



T.C.  
NİĞDE ÖMER HALİSDEMİR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

*Pseudomonas aeruginosa* 'yı İNHİBE EDEN BAKTERİYOFAJLARIN İZOLE VE  
KARAKTERİZE EDİLMESİ VE TAVUK ETİNDE BİYOKORUYUCU OLARAK  
KULLANILMA POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ

NAZİFE YILMAZ

Ağustos 2021



T.C.  
NİĞDE ÖMER HALİSDEMİR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

*Pseudomonas aeruginosa* 'yı İNHİBE EDEN BAKTERİYOFAJLARIN İZOLE VE  
KARAKTERİZE EDİLMESİ VE TAVUK ETİNDE BİYOKORUYUCU OLARAK  
KULLANILMA POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ

NAZİFE YILMAZ

Doktora Tezi

Danışman

Prof. Dr. Zeliha YILDIRIM

Ağustos 2021

**Nazife YILMAZ** tarafından **Prof. Dr. Zeliha YILDIRIM** danışmanlığında hazırlanan *“Pseudomonas aeruginosa’yı İnhibe Eden Bakteriyofajların İzole ve Karakterize Edilmesi ve Tavuk Etinde Biyokoruyucu Olarak Kullanılma Potansiyellerinin Belirlenmesi”* adlı bu çalışma jürimiz tarafından Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı’nda Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Zeliha YILDIRIM, Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Metin YILDIRIM, Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Ayten ÖZTÜRK, Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Zülal KESMEN, Erciyes Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Mehmet TOKATLI, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi

**ONAY:**

Bu tez, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca belirlenmiş olan yukarıdaki jüri üyeleri tarafından .../.../20.... tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu’nun .../.../20.... tarih ve ..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

...../...../20...

**Prof. Dr. Murat BARUT**  
**MÜDÜR**

## **TEZ BİLDİRİMİ**

Tez içindeki bütün bilgilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Nazife YILMAZ

## ÖZET

### *Pseudomonas aeruginosa* 'yı İNHİBE EDEN BAKTERİYOFAJLARIN İZOLE VE KARAKTERİZE EDİLMESİ VE TAVUK ETİNDE BİYOKORUYUCU OLARAK KULLANILMA POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ

YILMAZ, Nazife

Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman

:Prof. Dr. Zeliha YILDIRIM

Ağustos 2021, 139 sayfa

Bu tez kapsamında, farklı illerden toplanan gıda örneklerinden *Pseudomonas aeruginosa* suşları izole edilmiş ve bu izolatlardan *P. aeruginosa*'ya özgü karakteristikler sergileyen 10 izolat, 16S rRNA bölgelerine göre tanımlanmıştır. Bakteriyofaj izolasyonu için farklı yerlerden örnekler toplanmış ve bakteriyofaj taraması yapılmıştır. Tarama sonucunda, 35 adet litik faj izole edilmiş ve konak hücre aralığı geniş olan iki tanesi seçilip karakteristik özellikleri belirlenmiştir. Taramalı elektron mikroskopuyla yapılan incelenme sonucunda, vB\_Pae-K10 ve vB\_Pae-K13 fajlarının *Caudovirales* takımından *Siphoviridae* familyasına ait oldukları belirlenmiştir. vB\_PaeS-K10 fajının genom büyüklüğü, MOI değeri, latent periyodu, patlama süresi ve patlama büyüklüğünün sırasıyla 54,20 kb, 10, 75 dk, 30 dk ve 34,86 olduğu, vB\_PaeS-K13 fajının ise 44,06 kb, 0,01, 20 dk, 35 dk ve 35,95 olduğu belirlenmiştir. Bu fajların her ikisinin de pH 3-12 değerleri arasında aktivitelerini tamamen koruduğu ve Ca<sup>+2</sup> iyonlarının, her iki fajın konakçısına karşı absorpsiyon oranını arttırdığı bulunmuştur. Litik aktivite testi, her iki fajın konak hücre yoğunluğunu 4 ve 37°C'de azalttığını göstermiştir. Faj vB\_PaeS-K10 95°C'de 5, faj vB\_PaeS-K13 ise 70°C'de 30 dakikalık ısı işlem sonucunda aktivitesini tamamen kaybetmiştir. Ayrıca, vB\_PaeS-K10 ve vB\_PaeS-K13 fajlarının 4°C'de tavuk etinde *P. aeruginosa*'ya karşı çok kuvvetli enfektif etki gösterdiği ve dolayısıyla tavuk etinde biyokoruyucu olarak kullanma potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir.

*Anahtar Kelimeler:* *Pseudomonas aeruginosa*, izolasyon, bakteriyofaj, karakterizasyon, biyokoruma

## SUMMARY

### ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF BACTERIOPHAGES INHIBITING *Pseudomonas aeruginosa* AND DETERMINING THEIR POTENTIAL OF UTILIZATION AS BIOPROTECTIVE IN CHICKEN MEAT

YILMAZ, Nazife

Niğde Ömer Halisdemir University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Food Engineering

Supervisor : Prof. Dr. Zeliha YILDIRIM

August 2021, 139 pages

In this study, *Pseudomonas aeruginosa* strains were isolated from food samples collected from different provinces, and ten of these isolates exhibiting *P. aeruginosa*-specific characteristics were identified according to their 16S rRNA regions. For bacteriophage isolation, samples were collected from different places and bacteriophage screening was performed. 35 lytic phages were isolated and two of them with a wide host cell range were selected and their characteristics were determined. As a result of the examination with scanning electron microscopy, it was determined that vB\_Pae-K10 and vB\_Pae-K13 phages belong to the family *Siphoviridae* from the order *Caudovirales*. The genome size, MOI value, latent period, burst time, burst size of vB\_PaeS-K10 phage are 54.20 kb, 10, 75 min, 30 min and 34.86 respectively, whereas those of vB\_PaeS-K13 phage are 44.06 kb, 0.01, 20 min, 35 min and 35.95. Both of these phages completely preserved their activities between pH 3-12, and Ca<sup>2+</sup> ions increased absorption rate of the phages against their hosts. Lytic activity test showed that both phages reduced host cell density at 4 and 37°C vB\_PaeS-K10 and vB\_PaeS-K13 phages lost completely their activities at 95°C after 5 min, and at 70°C after 30 min of heat treatment, respectively. In addition, it has been determined that vB\_PaeS-K10 and vB\_PaeS-K13 phages have a very strong infective effect against *P. aeruginosa* in chicken meat at 4°C and therefore have the potential to be used as bioprotective in chicken meat.

*Keywords:* *Pseudomonas aeruginosa*, isolation, bacteriophage, characterization, bioprotection

## ÖN SÖZ

Çalışmalarım boyunca farklı bakış açıları ve bilimsel katkılarıyla beni aydınlatan, yakın ilgi ve yardımlarını esirgemeyen ve bu günlere gelmemde en büyük katkı sahibi hocam Sayın Prof. Dr. Zeliha YILDIRIM'a teşekkürü bir borç bilirim.

Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesindeki çalışmalarım boyunca laboratuvarını bana açıp bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan Sayın Dr. Öğr. Üyesi Mert KARAOĞLAN'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Laboratuvarda birlikte çalışmaktan keyif aldığım Dr. Öğr. Üyesi Tuğba SAKİN ŞAHİN ve diğer laboratuvar arkadaşlarıma teşekkür ediyorum.

Ayrıca; bu günlere gelmemde en büyük katkı sahibi olan, sonsuz sevgilerini benden esirgemeyen fedakâr anneme, hayatım boyunca örnek aldığım canım babama ve çalışmalarım süresince sabır göstererek beni daima destekleyen eşime tüm kalbimle teşekkürlerimi sunarım.

Bu araştırma Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Koordinatörlüğü'nce desteklenmiştir (Proje No: GTB 2019/01-BAGEP).



2.7.1.4 Yeni kapsidlerin oluşumunda rol oynayan faj proteinlerinin sentezi ve montajı.....	32
2.7.1.5 Kopyalanmış faj genomunun paketlenmesi .....	32
2.7.1.6 Hücre lizizi ve yeni faj partiküllerinin salınması .....	33
2.7.2 Lizojenik döngü .....	34
2.8 Bakteriyofaj Direnç Sistemleri .....	36
2.8.1 Faj adsorpsiyonunun önlenmesi .....	36
2.8.2 Faj DNA girişini önleme .....	38
2.8.3 Restriksiyon modifikasyon sistemleri.....	38
2.8.4 Abortif enfeksiyon .....	39
2.9 Bakteriyofajların Gıda Endüstrisinde Biyokoruyucu Olarak Kullanılması .....	39
2.10 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın Bakteriyofajlar Aracılığı ile Kontrolü .....	42
BÖLÜM III.....	45
MATERYAL VE METOT .....	45
3.1 Materyal .....	45
3.2 Metot .....	45
3.2.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> izolasyonu için gıda örneklerinin toplanması.....	45
3.2.2 Gıda örneklerinden <i>Pseudomonas aeruginosa</i> izolasyonu ve saflaştırılması. 45	
3.2.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın tanımlanması .....	46
3.2.3.1 Morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testler.....	46
3.2.3.2 Moleküler tanımlama .....	50
3.2.4 Bakteriyofaj izolasyonu ve karakterizasyonu .....	52
3.2.4.1 Bakteriler ve besiyerleri .....	52
3.2.4.2 Bakteriyofajların izolasyonunda kullanılan materyaller .....	52
3.2.4.3 Bakteriyofajların izolasyonu .....	52
3.2.4.4 Spot ve çift tabaka agar plak metodu .....	53
3.2.4.5 Bakteriyofajların saflaştırılması .....	53
3.2.4.6 Faj stoklarının hazırlanması .....	54
3.2.4.7 Fajların etki ettiği konakçı aralığının belirlenmesi .....	54
3.2.4.8 Bakteriyofajların elektron mikroskopuyla incelenmesi .....	54
3.2.4.9 Bakteriyofaj DNA'sının saflaştırılması.....	55
3.2.4.10 Bakteriyofaj genom büyüklüğünün restriksiyon enzimleri ile belirlenmesi .....	56
3.2.4.11 İnfeksiyon çokluğu değerinin belirlenmesi .....	56

3.2.4.12 Bakteriyofajların tek aşamalı gelişim kurvelerinin belirlenmesi .....	57
3.2.4.13 Fajların konakçı hücreye adsorpsiyon oranının belirlenmesi.....	57
3.2.4.14 Fajların pH ve sıcaklık stabilite değerlerinin tespiti.....	58
3.2.4.15 Konak hücreye karşı bakteriyofajların litik aktivitelerinin belirlenmesi .....	58
3.2.4.16 Fajların biyokoruyucu olarak tavuk etinde kullanım olanaklarının belirlenmesi .....	58
3.2.4.17 İstatistiksel değerlendirme.....	59
BÖLÜM IV .....	60
BULGULAR VE TARTIŞMA .....	60
4.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> İzolasyonu ve Tanımlanması .....	60
4.1.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> izolasyonu, morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerin belirlenmesi .....	60
4.1.2 <i>P. aeruginosa</i> izolatlarının moleküler tanımlanması .....	69
4.2 Bakteriyofaj İzolasyonu .....	71
4.3 Atık Sulardan İzole Edilen Bakteriyofaj Örneklerinin Saflaştırılması ve Faj Titreleri .....	76
4.4 Fajların Etki Ettiği Konakçı Aralıkları .....	76
4.5 vB_Pea-K10 ve vB_Pea-K13 Fajlarının Morfolojik Özellikleri .....	80
4.6 Bakteriyofaj DNA'sının Saflaştırılması ve Genom Büyüklüğü .....	90
4.7 Bakteriyofajların Tek Aşamalı Gelişim Kurveleri.....	92
4.8 Enfeksiyon Çokluğu Değeri.....	96
4.9 Fajların Konakçı Hücreye Adsorpsiyonu .....	98
4.10 Konak Hücreye Karşı Bakteriyofajların Litik Aktiviteleri .....	100
4.11 Fajların pH ve Sıcaklık Stabiliteleri.....	103
4.12 Fajların Biyokoruyucu Olarak Tavuk Etinde Kullanım Olanaklarının Belirlenmesi.....	107
BÖLÜM V .....	112
SONUÇLAR .....	112
KAYNAKLAR .....	116
ÖZGEÇMİŞ .....	139

