

## דוח מחקר, מאי 2018

### נושא: מיקרואצות כמקור לתכשירים כנגד גורמי מחלה טפיליים בדגים - תחליפים לברומקס, פורמלין וגופרת נחושת

אינה חוזין-גולדברג<sup>1</sup>, חנוך גלסנר<sup>2</sup>, ריטה סמירנוף<sup>3</sup>, תמיר אופק<sup>3</sup> בוריס זורין<sup>1</sup>, אמיר אנטיגונוס<sup>4</sup>, ניצן סגל<sup>5</sup>, דינה זילברג<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>המכון לחקלאות וביוטכנולוגיה של אזורים צחיחים, המכונים לחקר המדבר, אונ' בן גוריון; <sup>2</sup>חוות עדן; <sup>3</sup>המעבדה לבריאות דגים בניר דוד; <sup>4</sup>חוות עוף החול, <sup>5</sup>מדגה מעוז חיים. \* dzilberg@bgu.ac.il

#### תקציר:

הטיפול במחלות טפיליות בדגים נמצא בפרשת דרכים, שכן רוב החומרים ששימשו לטיפול בטפילים אינם מותרים עוד, והחומר היחיד שמותר, פורמלין, קרצינוגני. מטרת המחקר הנוכחי היתה לפתח טיפול על בסיס טבעי, תוך שימוש באצות כמקור לטיפול.

בתקופת המחקר הראשונה (כחצי שנה) איתרנו אצה בעלת פעילות אנטי-טפילית כנגד מונוגניאה גירודקטילוס בדגי גופי שימש כמודל), ובחנו שיטות מיצוי שונות לשיפור יעילות האצה. נראה שהמיצוי הפעיל של האצה אינו רעיל לדגים. המשך המחקר יתמקד בזיהוי החומר הפעיל שמטרה להגביר ייצורו ולייעל עוד את מיצוי האצה, ובביצוע ניסויים in vivo בדגים נגועים. מוצעת תוכנית המשך לשנה שנייה, המתמקדת בהמשך ייעול מיצוי האצה ובחינת יעילות כנגד טפילים נוספים במיני דגים נוספים.

#### הגדרת הבעיה:

מחלות טפיליות מהוות גורם מרכזי בתחלואה ותמותה של דגים בגידול אינטנסיבי. אפשרות לטיפול בגורמי מחלה אלה מוגבלת ביותר בגלל ההגבלה על התכשירים המותרים לשימוש בדגים. התכשיר היחיד המותר לשימוש כיום הוא פורמלין, הידוע בתכונותיו המסרטנות ומהווה סכנה למגדל בחשיפה במגע ושאיפה, ולכן כבר נאסר לשימוש בחלק ממדינות אירופה, איסור שצפוי גם במדגה הישראלי. טיפולים מותרים כוללים שימוש במי חמצן, מלח, אלה חומרים שאין להם השפעה בריאותית או סביבתית ארוכת טווח מזיקה, אך יעילותם מוגבלת בריכוזים הבטוחים במתן לדגים. כך שלמעשה אין טיפול מותר למספר רב של מחלות בענף המדגה.

#### רקע:

טיפולים טבעיים על בסיס צמחי יכולים להוות תחליף לחומרים הכימיים המשמשים לטיפול בגורמי מחלה טפיליים בדגים. במחקר שנערך במעבדתנו הדגמנו את האפשרות לטיפול במחלת הגירודקטילוס, הטפיל *Gyrodactylus turnbulli* (מונוגניאה) התוקף דגי גופי באמצעות ג'ינג'ר ושום, וכן באמצעות Timor C, חומר מסחרי על בסיס טבעי שמיוצר על ידי חברת סטוקטון-אקואמור, כל אלה כתחליף לברומקס (מחקרים שפורסמו או הוגשו לפרסום בספרות המדעית).

מיקרואצות ידועות כמכילות חומרים אנטי-ויראליים, אנטי-בקטריאליים ואנטי-זאופלנקטון (חד ורב תאיים), לצורך התגוננותן כנגד מיקרואורגניזמים בסביבתן הטבעית, בפרט טריפה על ידי סרטניות וחד תאים. דגים רבים ניזונים מאצות כחלק מהדיאטה ומיני אצות מעטים רעילים לדגים. **השילוב של אי רעילות לדגים יחד עם רעילות למיקרואורגניזמים יכולה להוות פלטפורמה לפיתוח טיפולים כנגד גורמי מחלה בדגים על בסיס שימוש באצות.**

**מטרת המחקר וחשיבותו:** מטרת המחקר הינה לפתח טיפולים כנגד גורמי מחלה טפיליים בדגים, תוך שימוש במיקרואצות. התכשירים שיפותחו יהוו תחליף לחומרים כימיים רעילים המשמשים כיום ואלטרנטיבה טיפולית לחומרים אסורים לשימוש או שצפויים שלא להיות מאושרים לשימוש בתקופה הקרובה.

