

מצקת וחיפוש אחר פתרונות להתפרצויות *fe* טטרהימנה בדג'י אופי (*Poecilia sp.*)

(סיכום מחקר 2003)

דינה זילברג, מרסיה (פימנטה) ליבוביץ'- המכון לחקר המדבר, אונ' בן גוריון
אילן פפרנה- הפקולטה לחקלאות, האוניברסיטה העברית בירושלים
רענן אריאב- אקוואוט, זיכרון יעקב

המחקר מומן ע"י היחידה לגידולי מים מ"פ נגב ערבה וביצע במסגרת לחקר המדבר,
אוניברסיטת בן-גוריון בנגב

מבוא

טטרהימנה (*Tetrahymena sp.*) הינה ריסנית החיה במים וניזונה מחומר אורגני וחיידקים. היא הופכת לטפיל פקולטטיבי בדגים בתנאים מסוימים, כמו: תנאי סביבה ירודים ופצעים חיצוניים (Ponpornpisit et al. 2000). קיים מספר רב של מיני טטרהימנה, אך מרבית המקרים הפתולוגיים המתוארים בספרות נגרמים ע"י *T. pyriformis* (Ponpornpisit et al. 2001, Griffin 1989) ו-*T. corlissi* (Hatai et al. 2001, Imai et al. 2000). מרבית המקרים של טטרהימנה מתרחשים בגופים, ובעבודה שהשוותה את מידת האלימות של הטפיל בעשרה מינים שונים של דגי נוי, אכן מצא שגופי הוא הרגיש מכולם (Ponpornpisit et al. 2000). מחלת הטטרהימנה זוהתה 3 פעמים בחוות דגי הנוי בערבה. מקרה ראשון היה אלים מאוד, ונגרם כפי הנראה ע"י *T. corlissi*. מקרה שני בעל אופי כרוני תקף דגיגים בשבועות הראשונים לחייהם, עם תמותות של עד 10%. בניגוד למקרה הראשון, נראה כי הטפיל הוא חיצוני, מצוי על העור ואינו חודר לרקמות ואיברים פנימיים של הדג. במקרה השלישי, דגים נגועים במחלה יובאו מסינגפור במהלך 2002, במטרה לשמש להורים באחת מחוות דגי הנוי בנגב. המחלה זוהתה בשלב הקרנטינה, והחדרתה לחווה נמנעה.

התקדמות ותוצאות המחקר

1. אחזקת דגים מודבקים במחלה:

דגים מודבקים יובאו למעבדה מחוות מסחריות. הדגים אוכלסו בארבעה אקווריומים של 30 ליטר עם פילטר ביולוגי פנימי, בטמפרטורה של 23-25 מעלות. הדגים אוכלסו בצפיפות של כ-350 דגים לאקווריום (2-3 דגים לליטר). האקווריומים נוקו אחת לשבוע, כולל סיפון, החלפת מים של 10-50% (לשבוע), ניקוי פילטרים ביולוגיים אחת לשבועיים. לדגים המודבקים הוספו דגים בריאים פעמיים בשבוע, סה"כ 20 עד 40 דגים לשבוע (תלוי בקצב התמותה). איכויות המים נשמרו ברמה נמוכה, והערכים שנמדדו היו: אמוניה של 2 - 8 חל"מ, ניטריט 0.5 חל"מ, ניטראט 125 חל"מ, חמצן 8-9

חל"מ. מצאנו כי אחזקת הטטרהימנה במעבדה הנה מורכבת. ניקוי יתר של האקווריום וצפיפות דגים נמוכה הם גורמים העשויים להביא להיעלמות המחלה מהאקווריומים. לחיזוק המחלה, כשנראה כי הנגיעות בטטרהימנה יורדת, הוספנו דגים מתים. הטפיל נמשך ותקף באופן הקשה ביותר דגים מתים ודגים חלשים. קשה היה לקבוע אם הגורם להיחלשותם נבע מהדבקה בטטרהימנה או גורם אחר, (כמו איכות מים ירודה).

2. בידוד וזיהוי מיני טטרהימנה:

בודדו וגודלו במעבדה שלוש תרביות נפרדות של טטרהימנה משלושה מקורות שונים, וסומנו במעבדתנו כ- Tet-Sin, Tet-CO, ו-Tet-RA. הטטרהימנה גודלה במדיום ATCC-357, עם העברות שבועיות. התרביות נשלחו לזיהוי מולקולרי במעבדה מתמחה בקנדה. שתיים מהתרביות זוהו כ- *T. farleyi* (Tet-CO) ו- *T. australis* (Tet-Sin). התרבית השלישית עדיין לא זוהתה. אנו כעת מבצעים זיהוי ואפיון מורפולוגי במעבדה המבוסס על מאפיינים הכוללים גודל, מספר ומבנה ריסים, מבנה פה, ומבנה גרעין.

