

Fajların Balık Hastalıklarının Kontrolünde Kullanımı

Süheyla KARATAŞ^{*}, Fatma KARAÇOBAN¹

İstanbul Üniversitesi, Su Bilimleri Fakültesi, Su Ürünleri Yetiştiriciliği ve Hastalıkları Bölümü, İstanbul

*Sorumlu Yazar: skaratas@istanbul.edu.tr

Derleme

Geliş 21 Ocak 2021; Kabul 19 Nisan 2021; Basım 01 Aralık 2021.

Alıntılama: Karataş, S. & Karaçoban, F. (2021). Fajların Balık Hastalıklarının Kontrolünde Kullanımı. *Acta Aquatica Turcica*, 17(4), 474-488. <https://doi.org/10.22392/actaquatr.866136>

Özet

Kültür balıkçılığında antibiyotik direncin ortaya çıkması sonucu, daha önce kolaylıkla tedavi edilen hastalıklar ile mücadele gittikçe zorlaşmış hatta imkânsız hale gelmiştir. Acil çevreyle dost alternatif yöntemlerin araştırılması ve geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Olası seçeneklerden biri, sorunlu bakteriyel balık patojenlerini hedef alan suya özgü bakteriyofajların profilaktik veya terapötik kullanımınıdır. Yapılmış olan bu çalışmada su ürünleri yetiştiriciliğinde özellikle ülkemizde görülen bakteriyel hastalık etkenlerine karşı izole edilen bakteriyofajlar ile ilgili bugüne kadar yapılmış araştırmalar derlenmiştir. Sonuç olarak ülkemiz akuakültür sektörü açısından baktığımızda fajlar ile ilgili detaylı çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır. Faj terapisi stratejisinden tam olarak yararlanabilmek için faj adaylarının dikkatle seçilmesi ve izole edilmiş fajların kullanımlarının güvenli olduğundan emin olmak için ayrıntılı bir şekilde karakterize edilmesi gerekmektedir. Bugüne kadar yapılmış faj çalışmalarının çoğu *in vitro* koşullarda yapılmıştır ve sahada kullanıma geçmeden önce daha detaylı *in vivo* çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: bakteriyofaj terapi, balık sağlığı, bakteriyel balık hastalıkları, akuakültür, çevreyle dost

The use of Phages for Fish Disease Control

Abstract

It has become increasingly difficult or sometimes impossible to combat bacterial diseases that were previously easily treated due to the emergence of antibiotic resistance in bacterial fish pathogens. There is therefore an urgent need for more research and the development of eco-friendlier alternatives to antibiotics. One very promising option is the preventive or therapeutic use of strain-specific bacteriophages that target problematic bacterial fish pathogens. In this article, the studies on bacteriophages isolated against bacterial disease agents in aquaculture, especially in our country, have been reviewed. As a result, when we look at the aquaculture sector in our country, detailed studies on phages are needed. To take full advantage of the phage strategy, phage therapy candidates must be carefully selected and characterized in detail to ensure that they are safe to use. One main conclusion is that there is a need for more basic research related to the use of phages in the aquaculture sector of our country. So far, most of the phage studies have been carried out *in vitro*, and more detailed *in vivo* studies are needed before the phages can be used in the field.

Keywords: bacteriophage therapy, fish health, bacterial fish diseases, aquaculture, eco-friendly

GİRİŞ

Dünya genelinde nüfusun ve beslenme sorunlarının arttığı günümüzde sağlıklı bir protein kaynağı haline gelen su ürünlerinin önemi giderek artmıştır ve artan bu üretimle birlikte bu kaynakları korumak, sürekliliğini sağlamak gerekmiştir. Bunun sonucunda su ürünleri, yetiştiricilik yoluyla gelişmiş ve en hızlı büyüyen sektörler arasında yer almıştır. Su ürünlerinin yıllara göre gelişimi ve değişimi incelendiği zaman üretim miktarında artış gözlenmiştir ve artan bu üretim beraberinde hastalık, yem, çevre, pazar, teknoloji, iş gücü ve mevzuat gibi çeşitli sorunları da getirmiştir (Subasinghe vd., 2009; Candan ve Karataş 2010; Cabello, 2006).

Balıklar diğer canlılara oranla çevre koşullarına daha fazla duyarlıdır ve yaşadıkları ortamdaki suyun fiziksel, kimyasal, biyolojik özelliklerin bozulmasından çok fazla etkilenirler. Ayrıca suların ısınması, kirlenmesi ve oksijen seviyesinin düşmesi yanı sıra yetiştiriciliğin yapıldığı yerlerde stok yoğunluğunun artmasına bağlı olarak stres oluşmaktadır. Balıkların boylama ve sayılması esnasında elle müdahale edilmesi ya da taşınması gibi nedenler yüzünden ortamda bulunan fırsatçı patojenlerin varlığına bağlı olarak enfeksiyonlar ortaya çıkmaktadır. Kültür balıklarında çevresel faktörlerin

hastalıklar üzerine etkisi, doğada yetişen balıklara oranla daha fazladır (Candan ve Karataş, 2010; Barton ve Iwama, 1991; Middelboe vd., 2008; Dallaire-Dufresne vd., 2014).

Su ürünleri sektörü, bakteriyel ve viral etkenlerin neden olduğu hastalıklar nedeniyle ölüm oranlarında ciddi bir artış ve büyük ekonomik kayıplar yaşamaktadır ve bu kayıpları azaltabilmek için uygun terapötikler kullanılmaktadır (Samanidou ve Evaggelopoulou, 2007; Diana vd., 2013; Wise ve Johnson, 1998). Antibiyotikler, bakteriyel hastalıkları kontrol altına almak için etkili terapötik ajanlar olarak kabul edilmiş, bununla birlikte sık kullanımlarına bağlı olarak antibiyotik direnci oluşmasına ve yaygınlaşmasına neden olmuştur (Candan ve Karataş, 2010). Antibiyotiklerin, direnç geliştirilmesiyle hastalıkların tedavi süreleri uzamakta, maliyet miktarı artmaktadır ve ciddi kayıplar meydana gelmektedir. Bir ilacın gelişimi yavaş bir süreçtir ve son yıllarda az sayıda antibiyotik piyasaya sürülmüştür. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) gözlem raporunda, yeni bir 'antibiyotik öncesi çağ' ın başlayabileceğini ve bu nedenle yenilikçi, çevreyle dost yöntemlerin araştırılması ve geliştirilmesinin teşvik edilmesi gerektiğini belirtmiştir (WHO, 2014).

Bakteriyel antibiyotik direncine ilişkin farkındalık son yıllarda artmakta ve dünya çapında çeşitli önlemler alınmaktadır. 2003 yılında Avrupa Birliği (AB), hayvanlarda büyüme amaçlı antibiyotik kullanımını yasaklamıştır. Ülkemizde de Sağlık Bakanlığı 2014-2017 yıllarını kapsayan “Akılcı İlaç Kullanımı Ulusal Eylem Planı” başlatmıştır. İlacın üretiminden, atığının imhasına kadar geçen süreci kapsamaktadır ve hasta, doktor, üretici ve personelin eğitilmesi, enfeksiyonların daha erken ve etkili bir şekilde tedavisi için direnç profilleri hakkında daha iyi bir veri toplanması, yeni antibiyotiklerin bulunması, hızlı tanı yöntemlerinin ve diğer alternatif yöntemlerin geliştirilmesi için kaynak sağlanması hedeflenmiştir (Şahin, 2017).

Alternatif anti-enfeksiyon yöntemlerin geliştirilmesi, modern tıbbın ve biyoteknolojinin önceliklerinden biri olmuştur. Antibiyotik direncinin ortaya çıkması sonucu, kültür balıkçılığında daha önce kolaylıkla tedavi edilen hastalıklar ile mücadele gittikçe zorlaşmış hatta imkânsız hale gelmiştir. Bu nedenle antibiyotiklerin etkilerini azaltabilmek için çeşitli çalışmalar başlatılmıştır (Merabishvili vd., 2009; Weber-Dabrowska vd., 2016). Balıklardan hastalık etkeni olarak izole edilmiş bakterilere karşı etkili, çevre dostu ve antibiyotiğe dirençli bakteriyel enfeksiyonları kontrol etmek için bilimsel olarak kanıtlanabilir bir çözüm olan “bakteriyofaj tedavisi” sahip oldukları doğal özellikleri nedeni ile antibiyotiklere alternatif olarak düşünülmüştür.

Yapılmış olan bu çalışmada su ürünleri yetiştiriciliğinde hastalık çıkışlarında görülen yüksek mortalitenin önüne geçebilmek ve antibiyotik kullanımını azaltabilmek için alternatif bir tedavi yöntemi olan bakteriyofajlar ile ilgili bugüne kadar yapılmış çalışmalar derlenmiştir.

Tarihçe ve Sınıflandırma

Bakteriyofajlar, bakterilerin zorunlu hücre içi parazitleridir yani bakterileri enfekte eden virüslerdir. 2011 yılında Alexander Sulakvelidze, bakteriyofajları “bu gezegendeki mikrobik dengenin korunmasında önemli bir rol oynayan dünyadaki en yaygın organizmalar” olarak tanımlamıştır. 1896 yılında İngiliz bilim adamı Ernest Hanbury Hankin, *Vibrio cholerae* bakterisinin Ganj Nehri suyunda öldüğünü ve su kaynatıldığında bu özelliğini kaybettiğini ve bu olaya canlı bir varlığın sebep olduğunu fark ettiğinde daha bakteriyofaj tanımı yapılmamıştır. İki yıl sonra, Rus bakteriyolog Gamaleya, *Bacillus subtilis* ile çalışırken benzer bir fenomenin varlığını gözlemlemiştir. Ancak Hankin'in gözleminden yaklaşık 20 yıl sonra İngiliz bilim adamı Frederick Twort tarafından benzer bir fenomen rapor edilinceye kadar hiç kimse bu konu ile daha fazla ilgilenmemiştir. Bu keşiften sonra 1915 yılında Felix d'Herelle bakteriyofajları isimlendirerek kolera, şarbon, difteri gibi hastalıklara neden olan bazı patojen mikroorganizmalara karşı bakteriyofajlar izole etmiştir. Birçok bilim adamı, ilk kez 1896 yılında keşfedilen ancak adı konamayan fenomene “Twort-d'Herelle fenomeni” ve daha sonra da “bakteriyofaj fenomeni” olarak atıfta bulunmuştur (Sulakvelidze vd., 2001; Wittebole vd., 2014).

