים. המחקר הביא לתובנות רבות וחשובות על האקולוגיה והאפידימיולוגיה של *A. salmonicida* במערכות מדגה, ולאוסף פעיל של בקטריופאגים שיכולים להוות בסיס לתכשיר ביולוגי אפקטיבי נגד *A. salmonicida* בעתיד. העובדה שחיידקי *A. salmonicida* הגורמים לכיבים בקרפיונים בארץ מאוד שמורים גנטית, הקל על מציאת אוסף בקטריופאגים פעילים ומגדיל את הסיכוי שתכשיר כזה יהיה יעיל לאורך זמן. העובדה שחיידקי *A. salmonicida* שוכנים בריר במהלך השנה בדגים בריאים מצביע על כך שהפתוגן אופורטוניסטי וככל הנראה מתפרץ כתוצאה של עקת טמפרטורה בתחילה ובסוף החורף. כמו כן, האופי הסטויכסטי של המיקרוביום בריר הדג, מצביע על כך שהיא לא מכילה באופן משמעותי חיידקים "אנדמים" המונעים התיישבות של *A. salmonicida*. העובדה שהצלחנו להפחית את התחלואה בקרפיונים הנגועים ב- *A. salmonicida* ע"י טיפול בתערובות בקטריופאגים הינה פריצת דרך מדעית, אולם יש צורך בפיתוח פרוטוקול לניקוי ופיתוח פורמולציות יציבות של בקטריופאגים ובפרוטוקולי יישום *in-vivo* בעלי יעילות גבוהה יותר. אין ספק שהמשך המחקר בכיוון הזה יכול להביא לטיפול מקדים (פרופילקטי) לקראת התפתחות מצבי עקה (לדוגמה העברה בין בריכות) המבוסס על בקטריופאגים בעלי טווח מאחסן רחב המכסה את כלל זני אס בסביבת הגידול ויכול להפחית את עומס הפתוגנים ובכך למנוע התפרצות המחלה.

מחלות הנגרמות כתוצאה מהתפרצות פתוגנים הינן אחד הגורמים העיקריים לפגיעה בכושר הייצור של מערכות חקלאות מים. אבדן תוצרת עולמי בתחום זה, בשל מחלות חיידקיות ואחרות, מוערך בלמעלה מ-6 מיליארד דולר בשנה, כאשר בענפים מסוימים הוא עשוי לעלות על 40% מכושר הייצור השנתי (Stentiford 2017). במקביל לעלייה באבדן כתוצאה מהתפרצות מחלות, ישנו צמצום מתמיד בכלים הנתונים בידי החקלאי על מנת להתמודד איתן. הדבר נכון במיוחד לגבי תכשירים אנטיביוטיים, וזאת לאור ההכרה בנזק הסביבתי המצטבר שנגרם על ידי שימוש בלתי מבוקר בהם, בפרט הקשר בין שימוש באנטיביוטיקה בחקלאות והעלייה הגלובאלית ברמת העמידות של חיידקים לאנטיביוטיקה, אשר פוגעת ביכולת למגר מחלות זיהומיות. במרבית המדינות המפותחות, לרבות בישראל, מוגבל הטיפול האנטיביוטי במדגה למספר מצומצם של תרכובות אנטיביוטיות (Serrano 2005). יחד עם זאת, שחרור תרכובות אנטיביוטיות למים יוצר לחץ סלקציה אשר מגביר את שיעור העמידות לאנטיביוטיקה בחיידקים הן במי הבריכה והן במיקרוביום הטבעי של הדג, ועשוי להשפיע גם על הרכב אוכלוסיית החיידקים במערכות מים טבעיות (נחלים, אגמים) אליהן נפלטים מי הבריכות (Done et al. 2015; Muziasari et al. 2014; Muziasari et al. 2016; Patil et al. 2016).

במסגרת תהליך שמטרתו הקטנת טביעת הרגל הסביבתית של חקלאות המים בישראל, נעשה מאמץ למציאת חלופות לחומרים כימיים ותרופות בעלי בעייתיות סביבתית. מעבר להשפעות הסביבתיות השליליות של שחרור אנטיביוטיקה לסביבה, והאתגרים התפעוליים והבריאותיים הנלווים, הפחתת השימוש באנטיביוטיקה תקדם את מיתוג המדגה הישראלי חקלאות ירוקה ומתקדמת. בפרט, האפשרות להציג דגים מגידול מקומי כנטולי אנטיביוטיקה, ועל כן בעלי יתרונות בריאותיים, עשויה להעניק להם יתרון שיווקי משמעותי על פני דגי יבוא.

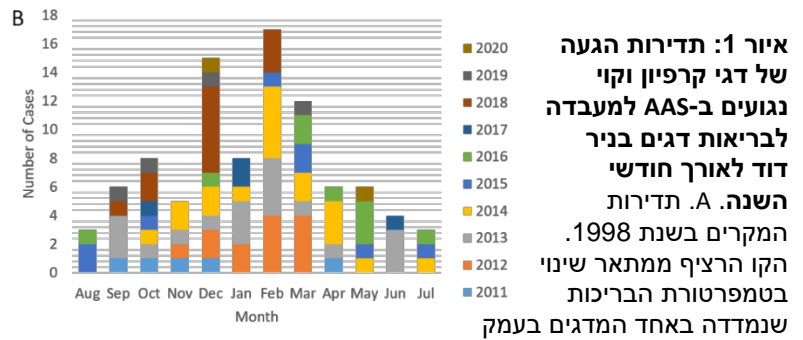
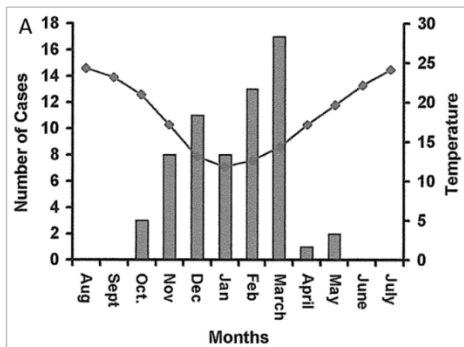
כיבי עור הנגרמים על ידי חיידקי *Aeromonas* הינם גורם מרכזי לאבדן תוצרת בדגים ממשפחת הקרפיונאים בישראל. בעולם ידועים חיידקים מסוג זה כפתוגנים של דגים ממינים נוספים כולל דגי איכות דוגמת פורל וסלמון (Menanteau-Ledouble et al. 2016), שפגיעתם רעה במיוחד במערכות מדגה אינטנסיביות (Igbinosa et al. 2012). בדגי נוי גורמים כיבים אלה לפגיעה אסתטית אשר עשויה לפסול את הדג לשיווק. התפרצות המחלה מתרחשת בדרך כלל במצבי עקה בשילוב עם ירידה בטמפרטורת המים ותנאי סניטציה ירודים. הסיכון גבוה במיוחד במצבים של עלייה בצפיפות בזמן שינוע או מיון הדגים, אשר במהלכם נגרמים פגעים בעור המהווים אתר התיישבות והדבקה פוטנציאלי עבור הפתוגן. השערת המחקר העיקרית הינה כי בקרה ביולוגית (biological control) שתיושם באופן פרופילקטי במקביל לחשיפת הדגים לתנאי עקה עשויה לשמש אלטרנטיבה לשימוש באנטיביוטיקה. כיום הולכת ומתבססת הבנה כי תפקוד האורגניזם תלוי ביחסי גומלין מורכבים עם אוכלוסיות מיקרואורגניזמים המאכלסות אזורים שונים בגופו (Zilber-Rosenberg and Rosenberg 2008). מחקרים רבים אפיינו את אוכלוסיות החיידקים בדגים שונים, וחשפו בין השאר אכלוסיה מגוונת המאכלסת את שכבת הריר בדגים, אשר עשויה להוות שכבת הגנה כנגד פתוגנים אופורטוניסטיים (Lowrey et al. 2015). טיפול אנטיביוטי צפוי לפגוע באופן בלתי סלקטיבי באוכלוסייה זו ולהוריד את ריכוז החיידקים החיים בסביבת הריר, ולכן עשוי לחשוף את הדג לפתוגנים מזדמנים העמידים לאנטיביוטיקה שיאכלסו את הנישה שהתפנתה. ישנה השערה כי שכבת הריר בדגים ובעלי חיים נוספים מאוכלסת גם בבקטריופאגים אשר עשויים להוות מעין מערכת חיסון נוספת כנגד פתוגנים המתיישבים על פני השכבה הרירית (Barr et al. 2015, Carda-Diequez et al. 2015, Barr et al. 2013). העשרת מערכת זו על ידי טיפול מבוסס בבקטריופאגים צפוי לפגוע באופן סלקטיבי בפתוגנים ולהשאיר את שאר האוכלוסייה המיקרוביאלית כשכבת הגנה טבעית. מטרת המחקר הנוכחי הינה פיתוח גישה לבקרה ביולוגית כאלטרנטיבה לשימוש מניעתי באנטיביוטיקה כנגד פתוגנים מסוג *A. salmonicida* במדגה מים פנימיים. **מטרת העל של מחקר זו הייתה לפתח גישה לבקרה ביולוגית המשלבת חיידקים פרוביוטים ובקטריופאגים להפחתת עומס ורמת התחלואה מחיידקי *A. salmonicida* בדגי קרפיון כתחליף לטיפול אנטיביוטי.**

פירוט עיקרי הניסויים ותוצאות המחקר:

אפיון אוסף תבדידי *atypical Aeromonas salmonicida*

המחקר התבסס על אוסף של תבדידי *A. salmonicida* (AAS) atypical פתוגניים שבודדו בין השנים 2013-2018 מדגי קרפיון, קוי וקומט שהגיעו למעבדה לבריאות דגים בניר דוד עם פצעים אופייניים. כל התבדידים זוהו על ידי גידול חיידקים מסביבת הפצע על אגר המכיל את הפיגמנט coomassie brilliant blue. מבחן זה מתבסס על צביעת שכבה חלבונית ייחודית (A-Layer) המאפיינת זני *A. salmonicida* פתוגניים, המורכבת מיחידות של החלבון ההידרופובי (VapA) המופרש ע"י החיידק ועוטף את שטח הפנים החיצוני לממברנה בשכבה חלבונית אחידה (Gulla et al., 2016). לשכבה זו תפקיד חשוב בהיצמדות לרקמת הדג ובהתחמקות מתאי מערכת החיסון. בנוסף, אופייה ההידרופובי של שכבה זו גורם לאוטו-אגרגציה של החיידק בתרבית מימית, וכן לספיחה של הפיגמנט כאמור לעיל.

