

**BALIK PATOJENİ BAZI VİBRİO  
BAKTERİYOFAJLARININ İZOLASYONU VE  
KARAKTERİZASYONU**

**GİZEM YILDIZLI**

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOTEKNOLOJİ  
ANA BİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**MERSİN  
ARALIK – 2015**

**BALIK PATOJENİ BAZI VİBRİO  
BAKTERİYOFAJLARININ İZOLASYONU VE  
KARAKTERİZASYONU**

**GİZEM YILDIZLI**

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOTEKNOLOJİ  
ANA BİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Danışman  
Prof. Dr. Gökhan CORAL**

**MERSİN  
ARALIK – 2015**



Gizem YILDIZLI tarafından Prof. Dr. Gökhan CORAL danışmanlığında “Balık Patojeni Bazı *Vibrio* Bakteriyofajlarının İzolasyonu ve Karakterizasyonu” başlıklı bu çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından oy birliği ile Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

İmza

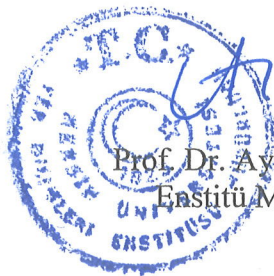
Prof. Dr. Gökhan CORAL

Prof. Dr. Ş. Necat YILMAZ

Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ



Yukarıdaki Jüri kararı Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 12./02./2016 tarih ve 2016.6...../..209..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.



  
Prof. Dr. Ayla ÇELİK  
Enstitü Müdürü

Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, çizelge ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

## BALIK PATOJENİ BAZI VİBRİO BAKTERİYOFAJLARININ İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU

Gizem YILDIZLI

### ÖZ

Bu çalışmada, ülkemizde deniz balıkları yetiştiriciliğinde ekonomik değere sahip *Dicentrarchus labrax* (deniz levreği)'ta yüksek ölüm oranlarına sebebiyet veren Vibriosis etkeni *Vibrio* bakterilerinin izolasyonu, karakterizasyonu; patojen *Vibrio* bakterilerinin doğal düşmanları olan bakteriyofajlarının izolasyonu ve karakterizasyonu amaçlanmıştır. Bu tez kapsamında deniz levreğinin; karaciğer, mide-barsak, ve böbrekleri homojenize edilmiştir. Homojenize edilen organlar, %1,5 NaCl içeren Triptik Soy Broth (TSB) besiyerine ekilmiştir ve 25 °C' de 24 saat inkübe edilmiştir. İzole edilen bakteriler, *Vibrio* bakterileri için seçici besiyeri olan Tiyosülfat Sitrat Safra Tuzları Sukroz Agar (TCBS)'ye ekilmiştir ve oluşan sarı koloniler izole edilmiştir. Bakteriyofaj izolasyonu; deniz suyundan, 0.22 µm por çaplı filtreler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çift tabaka agar yöntemi ile bakteriyofaj varlığı tespit edilmiştir. Faj plakları gözlemlenen 5 bakterinin karakterizasyonu, API 20E hızlı tanı kiti ve 16S rRNA dizi analizi yapılarak belirlenmiştir. API 20E test kiti ile *Aeromonas hydrophila* olarak belirlenen bakteri izolatları 16S rRNA dizi analizleri sonucunda *Vibrio anguillarum* olarak tanımlanmıştır. Konak bakteri suşlarına ait faj izolatları, tek plak yöntemi saflaştırılmıştır. Fajların genomik DNA'ları Hind III restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilerek genom büyüklükleri analiz edilmiştir. Saf faj izolatları, uranil asetat ile negatif boyanak Transmisyon Elektron Mikroskop (TEM) ile görüntülenmiştir. Fajların morfolojik özellikleri belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Bakteriyofaj, faj terapisi *Vibrio*, *Dicentrarchus labrax*, Vibriosis

**Danışman:** Prof. Dr. Gökhan CORAL, Mersin Üniversitesi, Biyoteknoloji ABD

## ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF SOME FISH PATHOGEN VIBRIO BACTERIOPHAGES

Gizem YILDIZLI

### ABSTRACT

In this study, we aimed to isolate and characterize, *Vibrio* bacteria. *Vibrio anguillarum* is a marine bacteria that can cause vibriosis in *Dicentrarchus labrax*. We isolated and characterized bacteriophages -naturel enemy of bacteria-. In this study, tissue samples were taken from kidney, stomach, intestine and liver of the sea bass and inoculated in Tryptic Soy Broth with 1.5% sodium chloride. Bacterial strains were purified by three times streaking on Thiosulfate Citrate Bile salts Sucrose Agar (TCBS) which is differential medium for *Vibrio*.bacteria and yellow colonies were isolated. Phages were isolated from sea water samples. Samples filtered through 0,22 µm syringe filter for extract phage suspension. Presence of bacteriophages were determined by the double layer agar method. Areas of clearing (plaque) were observed and the presence of lytic activity determined by plaque assay. Bacteria were then analysed by API 20E identification kit and 16S rRNA analyse performed as well. Bacteria were identified as *Vibrio anguillarum*. High amount of DNA was electrophoresed through 0.7% agarose gel to determine size of phage DNA. Phage containing filtrates were mixed with buffered glutaraldehyde. Fixed phages were added onto the surface of a pioloform coated grid and negatively stained with 0.5% uranyl acetate. Grids were then inspected with a Transmission Electron Microscopy (TEM).

**Keywords:** Bacteriophage, phage therapy, *Vibrio*, *Dicenthrarhus labrax*, Vibriosis

**Advisor:** Prof. Dr. Gökhan CORAL, Mersin University, Department of Biotechnology

## **TEŞEKKÜR**

Çalışmalarında beni destekleyen, engin bilgi ve deneyimlerini, yardımlarını benden esirgemeyen değerli danışmanım Prof. Dr. Gökhan Coral'a;

Her türlü konuda yardımını, deneyimlerini ve pozitif enerjisini esirgemeyen sevgili Prof. Dr. Mutlu Nisa Ünaldı Coral'a;

Aldığım her kararda yanımda olan, destekleriyle bugünlere gelmemi sağlayan ve hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan canım aileme;

Sonsuz bir sabırla tüm sıkıntılara ortak olan ve bana güzel bir çalışma ortamı sağlayan, hayatımı güzel günlerle dolduran sevgili eşim Arş. Gör. Aytunç Yıldızlı'ya;

Her zaman yanımda olan deneyimlerinden yararlandığım ve içten dostluğuna inandığım Arş. Gör. Pınar Küce Çevik'e;

Arkadaşlığı ve bilimsel desteği ile yanımda olan iş arkadaşım Aylin Başaran Eroğlu'na,

Tüm yardımlarıyla destek veren Prof. Dr. Necat Yılmaz'a;

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

<b>ÖZ</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>iii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iv</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>vi</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>vii</b>
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR</b> .....	<b>viii</b>
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR (devamı)</b> .....	<b>ix</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ARAŞTIRMASI</b> .....	<b>3</b>
2.1. BAKTERİYOFAJLAR.....	3
2.1.1. Bakteriyofajların Sınıflandırılması.....	3
2.1.1.1. Kuyruklu Fajlar.....	6
2.1.2. Bakteriyofajların Yaşam Döngüleri.....	8
2.1.2.1. Lizogenik Yaşam Döngüsü.....	10
2.1.2.2. Litik Yaşam Döngüsü.....	10
2.2. FAJ TERAPİSİ.....	11
2.3. LEVREKLERDE GÖRÜLEN BAKTERİYEL ENFEKSİYONLAR ve VİBRİOSİS .....	15
2.4. <i>VİBRİO</i> GENUSUNUN ÖZELLİKLERİ.....	19
2.5. ÇALIŞMANIN AMACI.....	20
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM</b> .....	<b>21</b>
<b>4. BULGULAR ve TARTIŞMA</b> .....	<b>32</b>



<b>5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....</b>	<b>51</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>52</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>62</b>



## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<b><u>Sayfa</u></b>
Çizelge 2.1. Faj temel özellikleri ve sınıflandırması .....	5
Çizelge 4.1. Bakterlerin API 20E test sonucu profilleri .....	41
Çizelge 4.2. Fajların morfolojik karakterleri.....	48



## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b><u>Sayfa</u></b>
Şekil 2.1. Bradley Sınıflandırması.....	4
Şekil 2.2. Bakteriyofaj familyaları.....	6
Şekil 2.3. Kuyruklu faj ailelerinin temsili çizimleri.....	8
Şekil 2.4. Bakteriyofajların iki yaşam döngüsü.....	9
Şekil 2.5. Levreklerde Vibriosis vakasında ağız çevresi, operkulum, yüzgeç, göz ve ağız çevresi kanama.....	18
Şekil 4.1. TCBS ve MacConkey agarda oluşan sarı koloniler.....	35
Şekil 4.2. Bakterilerin Gram Boyama Profili.....	35
Şekil 4.3. DAPI ile Boyanan Bakterilerin Epifloresan Mikroskop Görüntüsü...	36
Şekil 4.4. Mide- barsaktan izole edilen bakterilerin TCBS agarda koloni morfolojileri.....	36
Şekil 4.5. Böbrekten izole edilen bakterilerin koloni morfolojileri.....	37
Şekil 4.6. Karaciğerden izole edilen 24 saatten yaşlı kültürlerdeki siyah pigment oluşumu.....	38
Şekil 4.7. Karaciğerden izole edilen bakterilerin koloni morfolojileri.....	38
Şekil 4.8. Sırasıyla B11, K8, K5, B12 ve B15 bakterilerinin API 20 E stripleri görüntüleri.....	38
Şekil 4.9. NCBI gen bankasındaki referans genomlarla eşleştirilerek ve Fast "Minimum Evolution Tree" yöntemi kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaç.....	43
Şekil 4.10. Böbrekten izole edilen B12 bakteri fajının plak morfolojisi negatif görüntüsü.....	44
Şekil 4.11. Böbrekten izole edilen B11 bakteri fajının plak morfolojisi negatif görüntüsü .....	45
Şekil 4.12. Böbrekten izole edilen B15 bakteri fajının plak morfolojisi negatif görüntüsü.....	45
Şekil 4.13. Karaciğerden izole edilen sırasıyla K8 bakterisi faj plaklarının morfolojisi negatif görüntüsü.....	46
Şekil 4.14. Karaciğerden izole edilen sırasıyla K5 bakterisi faj plaklarının morfolojisi negatif görüntüsü.....	46

Şekil 4.15. Bakteriyofajların Epifloresan Görüntüsü.....	47
Şekil 4.16. Bakteriyofaj genomlarının HindIII restriksiyon endonükleaz enzim patterni .....	48
Şekil.4.17. Fajların TEM Görüntüsü(100.000X) .....	49
Şekil 4.18. K5 bakterisi fajı TEM görüntüsü (200.000 X).....	50
Şekil 4.19. K8 bakterisi fajı TEM görüntüsü (200.000 X).....	50
Şekil 4.20. B11 bakterisi fajı TEM görüntüsü (200.000 X).....	51



## SİMGELER ve KISALTMALAR

°C	santigrat derece
µl	mikro litre
µg	mikro gram
kb	Kilobaz
ADH	Arjinin dihidrolaz
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNase	Deoksiribonükleaz
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
EtBr	Etidyum bromid
IND	İndol
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
FTS	Fizyolojik tuzlu su
LDC	Lizin Dekarboksilaz
ODC	Ornithin Dekarboksilaz
ONPG	Orta nitrofenil beta galaktosidaz
PEG	Polietilenglikol
pfu/ml	Mililitredeki plak oluşturma birimi
RNA	Ribonükleik asit
rRNA	Ribozomal Ribonükleik asit
rpm	round per minute
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TBE	Tris-Borik asit-EDTA
TCBS	Tiyosülfat sitrat safra tuzları sukroz agar
TDA	Triptofan Deaminaz
TSA	Triptik Soy Agar
TSB	Triptik soy
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
u	Unit
UV	Ultraviolet
VAM	<i>Vibrio anguillarum</i> besiyeri
VP	Voges-Proskauer

## **SİMGELER ve KISALTMALAR (devamı)**

JEL	Jelatin
GLU	Glukoz
MAN	Mannitol
SOR	Sorbitol
CIT	Sitrat
RHA	Rhamnoz
SAC	Sukroz
MEL	Melibioz
AMY	Amigdalın
ARA	Arabinoz
OX	Oksidaz

## 1. GİRİŞ

Su ürünleri yetiştiriciliği, dünya besin gereksiniminin önemli kısmını karşılayan temel bir endüstridir. Asya ülkelerinde yüzyıllardır uygulanmaktadır. Özellikle son 50 yılda eğitim merkezleri ve hızlı teknoloji transferi ile şaşırtıcı bir gelişim göstermiştir. Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) tarafından dünyada en hızlı büyüyen gıda sektörü olarak belirlenmiştir. Dünyada yetiştiricilikle üretilen su ürünleri miktarı 1980’de 7,4 milyon tondan 1990’da 16,8 milyon tona ve 2002 yılında 40 milyon tona ulaşmıştır. Su ürünleri yetiştiriciliği, dünya balıkçılık üretiminin yaklaşık %30’unu karşılamakta [Davenport vd., 2003] ve yılda % 10’dan daha fazla artarak büyümektedir.

2014 yılı istatistiklerine göre Türkiye kültür balıkçılığı üretimi 537 bin 345 ton olarak belirlenmiştir. 2013 yılı avlanan deniz ürünleri üretim rakamlarına bakıldığında, Türkiye 339 bin ton ile Avrupa ülkeleri arasında 7. sırada yer almaktadır. [FAO, 2014; Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK), 2014] Yetiştiriciliği yapılan türler arasında 78 bin ton ile tatlı suda en çok üretilen alabalıktan sonra, denizde yetiştirilen 50 bin ton levrek gelmektedir [TÜİK, 2014].

Euryhalin bir tür olan deniz levreği (*Dicentrarchus labrax*), Akdeniz’de yetiştiriciliği yoğun olarak yapılan bir türdür. Genellikle kıyısız alanlarda yaşamını sürdüren bu tür, sıcaklığa ve tuzluluğa toleransı nedeniyle daha çok lagünlerde ve nehir ağızlarında yayılım gösterir. Yaz sonunda kıyısız alanlara ve nehir ağızlarına doğru üreme göçleri yaparlar [Dando ve Demir; 1985; Pickett ve Pawson; 1994; Jensen vd., 1998].

Bu türün ekonomik değerinin yüksek olması ve yetiştiriciliğinin giderek artması nedeniyle, yetiştiriciliğinde karşılaşılan hastalık sorunlarının da çözülmesi oldukça önem kazanmaktadır. Kültür balıkçılığında artış hızla devam ederken üretimde karşılaşılan en önemli sorunlardan birisi de ekonomik kayıplara yol açan hastalıkların ortaya çıkmasıdır. Kızıl hastalığı (Vibriosis) balıklarda en sık karşılaşılan enfeksiyonlardan biridir. Hastalığın etmenlerinin başında *Vibrio anguillarum* gelmektedir [Demircan ve Candan, 2006]. Hastalık birçok literatürde red pest, kırmızı hastalık, pestis rubia anguillarum, erysipelosis anguillarum, cod

pest, göz hastalığı, ülser, bakteriyel dermatitis ve tuzlu su furunkulozisi gibi isimlerle ifade edilmiştir.

Ülkemizde ve tüm dünyada balık hastalıklarını tedavi etmek için çeşitli antibakteriyel maddeler kullanılmaktadır. Bu maddelerin uygunsuz ve kontrolsüz kullanımı ise dirençli bakterilerin ortaya çıkmasına ve giderek kullanılabilir etkili antibiyotik sayısının azalmasına neden olmaktadır. Bu durumda tedavideki başarısızlık ile mortalite ve tedavi maliyeti artmaktadır. [Smith vd., 1994; Colquhoun vd., 2007].

On yıldan fazla bir süredir, antibiyotik kullanımına bir alternatif olarak, patojen bakterileri, onların doğal düşmanları olan bakteriyofajları kullanarak yok etme düşüncesinin benimsenmiş ve faj terapisi adı verilen bir tedavi yöntemi üzerine yoğunlaşmıştır [Breitbart vd, 2002; Hambly vd, 2005; Weinbauer vd, 2004].

Yetiştiriciliği yapılan ve ekonomik katma değere sahip balıklarda bakteri hücrelerini özgül olarak öldüren yapıların bulunması, fajların bakterilerle savaşta etkili silahlar olarak kullanılabilirliklerini düşündürmüştür. Bu amaçla bazı spesifik fajlar üretilmiş ve bu fajlar basilli dizanteri ve kolera başta olmak üzere bir çok hastalığın tedavisinde, kontamine olmuş suların temizlenmesinde uzun yıllar denemiştir. Son yıllarda fajların yine özellikle antibiyotiklere direnç geliştirmiş enfeksiyon etkenlerine karşı kullanılmasıyla ilgili çalışmalar başlamış ve bir çok araştırmacı olumlu sonuçlar almıştır [Chan vd. 2012; Chibani-Chennoufi vd., 2004; Lorch, 1999; Biswas vd., 2002; Kudva vd., 1999].

Bu çalışmada, faj terapisinde kullanım potansiyeline sahip bakteriyofaj kültürleri elde etmek ve elde edilen bakteriyofajların morfolojik genomik karakterizasyonları amaçlanmıştır. Faj terapisi antibiyotik kullanımına alternatif bir tedavi yöntemi olup, bu yöntemle ülkemiz balık yetiştiriciliğinde ekonomik bir yeri olan Levrek'te gözlemlenen *Vibrio* enfeksiyonları ile etkin bir mücadele yöntemi olacağı düşüncesindeyiz.



## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1. BAKTERİYOFAJLAR

Bakterileri enfekte eden virüsler, bakteriyofajlar olarak adlandırılırlar. Fajlar, bakterilerin zorunlu parazitleri olup, yalnızca canlı bakteri hücreleri içinde çoğalabilirler. Bakteriyofaj kelimesi; bakteri ve Yunanca'da yeme anlamına gelen 'Phagein' kelimelerinden oluşmakta ve bu kelime 'bakteri yiyen' anlamına gelmektedir [Chhibber, 2012].

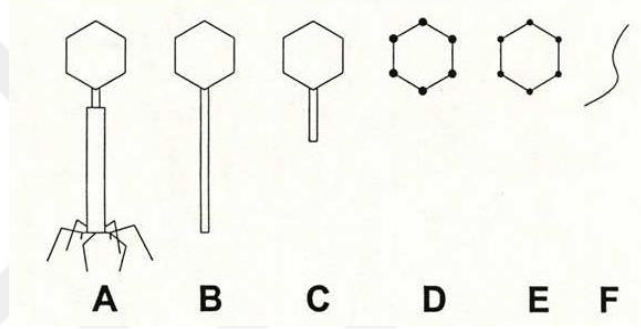
#### 2.1.1. Bakteriyofajların Sınıflandırılması

Sınıflandırma çalışmaları sayesinde tanımlanmış olan 5000'den fazla fajın özellikleri kategorize edilerek, izole edilen yeni fajların da hangi gruplara ait oldukları belirlenmiştir. Ayrıca, tedavide ve endüstriyel çalışmalarda kullanılabilen yararlı fajlar ile biyoteknoloji ve fermentasyon işlemlerinde zararlı olabilecek fajlar tanımlanmış, koleksiyonları oluşturularak kontrol altına alınmıştır [Ackermann, 2005; Ackermann, 2006].

Modern faj araştırmaları, keşfedildikleri 1915 yılında Frederick W. Twort ile başlamış, Felix d'Herelle ile devam etmiştir [Summers, 2005]. Daha sonra, Felix d'Herelle'nin *Bacteriophagum intestinale* olarak adlandırdığı ve tek tip olduğunu düşündüğü fajların; partikül büyüklüklerine, konakçı dizgelerine, serolojik ve stabil kalabilme özelliklerine göre alt gruplara ayrıldığı görülmüştür [Ackermann, 2005; Ackermann, 2006]. 1930 yılında, virüs taksonomisi ve terminolojisi için ilk girişimlerde bulunulmuş, ancak basit taksonomik bir dayanağın bulunamaması nedeniyle sınıflandırma çalışmalarında başarı sağlanamamıştır [Tikhonenko, 1970].