Fajların bulunmasından yaklaşık 20 yıl sonra ilk antibiyotik, penisilin bulunmuş ve bu nedenle bakteriyofaj çalışmaları yavaşlamıştır. 1928 yılında Alexander Fleming'in penisilini keşfetmesiyle antibiyotik çağı başlamış ve fajlara olan ilgi bir anda önemini yitirmiştir. Bununla birlikte faj terapisi, eski SSCB, Polonya ve daha az ölçüde Hindistan'da devam etmiştir. Ancak son yıllarda birçok patojen organizmada oluşan antimikrobiyal direnç, araştırmacıların bu asırlık yaklaşımı yeniden düşünmelerine ve tedavisi zor olan bakteriyel patojenlere karşı yeni ve potansiyel olarak uygulanabilir bir tedavi seçeneği olarak faj terapisini yeni bir bakış açısı ile ele almalarına neden olmuştur (Wittebole vd., 2014). Bu çalışmaların bir sonucu olarak, faj tedavisi üzerine ilk makale Richard Bruynoghe ve Joseph Maisin tarafından 1921 yılında yayımlanmıştır (Sulakvelidze vd., 2001). Bu

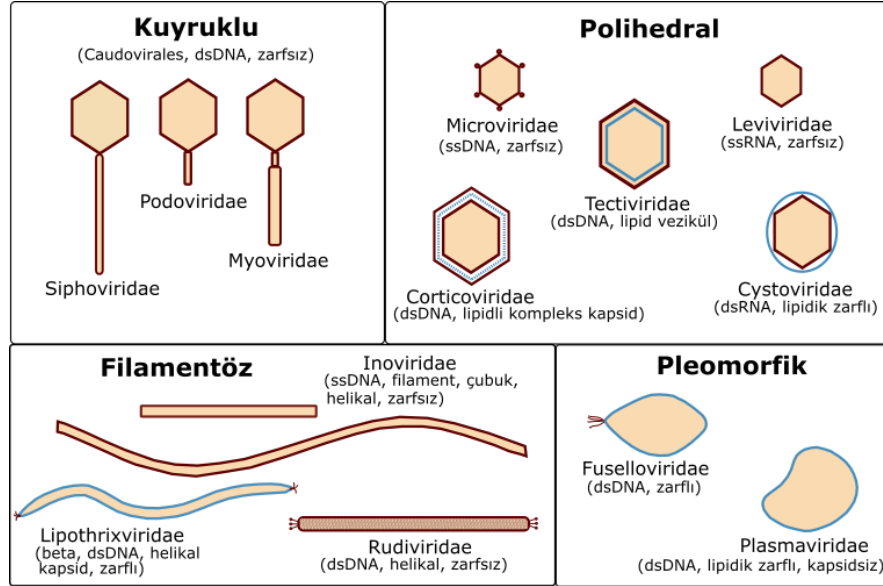
çalışmalardan birkaç yıl sonra, bakteriyofaj çalışmalarını daha ileri boyuta taşımak ve faj tedavisini geliştirmek üzere 1923 yılında Tiflis-Gürcistan'da ilk bakteriyofaj enstitüsü kurulmuştur. Bu enstitü halen faj terapisini araştırmakta ve çeşitli bakteriyel hastalıkların tedavisinde faj tedarik etmektedir (Summers, 2001; Sulakvelidze vd., 2001; Kutter ve Sulakvelidze, 2004). İnsan hekimliğinde bakteriyofajlar ilk kez Hindistan'da kolera hastalığı tedavisi için d'Herelle tarafından 1931 yılında kullanılmıştır, 1940 yılında Helmut Rushka tarafından elektron mikroskopunda incelenmiştir (Ackermann, 2011). 1951 yılında “λ” lambda fajı izolasyonu Esther Lederberg tarafından yapılmış ve bu yıllardan başlamak üzere fajlar moleküler biyolojide rutin bir şekilde kullanılmıştır (Lederberg ve Lederberg, 1953). 1960 yılında immünoloji konusunda Nobel ödülü alan Avustralyalı bilim adamı Frank Macfarlane bakteriyofajların doğası, bakteriyel konağı ile etkileşimleri ve lizojeni ile ilişkili çalışmalar yapmış ve aynı zamanda farklı faj türlerinin olabileceğini göstermiştir (Sankaran, 2010, Wittebole vd., 2014). Schlesinger, fajların nükleoproteinlerden oluşmuş viral partiküller olduğunu doğrulamıştır. Faj genomlarının dizilenmesine ise ilk kez 1970'lerin sonlarına doğru başlanmıştır (Fiers vd., 1976).

Fajların bakteriyel ajanlara karşı etkilerinin gözlenmesinin hemen ardından çeşitli ticari ürünler geliştirilmiştir. Örneğin Eliava Enstitüsü 1920'li yıllarda kurulduktan sonra; *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Proteus* ve birçok enterik patojene karşı, günde tonlarla ifade edilen faj üretimi yapmıştır. 1940'larda Amerika Birleşik Devletleri'nde “the Eli Lilly Company”, insan kullanımı için staphylococci, streptococci, *Escherichia coli* ve diğer bakteriyel patojenlere karşı kullanılmak üzere yedi farklı faj ürünü üretmiştir. 1930 ve 1940'larda bakteriyofaj ürünleri Fransa, İngiltere, Almanya, İtalya ve ABD'de ticari olarak bulunuyordu (Myelnikov, 2018). 1952 yılında Polonya'da kurulan Hirsfeld Enstitüsü, septisemi, furunkulozis, pulmoner ve üriner kanal enfeksiyonları ve postoperatif ve posttravmatik enfeksiyonların tedavisi veya profilaksisinde kullanılan ürünler geliştirmiştir (Sulakvelidze vd., 2001). Bunların dışında günümüze kadar pek çok faj araştırması hayvanlarda (Smith ve Huggins, 1983; Smith ve Huggins, 1987; Soothill vd., 1988; Bogovazova vd., 1991) ve insanlarda (Slopek vd., 1983; Slopek vd., 1987; Kaczowski vd., 1990; Stroj vd., 1999) yapılmıştır ve gelişen antibiyotik direnci sorunuyla birlikte, fajların insan-hayvan hekimliğinde klinik kullanımının gelecekte çok daha fazla önemli hale geleceği düşünülmektedir (Kingwell, 2015).

Bakteriyofajlar, Eubacteria ve Archaea'ları enfekte ederler bu nedenle prokaryotların virüsleri olarak da tanımlanmaktadır ve toplamda 140'tan fazla bakteri genusunu enfekte ederler. Bakteriyofajlar diğer virüsler gibi nükleik asit ve protein kılıftan ibarettir. Farklı şekilleri olmakla birlikte, çoğunda nükleik asidin konak hücreye transferinde bir kanal ya da köprü vazifesi gören bir kuyruk bulunur. Yüksek sıcaklık, düşük pH gibi zor koşullarda bile hayatta kalabilirler. Fajlar yapısal, fizikokimyasal ve biyolojik özelliklerinde son derece heterojen olduklarından; morfotiplerine, nükleik asit yapılarına, şekillerine, enfekte ettikleri bakterinin türüne göre farklı şekilde sınıflandırılmışlardır (Ackermann, 2001, 2007). Virionlar kuyruklu, polihedral, filamentöz ve pleomorfik yapıdadırlar. Büyük çoğunluğu çift iplikli DNA içerir ancak tek iplikli DNA, tek iplikli RNA veya çift iplikli RNA içeren az sayıda faj grupları da bulunmaktadır ve 1 ordo, 13 familya ve 31 tür olarak sınıflandırılmışlardır. Familyalar, faj nükleik asidin doğası ve genel virion morfolojisine göre tanımlanmıştır. Sınıflandırma için yaklaşık 40 kriter kullanılmasına rağmen, cins ve türler için evrensel bir kriter bulunmamaktadır (Ackermann, 2005).

Kuyruklu fajlar en büyük ve en yaygın bakteriyel virüs grubunu oluşturur; örneğin, bugüne kadar elektron mikroskopunda en az 4950 kuyruklu faj gözlenmiştir (Ackermann, 2001; Schopf, 1992; Ackermann, 1999). Virionlar sadece bir protein kılıftan ve doğrusal çift iplikli DNA'dan oluşur. Zarfları bulunmaz ve kapsitler kübik simetridir, kuyrukları sarmal yapıdadır. Başları ikosahedral yapıda, düzgün ya da yayvan şekildedir. Kuyruklu fajlar Caudovirales ordosu altında sınıflandırılmışlardır. Ayrıca boyutları, yapıları, DNA içeriği ve bileşimi, yapısal proteinlerin doğası, serolojileri, konakçı aralığı ve fizyolojileri farklılık gösterebilmektedir. Bu nedenle kuyruklu fajlar tüm virüslerin en çeşitli, en çok sayıda ve en yaygın olanlarıdır. Kuyruklu fajların yaklaşık %25'ini oluşturan, bir kılıf ve bir merkezi kasılabilen kuyrukları olan Miyoviridae, kuyruklu fajların yaklaşık %61'ini oluşturan uzun, kasılamayan kuyrukları olan Siphoviridae ve kuyruklu fajların yaklaşık %14'ünü oluşturan kısa, kasılamayan kuyrukları olan Podoviridae olmak üzere üç familyası bulunmaktadır (Ackermann, 2005).

Bugüne kadar tanımlanmış virüslerin % 4'ünden daha az bir kısmını kapsayan kuyruksuz fajlar bazen tek bir genus ve tür içeren 10 familya altında sınıflandırılmışlardır. Zarflı ve zarfsız fajlar ise polihedral, filamentöz ve pleomorfik yapıda olmak üzere üç tiptir (Şekil 1) (Ackermann, 2005).