A. salmonicida הוא חיידק פתוגני, ועבודה שבוצעה בשנות ה-90 הראתה כי התפרצותו בקרפיונים בארץ מוגבלת לחודשים אוקטובר – מרץ, עם מקרים בודדים באפריל ומאי (איור A1). נתוני הבידוד עבור הזנים באוסף נייר דוד הראו כי פעילותו כיום עדיין מתרכזת בחודשי החורף, אך לאורך 10 שנים בהן נבנה האוסף התקבלו דגים במעבדה בכל חודשי השנה (איור B1). ממצא זה עשוי לרמז כי מאז שהוחדר לארץ עבר הפתוגן התאמה לסביבה החמה. יש לסייג ולומר כי הדיגום בעבודה המוקדמת בוצע לאורך שנה אחת בלבד, אך ראוי גם לציין כי מאחר ואין חובת דיווח על דגים נגועים הבידוד והתיעוד של מקרים בארץ לא בוצעו באופן שיטתי. גם כאשר מגיעים דגים נגועים למעבדה, אין לכך תיעוד באוסף אלא אם בוצע בהצלחה בידוד של הפתוגן. לאור זאת יש להניח כי המידע המובא כאן הינו חלקי, ונדרשת עבודה נוספת על מנת להבין את התמונה המלאה.



איור 1: תדירות הגעה של דגי קרפיון וקוי נגועים ב-AAS למעבדה לבריאות דגים בניר דוד לאורך חודשי השנה. A. תדירות המקרים בשנת 1998. הקו הרציף ממתאר שינוי בטמפרטורת הבריכות שנמדדה באחד המדגים בעמק

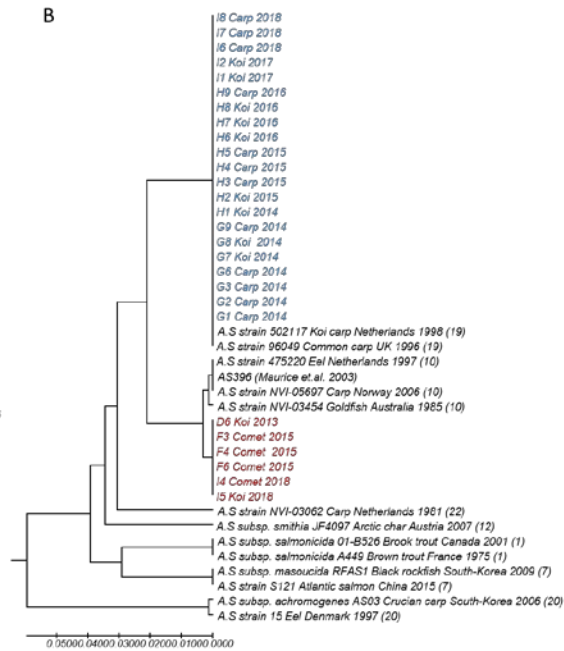
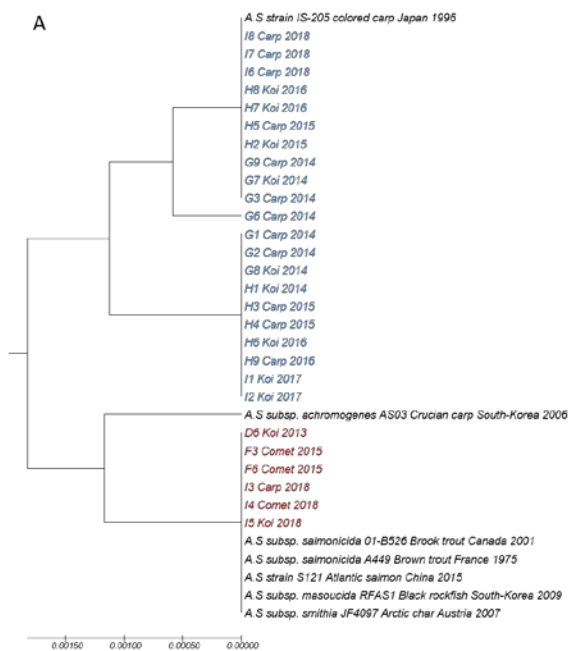
באותה השנה (מתוך עבודת דוקטורט של Dr. Sarah Maurice שהוגשה בפקולטה לחקלאות בשנת 2003). B. תבדידי AAS באוסף המעבדה בניר דוד, בחלוקה לחודש בו בוצע הבידוד ולשנת הבידוד (ראה קוד צבעים).

לצורך אפיון ראשוני של הזנים באוסף, והבנת המגוון הגנטי של AAS בסביבת בריכות הדגים בישראל, בוצע ריצוף של מספר גנים המשמשים לאפיון טקסונומי של חיידקים: *dnaJ*, *gyrB*, *rpoD* והגן המקודד ל-16S rRNA. עבור 27 תבדידים מן האוסף. המגוון הפילוגנטית בכל הגנים הייתה נמוכה מאוד, כאשר רצפי 16S התחלקו לשתי קבוצות עיקריות, קבוצה קטנה המכילה 6 תבדידים וקבוצה גדולה עם 21 התבדידים בודדים (איור A2). תוצאה זו הינה מפתיעה לאור העובדה שמדובר בזנים שבודדו לאורך מספר שנים, מסוגי דגים שונים וממשקים שונים בעמק יזרעאל ובאזור החוף, ומצביעה על מגוון גנטי נמוך באוכלוסיית הפתוגן. רצפי 16S שהתקבלו עבור הקבוצה הקטנה יותר היו זהים למספר רב של רצפי A. *salmonicida* מעבודות קודמות. לעומתם, עבור רצפים מן הקבוצה הגדולה נמצא רצף בודד בזהות של 100%, אשר הגיע מדגי קוי מהתפרצות ב-1995 ביפן (Kaku et al 1999). לצורך אפיון נוסף בוצע ריצוף של הגן המקודד לחלבון vapA, אשר שימש במחקרים קודמים לצורך אפיון של תבדידי *A. salmonicida* (Gula et al. 2017). תוצאות אנליזה זו הראו הפרדה ברורה יותר, אך תמכו בחלוקת האוסף לשתי קבוצות אשר חפפו לחלוטין את החלוקה שהתקבלה מרצפי 16S rRNA (איור 2B). רצפי vapA עבור הקבוצה הקטנה הראו דמיון רב לרצפים מעבודה קודמת שאפיינה מגוון חיידקי A. *salmonicida* על סמך גן זה והראתה קשר בינו לבין הדג המארח, כאשר רצפים מן הקבוצה הגדולה נמצאו זהים לרצפים מאותה עבודה. מעניין לציין כי שתי הקבוצות אפיינו הדבקה בדגי זהב ודגי קוי וקרפיון, בהתאמה. כפי שניתן לראות בטבלה 1, ישנה התאמה דומה בתבדידים בניר דוד, כאשר 4 מתוך 6 תבדידים בקבוצה הקטנה הגיעו מדגי זהב, בעוד שכל התבדידים בקבוצה הגדולה הגיעו מקרפיון או קוי. בהתאם קיבלה הקבוצה הקטנה את הזיהוי G (Goldfish), בעוד שהקבוצה הגדולה קיבלה את הזיהוי C (Carp). מעניין לראות כי רצף vapA מתבדיד AS96, שבודד בישראל בשנת 1996 מדג זה, מראה זהות של 100% לתבדידים מדגי זהב בעבודה קודמת, אך נבדל במעט מתבדידים באוסף הנוכחי.

| Isolate Name | Isolation Date | Fish Type | Isolation Site | Clade (vapA) | Genome | Isolate Name | Isolation Date | Fish Type | Isolation Site | Clade (vapA) | Genome |
|--------------|----------------|-----------|----------------|--------------|--------|--------------|----------------|-----------|----------------|--------------|--------|
| D6 | Nov 2013 | Koi | A | G | V | H5 | Oct 2015 | Carp | B | C | V |
| F3 | Mar 2015 | Goldfish | A | G | V | H6 | Mar 2016 | Koi | C | C | V |
| F6 | Aug 2015 | Goldfish | A | G | V | H7 | May 2016 | Koi | A | C | |
| G1 | Dec 2013 | Carp | B | C | | H8 | Aug 2016 | Koi | A | C | |
| G2 | Feb 2014 | Carp | B | C | | H9 | Dec 2016 | Carp | J | C | |
| G3 | Mar 2014 | Carp | E | C | V | I1 | Jan 2017 | Koi | C | C | V |
| G6 | Apr 2014 | Carp | E | C | | I2 | June 2017 | Koi | D | C | V |
| G7 | May 2014 | Koi | D | C | | I3 | Feb 2018 | Carp | F | G | |
| G8 | Oct 2014 | Koi | A | C | | I4 | Feb 2018 | Goldfish | A | G | V |
| G9 | Nov 2014 | Carp | A | C | | I5 | Feb 2018 | Koi | A | G | V |
| H1 | Dec 2014 | Koi | A | C | | I6 | Sept 2018 | Carp | J | C | |
| H2 | Feb 2015 | Koi | C | C | | I7 | Oct 2018 | Carp | F | C | |
| H3 | Mar 2015 | Carp | B | C | | I8 | Oct 2018 | Carp | J | C | |
| H4 | May 2015 | Carp | B | C | | | | | | | |

טבלה 1: תבדידים המיוצגים באנליזה הפילוגנטית, כולל חודש הבידוד, סוג הדג, חלוקה למשקים, הקלייד אליו משתייך וריצוף גנום מלא

מן התוצאות שהתקבלו מאנליזות אלה נראה כי אוכלוסיית הפתוגן בארץ הינה בעלת מגוון גנטי נמוך ביותר, ומורכבת משני קליידים בלבד, האחד נוטה להדביק דגי זהב בעוד השני "מתמחה" בקרפיון וקוי. כאמור, תוצאות אלה עולות בקנה אחד עם אנליזה קודמת (Gula et al 2017) שמראה זיקה בין רצפי vapA לבין דגים ספציפיים. התוצאות מתאימות גם לדיווחים קודמים על פיהם נגיעות ב-AAS הופיע בדגי זהב בתחילת שנות ה-80, אך נמצאה בקרפיון וקוי רק החל מ-1997.