1943 yılında elektron mikroskopunun keşfiyle, fajları öncelikle üç morfolojik tipe ayırmak mümkün olmuştur. Daha sonra konakçı dizgesi, plak ve partikül büyüklüğü, sıcaklık ve üreye dayanıklılıkları dikkate alınmış ve 46 faj sınıfı oluşturulmuştur. Ancak, adı daha sonra International Committee of Taxonomy of Viruses, Uluslar Arası Virüs Taksonomi Komitesi (ICTV) olarak değiştirilen komite bunu kabul etmemiş ve tüm virüslerin kendi fizikokimyasal özelliklerine bakılarak sınıflandırılmasını uygun görmüştür. 1962 yılında Lwoff, Horne ve Tournier (LHT);

virüslerin içerdikleri nükleik aside, kapsid şekline, zarfı olup olmamasına ve kapsomer sayısına göre sınıflandırılmasını önermişlerdir. Bunun üzerine, virüslerin dört çift karakterden oluşan kriptogramlarının çıkarılması istenmiştir. Elektron mikroskopunda ve preparat hazırlama tekniklerinde kaydedilen gelişmeler sonucunda, fajların morfolojik olarak sınıflandırılması mümkün olmuştur [Matthews, 1985]. 1967 yılında Bradley, taşıdıkları nükleik asit tipine ve morfolojik yapılarına göre fajları 6 basit tipe (A – F) ayırmıştır (Şekil 2.1.). Bradley sınıflandırmasındaki gruplar içinde bulunan faj sayısı ve tipi; kübik, filamentöz ve pleomorfik fajların keşfi ve eklenmesiyle daha da genişlemiştir. 1971 yılından bu yana geçerliliğini koruyan Bradley sınıflandırmasına göre; Şekil 2.1.'de gösterildiği gibi 6 faj cinsinin varlığı kabul edilmiştir [Arda, 2000; Ackermann, 2005].



Tip	Nükleik asit	Özellik
A	DNA, 2, L	Polihedral baş, kuyruk etrafında kontraktıl kılıf, kuyruk levhası, kuyruk iğnesi ve fibrilleri
B	DNA, 2, L	Polihedral baş, kontraktıl kılıfı olmayan uzun kuyruk
C	DNA, 2, L	Polihedral baş, kontraktıl kılıfı olmayan kısa kuyruk
D	DNA, 1, C	Kuyruksuz, ikosahedral baş, kapsid üzerinde çok büyük kapsomer
E	RNA, 1, L	Kuyruksuz, ikosahedral baş, kapsid üzerinde küçük kapsomer
F	RNA, 1, L	Fleksibl filamentöz

Şekil 2.1. Bradley Sınıflandırması (1; Tek iplikçik, 2; çift iplikçik, L: Lineer C: Sirküler ), [Bradley, 1967]

Daha sonra, fajların morfolojik özellikleri yanında nükleik asit yapılarının da dikkate alındığı 'Ackermann Sınıflandırması' olarak adlandırılan, diğer bir

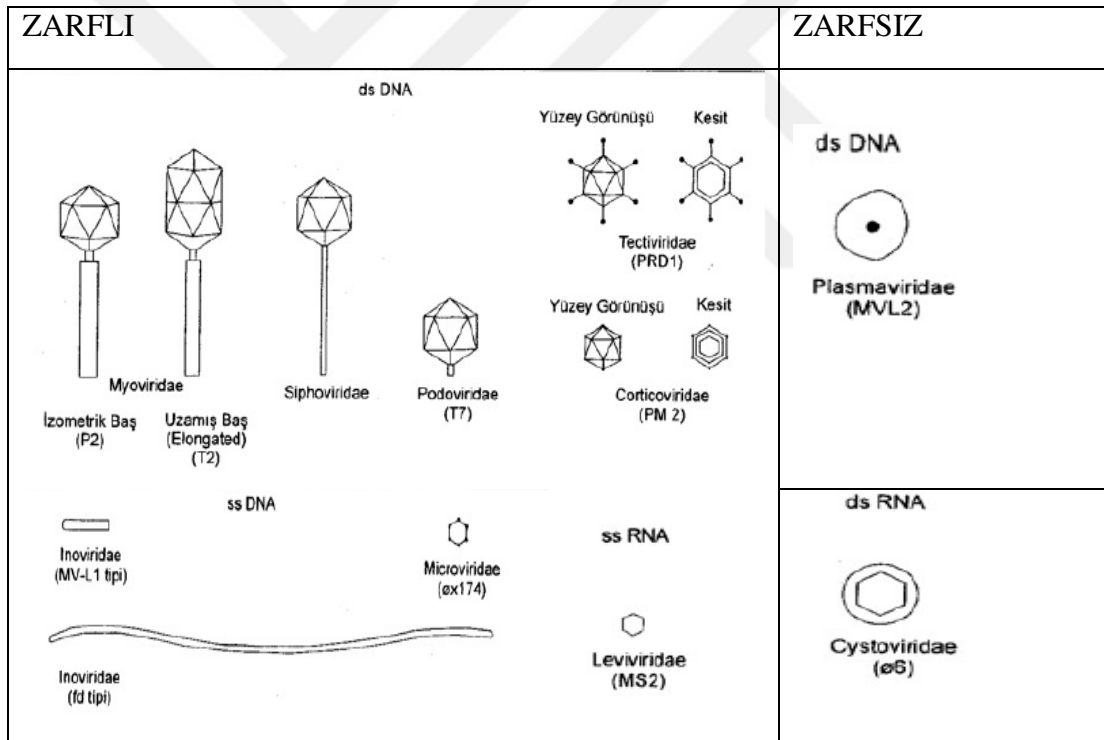
sınıflandırma modeli geliştirilmiştir (Çizelge 2.1.) [Ackermann 1987]. 1959 yılından 1990 yılına kadar 3400 [Ackermann, 1991], günümüze kadar ise yaklaşık 5100 adet değişik bakteri türlerine özgül faj; dört yapısal gruba ayrılmış ve 1 takım, 13 aile ve 31 cins olarak karakterize edilmiştir. Bradley ve Ackermann sınıflandırmalarına göre kübik, filamentöz ve pleomorfik grupta yer alan faj sayısı yaklaşık 180'dir ve 10 küçük aile içinde toplanmıştır [Ackermann, 2001, Ackermann, 2003, Ackermann, 2005, Ackermann, 2006].

Çizelge.2.1 Faj temel özellikleri ve sınıflandırması [Ackermann, 2007]

Morfoloji	Nükleik Asit	Takım ve Familyalar	Cins	Örnek	Üye Sayısı	Özellikleri
Kuyruklu	dsDNA (L)	<i>Caudovirales</i>	15		4950	
		<i>Myoviridae</i>	6	T4	1243	Kontraktıl
		<i>Siphoviridae</i>	6	V	3011	Kuyruk
		<i>Podoviridae</i>	3	T7	696	Uzun Kuyruk Kısa Kuyruk
Polihedral	ssDNA (C)	<i>Microviridae</i>	4	cX17	40	
		<i>Corticoviridae</i>	1	4	3?	Lipid ,çeren
		<i>Tectiviridae</i>	1	PM2	18	Kompleks
		<i>Leviviridae</i>	2	PRD1	39	Kapsid
		<i>Cystoviridae</i>	1	MS2	1	Lipoprotein
Filamentöz	ssDNA (C)	<i>Inoviridae</i>	2	fd	57	Lipid zarf
		<i>Lipothrixviridae</i>	1	TTV1	6?	Uzun veya
		<i>Rudiviridae</i>	1	SIRV	2	Kısa
			1			Filament Lipid Zarf TMV Benzeri Yapı
Pleomorfik	dsDNA (C, S)	<i>Plasmaviridae</i>	1	L2	6	Kapsid Yok, Lipid Zarf
	dsDNA (C, S)	<i>Fuselloviridae</i>	1	SSV1v	8?	Kapsid Yok, Limon Formlu

ds: çift sarmal C: sirküler S: parçalı, ss: tek sarmal L: lineer T: süper helikal

Virüs sınıflandırmasında, morfolojik yapı ve nükleik asit doğası ön plandadır. Ancak, cins ve türlerin ayrımı için belirgin bir kriter bulunmamaktadır. Bu nedenle ICTV, sınıflandırma için uygun özellikleri belirlemekte ve taşınabilir kriterler seti hazırlamaktadır. 'Polytetik Türler Kavramı' denilen bu sistemde bir faj türü, belirlenmiş özelliklerden tamamını veya bir kısmını taşıyarak tanımlanabilmektedir. Dolayısıyla, aynı grupta yer alan fajların birbirleri ile birebir benzerlik gösteremeyeceği bilinmektedir. Nükleik asit doğası, partikül yapısı, DNA-DNA hibridizasyonu, nükleotit veya aminoasit sekansları gibi parametreler bu sınıflandırma sistemi için kullanılabilir. Şu anki sistem aileye kadar tanımlama yapabilmekte (Şekil 2.2., Çizelge 2.1.), daha ayrıntılı yani tür bazında sınıflandırmaya gidememektedir [ICTV; Ackermann, 2003; Ackermann, 2005].

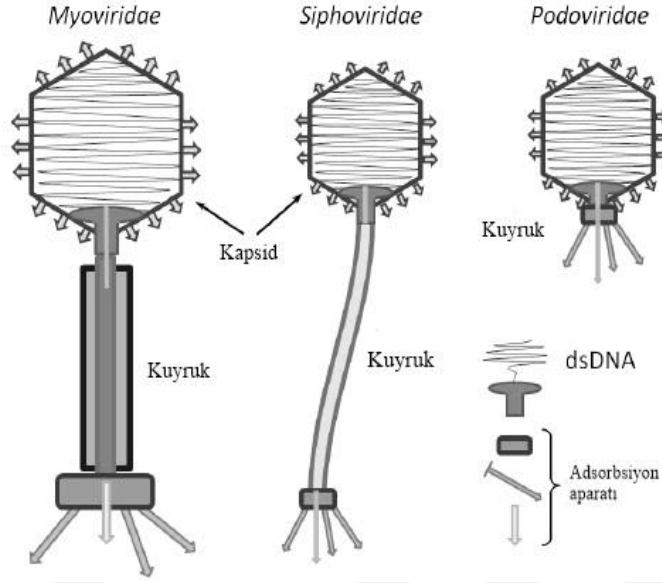


Şekil 2.2. Bakteriyofaj familyaları [Ackerman, 2007]

#### 2.1.1.1. Kuyruklu Fajlar

Faj popülasyonunun % 96'sını, 5100'e yakın üyesi ile 'kuyruklu fajlar' oluşturmaktadır [Maniloff ve Ackermann, 1998; Ackermann, 2001; Ackermann,

2003]. Kuyruklu fajlar, lineer çift sarmal DNA ve bu DNA'yı çevreleyen ikosahedral kapside ve helikal yapıda kuyruğa sahiptirler. DNA büyüklükleri 17-500 kb, kuyruk uzunlukları da 10-800 nm arasında değişmektedir. Kapsidleri, 'kapsomer' adı verilen alt ünitelerden kapsomerler ise 5 veya 6 adet 'protomer' den oluşmaktadır. Kontraktil veya kontraktil olmayan kuyruklarının sonunda kuyruk plağı, kuyruk iğnesi ve/veya fibrilleri bulunabilmektedir [Tikhonenko 1970; Prescott vd. 1993]. Büyük ve kompleks olan DNA'ların da, konakçı DNA'larından farklı olarak (T4 faj DNA'sında olduğu gibi) '5-hidroksimetilsitozin' veya '5-hidroksimetilurasil' bulunabilmektedir [Ackermann, 2006]. Birbirleriyle benzer morfolojik, fizikokimyasal ve fizyolojik özellikler taşıyan bu fajlar, 'monophyletic' bir evrim grubu oluşturmuş ve 'Caudovirales' (Cauda=kuyruk) adlı tek bir takım içerisinde yer almışlardır (Şekil 2.3.). Bununla beraber bu fajlar; büyüklüklerinin, DNA içerik ve kompozisyonlarının, proteinlerinin, serolojik özelliklerinin, konakçı dizgeleri ve fizyolojilerinin farklılıklar göstermesi nedeniyle *Myoviridae*, *Siphoviridae* ve *Podoviridae* familyaları (Bradley sınıflandırmasına göre sırasıyla A, B ve C grubu) içerisinde gruplandırılmışlardır [Maniloff and Ackermann, 1998]. *Myoviridae* familyasında bulunan fajlar kontraktil kuyruğa sahiptir ve kuyruklu fajların % 25'i bu grupta yer almaktadır. Kuyruklu fajların % 14'ünü oluşturan, kısa ve kontraktil olmayan kuyruğa sahip *Podoviridae* familyasında ise, 700 adet faj bulunmaktadır. Fajların geri kalan kısmı (% 61), kontraktil olmayan uzun kuyruğu ile karakterize edilen *Siphoviridae* familyası üyesidirler [Ackermann, 2001; Ackermann, 2003; Ackermann, 2005; Ackermann, 2006]. Kuyruklu fajlar, DNA veya RNA polimeraz varlığına, farklı baz içermelerine, nükleotit dizileri ile konkatamer oluşumlarına bakılarak 15 cinse ayrılmıştır. Sınıflandırılmayı bekleyen çok sayıda faj bulunduğundan, var olan cinsler okyanustaki adalar gibi düşünülmektedir. Şu anda, izolasyonları gerçekleştirilen fajlardan sadece 250 adedinin morfolojik yapıları, DNA-DNA hibridizasyon oranları, nükleotit dizi analizleri ve serolojik özellikleri dikkate alınarak tür bazında ayrımı yapılabilmektedir [Ackermann, 2003; Ackermann, 2005; Ackermann, 2006].



Şekil 2.3. Kuyruklu faj ailelerinin temsili çizimleri [Chibber ve Kumari, 2012]

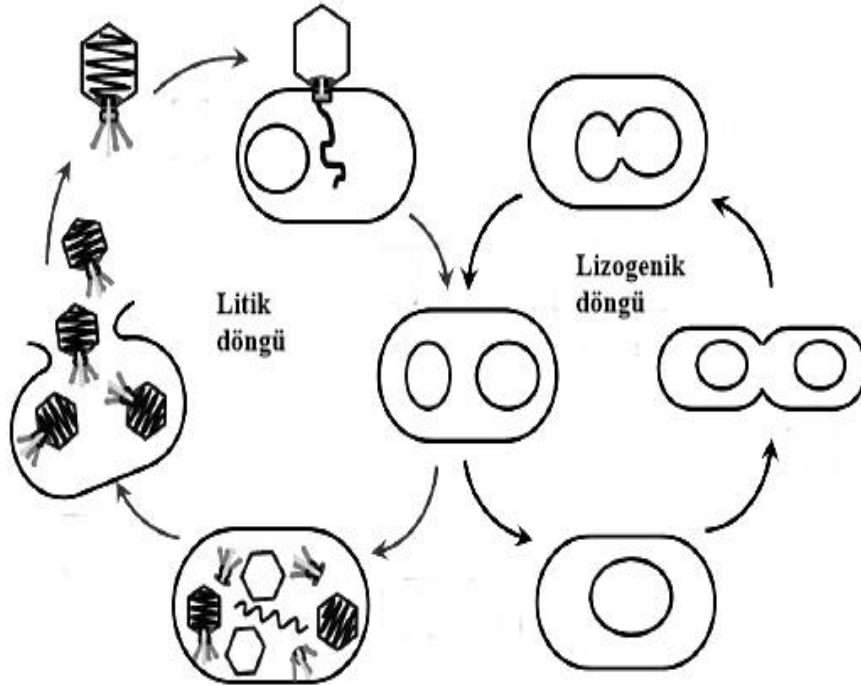
### 2.1.2. Bakteriyofajların Yaşam Döngüleri

Çift zincirli DNA'ya sahip fajların, konakçıları üzerinde litik ve lizogenik olmak üzere iki tip yaşam şekli vardır (Şekil 2.4.). Litik yaşam şeklini seçen fajlar virüent faj, lizogenik yaşam şeklini seçenler ise temperent (ılımlı) faj olarak adlandırılır [Guttman vd., 2005]. Fajın hangi yaşam döngüsüne gireceği Cro ve CI proteinleri arasındaki yarışa bağlıdır. Çünkü ikisi de aynı operatör (OL ve OR) bölgesine bağlanabilmektedir. Cro ve CI, operatörde bulunan 3 adet bağlanma bölgesine ters yönlerden tutunabilmektedir. CI proteini lizogenik döngünün; cro proteini ise litik döngünün başlaması ve devamı için gereklidir. Proteinlerden hangisi operatörün öncelik verdiği bölgeye bağlanırsa, kendi sentezini stimüle ederken diğer proteinin sentezini bloke eder. Buna göre de lizogenik veya litik yaşam başlamış olur. T4 fajı, virüent fajların; V fajı ise temperent fajların prototip örneği olarak kabul edilmektedir [Hendrix, 2002b; Lerner ve Lerner, 2003].

Her iki yaşam tipinde de, fajın konakçısına adsorbsiyonu ve DNA'sını enjekte etme aşamaları ortaktır [Birge, 2000; Guttman vd., 2005]. Kuyruklu fajlarda fibril, kuyruk plağı gibi özel adsorbsiyon yapıları, konakçı üzerindeki belirli moleküllere bağlanır. Gram negatif bakterilerde proteinler, oligosakkaritler,

lipopolisakaritler faj reseptörleri olarak görev yaparlarken; Gram pozitif bakterilerde daha kompleks olan murein tabakası, daha farklı bağlanma bölgelerini gerektirir. Birçok fajın konakçıya adsorbe olması, adsorbe olma hızı ve etkinliği, bazı maddelerin ortamda yüksek konsantrasyonda bulunmasına ve konakçının fizyolojik durumuna bağlıdır. Örneğin, T4 tipi fajlar iki ayrı aşamada ve farklı iki reseptöre bağlanarak konakçılara adsorbe olabilmektedirler. T4 fajı, ortamda L-triptofan olması durumunda konakçısına daha etkin şekilde bağlanabilirken; V fajı reseptörü, ancak maltoz varlığında aktive olmaktadır.

Fajın dönüşümsüz olarak hücre yüzeyine bağlanmasından sonra, faj DNA'sı kuyruk içerisinden geçerek konakçı hücre sitoplazmasına bırakılır. Kuyruk ucu, hücre membranında bulunan peptidoglikan tabakayı delici bir enzim sistemine sahiptir. Hücre yüzeyine bağlı olan kuyruk, DNA'nın, konakçıya uygun bir şekilde bağlanana kadar, kapsidde kalmasını sağlamaktadır [Garen ve Kozloff; 1959, Luria and Darnell; 1967 Guttman vd., 2005].



Şekil 2.4. Bakteriyofajların iki yaşam döngüsü [Chibber ve Kumari, 2012]

### 2.1.2.1 Lizogenik Yaşam Döngüsü

Lizogenik durum, CI, CII ve CIII kodlu üç viral proteinin varlığına bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Viral DNA'nın hücreye girişiyle birlikte, CI proteininin üretimi başlamakta ve bu protein sayesinde yeni faj partiküllerinin üretimi için gereken bilginin genom üzerinden okunması engellenmektedir. Dolayısıyla, litik döngüye geçiş mümkün olamamaktadır.

Sitoplazmada dairesel formda bulunan viral DNA; ya plazmid formunda kalmaya devam eder, ya da konakçı genomuna entegre olmaya başlar. İntegrasyon, attP ve attB bölgeleri arasında gerçekleşmektedir. CI proteininden sonra üretilmeye başlanan CII proteini, konakçı transkripsiyon organellerini kullanarak CI üretiminin devamını sağlarken; CIII proteini de, CII'nin konakçı enzimleri tarafından parçalanmasına engel olmaktadır. CI proteininin cro proteinine oranla daha fazla üretilmesi, viral genomun konakçı genomuna entegre olmasını indüklemektedir. İntegrasyon tamamlandığında ise, sadece CI'in üretimi söz konusudur. Buradan, lizogenik durumun oluşumunun ve devamının, CI, CII ve CIII proteinlerinin varlığına bağlı olduğu açık bir şekilde anlaşılmaktadır [Hendrix, 2002b; Lerner ve Lerner, 2003]. Bakteri genomuna entegre olmuş faj DNA'sına 'profaj', profajı taşıyan bakteriye de 'lizogen bakteri' adı verilmektedir. Artık viral DNA, konakçı DNA'sı ile aynı hızda replike olmakta ve kardeş hücrelere geçmektedir. Konakçı hücre viral DNA'yı taşıdığından, enfeksiyon durumu da devam etmekte ve dolayısıyla aynı karakterdeki başka bir faj ile enfeksiyonu söz konusu olamamaktadır. Bu duruma 'süperenfeksiyon' denilmekte ve faj direnç sistemlerinden biri olarak da kabul edilmektedir. Profajın; UV, mitomisin C, mutajenik maddeler ve inkübasyon sıcaklığındaki değişim ile indüklenebildiği bilinmektedir [Sanders; 1988, Neve; 1996; Birge, 2000; Hendrix, 2002b; Lerner ve Lerner 2003].