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Pseudomonasların sınıflandırılması (Ekincioğlu, 2012) .....	5
Çizelge 2.2. Ackermann sınıflandırması (Ackermann, 2007) .....	24
Çizelge 3.1. Amplifikasyon için kullanılan primerlerin baz dizilimi .....	51
Çizelge 3.2. PCR döngü şartları.....	51
Çizelge 3.3. <i>P. aeruginosa</i> suşlarını enfekte eden fajların konak hücre aralığının belirlenmesinde kullanılan bakteriler .....	55
Çizelge 4.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> türlerinin izole edildiği materyallere göre dağılımları.....	61
Çizelge 4.2. Piyasadaki çeşitli kasaplardan, kesim evlerinden toplanan bazı tavuk, kırmızı et ve peynir örneklerinden izole edilen izolatların morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri .....	62
Çizelge 4.3. Süt üreticilerinden toplanan çiğ süt örneklerinden izole edilen izolatların morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri.....	66
Çizelge 4.4. 16S rRNA tam sekans analizi ile tanımlanan süttten izole edilen bakteriler.....	70
Çizelge 4.5. Niğde, Nevşehir ve Aksaray'dan toplanan atık su örneklerinden <i>Pseudomonas aeruginosa</i> suşlarına karşı bakteriyofaj tarama sonuçları ..	74
Çizelge 4.6. Bakteriyofajların tarandığı ortamlar ve elde edilen izolat sayıları .....	75
Çizelge 4.7. Saflaştırılan bakteriyofaj örneklerinin titreleri .....	77
Çizelge 4.8. İzole edilen fajların farklı <i>P. aeruginosa</i> suşlarına karşı enfektif etkileri ..	81
Çizelge 4.9. İzole edilen fajların farklı <i>E. coli</i> ve <i>Salmonella enteritidis</i> suşlarına/serovarlarına karşı enfektif etkileri .....	82
Çizelge 4.10. İzole edilen fajların farklı <i>Salmonella typhimurium</i> ve diğer <i>Salmonella enterica</i> serovarlarına karşı enfektif etkileri .....	84
Çizelge 4.11. İzole edilen fajların diğer bazı Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilere karşı enfektif etkileri .....	85
Çizelge 4.12. <i>P. aeruginosa</i> bakteriyofajlarının yapısal özelliklerine ait ölçümler .....	89
Çizelge 4.13. Bakteriyofajların latent dönemleri, patlama zamanları ve patlama büyüklükleri .....	95

- Çizelge 4.14. 4°C’de depolanan tavuk etlerine yaklaşık  $10^3$  kob/g düzeyinde inoküle edilen *P. aeruginosa* RM11 suşuna karşı *P. aeruginosa* fajlarının inhibitör etkisi ..... 108
- Çizelge 4.15. 4°C’de depolanan tavuk etlerine yaklaşık  $10^5$  kob/g düzeyinde inoküle edilen *P. aeruginosa* RM11 bakterisine karşı *P. aeruginosa* fajlarının inhibitör etkisi ..... 109



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Bradley'in bakteriyofajların temel sınıflandırması (Bradley, 1967) .....	22
Şekil 2.2. Bakteriyofajın yapısı (Titer, 2016) .....	26
Şekil 3.1. Pseudomonas Selektif Agar Base CFC'ye ekimi yapılan örnekler .....	46
Şekil 3.2. Oksidaz testi .....	47
Şekil 3.3. 41°C'de üreme testi .....	47
Şekil 3.4. Hareketlilik testi .....	48
Şekil 3.5. King B besiyerine ekim yapılan örnekler .....	48
Şekil 3.6. İndol testi .....	49
Şekil 4.1. Süt fabrikası atık suyundan izole edilen bakteriyofajların görüntüleri.....	73
Şekil 4.2. vB_Pea-K13 (a) ve vB_Pea-K10 (b) fajlarının konuk hücreleri RM24 ve RM11'e karşı oluşturdukları plak görüntüleri.....	87
Şekil 4.3. vB_PaeS-K10 fajının elektron mikroskobu görüntüsü.....	88
Şekil 4.4. vB_PaeS-K13 fajı elektron mikroskobu görüntüleri .....	88
Şekil 4.5. <i>P. aeruginosa</i> fajlarından izole edilen DNA'ların retriksiyon enzimleri ile kesilmesi sonucu elde edilen bant görüntüleri. A, <i>HindIII</i> enzimi ile kesilen $\lambda$ DNA Markırı; B, <i>EcoR1</i> ile kesilen vB_PaeS-K10 fajı; C, <i>HindIII</i> ile kesilen vB_PaeS-K10 fajı; D, <i>BamHI</i> ile kesilen vB_PaeS-K10 fajı; E, <i>HindIII</i> enzimi ile kesilen $\lambda$ DNA Markırı; F, <i>EcoR1</i> ile kesilen vB_PaeS- K13 fajı; G, <i>HindIII</i> ile kesilen vB_PaeS-K13 fajı; H: <i>BamHI</i> ile kesilen vB_PaeS-K13 fajı.....	91
Şekil 4.6. vB_PaeS-K10 fajı tek aşamalı gelişim kurvesi .....	94
Şekil 4.7. vB_PaeS-K13 fajı tek aşamalı gelişim kurvesi .....	95
Şekil 4.8. vB_PaeS-K10 ve vB_PaeS-K13 bakteriyofajların MOI değerleri: vB_PaeS-K10 (a) ve vB_PaeS-K13 (b) .....	97
Şekil 4.9. Bakteriyofajların konak hücrelerine adsorpsiyon oranları: vB_PaeSE-K10 fajı (a) ve vB_PaeS_K13 fajı (b) .....	99
Şekil 4.10. vB_PaeS-K10 fajının 37°C ve 4°C'de <i>P. aeruginosa</i> RM11'e karşı litik aktivitesi.....	102
Şekil 4.11. vB_PaeS-K13 fajının 37°C ve 4°C'de <i>P. aeruginosa</i> RM24'e karşı litik aktivitesi.....	103

Şekil 4.12. vB_PaeS-K10 fajının sıcaklık stabilitesi .....	104
Şekil 4.13. vB_PaeS-K13 fajının sıcaklık stabilitesi .....	105
Şekil 4.14. vB_PaeS-K10 fajının pH stabilitesi.....	106
Şekil 4.15. vB_PaeS-K13 fajının pH stabilitesi.....	107
Şekil 4.16. <i>P. aeruginosa</i> fajlarının 4°C’de yaklaşık 3,10 log kob/g düzeyinde <i>P.</i> <i>aeruginosa</i> RM11 ile inoküle edilen tavuk etlerinde stabilitesi .....	109
Şekil 4.17. <i>P. aeruginosa</i> fajlarının 4°C’de yaklaşık 5,37 log kob/g düzeyinde <i>P.</i> <i>aeruginosa</i> RM11 ile inoküle edilen tavuk etlerinde stabilitesi .....	110



## SİMGE VE KISALTMALAR

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklama</b>
$\mu$	Mikron
kob/mL veya g	Mililitrede veya gramda koloni oluşturan birim
pob/mL veya g	Mililitrede veya gramda plak oluşturan birim
nm	Nanometre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
kb	Kilobaz
<i>P.aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P. fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>P. putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>P. protegens</i>	<i>Pseudomonas protegens</i>
<i>P. syringae</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>
<i>P. entomophila</i>	<i>Pseudomonas entomophila</i>
<i>E. coli O157:H7</i>	<i>Escherichia coli O157:H7</i>
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>

<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklama</b>
AB	Avrupa Birliği
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
Abi	Abortif Enfeksiyon
ATCC	Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu
BIM	Bakteriyofaja Duyarsız Mutant Sıklığı
Ca	Kalsiyum
CaCl <sub>2</sub>	Kalsiyum Klorür
CFC	Cephalothin-sodium fusidate-cetrimide
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dsDNA	Çift sarmallı DNA
EF	Elongasyon Faktörü

EN	European Norm
EPS	Ekzopolisakkarit
ExoA	Exzotoksin A
exoS	ekzoenzim S
exoT	ekzoenzim T
exoU	ekzoenzim U
exoY	ekzoenzim Y
FDA	Amerika Gıda ve İlaç Dairesi
GRAS	Genel Olarak Güvenli
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen Peroksit
HACCP	Tehlike Analizi ve Kritik Kontrol Noktaları (Hazard Analysis and Critical Control Points)
HMC	Hidroksimetilsitozin
ICTV	Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi
IL-8	İnterlökin-8
ISO	International Organization for Standardization
LAB	Laktik Asit Bakterileri
LPS	Lipopolisakkarit
MgSO <sub>4</sub>	Magnezyum Sülfat
MOI	Çoklu Enfeksiyon Değeri
mRNA	Haberci Ribonükleik asit
NaCl	Sodyum Klorür
NAG	N-asetilglukozamin
NAM	N-asetilmuramik asit
NB	Nutrient Broth
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PSAB	Pseudomonas Selektif Agar Base
PFP	Pleomorfik
PT	Faj Terapisi
RBP	Reseptör Bağlayıcı Protein
R-M	Restriksiyon-modifikasyon
RNA	Ribonükleik Asit
RPM	Revolutions Per Minute (Dakikadaki Devir Sayısı)
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit

Sie	Süper Enfeksiyon Dışlama
ssDNA	Tek sarmallı DNA
STX	Shiga Toksini
TEM	Transmission Electron Microscope
Tris-Cl	Tris-Klorid
TS	Türk Standardı
UHT	Ultra-High Temperature
UV	Ultraviyole
WHO	Dünya Sağlık Örgütü



# BÖLÜM I

## GİRİŞ

Gıda güvenliği, sağlıklı yaşamın öncüsüdür. Ancak, günlük yaşamımızda ve doğal çevremizde yaygın olarak bulunan patojenik bakteriler, gıda güvenliği ve halk sağlığı açısından dünya çapında büyük bir tehdit oluşturmaktadır (Zhong vd., 2020).

Gıda kaynaklı mikroorganizmalar, hastalık ve ölümcül vakalara neden oldukları gibi gıda bozulmalarında da önemli rol oynamaktadırlar. Bozulma etmeni olan bakteriler, gıda endüstrisinde yüksek ekonomik kayıplara neden olurken, patojen bakteriler de tüketici sağlığını tehdit eden durumlara neden olabilirler. Bu yüzden, patojen ve bozulma etmeni bakterilere karşı sıkı kontrol mekanizmaları gerekmektedir (Bassett, 2007).

Kümes hayvanları, dünya çapında tüketilen en önemli ikincil et ürünüdür ve 2022 yılından itibaren ilk sırada yer alması beklenmektedir. Dağıtım, satış ve tüketim öncesinde kümes hayvanlarının organoleptik özellikleri, bozulmaya neden olan mikroorganizmaların çoğalmasından etkilenebilir (Morales vd., 2016). İnsan beslenmesinde önemli yere sahip olan beyaz etin güvenli bir şekilde üretilmesi ve tüketilmesi amacı ile soğukta depolanan karkaslarda bozulma ve insanlarda hastalık etmeni olan *Pseudomonas aeruginosa*'nın inhibe edilmesi, gıda güvenliği açısından önem taşımaktadır.

*P. aeruginosa*'nın antibiyotiklere dirençli patojen bir bakteri olması, tavuk etlerinde ve birçok gıda ürününde başlıca bozulma etmeni olması ve bunun yanı sıra gıda endüstrisinde kullanılan birçok antimikrobiyal ajanlara karşı dirençli olması nedenleri ile bu mikroorganizmanın gıdalarda gelişimini önlemek adına yeni yollar aranmaktadır. Bakteriyofajların, *P. aeruginosa* gibi imha edilmesi zor ve kolayca gelişen patojen ve bozulma etmeni bakterilerin gelişiminin önlenmesinde biyokoruyucu ajan olarak kullanılması, yeni muhafaza tekniklerinin başında gelmektedir.

Gıda endüstrisinde bakteriyofajların biyokontrol aracı olarak kullanımıyla ilgili çalışmaların sayısı son yıllarda önemli ölçüde artış göstermiştir. Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi, 2007 yılında *Listeria*'ya spesifik bakteriyofaj içeren

“Listex P100”ün tüketime hazır et ürünleri ve diğer bazı tüketime hazır gıdalarda kullanımına onay vermiştir. Yapılan çalışmalarda bakteriyofajların insan sağlığını olumsuz yönde etkilemeden ve gıdaların kimyasal, fiziksel ve duyuşal özelliklerinde herhangi bir değişime neden olmadan gıda kaynaklı patojen ve bozulma etmeni bakterilerin kontrolünde oldukça etkin rol oynadıkları belirlenmiştir. Dolayısıyla bakteriyofajlar, gıda güvenliğinin sağlanmasında ve gıdaların raf ömürlerinin uzatılmasında geleneksel yöntemlere uygun bir alternatif olma potansiyeline sahiptirler (Cooper, 2016; Lacroix, 2010).