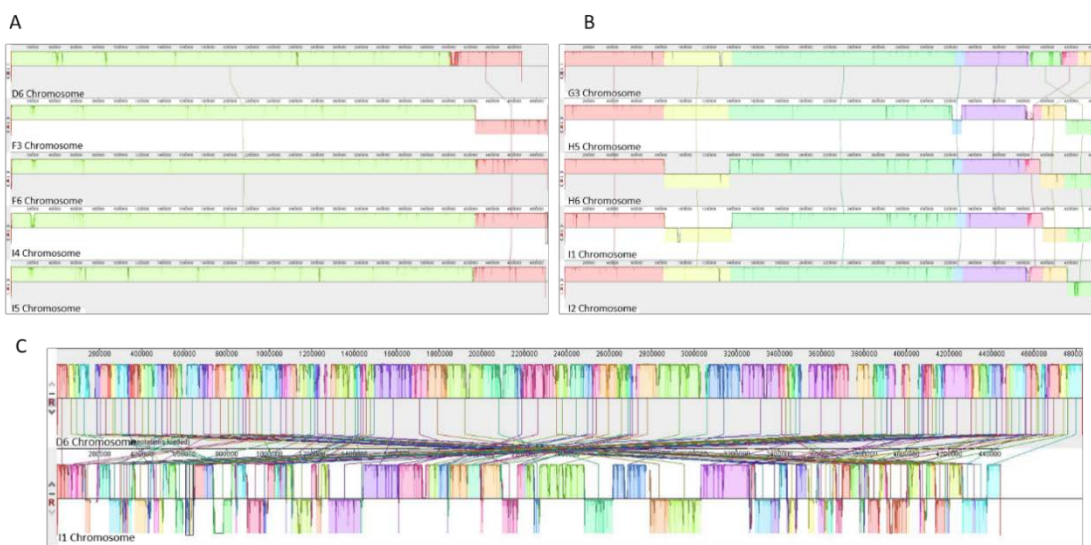


איור 2: פילוגנזה של 27 תבדידים מאוסף AAS מניר דוד על פי A. 16S rRNA ו-B. vapA. תבדידים מקבוצה G מופיעים באדום, תבדידים מקבוצה C בכחול, ותבדידים מעבודות קודמות בשחור.

נראה אם כן כי הפתוגן הגיע לארץ בשני אירועים נפרדים, ייתכן עם משלוחי דגים נגועים, כאשר הזן המדביק דגי זהב (קבוצה G) הגיע מוקדם יותר, בעוד הזן המדביק קרפיונים וקוי (קבוצה C) הגיע מאוחר יותר אך מיוצג בעודף באוסף ניר דוד עקב התפוצה הנרחבת יותר של גידול קרפיון, וייתכן עקב המשמעות הכלכלית של נגע זה בגידול קוי.

אפיון גנומי של תבדידים מייצגים מתוך האוסף. על מנת להבין לעומק את המגוון המצוי בתוך כל אחת מן הקבוצות, הוחלט לבצע ריצוף גנומי של 5 נציגים מכל קבוצה בשיטה היברידית, ששילבה ריצוף מקטעים ארוכים (Oxford Nanopore-) וקצרים (Minion) (Illumina MiSeq) על מנת לשפר את אמינות הרצף המתקבל. התקבלו 10 גנומים סגורים, באיכות גבוהה, כולל פלסמידים. יש לציין כי אלו הגנומים הראשונים של AAS מקבוצות G ו-C, ועל כן יש בהם עניין מעבר לפרויקט הנוכחי.

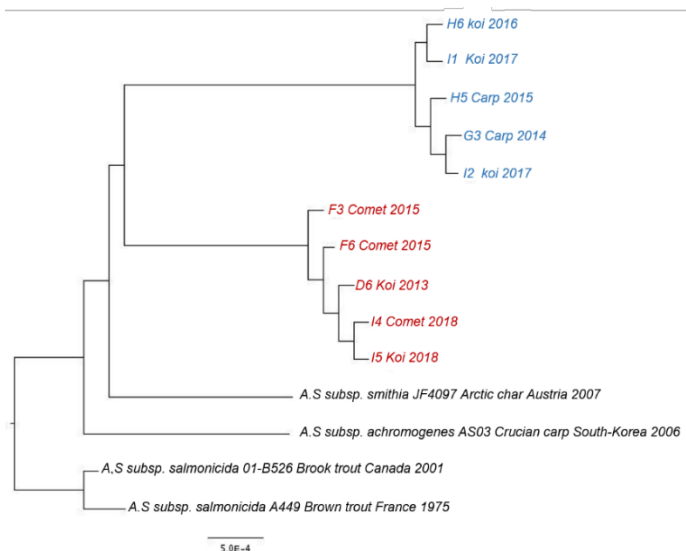
השוואת סינטניות, כלומר הסדר הפנימי, בתוך כל אחד מן הגנומים שהתקבלו העלתה תוצאה מפתיעה. הגנומים מכל אחת מן הקבוצות הראו שימור כמעט מושלם בסדר הגנים (Synteny), כאשר בקבוצה G זיהינו אירוע אחד בלבד של שינוי משמעותי בסידור הגנום (איור A3), בעוד בקבוצה C ניתן לזהות כ-4 אירועים כאלה (איור B3). השוואה בין גנומים משתי הקבוצות (איור C3) נותנת תמונה שונה בתכלית, כאשר ניתן לראות כי למרות שמספר רב של מקטעים שמור בין שני הגנומים, הסדר והכיווניות שלהם שונים לחלוטין. תוצאה זו מחזקת את המסקנה העולה מן האנליזה הפילוגנטית, המצביעה על שתי אוכלוסיות קולוניאליות שהתבססו בסביבת המדגה הישראלי ושומרות על יציבות מפתיעה בתוך סביבה זו. לתוצאה זו חשיבות רבה למטרת המחקר המרכזית, שהיא בקרה ביולוגית של פעילות הפתוגן. מאחר וטיפול ביולוגי, ובפרט טיפול מבוסס בקטריופאגים, מושפע מאוד מן הגנטיקה של פתוגן המטרה, המגוון הגנטי הנמוך באוכלוסיות AAS בארץ משמעותו כי בקטריופאגים או גורמים אחרים שימצעו כפעילים כנגד האוסף המעבדתי צפויים להיות יעילים במידה דומה כנגד כלל הפתוגנים בסביבה.



איור 3: סינטניות רצפים גנומיים של תבדידים מייצגים מאוסף ניר דוד. A. השוואה של 5 גנומים של תבדידים מקבוצה G. ניתן לראות כי הסינטניות (סדר הגנים בתוך הגנום) נשמרת באופן כמעט מושלם למעט היפוך של מקטע של כ-500 אלף בסיסים בתבדיד F3 וחוסר של כ-200 אלף בסיסים בגנום של תבדיד D6. B. השוואה של 5 גנומים מקבוצה C. גם כאן הסינטניות נשמרת בצורה טובה, אך ניתן לזהות כ-4 אירועים של היפוך/תזוזה של מקטעים באורך שבין 100 ו-600 אלף בסיסים לדוגמה מקטע תכלת ב-H5, מקטע צהוב ב-H6. C. השוואת רצפים מייצגים משתי הקבוצות. ניתן לראות כי מרבית המקטעים בקבוצה G מיוצגים בקבוצה C, אך יש אין שמירה של סינטניות בין הקבוצות ברמת הגנום. כל האנליזות בוצעות בתוכנת MAUVE.

עץ פילוגנטי המבוסס על רצפי כלל הגנים שזוהו בכל אחד מהכרומוזומים מראה קרבה בין התבדידים בתוך כל אחת מן הקבוצות, כאשר שתי הקבוצות מהוות ענף נפרד מגנומים של *A. salmonicida* שפורסמו בעבר ואשר מגיעים בעיקר מסלמונידים (איור 4). יחד עם זאת ניתן לראות הבדלים בין התבדידים השונים שעשויים לרמז על אבולוציה שעובר הפתוגן בסביבת המדגה בארץ. ההפרדה לכאורה של הרצפים המקומיים נובע כפי הנראה מחוסר ברצפים גנומיים של תבדידי AAS מקרפיונאים מאזורים נוספים בעולם, בין השאר בשל מיעוט יחסי של עבודות על נושא זה. הרצף היחיד שנצא מתבדיד שמקורו בקרפיון (AS03) שונה מהתבדידים שבידינו, וייתכן ששייך לקבוצה נוספת המדביקה קרפיונאים ואשר עד

כה לא מצאנו לה נציגים בישראל.



איור 4. אנליזה פילוגנטית המבוססת על רצפי חומצות אמינו של כלל הגנים שזוהו בעשרת הגנומים שרוצפו במסגרת המחקר. רצפים מקבוצה G מופיעים באדום, רצפים מקבוצה C מופיעים בכחול, רצפי ייחוס מופיעים בשחור. ניתן לראות כי שתי הקבוצות יוצרות ענפים נפרדים, אך קרובות זו לזו יותר מאשר לרצפי הייחוס שנמצאו.