### 2.1.2.2. Litik Yaşam Döngüsü

Litik döngü, lizogenik döngüden 'Latent Dönem' olarak adlandırılan periyodun başlaması ile ayrılır. Çünkü faj DNA'sının hücre içine alınmasıyla,



konakçı RNA polimeraz enzimi devreye girer ve erken genlerin transkripsiyonu başlar. Bu gen ürünleri, faj genomunu konakçı tarafından sentezlenen endonükleazlara karşı korumakta ve fajın ihtiyacına göre konakçıda tekrar yapılanmayı sağlayabilmektedir. Ayrıca, konakçı proteazlarını ve diğer bazı proteinleri inaktive edebilmektedir. Daha sonra, orta (middle) genlerin transkripsiyonu ile yeni faj DNA'sının sentezi gerçekleşmektedir. Son olarak, geç genlerin kodlanması ile faj partikülünün kapsid, kuyruk, kuyruk fibrilleri gibi parçalarının üretimi, dolayısıyla faja özgül şekil oluşumu (morphogenesis) başlamaktadır [Hendrix, 2002b].

Prokapsid olarak adlandırılan tam yapılanmamış ikosahedral protein kılıf içerisinde, faj DNA'sı paketlenmekte ve kuyruk ile kapsid birleştirilmektedir (Klug and Cummings 2000). Litik döngünün son aşaması, konakçı hücrenin lizise uğratılmasıdır. Kuyruklu fajlar, lizinin gerçekleşmesi için iki bileşen kullanmaktadır. Bunlardan, 'lisin' enzimi peptidoglikan matriks içerisinde kesim yaparken; 'holin' adlı ikinci enzim de, iç membranda porlar açarak lisin enziminin peptidoglikan tabakaya ulaşmasını ve hücre lizisinin gerçekleştirilmesini sağlamaktadır [Guttman vd., 2005].

## 2.2. FAJ TERAPİSİ

Fajlar ilk olarak; İngiliz bilim insanı E. Hanbury Hankin 1896'da Hindistan'ın nehirlerinde, oldukça ince porselen filtrelerden geçirildiği halde, ayırt edici yapısı bozulmayan, kolera etmeni; *Vibrio cholera* üzerinde antibakteriyel etkisi olan bir canlı tespit ettiğinde rapor edilmiştir. Ancak bu canlının tanımlaması 1915 yılında Frederick W. Twort tarafından yapılmıştır. Felix d'Herelle 1916'da bir filtre yardımıyla, bakterilerden arındırdığı filtratı, dizanteri bakterisinin bulunduğu kültüre inoküle ederek, bakterinin öldüğünü gözlemlemiştir. Felix d'Herelle bu keşfini "görünmez, dizanteri mikrobu antagonisti" olarak yayımlamıştır. D'Hérelle, bu şekilde, bakteriyofajların hastalıkları tedavi edici yönünü keşfeden ilk kişiydi [Chibber ve Kumari, 2012].

1923'te Tiflis'te bakteriyofaj çalışmaları ve faj terapisini geliştirmek amacıyla Eliava enstitüsü açıldı. O zamandan beri birçok bilim insanı faj çalışmalarında yeni teknikler geliştirmiş ve çeşitli amaçlarda kullanmıştır. 1969'da Max Delbrück, Alfred Hershey ve Salvador Luria virüslerin genetik yapısı ve replikasyonu alanındaki çalışmalarıyla Nobel ödülü aldılar [Chibber ve Kumari, 2012].

1966-1996 yılları arasında Pollanda, Sovyetler Birliği ve Britanya' da yapılan çalışmalarda, fajlar; insanlara ve çocuklara, ağız yoluyla ya da bölgesel olarak uygulanarak, antibiyotiğe dirençli patojenleri tedavi etmek amacıyla kullanılmıştır. *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Shigella* and *Salmonella spp* gibi patojenlerin sebep olduğu, iltihap oluşturan yara enfeksiyonları, sepsis, mide-barsak iltihabı, kemik iliği iltihabı deri iltihabı gibi enfeksiyonları tedavide kullanılmış ve yöntem yüksek oranda başarı göstermiştir [Alisky vd., 1998].

1982, 1983 yıllarında Britanya'da Smith ve Huggins, farelerde görülen *E.coli* enfeksiyonlarında ve genç buzağı ve domuzlardaki diyareik hastalıklarda bir seri kontrollü deneylerde faj terapisini kullanarak olumlu sonuçlar almışlardır [Morrison vd., 2004].

Asheshov vd. ve Ward yaptıkları deneyler sonucunda; fazla miktarda bakteriyofaj verilen hayvanların, bu canlılarda bulunan spesifik bakteriyel enfeksiyonlara karşı koruma geliştirdiklerini gösterdiler [Barrow vd, 1997].

Carlton, 1999'da, fajların ökaryotik canlılara zarar vermediği ve faj konaklarının spesifik olması dolayısıyla antibiyotiklerin aksine oldukça zararsız bir yöntem olduğunu bir çalışmasında bildirmiştir.

1999 yılında Nakai ve diğerleri yaptıkları bir çalışmada; Sarı kuyruk balığında hastalık etmeni *L. garvieae*'nin faj terapisi ile kontrolü amacıyla, bu bakterinin fajlarını izole etmişlerdir. Fajlar, Sarı kuyruk balığının yemine uygulanmıştır. Aynı zamanda fajlar, balığın enfekte olmuş dalak ve bağırsağına

enjekte edilmiştir. Uygulanan tedavi sonrası hayatta kalma oranı, faj kullanılmadan uygulanan tedavi yöntemine oranla daha yüksektir.

Bir başka çalışmada; *P. plecoglossicida* enfeksiyonunu tedavi etmek amacıyla, ayu balığının yemlerine fajlar inoküle edilmiştir. *P. plecoglossicida* ile enfekte edilen ayu balıklarında, bakteriler ilk olarak böbrekte gözlenmekteydi. Faj uygulanan balıklarda ise böbrekte bakterilerin üremediği gözlenmiştir. Faj uygulanan balıklarda ölüm oranı % 22,5 iken, tedav uygulanmayan ayu balıklarında ölüm oranı % 60 olarak gözlenmiştir. Sonuçlar; ağız yoluyla uygulanan fajların, iç organlarda hedef bakteriyel hücrelerin öldüğünü, vücuda ait enfeksiyon evrelerinde faj terapisinin etkili olduğunu bildirmişlerdir [Park vd., 2000].

İnsanlarda ve deneysel olarak enfekte edilmiş hayvanlardaki bazı enfeksiyonların tedavisinde fajların, antibiyotiklerden daha etkili oldukları rapor edilmiştir. Başka bir çalışmada *Staphylococcus aureus* fajları akciğer enfeksiyonu olan hastaların tedavisinde kullanılmıştır. Hastalar iki gruba bölünmüştür; A grubundaki 223 hasta faj ile, B grubundaki 117 hasta ise antibiyotik ile tedavi edilmiştir. Bu klinik çalışma; fajların, damar yoluyla (i.v) uygulandığı ender çalışmalardan birisidir. Sonuçların değerlendirilmesinde hastanın genel durumu, X-ray muayenesi, kan ve balgamın mikrobiyolojik değerlendirmesi dikkate alınmıştır. i.v olarak faj uygulanan hastaların hiç birinde herhangi bir yan etki saptanmamıştır. Faj ile tedavi edilen grupta %82 oranında tam iyileşme, antibiyotik ile tedavi edilen grupta ise %64 oranında iyileşme gözlenmiştir. Faj tedavisi uygulanan hastalardaki iyileşme oranı (95%) oldukça yüksektir. Fajların insanda terapötik kullanımı ile ilgili mevcut literatür bulgularının büyük çoğunluğu Doğu Avrupa ve Rusya'ya aittir [Morrison vd., 2004].

Yapılan bir çalışmada, bilim insanları balık çiftliklerinden izole ettikleri 7 farklı faj tipi ile farklı coğrafik bölgelerde bulunan 183 *V. harveyi* suşu üzerindeki litik etkisini test etmişlerdir. Sonuç olarak % 15 ile % 69 arasında litik aktivite gözlemlenmiştir. Her faj spesifik *Vibrio* türüne etki etmiştir [Shivu vd., 2006].

Vinod vd., 50 *V. harveyi* izolatu üzerinde karides çiftliklerinden izole ettikleri fajların litik aktivitesini test etmişlerdir. Sonrasında yapılan deneyler hem laboratuvarında hem de *Penaeus monodon* (Asya karidesi) larvalarının enfeksiyondan korunma potansiyelini belirleyebilmek amacı ile karides çiftliğinde gerçekleştirildi. Laboratuvarında gerçekleştirilen deneylerde patojenik *V. harveyi* ile enfekte karides larvalarında hayatta kalma oranı %45 - %55 arasında arttığı gözlemlenmiştir. Karides çiftliğinde yapılan deneylerde fajların eklenmesini takip eden 17 gün süresince enfeksiyondan kurtulan karides sayısı %17'den %86'ya kadar artmıştır. Antibiyotik uygulanan karideslerde hayatta kalma oranı ise %40'tır [Vinod vd, 2006].

Walakira vd, kedi balığında enterik kasılmalara sebep olan *Edwardsiella ictaluri*'ye spesifik 2 litik bakteriyofaj izole etti ve bu fajların geniş konak aralığına sahip olduğunu bildirdiler. Litik fajların bu özelliği ile faj terapisi çalışmalarında kolaylıkla kullanılacakları düşünülmüştür [Romero vd, 2012].

Yapılan başka bir çalışmada bilim insanları, deniz bakterilerini enfekte eden fajların izolasyonu ve karakterizasyonunda metagenomik çalışmışlardır [Kang vd., 2013].

Karides çiftliklerinde meydana gelen ölümlerin önemli sebeplerinden biri de bakteriyel enfeksiyonlardır. Bu enfeksiyonların etkenleri arasından *Vibrio* bakterileri yüksek derecede tehdit oluşturmaktadır. Bu probleme yönelik yapılan bir çalışmada *Vibrio sp.* ve bakterinin fajları olan V1G, V1P1, V1P2'nin evrimsel etkileşimlerini değerlendirmek üzere faj kokteyli hazırlanarak bakteriyel enfeksiyon bulunduklarından şüphelenilen karides larvalarına verilmiştir [Barbosa vd.,2013].

Litik fajlar, hedeflenen patojen bakteriye oldukça spesifik olmaları, genomlarında integrasyon genleri içermedikleri, lizogenik fajların aksine konak bakteri ile birlik içinde olmadıkları ve etkili bir şekilde lizis gerçekleştirdikleri için, patojen bakterilerin biyokontrolünde tercih edilmektedir [Brüssow, 2005].

Doğada bol miktarda bulunan bakteri virüsleri olan bakteriyofajların, doğal sistemlerdeki bakteriyel popülasyonunun kontrol altına alınmasında çok önemli olduğu düşünülmektedir [Abedon, 2008].

Günümüzde patojen bakterilerdeki çoklu antibiyotik direnci ve bu organizmaların neden olduğu enfeksiyonların immun sistemi baskılanması hastalardaki artık kritik bir sorun olmaya başlamıştır. Antibiyotiklere dirençli bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavi maliyetlerinin yüksekliği ve direncin bakteriler arasında hızlı yayılması, antibiyotiklerin etkilerini sınırlar ve bazı olgularda da tamamen yetersiz kılar. Bakterilerdeki direnç probleminin giderek önem kazanması antienfektif modellerin, modern tıpta ve biyoteknolojide öncelik kazanmasına neden olmaktadır. Antibiyotiklerin keşfi ve yaygın kullanımlarından önce, litik faj terapisi konvansiyonel antibiyotiklere alternatif olarak önerilmiştir. Klinik çalışmalarda bakteriyofajların çeşitli patojenlerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde oldukça etkili oldukları görülmektedir. [Sulakvelidze vd., 2011].

### 2.3. LEVREKLERDE GÖRÜLEN BAKTERİYEL ENFEKSİYONLAR ve VİBRİOSİS

Levrek (*Dicentrarchus labrax*, L. 1758) balığına biyolojisi;

*Morone labrax* ve *Roccus labrax* sinonimleri ile de adlandırılan levrek,

Phylum: Vertabrata

Subphylum: Pisces

Classis: Osteichthyes

Subordo: Percoidei

Familia: Serranidae

Genus: *Dicentrarchus*

Species: *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) şekliyle sistematikteki yerini almıştır.

Levrek balıkları, tüm Akdeniz'den, İngiltere'nin kuzey sahillerine ve Kanarya Adaları'na kadar yayılım gösterir. Ülkemizde rapor edilmiş yetiştiriciliği yapılan levreklerde görülen bakteriyel hastalıklardan; vibriosis [Timur ve Korun, 2004; Akaylı ve Timur, 2004; Demircan ve Candan, 2006], pasteurellosis [Candan vd., 1996; Çolak, 1999; Yaman vd., 2003; Korun ve Timur, 2005] tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de üretimi kısıtlayan en önemli faktörler arasındadır [Austin, B., 1987]. Levrek balıklarında görülen diğer bakteriyel hastalıklar daha az düzeyde kayıplara neden olmaktadır.

Vibriosis Türkiye'de ve dünyada en yaygın görülen hastalıktır. Açık denizlerle bağlantısı olan kapalı kıyı su (östarin) ve deniz balığı artıklarıyla beslenen tatlı su balıklarında çok sık görülüşü rapor edilmiştir [Toranzo vd, 2005; Candan ve Karataş, 2010; Actis vd., 2011]. Vibriosis etmeni olan *Vibrio* ilk defa 1718 yılında yılan balıklarından izole edilmiştir ve Bonaveri tarafından "kızıl veba" olarak tanımlanmıştır. Etkenin identifikasyonu 1893 yılında Canestrini tarafından yapılarak *Bacterium anguillarum* olarak isimlendirilmiştir. Daha sonra Bergman tarafından 1907 'de İsveçte kafeslerde yetiştiriciliği yapılan yılan balıklarından aynı etken izole edilmiş ve 1909 yılında da identifikasyonu tamamlanarak bakteriye *Vibrio anguillarum* adı verilmiştir.

Avrupa'da rapor edilen ilk bakteriyel balık hastalığıdır Amerika'da 1953 yılında rapor edilen vibriosis Rucker ve arkadaşları tarafından chum salmon (*O. keta*) balıklarından *V. anguillarum* izole edilmesiyle bildirilmiştir. Daha sonra deniz ve tatlı su balığı olan (salmonid, kalkan, levrek, çipura, ayu, morina ve kırmızı mercan gibi) 50'ye yakın türde birçok ülkede büyük kayıplara neden olduğu bildirilmiştir [Toranzo ve Barja, 1990; Actis vd., 2011].

Tüm dünyada gelişen su ürünleri yetiştiriciliğine paralel olarak farklı *Vibrio* türlerinin hastalık oluşturduğu görülmüştür [Austin ve Austin, 2007]. Bu hastalığın etkeni olan bakteriler, *V. anguillarum* (*Listonella anguillarum*), *V. ordalii* (*V. anguillarum* biyotip 2) [Schiewe vd., 1981], *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. damsela* (*Photobacterium damsela*), *V. harveyi* (*V. cairchariae*) [Kraxberger-Beatty

ve McGarey, 1990], *V. splendidus*, *V. cholerae* non-O1, *V. marinus* (*Moritella marina*), *V. ichthyoenteri*, *V. logei*, *V. pelagius*, *V. trachuri*, *V. salmonicida* [Austin ve Austin, 2007], *V. tubiashii* [Hada vd., 1984], *V. campbelli* [Tendencia, 2002], *V. nereis*, *V. parahaemolyticus*, *V. viscosus* (*Moritella viscosa*), *V. mediterrani*, *V. fischeri*, *V. chagasii*, *V. pomeroyi* ve *V. kanaloae* [Thompson vd., 2003a] ve sınıflandırmaya sonradan katılan *V. xuii*, *V. brazillensis*, *V. neptunis* [Thompson vd., 2003b], *V. tasmaniensis* [Thompson vd., 2003c], *V. fortis sp* ve *V. hepatarius* [Thompson vd., 2003d] gibi türlerdir.

İlk olarak Schiewe ve arkadaşları tarafından 1977 yılında *V. anguillarum* iki farklı biyotipe ayrılmış, daha sonra biyotip 2 olarak tanımlanan tür 1981 yılında *V. ordalii* olarak isimlendirilmiştir [Actis vd., 2011]. *V. ordalii* salmonid balıklarda, çipuralarda ve levreklerde vibriosis etkeni olarak Avrupa'da ve ülkemizde rapor edilmiştir [Colwell ve Grimes, 1984; Candan, 1991; Çağırman ve Yürekli Türk, 1996; Akaylı, 2001; Toranzo vd., 2005; Korun ve Timur, 2008]. *V. anguillarum* ve *V. vulnificus* Akdeniz'de en sık karşılaşılan Vibriosis hastalığının etkenleri olarak bildirilmiştir. Ülkemizde vibriosis ilk olarak *V. anguillarum*'un çipura balıklarında hastalık etkeni olarak tanımlanmıştır [Candan, 1991]. Kültür levrek balıklarında ise vibriosis'e neden olan *Vibrio* türleri *V. anguillarum* [Çağırman ve Yürekli Türk, 1996; Akan vd., 1996; Korun, 2004; Demircan ve Candan, 2006; Korun ve Timur, 2008], *V. ordalii* [Timur vd., 2007; Korun ve Timur, 2008] *V. harveyi* [Korun ve Akaylı, 2004; Korun ve Timur, 2008] ve *V. alginolyticus* [Korun, 2008] olarak bildirilmiştir. *V. anguillarum* genellikle deniz balıklarında hastalık etkeni olarak bildirilmesine rağmen son yıllarda tatlı suda kültürü yapılan balıklarda da hastalık etkeni olarak rapor edilmiştir [Timur ve Korun, 2004].

Hasta levreklerde deri renginde koyulaşma, vücut üzerinde nekrotik lezyonlar ve erimeler klinik bulgulardır. Nekrotik lezyonlar daha çok abdominal kaslarda, erimeler karın altında, yüzgeç kaidelerinde ve ağız etrafında görülür. Kaudal yüzgeçte erime ve ülser görülür. [Çağırman ve Yürekli Türk, 1996]



Şekil 2.5. Levreklerde Vibriosis vakasında ağız çevresi, operkulum, yüzgeç, göz ve ağız çevresi kanama [Yaman vd. 2003].

Deniz suyu sıcaklığı arttığında deniz mikrobiyal florasında *Vibrio* türlerinin sayısının arttığı bilinmektedir. *V. anguillarum* deniz balıklarının normal bağırsak florasında bulunur. Hastalığın ortaya çıkmasındaki en önemli nedenlerden biri olumsuz çevre faktörlerinden kaynaklanan strestir. Etken deri, solungaç ve anüs yoluyla girerek hastalığa neden olur. Aynı zamanda enfekte gıdaların ağız yoluyla alınmasıyla da bulaşır [Yaman vd.; 2003; Sarjito vd., 2009; Noga, 2010; Actis vd., 2011]. Vibriosis akut ve kronik olarak görülebildiği bildirilmiştir. Balıkların tatlı su ve deniz suyundaki bakır (>30 g/ml) ve demir (>10 g/ml) moleküllerine maruz kalmaları hastalık çıkışının çevresel nedenleri olarak bildirilmiştir. Tedavi için



oksitetrasiklin, nitrofuranlar, sülfanamidler ve oksolinik asitin başarılı bir şekilde kullanıldığı, fakat özellikle *V. anguillarum* ve *V. salmonicida* türlerinin bu kemoterapötiklere direnç geliştirdikleri rapor edilmiştir [Noga, 2010].