## **תוצאות – לאחר כ 6 חודשי מחקר:**

### **(I) פיתוח טיפול כנגד מונוגניאה:**

התמקדנו בשימוש באצה צורנית *Pheodactylum tricornutum*, אשר מתוך סריקה ראשונית הראתה פוטנציאל ליעילות כנגד מונוגניאה. כמודל למונוגניאה בחרנו הדבקה בגירודקטילוס בדגי גופי.

### **1. תוצאות מניסויים *in vitro***

#### **הכנת מיצויי אצה לבדיקה:**

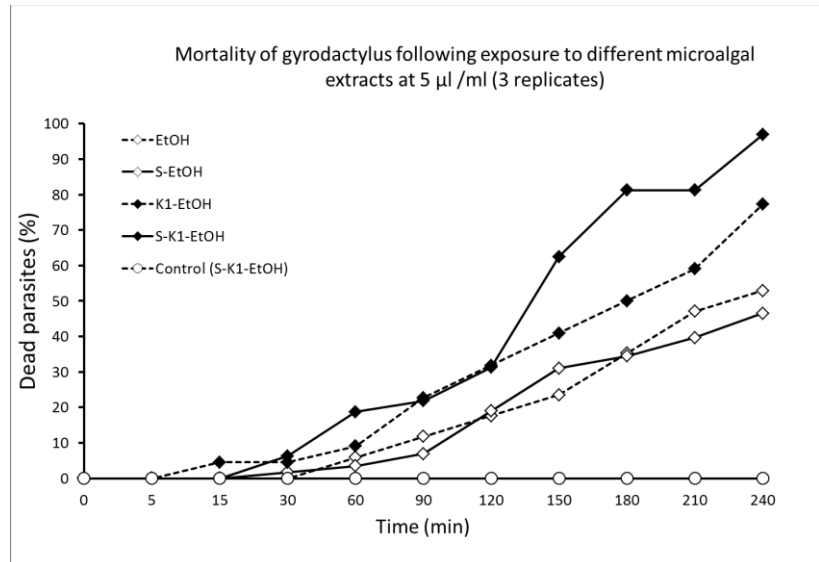
האצה גודלה בתנאים שונים, כולל גידול למשכי זמן שונים (שבוע ושבועיים) עד לשלב של early stationary – late stationary; בטמפרטורה של 25 מעלות. מיצויים הוכנו תוך שימוש בסולבנטים 'רוקים' שונים. שאינם רעילים ומותרים לשימוש בתעשיית המזון, כולל: אתנול (100%), אתנול (75%), אתנול:אתיל-אצטאט (כל אחד 50%) ואתיל אצטאט (100%). האצות מוצו לפרקי שונים ובטמפרטורות שונות. בחנו השפעת טיפול בסוניקציה עדינה על יעילות המיצוי והוספתו עם ריכוזים שונים של דטרגנט (גם כן מור לשימוש בתעשיית המזון

#### **בחינת יעילות המיצויים כנגד הטפיל *in vitro*:**

יעילות המיצויים נבחנה כנגד גירודקטילוס. סנפירי זנב נאספו מדגים נגועים ברמה גבוהה (לאחר הרדמתם), וחתיכות סנפיר מודבקות בגירודקטילוס הושמו בבארות של צלחת 24 בארות בתוספת המיצויים הנבדקים. הפרדות הטפיל מהסנפיר ותמותה של הטפיל נבדקו לאורך זמן. באופן זה נבדקו המיצויים השונים שתוארו לעי"ל, בריכוזים שונים. נמצא כי מיצוי מאצה שגודלה למשך שבועיים, לשלב ה Late stationary היתה פעילה יותר. המיצוי היעיל ביותר נתקבל עם 100% אתנול, למשך 4 שעות בטמפ' החדר וטיפול בסוניקציה עדינה. יעילות כנגד הטפיל עלתה לאחר תוספת של 1% דטרגנט למיצוי, על פי נתוני הפרדות הטפיל מסנפיר הזנב ותמותת הטפיל (איור 1).