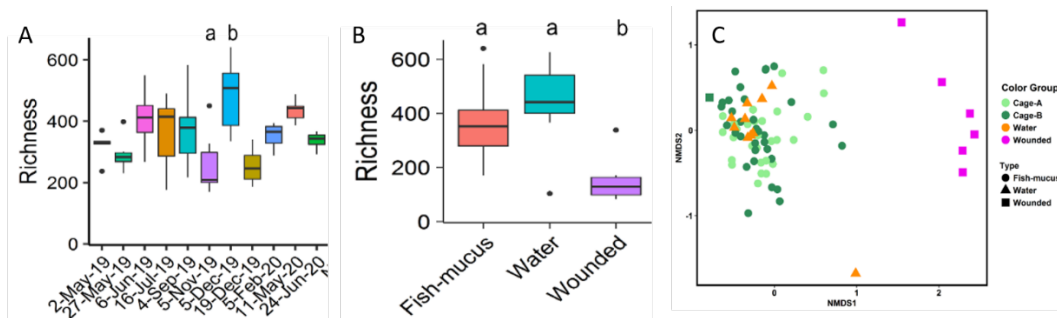
ישנם הבדלים רבים נוספים רמת תכולת הגנום בין שתי הקבוצות אשר טרם נחקרו עד תום, ובכל מקרה אין די מקום לפרטם במסגרת הדו"ח הנוכחי. ניתן לציין לדוגמה מספר גדול משמעותית של גנים הקשורים לייצור שוטון בקבוצה G לעומת קבוצה C, נתון מפתיע בהתחשב בכך ש *A. salmonicida* נחשב לחיידק לא מוטילי (אם כי ישנם דיווחים קודמים על יכולת ייצור שוטון אצל תבדידים מסוימים תחת תנאים שטרם הוגדרו בצורה ברורה). אין ספק כי יש עוד הרבה מה ללמוד על הפתוגנים הללו, והאבולוציה שלהם בסביבת המדגה בישראל, מתוך המידע שהתקבל מאנליזה זו ומתוך עבודה נוספת שעוד צריכה להעשות בעתיד.

בידוד ובחינת יכולת אנטגוניסטית של תבדידים משכבת הריר כנגד AAS

אחת ממטרות המחקר המרכזיות הייתה חקר המיקרוביום של ריר הדג ואיתור חיידקים מסביבה זו חיידקים בעלי פעילות אנטגוניסטית כנגד AAS, וזאת במטרה לפתח טיפול פרוביוטי עתידי כנגד AAS בקרפיונים. במסגרת מטרה זו ביצענו שתי משימות עיקריות, אפיון אוכלוסיות אופייניות לריר הדג והשינוי בהן לאורך השנה, ובידוד וסריקת פעילות של תבדידים, בניסיון לזהות חיידקים בעלי פעילות אנטגוניסטית כנגד תבדידי AAS. כפי שדווח בהרחבה בדו"ח שנה א', למרות מאמצים רבים שהושקעו בנושא בשנת המחקר הראשונה, כולל סריקה של עשרות תבדידים מריר הדג ומסביבות נוספות בבריכות הדגים, לא הצלחנו להראות פעילות אנטגוניסטית יציבה של מי מהתבדידים. חשוב לציין שהגידול האיטי של AAS ביחס לתבדידים שנבדקו, הקשה את השימוש במדדי אנטגוניזם *in-vitro* בצלחות פטרי המוכרים לחוקרים מעבודה עם מדברים ביולוגים כנגד מחלות צמחים, האריך את זמני הניסוי והקשה על ביצוע מספר רב של ניסויים. למרות מספר שיטות גידול שנבדקו, וכמות רבה של עבודה שהושקעה בניסיונות אלה, לא הצלחנו להדגים עיכוב משמעותי של הפתוגן, אם כמותית ואם איכותנית. תוצאה זו, יחד עם תוצאות המיקרוביום (ראו למטה) שהצביעו על כך שהרכב קהילת החיידקים בריר הדג סטוכסטית ותלוי ברובו מהרכב החיידקים במים באופן עונתי (כלומר אין עדות לכך שישנם חיידקים "אנדמים" בריר המגנים על אור הדג מפני פלישת פתוגנים), הובילו אותנו להזניח את נושא הפרוביוטיקה כפי שנכתב בדו"ח שינויים במחקר שהוגש בשנה שלישית. החלטה זו נבעה בעיקר בעקבות התוצאות הברורות והמבטיחות אשר הצביעו על פעילות אנטגוניסטית רבה של פרטים מאוסף הבקטריופאגים ולאור הדמיון הרב בתבדידי ה-AAS שבודדו מהקרפיונים לאורך השנים, המקל על מציאת ספריית פאגים יעילים כנגד AAS, כפי שמתואר בהמשך הדוח.

אפיון המיקרוביום של ריר הדג, מי בריכת הדגים וכיבים נגועים ב-AAS

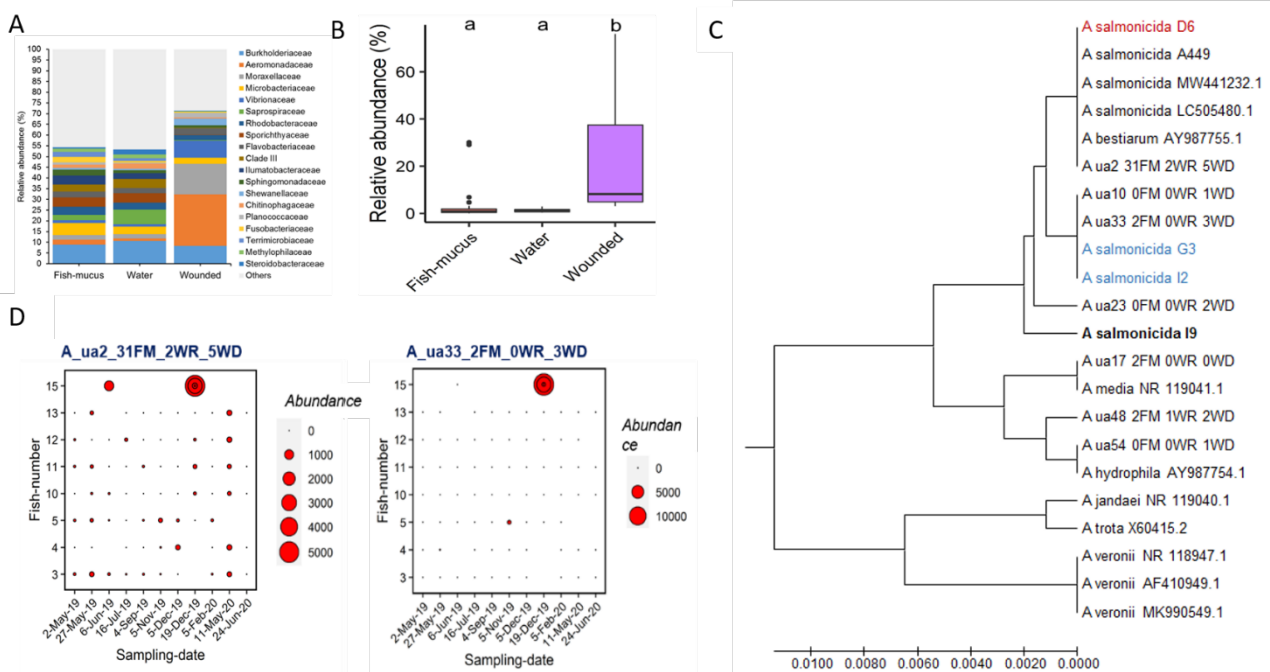
במטרה להבין לעומק את הדינמיקה של המיקרוביום של ריר הקרפיון כתלות בעונה, בפרט וברמת התחלואה בארומונס, ביצענו ניסוי מקיף בתחנה לחקר הדיג בדור, שבו הכנס סמן (צ'פ) ל-12 דגים המוחזקים ב-3 כלובי רשת עם ארבעה דגים בכל כלוב. דגמנו באמצעות מטוש ריר מששת הדגים, ב-11 זמנים במהלך 2019-2020 ואת המים מבריכת הדגים בו שכנו הכלובים (דוגמה 13) בכל אחד מהזמנים. ציפיו לראות התפתחות "טבעית" של כיבי AAS לאורך הניסוי, במיוחד בתקופת החורף, אולם למעט דג אחד שהראה סימנים מאוד קלים של נגיעות ביוני 2019, לא הופיעו כיבים בדגים. בדצמבר 2019 בבריכה שכנה דגמנו ריר מכיבים של שלושה דגים נגועים אשר נלקחו מבריכת דגים אחרת בה נצפתה התפרצות באותו הזמן, במטרה להבין את הרכב המיקרוביום בדג "חולה" ולזהות אוכלוסיות חיידקים ששכיחותם עולה יחד עם ה-AAS בהשוואה לריר מדג "בריא", או לחילופין אוכלוסיות אנטגוניסטיות ששכיחותן יורדת. דנ"א הופק מכלל הדגימות שנאספו. עבור שישה מן הדגים המסומנים, וכן עבור דגימות המים והדגים הנגועים, הוגבר האזור הוריאבילי של גן ה-16S rRNA בעזרת PCR, ורופצו תוצרי ה-PCR בשיטת ILLUMINA (Gupta et al., 2021). סה"כ התקבלו בשיטה זו כ-42000 מקטעים (reads) לדגימה אשר שימשו אותנו לאנליזה של האוכלוסייה המיקרוביאלית של ריר הדג. מצאנו הבדל מובהק במגוון המינים החיידקיים במים ובריר כתלות בזמן בחלק מהזמנים, ובמגוון של הקהילה החיידקית בריר בריא לעומת כיבים, אך להפתעתנו, לא מצאנו הבדל מובהק במגוון או בהרכב אוכלוסיית החיידקים במים לעומת הריר באותם המועדים (איור 5). בדגים הנגועים חיידקי אירומונס גורמת לדיסביוזה (dysbiosis) עם ירידה משמעותית במגוון החיידקים ועלייה במיני חיידקים המוכרים כפתוגנים של דגים כגון *Flavobacterium columnare*.