Vibriosis hastalığının tedavisinde ve koruyucu olarak antibiyotikler ve kemoterapötik ajanlar yeme ilave edilerek kullanılmaktadır. Son yıllarda yetiştiricilik koşullarında balıklar ticari vibriosis aşuları ile her yıl aşılınmalarına rağmen, özellikle Vibriosise karşı aşılanmış levreklerde (*Dicentrarchus labrax*), *V. anguillarum* ve *V. ordalii* türlerinden başka bazı *Vibrio* türlerinin neden olduğu enfeksiyonlar rapor edilmiştir. Bu nedenle Avrupa su ürünleri yetiştiriciliğinde Vibriosis önemini hala korumaktadır [Pedersen vd., 1999]. İlk kez Canestrini (1893) tarafından göç eden yılan balıklarında (*Anguilla vulgaris*) “kızıl veba hastalığı” etkeni olarak *Bacillus anguillarum* olarak tanımlanmıştır. Bu bakteriye *V. anguillarum* ismini 1909 yılında Bergman vermiştir. Baumann ve arkadaşları tarafından 1978 yılında *Benecka anguillara* biyotip 1 olarak yeniden isimlendirilmesi önerilmiştir. Daha sonra McDowell ve Cowell tarafından 1985 yılında *Listonella anguillarum* olarak isimlendirilmesi önerilse de halen *Vibrio* genusu içerisinde yer alması gerektiği bir çok araştırmacı tarafından savunulmaktadır [Austin ve Austin, 2007; Actis vd., 2011]. *V. anguillarum*’un belirlenmiş (O1- O23) yirmiden fazla farklı serotipi olduğu rapor edilmiştir [Boesen vd., 1999]. Levreklerde çoğunlukla serotip O1 ve O3, alabalıklarda serotip O1 ve O2’nin enfeksiyonlara yol açtığı [Yaman vd., 2003; Korun ve Timur, 2008], ülkemizde son 15 yılda levreklerden izole edilen *V. anguillarum* suşlarının genellikle serotip O1 olarak teşhis edildiği bildirilmiştir [Çağırğan, 2004].

#### 2.4. *VİBRİO* GENUSUNUN ÖZELLİKLERİ

*Vibrio* türleri, Gram negatif, hareketli, kıvrık basil, 0,5-0,8 X 1,4-2,6 µm boyutlarında besiyerlerinde krem renğinde, yuvarlak, kenarları düzgün koloniler oluşturan, fermantatif, oksidaz pozitif, genellikle Öte yandan 2,4-diamino-6,7-diisopropylpteridine (O/129)’a hassas bakterilerdir. Optimum 20- 30°C’de üreme özelliği göstermelerine rağmen [Noga, 2010, Sarjito vd., 2009; Actis vd., 2011] tatlı

sularda 1-4°C'de hastalık oluşturdıkları rapor edilmiştir [Yaman vd., 2003]. Bazı O/129'a (150 µg) dirençli *V. cholerae*, *V. damsela* gibi *Vibrio* türlerinin yanı sıra *V. harveyi* suşlarının O/129'a dirençli olabileceği bildirilmiştir [Alsina ve Balnch, 1994; Karunasagar vd., 1994]. Aşağıda *Vibrio* genusunun sistematığı bulunmaktadır.

Kingdom: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Class: Gammaproteobacteria

Order: Vibrionales

Family: Vibrionaceae

Genus: *Vibrio*

*V. anguillarum* *Vibrionaceae* familyasının halofilik grubuna ait, Gram negatif, tek polar flagelası olan, 0,5 X 2 µm boyutlarında kıvrık çomak şeklinde, fakültatif anaerob, guanin ve sitozin (G+C) içeriği %43-46 olan, 25-30°C'de % 1,5 NaCl içeren TSA, BHI gibi zengin besiyerlerinde rahatça gelişebilen bir bakteridir. Katı besiyerinde yuvarlak düzgün, krem renkli koloniler oluştururlar [Timur ve Timur, 2003; Actis vd., 2011]. Sitokrom oksidaz, katalaz, ONPG (β- galaktosidaz), indol, nitrat, jelatin, amilaz, arjinin dihidrolaz, glukoz, mannitol, sakkaroz, mannoz, sorbitol, fruktoz testleri pozitif; lüminisans, üre, ornitin ve lizin dekarboksilaz, glukozdan gaz oluşumu, laktoz, ksiloz, ramnoz ve melibioz testlerine negatif olarak sonuç verdiği çeşitli araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir [Holt vd., 1994; Whitman 2004; Buller, 2004; Austin ve Austin, 2007]. MR, VP, sitrat, TSI, eskülin, arabinoz, maltoz, inositol ve galaktoz testleri için bu araştırmacılar tarafından farklı sonuçlar bildirilmiştir. Öte yandan O/129'a hassaslık, TCBS agarda sarı ve yeşil koloni oluşturma, *Vibrio anguillarum* Medium (VAM) seçici besiyerinin rengini sarıya çevirerek sarı koloniler oluşturma, 37°C'de ve % 3-5 NaCl içeren besiyerinde gelişebilme özellikleri aynı araştırmacılar tarafından verilen benzer özelliklerdir. Serotip 1 suşunun arabinoz testine pozitif sonuç verme eğiliminde olduğu bildirilmiştir [Toranzo and Barja, 1990].

*V. anguillarum* deniz ortamının normal mikrobiyal florasında ve deniz balıklarının barsaklarının normal florasında bulunur. Bakteri sayısı deniz suyu sıcaklığının artmasıyla yazın artar, kışın ise azalır. Bu patojenin deniz suyunda 50 aydan daha uzun süre canlı kaldığı tespit edilmiştir. [Austin ve Austin, 1993].

## 2.5 ÇALIŞMANIN AMACI

Bu çalışmada; deniz levreklerinde büyük kayıplara neden olan Kızıl hastalığı etkeni, *V. anguillarum* bakterisine özgü fajların, izolasyonu ve karakterizasyonun yapılması amaçlanmıştır.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1.MATERYAL

##### 3.1.1. Kullanılan Bakteri ve Bakteriyofajlar

Bu çalışmada; *Dicentrarchus labrax*'ın karaciğer, böbrek, mide-barsağı homojenize edildi. Homojenize edilen organlar Triptic Soya Broth (TSB) besiyerine eklendi ve bakteriler izole edildi. Bakteriyofajlar deniz suyundan 0.22 µm por çaplı filtrelerden geçirilerek izole edildi.

##### 3.1.2. Cam Malzemeler

Besiyeri içeren erlenlerin sterilizasyonu 121 °C'de 1,3 atm basınçta, 15 dakika bekletilerek yapıldı. Petri kapları Pasteur fırınında 200 °C'de, 2 saat süre bekletilerek steril edildi.

##### 3.1.3. İnkübatörler

Bakteri suşlarının ve bakteriyofajların kültürü hazırlanırken, katı kültür ortamlarının inkübasyonu, Nüve marka EN400 model (Nüve Sanayi Malzemeleri İmalat ve Ticaret A.Ş. Ankara, Türkiye) inkübatör ile gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılan bakteri suşlarının izolasyonu ve sıvı kültür ortamlarının inkübasyonu ise Edmund Bühler TH 15 orbital çalkalamalı inkübatör ile yapıldı.

##### 3.1.4. Santrifüj

Bakteriyofajların genomik DNA izolasyonunda Sigma 1-14 typ model santrifüj kullanıldı. Bakteriyofajların izole edilmesinde ve Nutrient Broth (NB) besiyerinde üretilmiş bakteri suşlarının çöktürülmesi aşamasında soğutmalı santrifüj (Hettich) kullanıldı.

### 3.1.5. Epiflorasan Mikroskobu

İzole edilen bakteri ve bakteriyofajlar DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) boyası ile boyanarak, Olympus BX51 model floresan mikroskop kullanılarak gözlemlendi.

### 3.1.6. Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM)

Faj titresi  $10^8$  pfu ml<sup>-1</sup> olarak hazırlanan bakteriyofaj izolatları, % 0,5 uranil asetat ile negatif boyanarak Transmisyon Elektron Mikroskobu (Jeol) ile karakteristik özellikleri, kuyruk ve kafa çapları gözlemlendi.

### 3.1.7. UV/White Transilüminatör

Agaroz jel elektroforezi sonuçları UVP White/ Ultraviolet Transilüminatör (UVP CA 91786, U.S.A) cihazı ile görüntülendi.

### 3.1.8. Nanodrop Cihazı

Bakteriyofajların genomik DNA izolasyonu sonucunda DNA miktarları Nanodrop (CapitalBio Nano) cihazı ile belirlendi.

### 3.1.9. Besiyerleri

Kullanılan besiyerleri ve içerikleri aşağıdaki gibidir.

Trypticase Soy Agar (Merck, 1.05458)

Kazein peptonu 15,0 g

Soya peptonu 5 g

NaCl 5,0 g

Agar-agar 15,0 g

Distile su 1 L

Trypticase Soy Broth (Merck, 1.05459)

Kazein peptonu	17,0 g
Soya peptonu	3,0 g
D(+) Glucose	2,5 g
NaCl	5,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,5 g
Distile su	1 L

Nutrient Broth (Merck, 1.05443)

Et peptonu	5 g
Et ekstraktı	3 g
Distile su	1 L

Nutrient Agar (Merck)

Et peptonu	5 g
Et ekstraktı	3 g
Agar-agar	12,0 g
Distile su	1 L

Top agar (% 0,7)

Nutrient Broth	8 g
Agar agar	7 g
Distile su	1 L

\*Besiyerlerine % 1,5 NaCl ilave edildi.

Thiosulphate Citrate Bile Salts Sucrose Agar (Merck, 1.10236),

Maya Özüdü	5 g
Pepton	10 g
Sodyum tiyosülfat	10 g
Sodyum sitrat	10 g
Sığır safra asitleri	5 g

Sakkaroz	20 g
Sodyum klorür	10 g
Demir sitrat	1 g
Bromtimol mavisi	0,04 g
Timol mavisi	0,04 g
Agar	15 g
Distile su	1 L

## 3.2. YÖNTEM

### 3.2.1. Levreklerden Bakteri İzolasyonu

1. Deniz levrekleri aseptik koşullar altında Mersin Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji laboratuvarına getirildi.
2. Levrekler dissekte edilerek karaciğer, böbrek, mide-barsakları izole edildi.
3. İzole edilen organların her biri ayrı ayrı homojenize edilerek, 100 ml %1,5 NaCl ilave edilmiş Trypticase Soy Broth (TSB) besiyeri içeren erlenlere inoküle edildi.
4. 25 °C'de 150 devir/dakika bir gece çalkalanmak suretiyle inkübe edildi.
5. 10 ml'lik cam tüplere 4,5 ml'lik steril distile sular hazırlandı ve 100 ml'lik erlenlerden 500 µL alınarak her bir organ için  $10^{-8}$  sulandırma oranına kadar seyreltme yapıldı.
6. Primer izolasyon için;  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  bakteri içeren cam tüplerden 100 µL örnek alınarak Trypticase Soy Agar (TSA) (%1,5 NaCl) içeren petri kaplarına drigalski saptülü ile ekim yapıldı.
7. Karaciğer, mide-barsak ve böbrek örneklerinin bulunduğu erlenlerden her organ için ayrı ayrı TSA (% 1,5 NaCl) içeren petri kaplarına direkt olarak azaltma yöntemiyle de ekim yapıldı.
8. Petri kapları 25 °C'de 1 gece etüvde inkübe edildi. TSA (% 1,5 NaCl) besiyerinde üreyen bakteri kolonileri seçilerek TCBS besiyerine öze yardımıyla azaltma yöntemiyle ekim yapıldı.

9. Primer izolasyondan sonra bakteri kolonilerini saflaştırmak için üç kez TCBS agara pasaj edildi. Pasajlar 24 saatte bir tekrarlandı.

10. TCBS besiyerine ekilen bakterilerden sarı renkli olan koloniler seçilerek, koloni morfolojileri belirlendi.

11. Sarı koloniler oldukları bilinen numaralandırılmış koloniler yarı eğik katı TSA (%1,5 NaCl) besiyerine inoküle edildi.

12. 25 °C’de 1 gece inkübasyondan sonra, daha sonradan kullanılmak üzere buzdolabında +4 °C’de saklandı.

### 3.2.2. Bakterilerin İdentifikasyonu

#### 3.2.2.1. API 20E ile Bakteri İdentifikasyonu

API 20E (Biomérieux) içeriğinde; 25 adet testlik kit, 25 adet API 20E stripleri, 25 adet inkübasyon kutusu, 25 adet sonuç kağıdı, mineral yağ, oksidaz, API 20E reaktif kit (TDA, JAMES, VP 1, VP2) bulunmaktadır. Kitin test parametreleri şu şekildedir; glikoz, mannitol, inositol, sorbitol, rhamnoz, sükroz, melibioz, amygdalin, arabinoz şekerlerin fermantasyonu, nitrit üretimi, beta-galaktosidaz, tryptofan deaminaz, jelatinaz, arginine dihidrolaz, lysine dekarboksilaz and ornithine decarboxylase aktivitesi, sitrat kullanımı, H<sub>2</sub>S, üre ve indol üretimi testleri.

Klasik mikrobiyolojik yöntemler ile elde edilen saf bakteri izolatlarına API 20E hızlı tanı kiti uygulandı.

1. Kit üretici firma Biomérieux’un talimatları doğrultusunda kullanıldı.
2. İnkübasyon sıcaklığı 25°C ve inkübasyon süresi 24 saat olarak tercih edildi.
3. Kitlerin okunması için kullanılan ayraçlar inkübasyon süresi sonunda kullanım kılavuzunda belirtildiği sıra ile ve gerekli miktarlarda damlatıldı.

#### 3.2.2.2. 16S rRNA Analizi ile Bakteri İdentifikasyonu



1. Nutrient broth'da üretilen bakteri süşunun genomik DNA izolasyonu Qiagen DNeasy Blood&Tissue Kiti ile yapıldı.

2. İzole edilen DNA Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltıldı.

Tüp başına toplam konstrasyon değerleri

0,2 X Taq Tamponu (Applied Biosystems)

1,5 mM MgCl

0,25 mM dNTP (Fermantas)

0,03 U AmpliTaq Polimeraz (Applied Biosystems)

0,4 pmol her bir primer (16S genini tümünü çoğaltan)

300 ng Bakteriyal Genomik DNA

3. PCR ürünlerini özütlemek için Macherey-Nagel NucleoSpin Extract II kiti kullanılmıştır.

4. PCR ürünü DNA'nın dizi analizi, Bigdye Cycle Sequencing kit v.3.1 ile yapılmıştır. DNA dizi analizi için ABI 3130XL Genetic Analyzer cihazı kullanıldı.

5. NaOAC-EtOH saflaştırma yöntemi ile DNA dizi analizi saflaştırması yapıldı.

6. Dizi analizinden çıkan sonuçlar FinchTV programında işlenip, NCBI gen bankasındaki referans genomlarla eşleştirildi ve Fast "Minimum Evolution Tree" yöntemi kullanılarak filogenetik analiz yapıldı.

### 3.2.3. Bakteriyofaj İzolasyonu

#### 3.2.3.1. Deniz Suyundan Bakteriyofaj İzolasyonu

2.0 SM (Faj Tamponu) [Sambrook vd. 1989]

NaCl 5,8 g

MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 2 g

1 M Tris.Cl (pH 7.5) 50 ml

% 2 jelatin çözeltisi 5 ml

## Bidistile Su

1 L

1. Deniz suyu aseptik koşullar altında 250 ml'lik kehribar şişelerde Mersin Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji laboratuvarına getirildi.
2. Deniz suyu örnekleri 15 ml'lik falcon tüplere dağıtılarak 5,000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
3. Üst sıvı 0.22 µm por çaplı filtreden (Milipore) geçirilerek faj izolatları elde edildi.
4. Faj izolatları SM tampona inoküle edildi ve +4 °C'de saklandı.

### 3.2.3.2. Çift tabaka agar yöntemiyle faj varlığının belirlenmesi

1. Bölüm 3.2.1'de anlatıldığı üzere elde edilen faj izolatlarından, 100 µl alınıp, 2 saatlik konakçı bakteri kültürlerine eklendi.
2. Adsorpsiyonun gerçekleşmesi için oda sıcaklığında 15 dk beklendi.
3. Faj-bakteri süspansiyonuna top agar eklenerek karışım NA (%1,5 NaCl) besiyerine döküldü.
4. Bir gece inkübasyondan sonra faj plakları gözlemlendi [Adams, 1959].

### 3.2.4. Bakteriyofajların saflaştırılması (Tek plak izolasyonu)

Faj süspansiyonlarını saflaştırmak için tek plak izolasyonu yapıldı.

1. Faj süspansiyonlarının  $10^{-6}$ 'ya kadar FTS (fizyolojik tuzlu su, %0,85 NaCl) kullanılarak dilüsyonları hazırlandıktan sonra, her bir dilüsyondan 0,1'er ml, içerisinde 0,1'er ml 2 saatlik konakçı bakteri bulunan steril tüplere alındı.
2. Adsorpsiyon için oda sıcaklığında 10 dk beklendikten sonra, faj-bakteri karışımı 4 ml top agar içine eklenmiş ve hafifçe karıştırıldı.
3. Bu karışım önceden hazırlanmış Nutrient Agar (%1,5 NaCl) besiyeri

üzerine dökülmüş ve homojen bir dağılım sağlandıktan sonra 25°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı.

4. İnkübasyon sonrasında oluşan plakların tek tek düştüğü bir bölgeden tek bir plak steril öze ucu yardımıyla kesilip, 2ml'lik Nutrient Broth (% 1,5 NaCl)'da üreyen 2 saatlik konakçı bakteri kültürüne alındı.

5. 25 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı.

6. İnkübasyon sonunda plak-bakteri karışımı steril Ependorflara alınarak 7000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.

7. Tek plak izolatu olan üst sıvıdan 0,2 ml ve 2 saatlik konakçı bakteri kültüründen 0,2 ml alınarak 15 ml'lik falcon tüpe ilave edilmiş bakteriyofaj partikülleriyle bakterilerin buluşması için 25°C'de 20 dakika inkübasyona bırakıldı.

8. İnkübasyon sonrasında karışıma 5ml besiyeri eklenip 300 devir/dakika' da bir gece inkübasyondan sonra kültür 5800 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.

9. Elde edilen üst sıvı, 0.45 µm porlu filtrelerden geçirilerek ve % 10 kloroform eklenerek saf faj filtratı olarak kullanıldı [Sambrook vd. 1989].

### 3.2.5. Fajların zenginleştirilmesi ve faj titresinin belirlenmesi

Saf faj filtratının zenginleştirilmesi için daha önce de anlatıldığı gibi faj ve 2 saatlik konakçı bakteri, sıvı ortamda istenilen titreye ulaşmaya kadar pasajlar yapılarak karşılaştırıldı. Titrenin belirlenmesi için son karşılaştırmaya ait faj süspansiyonunun  $10^{-6}$  'ya kadar FTS içerisinde dilüsyonları hazırlandı ve yine çift tabaka agar yöntemi kullanıldı. Bu amaçla;

1. 2 saatlik konakçı kültüründen 0,1 ml ve faj süspansiyonundan 0,1 ml alınarak 4 ml top agar ile karıştırıldı ve önceden hazırlanan NA(% 1,5 NaCl) besiyeri üzerine yayıldı.

2. 25°C'de 24 saat inkübasyondan sonra faj plakları sayıldı.

3. Faj titres (plak oluşturma birimi, pfu/ml),  $10^{-6}$  dilüsyonunda 100 faj plağı olduğu için;  $10^6 \times 100 = 10^8$  pfu/ml olarak belirlendi.

### 3.2.6 Bakteriyofajlardan Genomik DNA İzolasyonu

Daha önce elde edilen saf faj filtratları numaralandırılarak 5 ayrı ependorfa eklendi.

