

		22/01/2014:
Ana Bilim Dalı	: BİYOTEKNOLOJİ	
Programı	: [X] Yüksek Lisans [] Doktora [] Sanatta Yeterlilik	
Öğrencinin Adı Soyadı	: GİZEM TALAŞ	İmza
Danışmanının Adı Soyadı	: PROF.DR. GÖKHAN CORAL	İmza

1. Başlık

Balık patojeni bazı Vibrio bakteriyofajların izolasyonu ve karakterizasyonu

2. Problem Tanımı / Konu / Kapsam / Araştırma Soruları

Deniz balıklarının, balık çiftliklerinde üretimi (akuakültür) dünya çapında en hızlı gelişen gıda üretim sektörlerinden biridir (Bostock vd, 2010). Ancak deniz ekosisteminde yer alan oldukça çeşitli bakteriyel patojenler deniz hayvanlarını tehdit etmekte denize bağlı gıda üretimi bu durumdan olumsuz etkilenmektedir (Defoirdt vd, 2011). Bu bakteriyel enfeksiyonları engellemek için profiltik olarak antibiyotikler yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak antibiyotik kullanımı pratikte bazı sorunları da beraberinde getirmektedir. Bakteriyel enfeksiyonlara karşı antibiyotiklerin kullanımı konusunda yapılan alan çalışmaları, laboratuvar ölçeğinde yapılan çalışmalara göre daha az etkili olmuştur (Gomez vd, 2007; Defoirdt vd, 2007; McPhearson vd, 1991). Üstelik bakterilerde antibiyotiklere karşı gelişen bir dirençlilik artışı görüldüğü gibi, balık dokularındaki antibiyotik kalıntılarının, bu balıkları tüketen insanların vücutlarındaki fırsatçı insan patojenlerinde de direnç gelişimine neden olabileceği belirtilmiştir [Defoirdt vd, 2007; 2011; McPhearson vd, 1991; Miranda ve Zemelman, 2002). Enfeksiyon hastalıkları önlemek için uygulanan ticari aşıların çok sınırlı olması da başka bir sorundur. Bu olumsuzluklar nedeniyle balık çiftliklerinde antibiyotik kullanımı uygun bir yöntem olmadığından, bakteriyel enfeksiyonların kontrolü için alternatif yöntemlere ihtiyaç vardır.

On yıldan fazla bir süredir, antibiyotik kullanımına bir alternatif olarak, patojen bakterileri, onların doğal düşmanları olan bakteriyofajları kullanarak yok etme düşüncesinin benimsendiği ve faj terapisi adı verilen bir yaklaşım üzerine yoğunlaşmıştır (Breitbart vd, 2002; Hambly vd, 2005; Weinbauer vd, 2004) Bakteriyel faj dirençliliği ve litik fajların seçilmesi gibi problemleri barındıran bu yol, hızlı yayılan antibiyotik dirençliliği ile mücadele ile mukayese edildiğinde daha kolay aşılabilecek gibi görünmektedir.

Vibriosis balıklarda en sık karşılaşılan enfeksiyonlardan biridir. Hastalığın etmenlerinin başında Vibrio anguillarum gelmektedir (Demircan ve Candan, 2006). Hastalık birçok literatürde red pest, red disease, pestis rubia anguillarum, erysipelosis anguillarum, cod pest, eye disease, ulcer disease, bakteriyel dermatitis ve tuzlu su furunkulozisi gibi isimlerle ifade edilmiştir. Zaman içinde Listonellosis ismi kabul edilmesine rağmen bir çok araştırmacı vibriosis deyimini tercih

etmiştir (Collwell vd, 1984,). Farklı vibrio türlerinin her yaştaki çipura ve levrek balıklarında hastalık oluşturduğu belirtilmiştir (Paperna, 1984).