איור 5. מגוון מיקרוביאלי באוכלוסיי ריר הדגים שנדגמו. A. שינוי במגוון המינים (α -diversity) בריר הדגים כתלות בזמן מראה תנודתיות מסוימת בעיקר בחודשי החורף. **B.** השוואה בין המגוון המיקרוביאלי בריר, במים, ובדגים נגועים. ניתן לראות כי המגוון בדגים הנגועים נמוך משמעותית בדגים בריאים או במים. **C.** השוואה של מבנה הקהילה המיקרוביאלית (β -diversity) בריר הדגים לעומת דוגמאות המים והכיבים מראה הפרדה ברורה בין הדגים הנגועים לדגים הבריאים ולמים.

לאורך השנה היה דמיון רב בין המשפחות הדומיננטיות בריר לעומת המים (איור 6). בין היתר, בלטו ה-*Burkholderiaceae*, *Vibrionaceae*, *Moraxellaceae*, *Aeromonadaceae* ו-*Microbacteriaceae*. ממצא זה, יחד עם הדמיון הרב במגוון המינים בין המים והריר, מצביע על כך שהמיקרוביום של הריר ברובו נבנה מתהליכים סטוכסטיים (אקראיים) ותלוי בעיקר בהרכב המיקרוביום של עמודת המים אשר משתנה כתלות בטמפרטורה ואולי גם בפרמטרים עונתיים נוספים. אם זאת, זוהו כמה עשרות קבוצות ששכיחותן בריר הייתה גבוהה יותר באופן מובהק מאשר במים, ומספר משפחות ייחודיות לריר שלא זוהו כלל במים. ביניהם, חיידקים מסוג *Candidatus Gortzia* ו-*Candidatus Trichorickettsia* המוכרים כאנדוסימביונטים של ריסניות (paramecium), והמשפחות *Enterobacteriaceae* ו-*Enterococcaceae* השכיחים במעיים של בעלי חיים שונים. כצפוי, בדגים הנגועים נצפתה שכיחות גבוהה משמעותית של חיידקי *Aeromonas* ביחס לריר בדגים הלא נגועים ולמים (איור B6), אך גם שכיחות גבוהה יותר של *Flavobacterium columnare* (פתוגן של דגים), ומיני *Enterobacteriaceae* כגון *Serratia* ו-*Proteus*.

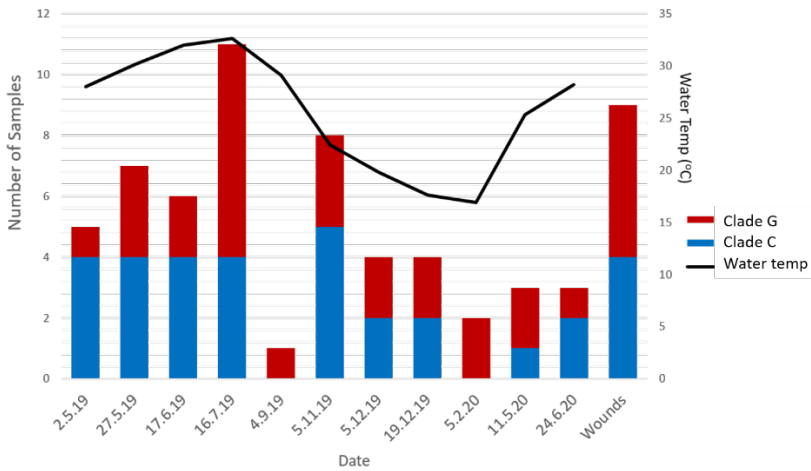
על ידי השוואה של רצפי אירומונס במיקרוביום לרצפי 16S rRNA של התבדידים באוסף ניר דוד הצלחנו לזהות רצפים שמגיעים בסבירות גבוהה מ-AAS, ואף לשייך אותם לקבוצה G או C (איור 6C). נוכחות זני ה-AAS עלתה באופן משמעותי כביב שנדגמו ביוני 2019 ובאלה שנדגמו מדגים חיצוניים. נמצא כי רצפים הקרובים ל-AAS מקבוצה G, המקושרת למחלה בדגי זהב, נמצאו בשכיחות נמוכה בריר של כל הדגים שנדגמו לאורך השנה (איור 6D), ובשכיחות גבוהה יותר בכיבים שנדגמו ביוני 2019 ובדגים הנגועים בדצמבר 2019. לעומתם, רצפים המשתייכים לקבוצה C נמצאו בנקודת זמן בודדת בדג אחד בלבד מן הדגים המסומנים, אך נמצאו בריכוז גבוה בדגים הנגועים שנדגמו מבריכה סמוכה. ממצא זה תומך בהשערה ש-AAS הינו פתוגן אופורטוניסטי אשר נוכח בריר באופן רציף אך הופך לאלים רק בתנאי עקה. האסוציאציה של רצפים הקרובים לקבוצה C בעיקר עם דגים נגועים מחזקת את ההשערה כי קבוצה זו היא הגורם העיקרי להתפרצות מחלה בקרפיונים וייתכן גם בקוי. העובדה כי במהלך השנה נמצאו בעיקר רצפים מקבוצה G עשויה להעיד כי קבוצה זו מהווה חלק מן המיקרוביום הטבעי של קרפיונים בארץ. העובדה כי הכיב שנצפה ביוני 2019 הראה עלייה בשכיחות של רצפים אלה מעידה כי בתנאים הנכונים גם הם עשויים לגרום למחלה, גם אם קלה יותר. בפרט, השכיחות הגבוהה של רצפים מקבוצה זו בדגים הנגועים שנדגמו עושיה להעיד כי זנים אלה מנצלים התפרצות הנגרמת על ידי פתוגנים מקבוצה C על מנת לנתרבות, ואולי אף תורמים להתפרצות המחלה, נושא אשר ראוי להיחקר בפרויקט המשך. ממצא מעניין נוסף, היה מציאת זנים ממשפחות ה-Thiobacillus ו-Desulfobacterium המעורבים בחיזור סולפט ובחמצון סולפיד, בהתאמה, המרמז על תנאים אנאירוביים בכיבי הדג.



איור 6. שכיחות יחסית של משפחות בולטות בריר הדגים, במים ובכיבים של דגים נגועים (למעלה משמאל). שכיחות יחסית של כלל משפחת האירומונס בריר הדגים, במים ובכיבים של דגים נגועים (למעלה מימין). שכיחות של רצפים המשתייכים לקבוצת ה-A. salmonicida בריר של דגים בודדים (3, 4, 5, 10, 11, 12) בעמודת המים (13) ובכיבים של דגים נגועים (15) - (למטה).

דגימות ה-DNA שהתקבלו נוצלו לאנליזה נוספת של נוכחות הגן *vapA*. על סמך רצפים שהתקבלו מתבדידים מאוסף ניר דוד פיתחנו שיטה מבוססת PCR המאפשרת להבחין בין שתי הקבוצות בעזרת פריימרים ספציפיים לאזור וריאבילי ברצף. בדיקה זו הינה רגישה יותר מריצוף המיקרוביום, ואפשרה לנו לזהות נוכחות של AAS גם בדגימות בהן לא נמצאו רצפי 16S הקרובים ל-*A. salmonicida* (איור 7). בשיטה זו נמצאו רצפים משתי הקבוצות במרבית הדגימות שנבדקו, אך גם כאן רצפים מקבוצה G היו יציבים יותר. מעניין לראות כי דגים רבים יותר נמצאו כנשאים של הפתוגן דווקא בעונות החמות. הממצאים מבדיקה זו

מחזקים עוד יותר את ההשערה כי AAS מהווה חלק מאוכלוסיית המיקרוביום בריר הדג, והמחלה נגרמת עקב תנאי עקה, ייתכן בשילוב על אינדוקציה של וירולנטיות של עקב שינוי בסביבת ריר הדג.



איור 7. בדיקת PCR לנוכחות רצפי vapA בדגים מניסוי בדור. אדום וכחול מייצגים את מספר הדגים בהם נמצאה הגברה של רצפים מקבוצה G ו-C בהתאמה. הקו השחור מתאר את השינוי בטמפרטורת המים לאורך תקופת הניסוי.

בניית אוסף בקטריופאג'ים התוקפים תבדידי *A. salmonicida* ואפיון טווח מאחסן.

בסה"כ במהלך הפרויקט בודדו למעלה ממאה בקטריופאג'ים כנגד תבדידי AAS מאוסף ניר דוד. מרביתם בודדו מדגימות מים מבריכות דגים בעמק ובאזור החוף, ומספר קטן הגיע מדגימות מי קולחים בשפד"ן ובצפון הארץ. בניגוד להנחת המחקר המקורית, לא הצלחנו בבידוד בקטריופאג'ים מריר קרפיונים שנאסף במהלך הפרויקט, כולל מדגים שנמצאו נגועים באירמונס. בקטריופאג'ים בודדו כנגד 4 תבדידים מקבוצה G ו-6 תבדידים מקבוצה C. יצוין כי עבור כל תבדיד בודדו בין 5 ל-15 פאג'ים מדגימות שונות. טווח הפעילות של כל הבקטריופאג'ים שבודדו היה רחב. מעבר להדבקה בתוך הקבוצה, שהיתה צפויה לאור הקלונליות הגבוהה שנמצאה בתוך כל אחת מן הקבוצות, נמצאה גם הדבקה רחבה בין הקבוצות. בקטריופאג'ים נגד תבדידים מקבוצה G הדביקו את מרבית התבדידים מקבוצה C, בעוד בקטריופאג'ים כנגד תבדידים מקבוצה C הדביקו גם תבדידים מקבוצה A אם כי ביעילות פחותה (טבלה 2). יחד עם זאת מספר תבדידים בקבוצה C הפגינו התנהגות שונה, כאשר תבדידים H5 ו-G6 נמצאו רגישים לפאג'ים שבודדו כנגד תבדידים אלה אך פחות רגישים כנגד פאג'ים מתבדידים שונים, בעוד שפאג'ים שבודדו כנגד תבדיד I1 נמצאו כבעלי יעילות גבוהה כנגד כלל התבדידים (למעט H5, G6), כולל תבדידים מקבוצה G. מאחר ושניים מתבדידים אלה (H5 ו-I1) נכללו באנליזה הגנומית במתוארת לעיל ניתן לומר בסבירות גבוהה כי הבדלים אלה לא מעידים על השתייכותם לענף נפרד. סביר אם כן כי אוכלוסיית הפתוגן בבריכות מתפתחת ומשתנה בתגובה ללחץ טריפה מצד הפאג'ים המצויים בסביבה זו. עם זאת, אנו יכולים לומר כי יש בידינו כיום בקטריופאג'ים פעילים כנגד כלל התבדידים באוסף ניר דוד.