Bu tez çalışmasının konusu ve kapsamı; gıdalardan *P. aeruginosa*'yı izole etmek ve tanımlamak, *P. aeruginosa*'yı liziz eden bakteriyofajları izole edip karakterize etmek ve izole edilen bakteriyofajların tavuk etinde söz konusu bakteriye karşı etkinliğini ortaya koymaktır.

## BÖLÜM II

### KAYNAK ARAŞTIRMASI

#### 2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonadaceae familyasında yer alan Pseudomonas'lar, Gram negatif, çubuk şeklinde, çoğu hareketli, aerobik, endospor negatif ve katalaz pozitifdir. Bazı türleri oksidaz pozitif bazıları negatiftir. Pseudomonas cinsi içerisinde saprofit ve patojen türler yer almaktadır. *Pseudomonas* türlerinin besin gereksinimleri basit olduğundan toprak, bitki, tatlı su, tuzlu su gibi birçok yerde yaygın olarak bulunabilirler. Doğada yaygın olarak bulunması Pseudomonas'ın gıda zincirine kolay bir şekilde girmesine neden olmaktadır. Saprofit bir bakteri olmakla beraber fırsatçı bir patojendir. Psikrofil, psikrotrof ve mezofil türleri vardır (Baltch ve Smith, 1994; Rajmohan vd., 2002; Ünlütürk ve Turantaş, 2015).

Pseudomonas cinsinde en sık izole edilen insan patojeni, *Pseudomonas aeruginosa*'dır. *P. aeruginosa*, toprakta, bitkilerde ve suda bulunur. Glikozu oksidasyon yoluyla parçalayan fakat fermantasyon yapamayan bir bakteridir. Katalaz, sitrat ve oksidaz pozitif, fırsatçı patojen, metil kırmızısı negatif, Voges Proskauer negatif, aerobik, polar flagellası ile hareket edebilen çubuk şekilli bir bakteridir. Genellikle tek hücreler halinde görünürler fakat bazen kısa zincirler halinde bulunurlar. Genç kültürler, genellikle mavi-yeşil bir pigment oluştururlar ancak kültür yaşlandıkça bu renkler kahverengine dönmektedir. Proteolitik ve lipolitik aktiviteye sahiptirler. Aerobik olmaları nedeni ile gıdaların yüzeyinde hızlı gelişebilmeleri sonucu okside ürünler ve mukoz madde oluştururlar. Kendi gelişmeleri için gerekli gelişme faktörlerini ve vitaminleri sentezleme yeteneğine sahiptirler (Baltch ve Smith, 1994; Rajmohan vd., 2002; Ünlütürk ve Turantaş, 2015).

*P. aeruginosa* antibiyotiklere karşı direnci ile ünlüdür ve bu nedenle özellikle tehlikeli ve korkulan bir patojendir. Antibiyotiklere direnç gelişimi için doğal bir afinitesi vardır. Bu durum, bu bakteriye karşı tanımlanmış bir antibiyotik kullanımını sınırlar ve artan mortalite oranlarına katkıda bulunur. Tetrasiklin ve benzil penisilin de dahil olmak üzere

birçok antibiyotiğe direncinin, dış membran lipopolisakkaritinin sağladığı geçirgenlik bariyerinden kaynaklandığı bildirilmektedir (Arumugam vd., 2018)

*P. aeruginosa*, gıda ve su kaynaklı hastalıklarla ilişkili fırsatçı bir insan patojenidir. Gıda kaynaklı patojenlerin başında gelen *P. aeruginosa*, kontaminasyon kaynağı olması, gıda zehirlenmelerine ve hayvanlarda antimikrobiyal dirence neden olması ve biyofilm oluşturma ve önlenmesindeki güçlükler nedeni ile gıda güvenliğinde önemli endişelere yol açmaktadır (Azelmad vd., 2018; Xu vd., 2019 ). Patojenlerin gıdaya bulaşmasında gıda işleme, ikram ve ev ortamında kontamine yüzeylerin önemi belirgindir. Bu tür yapışkan bakteriler, üretim sırasında gıdaya bulaşabilir. Bu durum, işlenmiş gıdanın kalitesini ve güvenliğini ciddi şekilde etkileyebilir ve tüketici için potansiyel bir risk oluşturabilir.

### **2.1.1 *P. aeruginosa*'nın tarihçesi**

Günümüzde *P.aeruginosa* olarak bilinen fırsatçı bakteriyel patojen, kültür sırasında üretilen karakteristik mavi-yeşil renklenmeye dayalı olarak tarihi boyunca birkaç isim almıştır. 1850'de Se'dillot, cerrahi yara örtülerindeki renk değişikliğinin transfer edilebilir bir ajanla ilişkili olduğunu ilk gözlemleyen kişi olmuştur. Mavi renklenmeden sorumlu olan pigment, 1860'da Fordos tarafından ekstrakte edilmiştir. 1862'de Lucke bu pigmenti çubuk şeklindeki organizmalarla ilişkilendiren ilk kişi olmuştur. Mavimsi-yeşil irinli iki hastanın yaralarından mikroorganizmanın büyümesini gözlemleyerek Carle Gessard, *P. aeruginosa*'nın klasik tanımlamasını yapmıştır. *P. aeruginosa*, 1882'ye kadar saf kültürde başarılı bir şekilde izole edilememiştir. 1889 ve 1894 yılları arasındaki çalışmalarda, *P. aeruginosa* (*Bacillus pyocyaneus*), hastaların yaralarında mavi-yeşil irinin nedeni olarak tanımlanmıştır. *Pseudomonas* bakterileri, ilk defa Migula tarafından 1894'te tanımlanmıştır. Bu tanımlama, genusun morfolojik ve fizyolojik özellikleri de dikkate alınarak yapılmıştır. Akut veya kronik enfeksiyona yol açan *P. aeruginosa* invazyonu ve yayılma yolları hakkında daha kapsamlı bir çalışma, Freeman tarafından 1916 yılında gerçekleştirilmiştir (Çelik, 2009; Lister vd., 2009).

Palleroni, 1973 yılında ribozomal RNA analizleri üzerinde çalışmış ve *Pseudomonas* bakterilerini rRNA'larına göre beş homolog gruba ayırmıştır. De Vos ve De Ley, 1983 yılında bu beş homolog grup üzerinde ayrıntılı çalışmalar yapmış ve türler arasındaki

yakınlıkları belirleyerek filogenetik yakınlıklarına göre grupları yeniden sınıflandırmıştır (Çelik, 2009). *P. aeruginosa*, homoloji grup I'de bulunmaktadır (Çizelge 2.1). Farklı özelliklere sahip olan homoloji grup II'de bulunan türler, *Burkholderia* cinsi içine alınmıştır (Murray, 2007).

**Çizelge 2.1.** Pseudomonasların sınıflandırılması (Ekincioğlu, 2012)

<b>rRNA Homoloji Grubu ve Alt Grubu</b>	<b>Cins ve Tür</b>
I Floresan Grubu	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pseudomonas putida</i>
Non Floresan Grubu	<i>Pseudomonas stutzeri</i> <i>Pseudomonas mendocina</i>
II	<i>Burkholderia pseudomallei</i> <i>Burkholderia mallei</i> <i>Burkholderia cepacia</i> <i>Ralstonia pickettii</i>
III	<i>Comamonas</i> türleri <i>Acidovorax</i> türleri <i>Delftia</i> türleri <i>Hydrogenophoga</i> türleri
IV	<i>Brevundimonas</i> türleri
V	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Xanthomonas</i> türleri

### 2.1.2 *P. aeruginosa*'nın mikrobiyolojik, kültürel ve biyokimyasal özellikleri

*P. aeruginosa*, basil veya kokobasil morfolojisinde çubuk şeklinde (düz veya hafif kıvrık olabilir) 0,5-0,8 µm genişliğinde, 1,5-3,0 µm boyutlarında, Gram negatif, metil kırmızısı negatif ve Voges Proskauer negatif bir bakteridir. Glikozu oksidasyon yoluyla parçalayan fakat fermantasyon yapamayan bir bakteridir. Katalaz, jelatin ve sitrat pozitif ve indol negatiftir. Enterobacteriaceae familyasının aksine genellikle oksidaz pozitif bir

bakteridir. Uçta bulunan tek polar flagella ile hareketli bir bakteri olup spor veya kapsül oluşturma yeteneği bulunmaz. Proteolitik ve lipolitik aktivite göstermektedirler (Bilgehan, 1993; Levinson, 2008; Virupakshaiah ve Hemalata, 2016).

*P. aeruginosa*, obligat aerobtur ancak oksijen yokluğunda eğer ortamda elektron alıcı olarak yeterli NO<sub>3</sub> varsa yaşamını devam ettirir. *Pseudomonas* bakterilerinin mezofil, psikrofil veya psikotrof türleri vardır. *P. aeruginosa*'nın 4°C veya daha düşük sıcaklıklarda üreyebilen türleri olduğu gibi, 41°C'de üreyebilen türleri de vardır. 37 ve 41°C'de optimum üreme göstermektedir. *P. aeruginosa*'nın 41°C'de üreyebilme özelliği, onu *P. putida* ve *P. fluorescens*'den ayırmaktadır. Yüksek yoğunluğa sahip tuzlara ve boyalara, zayıf antiseptiklere ve yaygın olarak kullanılan birçok antibiyotiğe dayanıklıdır. *Pseudomonas* türleri, pH 5,6 ve 8,0 arasında üremelerine rağmen en iyi üreme özelliklerini, pH 6,6-7,0 aralığında gösterirler. Organik üreme faktörlerine gereksinimleri olmadığı için kolay üreyen bir bakteridir. Tek bir karbon kaynağı varlığında üreyebilen nadir bakterilerdendir. Mikrobiyoloji laboratuvarlarında sıklıkla kullanılan besiyerlerinde rahatlıkla üreyebildiği için izole edilmeleri kolaydır. Katı besiyerinde 37°C'de 24 saatte 3 tip koloni oluşturma özelliğine sahiptir. Birinci tip koloni, genellikle klinik örneklerden izole edilen, 2-3 mm çapında, yuvarlak, mat yüzeyli, ortası kabarık, beyaz renkli ve floresan özelliği olan, besiyerinin her tarafına yayılmış ve mavi-yeşil pigmentleri olan kolonilerdir. İkinci tip koloni, çoğunlukla doğal kaynaklardan izole edilen daha küçük, kabarık, konveks ve düzensiz kolonilerdir. Üçüncü tip koloni ise *P. aeruginosa*'nın bazı suşlarının hücre dışı aljinat salgılaması nedeniyle mukoid görünüme sahip R tipi kolonilerdir. Kültürde tatlımsı aromatik meyve ya da trimetil amin kokusuna benzer koku hakimdir (Baltch ve Smith, 1994; Rajmohan vd., 2002; Keskin, 2004; Düğenci, 2014; Ünlütürk ve Turantaş, 2015; Virupakshaiah ve Hemalata, 2016).

*P. aeruginosa*, piyoverdin, piyosiyenin, piyorubin ve piyomelanin pigmentlerini üretme yeteneğine sahiptir. Piyoverdin, kloroformda çözünmeyen ancak suda çözünen ve 254 nm dalga boyundaki UV ışınları ile floresans oluşturarak yeşilimsi renk veren bir pigmenttir. Piyosiyenin ise suda ve kloroformda çözünebilen fenazin boyası olan, floresans vermeyen ve mavi renkte bir pigmenttir. Bu pigment yalnızca aerob ortamda oluşur ve tanı değeri yüksektir. Piyorubin kırmızı, piyomelanin ise kahverengi renkte pigmentlerdir. Piyorubin ve piyomelanin pigmentlerinin varlığı, piyosiyenin pigmentinin oluşmasını baskılamaktadır. King ve Phillips, King A besiyerinde piyosiyenin, King B

besiyerinde ise piyoverdin pigmentinin oluştuğunu gözlemişlerdir. Pigmentler, bakterinin demir alımı için sifefor olarak görev yaptıklarından, demirin sınırlı olduğu durumlarda pigment üretimi artar. Besiyerinde özellikle piyosiyanın ve piyoverdin pigmentlerinin oluşumu, *P. aeruginosa*'nın tanısı yönünden oldukça önemli bir özelliktir (King ve Phillips, 1978).