Şekil 1. Temel bakteriyofaj morfortipleri (Ackerman 2005, değiştirilerek çizilmiştir)

Bakteriyofajların Yaşam Döngüsü

Fajlar, diğer tüm virüsler gibi hücre içi parazitlerdir ve bu nedenle çoğalmak için belirli bir konakçıya ihtiyaç duyarlar. Bir konakçı bakteri ile faj teması, konakçı yüzeyinde mevcut olan gerekli reseptörleri (karbonhidrat, protein, lipopolisakarit molekülleri ve flagella) tanıyan kuyrukları ve uçları yoluyla gerçekleşir. Çoğu faj, konak reseptörleri için oldukça spesifik ve biraz farklı yapılara sahip reseptörlerle zayıf veya hiç etkileşimleri yoktur. Bu yüksek özgüllük, bakteriyel türlerin veya alt türlerin tanımlanmasında yaygın olarak kullanılan faj tiplene yöntemlerinin temelini oluşturur (Sillankorva 2008; Sharma vd., 2017). Genetik materyal olarak virüsler gibi DNA ya da RNA içerirler ve konak bakteri yönünden oldukça seçicidirler. Her fajın, içinde çoğalabileceği spesifik bir bakteri konağı bulunur. Virüslerde olduğu gibi adsorpsiyon, penetrasyon, bakteri içinde gelişme dönemi, olgun fajların meydana gelmesi ve fajların serbest kalma safhaları bulunur. Kuyruklu fajlar konak bakteriye kuyruk kısımlarıyla, kuyuksuz fajlar ise kapsitlerinin herhangi bir noktasından tutunurlar. Kasılabilen kuyrukları bulunan bakteriyofajlar bakteri hücrelerine yapışır yapışmaz, kasılma hareketi ile faj DNA'sını bakteri içerisine enjekte ederler. Diğer fajlarda özel bir mekanizma ile faj nükleik asidi hücre içerisine girer. Bakteriyofajlar genellikle lizojenik ve litik olmak üzere 2 tür enfeksiyona neden olurlar. Litik enfeksiyon bakteriyel konakçıya doğrudan zarar veren bir enfeksiyon şeklidir. Bu tür çoğalma sonucunda bakteri hücreleri genellikle parçalanarak erirler, yani lizise uğrayarak ölürler. Konak bakterinin erimesi ve fajların serbest hale geçmesinde faj genomunda kodlanan spesifik litik enzimlerin önemli fonksiyonları vardır. Bu enzim sayesinde fajlar belirli bir sayıya ulaştıktan sonra hücre duvarını eriterek serbest hale gelirler. Konakçı lizisi ile enfekte olmuş her bir bakteriden yüzlerce yeni faj salınır. Üretilen yeni fajların sayısı türlere ve koşullara bağlı olmakla beraber her bir faj, litik döngü başına ortalama 50-200 yeni faj üretebilir (Hayes, 1968; Carlton, 1999, Tan, 2015; Alves, 2015). Lizojenik enfeksiyon, virionun konakçılarda hücre yüzeyi reseptör molekülleri ile etkileşime girmesi ile başlar, faj adsorpsiyonundan sonra hücre duvarı eritilerek nükleik asit hücreye taşınırken kapsit hücrenin dışında kalır. Fajlar bakteri içine girdikten sonra faj DNA'sı bakteri DNA'sı ile bütünleşir. Bu şekilde DNA'sı ile bütünleşmiş faj taşıyan bakteriye lizojen bakteri adı verilir. Bu olaya lizojeni, bağlanan faja da profaj adı verilir ve bu durumda faj çoğalmaz ve bakteriyi eritmez. Lizojenik bakteriyofajlar da diğer bakteriler gibi çoğalırlar ve hayati fonksiyonlarını devam ettirirler. Böylece bir lizojenik bakteriden iki yavru lizojenik bakteri meydana gelir (Letchumanan, 2016; Bilgehan, 2002; Rao ve Lalitha, 2015, Alves, 2015; Sillankorva, 2008).

Fajlar doğada en çok bulunan organizmalardır (10^{30} - 10^{31} arasında). Konak bakterileri nerede yaşıyorsa o bölgede çok sayıda bulunurlar. Yaklaşık olarak saniyede 10^{23} faj enfeksiyonu gerçekleştiği ve dünyadaki bakterilerin yarısının 48 saatte fajlar tarafından yok edildiği rapor edilmiştir (Sulakvelidze vd., 2001). Doğada çok fazla sayıda faj olmasına rağmen spesifik bir bakteriyeye karşı

izolasyonları zordur. Bu nedenle faj konusunda çalışan bilim adamları faj izolasyon işlemine “faj avı” (phage hunting) kendilerine de “faj avcısı” (phage hunter) ismini vermişlerdir.

Lizojenik fajlar, faj terapisi için iyi adaylar değildir. Lizojenik yaşam döngüsünde fajlar, kendilerini enfekte olmuş bakterilerin genomuna kopyalarlar ve orada bir “profaj” olarak bulunurlar. Bu fajların bakteri genomlarının evrimi için önemli olduğu ve “transdüksiyon” olarak bilinen işlemde, bakteriler arasında yatay gen transferine aktif olarak katkıda buldukları bilinmektedir. Bu mekanizma, zararsız bir bakteriyi problemlili bir patojen haline getirebilecek antibiyotik direnç genlerini ve virülans genlerini yaymaktadır. Bunun aksine; litik fajların yaşam döngüleri, enfekte olmuş hücrenin lizisine yol açtığı için bu tipteki fajlar faj tedavisi için genellikle idealdir. Bununla birlikte, bazı lizojenik fajlar da bakteriler arasında gen transferini kolaylaştırabilmektedir. Genomlarında endonükleazlar olmayan ve “süper yayıcı” olarak adlandırılan bu virülan fajlar, parçalanmış bakterilerden çevreye bozulmamış genomik DNA salgırlar (Keen vd., 2017). Bu hücre dışı DNA, “transformasyon” olarak bilinen işlemde bazı diğer bakteriler tarafından alınabilir. Bu nedenle, terapötik potansiyele sahip bir fajın, bakteriyel hücre lizizinden önce bakteriyel kromozomu parçaladığından emin olmak önemlidir.

Ek olarak, faj terapisi için iyi adaylar “spesifik” yani dar bir bakteriyel konak aralığına sahip olmalıdırlar. Bu özellik hem yetiştiricilik ortamının hem de yetiştiriciliği yapılan balıkların doğal mikrobiyotasının faj tedavisi sırasında bozulmamasını sağlayacaktır. Dolayısıyla, ikincil enfeksiyonlar da önlenmiş olacak ve konak balıkların büyük olasılıkla daha hızlı iyileşmesi sağlanacaktır. Ayrıca, faj terapisi için iyi olarak nitelendirilecek adaylar hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak etkili bir şekilde çoğalabilmelidir, özellikle *in vitro* çoğalma büyük ölçekli faj üretimi için bir gerekliliktir.

Bakteriyofajların Avantaj ve Dezavantajları

Fajların birçok avantajı bulunmasına rağmen henüz açıklanamamış ve daha detaylı çalışmaların yapılmasına ihtiyaç duyulan olası dezavantajları da bulunmaktadır. Faj uygulamalarını kısıtlayan en önemli faktörlerden birisi faj dirençli bakterilerin görülmesidir. Faj dirençli bakterilerden korunmak için farklı faj kokteyllerinin kullanılması yada antibiyotik ve dezenfektanlar ile birlikte kullanılmaları önerilmektedir (Nakai, 2010; Park vd., 2020). Ancak su ürünleri yetiştiriciliğinde başarılı faj uygulamaları için bakteriyel faj direnç mekanizmalarını anlamak ve seçilen fajdaki reseptörleri belirlemek çok önemlidir. Fajların bugüne kadar bildirilmiş avantaj ve olası dezavantajları Tablo 1’de özetlenmiştir (Sieiro vd. 2020; Rao ve Lalitha, 2015).

Avantaj	Dezavantaj
Doğal biyolojik ürünler	Hastalık etkeninin kesin tanısının yapılması gerekmektedir
Kolay izole edilir ve çoğaltılabilirler	İlgili mevzuat ve yönetmeliklerin geliştirilerek uygulanması gerekmektedir
Gram negatif ve Gram pozitif bakterilere karşı etkilidirler	Faj direnci oluşabilir
Spesifikler yani yalnızca belirli bir bakteri türünü veya suşu enfekte edebilirler	Bakteriye gen transferi olabilir
Normal flora bakterilerine karşı etki göstermezler	Üretim süreçlerinin optimize edilmesi gerekmektedir
Kolaylıkla uygulanabilirler	Litik faj koleksiyonlarının oluşturulması ve sürekliliğin sağlanması gerekmektedir
Çok bileşenli faj preparatları sinerjik etki gösterirler	Doz, zamanlama ve uygulama yöntemlerinin optimize edilmesi gerekmektedir
Antibiyotik ve dezenfektanlar ile sinerjik etki gösterirler	
Terapötik ve biyosanitasyon amaçlı kullanılabilirler	
Şimdiye kadar herhangi bir yan etkileri bildirilmediğinden güvenli olarak kabul edilebilirler	
Diğer yöntemlere göre nispeten ucuzdur	
Biyofilmlere karşı etkilidirler	
Çoklu antibiyotik direnci görülen bakterilere karşı etkilidirler	
Çevre dostu	

Tablo 1. Fajların avantaj ve dezavantajları

Bakteriyofajların Ticari Üretimi ve Akuakültürde Faj Uygulamaları

D'Herelle tarafından hastalıkları tedavi etmek için bakteriyofajların kullanılabilmesi ileri sürüldükten sonra ilk kez 1921 yılında Fransa'da Bruynoghe ve Masin, insanlarda Stafilokok deri hastalıklarını tedavi etmek için fajları kullanılmışlardır (Alisky vd., 1998; Barrow ve Soothill, 1997; Morozova vd., 2018). Daha sonrasında 1928 yılında Alexander Fleming tarafından antibiyotığın keşfedilmesi ile fajların bakteriyel hastalıkların tedavisinde kullanılabilirliği, yerini antibiyotik tedavisine bırakmıştır. Ancak insan sağlığı açısından önemli pek çok bakteriyel hastalık etkeninde çok sayıda antibiyotiğe direnç görülmesi bilim adamlarını bu eski yaklaşıma yönlendirmiştir. Faj tabanlı ürünler ilk olarak Paris'te, adı daha sonra L'Oréal olarak değiştirilen d'Herelle ticari laboratuvarında geliştirilmiş ve Bacté-rhinophage, Bacté-intesti-phage, Bacté-pyophage, and Bacté-staphyphage olarak isimlendirilen beş farklı faj üretilmiştir (Summers 1999; Sulakvelidze vd., 2001; Sharma vd., 2017). 1940'lı yıllarda Amerika Birleşik Devletleri'nde de ticari faj üretimi gerçekleştirilmiştir. Eli Lilly adındaki şirket insanlarda hastalık oluşturan Stafilokok, Streptokok, *E. coli* ve diğer bakteriyel patojenler için kullanılacak yedi ticari faj üretmişlerdir (Sulakvelidze vd., 2001; Sharma vd., 2017).