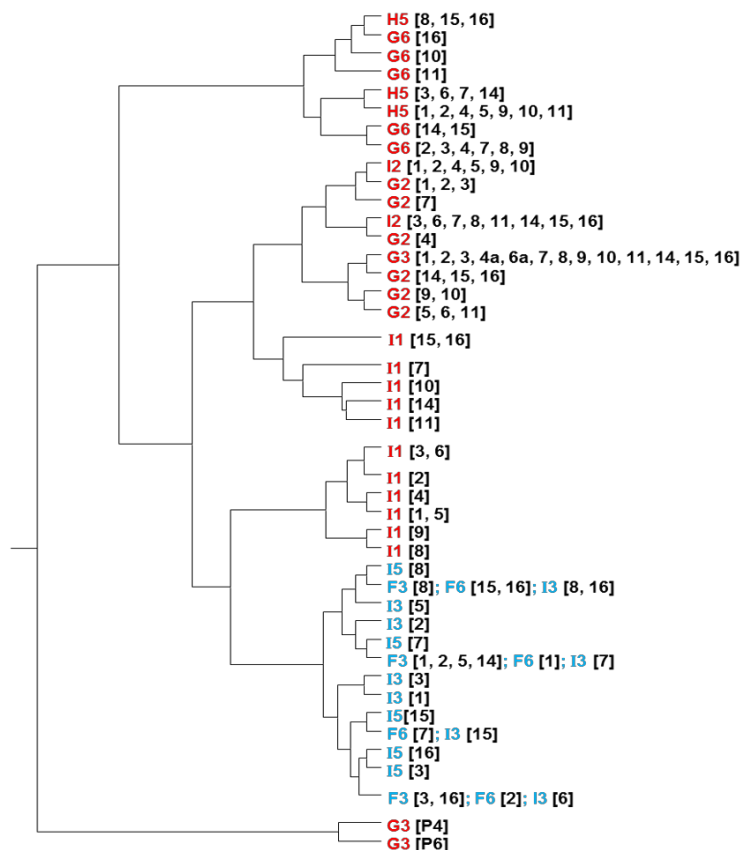
| Strains | Small Clade | | | | | Big Clade | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------|-------------|-----|-----|-----|-----|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | F3 | F4 | F6 | I3 | I4 | I5 | G2 | G3 | G5 | G6 | H2 | H4 | H5 | H6 | I1 | I2 | I6 | I7 | I8 | G1 | G7 | G8 | |
| F3 | ** | *** | ** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | - | *** | *** | - | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | ND | ND |
| F6 | ** | *** | ** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | * | *** | *** | * | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | ND | ND |
| I3 | ** | *** | ** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | * | *** | *** | * | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | ND | ND |
| I5 | ** | *** | * | ** | *** | *** | *** | *** | *** | * | *** | *** | * | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | ND | ND |
| G2 | - | * | * | ** | * | * | *** | *** | *** | - | *** | *** | - | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** |
| G3 | - | * | - | * | ** | * | *** | *** | *** | - | *** | *** | - | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | ND | ND |
| G6 | * | ** | * | ** | ** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** |
| H5 | * | ** | * | ** | * | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** |
| I1 | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | - | *** | *** | - | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** |
| I2 | * | ** | * | ** | * | *** | *** | *** | *** | - | *** | *** | - | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** |

*** Strong effect ** Moderate effect * Weak effect - No effect ND Not determined

טבלה 2: אפיון טווח מאחסן של בקטריופאג'ים שבודדו במהלך המחקר. כל שורה מייצגת מספר פאג'ים (לפחות 5) שבודדו ממקורות שונים כנגד מאחסן יחיד, כל משבצת מייצגת תוצאת בדיקה של כל הבקטריופאג'ים שבודדו כנגד מאחסן יחיד בהדבקה. ירוק – כל הפאג'ים נמצאו פעילים. כחול – חלק מן הפאג'ים פעילים. צהוב – חלק מן הפאג'ים הראו פעילות נמוכה. אדום – לא נמצאה פעילות. ND – לא נבדק.

כחלק מן המאמץ לאפיין את אוסף הבקטריופאגים שיצרנו פיתחנו שיטה פשוטה לתיאור הקרבה בין הפאגים השונים כפי שמתבטאת בטווח המאחסן שלהם (איור 7). שיטה זו אישרה את קיומן של לפחות 6 קבוצות פאגים שונות באוסף, מה שיאפשר בהמשך ליצור שילובים ביניהן עם טווח מאחסן רחב יותר. מאמץ נוסף בוצע לצורך אפיון גנומי של חלק מן הבקטריופאגים, אך עקב אילוצי זמן ותקציב שנוצרו בעקבות משבר הקורונה לא הספקנו להשלים חלק זה של העבודה, ואנו מקווים להשלימו במסגרת פרויקט המשך.

איור 8. פילוגנזה של הבקטריופאגים השונים שבודדו במהלך המחקר על סמך טווח המאחסן שלהם. ניתן לראות הפרדה ברורה בין בקטריופאגים של קבוצה G (כחול) ואלו של קבוצה C (אדום). בקטריופאגים שבודדו כנגד תבדידים H5, G6 יוצרים ענף שכם אך מופרד משאר תבדידי קבוצה C. בקטריופאגים שבודדו כנגד תבדיד 11, אף הוא מקבוצה C, יוצרים שתי קבוצות נפרדות, שאחת מהן קרובה יותר לפאגים כנגד קבוצה G. בנוסף ניתן לראות כי שניים מן הפאגים שבודדו כנגד תבדיד G3 יושבים על ענף נפרד.



אפיון ספיחת פאגים לריר

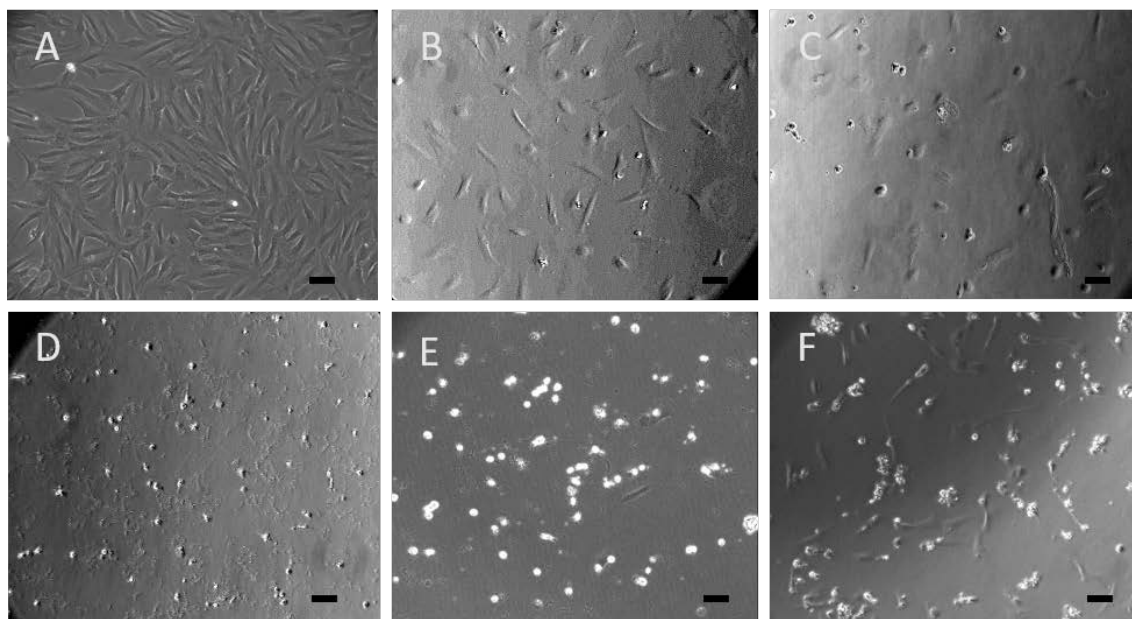
חלק זה בעבודה הוצע במקור על מנת לבדוק השערה כי פאגים שמקורם בריר יהיו בעלי אפיניות גבוהה יותר למטריצה זו מפאגים שמקורם במים, אך לאור זאת שלא הצלחנו עד כה לבודד פאגים מריר דגים לא ניתן היה לבחון השערה זו. נעשה ניסיון לבחון שאלה זו על אוסף הפאגים הקיימים במהלך שנת המחקר האחרונה, אך בשל עומס המשימות האחרות בפרויקט, ובשל בעיות אספקה של רכיב מרכזי בניסויים אלה, לא הושלמה משימה זו. ייתכן וניתן יהיה לבחון אותה בפרויקט עתידי.