3. Özgün Değer / Katma Değer / Önem

Önerilen tezde, yüzer ağ kafeslerde yetiştiriciliği yapılan Levrek (*Dichentrarchus labrax* L., 1758) balıklarında patojen *Vibrio* spp. izolasyonları yapılarak API 20E test kiti ile identifikasyonları yapılacaktır. Tanımlanan bakteri örneklerinin bakteriyofaj profilleri çıkarılarak karakterizasyonu gerçekleştirilecektir. Kültürü yapılan balıklardaki patojen bakterilere özgü bakteriyofajların karakterize edildiği ulusal bir araştırmanın bulunmaması projemizin özgün değerini artırmaktadır. Elde edilen bakteriyofaj örneklerinin faj terapisi uygulamalarında kullanım potansiyellerinin bulunması açısından da sonraki çalışmalara temel oluşturacağı düşüncesindeyiz.

4. Kaynak Araştırması

Şimdiye kadar fajlarla ilgili yapılan çalışmalar, tıp alanında bakteri tiplendirilmesi, endüstriyel alanda (özellikle fermentasyon ürünlerinden verimin artırılması için) ve moleküler biyoloji çalışmalarını (klonlama, ekspresyon ve enzimleri) kapsamaktadır.

Yetiştiriciliği yapılan ve ekonomik katma değere sahip balıklarda bakteri hücrelerini özgül olarak eriten yapıların bulunması, fajların bakterilerle savaşta etkili silahlar olarak kullanılacaklarını 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 denemişse de pek başarılı sonuçlar elde edilememiştir. Ancak 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).

Vibriosis kültür balıklarında yüksek ölüm oranlarına sebebiyet veren bakteriyel bir hastalıktır. Hastalığın tedavi yöntemi olan antibiyotiğe karşı dirençli balıkların gelişmesi ve yayılması riskini azaltmak amacıyla, balıkları etkileyen bakteriyel hastalıkların kontrolü için yeni yöntemler geliştirilmelidir. Bu fikir doğrultusunda, gelişen akuakültür sektöründeki başlıca sorun olarak göze çarpan bakteriyel hastalıkların tedavisi için faj terapisi kullanımı oldukça umut verici görünmektedir (Pereira v.d., 2011). Doğada bol miktarda bulunan bakteri virüsleri olan bakteriyofajların, doğal sistemlerdeki bakteriyel popülasyonunun kontrol altına alınmasında çok önemli olduğu düşünülmektedir (Abedon, 2008) Terapötik fajlar, konağı balık olan ve akuatik ortamda yaşayan patojen organizmalarla devamlı ve yakın bir fizyolojik ilişki içinde olması dolayısıyla akuatik sistemlerdeki hastalığın kontrolü için faj terapisinin potansiyel kullanımı etkili

bir yöntem olarak göze çarpmaktadır. Asheshov v.d. ve Ward yaptıkları deneyler sonucunda; fazla miktarda bakteriyofaj verilen hayvanların bu canlılarda bulunan spesifik bakteriyel enfeksiyonlara karşı koruma geliştirdiklerini gösterdiler (Barrow ve Soothill, 1997).

Kang ve arkadaşları (2013), deniz bakterilerini enfekte eden fajların izolasyonu ve karakterizasyonunda metagenomik çalışmışlardır.

Yapılan çalışmalarda bir çok deniz canlısında, levrekte dahil olmak üzere, vibriosis etkeni olan gram negatif bakteri *Vibrio anguillarum*' un 23 O serotipi bulunmuş ve 01-02-03 serotipleri vibriosis ile bağlantılı olduğu bildirilmiştir (Higuera v.d, 2013.) (Frans v.d., 2011; Silva-Rubio v.d., 2008).

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. Elektron mikroskobu ile incelenen ALMED' in 50nm çapında ikozahedral bir baş ve uzun kontraktıl bir kuyruğu, CHOD'un ise kuyruksuz olduğu ve 50nm çapında ikozahedral bir başa sahip olduğu gözlemlenmiştir (Higuera v.d.,2013).

Thiyagarajan v.d.' larının yaptığı bir çalışmada *V. harveyi*' yi enfekte eden ϕ Vh1, ϕ Vh2, ϕ Vh3, ϕ Vh4 fajlarının PFGE (Pulsed-field gel electrophoresis) ile belirlenen genom büyüklükleri sırasıyla 85, 58, 64, 107 kb olarak belirlenmiştir.