Faj tedavisi hala Rusya, Gürcistan ve Polonya dışında diğer ülkelerde kullanılmamaktadır (Reardon, 2014). Ancak 2013 yılında *E. coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* ile enfekte olan yanıkları tedavi etmeyi amaçlayan "PhagoBurn" başlıklı proje Avrupa Birliği tarafından desteklenmiştir (Sharma vd., 2017; Reardon, 2014; <http://www.phagoburn.eu/>). Faj konusunda çalışan Eliava Enstitüsü araştırmacıları bakterilerin kullanılan faja direnç kazanabilme özellikleri nedeniyle sekiz ayda bir yeni faj kokteylleri hazırladıklarını ifade etmektedirler (Reardon, 2014).

Litik fajlar antibiyotikler ile karşılaştırıldıklarında çevreye negatif etkilerinin bulunmaması nedeni ile bakteriyel patojenlerin kontrolünde alternatif biyoterapötik ajan olarak düşünülmektedir ve ziraat alanında, et ve peynir üretiminde bakteriyel enfeksiyonların kontrolü için kullanılmışlardır (Rao ve Lalitha, 2015; Soykut 2007; Özkan 2015). Faj terapisi için kullanılacak ürünler Hollanda'da ticari olarak satışa sunulmuştur. Örneğin *Listeria monocytogenes* için PhageGuard Listex, Salmonella için PhageGuard S, *E. coli* ile mücadele için ise PhageGuard E isimli ürüne ulaşılabilmektedir (Hagens ve Loessner, 2014; <https://phageguard.com/ecoli-solution/>). Ancak hala Avrupa Birliği tarafından bu ürünler onaylanmamıştır. AB ayrıca, su ürünleri yetiştiriciliğinde faj terapisinin geliştirilmesi ve endüstriyel kullanımının çevresel etkilerini değerlendirmek üzere Aquaphage ve Enviphage isimli iki faj projesine destek vermiştir (<https://aquaphage.weebly.com/>; <http://www.enviphage.eu/en/>).

Culot vd. (2019) akuakültürde faj kullanımı, avantajları ve bugüne kadar yapılmış olan yayınları derledikleri çalışmalarında 2000-2018 yılları arasında akuakültür ve faj anahtar kelimeleriyle yapmış oldukları taramada su ürünleri yetiştiriciliği için en çok çalışılan fajların Myoviridae, Podoviridae ve Siphoviridae familyalarına ait olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca yine aynı çalışmalarında en çok yayının Asya'da ve daha sonra da Avrupa'da yapıldığı, en çok *Vibrio* fajlarının araştırıldığı ve sırasıyla *Flavobacterium*, *Aeromonas*, *Lactococcus* ve *Pseudomonas* sp. fajları ile ilgili çalışmaların yapıldığı tespit edilmiştir.

Proteon Pharmaceuticals tarafından *Aeromonas* ve *Pseudomonas* sp. için etkili Bafador isimli ürün, ACD Pharma tarafından *Yersinia ruckeri*'ye karşı etkili Custus isimli ürün, Fixed-phage şirketi tarafından Flavobacterial enfeksiyonlara karşı etkili ürünler su ürünleri yetiştiriciliğinde balıklarda kullanılmak üzere geliştirilmektedir (<http://www.intralytix.com/>; <https://acdpharma.com/en/front-page/>; www.proteonpharma.com).

Su ürünlerinde kullanılacak fajlar ile ilgili çalışmaların büyük bir kısmı faj izolasyonu ve *in vitro* etkisinin araştırıldığı çalışmalardır ancak son yıllarda balıklar üzerinde *in vivo* çalışmalar da yapılmaya başlanmıştır. Özellikle en çok bilinen ve balıklarda hastalık oluşturan *V. anguillarum*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *A. hydrophila*, *A. salmonicida*, *Streptococcus iniae*, *Flavobacterium columnare*, *F. psychrophilum*, *P. aeruginosa*, *P. plecoglossicida*, *Lactococcus garvieae*, *Edwardsiella ictaluri* ve *Edwardsiella tarda*'ya karşı *in vitro* ve bazı *in vivo* çalışmalar bulunmaktadır (Chow ve Rouf 1983; Merino vd., 1990; Le vd., 2018; Jun vd., 2013; Akmal vd., 2020; Easwaran vd., 2016; Kim vd., 2012; Silva vd., 2016; Verner-Jeffreys vd., 2007; Mateus vd., 2014; Kalatzis vd., 2016; Higuera vd., 2013; Silva vd., 2014; Vinod vd., 2006; Richards, 2014).

Aeromonas Genusu

Aeromonas sp. tatlı ve acı sularda hastalığa neden olan önemli bir bakteri grubudur. Hareketli türleri bağışıklık sistemi zayıf balıklarda çok sık görüldüğünden hastalığı kontrol edebilmek için

büyük çabalar harcanmaktadır. 1980'li yıllardan bu yana fajlar bu bakterilerin üstesinden gelmek için araştırılmışlardır (Chow ve Rouf, 1983; Merino vd., 1990; Hoang vd. 2019; Le vd., 2018; Jun vd., 2013; Akmal vd. 2020; Easwaran vd. 2016). Yapılan çalışmaların büyük bir kısmı faj izolasyonu ve *in vitro* etkisinin araştırıldığı çalışmalardır, son yıllarda balıklar üzerinde *in vivo* çalışmalar da yapılmaya başlanmıştır.

Chow ve Rouf (1983) kanalizasyon suyundan izole ettikleri *A. hydrophila* fajının *in vitro* etkisini araştırmışlardır. İzole edilen fajların, çalışmada kullanılan 22 adet izolatın 13'ünü enfekte ettiği rapor edilmiştir.

Hoang vd. (2019) yayın balıklarının (*Pangasianodon hypophthalmus*) yetiştiriciliğinin yapıldığı havuz suyundan *A. hydrophila*'ya özgü faj izole ederek *in vitro* etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada kullanılan 100 adet havuz suyu örneğinden 24 adet etkili faj izolasyonu gerçekleştirdiklerini rapor etmişlerdir.

Le vd. (2018) Vietnam'daki yayın balıklarında çeşitli antibiyotik tedavileri uygulanmasına rağmen yüksek ölüm oranlarına neden olan *A. hydrophila* izolatının antimikrobiyal dirençlerini araştırarak faj izolasyon çalışmaları yapmışlardır. Çalışmada kullanılan altı izolatın hepsinin gentamisin, oksitetrasiklin, Bactrim, enrofloksasin, amoksisilin/klavulanik asit ve ampisiline dirençli olduğu ve çoklu antibiyotik direncinin görüldüğü, izole edilen her iki fajın da Myoviridae familyasına ait olduğu rapor edilmiştir. İzole edilen fajların çalışmada kullanılan *A. hydrophila* izolatlarının üremesini engelleyici etkiye sahip olduğu, hazırlanan faj kokteylinin yayın balıklarında *A. hydrophila* enfeksiyonunun tedavisinde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Kore'de nehirde izole edilen pAh1-C ve pAh6-C fajlarının çoklu antibiyotik direnç özelliğine sahip *A. hydrophila*'ya karşı etkisi *in vitro* ve *in vivo* olarak Jun vd. (2013) tarafından araştırılmıştır. Fajların *in vitro* olarak bakterisidal etki gösterdikleri ve bu fajların tek bir enjeksiyon uygulaması ile deney balıklarına verilmesinden sonra hayatta kalma oranlarında artış tespit edilmiştir. pAh1-C ve pAh6-C fajlarının balıklarda *A. hydrophila* enfeksiyonunun tedavisi için potansiyel terapötik ajanlar olabileceği sonucuna varılmıştır. Jun vd. (2013)'nin çalışmasına benzer şekilde Akmal vd. (2020) Güney Kore'deki bir nehirde izole ettikleri Siphoviridae familyasına ait Akh-2 fajının çalışmada kullandıkları yedi *A. hydrophila* izolatının dördüne etkili olduğu rapor edilmiştir. Yapmış oldukları *in vivo* çalışmalarında Akh-2 fajı ile tedavi edilmiş balıklarda kontrole göre daha yüksek hayatta kalma oranı elde edilmiştir. Akh-2 fajının balıklarda *Aeromonas* enfeksiyonlarının tedavisi için potansiyel bir biyolojik ajan olabileceği bildirilmiştir.

Easwaran vd. (2016) akarsulardan izole ettikleri pAh-1 fajının *A. hydrophila* üzerine etkisini ve sıcaklık, pH, kalsiyum ve magnezyum konsantrasyonunun bu fajın gelişimini nasıl etkilediğini çalışmışlardır. Sıcaklık, pH'ın, kalsiyum ve magnezyumun farklı konsantrasyonlarının fajı çok fazla etkilemediği rapor edilirken zebra balığında periton içi faj tedavisinin *A. hydrophila*'ya karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

Cao vd. (2020) daha önceden izole edilmiş olan MJG isimli fajın *in vitro* etkisi ve gökkuşağı alabalıkları üzerine *in vivo* etkisini araştırdıkları çalışmalarında MJG'nin geniş bir pH ve sıcaklık aralığına sahip olduğu rapor edilmiştir. MJG fajının çalışmada kullanılan 20 *A. hydrophila* izolatının sadece 4'ünü enfekte ederek dar bir konak aralığına sahip olduğu gösterilmiştir. Gökkuşağı alabalıkları *A. hydrophila* ile enfekte edildikten iki saat sonra MJG fajı $3,2 \times 10^6$ PFU/balık oranında periton içi enjeksiyonu, $3,2 \times 10^6$ veya $3,2 \times 10^5$ PFU/ml oranında 15 dakika daldırma banyo şeklinde uygulanmış, ayrıca $3,2 \times 10^7$ veya $3,2 \times 10^6$ PFU/g olacak şekilde hazırlanmış yemler ile balıklar beslenerek oral tedavinin etkisi de araştırılmıştır. MJG fajı daldırma ve enjeksiyon şeklinde gökkuşağı alabalıklarına uygulandığında, balıkların hayatta kalma oranlarının arttığı, oral uygulamanın ise diğer iki yöntemle göre daha az hayatta kalma oranına neden olduğu ancak kontrole oranla daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (Cao vd., 2020).