1. DNase+RNase solüsyonu eklenen ependorflar 37 °C’de 30 dakika inkübasyona bırakıldı.
2. İnkübasyon sonrası çöktürücü işlevi olan PEG 8000 Ependorflara eklenerek 1 saat süreyle buzun üstünde inkübasyona bırakıldı.
3. Çöken faj izolatları 11000 rpm’de 4 °C’de 10 dakika santrifüj edilerek üst sıvı uzaklaştırıldı.
4. Pellet 500 µl resüpsansiyon tamponu ile nazikçe pipetlenerek 1,5 ml’lik mikrosantrifüj tüpüne alındı.
5. Her 500 µl faj süspansiyonuna 10 µl 0,5 M EDTA ve Proteinase K (son konsantrasyon 100 µg/ml) eklendi. [Sambrook vd., 1989]
6. 50 °C’de 30 dakika inkübasyondan sonra ‘The GeneJET Gel Extraction and Cleanup Micro Kit ile genomik DNA izolasyonu yapıldı.
7. Kit üretici firmanın talimatları doğrultusunda kullanıldı.

DNase I (Thermo Scientific)

Konsantrasyon: 1U/µl

1 ml 10X Reaksiyon Tamponu

1 ml 50mM EDTA

RNase A, (Thermo Scientific)

Konsantrasyon 10mg/ml

Proteinase K (Thermo Scientific)

Konsantrasyon: 600U/ml~ 20mg/ml

Gene Ruler 1 kb DNA ladder (Thermo Scientific)

Konsantrasyon: 0,5 µg/µl

2x1 ml 6X DNA yükleme boyası

GeneJET Gel Extraction and Cleanup Micro Kit (#K0831)

DNA saflaştırma mikro kolonları	50 adet
Elüsyon Tamponu	1,5 ml
Yıkama Tamponu	2x7 ml
Ekstraksiyon Tamponu	11 ml
Bağlama Tamponu	5,5 ml
Ön yıkama Tamponu	10 ml

PEG 8000

Polietilen glikol 8000	30 g
NaCl	19,3 g
Bidistile su	100 ml

Resüspanسیون Tamponu

MgSO <sub>4</sub>	5 mM
-------------------	------

3.2.7. İzole edilen DNA örneklerinin Nanodrop Cihazı ile Miktarının belirlenmesi

1. Bakteriyofajlardan elde edilen genomik DNA örnekleri ependorflara alındı.
2. Nanodrop Cihazı (CapitalBio Nano) ile ölçümleri yapılarak DNA miktarları belirlendi.

3.2.8. Faj DNA'larının restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilmesi

1. Genomik DNA miktarları Nanodrop cihazı ile belirlenen örnekler HindIII restriksiyon endonükleaz enzimi ile 37 °C'de 2 saat inkübe edildi.
2. 2 saat inkübasyondan sonra örnekler, 80 °C'de su banyosunda 20 dakika boyunca reaksiyonu durdurmak amacıyla bekletilerek DNA kesme işlemi tamamlandı.

HindIII (Thermo Scientific)

Konsantrasyon:	10U/ µl
10X R Tamponu	2x 1 ml
10X Tango Tamponu	1 ml

### 3.2.9 Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jel Tris Borik asit EDTA (TBE) tamponu ile hazırlandı. 10X konsantrasyonda hazırlanıp 1X konsantrasyonda kullanıldı.

10X TBE tamponu	
Tris	54 g/ ml
Borik asit	27,5 g/ ml
Na <sub>2</sub> EDTA	7,44 g/ ml

Elde edilen faj genomik DNA'sı agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi.

1. Aynı bakteriden alınan, HindIII restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilmiş ve kesilmemiş DNA örnekleri jele yüklendi.
2. Faj DNA'ları % 0,7'lik agaroz jelde 60 V da 180 dakika boyunca yürütüldü.
3. 180 dakika sonunda jel, 1 µg/mL Etidyum Bromür (EtBr) ile 10 dakika boyandı.
4. Agaroz jel, transilüminatör cihazı ile gözlemlendi.
5. Agaroz jel elektroforezi sonucunda, kromozomal DNA'ların büyüklüğü, DNA Size (Version 1) adlı bilgisayar program kullanılarak belirlendi.

### 3.2.10. Bakteriyofajların TEM ile görüntülenmesi

1. 10<sup>-8</sup> titreye sahip faj filtratları 1/10 oranında % 2,5 gluteraldehit tamponu ile karıştırılarak beş dakika oda sıcaklığında bekletildi.
2. Fikse olmuş fajlardan 25 µl alındı ve pioloform kaplı gridlere inoküle

edilerek 2 dakika bekletildi.

3. Gridler distile su ile yıkandı, % 0,5'lik uranil asetat ile negatif boyanarak TEM ile gözlemlendi [Karunasagar, 2005].



## 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

### 4.1. BULGULAR

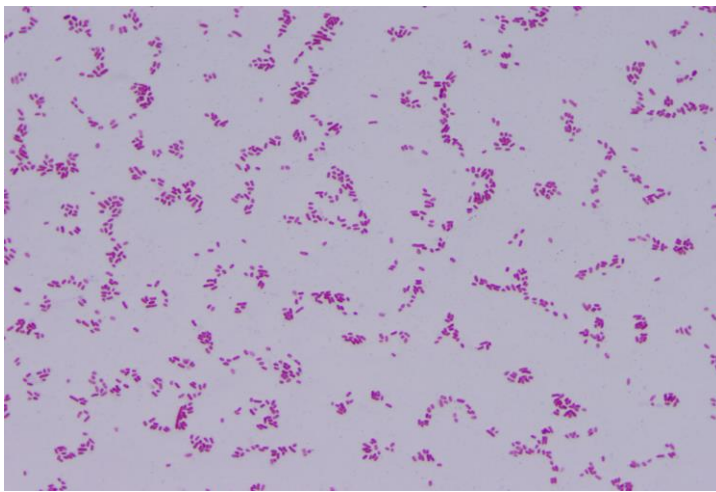
#### 4.1.1 İzole Edilen Bakterilerin İdentifikasyonu

Levreklerde görülen Vibriosis etmeni, *Vibrio* bakterilerini elde etmek amacıyla seçici besiyerinde üreme gösteren bakterilerden, sarı renkli koloniler seçildi ve saf koloni elde edilene kadar pasajlandı. Elde edilen bakterilerin koloni morfolojileri teşhis edildi. Bakteriler izole edildikleri organlara göre isimlendirildi. Karaciğer, böbrek ve mide-barsaktan toplamda 20 bakteri suşu izole edildi. Ancak, bakteriler; deniz suyundan izole edilen bakteriyofajlarla buluşturulduğunda, 5 bakteri suşunda faj plağı gözlemlendi. Fajlarla buluşturulan ve plak oluşumu gözlenen 5 bakteri B12, B11, B15, K5 ve K8'dir. İzole edilen bakteri izolatlarının TSA (%1,5 NaCl)'da krem renkli, parlak, konveks, yuvarlak düzgün kenarlı yumuşak, TCBS agar ve MacConkey agarda ise sarı koloniler oluşturdukları görüldü (Şekil 4.1.). Bu bakterilerin 1–5 µm uzunluğunda ve 0,5–1 µm genişliğinde, kıvrık çomak şekilli ve hareketli oldukları görüldü. Gram boyama ile boyanan saf kültürün, Gram negatif özellik gösterdiği tespit edildi (Şekil.4.2.). Bakteri suşları DAPI boyası ile boyandı, epifloresan mikroskoptaki görüntüsü Şeki 4.3.'teki gibidir.

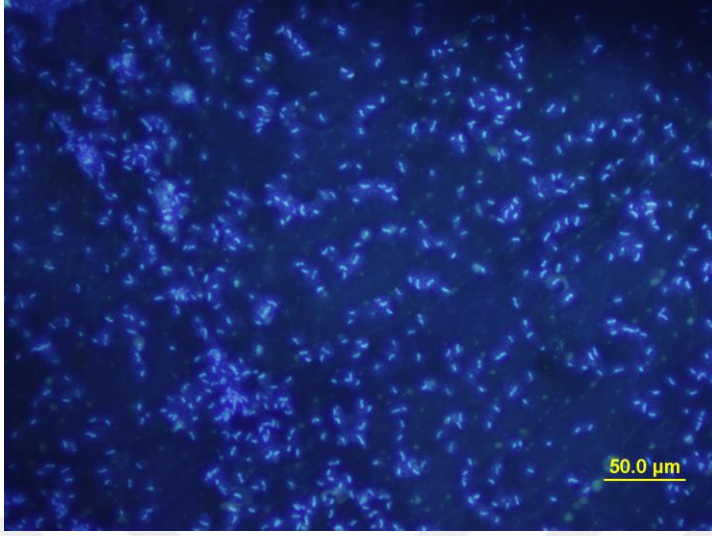




Şekil.4.1. TCBS ve MacConkey agarda oluşan sarı koloniler

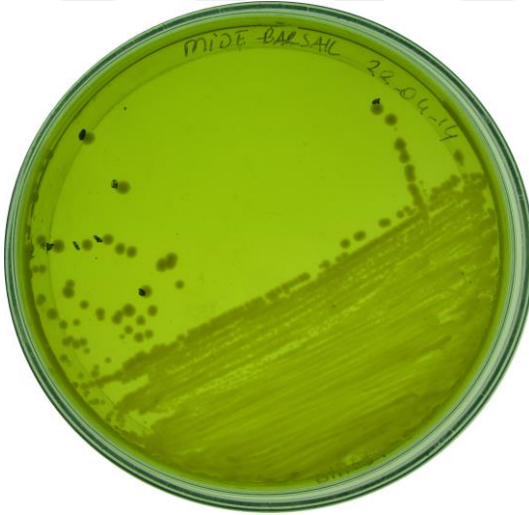


Şekil 4.2. Bakterilerin Gram Boyama Profili



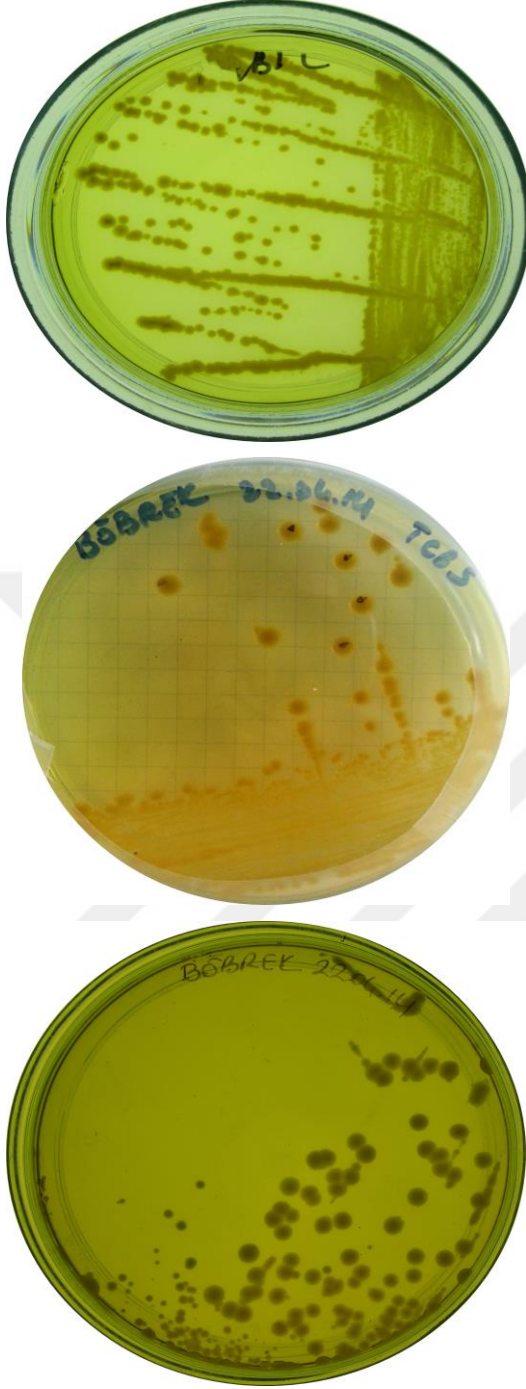
Şekil 4.3. DAPI ile Boyanan Bakterilerin Epifloresan Mikroskop Görüntüsü

Levreğin mide-barsağından izole edilen bakterilerin, TCBS agarda ıslak görümlü, sarı, yumuşak, düzgün kenarlı, 0,70 mm çapında koloniler verdiği gözlemlendi. (Şekil 4.4.)



Şekil 4.4. Mide- barsaktan izole edilen bakterilerin TCBS agarda koloni morfolojileri

Levreğin böbreğinden izole edilen bakterilerin, TCBS agarda sarı, yuvarlak, düzgün kenarlı, yoğun kıvamlı ve viskoz yapıya sahip koloniler oluşturdukları görüldü (Şekil 4.5.)



Şekil 4.5. Böbrekten izole edilen bakterilerin koloni morfolojileri

Levrek balığının karaciğerinden izole edilen bakterilerin 24 saatten yaşlı kültürlerinde kolonilerin üzerinde siyah renkli pigmentlerin oluştuğu gözlemlendi (Şekil 4.6.). K5 ve K8 bakterilerinin TCBS agarda oluşturdukları sarı kolonilerin, mide-barsak ve böbrekten izole edilen bakterilerden farklı olarak daha küçük koloniler oldukları gözlemlendi (Şekil 4.7.).



Şekil 4.6. Karaciğerden izole edilen 24 saatten yaşlı kültürlerdeki siyah pigment oluşumu

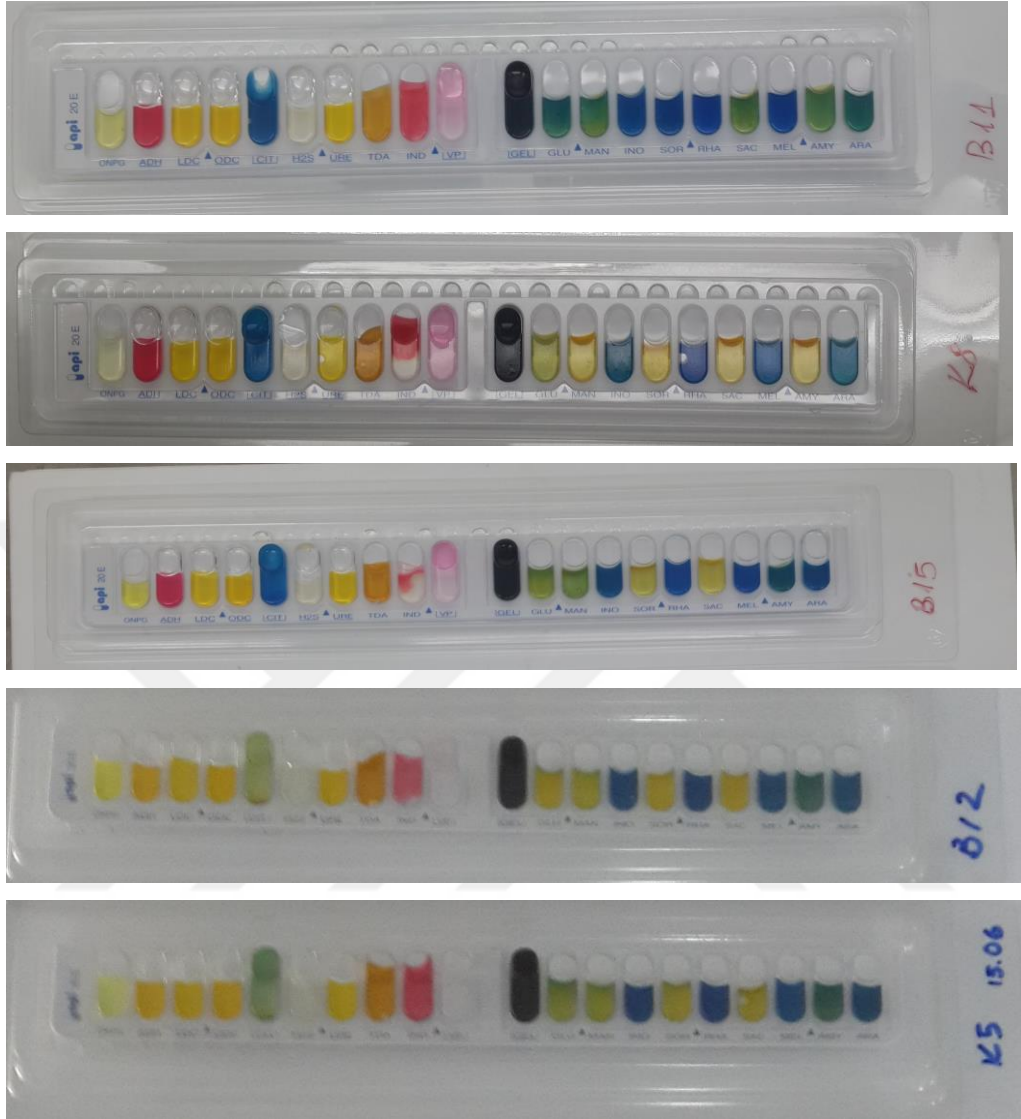


Şekil 4.7. Karaciğerden izole edilen bakterilerin koloni morfolojileri

#### 1.1.1.1. API 20E ile identifikasyon bulguları

24 saatlik taze bakteri kültürlerinden hazırlanan inokulumlar kullanılarak gerçekleştirilen API testleri 24 saat sonunda ayraçları damlatılmadan kontrol edildi. Bakterinin API 20E striplerine inokulasyonunda saf su yerine %1.5 NaCl içeren steril su kullanıldı. En az 3 testin pozitif olmadığı durumlarda süre 48 saat uzatıldı ve ayraçlar damlatılarak sonuçlar kayıt edildi. Tüm bakterilerin API profilleri Çizelge.4.1 ve Şekil.4.8'teki gibidir. B11 bakterisinin; ONPG, IND, VP ve GEL profili pozitif, ADH, LDC, ODC, CIT, H<sub>2</sub>S, URE, TDA profili negatiftir. MAN ve SAC şekerlerini parçalama testi sonucu pozitif iken INO, SOR, RHA, MEL, AMY şekerlerini parçalayamadığı tespit edildi. B12 bakterisinin; ONPG, VP ve GEL profili pozitif, IND, ADH, LDC, ODC, CIT, H<sub>2</sub>S, URE, TDA profili negatiftir. Şekerlerden MAN, SOR, SAC'u parçalarken, INO, RHA, MEL, AMY'i parçalayamadığı gözlemlendi. K5 bakterisinin API profili B12 bakterisi ile aynı özellikleri gösterdi. B15 bakterisi; ONPG, TDA, IND, VP, GEL profili pozitifken, ADH, LDC, ODC, CIT, H<sub>2</sub>S, URE ise negatiftir. MAN, SOR, SAC şekerlerini parçalarken, INO, RHA, MEL, AMY'i parçalayamadığı gözlemlendi. K8 bakterisinin, ONPG, TDA, IND, VP, GEL profili pozitifken, ADH, LDC, ODC, CIT, H<sub>2</sub>S, URE ise negatiftir. Şekerlerden MAN, SOR, SAC, AMY'i parçalarken, INO, RHA, MEL'i parçalayamadığı gözlemlendi. Okuma striplerine göre numaralandırılan bakteriler veritabanında *Aeromonas hydrophila* olarak tespit edildi.