TEM (Transmisyon Elektron Mikroskopisi), bakteriyofajların morfolojik özelliklerinin incelenmesine olanak sağlayarak, fajların sınıflandırılmasında önemli bir rol oynar. Elektron mikroskopisi ve genom sekanslarını yorumlama fajı tanımlamada kullanılan yegâne yöntemlerdir. Fajların identifikasyonu bu yöntemlerle tür bazında yapılabilir (Kakoma, 2009).Yaklaşık 5568 bakteri virüsü tanımlanmıştır. Bakteriyofaj sınıflandırması ilk olarak; DNA yada RNA' ya sahip olan, kuyruklu, filamentöz ve kübik fajlar olarak 6 temel türü içeriyordu (Kakoma, 2009). ICTV (The International Committee for Taxonomy of Viruses) günümüzde fajları, kuyruklu fajlar olan Caudovirales ordosunda sınıflandırmışlardır. Bakteriyofajların yaklaşık % 96'sı Myoviridae, Siphoviridae ve Podoviridae familyalarına dahildir ve virionları kübik simetrlili bir baş (kapsid) ve helikal bir kuyruk içerirler. Geriye kalan %4'ü polihedral, filamentöz ve pleomorfik fajlardır. Bu fajların kapsitleri zarflı ya da zarfsız olabilir (Kakoma, 2009).

Fajların indüklenmesine UV, sıcaklık, mitomycin-C, hidrojen peroksit, alkilleyici etkenler, 6-azourasil gibi etkenlerin neden olduğu bilinmektedir. Son çalışmalarda kirlilik etkenlerinin de faj indüksiyonuna neden olabileceği gösterilmiştir.

5. Amaç

Ülkemiz balık yetiştiriciliğinde ekonomik potansiyeli yüksek bir balık olan Levrekte görülen *Vibrio* enfeksiyonları ile mücadelede antibiyotik kullanımına bir alternatif teşkil eden faj terapisinde kullanım potansiyeline sahip bakteriyofaj kültürleri elde etmek çalışmamızın başlıca amacıdır. Projemizde izole edilen bakteriyofajlara ait karakterizasyon çalışmalarının, bakteriyofajlar hakkında çok sınırlı olan literatür bilgisine önemli katkılar yapacağı kanaatindeyiz.

6. Denenceler (*)

7. Materyal, Yöntem ve Veri Toplama Teknikleri

Deniz suyundan bakteriyofaj izolasyonu: Balık çiftliklerinden alınan su örneklerinden bakteriyofaj izolasyonu yapılacaktır. Bakterileri lizi eden faj elde edebilmek için konak *Vibrio* spp. kültürü TSA (Trypton Soy Agar) besiyerine inoküle edilir. Deniz suyu örneği 10.000 dev/dak 15 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatant TSB (Trypton Soy Broth) besiyerine eklenecektir. 37°C' de 1 gece inkübasyondan sonra kültür, bakterileri ayırmak amacıyla santrifüje edilecek ve elde edilen süpernatant 0,02 µm por çaplı filtreden geçirilecektir. Elde edilecek filtradaki litik faj varlığı çift tabaka agar metodu kullanılarak test edilecektir (Higuera v.d., 2013). Bakteriyofajların litik döngüleri sonucunda oluşan berrak plaklar izole edilecek ve yeniden konak bakteri kültürüne ekimi yapılarak fajlar saflaştırılacaktır. (Adams, 1959).

Vibrio spp. izolasyonu ve identifikasyonu: API 20E sistemi standartize edilmiş hızlı identifikasyon için önerilen bir test sistemidir. Bu minyatür multitest sistemi klinik laboratuvarlarda Gram (-) enterik bakterilerin identifikasyonu için geliştirilmiştir. Bu çalışmada Levrek'ten (*Dichentrarchus labrax* L., 1758) izole edilen *Vibrio* türlerinin identifikasyonunda API 20E test kiti kullanılacaktır. Hasta balıklardan alınacak numune %1.5 tuz içeren TSA ve BHIA (Brain Heart Infusion Agar) ekilerek 21°C de 72 saat inkübe edilecektir. Koloniler *Vibrio* türleri için ayırt edici ortam olan TCBS (Thiosulphate, Citrate, Bile salts, Sucrose) agara ekilerek saflaştırılacaktır. TCBS agarda üreyen koloniler yeniden %1.5 tuzlu TSA'ya alınacak ve üreyen bakteri kolonileri API 20E test kiti ile idenfiye edilecektir. (Tanrıkul v.d., 2004).