Furunkulozis bilinen en eski balık hastalığı olduğundan, etkeni *A. salmonicida*'ya karşı etkili faj izolasyon çalışmaları da 1960'lı yıllarda başlamıştır. Paterson vd. (1969) Kanada'da yetiştiricilik yapılan kuluçkahane ve havuzlardan *A. salmonicida*'ya karşı etkili faj izolasyonu çalışmaları yapmışlardır. 19 istasyondan alınan su ve çamur örneklerinin 13'ünden başarılı bir şekilde faj izolasyonu gerçekleştirmişlerdir. Fajların izole edildiği 13 istasyonun dokuzunda furunkulozis hastalığı öyküsü olduğu tespit edilmiştir. İzole edilen fajların üç serolojik grup ve iki farklı morfolojiye sahip oldukları, serolojik grup I ve II özellik gösteren fajların aynı morfolojiye sahip

oldukları, bütün fajların baş ve kasılabilen bir kuyruğa sahip karmaşık yapıda oldukları rapor edilmiştir.

Kim vd. (2012) *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*'nın neden olduğu hastalığı kontrol edebilmek için Kore'de kültürü yapılan gökkuşağı alabalık sistemlerinin sediment örneklerinden PAS-1 fajını izole ederek tanımlamışlardır. İzole edilen fajın diğer *Aeromonas* türlerini enfekte eden Myoviridae fajları ile ilişkili olduğu ve *A. salmonica* subsp. *salmonicida*, *A. salmonica* subsp. *achromogenes*, *A. salmonicida* subsp. *masoucida* üzerine bakteriyolitik bir etkiye sahip olduğu ancak *A. hydrophila* izolatları üzerine herhangi bir etkiye sahip olmadığı rapor edilmiştir.

Balıklarda önemli bir mortaliteye neden olan furunkulozis hastalığının etkeni *A. salmonicida*'yı inaktive etmek için fajların *in vivo* ve *in vitro* etkisi Silva vd. (2016) tarafından araştırılmıştır. Portekiz'de kanalizasyon suyundan izole edilen AS-A fajının 25 bakteri türüne karşı etkisi araştırılmış ve sadece *A. salmonicida*'yı inaktive ettiği tespit edilmiştir. İzole edilen tank suyuna faj ilave edilerek enfekte edilmiş balıkların kontrol grubuna göre hayatta kalma oranlarında önemli bir artış olduğu ve izole edilen AS-A fajının furunkulozis hastalığının tedavisinde kullanılabileceği rapor edilmiştir.

Verner-Jeffreys vd. (2007) Atlantik salmonuna oral, periton içi ve banyo şeklinde verdikleri fajın *in vivo* etkisini araştırdıkları çalışmalarında, faj uygulamasının furunkulozis hastalığını tedavi etmede herhangi bir etkisinin olmadığını rapor etmişlerdir.

Vibrio Genusu

Vibriozis deniz ve acı sularda yaşayan balık türlerinin en önemli bakteriyel hastalığıdır. *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *V. ordalii*, *V. vulnificus*, *V. salmonicida*, *V. damsela*, *V. carchariae*, *V. tubiashii*, *V. marinus*, *V. campbellii*, *V. nereis*, *V. parahaemolyticus*, *V. viscosus*, *V. cholerae*, *V. splendidus*, *V. pelagius* türlerinin vibriozise neden olduğu bilinmektedir. *Vibrio* sp. türlerine karşı gerek *in vivo* gerekse *in vitro* etkilerinin araştırıldığı detaylı faj çalışmaları bulunmaktadır. Son zamanlarda farklı *Vibrio* sp. türlerine karşı etkili fajların tüm genom analizleri yapılmıştır (Romero vd., 2014; Luo vd., 2015).

V. parahaemolyticus izolatlarını enfekte eden VP-1, VP-2 ve VP-3 fajlarının farklı balık patojenlerinin üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmada VP-1, VP-2 ve VP-3 fajlarının *V. anguillarum* ve *A. salmonicida*'yı enfekte ettiği, izole edilen üç fajın *A. hydrophila*, *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, *V. fischeri*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. gingeri* ve *P. segetis*'i enfekte etmediği rapor edilmiştir. İki veya üç farklı faj kokteyllerinin kullanımının konak bakteride direnç oluşumunu geciktirerek *V. anguillarum*'a karşı etkili olduğu sonucuna varılmıştır (Mateus vd., 2014).

Çipura balıklarından izole edilmiş olan *V. alginolyticus* bakterisi konak olarak kullanılarak Yunanistan'ın Girit adasından alınan deniz suyu örneklerinden izole edilen iki farklı fajın *V. anguillarum*, *V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. ordalii*, *V. parahaemolyticus*, *V. splendidus* ve *V. owensii*'ye karşı etkisi *in vitro* olarak araştırılmış ve aynı çalışmada *Artemia salina* yetiştiricilik sistemlerine bu fajların ilave edilmesi ile *in vivo* etkisi de incelenmiştir (Kalatzis vd., 2016). İzole edilen her iki fajın da çalışmada kullanılan sekiz *V. alginolyticus* izolatının tümünü, sekiz *V. harveyi* izolatının birini ve bir *V. parahaemolyticus* izolatını enfekte ettiği; *V. anguillarum*, *V. ordalii*, *V. owensii* ve *V. splendidus* izolatlarının hiçbirine etkili olmadığı rapor edilmiştir. Faj karışımının *A. salina* kültür sistemlerine ilavesi ile sistemde bulunan *Vibrio* sp. yükünde %93 oranında azalma görülmüştür (Kalatzis vd., 2016).

Higuera vd. (2013) ilk kez Atlantik salmonunda *V. anguillarum*'un neden olduğu vibriozise karşı etkili fajları kullandıkları çalışmalarında altı faj izole ederek tanımlamışlardır. İzole edilen fajların hepsinin de *V. anguillarum* ve *V. ordalii* izolatlarını enfekte ettiği ancak *V. parahaemolyticus* izolatlarını enfekte etmediği; Atlantik salmonunda yapmış oldukları *in vivo* çalışmada da kullanılan fajın balıkları vibriozise karşı koruduğu rapor edilmiştir.

Portekiz'de kanalizasyon suyundan elde edilen *V. parahaemolyticus* fajı VP2 ve *V. anguillarum* fajı VA1'in *in vitro* etkisi ve zebra balıklarında *in vivo* etkisi Silva vd. (2014) tarafından araştırılmıştır. Zebra balıkları *V. anguillarum* ile enfekte edildikten sonra suya faj ilave edilmiş ve 72 saat sonra larvaların hayatta kalma oranları takip edilmiştir. Sonuç olarak faj ile muamele edilmiş grupta kontrol grubuna oranla önemli ölçüde yüksek hayatta kalma oranı elde edilmiştir. Faj VP2'nin *V. anguillarum* ve *A. salmonicida*'yı enfekte ettiği ancak *A. hydrophila*, *P. damsela* subsp. *damsela*, *P. damsela* subsp. *piscicida*, *V. fischeri*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* ve *P. putida*'yı enfekte etmediği, faj VA1'in ise *V. parahaemolyticus* ve *A. salmonicida*'yı enfekte ettiği rapor edilmiştir (Silva vd., 2014).

Karides çiftliklerinde *V. harveyi*'nin neden olduğu mortaliteyi azaltabilmek için Hindistan'ın batı kıyılarındaki karides çiftliklerinden izole edilen faj kullanılmıştır. Siphoviridae familyasına ait faj izole edilerek *in vivo* etkisi çalışılmıştır. *Penaeus monodon* larvalarının bulunduğu tanklara 10^9 PFU/ml faj ilavesinin larvaların hayatta kalma oranlarında kontrol gruba oranla önemli bir artışa neden olduğu ve tanktaki *V. harveyi* bakteri yükünün de azaldığı rapor edilmiştir (Vinod vd., 2006).

Cui vd. (2021) kalkan balıklarının yemlerine ilave edilen spesifik *V. harveyi* faj kokteyllerinin koruyucu etkinliğini araştırmışlardır. Sonuç olarak faj ilave edilmiş yemler ile beslenen balıkların hayatta kalma oranlarında artış tespit edilirken balıkların normal büyümeleri üzerine herhangi bir etkiye sahip olmadığı bildirilmiştir. Bu nedenle kalkan balığı kültüründe *V. harveyi* enfeksiyonuna karşı faj kokteyllerinin hazırlanarak yem ile birlikte oral yolla balıklara verilebileceği sonucuna varılmıştır.

Ülkemizde balık patojeni *V. anguillarum*'a özgü faj izolasyonu çalışması ilk kez 2015 yılında Yıldızlı tarafından gerçekleştirilmiştir. Yapmış oldukları çalışmada deniz suyu örnekleri alınarak herhangi bir zenginleştirme işlemi yapılmadan direkt filtre edilerek kullanılmış, çok küçük yapıda ve iğne ucu görünümü plak oluşturan Caudovirales'e üye farklı boyutlarda fajlar izole edilmiştir (Yıldızlı, 2015).

Karideslerde *V. vulnificus*'un neden olduğu vibriozise karşı kullanılacak etkili fajlar Srinivasan vd. (2017) tarafından izole edilerek tanımlanmıştır. Karides yetiştiricilik sistemlerinden Tectiviridae familyasına ait VV1, VV2, VV3 ve VV4 olmak üzere dört farklı faj izole edilmiştir. Kloroform, aseton, etil ve metil alkol, RNase, tripsin, triton-X100'ün bu dört fajın üremesi üzerine herhangi bir etkisi bulunmadığı, VV1-VV4 fajlarının yüksek sıcaklık (60°C -üzeri), yüksek ve düşük pH (<3 ve >12) değerlerinde, lizozim ve SDS ilavesi ile tamamen inaktif olduğu rapor edilmiştir (Srinivasan vd., 2017).

Martínez-Díaz ve Hipólito-Morales (2013), *Artemia franciscana* nauplilerini *V. parahaemolyticus* ile enfekte ettikten 0, 3, 10, 20 ve 30 saat sonra Vpms1 fajının farklı dozlarının ilave edilmesinin etkisini araştırmışlardır. *A. franciscana* üzerine *V. parahaemolyticus*'un olumsuz etkisini ortadan kaldırmak için Vpms1 fajının tek bir dozunun etkili olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca enfeksiyondan sonra geç faj uygulanmasının *V. parahaemolyticus*'un neden olduğu mortaliteyi kontrol etmede etkisiz olduğu sonucuna varılmıştır.