איור 1: בחינה in vitro של מיצוי ממיקרואצה צורנית כנגד גירודקטילוס (מונוגנאה). בניסוי, שנערך בצלחות 24 בארות, בכל באר הושמה פיסת סנפיר זנב שאליו צמודים מס טפילי מונוגנאה (מדג גופי נגוע שהורדם), והוסף המיצוי בריכוז של 5 µl/ml. האצות מוצו באתנול (EtOH), ונבחנה השפעה של תוספת סוניקציה (S) והוספה של דטרגנט (K1). לביקורת שימש הסולבנט בלבד, בתוספת סוניקציה ודטרגנט (Control).

נבחן זמן למוות הטפיל (על פי אי תנועתיות) בהסתכלות מיקרוסקופית ישירה לאורך זמן (סיכום תוצאות מ-3 ניסויים נפרדים).



## 2. תוצאות מניסויים in vivo:

בדיקת רעילות לדגים

נמצא שריכוז של 10 mL/L לא היה רעיל בחשיפה למשך 24 שעות, כפי שנבחן בדגי גופי (לא מוצג). טיפול בדגים נגועים – ניסוי בקנה מידה קטן נערך ניסוי ראשוני לבחינת הייתכנות של שימוש במיצוי. תוצאות ראשוניות מצביעות על יעילות המיצוי בריכוזי של 2.5 mL/L.

## (II) פיתוח טיפול כנגד אואודיניום

דגים נגועים באואודיניום הובאו למערכת הניסויית בחוות עדן, ומאמצים נעשים לייצב את ההדבקה הניסיונית בכדי להעמיד מערכת שתאפשר קבלת מספרים גדולים של הטפיל לבחינת יעילות מיצויים כנגדו.

## **תוכנית המחקר**

העבודה שנעשתה בחצי השנה הראשונה תואמת את תוכנית המחקר מבחינת ביצוע ניסיונות *in vitro* ושיפור גידול ומיצוי האצה להגברת יעילותה כנגד הטפיל. בחנו פעילות אנטי-טפילית כנגד גירודקטילוס ואנו עובדים על העמדת הדבקה באואודיניום. בחרנו לבצע ניסוי ראשוני של טיפול בדגים נגועים (תוכנית לשנה שנייה על פי התוכנית המקורית) בכדי לוודא שאכן יש פוטנציאל יישומי בדגים למיצויים. כאמור התוצאות מצביעות של פוטנציאל כזה.

### **תוכנית עבודה להמשך השנה הראשונה:**

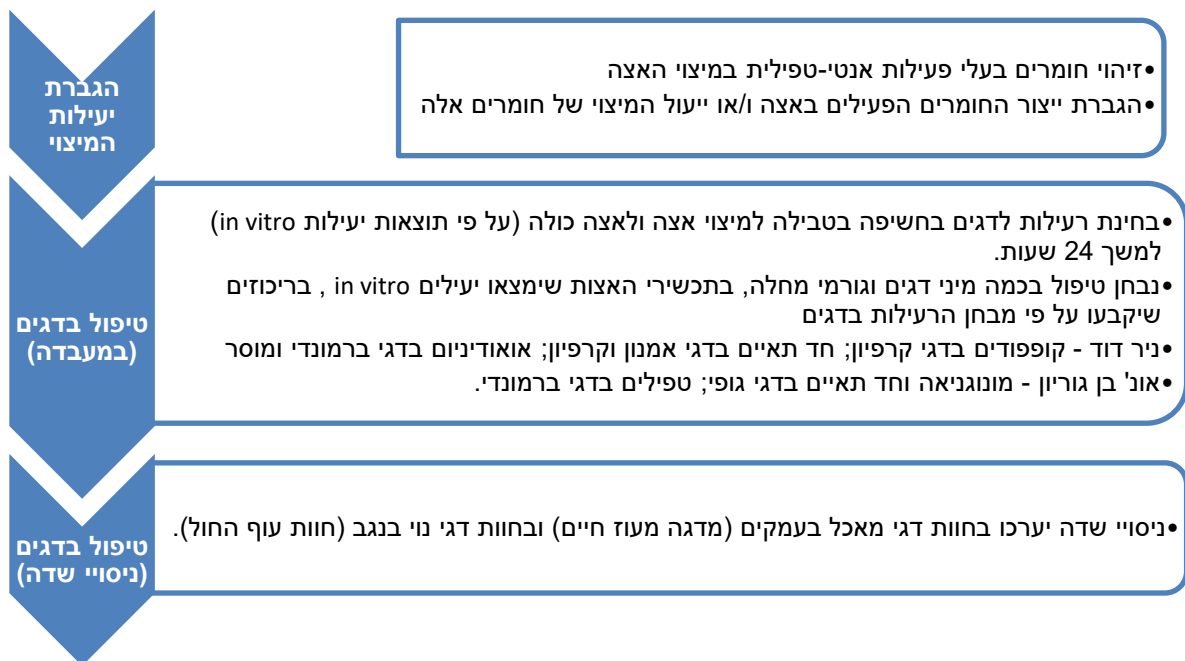
1. לבחון את השפעת המיצויים על חד תאים, טטרהימנה ואואודיניום.
2. להעלות את יעילות המיצויים על ידי:

- א. ריכוז המיצוי
- ב. הגברת ייצור החומר הפעיל באצה על ידי חשיפה לתנאי עקה נוספים (עד כה בדקנו שלבי גידול שונים)
- ג. נשקול תחילת עבודה של זיהוי חומרים פעילים כבר בשלב זה, בכדי לשפר את יכולתנו להעלותם במיצויים לטיפול.

### **תוכנית מחקר לשנה השנייה:**

תוכנית המחקר המוצעת לשנה השניה מתמקדת בניסיונות *in vivo* בדגים, כפי שפורט בהצעה המקורית, ומובא בהמשך. בשלב זה המיצוי יעיל בריכוזים של 2.5 mL/L. בכדי לאפשר טיפול בדגים גדולים ונפחי מים גדולים, יש לייעל את המיצוי ולאפשר שימוש בריכוזים נמוכים יותר. נתמקד במחקר במטרה לשפר את יעילות המיצוי בחלק השני של השנה הנוכחית (שנת מחקר ראשונה), אך עבודה זו תימשך גם בשנה השניה, כולל זיהוי החומרים הפעילים, בכדי לכוון באופן ספציפי להגברת ייצורם באצה ומיצויים.

**שנה שניה:** המשך עבודה על העלאת יעילות המיצוי; ניסיונות *in vivo* בדגים (אונ' בן גוריון, חוות עדן, ניר דוד; חוות דגים, עוף החול ומעוז חיים. יתכן ויכללו חוות נוספות):



### שיפור יעילות מיצוי האצה:

- בכדי לשפר את יעילות המיצוי מהאצה נחקור בכמה מישורים:
1. זיהוי חומרים פעילים במיצוי(באמצעות אנליזת HPLC).
  2. חשיפת האצה בשלב הגידול לתנאי עקה נוספים, תנאי שעשויים להגביר ייצור חומרים פעילים.
  3. שיפור שלב המיצוי על ידי מניפולציות של משך מיצוי, טמפרטורת מיצוי, הכנת האצה למיצוי.
  4. ריכוז המיצוי על ידי נידוף הסולבנט והמסה בנפח קטן יותר.
- מטרתנו לייצר מיצוי שיעילותו גדולה מהמיצוי הנוכחי, כך שיהיה יעיל בריכוזים של כ 50 ppm (לעומת 2.5 ppt עבור המיצוי הנוכחי).

### ניסיונות *in vivo* בדגים:

בשלב הראשון נבחן רעילות האצות ומיצוייהן לדגים על ידי חשיפה לריכוזים שונים למשך 24 שעות באמבט. הריכוז הנבחן יכול את הריכוז האפשקטיבי in vitro, וריכוזים של עד פי 10 מריכוז זה. הבדיקה תערך במיני דגים שימשו בניסוי (כמו אמנון, קרפיון, גופי, ברמונדי, מוסר, דניס) בשל חשש להבדלים ברגישות של מינים שונים.

בשלב הבא נבחן יעילות האצות בריכוזים שאינם רעילים לדג כנגד גורם המחלה; כמו: גירודקטילוס ודקטילוגירוס בדגי גופי; קופפודים בדגי קרפיון ואמנון; אואודיניום בדגי דניס ברמונדי ומוסר; וגורמי מחלה חד תאיים, כולל טריכודינה ואיכטיובודו, אשר נמצאים באופן קבוע במדגים בהם המעבדות השותפות במחקר מבצעות איבחונים שגרתיים.