Şekil.4.8. Sırasıyla B11, K8, K5, B12 ve B15 bakterilerinin API 20 E stripleri görüntüleri

Çizelge 4.1. Bakterlerin API 20E test sonucu profilleri

Biyokimyasal Testler	B12 bakterisi	B11 bakterisi	B15 bakterisi	K5 bakterisi	K8 bakterisi
ONPG (beta-galaktosidaz)	+	+	+	+	+
ADH (arjinin dihidrolaz)	-	-	-	-	-
LDC (lizin dekarboksilaz)	-	-	-	-	-
ODC (ornitin dekarboksilaz)	-	-	-	-	-
CIT (Sitrat)	-	-	-	-	-
H <sub>2</sub> S (hidrojen sülfür)	-	-	-	-	-
URE (UREaz)	+	-	-	-	-
TDA (tryptofan deaminaz)	-	-	+	-	+
IND (İndol)	-	+	+	-	+
VP (Voges Proskauer)	+	+	+	+	+
GEL (jelatinaz)	+	+	+	+	+
MAN (Mannitol)	+	+	+	+	+
INO (Inositol)	-	-	-	-	-
SOR (Sorbitol)	+	-	+	+	+
RHA (Ramnoz)	-	-	-	-	-
SAC (Sükroz)	+	+	+	+	+
MEL (Meliboz)	-	-	-	-	-
AMY (Amigdalın)	-	-	-	-	+
ARA (Arabinoz)	-	-	-	-	-
OX (Oksidaz)	+	+	+	+	+

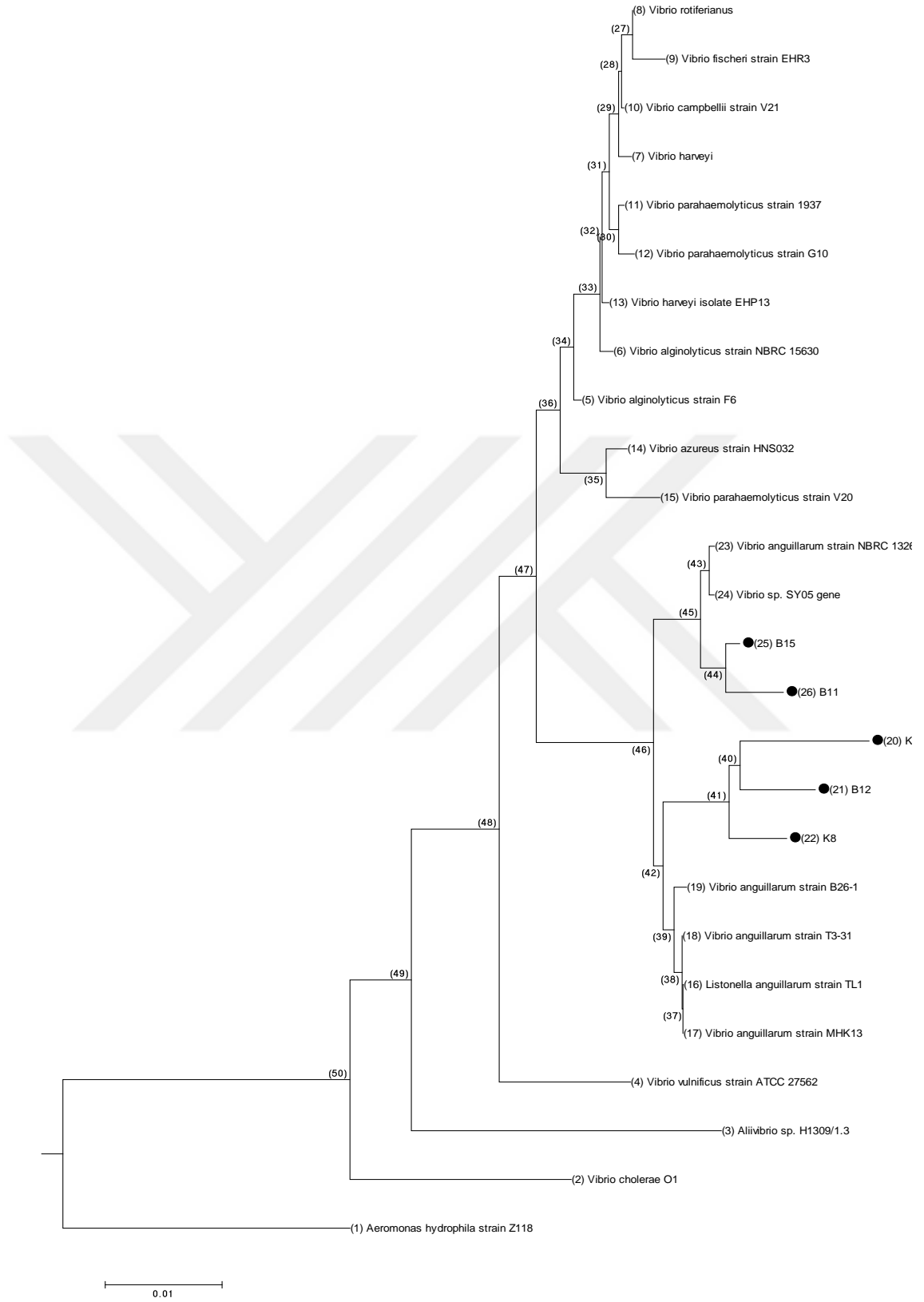
#### 4.1.1.2. Bakteri Suşunun 16S rRNA Analizi ile İdentifikasyon Bulguları

Nutrient Broth'da üretilen bakteri suşunun genomik DNA izolasyonu yapıldı. 16S rRNA genini kodlayan bölge PCR'da çoğaltılmış ve çoğaltılan bölgenin DNA dizi analizi sonuçları; NCBI gen bankasındaki referans genomlarla eşleştirilerek ve Fast "Minimum Evolution Tree" yöntemi kullanılarak filogenetik analiz yapıldı.

Sekanslanan gen dizileri FinchTV adlı bilgisayar programında BLAST analizi yapılarak 5 suşun, %96 güvenilirlikle *Vibrio anguillarum* türüne ait olduğu tespit edildi. MEGA6 programıyla filogenetik ağaç çizildi (Şekil 4.9.).



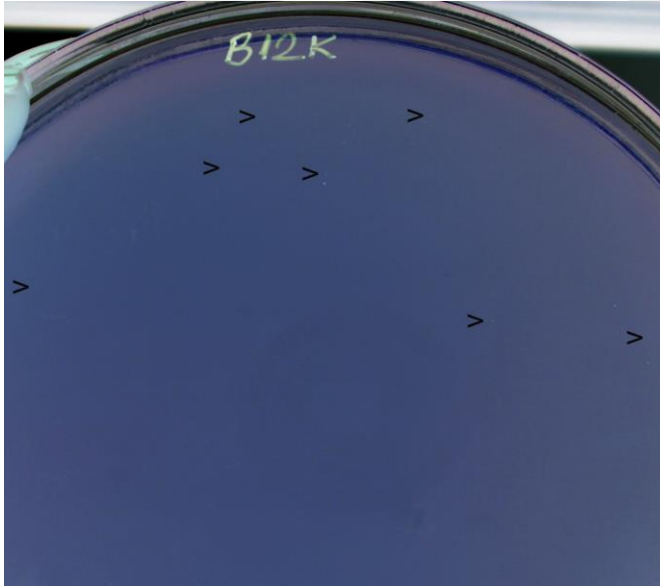




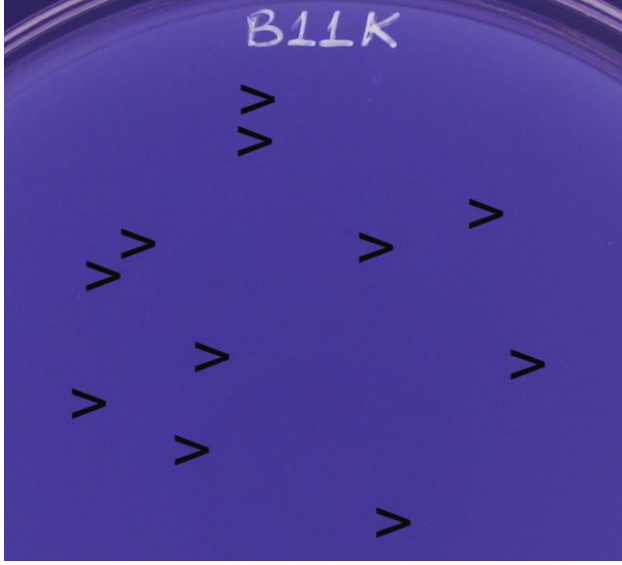
Şekil 4.9. NCBI gen bankasındaki referans genomlarla eşleştirilerek ve Fast "Minimum Evolution Tree" yöntemi kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaç.

#### 4.2. Bakteriyofajların İzolasyonuna Ait Bulgular

Deniz suyundan filtrasyon yoluyla izole edilen bakteriyofajların varlığı çift tabaka agar yöntemi ile belirlendi. Tek plak yöntemi ile izole edilen saf bakteriyofaj kültürlerine, izole edildikleri bakteri suşlarına ait isimler verildi. B11, B12 ve B15 bakterilerine ait bakteriyofajlar; iğne ucu şekilli ve karaciğerden izole edilen bakterilerin faj plaklarına göre daha küçük plak morfolojileri gösterdikleri gözlemlendi. B12 fajı plakları; merkezi temiz, kenarları düzgün, B11 ve B15 fajlarının merkezleri bulanık kenarları düzgün yapıdaki plakları gözlemlendi (Şekil 4.10., Şekil 4.11., Şekil 4.12). Fajların oluşturduğu plakları oldukça küçük olup, daha rahat gözlenebilmesi amacıyla fotoğraflar negatife çevirilerek kullanıldı.



Şekil 4.10. Böbrekten izole edilen B12 bakteri fajının plak morfolojisi negatif görüntüsü

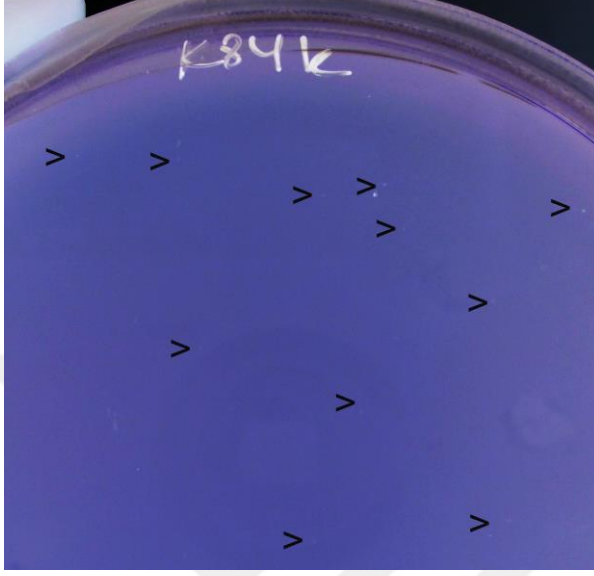


Şekil 4.11. Böbrekten izole edilen B11 bakteri fajının plak morfolojisi negatif görüntüsü



Şekil 4.12. Böbrekten izole edilen B15 bakteri fajının plak morfolojisi negatif görüntüsü

Karaciğerden izole edilen bakteri suşlarının faj plakları 0,5 – 1 mm çapında iğne ucu şekilli, küçük plaklar olarak gözlemlendi. (Şekil 4.13., Şekil 4.14.)

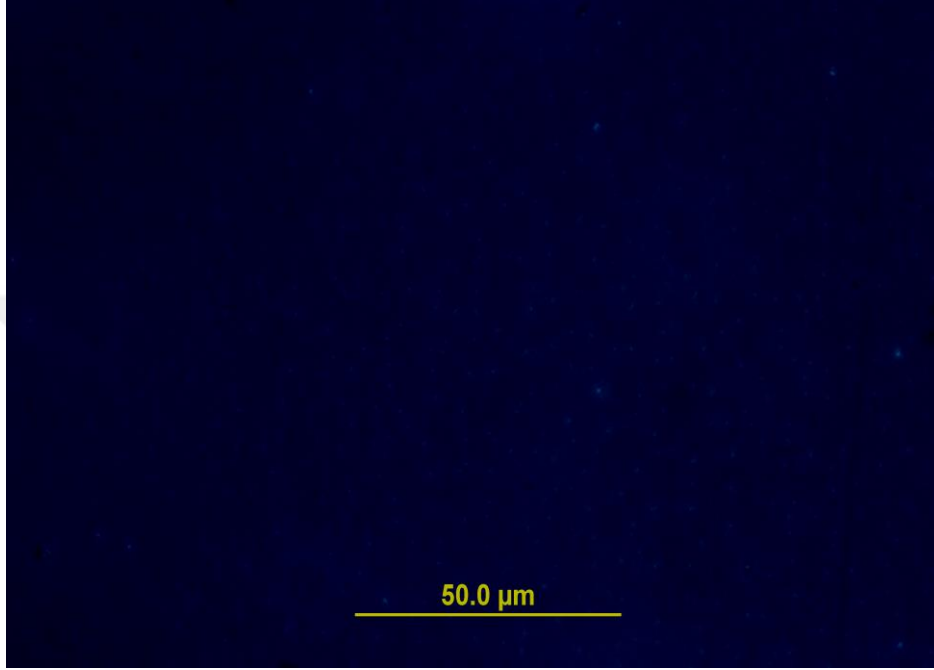


Şekil 4.13. Karaciğerden izole edilen K8 bakterisi faj plaklarının morfolojisi negatif görüntüsü



Şekil 4.14. Karaciğerden izole edilen K8 bakterisi faj plaklarının morfolojisi negatif görüntüsü

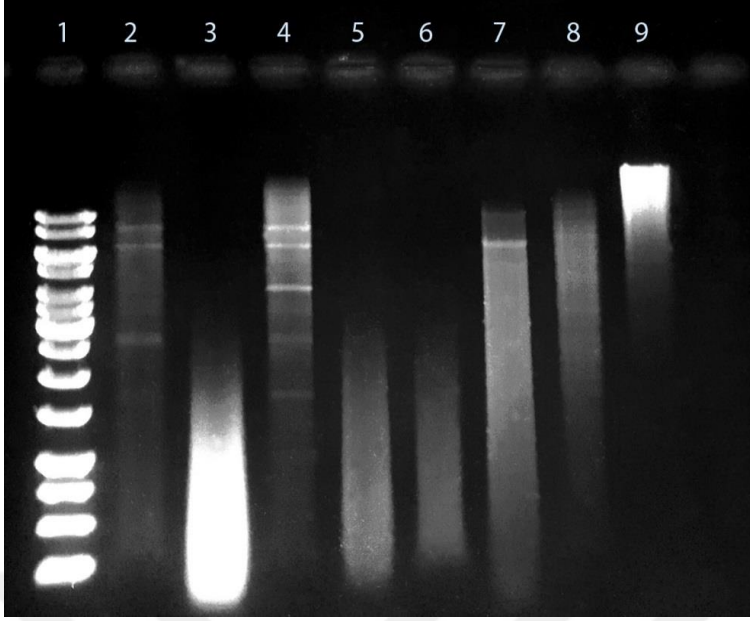
Bakteriyofaj örnekleri 0.45 µm filtreden geçirildi ve DAPI ile boyanarak Epiflorasan mikroskop ile gözlemlendi. Fajlar küçük mavi noktalar olarak gözlemlendi. (Şekil 4.15.)



Şekil 4.15. Bakteriyofajların Epifloresan Görüntüsü

#### 4.1.5. Agaroz Jel Elektroforezine Ait Bulgular

Genomik DNA izolasyon kiti ile izolasyonu yapılan *V. anguillarum* bakteriyofajlarının DNA'sı % 0,7'lik agaroz jelde 60 V uygulanarak 180 dakika boyunca separe edildi (Şekil 4.16.). Böbrekten izole edilen B15 bakterisinde faj varlığı çift tabaka yöntemi ile belirlense de agaroz jel elektroforezinde genomik DNA'sı gözlenemedi. Şekil 4.13.'te ki agaroz jel görüntüsünde; sırasıyla genom büyüklükleri; B12 fajı; 55 kb, B11 fajı; 23 kb, K5 fajı; 44 kb, K8 fajı; 73 kb olarak belirlendi (Şekil 4.16.) (Çizelge 4.2.).



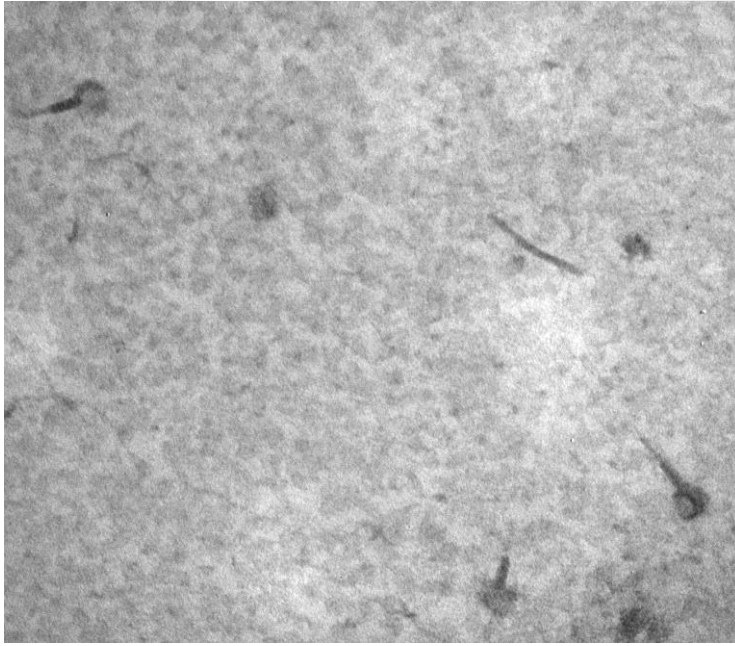
Şekil 4.16. Bakteriyofaj genomlarının HindIII restriksiyon endonükleaz enzim patterni. 1. kuyucuk; 1 kb DNA markeri, 2. Kuyucuk B12 bakteriyofajı, 4. Kuyucuk K8 bakteriyofajı, 7. kuyucuk B11 bakteriyofajı, 8. kuyucuk K5 bakteriyofajıdır. 3, 5, 6 ve 9. kuyucuklarda ise kesilmemiş faj DNA'sıdır.

Çizelge 4.2. Fajların morfolojik karakterleri

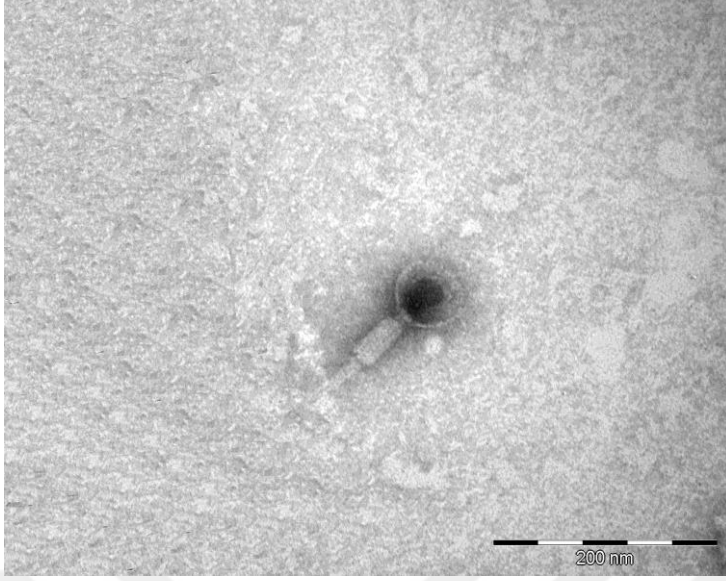
Faj	Kafa Çapı (nm)	Kuyruk Çapı (nm)	Kuyruk Uzunluğu (nm)	Genom Büyüklüğü (kb)
B15	-	-	-	-
B11	-	-	-	23
B12	54-55	8-9	302-303	55
K5	55-56	18-19	52-53	44
K8	66-67	17-18	52-53	73

### 3.1.5 TEM Bulguları

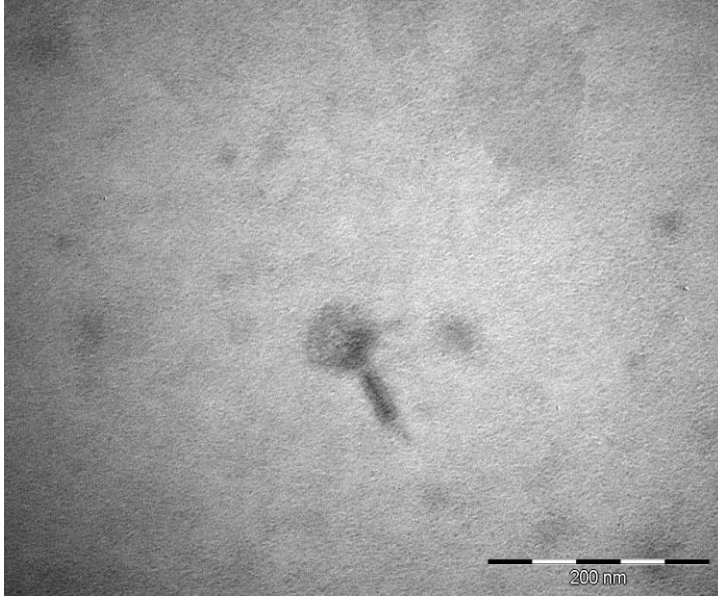
$10^{-8}$  titreye sahip 5 bakteriyofaj süspansiyonu uranil asetat ile negatif boyanarak TEM ile görüntülenmek üzere hazırlandı. Bakteriyofajlardan B15 ve B12 bakterilerinin fajları yüksek titreli olmalarına rağmen TEM ile görüntülenememişlerdir. B11, K8 ve K5 bakterilerin bakteriyofajları ise görüntülenerek morfolojileri belirlendi (Şekil 4.17.). K5 bakteriyofajı 55,5 nm kafa, 18,9 nm kuyruk çapına ve 52,7 nm kuyruk uzunluğuna sahiptir (Şekil 4.18). K8 bakteriyofajı 66,1 nm kafa, 17,1 nm kuyruk çapına sahipken, 52,6 nm kuyruk uzunluğuna sahiptir (Şekil.4.19) B11 bakteriyofajı 54,8 nm kafa, 8,3 nm kuyruk çapına ve 302,8 nm kuyruk uzunluğuna sahiptir (Şekil 4.20) (Çizelge 4.2.).