Lactococcus Genusu

Laktokokkozis hastalığının etkeni Gram pozitif *L. garvieae*, kültürü yapılan balıklarda olduğu kadar doğada yaşayan balıklarda da önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Laktokokkozis enfeksiyonunu kontrol edebilmek için yeni aşı ve antibiyotik çalışmalarına rağmen eritromisin, linkomisin ve oksitetrasiklin gibi antibiyotiklere dirençli yeni izolatlar elde edildiği rapor edilmiştir (Kawanishi vd., 2005).

Ghasemi vd. (2014) İran'da atık su arıtma tesisinden *L. garvieae*'ye karşı etkili, litik bir WWP-1 fajı izole etmişlerdir. İzole ettikleri fajın ikosaedral kafa ve kontraktil olmayan kısa bir kuyruğa sahip Podoviridae familyasının üyesi olduğu rapor edilmiştir. *In vivo* çalışmalarında, *L. garvieae* ile enfekte gökkuşuğu alabalıkları, 10^8 PFU/g olacak şekilde faj ilave edilmiş yemler ile beslendiğinde mortalitede önemli bir azalma olduğu görülmüştür.

Toprak kompostundan *L. garvieae*'ye karşı etkili GE1 fajı izole edilmiştir. İzole edilen fajın Siphoviridae familyasına ait, yayvan bir kapside, uzun bir kontraktil olmayan kuyruğa ve DNA genomuna sahip olduğu, latent dönem süresinin 31 dakika ve patlama büyüklüğünün ise 139 olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca çalışmada kullanılan 72 adet *L. garvieae* izolatının sadece ikisini enfekte edebildiği ve 58 adet *L. lactis* izolatını enfekte etmediği araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Eraclio vd., 2015).

Park vd. (1997) *L. garvieae* izolatlarına karşı etkili PLgY isimli bakteriyofajı hasta *Seriola quinqueradiata*'dan izole ederek tanımlamışlardır. İzole edilen fajın Siphoviridae familyasına ait 50-60 nm boyutlarında izometrik bir kafa ve esnek uzun bir kuyruğu sahip olduğu ve çalışmada kullanılan 26 *L. garvieae* izolatının 22'sini enfekte ettiği rapor edilmiştir. 1999 yılında Park vd. (1997) tarafından izole edilerek tanımlanan PLgY-16 fajının *in vivo* ve *in vitro* etkisi Nakai vd. (1999) tarafından araştırılmıştır. Faj, *Seriola quinqueradiata*'ya periton içi ve oral yolla verildikten sonra *L. garvieae* ile enfekte edilmiş ve balıkların mortalite oranları takip edilmiştir. Fajın farklı fizikokimyasal (sıcaklık, tuzluluk, pH gibi) ve biyolojik (yem, serum gibi) ortamlarda hayatta kalabildiği, balıklara oral veya

enjeksiyon şeklinde uygulanmasının balıkları *L. garvieae* enfeksiyonuna karşı koruyabildiği rapor edilmiştir.

Yersinia Genusu

Gram negatif balık patojeni *Yersinia ruckeri* özellikle salmonid balıkları olmak üzere pek çok balık türünde enterik kızıl ağız (ERM) olarak bilinen hastalığa neden olmaktadır. Hastalık 1950'li yıllarda ilk kez Amerika'da yetiştiriciliği yapılan gökkuşağı alabalıklarında rapor edildikten sonra bütün dünyaya yayılmıştır. Ülkemizde ise 1991 yılında ilk bildirim yapılmış ve sonrasında çok sayıda araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (Timur ve Timur, 1991; Çağırğan, 1991). Daha önceki yıllarda ERM hastalığı tatlı su ile ilişkilendirilmiştir ancak acı sularda yetiştiriciliği yapılan alabalıklarda ve denize yeni taşınmış salmon balıklarında da hastalık tespit edilmiştir (Karataş ve diğ., 2004; Gulla ve diğ., 2018). Aşılamanın etkisi ile hastalık bütün dünyada olduğu gibi ülkemizde de etkisini azaltmıştır. Ancak son yıllarda ERM ile ilişkili balık ölümleri yeniden artmaya başlamıştır.

Farklı balık türlerinden elde edilmiş *Y. ruckeri* suşlarına karşı etkili faj izolasyonu çalışması ilk kez Stevenson ve Airdrie tarafından 1984 yılında yapılmıştır. Farklı bölgelerden alınan kanalizasyon örneklerinden *Y. ruckeri* izolatlarına karşı etkili sekiz faj izole edilmiştir. İzole edilen fajların büyük çoğunluğunun ikosahedral veya oktahedral yapıda başa sahip kuyruklu fajlar olduğu rapor edilmiştir. İzole edilen kuyruklu ikosahedral yapıda olan faj YerA41'in 35 farklı *Y. ruckeri* serovar I suşundan 34'üne karşı etkili olduğu ancak diğer üç serolojik gruba ait 15 suşa karşı herhangi bir etki göstermediği bildirilmiştir (Stevenson ve Airdrie, 1984)

Strand (2017) yapmış olduğu yüksek lisans tez çalışmasında, 2011 yılından bu yana su ürünleri yetiştiriciliğinde bakteriyel enfeksiyonların azaltılmasında kullanılmak üzere bakteriyofaj bazlı ürünler geliştiren ACD Pharmaceuticals AS (Norveç) tarafından izole edilen dört farklı fajın, *Y. ruckeri* izolatlarına karşı bakteriyolitik etkisini araştırmıştır. Çalışmada test edilen tüm fajların, *Y. ruckeri* üzerinde bakteriyolitik bir etki gösterdiği rapor edilmiştir. Ayrıca salmon balıklarında spesifik faj antikorlarını ölçmek için bir ELISA testi geliştirmiştir.

Karaçoban (2019) yapmış olduğu tez çalışmasında farklı kaynaklardan topladığı su örneklerinden *Y. ruckeri*, *V. anguillarum*, *A. hydrophila* ve *A. sobria*'ya karşı etkili faj izolasyon çalışmaları yapmış ve sonuç olarak çalışmada kullandığı 13 *Y. ruckeri* izolatından sadece bir izolata karşı etkili bir faj elde etmiştir. Ayrıca ACD Pharmaceuticals AS (Norveç) tarafından izole edilen *Y. ruckeri* fajının ülkemizden izole edilen *Y. ruckeri* izolatlarına herhangi bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Su ürünleri yetiştiriciliğinde faj uygulamalarını etkileyen en önemli faktörler uygun yöntemin, zamanın ve dozun seçimidir. Hastalık baş edilemeyecek bir noktaya gelmeden önce faj uygulamasına başlamak en uygun zaman olarak düşünülmektedir. Ayrıca konsantrasyonun iyi ayarlanması, yüksek çoğalma oranına ve düşük dozlarda yüksek etkiye sahip olan fajların seçilmesi çok önemlidir. Fajlar daldırma, yeme karıştırma, enjeksiyon gibi yöntemler ile balıklara uygulanabilmektedir. Her uygulama yönteminin bazı avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Örneğin, daldırma yöntemi aşılama olduğu gibi çok sayıda balığa hızlı bir şekilde uygulanabilirken çok fazla faja ihtiyaç duyulan maliyetli bir yöntemdir. Uygulama yöntemi balığın türüne, enfeksiyonun doğasına, fajların özelliklerine göre belirlenmelidir (Culot vd., 2019; Park vd., 2020).

Fajların su ürünleri yetiştiriciliğinde kullanımları ile ilgili bazı endişeler bulunmaktadır. Özellikle bu ürünleri tüketen insanlar üzerindeki etkileri ile ilgili çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Ancak fajların çevresel strese çok etkilenmediği için su ortamında ve memelilerin sindirim kanalında çok bol miktarda bulunduğu yani normal mikrobiyomun bir parçası olduğu bilinmektedir. Aynı şekilde su ürünleri yetiştiriciliğinde kullanılan fajların çoğu doğal ortamdaki izole edilmektedir ve deniz ürünlerini tüketen insanlar tarafından bilinen zararlı etkileri olmaksızın günlük olarak sindirilmektedir. Fajlar bakteriler neredeyse orada çoğalırlar, bugüne kadar herhangi bir yan etkileri bildirilmemiştir, bakterilerde direnç gelişse bile aynı bakteriyi hedef alan diğer fajlara duyarlı olabilirler, biyofilm oluşturan bakteri formlarında oldukça etkilidirler. Ayrıca fajlar spesifik dar bir konak aralığına sahiptirler, yani normal bağırsak mikrobiyotasına zarar vermezler. İnsan sağlığını etkileme ve mikrobiyomun diğer üyeleri ile etkileşime geçme yeteneklerinin oldukça zayıf olduğu düşünülmektedir.

Faj tedavisi; yeni teknoloji ile canlanan eski bir fikir olarak karşımıza çıkmaktadır. Su ürünleri yetiştiriciliğinde bakteriyel hastalıkların kontrol ve tedavisinde kullanılabilecek fajlar ile ilgili bugüne