מערכת הניסוי תותאם למין הדג וגודלו. משך הטיפול ינוע בין 4 ל 24 שעות, ובמקרה של אואודיניום, תינתן באופן רציף או יומי למשך כמה שבועות (שבועיים או יותר). נבדוק נגיעות בגורם המחלה לפני ואחרי הטיפול בהסתכלות מיקרוסקופית ישירה. תוצאות הטיפול ישוו לטיפול קונוונציונלי (פורמלין/ברומקס/גופרת מנחושת) ולקבוצת ביקורת, ללא טיפול.

**ניסיונות במדגים מסחריים:**

טיפולים יעילים in vivo יבחנו במדגים בנגב ובאזור העמקים. כיון שדגים ממדגים באזורים אלה נבדקים באופן קבוע במעבדות השותפות במחקר, גורמי המחלה בחוות השונות ידועים ומבנה המדגה ידוע, מה שמקל עת התכנון והביצוע.

**VI. אבני דרך:**

חודשים:

24	20	16	12	8	4	
					X	איתור מיני אצות יעילים (אונ' בן גוריון)
				XX	X	הגברת יעילות המיצוי באמצעות סולבנטים שונים, טיפולים נלווים לתהליך המיצוי (אונ' בן גוריון)
				XX		קביעת ריכוזים יעילים לטיפול in vitro (אונ' בן גוריון)
		X	XX			זיהוי חומרים פעילים במיצוי
		XX	XX			שיפור יעילות המיצוי באמצעים שונים
		X		X		רעילות לדגים (אונ' בן גוריון, ניר דוד, חוות עדן, חוות עוף החול, מדגה מעוז חיים)
	XX	XX				טיפול בדגים (אונ' בן גוריון, ניר דוד, חוות עדן)
XX						ניסיונות שדה (אונ' בן גוריון, ניר דוד, חוות עדן, חוות עוף החול, מדגה מעוז חיים)

**VIII. פירוט כוח אדם ותקציב (ש):**

שנה ב'		
ניר דוד וחוות עדן	אונ' בן גוריון	
		<b>כוח אדם (אחוז השקעת זמן במחקר):</b> דינה זילברג (20%) אינה חוזין-גולדברג (15%) בוריס זורין (5%) חנוך גלסנר (15%) ריטה סמירנוף (15%) תמיר אופק (10%) אמיר אנטיגונוס (5%)

		ניצן סגל (5%)
	40,000	סטודנט (100%)
	20,000	טכנאי (20%)
20,000	30,000	<b>מתכלים</b>
1,000	6,000	<b>נסיעות</b>
15,000		<b>ציוד קבוע</b>
5,400	14,400	<b>תקורה (15%)</b>
151,800		<b>סה"כ</b>

### **פירוט תקציב:**

**משכורות:** 50% מעלת המלגה מבוקשת עבור סטודנט לדוקטוראט באוני' בן גוריון. יתרת המלגה תמומן על ידי האוני'. משכורת חלקית עבור טכנאי (20%) מבוקשת לצורך הכנת כמויות גדולות של אצות לניסיונות בדגים גדולים.

מתכלים: כולל חומרים וציוד מתכלה לגידול האצות, הפקת מיצויים, אנליזה של האצות ומיצויים, ייצור חומר על בסיס אצות לטיפול בניסויי השדה והמעבדה, חומרים וציוד מתכלה לגידול פרטוזואה ואחזקת מונוגניאה ואואודיניום, עלות דגים ומזון דגים, ציוד מתכלה לניסיונות מעבדה ואנליזות בדגים. **נסיעות:** מחושבות על פי עלות לק"מ (2.5 - 2 ש"ק"מ, עלות מינימלית של רכב באוני' בן גוריון). נסיעות כוללות נסיעה לחוות דגים לצורך הבאת דגי ניסוי וביצוע ניסיונות שדה; נסיעות לצורך פגישות בין חוקרים (פעמיים בשנה הראשונה וכ 4 מפגשים בשנה השניה).

**ציוד:** 15,000 ש"ח ישמשו לרכישת מיקרוסקופ לחוות עדן, פריט ציוד חיוני לבחינת יעילות המיצויים כנגד אואודיניום.

### **רשימת ספרות:**

Zorin and Zilberg 2017, Timor c, a commercial plant-based alternative for the treatment of infections caused by monogenean parasites. 18th International conference on diseases of fish and shellfish, Belfast, Ireland.

גלסנר, ח. מ. סמירנוב, ור. פלק (2013) מערכת לאפיון וריבוי הטפיל *Amyloodinium ocellatum* הגורם לתחלואה בבריכות בעמק בית שאן. דייג ומדגה 2013, 1: 1658-1662.