מערכות הדבקה:

בהצעת המחקר המקורית תוכננו שתי מערכות הדבקה בהן תיבדק פעילות הבקטריופאגים שיבודדו. האחת מבוססת תרבויות תאים, והשנייה מבוססת על הדבקה בדגי קרפיון חיים במערכות ההסגר שבמעבדה לבריאות דגים בניר דוד. **תרבות תאים.** קו תאי אפיתל של דגי קרפיון, K-305, התקבל מחברת Kovax במהלך שנת המחקר הראשונה. התאים גודלו במדיום M-199 בתוספת אנטיביוטיקות מסוג פניצילין וסטרפטומיצין למניעת זיהומים, והוקפאו ב-80°C בתמיסת DMSO לשמירה לאורך זמן, וזאת בהתאם להוראות החברה. בניסוי הדבקה ראשוניים התקבלו תוצאות מבטיחות, כאשר אילוח תרבות תאים בחיידקי ארומונאס (10^5 תאים יוצרי מושבות (CFU) של תבדיד G3 למ"ל) גרם להיפרדות התאים משטח הפנים של כלי הגידול שלהם, ולתמותה נרחבת. ניסיונות מוקדמים להצלת התאים ע"י הוספת פאגים בעלי פעילות כנגד התבדיד שנבדק האטו את קצב תמותת התאים,

כך שלאחר 20 שעות ניסוי נצפתה שרידות מסוימת של התאים, לעומת 100% תמותה לאחר 10 שעות ניסוי ללא הפאג'ים. ניסוי זה בוצע זמן קצר לפני משבר הקורונה שהביא למעל 6 חודשי הפסקה בניסויים בתרביות התאים במהלכם בוצעה העברה חודשית של התאים במטרה לשמר אותם. לצערנו, כאשר ניסינו לחזור לניסויי הדבקה עם החזרה לעבודה סדירה נתקלנו בקושי בעבודה עם התאים וחזרה על תוצאות שהתקבלו בעבר (איור 9A,B), ייתכן עקב הזדקנות התאים אשר עברו יותר מדי מחזורי גידול והקפאה. בפרט, תרבית התאים נמצאה לא יציבה והתאים התנתקו מן המצע גם ללא כל טיפול נוסף (איור 9C). ניסויי הדבקה שבוצעו עם תרביות התאים נתנו תוצאות מעורבות, תוצאות מדגמיות מובאות באיור 9. הדבקה בחיידקי אירומונס (10^5 CFU/ml G3) הראתה אפקט ברור, ניתן לראות גידול של החיידקים במצע ותמותה כוללת של התאים (איור 8D), אך חשוב לציין כי החיידקים גדלו המצע הגידול גם ללא נוכחות תאים. הוספה של פאג'ים (כאן פאג' G3P4 ב-100 MOI) מנעה את גידול החיידקים אך עדיין התקבלה שרידות מועטה בלבד של תאים (איור 9E). גם הוספה של פאג' בלבד הביאה לירידה מסוימת בשרידות התאים (איור 9F). יחד עם זאת, לאור מצבה המדורדר של תרבית התאים וההדירות הנמוכה של התוצאות שהתקבלו, בעיקר עקב התמוטטות תכופה של תרבית התאים גם בקבוצת הביקורת, לא ניתן היה לקבל נתונים כמותיים מניסויים אלה.

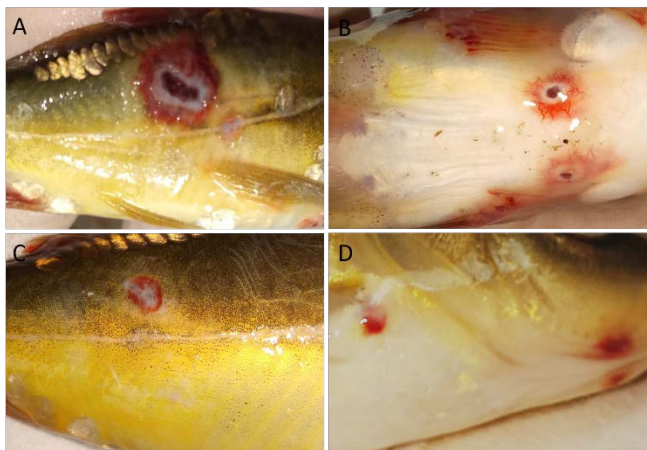
על סמך תוצאות הניסויים שבוצעו ניתן לומר כי יש היתכנות לפיתוח מערכת דומה במסגרת פרויקט עתידי, אך רגישות גבוהה של התאים לתנאים במדיום, ויכולת החיידקים לגדול במדיום הגידול גם ללא נוכחות תאים, מטילה ספק ביכולתה של מערכת כזו לחזות השפעה של טיפול מבוסס בקטריופאג'ים על דגים חיים.



איור 9. תוצאות מדגמיות מניסויי הדבקה בתרביות תאים. A. תמונה אופיינית של תרבית תאי אפיתל של דגי קרפיון, קו K-305, קבוצת ביקורת מניסוי שבוצע במהלך שנת המחקר השנייה לאחר כ-20 שעות הדגרה תחת המיקרוסקופ. ניתן לראות תאים ישובים בצפיפות גבוהה, עם

תאים מעטים שמתנתקים. **B.** תמונה מקבוצת ביקורת בתחילת ניסוי שבוצע בשנת המחקר השלישית, לאחר חזרה לשגרה בעקבות משבר הקורונה, הממחישה את הירידה ביציבות תרבית התאים. ניתן לראות צפיפות נמוכה משמעותית של תאים, תאים רבים מתנתקים. **C.** אותו השדה כמו ב-B לאחר כ-20 שעות של הדגרה במיקרוסקופ. ניכרת ירידה בצפיפות התאים ותאים רבים בתהליך הפירודות מהמצע. **D.** תמונה מייצגת הבראית שעברה הדבקה בחיידקי *G3 salmonicida*. לאחר 20 שעות הדגרה במיקרוסקופ. ניתן לראות גידול של חיידקים ותמותה כוללת של התאים. **E.** בארית שקיבלה בנוסף לחיידק G3 פאג'ים כנגד תבדיד זה (G3P4 ב-100 MOI). אין גידול חיידקים אך שרידות מועטה בלבד של תאים, ייתכן עקב מזהמים שהגיעו עם הבקטריופאג'ים או שהשתחררו מן החיידקים בעקבות הדבקה בפאג'. **F.** בארית שקיבלה תוספת פאג' בלבד בריכוז זהה לזה שב-E. ניכרת ירידה בחיות התאים. קנה המידה בכל התמונות 50 מיקרון.

מערכת לבחינת הדבקת דגי קרפיון בחיידקי *A. salmonicida* ופאג'ים בתנאים מבוקרים. ניסויי הדבקה מבוקרים בדגי קרפיון הועמדו במעבדה לבריאות דגים בשנת 2019 וכן במהלך שנת 2021 לאחר שיפוץ מקיף שעברה מערכת ההסגר בניר דוד. סה"כ בוצעו ארבעה ניסויי הדבקה כאשר בכל ניסוי אולחו קבוצות של 6-10 דגים במיכלי 100 ליטר. בשל מגבלות מקום (מספר מיכלים פנויים) ומספר הדגים שאושר לנו לשימוש בניסויים נאלצנו להסתפק בשתי חזרות לכל טיפול, מה שמוריד מן החוזק הסטטיסטי של התוצאות. בניסוי הראשון נבחן פרוטוקול הדבקה הכולל טלטול הדגים ברשת במשך 30 שניות או גרימת פצעים תת עוריים ע"י מחט ולאחר מכן אילוח בזן G3 (קבוצה C) בריכוז של 10^5 תאים (CFU) למ"ל. מתוצאות הניסויים עולה כי נדרשת עקה דוגמת טלטול בשילוב עם פציעות קלות (לדוגמה עקב חיכוך עם רשת) על מנת לאפשר התפרצות המחלה בתנאי הניסוי. בדגים שעברו טיפול כזה התקבלו 50-80% נגיעות, כאשר בביקורות ללא עקה או ללא חיידקים לא התקבלו כל פצעים על הדגים שנבדקו. על סמך ניסויים אלה תוכנן ובוצע ניסוי ראשון לבחינת יכולת בקטריופאג'ים שבודדו במחקר להגן על הדגים, אך בניסוי זה לא התפתחו פצעים באף אחת מקבוצות הניסוי, ייתכן בשל משקל נמוך של הדגים לעומת ניסויים קודמים שהביא לאפקטיביות נמוכה של הטלטול בגרימת פציעות שטחיות הנדרשות כנראה להדבקה. בניסויים הבאים שולבה עקה נוספת על פי פרוטוקול מעבדה קודמת (Sarah Maurice, PhD dissertation, HUJI 2003), אשר כלל העברת הדגים למיכל בטמפרטורה נמוכה (14°C) למשך 24 שעות ולאחר מכן העברתם למיכלי הטיפול בהם נשמרה טמפרטורה של 18°C מעלות. בניסוי זה התקבלו פצעים בכל המכלים, כולל מכלי הביקורת שלא עברו אילוח. דיגום הפצעים אישר כי מדובר בחיידק AAS, אשר כפי הנראה הגיע עם הדגים. לאור תוצאה זו לא יכולנו לנתח את תוצאות הניסוי ועל כן ביצענו ניסוי נוסף, כאשר במהלך השהייה במיכל המקורר קיבלו הדגים גם טיפול אנטיביוטי (25 mg/L sulfadiazine/trimethoprim) כדי לקטול חיידקי ארומנס שהגיעו עם הדגים. לאחר מכן נשטפו הדגים מן האנטיביוטיקה והועברו למכלים בטמפרטורה של 18°C לצורך אילוח וטיפול בבקטריופאג'ים. בשל אילוצי זמן וכן עקב סיום מכסת הדגים שקיבלנו לצורך ניסויי הדבקה בחרנו לבצע טיפול משולב ב-3 פאג'ים בו זמנית (G3P1, G3P4, I5P8) ב-MOI של 100 עבור כל אחד מן הפאג'ים, על מנת להגדיל את סיכויי ההצלחה של הניסוי. בניסוי זה לא נמצאו פצעים במכלי הביקורת. במיכל שקיבל חיידקי AAS בלבד נמצאה נגיעות של קרוב ל-100%, כאשר רק בדג אחד מתוך 20 במכלים אלה לא נמצאה נגיעות. במכלים שקיבלו טיפול בפאג'ים בתוך חצי שעה מאילוח בחיידקים נמצאה ירידה קלה בנגיעות, כאשר במיכל אחד נמצאו 8 דגים נגועים ובשני 9 דגים. יחד עם זאת הכיבים שנמצאו בדגים שקיבלו טיפול בפאג'ים היו בדרגת חומרה נמוכה משמעותית (איור 10) מהביקורת. טיפול נוסף, בו הוספו הפאג'ים כ-24 שעות לאחר האילוח בחיידק, הראה תוצאת ביניים (8 ו-9 דגים נגועים) וגם בו חומרת הנגעים (למעט בדג אחד שנראה כי סבל מוירוס בנוסף לאילוח) הייתה נמוכה מן הדגים שלא טופלו בפאג'ים.