kadar yapılmış çalışmalar incelendiğinde büyük bir kısmının faj izole edilerek *in vitro* etkisinin araştırıldığı çalışmalar olduğu, son yıllarda az sayıda *in vivo* çalışmaların da yapıldığı tespit edilmiştir. Ülkemiz akuakültür sektörü açısından baktığımızda ise fajlar ile ilgili sadece iki tez çalışması bulunmaktadır. Daha çok sayıda ve detaylı klinik çalışmalara ihtiyaç olduğu açıktır. Ancak faj çalışmalarında klinik çalışmalara geçmeden önce bu kadar hızlı gelişen bir ürünün yetkili kurumlar tarafından nasıl denetleneceğinin iyi anlaşılması gerekmektedir. Faj terapisi stratejisinden tam olarak yararlanabilmek için faj adaylarının dikkatli seçilmesi ve izole edilmiş fajların kullanımlarının güvenli olduğundan emin olmak için ayrıntılı bir şekilde karakterize edilmesi gerekmektedir. Başka bir deyişle güvenliğin; hem çevre hem yetiştiriciliği yapılan balıklar hem de bu balıkları tüketen insanlar için olduğunu unutmamak gerekmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma 2019 yılında İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü'nde tamamlanan Yüksek Lisans tezinden üretilmiş ve İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği FYL-2018-30132 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Ackermann H.W. (1999). Tailed bacteriophages. The order Caudovirales. *Advances in Virus Research*, 51: 135–201.
- Ackermann, H.W. (2001). Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. *Archives of Virology*, 146, 843–857.
- Ackermann, H.W. (2005). Bacteriophage Classification: In: Kutter E, Sulakvelidze A (eds), Bacteriophages: biology and applications. *CRC Press*, Boca Raton.
- Ackermann, H.W. (2007). 5500 Phages examined in the electron microscope. *Archives of Virology*, 152, 227–243.
- Ackermann, H.W. (2011). The first phage electron micrographs. *Bacteriophage*, 1(4), 225–227.
- Akmal, M., Rahimi-Midani, A., Hafeez-ur-Rehman, M., Hussain, A., Choi, T.-J. (2020). Isolation, characterization, and application of a bacteriophage infecting the fish pathogen *Aeromonas hydrophila*. *Pathogens*, 9, 215.
- Alisky, J., Iczkowski K., Rapoport A., Troitsky N. (1998). Bacteriophages show promise as antimicrobial agents. *The Journal of Infectious Diseases*, 36:5–15.
- Alves, D.R. (2015). Development and characterisation of a responsive polyvalent bacteriophage therapeutic. PhD thesis, Department of Chemistry University of Bath, İngiltere.
- Barrow, P.A., Soothill, J.S. (1997). Bacteriophage therapy and prophylaxis: rediscovery and renewed assessment of potential. *Trends in Microbiology*, 5: 268–271.
- Barton, B.A., Iwama, G.K., (1991). Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids, *Annual Review of Fish Diseases*, 1(6), 3–26.
- Bilgehan, H. (2002). *Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi*. Barış yayınları, Fakülteler Kitabevi, İzmir.
- Bogovazova, G.G., Voroshilova, N.N., Bondarenko, V.M., (1991). The efficacy of *Klebsiella pneumoniae* bacteriophage in the therapy of experimental *Klebsiella* infection. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, immunobiologii*, (4), 5-8.
- Cabello, F.C., (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment, *Environmental Microbiology*, 8(7), 1137 – 1144.
- Candan, A.A., Karataş, S., (2010). *Balık Sağlığı*. Kalmak Ofset Matbaacılık, İstanbul, ISBN: 978-605-88665-0-8.
- Cao, Y., Li S., Li, S., Han, S., Wang, D., Zhao, J., Xu, L., Liu, H., Lu, T. (2020). Characterization and application of a novel *Aeromonas* bacteriophage as treatment for pathogenic *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout. *Aquaculture*, 523, 30.
- Carlton, R.M. (1999). Phage Therapy: Past History and Future Prospects. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 47: 267-274.
- Chow, M.S., Rouf, M.A. (1983). Isolation and partial characterization of two *Aeromonas hydrophila* bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*, 45(5), 1670–1676.
- Cui H., Cong C., Wang L., Li X., Li j., Yang H., Li S., Xu Y. (2021). Protective effectiveness of feeding phage cocktails in controlling *Vibrio harveyi* infection of turbot *Scophthalmus maximus*. *Aquaculture*, 535, 30.
- Culot A., Grosset N., Gautier M. (2019). Overcoming the challenges of phage therapy for industrial aquaculture: A review. *Aquaculture*, 513, 734423.
- Çağırğan, H. (1991). First Isolation of *Yersinia ruckerii* from a rainbow trout farm in Turkey. European Association of Fish Pathologists: EAFP 5th International Conferences on fish diseases, Budapeşte, Macaristan, 131.

- Dallaire-Dufresne, S., Tanaka, K.H., Trudel, M.V., Lafaille, A., Charett, S.J., (2014). Virulence, genomic features, and plasticity of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, the causative agent of fish furunculosis. *Veterinary Microbiology*, 169(1-2), 1–7.
- Diana, J.S., Egna, H. S., Chopin, T., Peterson, M. S., Cao, L., Pomeroy, R., (2013). Responsible aquaculture in 2050: Valuing local conditions and human innovations will be key to success. *BioScience*, 63(4), 255–262.
- Easwaran, M., Dananjaya, S.H.S., Park, S.C., Lee, J., Shin, H-J, De Zoysa, M. (2016). Characterization of bacteriophage pAh-1 and its protective effects on experimental infection of *Aeromonas hydrophila* in Zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Fish Diseases*, 40(6).
- Eraclio, G., Tremblay, D. M., Lacelle-Côté, A., Labrie, S. J., Fortina, M. G., Moineau, S. (2015). A virulent phage infecting *Lactococcus garvieae*, with homology to *Lactococcus lactis* phages. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(24), 8358–8365.
- Fiers, W., Contreras, R., Duerinck, F., Haegeman, G., Iserentant, D., Merregaert, J., Volckaert, G. (1976). Complete nucleotide sequence of bacteriophage MS2 RNA: primary and secondary structure of the replicase gene. *Nature*, 260(5551), 500.
- Ghasemi, S.M., Bouzari, M., Emtiazi, G. (2014). Preliminary characterization of *Lactococcus garvieae* bacteriophage isolated from wastewater as a potential agent for biological control of lactococcosis in aquaculture. *Aquaculture International*, 22, 1469–1480.
- Gulla, S., Barnes, A. C., Welch, T. J., Romalde, J. L., Ryder, D., Ormsby, M. J., Carson, J., Lagesen, K., Verner-Jeffreys, D. W., Davies, R. L., Colquhoun, D. J. (2018). Multilocus variable-number tandem-repeat analysis of *Yersinia ruckeri* confirms the existence of host specificity, geographic endemism, and anthropogenic dissemination of virulent clones. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(16), e00730-18.
- Hagens, S., Loessner, M.J. (2014). Phages of *Listeria* offer novel tools for diagnostics and biocontrol. *Frontiers in Microbiology*, 5:159.
- Hayes, W. (1968). *The Genetics of Bacteria and Their Viruses. Studies in Basic Genetics and Molecular Biology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Higuera, G., Bastías, R., Tsertsvadze, G., Romero, J., Espejo, R.T. (2013). Recently discovered *Vibrio anguillarum* phages can protect against experimentally induced vibriosis in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*, 392–395, 128–33.
- Hoang, A., Xuan, T.T.T., Nga, L. P., Oanh, D.T.H. (2019). Selection of phages to control *Aeromonas hydrophila* – An infectious agent in Striped Catfish. *Biocontrol Science*, 24, 1, 2328.
- Jun, J.W., Kim, H.J., Shin, S.P., Han, J.E. , Chai, J.Y., Park, S.C., (2013). Protective effects of the *Aeromonas* phages pAh1-C and pAh6-C against mass mortality of the cyprinid loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) caused by *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, 416–417, 289–295.
- Kaczkowski, H., Weber-Dabrowska, B., Dabrowski, M., Zdrojewicz, Z., Cwioro, F. (1990). Use of bacteriophages in the treatment of chronic bacterial diseases, *Wiadomosci lekarskie* (Warsaw, Poland: 1960), 43(3-4), 136-141.
- Kalatzis, P.G., Bastias, R., Kokkari, C., Katharios, P. (2016) Isolation and characterization of two lytic bacteriophages, ϕ St2 and ϕ Grn1; Phage therapy application for biological control of *Vibrio alginolyticus* in aquaculture live feeds. *PLoS ONE*, 11(3): e0151101.
- Karaçoban, F. (2017). Balık patojenlerine karşı bakteriyofajların kullanımının araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul.
- Karatas, S., Candan, A., Demircan, D. (2004). Enteric red mouth disease in cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) on the Black Sea coast of Turkey. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 56-3, 226-231.
- Kawanishi, M., Kojima, A., Ishihara, K., Esaki, H., Kijima, M., Takahashi, T., Suzuki, S. and Tamura, Y. (2005), Drug resistance and pulsed-field gel electrophoresis patterns of *Lactococcus garvieae* isolates from cultured *Seriola* (yellowtail, amberjack and kingfish) in Japan. *Letters in Applied Microbiology*, 40: 322-328.
- Keen, E.C., Bliskovsky, V.V., Malagon, F., Baker, J.D., Prince, J.S., Klaus, J.S., Adhya, S.L. (2017). Novel "Superspreader" Bacteriophages Promote Horizontal Gene Transfer by Transformation. *mBio*, 8(1):e02115-16.
- Kim, J.H., Son, J.S., Choi, Y.J., Choresca C.H., Shin S.P., Han J.E., Jun J.W., Kang D.H., Oh C., Heo S.J., Park S.C. (2012). Isolation and characterization of a lytic Myoviridae bacteriophage PAS-1 with broad infectivity in *Aeromonas salmonicida*. *Current Microbiology*, 64, 418–426.
- Kingwell, K. (2015). Bacteriophage therapies re-enter clinical trials. *Nature Reviews Drug Discovery*. 14(8):515-6.
- Kutter E., Sulakvelidze A. (2004). Bacteriophages:biology and applications. CRC Press, Amerika, ISBN 0-8493-1336-8.