Mikrobiyal pigmentlerin bazı doğal etkileri aşağıda listelenmiştir (Liu ve Nizet, 2009):

1. Ultraviyole radyasyona karşı koruma,
2. Oksidan maddelere karşı koruma,
3. Aşırı soğuk ve sıcaklığa karşı koruma,
4. Besin elde etmesini sağlamak (demir vs.),
5. Diğer mikroorganizmaların antimikrobiyal aktivitesine karşı koruma,
6. Fotosentez ile enerji üretimini sağlama.

Pigment üretme yeteneğinin yanı sıra bazı *P. aeruginosa* suşları, bakteriyosin üretme yeteneğine de sahiptirler. François Jacob, *P. aeruginosa* kaynaklı bir bakteriyosini tanımlayan ilk kişidir. Piyosinler, *P. aeruginosa* suşlarının % 90'ından fazlası tarafından üretilir ve her suş birkaç piyosin sentezleyebilir. Piyosin genleri, *P. aeruginosa* kromozomunda bulunur ve mitomisin C gibi mutajenik ajanlarla veya ultraviyole ışınlarla sentezinin indüklendiği belirtilmektedir. Jacob, bir mutajen ajan (yani ultraviyole ışınlama) ile muamele edilen *P. aeruginosa* 10 suşunun (dalga boyu 253,7 nm), bakteriyel liziz ile salınan, özellikle duyarlı bakterilerin hücre yüzeyine adsorbe olarak ölümlerini tetikleyen indüklenebilir bir bileşik ürettiğini göstermiş ve koliklinlere benzer şekildeki bu bileşiğe piyosin adını vermiştir (Jacob, 1954). Üç tip piyosin tanımlanmıştır. Bunlar; R tipi, F tipi ve S tipi'dir. İlk tanımlanan piyosinler, parçacık olarak meydana gelenlerdir. *P. aeruginosa* R tarafından üretilen, bakteriyofaj kuyruğuna benzeyen çubuk benzeri bir parçacık, R-tipi piyosin olarak adlandırılmıştır. Tüm R tipi piyosinler, nükleaz ve proteaza dirençlidir. Bu özellikleri, piyosinin saflaştırılmasını ve spesifik antiserumların üretimini kolaylaştırır. Hücre yok etme mekanizmaları, gözenek (por) oluşumuyla ilişkili olarak sitoplazmik zarın (en az 90 mV) depolarizasyonundan kaynaklanmaktadır. Takeya vd. (1969) tarafından ikinci bir tür özel piyosin tanımlanmış ve F tipi olarak adlandırılmıştır. Nükleaz ve proteaza dirençlidir ve aynı zamanda esnek faj kuyruklarına benzer bir yapıya sahiptir. F tipi piyosinin spesifik aktivitesi, suşlara göre farklıdır.

Üçüncü tip olan S tipi piyosinler, R ve F tipi piyosinlerin aksine proteaza duyarlıdırlar. Saflaştırılması sonucunda yapısında iki proteinin varlığı ortaya çıkmıştır. Yalnızca daha büyük olan protein öldürme aktivitesi gösterirken küçük olan protein, konakçı bakterileri büyük proteinin öldürme aktivitesinden koruyan bir bağışıklık proteini olarak tanımlanmıştır. R ve F tipi piyosinler, *P. aeruginosa* suşlarının % 90'ından fazlası tarafından üretilirken S tipi, bu suşların %70'i tarafından üretilmektedir (Takeya vd., 1969; Michel-Briand ve Baysse, 2002).

### **2.1.3 Virülans faktörleri ve patojenitesi**

Mikroorganizmanın konağa yerleşip çoğalmasına, konak hücrelerinde hasar ve hastalık oluşturmaya virülans, bu olaydan sorumlu olan mikrobiyal faktörlere ise virülans faktörler denilmektedir (Van Delden ve Iglewski, 1998). *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının patojenitesinde konağa ve bakteriye ait faktörler rol oynar. Bakterinin virülans faktörleri, hücre ile ilişkili ve hücre dışına salınan faktörler olarak incelenebilir. Virülans faktörlerinin salınımı, üremenin olduğu ve hücre yoğunluğunun arttığı logaritmik fazda artar. Virülans faktörlerinin salınımı ve düzenlenmesi, karmaşık bir düzenleyici sistem ile kontrol edilir ve koordinasyonun sağlanmasında hücreler arası iletişim sisteminin önemli rolü vardır. Virülans faktör üretimi, bakteride genetik düzeyde regüle edilir. DNA düzeyindeki regülasyonun büyük kısmı özgül virülans faktörleri kodlayan gendeki yeniden düzenlemeleri, promotör veya diğer regülatör elemanları içeren genlerdeki değişimleri veya yeniden düzenlemeleri içerir (Woods, 2004). Bunun yanında, *Pseudomonas* enfeksiyonunun ilk basamağı adezyon ve kolonizasyondur. Bunu, lokal invazyon ve yaygın sistemik enfeksiyon aşamaları takip eder. *P. aeruginosa*'nın patojenitesinin, biyofilm oluşturma kabiliyetinden ve çok sayıda membran ve hücre dışı virülans faktörün üretiminden kaynaklandığı düşünülmektedir. Membran faktörleri arasında lipopolisakkaritler, flagella, adezyon faktörü (pili tip IV) ve aljinat bulunur. Hücre dışı faktörlerinin başlıcaları; ekzotoksinler (ekzotoksin A), ekzo-proteazlar (elastaz, stafilolizin, alkalın proteaz, proteaz IV), fosfolipaz C, kromoforlar ve ekzo-enzimler S, T ve U'dur. Membran ile ilişkili virülans faktörleri, genellikle kolonizasyon ve kronik enfeksiyonda yer alırken, aşırı derecede toksik olan hücre dışı faktörler akut enfeksiyon ile ilişkilidir (Benie vd., 2017).

### 2.1.3.1 Membran faktörleri

*Lipopolisakkaritler:* *P. aeruginosa*'nın yüzey ile ilişkili temel virülans faktörüdür. Lipopolisakkarit (LPS), immünojendir ve bakteri hücre yüzeyi ile dış ortam arasındaki etkileşime aracılık etmede önemli bir yapısal rol oynar (Le Berre vd., 2011). Bakteriyel LPS tipik olarak lipid A (veya endotoksin) olarak bilinen bir hidrofobik alandan, tekrarlanmayan bir oligosakaritten ve bir dışsal polisakaritten (veya O-antijeninden) oluşur. LPS, konağın doğuştan gelen ve adaptif (veya edinilmiş) bağışıklık tepkilerinin aktivasyonunda önemli bir rol oynar. Nihayetinde, morbidite ve mortaliteye katkıda bulunan düzensiz inflamasyon yanıtlarına neden olur (Rocha vd., 2019).

*Flagella:* Çeşitli bakteri türleri arasında iyi derecede korunmuş oldukça karmaşık bir bakteri organelidir. Flagella'nın sentezinde ve işlevinde 50'den fazla gen yer almaktadır. Kemotaksis ve hareket özelliğinden dolayı mikroorganizmanın hayatta kalmasında önemli olduğu düşünülmektedir. Flagella, temel besin maddelerinin elde edilmesini kolaylaştırır. Ayrıca, flagella'nın yüksek oranda immünojenik olduğu bilinmektedir (Feldman vd., 1998).

*Adezyon faktörü pili (pili tip IV):* Birçok hücre tipine yapışmada önemli bir role sahiptir. Bu özellik, belirli dokulara bağlanma açısından önem arz etmektedir. Biyofilm oluşumuna, opsonik olmayan fagositozun başlamasına ve adezyonları tanıyan fagosit reseptörlere aracılık eder (Benie vd., 2017; Rocha vd., 2019).

*Aljinat:* Mannuronik ve guluronik asit polimerinden oluşan ekzopolisakkarit mukoid bir yapıdır. Aljinat oluşturan *P. aeruginosa*'nın mukoid kolonileri, bakteriyi konağın bağışıklık tepkisinden ve antibiyotiklerden korur. Aljinatın fazla salgılanması, *P. aeruginosa*'yı fagositozdan, dehidratasyondan, antibiyotiklerden ve hatta kazanılmış konak yanıtından korur (Van Delden, 2004; Benie vd., 2017).

### 2.1.3.2 Hücre dışına salgılanan virülans faktörler

*Elastaz:* Elastaz, kolajen, IgG ve tamamlayıcı proteinler gibi çok çeşitli konakçı proteinleri parçalama özelliğine sahiptir (Laarman vd., 2012). Elastaz, güçlü bağları

deforme ederek epitel bariyerin bütünlüğünü bozar. Aynı zamanda, sürfaktan proteinleri olan A ve D'yi tahrip etme özelliğine de sahip olduğu belirtilmiştir (Le Berre vd., 2011).

*Alkalen proteaz:* *P. aeruginosa*'nın alkalen proteazı (AprA), bakteriyel virülans ile ilişkilendirilmiştir ve eritrositlerin kompleman aracılı lizisine müdahale ettiği bilinmektedir. Ancak, bakteriyel kompleman kaçışındaki rolü kesin olarak bilinmemektedir. *aprA* geninin yukarıdaki üç gen tarafından kodlanan kendi tip I salgılama sistemi yoluyla salgılanan bir proteazdır. Yüksek proteolitik aktiviteye sahiptir. 50 kDa ağırlığındaki enzim, en iyi alkali pH değerlerinde etkinlik gösterir (Laarman vd., 2012).

*Piyosiyanın:* Piyosiyanın, hücre içi redoks döngüsü nedeniyle reaktif oksijen türleri tarafından üretilen mavi bir redoks aktif fenazin pigmentidir. Nötrofil süperoksit oluşumunu ve lenfosit proliferasyonunu inhibe ederek ve insan solunum yolu epitel hücreleri tarafından IL-8 üretimini artırarak konakçı hücrelerin yanıtlarını değiştirir. Piyosiyanın insan nötrofillerinin apoptozunu indüklediği, reaktif oksijen ara ürünlerinin hızlı üretimini sağladığı ve hücre içi cAMP seviyelerinin düşürülmesi ile bağlantısı olduğu düşünülmektedir (Van Delden, 2004). Piyosiyanın hücre solunumunun inhibisyonuna neden olduğu, siliyer fonksiyonunu bozduğu ve akciğer epitelinde oksidatif hasarı kolaylaştırdığı belirtilmiştir (Le Berre vd., 2011).

*Piyoverdin:* *P. aeruginosa* pyoverdini, bir peptit zinciri ve bir kromofor içeren kompozit (karışık) bir siderofor dur. Piyoverdinler, floresan *Pseudomonas* türlerinin (*P. fluorescens*, *P. putida*, *P. syringae*, *P. aeruginosa*) ayırt edici bir özelliğidir ve bakteriler, demirin düşük olduğu koşullarda yetiştirildiklerinde üretilirler. Pyoverdin sadece bir siderofor değil, aynı zamanda iki hücre dışı virülans faktörünün (proteaz PrpL ve güçlü toksin ekzotoksin A) üretimini tetiklediği için bir sinyal molekülü olarak da tanımlanmaktadır (Cornelis ve Dingemans, 2013).

*Proteaz IV:* Lizin içeren peptitlerin karboksil tarafındaki substratlarını spesifik olarak ayıran, 26 kDa moleküler kütleyle sahip bir serin proteazdır. Bu enzimin tamamlayıcı bileşenleri Clq ve C3; immünoglobulin G, fibrinojen, plazmin ve plazminojenin yapısını bozmaktadır. Kornea enfeksiyonlarında önemli bir virülans faktördür (Van Delden, 2004).

*Fosfolipaz C*: Fosfolipaz C, tip 2 salgı sistemi ile *P. aeruginosa*'nın dış zarından salgılanır. *P. aeruginosa*, hemolitik PLC (PlcH) ve hemolitik olmayan PLC (PlcN) olmak üzere 2 tip Fosfolipaz C üretmektedir. Fosfolipaz C, sitotoksiktir ve çeşitli ökaryotik hücrelerde sinyal iletimi süreçleri üzerine değiştirici etkisi olduğu belirtilmektedir (Barker vd., 2004).

*Ramnlipid*: *P. aeruginosa*, ramnlipidler adı verilen ramnoz içeren glikolipid biyosümfaktanları üretir ve salgılar. Ramnlipid üretimi, *P. aeruginosa*'nın karakteristik özelliği olmakla birlikte patojen olmayan *P. putida* ve *P. chlororaphis*'in bazı izolatlarının da ramnlipidler ürettiği belirtilmiştir. Ramnlipid üretimi, çevreyi algılama (quorum sensing-QS) sistemi ile düzenlenmektedir. Katkı maddesi, kozmetik, ilaç ve deterjan üreticilerinin ilgi duyduğu bir biyosümfaktandır (Soberón-Chávez vd., 2005; Müller vd., 2010).