3. פיתוח פרוטוקול הדבקה מבוקר בגופים:

פותחו מספר פרוטוקולים להדבקה מבוקרת, לקבלת 100% הדבקה או כ-50% הדבקה (IC_{50}). חשיפה לריכוזי טטרהימנה גבוהים (1,000 פרטים למ"ל) בצלחות פטרי למשך 48 שעות נותנת הדבקה בשיעור של 100%. חשיפה בכלים של 800 מ"ל לריכוזי טטרהימנה הנעים בין 100 ל 1,000 פרטים למ"ל נותנת הדבקה של 20-60% מהדגים.

4. השוואה בין בידודי הטטרהימנה השונים:

מידת אלימותם של בידודי הטטרהימנה השונים לדגי גופי הושוותה. דגים נחשפו לריכוזים שונים של טטרהימנה בצלחות פטרי (40 מ"ל). נמצא כי Tet-RA הוא הבידוד האלים ביותר, אח"כ Tet-Sin והפחות אלים הוא Tet-CO.

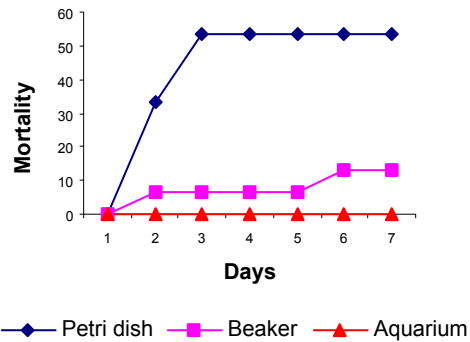
5. רגישותם של מיני דגים שונים לטטרהימנה:

רגישותם של המינים הבאים לטטרהימנה Tet-RA נבדקה בגופי, פלטי, סקלר ואמנון. הדגים נבדקו עם ובלי טיפול מקדים של שפשוף העור. נמצא כי כל דגי הנוי הטרופיים היו רגישים למחלה, והאמנון עמיד למחלה.

6. החלמה מהדבקה בטטרהימנה:

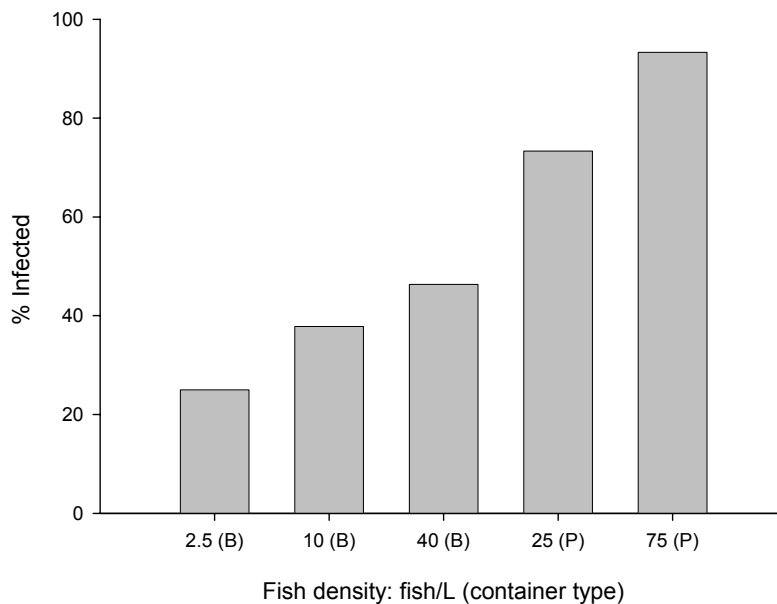
התנאים להחלמה מהדבקה במחלת הטטרהימנה נבדקו. לביצוע הניסויים, 100% מהדגים הודבקו במחלה ע"י חשיפה לטטרהימנה בצלחות פטרי, ואח"כ הועברו בצפיפויות שונות לכלים בגדלים שונים (טבלה 1). נמצא שהעברת דגים נגועים לאקווריום של 7 ליטר מביא להחלמה מלאה מהמחלה (איור 1, טבלה 2). נמצא שצפיפות הדגים וממדי המכל משפיעים על החלמה (איור 2).

איור 1: תמותת דגי גופי בעקבות הדבקה בטטרהימנה. דגים מודבקים פוזרו בין צלחות פטרי (40 מ"ל, X דגים למ"ל), כוסות (800 מ"ל, X דגים למ"ל) ואקווריוםים (7 ליטר, X דגים למ"ל). נגיעות במחלה נבדקה לאחר שבוע.