- Le, T.S., Nguyen, T.H., Vo, H.P., Doan, V.C., Nguyen, H.L., Tran, M.T., Tran, T.T., Southgate, P.C., Kurtböke, D.İ., (2018). Protective effects of bacteriophages against *Aeromonas hydrophila* species causing Motile Aeromonas Septicemia (MAS) in striped catfish. *Antibiotics*, 7(1), 16.
- Lederberg, E. M., Lederberg, J., (1953). Genetic studies of lysogenicity in *Escherichia coli*. *Genetics*, 38(1), 51.
- Letchumanan, V., Chan, K. G., Pusparajah, P., Saokaew, S., Duangjai, A., Goh, B. H., Ab Mutalib, N. S., Lee, L. H. (2016). Insights into Bacteriophage Application in Controlling *Vibrio* Species. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1114.
- Luo, Z.H., Yu, Y.P., Jost, G., Xu, W., Huang, X.L. (2015). Complete genome sequence of a giant *Vibrio* bacteriophage VH7D. *Marine Genomics*, 3, 293-295.
- Mai, V., Ukhanova, M., Visone, L., Abuladze, T., & Sulakvelidze, A. (2010). Bacteriophage Administration Reduces the Concentration of *Listeria monocytogenes* in the Gastrointestinal Tract and Its Translocation to Spleen and Liver in Experimentally Infected Mice. *International Journal of Microbiology*, 624234.
- Martínez-Díaz S.F., Hipólito-Morales A. (2013). Efficacy of phage therapy to prevent mortality during the vibriosis of brine shrimp. *Aquaculture*, (400–401), 120-124.
- Mateus L., Costa Y.J., Silva C., Pereira A., Cunha A., Almeida A. (2014). Efficiency of phage cocktails in the inactivation of *Vibrio* in aquaculture. *Aquaculture*, 424–425, 167-173.
- Merabishvili, M., Pirnay, J.P., Verbeken, G., Chanishvili, N., Tediashvili, M., Lashkhi, N., Glonti, T., Krylov, V., Mast, J., Van Parys, L., Lavigne, R., Volckaert, G., Mattheus, W., Verween, G., De Corte, P., Rose, T., Jennes, S., Zizi, M., De Vos, D., Vaneechoutte, M., (2009). Quality-controlled small-scale production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials. *Plos One*, 4(3), e4944.
- Merino, S., Camprubi, S., Tomas, J.M. (1990). Isolation and characterization of bacteriophage PM2 from *Aeromonas hydrophila*. *FEMS Microbiology Letters*, 68, 3, 239–244.
- Middelboe, M., Jacquet, S., Weimbauer, M., (2008). Viruses in freshwater ecosystems: an introduction to the exploration of viruses in new aquatic habitats. *Freshwater Biology*, 53, 1069–1075.
- Morozova, V. V., Vlassov, V. V., & Tikunova, N. V. (2018). Applications of Bacteriophages in the Treatment of Localized Infections in Humans. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1696.
- Myelnikov, D. 2018. An Alternative Cure: The Adoption and Survival of Bacteriophage Therapy in the USSR, 1922–1955. *Journal of the History of Medicine and Allied Sciences*, October 12, Vol. 73, No. 4, pp. 385–411.
- Nakai, T., Sugimoto, R., Park, K.H., Mori, K., Nishioka, T., Maruyama, K. (1999). Protective effects of bacteriophage on experimental *Lactococcus garvieae* infection in yellowtail. *Diseases of Aquatic Organisms*, 37, 33–41.
- Özkan, İ. (2015). Antibiyotik dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarına spesifik litik bakteriyofaj izolasyonu ve izole edilen fajların litik spektrumlarının belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Şifa Üniversitesi, İzmir.
- Park, KH, Matsuoka, S, Nakai, T, Muroga, K. (1997). A virulent bacteriophage against *Lactococcus garvieae* (formerly *Enterococcus seriolicida*) isolated from yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 29:1449.
- Park S.Y., Han J.E., Kwon H. Park S.C., Kim J.H. (2020). Recent Insights into *Aeromonas salmonicida* and Its Bacteriophages in Aquaculture: A Comprehensive Review. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(10): 1443–1457.
- Paterson, W.D., Douglas, R.J., Grinyer, I., McDermott, L.A. (1969). Isolation and preliminary characterization of some *Aeromonas salmonicida* bacteriophages. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 26:629-632.
- Rao, M.B., Lalithab, K.V. (2015). Bacteriophages for aquaculture: Are they beneficial or inimical. *Aquaculture*. 437, 146-154.
- Reardon, S. (2014) Phage therapy gets revitalized. *Nature*, 510:15–16.
- Richards, G.P. (2014). Bacteriophage remediation of bacterial pathogens in aquaculture: a review of the technology. *Bacteriophage*, 4(4), e975540.
- Romero, J., Higuera, G., Gajardo, F., Castillo, D., Middleboe, M., García, K., Ramírez, C., Espejo, R.T. (2014). Complete genome sequence of *Vibrio anguillarum* phage CHOED successfully used for phage therapy in aquaculture. *Genome Announcements*, 2, 4 e00091-14.
- Samanidou, V.F., Evaggelopoulou, E.N. (2007). Analytical strategies to determine antibiotic residues in fish. *Journal of Separation Science*, 30: 2549-2569.
- Sankaran, N. (2010) The bacteriophage, its role in immunology: how Macfarlane Burnet's phage research shaped his scientific life. *Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences*, 41:367-75.
- Schopf, J. W. (1992). *The oldest fossils and what they mean, in Major Events in the History of Life*. Jones and Bartlett Publishers, Boston, 29–63.

- Sieiro C, Areal-Hermida L, Pichardo-Gallardo Á, Almuiña-González R, de Miguel T, Sánchez S, Sánchez-Pérez Á, Villa TG. (2020). A Hundred Years of Bacteriophages: Can Phages Replace Antibiotics in Agriculture and Aquaculture? *Antibiotics*, 9(8):493.
- Sharma, S., Chatterjee, S., Datta, S., Prasad R, Dubey D., Prasad R.K., Vairale M.G. (2017). Bacteriophages and its applications: an overview. *Folia Microbiologica*, 62, 17–55.
- Sillankorva, S.M. (2008). Use of bacteriophages to control biofilms. PhD in Chemical and Biological Engineering, University of Minho, Braga, Portekiz.
- Silva, Y.J., Costa, L., Pereira, C., Mateus, C., Cunha, A., Calado, R., Gomes, N.C. M., Pardo, M.A., Hernandez, I., Almeida, A. (2014). Phage therapy as an approach to prevent *Vibrio anguillarum* infections in fish larvae production. *PLoS One*, 9(12):e114197.
- Silva Y.J., Moreirinha, C., Pereira, C.S.G., Costa, L., Rocha, R., Cunha, A., Gomes, N.C.M., Calado, R. Almeida, A. (2016). Biological control of *Aeromonas salmonicida* infection in juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*) with Phage AS-A. *Aquaculture*, 2016;450:225–233.
- Slopek, S., Durlakowa, I., Weber-Dabrowska, B., Kucharewicz-Krukowska, A., Dabrowski, M., Bisikiewicz, R. (1983). Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections. I. General evaluation of the results, *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 31(3), 267-291.
- Slopek, S., Weber-Dabrowska, B., Dabrowski, M., Kucharewicz-Krukowska, A., (1987). Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections in the years 1981-1986. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, 35(5), 569-583.
- Smith, H.W., Huggins, M.B. (1983). Effectiveness of phages in treating experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves, piglets and lambs. *Microbiology*, 129(8), 2659-2675.
- Smith, H.W., Huggins, M.B., Shaw, K.M. (1987). Factors influencing the survival and multiplication of bacteriophages in calves and in their environment. *Microbiology*, 133(5), 1127-1135.
- Soothill, J.S., Lawrence, J.C., Ayliffe, G.A.J. (1988). The efficacy of phages in the prevention of the destruction of pig skin in vitro by *Pseudomonas aeruginosa*. *Medical Science Research*, 16, 1287-1288.
- Soykut, E.A. (2007). Streptococcus thermophilus ve *Lactobacillus bulgaricus* virulent fajlarının replikasyon parametreleri, kapsid protein profilleri ve restriksiyon endonükleaz analizleri esas alınarak tanımlanmaları ve sınıflandırılmaları. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Srinivasan, P., Ramasamy, P. (2017). Morphological characterization and biocontrol effects of *Vibrio vulnificus* phages against Vibriosis in the shrimp aquaculture environment. *Microbial Pathogenesis*, 111, 472-480.
- Stevenson, R. M., & Airdrie, D. W. (1984). Isolation of *Yersinia ruckeri* bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*, 47(6), 1201–1205.
- Strand, A. (2017). Analyses of bacteriophages to *Yersinia ruckeri* and the salmon (*Salmo salar* L.) antibody response to the bacteriophages. Master thesis, University of Bergen, Norway.
- Stroj, L., Weber-Dabrowska, B., Partyka, K., Mulczyk, M., Wojcik, M. (1999). Successful treatment with bacteriophage in purulent cerebrospinal meningitis in a newborn. *Neurologia i Neurochirurgia Polska*, 33(3), 693-698.
- Subasinghe R., Soto D., Jia J. (2009). Global aquaculture and its role in sustainable development. *Reviews in Aquaculture*, 1, 2–9.
- Sulakvelidze A., Alavidze Z., Morris J. G. (2001). Bacteriophage Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, March, 649–659.
- Summers, W.C. (1999). *Felix d'Herelle and the origins of molecular biology*. Yale University Press, New Haven, Conn.
- Summers, W.C. (2001). Bacteriophage therapy. *Annual Review of Microbiology*, 55:437–45.
- Şahin K. (2017). *TÜBA-İnsan ve Hayvan Sağlığında Akılcı Antibiyotik Kullanımı ve Antibiyotik Dirençlilik Raporu*. Türkiye Bilimler akademisi Yayınları, TÜBA raporları, No:21. Ses reklam Matbaacılık, Ankara.
- Tan, D. (2015). Exploration of phage-host interactions in the fish pathogen *Vibrio anguillarum* and antiphage defense strategies. PhD thesis, University of Copenhagen Faculty of Science Department of Biology Marine Biological Section, Danimarka.
- Timur, G, Timur, M. (1991). An outbreak of enteric red mouth disease in farmed rainbow trout (*O. mykiss*) in Turkey. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 11(5): 182-183.
- Verner-Jeffreys, D.W., Algoet, M., Pond, M.J., Virdee, H.K., Bagwell, N.J., Roberts, E.G. (2007). Furunculosis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) is not really controllable by bacteriophage therapy. *Aquaculture*, 270:475-84.
- Vinod, M.G., Shivu, M.M., Umesha, K.R., Rajeeva, B.C., Krohne, G., Karunasagar, I., Karunasagara, I. (2006). Isolation of *Vibrio harveyi* bacteriophage with a potential for biocontrol of luminous vibriosis in hatchery environments. *Aquaculture*, 255, 1–4, 117-124.
- Weber-Dąbrowska, B., Jończyk-Matysiak, E., Żaczek, M., Łobocka, M., Łusiak-Szelachowska, M., Górski, A. (2016). Bacteriophage Procurement for Therapeutic Purposes. *Frontiers in Microbiology*, 12;7:1177.

- WHO (2014). Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance. *World Health Organization, Geneva*, p. 257. ISBN: 9789241564748.
- Wise, D.J., Johnso, M.R., (1998). Effect of feeding frequency and fomet-medicated feed on survival, antibody response, and weight gain of fingerling channel catfish *Ictalurus punctatus* after Natural Exposure to *Edwardsiella ictaluri*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 29(2).
- Wittebole, X., De Roock, S., & Opal, S. M. (2014). A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Virulence*, 5(1), 226–235.
- Yıldızlı, G. (2015). Balık patojeni bazı *Vibrio* bakteriyofajlarının izolasyonu ve karakterizasyonu, Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Mersin.