*Ekzotoksin A (ExoA)*: Hücre dışına tip 2 salgı sistemi ile salgılanan bir toksindir. ExoA, *P. aeruginosa*'nın virülansında önemli bir rol oynar. Etkisini difteri toksinine benzer şekilde ADP-ribozil transferaz özelliği ile elongasyon faktörü 2'yi (EF-2) ve dolayısıyla protein sentezini inhibe edip hücre ölümüne yol açarak gösterir. ExoA'nın enfeksiyonda konak yanıtını baskıladığı gösterilmiştir. Ayrıca, ekzotoksin A'nın lokal doku hasarı ve invazyonunda rol oynadığı belirtilmiştir (Van Delden ve Iglewski, 1998; Rocha vd., 2019).

*Tip 3 salgı sistemi*: Bu sistem, ekzotoksinleri doğrudan ökaryotik hücrenin sitoplazmasına enjekte etmek için translokasyon iğnesi benzeri bir aparat ve porin oluşturan proteinler kullanmaktadır. *P. aeruginosa*'nın Tip III salgı sistemi tarafından 4 tip toksin salgılandığı belirtilmiştir. Bu toksinler; ekzoenzim S (exoS), ekzoenzim T (exoT), ekzoenzim Y (exoY) ve ekzoenzim U (exoU)'dur (Le Berre vd., 2011). ExoS geni tarafından kodlanan ekzoenzim S, ADP-ribosiltransferaz aktivitesine sahip 49-kDa büyüklüğünde ve ADP-ribosiltransferaz aktivitesine sahip 53-kDa büyüklüğünde iki proteinden oluşan bir agregerattır. ExoS, hücre iskeleti yapısını bozarak bağışıklıktan kaçmaya yardımcı olmaktadır. ExoU, tip III salgılama sistemi tarafından salgılanan bir sitotoksindir. Ekzotoksin U enfeksiyonu, konakçı hücrelerin hızlı ölümünün (1 ila 2 saat) nedenidir. Bu ölüm, tipik bir nekroz olan hücre zarının bütünlüğünün kaybı ile karakterize edilmektedir. ExoU, fosfolipaz A2 aktivitesine sahiptir ve ayrıca, fagositlerin alımını da

bozar. ExoU'nun, ExoS'den 100 kat daha fazla sitotoksik olduğu düşünülmektedir. ExoT ile birlikte proapoptotik yolları aktive ettiği ve diğer epitel hücre tiplerinde yara iyileşmesini geciktirdiği bilinmektedir. ExoT, tüm virulent *P. aeruginosa* klinik izolatlarında kodlanan ve eksprese edilen tek tip III salgı sistemi ekzoenzimidir ve *P. aeruginosa* patojenitesinde bu virülans faktörün temel bir rol oynadığı düşünülmektedir. Kollajen ve elastin gibi ökaryotik proteinlere saldırır ve hücrenin yapısal proteinlerini yok eder. ExoT'nin yara iyileşmesini engellediği, aktin hücre iskeletini değiştirdiği, hücre göçünü ve hücrenin sitokinez bölünmesini engellediği belirtilmiştir. ExoY, ExoS regulonuna bağımlı dördüncü bir efektör proteindir. Bu enzim, tip III salgılama sistemi vasıtasıyla hedef hücrelerde yer değiştirebilen bir adenilat siklazdır. ExoY'nin de aktin hücre iskeleti bozulmasına neden olduğu rapor edilmiştir. Bunun yanı sıra, proteolitik ve elastolitik proteinler; LasA ve LasB gibi diğer salgılanan virülans belirleyicilerinin doku hasarına neden oldukları ve kronik enfeksiyonların kalıcılığını artırdıkları bilinmektedir (Van Delden, 2004; Le Berre vd., 2011; Wood vd., 2015; Newman vd., 2017).

*Biyofilm:* Biyofilmler, çeşitli biyotik ve abiyotik yüzeylerde büyüyen, kendilerini salgılanmış hücre dışı polimer (EPS) ile çevreleyen ve yoğun şekilde bir araya gelmiş mikroorganizma topluluklarıdır. Birçok bakteri türü biyofilm oluşturur ve bu, önemli bir bakteriyel hayatta kalma stratejisidir. Biyofilm oluşumunun bakteri tarafından bir yüzeyde yaşam değişimini tetikleyen çevresel şartların algılanması ile başladığı düşünülmektedir. Biyofilmlerin yapısal ve fizyolojik karmaşıklığı, çok hücreli organizmalara benzer şekilde koordine ve işbirlikçi gruplar halinde çalıştıklarını düşünmemize neden olmaktadır (Passerini vd., 1992). *P. aeruginosa* biyofilmlerinin birçok kronik bulaşıcı hastalığın altta yatan nedeni olduğu ve bakterinin neden olduğu enfeksiyonların tedavisini zorlaştırdığı düşünülmektedir. İlaç moleküllerinin biyofilmlerin iç yüzeyine nüfuz edememesi nedeniyle biyofilm içinde büyüyen bakterilerde antibiyotiklerin etkisiz olduğu tespit edilmiştir. Bakteriyofajlar, etkili antibiyofilm ajanları olarak önerilmektedirler. Bakteriyofajların yeni bir antibakteriyel ajan olarak kullanılması, *P. aeruginosa*'nın antibiyotiğe dirençli suşlarıyla mücadelede yardımcı olabilecek, umut verici bir terapötik yaklaşımdır (Yuan vd., 2019).

Bunun gibi çeşitli virülans faktörler, *P. aeruginosa*'nın patojenitesine katkıda bulunmakla birlikte bu virülans faktörler, bazı yerel gıda ürünlerinden izole edilen suşlarda sıklıkla incelenmemektedirler. Ancak, bu yerel gıda ürünlerinin ve esas olarak hayvansal kökenli

ürünlerin, virülans faktörlere bağlı bazı riskli zoonotik serogruplara sahip suşları barındırdıkları bildirilmiştir. Bu sebeple hayvansal gıdalardan izole edilen suşlardaki virülas faktörler de önem taşımaktadır (Benie vd., 2017).

#### **2.1.4 *Pseudomonas aeruginosa*'nın neden olduğu enfeksiyonlar**

*P. aeruginosa*, gıda bozulmalarına sebep olmasının yanı sıra sık sık ikincil enfeksiyona neden olduğundan insan ve hayvanlar için büyük risk teşkil etmektedir. Çoklu ilaca dirençli *P. aeruginosa* suşlarının ortaya çıkması ve yayılması, son zamanlarda halk sağlığı açısından endişe veren bir konu haline gelmiştir (Horcajada vd., 2019). *P. aeruginosa*, çoğunlukla nazokomiyal bir patojendir (Giamarellou, 2000). *P. aeruginosa* kaynaklı enfeksiyonlarda neredeyse tüm klinik vakalar, konakçı savunmasının bozulmasıyla ilişkilendirilebilir. Birçok *P. aeruginosa* enfeksiyonu vakası, AIDS ve kemoterapi tedavisi gören immün sistemi baskılanmış hastalardır. Bu tür hastalıklar, konağı çeşitli bakteriyel ve fungal enfeksiyonlara yatkın hale getirir ve bu nedenle *P. aeruginosa*'nın patogeneze özgü bilgiler vermezler. Bu bağlamda, *P. aeruginosa*'nın neden olduğu üç temel hastalık: ciddi yanık hastalarında bakterimiya, kronik akciğer enfeksiyonu ve kistik fibroz ve uzun süreli yumuşak kontak lens kullananlarda akut ülseratif keratitdir (Lyczak vd., 2000).

Son çalışmalarda, *P. aeruginosa*'nın birçok toplumsal ve hastane enfeksiyonunun ortak kaynağı olduğu ve özellikle bağışıklık sistemi zayıf kişilerde, yanık ve kistik fibrozis hastalarında çok etkili olduğu ortaya konmuştur. Enfeksiyonlar tüm anatomik bölgelerde meydana gelebildiği gibi; en yaygın enfeksiyonlar, kornea, deri, solunum yolları ve idrar yollarında meydana gelmektedir. Hastane kaynaklı, örneğin; solunum cihazına bağlı kişilerde pnömoni ve sepsis sendromu gibi hastalıkların başlıca etmenidir. *P. aeruginosa*, çoklu antibiyotik direnç özelliğinden dolayı tıpta da çok önemli bir patojendir. Pnömoni, septik şok, üriner sistem, gastrointestinal, cilt ve yumuşak doku enfeksiyonlarına neden olmaktadır (Kumari vd., 2009a; Høiby vd., 2010; Lopez vd., 2015). *P. aeruginosa*, bunların dışında endokardit ve ölümlü sonuçlanabilen kulak enfeksiyonlarına da yol açabilir (Arumugam vd., 2018).

*P. aeruginosa*, hızlı antibiyotik direnci kazanması ve çoklu antibiyotik direnç mekanizmasına sahip olmasından dolayı, yüksek mortaliteye sahip enfeksiyonlardan

sorumludur. *P. aeruginosa*'da beta-laktam direnci, enzimatik (penisilinaz, genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz, imipenemaz ve sefalosporinazlar) ve enzimatik olmayan (porin kaybıyla membran geçirgenliğin azalması, aktif dışarı pompalama) mekanizmalar ile oluşur (Cavallo vd., 1996). Antibiyotik direnç özelliğinden dolayı *Pseudomonas* enfeksiyonlarının tedavisinde alternatif olarak bakteriyofajların kullanımına olan ilgi büyük bir artış göstermektedir.

Pseudomonasların bir diğer ilginç özelliği, biyofilm oluşturma yetenekleridir. *Pseudomonas* biyofilmleri hem tıp hem de gıda teknolojisinde önemli bir sorun teşkil etmektedir. Mevcut antibiyotikler ve diğer koruyucu kimyasallarla biyofilm içinde yer alan *P. aeruginosa*'yı imha etmek oldukça zordur. Biyofilmlerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kimyasal antibiyotiklere kıyasla bakteriyofajların daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Biyofilme bakteriyofaj uygulandığında bakteriyofajların, yüzeylerinde bulunan bakteri hücrelerini enfekte edip çoğaldıkları ve böylece artan plak sayısı ile biyofilmi tahrip ettikleri belirtilmektedir. Bakteriyofajların biyofilm matriksini zayıflatmasının ve hatta yok etmesinin diğer kimyasal ajanların nüfuz etmesine yardımcı olarak bir sinerjik etki yarattığı da ifade edilmektedir (Harper ve Enright, 2011).

*P. aeruginosa*, antibiyotiğe dirençli plazmidleri barındırır ve bu genleri, transdüksiyon ve konjugasyon süreçleriyle aktarabilir. Bazı beta-laktamlar, aminoglikozitler, karbapenemler ve florokinolonlar dâhil olmak üzere *Pseudomonas*'a karşı sadece birkaç antibiyotik etkilidir. Ancak bunlar, tüm suşlara karşı etkili değildirler. *Pseudomonas* enfeksiyonlarını antibiyotiklerle tedavi etmenin yararsızlığı, neredeyse hepsi tedavi edilemez ve antibiyotiğe dirençli bir suş ile enfekte olan kistik fibroz hastalarında en dramatik şekilde gösterilmektedir. *P. aeruginosa*'da günümüzde mevcut olan antibiyotik ilaçlarına karşı direncin ortaya çıkması, esas olarak bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda görülen artış nedeniyle, modern tedavide ciddi bir sorun haline gelmiştir. Bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde antibiyotik olmayan ve bakteriyel patojeni hedefleyen spesifik faj kullanmak, ciddi bir önem arz eden ve tercih edilen seçeneklerden biridir (Arumugam vd., 2018).

## 2.2 *Pseudomonas aeruginosa*'nın Gıdalarda Bulunma Durumu

*P. aeruginosa*, özellikle soğukta saklanan kırmızı et, tavuk eti, yumurta ve deniz ürünlerinin birinci derecede bozulma etmenidirler. Taze etlerde meydana gelen yüzeyde yapışkanlık, ekşime ve renk bozuklukları, *Pseudomonas*'dan kaynaklanmaktadır. *Pseudomonas* kaynaklı mikrobiyal bozulma, gıdanın çürümesi ve lezzet özelliklerini etkilemekle birlikte ciddi ve ölümcül hastalıkların nedeni de olabilir (Ünlütürk ve Turantaş, 2015; Arnout-Rollier vd., 1999; Franzetti ve Scarpellini, 2007; Baltch ve Smith, 1994).