Bakteriyofaj karakterizasyonu:

a) Elektron mikroskopisi: 10⁸ pfu ml⁻¹ (plaque forming unit) den büyük titreye sahip olan faj izolatları %2.5 glutraldehit tamponunun 1/10' luk ile 5 dakika fikse edilecektir. Fikse edilen fajlar pioloform kaplı gridlere uygulanacak ve 2 dakika inkübe edilecektir. Fazla sıvı uzaklaştırılarak, gridler distile su ile yıkandıktan sonra %0.5 lik uranil asetat ile 2 dakika boyunca negatif boyama gerçekleştirilecektir. Fazla boya uzaklaştırdıktan sonra gridler kurumaya bırakılacak ve daha sonra Transmission Elektron Mikroskobu (TEM) ile incelenecektir (Vinod v.d, 2006). TEM ile görüntüleme sonucunda bakteriyofajların yapısal özellikleri (Biçim, kafa ve kuyruk çapları) belirlenecektir.

b) Bakteriyofaj DNA'larının analizi: İzole edilen fajlardan genomik DNA izolasyonu yapılacaktır. Elde edilecek faj DNA'ları, HindIII restriksiyon enzimi ile kesilecek ve oluşacak fragmentler %0,7 lik agaroz jelde elektroforez işlemi ile ayrılarak büyüklük markeri ile toplam genom büyüklüğü hesaplanacaktır. (Higuera vd. 2013).

8. Sınırlamalar (*)

-

9. Araştırma Olanakları

Önerilen projenin gerçekleştirilmesi için gerekli tüm laboratuvar donanımı kurumumuzda mevcut olup, bazıları aşağıda sıralanmıştır. Bunun dışında ihtiyaç duyulan sarf malzemenin temini için proje BAP'a sunulacaktır.

Epifloresan mikroskop; MEÜ Fen-Edeb. Fak. Biyoloji Böl., Moleküler Biyoloji laboratuvarı;

UV vis. Spektrofotometre; MEÜ Fen-Edeb. Fak. Biyoloji Böl, Mikrobiyoloji laboratuvarı

Laminar kabin; MEÜ Fen-Edeb. Fak. Biyoloji Böl., Moleküler biyoloji laboratuvarı

Mikrosantrifüj; MEÜ Fen-Edeb. Fak. Biyoloji Böl., Moleküler biyoloji laboratuvarı

Elektroforez ve Jel görüntüleme sistemi ; MEÜ Fen-Edeb. Fak. Biyoloji Böl., Moleküler biyoloji laboratuvarı

Taramalı Elektron Mikroskobu (MEİTAM)

Otoklav; MEİTAM

I

10. Çalışma Takvimi

Çalışma takvimi aşağıda sunulmuştur:

Deniz suyu örneklerinden bakteriyofaj izolasyonu (1-6 ay)

Hasta balıklardan Vibrio spp. İzolasyonu ve identifikasyonu (1-6 ay)

Bakteriyofaj zolatların enfeksiyon tipleri belirlenmesi (6-7 ay)

Bakteriyofajların karakterizasyonu (7-10 ay)

Verilerin derlenmesi ve tez yazımı (10-12 ay)

.

11. Kaynaklar

Adams M.H Bacteriophages Interscience publishers, INC, (1959).

Barrow PA, Soothill JS, Bacteriophage therapy and prophylaxis rediscovery and renewed assessment of potential. Trends in Microbiology Vol.5 No.7; (1997).

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).