Şekil 4.17. Fajların TEM görüntüsü (100.000 X)

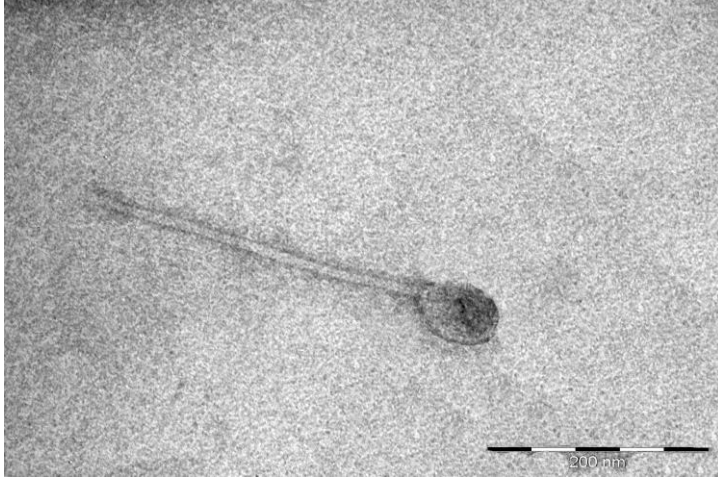


Şekil 4.18. K5 bakterisi fajı TEM görüntüsü (200.000 X)



Şekil 4.19. K8 bakterisi fajı TEM görüntüsü (200.000 X)





Şekil 4.20. B11 bakterisi fajı TEM görüntüsü (200.000 X)

#### 4.3. TARTIŞMA

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda; *Vibrio* bakterilerini enfekte eden 227 kuyruklu faj tespit edilmiştir, bu fajlardan 87 tanesi *Myoviridae*, 67 tanesi *Siphoviridae* ve 74 tanesi *Podoviridae* familyasına dahildir [Ackermann, 2007]. Bu çalışmada izole edilen fajlar da kuyruklu fajların tek takımı olan *Caudovirales*'e üye fajlar olarak belirlendi.

Ackermann'a göre kuyruklu fajların kapsid ve kuyruk büyüklükleri sırasıyla; 30-160 nm, 10-800 nm aralığındadır [Ackermann, 2005]. *Siphoviridae* familyasına dahil fajların; 14,5 kb'dan, 134,4 kb'a kadar varan genom büyüklüklerine sahip oldukları bildirilmiştir [Thiyagarajan, 2011].

*Vibrio parahaemolyticus* fajları olan VP16T ve VP16C izolatları elektron mikroskobu ile gözlenmiştir. Her iki faj da birbirine benzemekle beraber, 80- 100 nm kuyruk uzunluğuna, 50-60 nm çapında ikosahedral bir kafa yapısına sahip oldukları gözlemlenmiştir [Seguritan, 2003].

Yapılan bir çalışmada ise *V. anguillarum*'un bakteriyofajları olan 309, ALMED, CHOED, ALME, CHOD ve CHOB'un restriksiyon endonükleazlarla kesilen genomik DNA'ları elektroforez işlemine tabi tutulduğunda genom büyüklüklerinin 47-48 kb olduğu bildirilmiştir [Higuera vd., 2013].

Higuera vd., 2013'te yaptığı bir çalışmada elektron mikroskobu ile incelenen *V. anguillarum* fajı ALMED' in 50nm çapında ikozahedral bir baş ve uzun kontraktıl bir kuyruğu, CHOD'un ise kuyruksuz olduğu ve 50 nm çapında ikozahedral bir başa sahip olduğu gözlemlenmiştir.

Thiyagarajan v.d.'larının yaptığı çalışmada *V. harveyi*'yi enfekte eden  $\phi$ Vh1,  $\phi$ Vh2,  $\phi$ Vh3,  $\phi$ Vh4 fajlarının PFGE (Pulsed-field gel electrophoresis) ile belirlenen genom büyüklükleri sırasıyla 85, 58, 64, 107 kb olarak bildirilmiştir.  $\phi$ Vh1,  $\phi$ Vh2,  $\phi$ Vh4 fajlarının 60-115 nm büyüklüğünde ikosahedral bir baş ve 130-329 nm

uzunluğunda kontraktil olmayan bir kuyruğa sahip oldukları ve *Siphoviridae* familyasının üyeleri oldukları TEM ile görüntülenerek belirlenmiştir.  $\phi$ Vh3 fajının ise *Podoviridae* familyasına dahil, 72-73 nm ikosahedral bir baş, 27 nm uzunluğunda kısa bir kuyruğa sahip olduğu belirlenmiştir.

Araştırmacılar bir *Vibrio harveyi* faji olan VHS1 fajını negatif boyama yaparak TEM’de görüntülemişlerdir. Bu çalışmada, VHS1 fajının ikosahedral bir baş ve kontraktil olmayan bir kuyruktan oluştuğu ortaya konulmuştur. VHS1 fajının kafa yarıçapı 60-62 nm, kuyruğun yarıçapı 9-10 nm ve kuyruk uzunluğu 100-120 nm olarak belirlenmiştir. VHS1 fajının plak morfoloji çapları 0,5-1 mm olarak belirlenmiştir [Pasharawipas vd., 2006].

Silva vd., *V. parahaemolyticus* ve *V. anguillarum*’ un fajları olan; sırasıyla; VP2 ve VA1 olarak adlandırdıkları iki faj izole etmişlerdir. Faj DNA’larını DNase I ve RNase A ile keserek nükleik asit tiplerinin DNA olduğunu ve S1 endonükleaz ile muamele ederek, dsDNA’ya sahip olduklarını belirlemişlerdir.

Bu çalışmada ise; *V. anguillarum* suşlarının bakteriyofajları HindIII restriksiyon endonükleaz ile kesildi ve agaroz jelde yürütülerek büyüklükleri 23-73 kb arasında değişen büyüklüklerde hesaplandı. Elektron mikroskobu ile B11, K5 ve K8 bakterilerinin bakteriyofajları görüntülendi. Görüntülenen 3 bakteriyofaj da *Caudovirales* takımının üyesidir. B11 bakteriyofajı 54,8 nm çapında ikosahedral bir başa, oldukça uzun (302,8 nm) bir kuyruğa sahiptir. K5 bakteriyofajı, 55,5 nm çapında ikosahedral bir baş ve 52,7 nm kuyruk uzunluğuna sahiptir. K8 bakteriyofajı ise yine ikosahedral 66,1 nm çapında bir baş, , 52,6 nm kuyruk uzunluğuna sahiptir.

$\phi$ Vh1,  $\phi$ Vh2,  $\phi$ Vh3,  $\phi$ Vh4 fajları birbirinden farklı plak morfolojileri göstermişlerdir.  $\phi$ Vh1 fajının; merkezi temiz, iğne ucu büyüklüğünde, belirgin olmayan kenar yapısı gösteren plak morfolojisine sahip olduğu bildirilmiştir.  $\phi$ Vh2 0,5-2 mm çapında, belirgin olmayan kenar yapısı gösteren plak morfolojisi gösterirken;  $\phi$ Vh3 fajı 1-2 mm çapında, belirgin olmayan kenar yapısı gösteren plak morfolojisine sahip olduğu bildirilmiştir. Son olarak  $\phi$ Vh4 fajı, bulanık merkezli,

iğne ucu büyüklüğünde plak morfolojisi gözlemlendiği bildirilmiştir [Thiyagarajan, 2011]. Bu çalışmada ise çift tabaka agar yöntemiyle belirlenen faj plak morfolojisi çapları 0,5-1 mm olarak belirlendi. Karaciğerden izole edilen K5 bakterisinin fajında, 1 mm çapında, merkezi temiz, kenarları düzgün ve bulanık olmayan faj plakları gözlemlendi. Yine karaciğerden izole edilen K8 bakterisinin faj plakları ise yapısal olarak K5 fajına benzese de merkezleri bulanık ve plak çapları 0,5 mm olarak belirlendi. Böbrekten izole edilen B11, B15, B12 bakterilerinin fajları iğne ucu büyüklüğünde plaklar oluşturdu. B12 fajı plakları; merkezi temiz, kenarları düzgün olmayan bir yapıya sahipken, B11 ve B15 fajlarının merkezleri bulanık kenarları düzgün yapıdaki plakları gözlemlendi.

Alboran Denizinden izole edilen fajların izolasyonunun yapıldığı bir çalışmada fajlar DAPI ile boyanarak çift zincirli DNA'ya sahip fajlar mavi parlak noktalar olarak gözlemlenmiştir [Alonso v.d., 2012]. Bu çalışmada da bakteriyofajların nükleik asit tipleri DAPI boyası ile boyanarak epifloresan mikroskopta gözlemlendi. Çift sarmal DNA içeren bakteriyofajlar mikroskopta küçük parlak mavi noktalar olarak gözlemlendi.

Balık patojenlerinin identifikasyonunda en yaygın kullanılanı API 20E test stripleridir. Deniz ve tatlı su balıklarının bakteriyel patojenlerinin identifikasyonunda API 20E sistemi bir çok araştırmacı tarafından kullanılmıştır [Baudin-Laurencin, 1981; MacDonell vd., 1982; Kent, 1982; Maugeri vd., 1983, Romalde ve Toranzo, 1991; Biosca vd., 1993; Grisez vd., 1991; Kronvall ve Hagelberg, 2002].

Birçok araştırmacı API 20E ile *Vibrio* bakterilerinin identifikasyonunda yanlış sonuçlar verebildiğini bildirmiştir [Kent, 1982]. API 20E sistemi %99 güvenilirlik notu verdiği identifikasyonlarda bile yanlış sonuç verebildiğini bildiren Kent (1982), veritabanını kullanmayı önermemektedir. İdentifikasyon için API 20E kullananan Dalsgard vd, (1996), *V. vulnificus*'u yanlış değerlendirerek %98 güvenilirlik notuyla *Aeromonas hydrophilia* ve *Flavobacterium meningosepticum* olarak tanımladıklarını belirtmişlerdir [Buller, 2014].

Deniz balıklarındaki patojenlerin teşhisi ile ilgili yapılan bir çalışmada, gram negatif, basıl şekilli fermantatif bir bakteri suşu API 20E profiline göre *Aeromonas* olarak tespit edilmiştir. Daha sonra yapılan 16S rRNA dizi analizi sonuçları bu suşun *Vibrio sp.* olduğu tespit edilmiştir [Güralp, 2012]. Bu çalışmada da, *Vibrio* bakterilerinin izolasyonunda, API 20E veritabanı kullanılarak 3 tekrar yapılarak elde edilen sonuçlarda 5 bakteri suşu da sırasıyla, %30, %35 ve %40 güvenilirlikle *Aeromonas hydrophilia* olarak belirlendi. Ancak yapılan 16S rRNA dizi analizi sonuçlarında bakteri suşlarının % 96 güvenilirlikle *Vibrio anguillarum* olduğu tespit edildi.

*V. anguillarum* % 1,5 NaCl içeren TSA, Brain Heart Infusion (BHI) gibi zengin besiyerlerinde rahatça gelişebilen bir bakteridir. Katı besiyerinde yuvarlak düzgün, krem renkli koloniler oluştururlar. TCBS ve MacConkey besiyerinde ise sarı koloniler oluştururlar [Timur ve Timur, 2003; Actis vd., 2011; Colquhoun, 2007]. Bu çalışmada da, levrek balığının mide-barsak, karaciğer ve böbreğinden izole edilen bakteriler TSA, TCBS ve MacConkey agara ekildi. TSA’da krem renkli, düzgün kenarlı, S tipi koloniler gözlenirken, *V. anguillarum* bakteri suşlarının TCBS ve MacConkey agarda parlak, viskoz, 1-2 mm çapında sarı koloniler oluşturdukları gözlemlendi.

## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Ülkemizde deniz levreğinin ekonomik değerinin yüksek olması ve yetiştiriciliğinin giderek artması nedeniyle, yetiştiriciliğinde karşılaşılan hastalık sorunlarının da çözülmesi oldukça önem kazanmaktadır. Ülkemizde ve tüm dünyada balık hastalıklarının tedavisi için çeşitli antibakteriyel maddeler kullanılmaktadır. Bu hastalıkların başında deniz levreklerinde yüksek ölüm oranına sahip Kızıl hastalığı (*Vibriosis*) gelmektedir. Kızıl hastalığı etkeni *Vibrio* bakterileri olmakla beraber; *Vibrio anguillarum*, hastalığın primer patojendir. Kızıl hastalığı başta olmak üzere birçok bakteriyel hastalığın tedavisinde antibiyotiklerin; uygunsuz ve kontrolsüz kullanımı dirençli bakterilerin ortaya çıkmasına ve giderek kullanılabilir etkili antibiyotik sayısının azalmasına neden olmaktadır. Bu durumda tedavideki başarısızlık, ölüm oranı ve tedavi maliyeti artmaktadır. Bu olumsuz etkiler doğrudan balık üzerinde gözlenebileceği gibi dolaylı olarak insan sağlığı üzerinde de gözlenebilir.

Dünya genelinde antibiyotiklerin kullanımının ve buna bağlı olarak antibiyotik dirençliliğinin artması antibiyotiklere alternatif tedavi yöntemlerinin gerekliliğini ortaya koymuştur. Bakterilerdeki direnç probleminin giderek önem kazanması, antienfektif modellerin modern tıpta ve biyoteknolojide öncelik kazanmasına neden olmaktadır. Bu durumu kontrol altına almak için yeni stratejiler geliştirilmelidir, bu stratejiler; mikrobiyal dayanıklılığın yayılma riskini ortadan kaldıracak, daha ucuz ve çevreye dost stratejiler olmalıdır. Faj terapisi ile tedavi yönteminin antibiyotiklere avantaj sağladığı durumlar; fajların oldukça spesifik olup genellikle yalnız hedef bakteri türlerini etkilemesi, en çok gereksinim olan enfeksiyon bölgesinde replike olmaları ve hedef bakteriye karşı fajların seçiminin oldukça kısa sürede gerçekleşmesidir. Faj terapisi, bakteriyel hastalıkların tedavisinde, antibiyotik kullanımına alternatif bir tedavi yöntemi olarak bilimsel anlamda gelecek vaat etmektedir.

Bu kapsamda; Kızıl hastalığının başlıca etkeni *Vibrio anguillarum*'a karşı faj terapisi tedavisinde kullanılmak üzere litik aktive gösteren bakteriyofajların izolasyonu ve karakterizasyonu, oldukça sınırlı olan *Vibrio* bakteriyofajlarının

koleksiyonlarının oluşturulması oldukça önem taşımaktadır. Bu hastalıkları tedavide; antibiyotiklerin kullanımının ve buna bağlı olarak antibiyotik dirençliliğinin artması antibiyotiklere alternatif tedavi yöntemlerinin gerekliliğini ortaya koymuştur.

*Vibrio* bakteriyofajlarının izolasyonu ve karakterizasyonu ile ilgili yapılan oldukça sınırlı sayıda literatür bilgisi bulunmaktadır. Bu çalışma, ülkemizde *Vibrio anguillarum* 'a ait bakteriyofajların izole edilerek, karakterizasyonunun yapıldığı ilk çalışmadır. Bu nedenle literatüre önemli bir katkı sağlayacağı kanaatindeyiz.



## KAYNAKLAR

- Abedon, S.T. "Bacteriophage Ecology: Population Growth, Evolution, and Impact of Bacterial Viruses", Cambridge University Press, 526p, (2008).
- Ackermann, H.W. "Bacteriophage taxonomy in 1987", Microbiol. Sci., 4; 214-218, (1987).
- Ackermann, H. W. "Phagentaxonomie 1990: Stand and Probleme Bioforum", 11/91, 419-426, (1991)
- Ackermann, H. W. "Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000", Arch. Virol., 146: 843-857, (2001)
- Ackermann, H. W. "Bacteriophage observations and evolution", Res. Microbiol. 154:245-251, (2003)
- Ackermann, H. W. "Bacteriophage Classification, In: Bacteriophages Biology and Applications", (Editörler: E. Kutter and A. Sulakvelidze), CRC Press, USA, 510p, (2005)
- Ackermann, H. W. "Classification of Bacteriophage, In: The Bacteriophage", 2<sup>nd</sup> ed. (Editör: R. Calendar) Oxford University Press, USA, 761p, (2006)
- Ackermann H. W. "5500 phages examined in the electron microscope", Arch Virol 152, 227-243, (2007).
- Actis, L.A., Tolmasky, M.E., Crosa, J.H., "Vibriosis. In: Fish Diseases and Disorders, Viral, Bacterial and Fungal Infections", 3<sup>rd</sup> ed. (Editörler: P.T.K. Woo and D.W. Bruno), CABI Publishing, 1845935543, 9781845935542. (2011)
- Akaylı, T., Timur, G., "A Diagnostic Study on Vibriosis Cultured Gilt-head Sea Bream in the Aegean Sea Coast of Turkey", Istanbul University Journal of Aquatic Sciences, 18, 43-54, (2004)
- Akaylı, T., "Kültür Çipura balıklarında (*Sparus auratus*, L .1758) Vibriosis'in ELISA ve bakteriyolojik yöntemlerle teşhisi", İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, (2009)
- Akaylı, T., Timur, G., "A Diagnostic Study on Vibriosis Cultured Gilt-head Sea Bream in the Aegean Sea Coast of Turkey", Istanbul University Journal of Aquatic Sciences. 18, 43-54, (2004)
- Alonso M.D.C, Rodríguez J and Borrego J.J., "Characterization of marine



- bacteriophages isolated from the Alboran Sea”, Journal of Plankton Research, 24: 1079-1087, (2012)
- Alsina, M., Blanch, A.R., A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species”, Journal of Applied Microbiology, 76(1), 76-85, (1994)
- Alvarez, J.D., Austin, B., Alvarez, A.M., Reyes, H., “*Vibrio harveyi*: a pathogen of penaeid shrimps and fish in Venezuela”, Journal of Fish Diseases, 21, 313–316, (1998)
- Austin B. and Austin, D. A. “Methods For the Microbiological Examination of Fish and Shellfish”, Simon and Schuster, Chichester, UK. (1987)
- Austin, B. and Austin, A.D., “Bacterial fish pathogens: Disease in farmed and Wild Fish”, 2<sup>nd</sup> ed. Simon and Schuster, Chichester, UK, (1993)
- Austin, B. and Lee, J.V., “Aeromonadaceae and Vibrionaceae. In: Identification in Applied and Environmental Microbiology”, (Editörler: Board, R.G., Jones, D. ve Skinner, F.A.), Society for Applied Bacteriology Series 29, Blackwell, London, 163-182, (1992)
- Austin, B., Austin, D., “Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish”, 7<sup>th</sup> ed, Springer-Praxis Publishing, Chichester,(2007)
- Barbosa C., Venail P., Holguin A.V., Vives M.J., “Co-evolutionary dynamics of the bacteria *Vibrio* sp. CV1 and phages V1G, V1P1, and V1P2: implications for phage therapy”, Microb Ecol, 66:897–905, (2013)
- Barrow PA, Soothill JS, “Bacteriophage therapy and prophylaxis rediscovery and renewed assessment of potential”, Trends in Microbiology, 5(7): 268-271, (1997)
- Baudin-Laurencin, F.,. “Fish *Vibrio* Strains Antisera In France. International Symposium on Fish Biologics: Serodiagnostics and Vaccines”. Develop. Biol. Standard, 49; 257-259, (1981)
- Biosca E. G., C. Esteve, E. Garay, C. Amaro., “Evaluation of the API 20E system for identification and discrimination of *Vibrio vulnificus* biotypes 1 and 2. Journal of Fish Diseases”,16,79-82, (1993)
- Birge, E. A.. “Bacterial and Bacteriophage Genetics”, 4<sup>th</sup> ed.Springer Verlag New York, USA, 559 p, (2000)