Etlerin normal soğuk depolama süreleri dışında bozulmalarına neden olan psikrofil bakterilerin başında *Pseudomonas*'lar ve az olarak *Achromobacter* gelmektedir. Donmuş etlerin depolanmalarında, çözünmelerinde veya çözülmüş etlerin saklanmalarında da *Pseudomonas*'lar sorun yaratan başlıca türler arasında görülmektedir. *Pseudomonas* cinsi içinde yer alan bazı türler; *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. protegens*, *P. syringae* ve *P. entomophila*'dır. Bu türler içerisinde gıda endüstrisinde öneme sahip olan tür, *P. aeruginosa*'dır. Bu bakterilerin psikrofil özellikleri uzun zamandan beri bilinmektedir. Etlerde koloni ve bakteriyel membranöz tabaka oluşturmaları, tanınmalarını kolaylaştırmaktadır (Akan, 2009). Tavuk, yüksek besin içeriğinden dolayı insan beslenmesinde önemli bir gıdadır. *P. aeruginosa*, tavuk endüstrisi için problem oluşturan mikroorganizmaların başında gelmektedir. Soğukta depolanan tavuk etlerinin yüzeyinde kayganlık ve istenmeyen kokuların oluşumuna neden olarak raf ömürlerini sınırlamaktadır. *P. aeruginosa*, gıda bozulmalarına sebep olmasının yanı sıra sık sık ikincil enfeksiyona neden olduğundan insan ve hayvanlar için büyük risk teşkil etmektedir (Kumari vd., 2009a; Høiby vd., 2010; Lopez vd., 2015).

Kümes hayvanlarından üretilen gıdaların erken bozulmaları, ürün kayıplarına neden olabilmektedir. Bu durum, işletmelerin isimlerini ve tüketici güvenini etkiler. Hem şirketler hem de tüketiciler için olumsuz bir etki yaratır. Soğukta muhafaza edilen tavuk eti, yüksek su aktivitesi, nispeten nötr pH'sı ve bol miktarda besin maddesi içermesi nedenleri ile oldukça çabuk bozulabilir bir besindir. Bu da onu psikrofilik bakterilerin çoğalması için mükemmel bir ortam haline getirir (Vihavainen ve Björkroth, 2010). Soğukta muhafaza edilen kümes hayvanlarının bozulma mikrobiyotası heterojendir ve çoğunlukla baskın mikroorganizmanın *Pseudomonas* spp. olması, genellikle üretim

ortamına özgüdür. Bu mikroorganizma, Őu anda HACCP planlarına dahil edilmemiŐtir çünkü varlığı, insan hastalıklarına neden olan birincil etkenlerden değildir. Bununla birlikte, *Pseudomonas* spp. küreselleŐen bir dűnyada özellikle uzun mesafeler taŐınarak dıŐ pazarlara ulaŐabilen kanatlı etinin kalitesini ve raf mrűnű belirleyen baŐlıca organizmadır. Aerobik *Pseudomonas* spp. tavukta önemli bir enterik patojen olan *Campylobacter jejuni*'nin hayatta kalmasına yardımcı olacak mikroaerofilik ortamı oluŐurmada anahtar bir faktör olarak kabul edilmektedir (Hilbert vd., 2010; Morales vd., 2016).

Dogan ve Boor (2003) yaptıkları bir çalıŐmada, çiđ sűt, iŐlenmiŐ sűt ve çevresel numunelerden toplamda 338 *Pseudomonas* izolatu elde etmiŐlerdir. 338 izolatu tamamını, API 20 NE kullanarak karakterize etmiŐlerdir. API 20 NE sonuçlarına göre izolatların %51'ni *P. fluorescens*, % 14'nű *P. putida* ve % 25'ni *P. fluorescens* veya *P. putida* olarak belirlemiŐlerdir.

BaŐka bir çalıŐmada, çeŐitli gıda őrűnlerinde hasat ve depolama sırasında yapılan yanlıŐ uygulamalar sonucunda *P. aeruginosa* varlığını ortaya çıkarmıŐlardır. *P. aeruginosa*'yı molekűler dűzeyde tanımlayarak, *P. aeruginosa* suŐu HV17 ve HV77 olarak adlandırdıkları gıda kaynaklı yeni patojenler tespit etmiŐlerdir (Virupakshaiah ve Hemalata, 2016).

Morales vd. (2016) yaptıkları çalıŐmada, farklı őrűtim tarihlerine sahip 11 tavuk eti örneđinin son kullanma tarihi 2 gűn geçmiŐ olanlardan, *P. fragi* ve *P. fluorescens* tőrlerini izole etmiŐlerdir.

*P. aeruginosa*, önemli bir fırsatçı patojen olarak bilinmesine rađmen, gıda gűvenliđinde yeterince tanınmayan bir mikroorganizmadır. Yűksek adaptasyon yeteneđi, hızlı őrűme kabiliyeti ve dűŐűk bűyűme gereksinimleri (az miktarda besin ve nemlilik gibi) nedenleri ile *P. aeruginosa*, çevrede yaygın olarak bulunur. Genellikle insanlar tarafından taŐınır ve sonuç olarak aŐađıdaki sebeplerden dolayı gıda gűvenliđi sorunlarına neden olabilir. Yiyeceklerin bozulması ve gıda zehirlenmelerinde, *P. aeruginosa* su, sűt őrűnleri, et ve bitkisel yiyeceklerde sıklıkla rapor edilmektedir. Detaylandırarak olursak;

- a) Genellikle havuzlar, küvetler, lavabolar ve su kapları gibi nemli ortamlarda bulunur. *P. aeruginosa*, içme suyunun %3', musluk suyunun %9'u, ŐiŐelenmiŐ suyun %18,8'i ve kanalizasyon suyu örneklerinin %90'ında tespit edilebilen ve içme suyundaki en tehlikeli bakteridir. Musluk suyunda kontaminasyon göstergesi olarak tanımlanmaktadır (Xu vd., 2019). Dünya sağlık rgt (WHO, World Health Organization), gıda testinde *P. aeruginosa*'yı içme suyu kalitesinin bir göstergesi olarak tanımlarken, Avrupa Toplulukları ve Codex Alimentarius Komisyonu, *P. aeruginosa*'nın suda tespit edilmemesi gerektiğini Őart koŐmuŐtur. Ek olarak *P. aeruginosa*, çok düşük konsantrasyonlarda enfeksiyonlara neden olabilir. Bu nedenle erken teŐhis, *P. aeruginosa* enfeksiyonunun tedavisi için kritiktir ( Tang vd., 2017).
- b) *Pseudomonas* spp., süt ve süt ürünlerinde en yaygın mikroorganizmalardandır ve *P. aeruginosa*, sütten %45'e kadar yüksek oranlarla izole edilebilmektedir (Chen vd., 2011).
- c) Et rnlerinde *P. aeruginosa*, yaygın olarak kümes hayvanı eti, sığır eti ve balıktan izole edilmiştir. Aynı zamanda histamin zehirlenmesinden de sorumlu olduğu düşünülmektedir (Geornaras vd., 1999).
- d) Meyve ve sebzelerde genellikle karmaşık bir mikrobiyota mevcuttur. *P. aeruginosa*, domates, patlıcan, ıspanak, turp, kereviz, hindiba, soğan, havuç, marul ve salatalık dahil olmak üzere çiğ ve taze meyve ve sebzelerin yanı sıra farklı salatalarda da yaygın olarak bildirilmiştir. Sonuç olarak salataların, yüksek riskli hastaların diyetlerinden çıkarılması önerilmektedir (Xu vd., 2019).
- e) Ek olarak, *P. aeruginosa* hastanelerde, kantinlerde ve okullarda yiyeceklerden de izole edilmiştir (Xu vd., 2019).

Mevcut antibiyotiklerin insanlarda veya hayvanlarda geliŐigüzel kullanımı, halk sağlığı ve gıda güvenliğinde büyüyen küresel bir tehdit olan bakterilerde antimikrobiyal direncin çoğalmasına katkıda bulunmuştur. Dirençli mikroorganizmalar, hayvanların kesilmesi ve iŐlenmesi sırasında et veya diğer hayvansal ürünleri kontamine edebilirler. Kontamine su ile sulanan meyvelere, sebzelere veya diğer ürünlere yayılabilir veya et ve diğer ürünlerden insanlara aktarılabilir (Xu vd., 2019).

### 2.3 Bakteriyofajlar

Virüsler, ışık mikroskopunda görünmeyen ve ince porselen filtrelerden geçebilen son derece küçük bulaşıcı parçacıklardır. Çok çeşitli formlarda bulunurlar ve hayvanlar, bitkiler, böcekler ve bakteriler gibi hemen hemen tüm canlı sistemleri enfekte edebilirler (Kurtböke, 2012). Bakteriyofajlar bakterileri enfekte edebilen ve bakteriyel hücre içinde replike olabilen virüslerdir (Arumugam vd., 2018). Bakteriyofajların biyomdaki  $10^{30}$ - $10^{32}$  viryon nüfusu ile bakteri hücrelerinin sayısından 10 kat daha fazla olduğu tahmin edilmekte ve gezegendeki en bol yaşam biçimini oluşturdukları düşünülmektedir. İnsan besin zinciri boyunca fajların, geniş çapta varlığa sahip olduğu saptanmıştır. Bu fajlardan bazıları faydalı olma potansiyeline sahipken (örneğin biyokontrol ajanları olarak) diğerleri, örneğin; yoğurt üretiminde kullanılan starter kültürlerini enfekte ederek zararlı olabilirler (Atterbury, 2009; Jurczak-Kurek vd., 2016). Bakteriyofajlar, antibiyotiklere göre kendilerine avantaj sağlayan çeşitli özelliklere sahiptir (Kutter ve Sulakvelidze, 2005). Fajlar, hem kendilerini kopyalayabilir hem de sınırlayabilirler ancak duyarlı konakçılar mevcut olduğu sürece aktif olarak çoğalırlar. Spesifik patojenleri hedefleyerek geniş spektrumlu antibiyotiklerle tedaviyi takiben sıklıkla görülen kommensal mikrofloranın bozulmasını önleyebilirler (Atterbury, 2009).

### 2.4 Bakteriyofajların Keşfi ve Tarihçesi

Bakteriyofajlar, 1915'te İngiliz patolog Frederick Twort ve 1917'de Fransız-Kanadalı mikrobiyolog Félix D'Hérelle tarafından bağımsız olarak keşfedilmiştir. Twort, mikrokok kolonilerinin camı dönüşümü'nü tanımlarken, D'Hérelle bir Shigella "anti-mikrobu"nu izole etmiş ve "bakteriyofaj" terimini tasarlamıştır - kelime tam manasıyla bakteri yiyen anlamına gelmektedir (Salmond ve Fineran, 2015).

Bakteriyofajlar veya fajlar, Twort ve D'Herelle tarafından bağımsız olarak keşfedilmişse de bu virüslerin ilk gözlemleri, 1896'da Hankin'e kadar uzanmaktadır (Kutter vd., 2005). D'Herelle, fajların virüs olduğuna çabucak ikna olmuş olsa da birçok bilim adamı bunların bakterisit etkisinin bir enzimin sonucu olduğuna inanmıştır. Nitekim bu erken dönemde Bordet ve Gratia gibi önde gelen mikrobiyologlar, D'Herelle'in virüs hipotezine şiddetle karşı çıkmışlardır. Ellis ve Delbruck klasik "tek aşamalı büyüme eğrisi" deneylerini gerçekleştirdiklerinde fajların konakçıya rağmen çoğalabildiklerinin kesin

kanıtını elde etmişlerdir. “Tek Aşamalı Büyüme Eğrisi”, tek bir fajın bakteriyi enfekte ederek konakçı içerisinde çoğalması ve viral soyun hücreyi parçalayarak çevreye yayılmasına (içeriden parçalanma veya litik enfeksiyon) kadar geçen süreyi gösterir. Ayrıca, Delbruck birçok fajın bir bakteriyi aynı anda enfekte etmesi durumunda konaklarını replikasyon olmadan öldürebileceğini (dışarıdan lizis, lysis from without, LO) göstermiştir. Delbruck'un kanıtı, 1940'ta Ruska tarafından fajların ilk elektron mikrografları ile desteklenmiştir (Pennazio, 2006).