- Bostock J, McAndrew B, Richards R, Jauncey K, Telfer T, Lorenzen K, Little D, Ross L, Handisyde N, Gatward I, Corner R Aquaculture: global status and trends. *Phil Trans R Soc B Biol Sci* 365:2897–2912 (2010).
- 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)
- Chan, B.K. and Abedon S.T. “Phage therapy pharmacology: phage cocktails”, *Adv. Appl. Microbiol.*, 78(1-239 (2012)
- Collwell, R.R. ve Grimes, D.J. *Vibrio* diseases of marine fish populations. *Hellolander Meeresuntersuchungen*, 37; 265-287,(1984).
- Defoirdt T, Boon N, Sorgeloos P, Verstraete W, Bossier P Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent vibriosis in aquaculture as an example. *Trends Biotechnol* 25:472–479, (2007).
- Defoirdt T, Sorgeloos P, Bossier P Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. *Curr Opin Microbiol* 14:251–258 (2011).
- Demircan, D., Candan A., Identification of *Vibrio anguillarum* by PCR (rpoN Gene) Associated with Vibriosis in Marine Fish in Turkey, *T. J. Vet. Anim. Sci.* 30; 305-310, (2006).
- Gómez G, Balcázar J, Ma S Probiotics as control agents in aquaculture. *J Ocean Univ China (English Edition)* 6:76–79 (2007).
- Hambly E, Suttle CA The virosphere, diversity, and genetic exchange within phage communities. *Curr Opin Microbiol* 8:444–450 (2005).
- Hara S , Terauchi K, Koike I Abundance of Viruses in Marine Waters: Assessment by Epifluorescence and Transmission Electron Microscopy *Appl. Environ. Microbiol.* 57(9):2731, (1991).
- 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).
- Kakoma K, Isolation and Characterisation of Bacteriophages and Their Potential Use for the Control of Bacterial Infections in Poultry *Journal of Plankton Research* 24 (10): 1079-1087 (2002)
- Kang, I., Myung, M., Kang, D. and Jho, J. “Genome of a SAR116 bacteriophages shows the prevalence of this phage type in the oceans” *PNAS*, June (24) (2013).
- 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).
- Lorch, A. “Bacteriophages: An alternative to antibiotics?”, *Biotechnology and Development Monitor* 39, 14-17 (1999).
- McPhearson RM, DePaola A, Zywno SR, Motes ML Jr, Guarino AM Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria from cultured catfish and aquaculture ponds. *Aquaculture* 99:203–211(1991).
- Miranda CD, Zemelman R Bacterial resistance to oxytetracycline in Chilean salmon farming. *Aquaculture* 212:31–47, (2002).
- Paperna, I. Review of diseases affecting cultured *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax* L’aquaculture du Bar et des Sparides. G. Barnabe, R. Billard ed. IRNA Publ., 465-482 pp., Paris, (1984).
- Pereira C, Silva YJ, Santos AL, Cunha Â, NewtGomes NCM, Almeida Bacteriophages with Potential for Inactivation of Fish Pathogenic Bacteria: Survival, Host Specificity and Effect on Bacterial Community Structure *Mar. Drugs* 9: 2236-2255, (2011).
- Tanrikul TT, Çağırğan H, Tokşen E, Levrek’lerden (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) İzole Edilen *Vibrio* Türlerinin API 20E Yöntemiyle İdentifikasyonu *E.U. Journal of Fisheries & Aquatic Sciences Cilt/Volume* 21, Sayı/Issue (3-4): 243– 247 (2004)
- Thiyagarajan S, Chrisolite B, Alavandi SV, Poornima M, Kalaimani N, Santiago TC, Characterization of four lytic transducing bacteriophages of luminescent *Vibrio harveyi*



T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ ÖNERİSİ FORMU



isolated from shrimp (*Penaeus monodon*) hatcheries FEMS Microbiol Lett. 325: 85–9, (2011).

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).

Weinbauer MG Ecology of prokaryotic viruses. FEMS Microbiol Rev 28:127–181 (2004).

Tez önerisinin hazırlanmasında yararlanılan kaynaklar ilgili enstitülerin tez yazım ve basım esaslarına göre listelenmelidir.)

Not : Form, enstitü öğrencileri tarafından bağlı buldukları Yönetmelik, Esaslar ve Kılavuzlara göre doldurulacaktır.

* Bu kısım Sosyal Bilimler Enstitüsü öğrencileri tarafından doldurulacaktır.