- Biswas, B., Adhya S., Washart P., Paul B., “Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*” *Infect Immun.*, 70(1): 204-210, (2002).
- Boesen, H. T., Pedersen, K., Larsen, J. L., Koch, C., Ellis, A. E., “*Vibrio anguillarum* Resistance to Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Serum: Role of O Antigen Structure of Lipopolysaccharide, Infection and Immunity”, 67 (1), 294, (1999)
- Bradley D. E “Ultrastructure of Bacteriophages and Bacteriocins *Bacteriological Reviews*”, p. 230-314, (1967)
- Breitbart M, Salamon P, Andresen B, Mahaffy JM, Segall AM, Mead D, Azam F, Rohwer F., “Genomic analysis of uncultured marine viral communities”, *Proc Natl Acad Sci*, 99:14250–14255, (2002)
- Buller, N. B., “Bacteria from Fish and Other Aquatic Animals: A Practical Identification Manual”, London: CABI Publishing, ISBN 0 85199 738, (2004)
- Buller, Nicky B., “Bacteria and Fungi from Fish and Other Aquatic Animals: A Practical Identification Manual”, CABI, (2014)
- Brüssow, H., “Phage therapy: the *Escherichia coli* experience”, *Microbiology*, 151(7), ss, 2133 – 2140, (2005)
- Candan, A,” Lymphocystis Disease of *Sparus aurata* in Marine Culture at Aegean and Mediterranean Coast of Turkey. MEDRAP II, Mediterranean Regional Aquaculture Project. Basic Level Training Course on Disease, Diagnosis and Prevention for Aquatic Species”. Turkey. (1991)
- Candan, A., Karataş, S., “Balık Sağlığı”. İstanbul: Kalmak Ofset, 978–605-88665-0-8, (2010)
- Carlton, R.M., “Phage Therapy: Past History And Future Prospects”, *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 47, pp. 267 – 274, (1999)
- Chan, B.K. and Abedon S.T., “Phage therapy pharmacology: phage cocktails”, *Adv. Appl. Microbiol.*, 78(1-239 (2012)
- Chhibber S, Kumari S, “Application of Therapeutic Phages in Medicine”, *Bacteriophages*, 1<sup>st</sup> ed. (Editör: İpek Kurtböke), 139-159, (2012).
- Chibani-Chennoufi S, Bruttin A, Dillmann M L, “Phage-host interaction: An

- ecological perspective”, *Bacteriol*, 186: 3677– 3686, (2004)
- Colquhoun, D.J., Aarflot, L., Melvold, C.F., “*gyrA* and *parC* Mutations and Associated Quinolone Resistance in *Vibrio anguillarum* Serotype O2b Strains Isolated from Farmed Atlantic Cod (*Gadus morhua*) in Norway, Antimicrobial Agents and Chemotherapy”, 51(7), 2597–2599, (2007)
- Colwell, R.R., Grimes, D.J., “*Vibrio* diseases of marine fish populations”, *Helgoland Marine Research*, 37(1-4), 265-287, (1984)
- Company, R., Sitjo-Bobadilla, A., Pujalte, M.J., Garay, E., Alvarezpellitero, P., Pérez-Sánchez, J., “Bacterial and parasitic pathogens in cultured common dentex, *Dentex dentex*”, *Journal of Fish Diseases*, 22, 299-309, (1999)
- Çağırğan, H., Yürekli Türk, O., “A Resarch on the Diagnosis and Treatment of Cultured Sea Bream (*Sparus aurata*) and Sea Bas (*Dicentrarchus labrax*), The Journal of Centre of Veterinary Control and Research Institute”, 21(35),113-122, (1996)
- Dando, P.R., Demir, N., “On The Spawning And Nursery Grounds Of Bass, *Dicentrarchus labrax* In The Plymouth Area. Journal Of Marine Biology” *Assoc.*, 159-168, (1985)
- Davenport, J., Black, K., Burnell, G., Cross, T., Culloty, S., Ekaratne, S., Furness, B., Mulcahy, M. and Thetmeyer, H., “Aquaculture: The Ecological Issues”, *Blackwell Publ., USA*, 89 s, (2003)
- Defroit, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Verstraete, W., Bossier, P., “Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent vibriosis in aquaculture as an example”, *Trends in Biotechnology* 25:10, 472-479, (2007)
- Demircan, M. D., Candan, A., “Identification of *Vibrio anguillarum* by PCR (*rpoN* Gene) Associated with Vibriosis in Marine Fish in Turkey, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*”, 30, 305-310, (2006)
- Garen, A. and Kozloff, L. M.. “The Initiation of Bacteriophage Infection, The Viruses, Plant and Bacterial Viruses”, 2<sup>nd</sup> ed. (Editör: F. M. Burnet and W. M. Stanley). *Academic Press, New York*, 397 s., (1959)
- Grisez L., R. Ceusters F. O., “The use of API 20E for the identification of *Vibrio anguillarum* and *V. ordalii*”, *Journal of Fish Diseases* 14,359-365, (1991)

- Guttmann, B. S. and Kutter, E. M..” Bacteriophage Genetics, Modern Microbial Genetics, 2<sup>nd</sup> ed. (Editörler: Uldis N Streips and Ronald E. Yasbin. A John Willey&Sons, Inc., Publication. New York. 655s, (2002)
- Guttman, B., Raya, R. A, and Kutter, E.. “Basic Phage Biology, Bacteriophages Biology and Applications”, (Editörler: E. Kutter and A. Sulakvelidze), CRC Press, USA, 510 s., (2005)
- Guralp, H. "Deniz Kültür Balıklarında Görülen Bakteriyel Patojenlerin Teşhisi ve Antibakteriyel Maddelere Duyarlılıklarının Belirlenmesi/Determination of Antibacterial Drugs Sensitivity and Diagnosis of Bacterial Pathogens in Cultured Marine Fish", İstanbul Üniversitesi, Doktora Tezi, 128 s, (2012)
- Hada, H.S. , West, P.A., Lee, J.V., Stemmler, J., Colwell R.R., “*Vibrio tubiashii* sp nov.’a Pathogen of Bivalve Mollusks”, International Journal of Systematic Bacteriology, 34(1), 1-4, (1984)
- Hambly E, Suttle CA., “The Viriosphere, Diversity, And Genetic Exchange Within Phage Communities”, Curr Opin Microbiol, 8:444–450, (2005).
- Hendrix, R. W..” Bacteriophages: Evolution of the majority. Theoretical Population Biology”, 61; 471-480, (2002a)
- Hendrix, R. W. “Bacteriophage V and Its Relatives. 127-144 ss. In: Modern Microbial Genetics”, 2<sup>nd</sup> ed. (Editör: Uldis N Streips and Ronald E. Yasbin. A John) Willey&Sons, Inc., Publication, New York, 655s., (2002b)
- Hendrix, R. W., Hatfull, G. F. and Smith, M. C. M., “Bacteriophages with tails: chasing their origins and evolution”, Research in Microbiology, 154; 253-257, (2003)
- Higuera G, Batias R, Tsertsvadze G, Romero J, Espejo RT., “Recently discovered *Vibrio anguillarum* phages can protect against experimentally induced vibriosis in Atlantic salmon, *Salmo salar*”, Aquaculture 392–395 128–133, (2013)
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H., Staley, J. T., Williams, S. T., “Bergey's manual of determinative bacteriology”, 9<sup>th</sup> ed., Lippincott Williams & Wilkins Company, (1994)
- Jensen, M.K, Madsen, S.S., Kristiansen, K, “Osmoregulation And Salinity Effects

- On The Expression And Activity Of Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase In The Gills Of European Sea Bass, *Dicentrarchus labrax* (L.)”, Journal of Experimental Zoology, 282: 290-300, (1998)
- Kang, I., Myung, M., Kang, D., Jho, J. “Genome of a SAR116 bacteriophages shows the prevalence of this phage type in the oceans” PNAS, June 110-30, 12343–12348 (2013).
- Karunasagar, I., Pai, R., Malathi, G.R., Karunasagar, I., “Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection”, Aquaculture, 128, 203-209, (1994)
- Karunasagar, I., Vinod, M.G., Bob Kennedy, M.D., Vijay, A., Deepanjali, A., Umesh, K.R., Karunasagar, I., “Biocontrol of bacterial pathogens in aquaculture with emphasis on phage therapy”, In Diseases in Asian Aquaculture, (Editörler: V.Walker, P.J., Lester, R.G., and Bondad-Reantaso, M.G.), Manila, Philippines: Fish Health Section, Asian Fisheries Society, 535–542s, (2005)
- Kent, M. L., “Characteristics and identification of *Pasteurella* and *Vibrio* species pathogenic to fish using API 20E (Analytab Products) multitube test strips”, Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science 39, 1725- 1729, (1982)
- Klug, W. S. and Cummings, M. R., “Concepts of Genetics”, 6<sup>th</sup> ed., (Editör: Cihan Öner) Prentice Hall, USA, 816 s, (2000)
- Korun, J., Tîmur, G., “The first pasteurellosis case in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) at low marine water temperatures in Turkey”. The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh, 57 (3), 197–206, (2005)
- Korun, J., Timur, G., , “Marine *Vibrios* Associated with diseased sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in Turkey”, Journal of Fisheries Sciences, 2(1), 66-76, (2008)
- Toranzo, A.E., Beatriz, M., Romalde, J.L., “A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems”, Aquaculture, 246, 37 – 61, (2005)
- Kraxberger - Beatty, T., MCGarey, D. J., “*Vibrio harveyi*, an opportunistic pathogen of common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch), held in captivity”, Journal of Fish Diseases, 13, 557–560, (1990)
- Kronvall G., A., Hagelberg A., “Numerical evaluation of minimal biochemical test

- combinations for the identification of *Enterobacteriaceae* species”, APMIS, 451-457, 110s, (2002)
- Kudva, I. T., Jelacic, S., Tarr, P., Youderian, P. and Hodve, C. J. “Biocontrol of *Escherichia coli* O157 with O157-specific bacteriophage”, Applied and Environ. Microbiol., 65 (9): 3767-3773 (1999).
- Lerner, K. L. and Lerner, B. W., “World of Microbiology and Immunology”, Gale Group. 701s, (2003)
- Luria, S. E. and Darnell, J. E.. “General Virology”, 2nd ed. John Wiley&Sons Inc, USA, 512 s, (1967)
- MacDonell, M.T. ve Colwell, R.R.. “Phylogeny of the *Vibrionaceae*, and recommendation for two new genera, *Listonella* and *Shewanella*”, System. Appl. Microbiol., 6; 171-182, (1985)
- Maniloff, J. and Ackermann, H. W.. “Taxonomy of bacterial viruses: establishment of tailed virus genera and the order *Caudovirales*”, Arch. Virol., 143 (10); 2051-2063, (1998).
- Maugeri, T. L., Crisafi, E., Genovese, L., Scoglio, M. E. R., “Identification of *Vibrio anguillarum* with the API 20E system”, Microbiologica 1,73-79, (1983)
- Morrison S., Rainnie D.J., “Bacteriophage Therapy: An Alternative to Antibiotic Therapy in Aquaculture?”, Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci. 2532: 23s, (2004)
- Nakai, T.; Sugimoto, R.; Park, K.; Matsuoka, S.; Mori, K.; Nishioka, T.; Maruyama, K., “Protective effects of bacteriophage on experimental *Lactococcus garvieae* infection in yellowtail”, Dis. Aquat. Org., 37, 33-41, (1999)
- Neve, H., Krusch, U. and Teuber, M., “Classification of virulent bacteriophages of *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* isolated from yoghurt and Swiss-type cheese”, Appl. Microbiol. Biotechnol., 30; 624-629, (1989)
- Noga, E.J., “Fish Disease: Diagnosis and Treatment”, 2<sup>nd</sup> ed., Singapore: Blackwell Publishing, (2010)
- Park, S.C.; Shimamura, I.; Fukunaga, M.; Mori, K.-I.; Nakai, T. “Isolation of bacteriophages specific to a fish pathogen carlton

- , as a candidate for disease control”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 1416-1422, (2000)
- Pasharawipas, T. et al., “Partial characterization of a novel bacteriophage of *Vibrio harveyi* isolated from shrimp culture ponds in Thailand”, *Virus Res.* 114, 63–69, (2006)
- Pedersen, K., Kuhn, I., Seppanen, J., Hellstrom, A., Tiainen, T., Rimaila-Parnanen, E., Larsen, J.L., “Clonality of *Vibrio anguillarum* strains isolated from fish from the Scandinavian countries, Sweden, Finland and Denmark”, *J. Appl. Microbiol.*, 86, 337–347, (1999).
- Phumkhachorn, P., Rattanachaikunsopon, P., “Isolation and partial characterization of a bacteriophage infecting the shrimp pathogen *Vibrio harveyi*”, *African Journal of Microbiology Research* Vol. 4(16),. 1794-1800s, (2010)
- Pickett, G.D., Pawson, M.G., “Sea bass”, *Fish and Fisheries Series 12*, Chapman and Hall, London. 337s, (1994).
- Prescott, L. M., Harley, J. P., and Klein, D. A., “Microbiology”, Wm. C. Brown Communication, Inc., 2<sup>nd</sup> ed., USA 912s, (1993)
- Romalde, J. L., Toranzo, A.E., “Evaluation of the API 20E system for the routine diagnosis of the enteric redmouth disease”, *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 11, 147-149, (1991)
- Romero, J, Feijoo, G.C, Navarrete, P., “Antibiotics in Aquaculture –Use, Abuse and Alternatives”, *Health and Environment in Aquaculture*, (2012)
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T., “Molecular Cloning, A Laboratory Manual”, 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, (1989)
- Sanders, M. E., “Phage resistance in lactic acid bacteria”, *Biochimie*, 70; 411-421, (1988)
- Sarjito, Radjasa, O. K., Sabdono, A., Prayitno, S. B., Hutabarat, S., “Phylogenetic Diversity of the Causative Agents of Vibriosis Associated with Groupers Fish from Karimunjawa Islands, Indonesia”, *Current Research of Bacteriology* , 2 (1), 14-21, (2009)
- Schiewe, M. H., Trust T. J., ve Crosa, J. H., “*Vibrio ordalii* sp. nov.: A causative agent of vibriosis in fish”, *Current Microbiology*, 6, 343348, (1981).
- Seguritan, V., Feng, I. W., Rohwer, F., Swift, M., Segall, A. M., "Genome

- sequences of two closely related *Vibrio parahaemolyticus* phages, *VP16T* and *VP16C*", *Journal of bacteriology*, 185.21: 6434-6447, (2003)
- Silva, Y. J., Costa, L., Pereira, C., Mateus, C., Cunha, Â., Calado, R., Almeida, A. "Phage therapy as an approach to prevent *Vibrio anguillarum* infections in fish larvae production", *PloS one*, 9(12), e114197, (2014).
- Smith, P., Hiney, M.P., Samuelsen, O., "Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents Used in Fish Farming: a Critical Evaluation of Method and Meaning, *Annual Review of Fish Diseases*, 4, 273-313, (1994)
- Summers, W. C., "Bacteriophage Research: Early History, In: *Bacteriophages Biology and Applications*", (Editörler: E. Kutter and A. Sulakvelidze), CRC Press, USA, 510S., (2005)
- Sulakvelidze A, Alavidze Z, Jr Morris Glenn. "Bacteriophage Therapy" *Antimikrob. Agents Chemother*, 45: 649-59, (2001)
- Toranzo, A.E., BARJA, J.L., "A Review of the Taxonomy and Seroepizootiology of *Vibrio anguillarum*, with Special Reference to Aquaculture in the Northwest of Spain", *Diseases of Aquatic Organisms*, 9, 73-82, (1990)
- Tendencia, E. A., "Vibrio harveyi Isolated From Cage Cultured Seabass Lates Calcarifer Bloch in the Philippines", *Aquaculture Research*, 33, 455-458, (2002).
- Thiyagarajan S, Chrisolite B, Alavandi SV, Poornima M, Kalaimani N, Santiago TC, "Characterization of Four Lytic Transducing Bacteriophages of Luminescent *Vibrio harveyi* Isolated From Shrimp (*Penaeus monodon*) Hatcheries" *FEMS Microbiol Lett.*, 325: 85-9, (2011).
- Tikhonenko, A. S., "Ultrastructure of bacterial viruses", *Plenum Publ. Corp.*, New York, NY, (1970)
- Thompson, F. L., Thompson, C. C., Li, Y., Gomezgil, B., Vandenberghe, J., Hoste B., Ve J., Swings, "Vibrio kanaloae sp. nov., *Vibrio pomeroyi* sp. nov. and *Vibrio chagasii* sp. nov., from Sea Water and Marine Animals", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, (2003a)
- Thompson, F. L., Li, Y., Gomez-gil, B., Thompson, C. C., Hoste, B., Vandemeulebroecke, K. Rupp, G. S., Pereira, A., Debem, M. M., Sorgeloos, P., SWINGS, J., *Vibrio neptunius* sp. nov., *Vibrio brasiliensis* sp. nov. and



- Vibrio xuii* sp. nov., isolated from the marine aquaculture environment (bivalves, fish, rotifers and shrimps), International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53, 245–252, (2003b)
- Thompson, F. L., Thompson, C. C., Swings, J., “*Vibrio tasmaniensis* sp. nov., isolated from Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.)”, System. Appl. Microbiol., 26, 65–69, (2003c)
- Timur, G., Timur, M., Korun, J., “A Study on the Outbreak of *Flavobacterium psychrophilum* Infection in a Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Hatchery in Turkey”, Istanbul University Journal of Fisheries & Aquatic Sciences, 17, 21-27, (2004)
- Vinod MG, Shivu MM, Umesha K.R, Rajeeva B.C, Krohne G, Karunasagar I, Karunasagar I., “Isolation of *Vibrio harveyi* Bacteriophage with a Potential for Biocontrol of Luminous Vibriosis in Hatchery Environments”, Aquaculture, 255: 117–124, (2006).
- Walakira, J.K.; Carrias, A.A.; Hossain, M.J.; Jones, E.; Terhune, J.S.; Liles, M.R., “Identification And Characterization Of Bacteriophages Specific To The Catfish Pathogen”, *Edwardsiella ictaluri*, J. Appl. Microbiol., 105, 2133-2142, (2008)
- Weinbauer M. G., “Ecology of prokaryotic viruses”, FEMS Microbiol, 28:127–181 (2004)
- Whitman, K. A., “Finfish and Shellfish Bacteriology Manual Techniques and Procedures”, Iowa State Press a Blackweel Publishing Company (2004).
- Yaman, F., Seçer, S., Halkman, A.K., “Ağ Kafeslerde Yetiştiriciliği Yapılan Çipura (*Sparus aurata* L.) ve Levrek (*Dicentrarchus labrax* L.) Balıklarında Vibriosis ve Pasteurellosis 'in Araştırılması”, Orta On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 1 (2): 1-36, (2003)

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı:** Gizem YILDIZLI

**Doğum Tarihi:** 21/03/1988

**Öğrenim Durumu:** Lisans Mezunu

Derece	Bölüm/Program	Üniversite /Okul	Yıl
Lise	Sayısal	Abdülkerim Bengi Anadolu Lisesi	2002-2006
Lisans	Biyoloji Bölümü	Ege Üniversitesi Fen Fakültesi	2007-2012
Yüksek Lisans	Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı	Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü	2013-

### Görevler:

Görev Unvanı	Görev Yeri	Yıl
Araştırma Görevlisi	Mersin Üniversitesi Fen- Edebiyat Fakültesi Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı	2013-