Bakteriyel enfeksiyonları tedavi etmek için fajların potansiyelini ilk fark eden D'Herelle olmuştur. 1919'da bakteriyel dizanteriden muzdarip 12 yaşındaki bir erkek çocuk üzerinde ilk başarılı faj tedavisi denemesini gerçekleştirmiştir. D'Herelle, bu başarıyı 24 saat içinde belirgin şekilde iyileşen üç dizanteri hastasıyla tekrarlamıştır. Bu zaman zarfında, Bruynoghe ve Maisin, stafilokokal deri enfeksiyonlarını tedavi etmek için fajları kullanmışlardır. D'Herelle, fajlarla tedavi edilebilen bakteriyel hastalık yelpazesini hızla genişletmiştir. 1925'te Mısır'da dört hıyarcıklı veba hastasını başarıyla tedavi etmiş ve Hindistan'daki kolera hastalarının ölüm oranlarını hastane denemelerinde yaklaşık %30'dan sıfıra düşürmüştür. Ancak, tüm faj tedavisi denemeleri başarılı olmamıştır. Bir çalışmada deneysel olarak in vivo streptokok enfeksiyonları tedavi edilememiştir (Atterbury, 2009).

Erken dönemde umut vaat etmesine rağmen faj tedavisi, Batı'da 1930'larda antibiyotiklerin yaygın kullanımından önce bile düşüş göstermekteydi. Titizlikle kontrol edilen çalışmaların ve standartlaştırılmış yöntemlerin azlığı, faj tedavisini objektif olarak değerlendirmeye yönelik erken girişimleri engellemiştir. D'Herelle'in başarısını takip eden yıllarda, bir dizi faj ürünü üretilmiş ve pazarlanmıştır. Bu ürünler, genellikle viral hastalıklara karşı etkili oldukları gibi yanlış iddialar kullanılarak pazarlanmaktaydı. Dahası, D'Herelle'in de bildirdiği gibi, bu ürünlerden bazıları hiç aktif faj içermediğinden bakteriyel hastalıklara karşı bile etkisiz hale gelmişlerdi. Ham lizatlar, genellikle depolama sırasında fajları inaktive eden hücre bileşenlerini içerdiğinden bu olumsuz sonuçlar şaşırtıcı değildi. Bu preparatlarda koruyucu olarak organo-merkür bileşiklerinin yaygın kullanımı da faj canlılığının azalmasına katkıda bulunabiliyordu (Merril vd., 2006). Ek olarak, ham faj lizatları sıklıkla yüksek seviyelerde lipopolisakkarit içerir. Yeterli miktarlarda lipopolisakkarit, bağışıklık sistemi zayıflamış bireylerde endotoksik şok ve ölüme neden olabilir. Ticari faj preparatlarının genel olarak zayıf etkinliği,

hastalığın tedavisinde fajların kullanımı konusunda yaygın eleştirilere ve anlaşmazlıklara yol açmıştır. Gıda uygulamaları söz konusu olduğunda ise, fajların kullanımı ile ilgili iki büyük engel ortaya çıkmaktadır. Bunlardan ilki, hedeflenen gıdaların önemli bir kısmının doğada sıvı değil katı formda olmasıdır. İkincisi, beklenen yüksek hijyen standartlarına rağmen çok düşük sayılarda bakteriyel kontaminasyonun meydana gelebilmesidir (Hagens ve Loessner 2010; Atterbury, 2009). Akademik toplulukta faj tedavisine olan ilgi, 1930'larda Amerikan Tabipler Birliği tarafından yapılan değerlendirmelerin genel olarak olumsuz olduğu bakteriyofaj araştırmasının ardından ciddi şekilde azalmıştır. Bu durum, 7 yıl sonra Krueger ve Scribner tarafından “bakteriyofajın doğası artık söz konusu değil” ifadesinin kullanıldığı bir sonraki raporla desteklenmiştir.

Erken faj tedavisi denemelerinin yeniden incelenmesi, başarısızlıkların çoğunun aşağıdaki faktörlerden bir veya birkaçından kaynaklandığını göstermektedir (Kutter ve Sulakvelidze, 2005).

1. Hem fajların hem de bakterilerin heterojenliğinin ve ekolojisinin belirlenememesi,
2. Hastadaki hedef bakterilere karşı yüksek derecede virülan fajların seçilememesi,
3. Farklı bakteri karışımlarını içeren enfeksiyonları tedavi etmek için tekli faj preparatlarının kullanılması,
4. Bakteriyofaja duyarsız mutantların (BIM'ler) ortaya çıkışı,
5. Faj preparatlarının uygun şekilde karakterize edilmemesi veya titre edilmemesi,
6. Oral uygulamadan önce mide pH'sının nötralize edilememesi,
7. Konakçı bağışıklık yanıtları ile fajların inaktivasyonu,
8. Faj hazırlanmasında hastada toksik şoka yol açan endotoksinlerin varlığı,
9. Enfeksiyona neden olan patojenleri doğru bir şekilde tanımlamak için güvenilir bakteriyoloji laboratuvarlarının azlığıdır.

Bu faktörler, 1940'larda antibiyotiklerin keşfi ve ardından gelen İkinci Dünya Savaşı ile birlikte Batı'daki faj terapi araştırmalarında önemli bir düşüşle sonuçlanmıştır. Batı'da faj terapi araştırmalarının yakın zamanda yeniden canlanmasına yönelik önemli bir adım, 1980'lerde Smith ve Huggins tarafından yapılan bir dizi veterinerlik deneyiyle atılmıştır. İlk çalışmalarında, menenjitli bir çocuktan alınan bir *Escherichia coli* suşu (O18: K1: H7 ColV +) kullanarak farelerde deneysel olarak indüklenen *E. coli* septisemisine

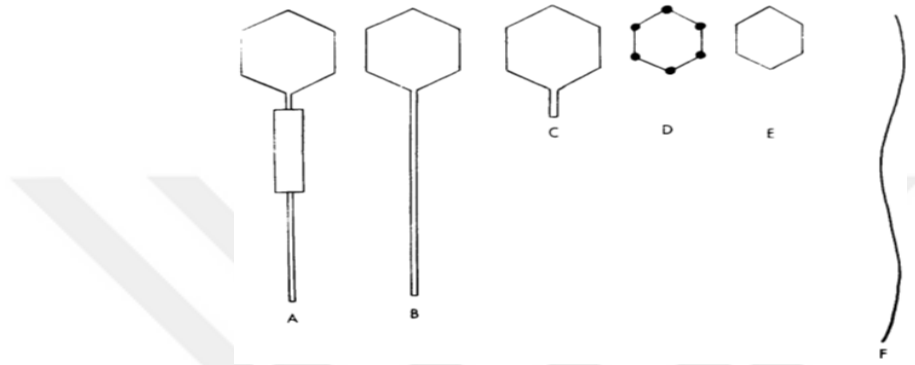
odaklanmışlardır. *E. coli* enfeksiyonları, o zamandan beri çeşitli faj terapi modellerinde kullanılmıştır (Smith ve Huggins, 1983).

Wang vd. (2006) tarafından enfeksiyon çokluğu değeri (MOI)'nin faj tedavisinin başarısındaki önemi üzerinde durulmuştur. Başka bir çalışma, *E. coli* O157 ile deneysel olarak enfekte farelerin tekrarlanan oral faj tedavilerinin başlangıçta patojen sayılarını azalttığını göstermiştir. Kemirgen hastalık modellerini kullanan diğer faj terapi denemeleri, fajların *Clostridium difficile*, *Acinetobacter baumannii* ve *P. aeruginosa*'yı başarılı bir şekilde azaltmak için kullanılabileceğini göstermiştir (Soothill, 1992).

## 2.5 Bakteriyofajların Sınıflandırılması

Bakteriyofajlar diğer virüslerle karşılaştırıldıklarında, doğadaki en büyük viral grubu oluştururlar (Ackermann, 2003). Sınıflandırmanın ana amaçları, genelleme ve basitleştirmedir. Sınıflandırma, karşılaştırmaları ve dolayısıyla virüs araştırmasını ve virüslerin anlaşılmasını kolaylaştırır. 1943'te Ruska, virüslerin sınıflandırılmasında elektron mikroskopunun kullanılmasını önermiştir (Ackermann, 2011). İlk olarak Holmes tarafından virüsler, hastalık belirtilerine göre sınıflandırılmış ve bu sınıflandırma kısa sürede unutulmuştur. 1962'de Lwoff vd., virionun nükleik asit türü (DNA veya RNA), kapsid morfolojisi ve zarf yapısını içeren bir virüs sınıflandırma sistemi geliştirmişlerdir (Salmond ve Fineran, 2015). Sırasıyla; kuyruklu fajlar için *Urovirales*, iplikli fajlar için *Inoviridae* ailesi ve  $\phi$ X-tipi fajlar için *Microviridae* ailesini önermişlerdir. 1967 yılında Bradley tarafından yapılan bir çalışma ile altı temel bakteriyofaj türü tanımlanmıştır. Bradley sınıflandırmasına göre fajlar, 6 temel gruba ayrılmıştır (Şekil 2.1). Bunlardan en karmaşık olanı (Şekil 2.1A), altıgen çerçeveden oluşan bir başa sahiptir ve kasılma kılıflı bir kuyruk ona tutturulmuştur. Yapısal karmaşıklık sırasına göre ikinci grup, (Şekil 2.1B) altı kenarlı bir kafaya ve bir kuyruğa sahiptir. Ancak burada kuyruk, nispeten esnek olup terminal ekleri olabilir veya olmayabilir. Kuyruk uzunluğu, baş çapından daha uzun ve kasılma aparatı yoktur. Üçüncü tip (Şekil 2.1C), bir kuyruğa ve altı kenarlı bir kafaya sahiptir. Ancak kuyruk, kafa çapından veya maksimum boyuttan daha kısadır, eklere sahip olabilir ve kasılamaz. Dördüncü grubun kuyruğu yoktur (Şekil 2.1D), simetrik görünümde ve altı kenarlıdır. Altıgenin her tepe noktasında bir boğum veya büyük bir kapsül bulunur. Bir sonraki grubun (Şekil 2.1E) büyük kapsomeri yoktur ve virion, basit ve düzenli altıgen bir başa

sahiptir. Son grup (Şekil 2.1F) diğerlerinden oldukça farklıdır. Virion, uzun ve esnek bir filaman biçimindedir ve ona bağlı herhangi bir ek yapı yoktur. Morfolojideki temel farklılık, nükleik asit tipindedir. Her grubun üyelerinde bulunan nükleik asit türünün, konakçı bakteri cinsi ne olursa olsun aynı olduğu kanıtlanmıştır (Bradley, 1967). Bu basit şema halen mevcut bakteriyofaj sınıflandırmasının temelidir (Ackermann, 2003). Bu şema, Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi (ICTV) tarafından kabul edilmiştir. ICTV, virüs taksonomisi ile ilgilenen tek uluslararası organdır (Ackermann, 2011).



**Şekil 2.1.** Bradley'in bakteriyofajların temel sınıflandırması (Bradley, 1967)

Bakteriyofajların en güncel sınıflandırması, Ackermann tarafından gerçekleştirilen sınıflandırmadır (Çizelge 2.2). Sınıflandırmanın kilit noktası faj morfolojisi ve nükleik asit özellikleridir. Genom DNA ya da RNA'dan oluşabilir. Fajların büyük çoğunluğu çift sarmallı DNA (dsDNA) içerirken, ssRNA, dsRNA veya ssDNA içeren küçük faj grupları da vardır. Bakteriyofajlar, bir takım, 13 aile ve 31 cinsten oluşmuştur. Bakteriyofaj vironları dört yapısal gruba ayrılmıştır. Bunlar; kuyruklu, polihedral (çok yüzlü), filamentli ve pleomorfiktir. Birkaç tipte lipid içeren zarflar bulunur veya lipid partikülleri, duvarın bir parçası olarak bulunabilir. Polihedral, filamentli ve pleomorfik (PFP) fajlar, yaklaşık 190 virüsten oluşmaktadır (fajların %3,6 kadarı) ve 10 küçük aileye ayrılırlar. Bu fajlar, farklı görünüş özellikleri ve orijinleri bakımından önemli ölçüde farklılık gösterirler (Ackermann, 2003; 2007).