טבלה 1: החלמה ממחלת הטטרהימנה בכלים מגדלים שונים

טיפול	צפיפות דגים (פרטים לליטר)	תמותה (%)	הדבקה (%)
צלחות פטרי (40 מ"ל)	75	53.3	71.42
כוסות (800 מ"ל)	12.5	13.3	30.76
אקווריום (7 ליטר)	2.9	0	0



איור 2: השפעת צפיפות הדגים וממדי המיכל על החלמה ממחלת הטטרהימנה. דגים מודבקים פוזרו בין כוסות של 800 מ"ל (B) וצלחות פטרי (P), בצפיפויות שונות. נגיעות במחלה נבדקה לאחר 5 ימים.

7. בדיקת השפעתם של גורמים שונים, ברמת הסביבה וברמת הדג, על הדבקה במחלת הטטרהימנה:

בבחינת גורמים שונים והשפעתם על הדבקה במחלה מצאנו כי: ההדבקה נמוכה יותר בחושך לעומת אור, מצב של סופר-סטורציה (רווית יתר של גזים) בדג מגבירה את הסיכוי להדבקה, אך שפשוף של עור הדג מקטין הדבקה במחלה. הטטרהימנה נמשכת ותוקפת דגים מתים ביעילות גבוהה (גבוהה מאשר בדגים חיים), מה שמרמז על אופיה הספרופיטי ומקור מזונה מחומר אורגני. מכאן שסילוק דגים מתים ושמירה

על ניקיון הבריכות מקטין את הסיכוי להתפרצות מחלה.

8. פיתוח פרוטוקול לבדיקת חומרים שונים לטיפול בטטרהימנה:

פיתוח פרוטוקול לבדיקת רגישות הטטרהימנה לחומרים שונים המבוסס על תגובת צבע שונה המתקבלת מתאים מתים וחיים. הבדיקה מתאימה לסריקה ראשונית של חומרים למציאת חומר בעל פוטנציאל טיפולי למחלה. נמצא כי הטטרהימנה רגישה לפורמלין ולאליצין (תוצאות לא מוצגות).

מטרות להמשך:

1. המשך אפיון בידודי הטטרהימנה השונים על פי מאפיינים מורפולוגיים.
2. הגדרת התנאים הסביבתיים המאפשרים החלמה מהמחלה.
3. חיפוש אחר פתרון ממשקי, טיפולי ותרופתי למחלה.

תוכנית העבודה:

1. המשך אפיון בידודי הטטרהימנה השונים על פי מאפיינים מורפולוגיים

הפרמטרים המורפולוגיים המאפיינים על פיהם מסווגת הטטרהימנה למינים שונים יסוכמו מהספרות. בידודי הטטרהימנה השונים יצבעו בצביעת כסף ויבחנו תחת מיקרוסקופ אור. הטטרהימנה תאופיין על פי הפרמטרים המורפולוגיים המקובלים בספרות.

2. הגדרת התנאים הסביבתיים המאפשרים החלמה מהמחלה

בניסוי שנערך בשנה הראשונה למחקר נמצא שהעברת 20 דגים נגועים למיכל של 7 ליטר הביא להחלמה מלאה מהמחלה. ניסוי נוסף הראה שהן לממדי הכלי והן לצפיפות השפעה על המחלה. בניסויים הבאים נמשיך לבחון גורמים המשפיעים על החלמה, כולל: צפיפות הדגים, חומר אורגני, יכולת תנועתיות של הדגים, איכות מים ועוד גורמים שעשויים לעלות במהלך העבודה.

3. חיפוש אחר פתרון טיפולי, תרופתי למחלה

נמשיך לסרוק חומרים שונים *in vitro*. נשתמש בעיקר במיצויי צמחים, שכן החומרים הקונוונציונליים נבדקו בעבר ומתוכם לא נמצא פתרון למחלה. החומרים היעילים ביותר יבחרו לניסויים *in vivo* בניסיון לרפא דגים נגועים במחלה.

רשימת ספרות:

- Griffin, B.R. 1989. Screening of chemicals to control protozoan parasites of fish. Progressive Fish Culturist 51(3):127-132.
- Hatai, K., Chukanhom, K., Lawhavinit, O., Hanjavanit, C., Kunitsune, M., Imai, S. 2001. Some biological characteristics of *Tetrahymena corlissi* isolated from guppy in Thailand. Fish Pathology 36(4):195-199.
- Imai, S., Trurimaki, S., Goto, E., Wakita, K., Hatai, K. 2000. *Tetrahymena* infection in guppy, *Poecilia reticulata*. Fish pathology 35(2):67-72.
- Pompornpisit, A., Endo, M., Murata, H. 2000. experimental infectopn of a ciliate *Tetrahymena pyriformis* on ornamental fishes. Fisheries Science Tokyo 66(6):1026-1031.
- Pompornpisit, A., Endo, M., Murata, H. 2001. Prophylactic effect of chemicals and immunostimulants in experimental *Tetrahymena* infections of guppy. Fish Pathology 36(1):1-6.