איור 10. השוואה בין כיבים בדגים שאולחו ב-AAS עם ובלי טיפול בפאג'ים. כל הדגים אולחו ב- 10^5 CFU/ml תאים של תבדוד G3 השייך לקבוצה C. טיפול בפאג'ים בוצע על ידי הוספת 3 פאג'ים שונים בעלי פעילות כנגד זן זה ב-MOI 100 (ראה פירוט בטקסט). התמונות צולמו 10 ימים לאחר האילוח. A, B – כיבים אופייניים שנצפו בדגים שטופלו בחיידק בלבד. ניתן לראות נקרוזה משמעותית אשר חודרת את שכבת האפיתל העליונה וחושפת את השכבה שמתחתיה (כתם כהה במרכז הכיב). C, D – כיבים אופייניים שנצפו בדגים שקיבלו טיפול בפאג'ים בסמוך לאילוח בחיידק או 24 שעות לאחר מכן. ניתן לראות כי הנגע שטחי יותר, אין חדירה של שכבת האפיתל.

בתום תקופת המחקר ישנם מספר ממצאים חדשים ומעניינים המצדיקים לטעמנו מחקרי המשך הן בכיוון הבסיסי של האקולוגיה של AAS בסביבות מדגה בארץ והן בכיוון היישומי של פיתוח טיפול מבוסס בקטריופאגים כנגד פתוגן זה. ממצא עיקרי במחקר הינו המגוון הנמוך במפתיע של פתוגנים מסוג *A. salmonicida* שבודדו מדגי קרפיון בארץ, המתחלקים לשני גנוטיפים בלבד. ממצא זה קיבל תמיכה נוספת מאפיון המיקרוביום של דגי קרפיון שהוחזקו במשך שנה בבריכת דגים פתוחה ובוצע מעקב אחר שינויים במיקרוביום שלהם. מעבר לעניין בהבנת הגורמים להימצאות מגוון כה נמוך, לממצא זה חשיבות רבה בהערכת היכולת ליישם בקרה ביולוגית בסביבה פתוחה דוגמת בריכות דגים, ובפרט בשימוש בבקטריופאגים אשר פעמים רבות עשויים להיות בעלי ספציפיות גבוהה למאחסן ספציפי. אכן, מתוצאות המחקר עולה כי הקבוצות הגנטיות שמצאנו חופפות במידה רבה לטווח המאחסן של הבקטריופאגים שבודדנו, אם כי בקטריופאגים משתי הקבוצות עשויים להדביק גם תבדידים מן הקבוצה השנייה. במיוחד יש חשיבות לעובדה כי אוסף הבקטריופאגים שבידינו מכסה את כלל התבדידים שנדבקו מאוסף ניר דוד, המייצג פתוגנים פעילים שנאספו מדגים נגועים לאורך תקופה של 10 שנים. יש לסייג כי טרם בוצע אפיון מלא של הבקטריופאגים, ויש סבירות גבוהה כי חלקם, למרות שבודדו בימים שונים ומבריכות שונות, יהיו קרובים מאוד זה לזה. אפיון נוסף של הבקטריופאגים, כולל אפיון גנומי ומורפולוגי, יבוצע במסגרת מחקר המשך.

כיוון נוסף של המחקר, בקרה ביולוגית מבוססת חיידקים פרוביוטיים, נזנח בשלב זה לאור חוסר היכולת לקבל עיכוב משמעות והדיר של הפתוגן על ידי זנים שנבחנו. יחד עם זאת יש להדגיש כי בעיה מרכזית בניסויים אלה הייתה הגידול האיטי של חיידקי *A. salmonicida* בתנאי מעבדה, מה שפגע מאוד ביכולת לכמת את גידולם בסמוך לחיידקים אנטגוניסטיים פוטנציאליים. אין להסיק מכך כי לא ניתן ליישם כיוון כזה בעתיד, אך יהיה צורך בפיתוח שיטות חדשות לבחינת וכימות ההשפעה האנטגוניסטית אם ישנה כזו.

במהלך המחקר ביססנו שתי מערכות מודל להדבקה בפתוגן במטרה לאפשר הערכה כמותית של תוצאות בקרה ביולוגית מבוססת בקטריופאגים. מערכת *in-vitro* המבוססת על תרבית תאי אפיתל של קרפיון, אשר תאפשר ביצוע ניסויים ללא שימוש בבעלי חיים, פותחה אך לא הצלחנו לקבל ממנה תוצאות כמותיות. בעיה מרכזית הייתה ירידה ביציבות המערכת לאחר מספר חודשים של הפסקת העבודה עקב משבר הקורונה. ייתכן כי מערכת עתידית דומה תאפשר ביצוע ניסויים כפי שתוכננו במחקר זה, אך יידרשו מספר שינויים בפרוטוקול על מנת לקבל תוצאות מהימנות ותידרש ולידציה של התוצאות על מנת להראות כי הן תקפות גם למערכת *in-vivo*. מערכת נוספת, המבוססת על דגי קרפיון שנחשפו לתנאי עקה מבוקרים, הוקמה בסיוע אנשי המעבדה לבריאות דגים בניר דוד ואיפשרה לנו לשחזר את המחלה בתנאים מבוקרים וכן להדגים פעילות בקטריופאגים בעיכוב המחלה. מערכת זו מהווה כלי חשוב ומרכזי במחקרי המשך בהם תבוצע אופטימיזציה של פרוטוקול השימוש בבקטריופאגים

לסיכום, תוצאות המחקר מצביעות על פוטנציאל ממשי ליישום שימוש בבקטריופאגים כבקרה ביולוגית של *A. salmonicida* בסביבות מדגה בישראל יתרה מזאת, המגוון הגנטי הנמוך שזיהינו, בשילוב עם טווח המאחסן של הפאגים שבודדו אשר מכסה את כלל התבדידים באוסף, מצביע על פוטנציאל אמיתי של מערכת זו לשמש כבסיס למחקרים נוספים וכמקרה מבחן ראשון מסוגו בעולם לשימוש בבקרה ביולוגית מבוססת בקטריופאגים בחקלאות מים בתנאי שדה.

1. Done HY, Venkatesan AK, Halden RU (2015) Does the recent growth of aquaculture create antibiotic resistance threats different from those associated with land animal production in agriculture? *The AAPS journal* 17(3):513-524
2. Gulla, S., Lund, V., Kristoffersen, A.B., Sørum, H. and Colquhoun, D.J., 2016. *vapA* (A-layer) typing differentiates *Aeromonas salmonicida* subspecies and identifies a number of previously undescribed subtypes. *Journal of fish diseases*, 39(3), pp.329-342.
3. Hektoen H, Berge JA, Hormazabal V, Yndestad M (1995) Persistence of antibacterial agents in marine sediments. *Aquaculture* 133(3):175-184
4. Gupta CL, Blum SE, Kattusamy K, Daniel T, Druyan S, Shapira R, Krifucks O, Zhu YG, Zhou XY, Su JQ, Cytryn E. Longitudinal study on the effects of growth-promoting and therapeutic antibiotics on the dynamics of chicken cloacal and litter microbiomes and resistomes. *Microbiome*. 2021 Aug 28;9(1):178.
5. Kaku Y, Yamada Y, Wakabayashi H (1999) Characterization of Atypical *Aeromonas salmonicida* Isolated from an Epizootic Ulcerative Disease in Carp (*Cyprinus carpio*). *Fish Pathology*,34(3),155-162,1999.
6. Lowrey L, Woodhams DC, Tacchi L, Salinas I (2015) Topographical mapping of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) microbiome reveals a diverse bacterial community with antifungal properties in the skin. *Applied and environmental microbiology* 81(19):6915-6925
7. Menanteau-Ledouble S, Kumar G, Saleh M, El-Matbouli M (2016) *Aeromonas salmonicida*: updates on an old acquaintance. *Dis Aquat Org* 120:49-68 .
8. Muziasari WI, Managaki S, Pärnänen K, Karkman A, Lyra C, Tamminen M, Suzuki S, Virta M (2014) Sulphonamide and trimethoprim resistance genes persist in sediments at Baltic Sea aquaculture farms but are not detected in the surrounding environment. *PLoS One* 9(3):e92702
9. Muziasari WI, Pärnänen K, Johnson TA, Lyra C, Karkman A, Stedtfeld RD, Tamminen M, Tiedje JM, Virta M (2016) Aquaculture changes the profile of antibiotic resistance and mobile genetic element associated genes in Baltic Sea sediments. *FEMS microbiology ecology* 92(4):fiw052
10. Patil HJ, Benet-Perelberg A, Naor A, Smirnov M, Ofek T, Nasser A, Minz D, Cytryn E (2016) Evidence of Increased Antibiotic Resistance in Phylogenetically-Diverse *Aeromonas* Isolates from Semi-Intensive Fish Ponds Treated with Antibiotics. *Frontiers in microbiology* 7(1875) doi:10.3389/fmicb.2016.01875
11. Serrano PH (2005) Responsible use of antibiotics in aquaculture. *Food & Agriculture Or.Stentiford* GD, Sritunyalucksana 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.
12. Zilber-Rosenberg I, Rosenberg E (2008) Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS microbiology reviews* 32(5):723-735
13. Irianto A, Austin B. Probiotics in aquaculture. *Journal of fish diseases*. 2002 Nov;25(11):633-42.