Kuyruklu fajlar, her yerde bulunabilirler, bilinen fajların %96'sını temsil ederler ve filogenetik olarak ilişkili üç ana aileye ayrılırlar. İkozahedral simetrideki bir başa, başın içine yerleşmiş çift zincirli bir DNA'ya ve çeşitli uzunlukta kuyruklara sahiptirler ve *Caudovirales* takımı içinde yer alırlar. Bu takım içinde yer alan aileler: *Myoviridae*, *Siphoviridae* ve *Podoviridae*. *Myoviridae*, kuyruklu fajların % 25'ini oluştururlar. Uzun

sert kontraktıl kuyruğa sahiptirler. Örneğin; faj T4 bu grupta yer alır. *Siphoviridae*, %61'ni oluştururlar ve uzun esnek kontraktıl olmayan kuyruğa sahiptirler (örneğin; faj  $\lambda$ ). *Podiviridae*, %14'nü oluştururlar ve kısa kontraktıl olmayan kuyruğa sahiptirler (faj T7 bu grupta yer alır) (Garcia vd., 2010; Harper ve Enright, 2011; Salmond ve Fineran, 2015).

Pleomorfik fajlar, daha fazla karakterizasyona ihtiyaç duyan üç aileye bölünmüşlerdir ve bilinen az sayıda üyeleri ile karakterize edilirler. *Plasmaviridae* (dsDNA), bir lipoprotein zarfiyla kaplanan dsDNA'lı fajları içerir ve bu nedenle bir nükleoprotein granül olarak adlandırılabilir. *Fusseloviridae* ailesinin üyeleri, bir ucunda kısa sivri uçlu limon şeklindeki bir kapsidin içinde dsDNA'ya sahiptir. *Guttaviridae* faj grubu, dsDNA'ya sahiptir ve damlacık şeklindeki virüs benzeri parçacıklarla temsil edilir. Sarmal veya ipliksi yapıya sahip fajlardan *Inoviridae* (ssDNA) ailesi, uzun, sert veya değişken uzunluktaki esnek filamentleri olan ve partikül uzunluğu, kapsid yapısı ve DNA içeriğine göre sınıflandırılmış fajları içerir. *Lipothrixviridae* (dsDNA) fajları, bir lipoprotein zarfi ve çubuk benzeri şeklin kombinasyonu ile karakterize edilirler. *Rudiviridae* (dsDNA) ailesi, zarfsız düz sert çubuklar olan ve tütün mozaik virüsüne çok benzeyen fajları temsil eder (Ackermann 2003; 2007). Polihedral faj grubu, ikozahedral şekilli kapsidlere sahiptir. Polihedral DNA fajları; *Microviridae*, *Corticoviridae* ve *Tectiviridae*'dir. Polihedral RNA fajı ise *Leviviridae*'dir. Bunlardan *Tectiviridae*, lipid zarflara sahiptir ve *Corticoviridae* kapsidi lipit parçaları içerir. *Leviviridae* ailesinden fajlar, küçük kapsidlerde paketlenmiş ssRNA genomuna sahiptir ve enterovirüslere benzerler (Ackermann, 2007).

## 2.6 Bakteriyofajların Morfolojik Özellikleri

Bakteriyofajlar, bakterileri enfekte eden zorunlu intraselüler parazitlerdir ve metabolik aktiviteye sahip değillerdir. Genetik ve yapısal olarak basit ve kısa (20-60 dk) bir hayat döngüsüne sahiptirler. Çok yüksek düzeyde konakçı-spesifik olup sadece spesifik türleri veya hatta suşları enfekte etmektedirler. Virülant fajlar, bakteriyel kontaminasyonun indikatörü olarak ve spesifik bakteri türlerinin veya suşlarının tanımlanmasında (tiplendirilmesinde) kullanılabilirler gibi konakçı hücreyi lize ettiklerinden bakteriyel popülasyonların kontrolünde de kullanılabilirler (Cooper, 2016; Harper ve Enright, 2011; McLaughlin vd., 2006).

**Çizelge 2.2.** Ackermann sınıflandırması (Ackermann, 2007)

Şekil	Nükleik asit	Virüs grubu	Özellikler	Örnek
<b>Kuyruklu</b>	DNA, 2, L	<i>Myoviridae</i>	Kontraktıl kuyruk	T4
		<i>Siphoviridae</i>	Kontraktıl olmayan uzun kuyruk	$\lambda$
		<i>Podoviridae</i>	Kısa kuyruk	T7
<b>Polyhedral</b>	DNA, 1, C	<i>Microviridae</i>	Belirgin kapsomerler	$\Phi$ X174
	2,C,S	<i>Corticoviridae</i>	Kompleks lipit kapsit	PM2
	2,L	<i>Tectiviridae</i>	Sahte kuyruk, içsel lipit kese	PRD1
	2,L	SHI, grup*	İçsel lipit kese	SH1
	2,C	STV1 grup*	Turet şeklinde çıkıntı	STIV
	RNA, 1,L	<i>Leviviridae</i>	Pliovirüs benzeri	MS2
	2,L, seg	<i>Cystoviridae</i>	Lipit zarf	$\Phi$ 6
<b>Filementöz</b>	DNA, 1,C	<i>Inoviridae</i>	a. Uzun kuyruklu b. Kısa çubuklar	fd MVL1
		<i>Lipotrixviridae</i>	Lipit zarf	TTV1
		<i>Rudiviridae</i>	TMV, benzeri	SIRV-1
<b>Pleomorfik</b>	DNA, 2, C, S	<i>Plasmaviridae</i>	Kapsitsiz, Lipit zarf	L2
	2, C, S	<i>Fuselloviridae</i>	Limon benzeri	SSV1
	2, L, S,	<i>Salterprovirus</i>	Limon benzeri	His 1
	2, C, S	<i>Guttaviridae</i>	Damlacık şeklinde	SNDV
	2, L	<i>Ampullaviridae</i> *	Şişe şeklinde	ABV
	2, C	<i>Bicaudaviridae</i> *	İki kıyruklu	ATV
	2, L	<i>Globuloviridae</i> *	Paramyxovirus benzeri	PSV

Elektron mikroskopunun keşfi ile virüslerin morfolojisini incelemek mümkün hale gelmiştir. İlk çalışmalar, virüslerin boyutlarına ve şekillerine göre ayırt edilebileceğini hemen ortaya çıkarmıştır. Virüsler, dairesel veya oval bir şekle ve esnek veya sert olabilen uzun kalın veya ince çubuk görünümüne sahip olabilir. Bazı virüslerin kendine özgü kafaları ve kuyrukları vardır. En küçük virüsler, yaklaşık 20 nm çapındayken en büyükleri, 500 nm civarındadır (Kurtböke, 2012). Tam enfektif virüs partikülü, virion olarak bilinir. Tüm virüsler katı geometrik çizgiler üzerine inşa edilmiştir ve simetri kurallarına uyarlar (Bradley, 1967).

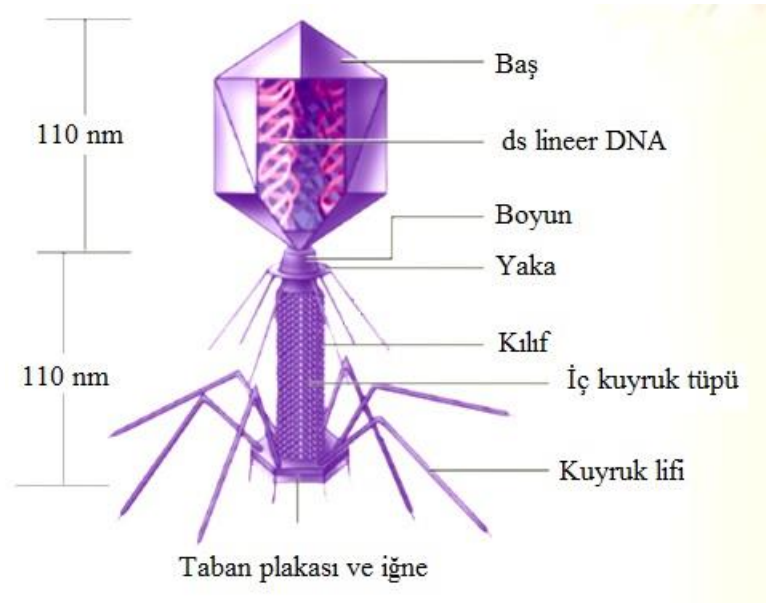
Virüsler oldukça basit yapıdadırlar. Bir nükleik asit genomundan (DNA veya RNA) ve nükleik asidi çevreleyen kapsit adı verilen bir protein kabuğundan oluşurlar. Bazıları, konakçı hücrenin zarından türetilen bir çift lipit tabakadan oluşan bir zarfa sahiptir. Bu yapılar, UV ışığı veya nükleazlar (konakçıda bulunan enzimler ve nükleik asidi bozan ortam) gibi çevresel etkenlere karşı nükleik asidin korumasını sağlarlar (Erles, 2011).

Bakteriyofajların temel yapısal özellikleri, bir kapsidin içine gizlenmiş genomu koruyan katlar (veya kapsidler) ve genom salımı için bir bakteri membranı ile ara yüz sağlayan ek yapılarıdır (Şekil 2.2). Farklı faj türleri, hem boyut (24-400 nm arasında) hem de genom uzunluğu bakımından farklılık gösterebilir. Ayrıca, DNA dizileri önemli ölçüde farklılık gösterir ve uzunlukları 18-400 kb arasında değişebilir. Nükleik asit, uzun iplikli bir molekül biçimindedir ve çift veya tek sarmal şeklinde olabilir (Bradley, 1967; Orlova, 2012).

Her virion, genomu örten polihedral, ağırlıklı olarak ikosahedral, başa (kapsid) sahiptir. Başlar, bir veya birkaç farklı proteinin birçok kopyasından oluşur ve çok kararlı bir organizasyona sahiptir. RNA, az sayıda düşük moleküler ağırlıklı proteini kodlamak için yetersiz olduğundan bir kapsid oluşturmanın tek yolunun aynı tür molekülü tekrar tekrar kullanmak olduğu, bunun da kapsomer adı verilen alt birimlerin simetrik olarak düzenlenerek gerçekleştirilebileceği belirtilmiştir (Bradley, 1967; Orlova, 2012). Bir bakteriyofaj kuyruğu, fajın bu iki önemli bileşeni arasında bir adaptör görevi gören bir bağlayıcı (konektör) aracılığıyla kapside bağlanır. Bağlayıcı, birkaç proteinden oluşan bir heterooligomerdir. Bağlayıcılar, faj yaşam döngüsü boyunca çeşitli işlevleri yerine getirirler. dsDNA'nın kapside paketlenmesine katılırlar ve daha sonra; fajın kapsid çıkışının kilitlemesi, yüksek basınç altında DNA sızıntısının önlenmesi, kuyruktan fajın

bakteriye bağlandığını belirten bir sinyalin iletilmesinin ardından bağlayıcının açılarak DNA'nın bakteri içerisine salınmasına izin vermek gibi işlevleri yerine getirirler (Plisson vd., 2007; Orlova, 2012).

Bakteriyofaj kuyrukları, konakçı hücre yüzeyini tanımak ve viral genomu bakteriyel sitoplazmaya iletmek için tasarlanmış nanomoleküler makinelerdir. Kuyruk, konektör aracılığıyla kapside (veya başa) bağlanır. Konektör halkası DNA'nın nükleokapsidden çıkışını önlemek için yapıyı kapatır (Plisson vd., 2007). Kuyruk hem bir sinyal ileticisi hem de enfeksiyon sırasında DNA'nın konakçı hücreye iletiildiği bir boru hattı görevi görür. Kuyruklar birinci olarak kısa veya uzun, ikinci olarak kasılabilen ve büzülmeyen kuyruklar olarak ikiye ayrılırlar. Uzun kuyruklar, tipik olarak helikal simetri ile düzenlenmiş birkaç proteinin birçok kopyasından oluşur. Tüm kuyruk türleri, kuyruğun uzak ucuna tutturulmuş dış uzantılara sahiptir ve genellikle birkaç lif ve bir uç içeren bir kuyruk plağı (taban plakası) veya bakterinin zar reseptörlerine özgü bir iğne içerir. Reseptör, bakteriye çok sayıda kısa süreli tersinir bağlanma sırasında meydana gelen kuyruk iğnesi tarafından bulunduğu kuyruk plağı ve kuyruk lifleri, fajın bakteriyel dış zara bağlanmasında rol oynar ve bağlanma geri döndürülemez hale gelir. Fajın kenetlenmesi (geri dönüşü olmayan bağlanma), faj bağlayıcısının (konektör) açılmasına ve genomun kuyruk tüpünden bakteri hücresine salınmasına neden olur (Orlova, 2012).



**Şekil 2.2.** Bakteriyofajın yapısı (Titer, 2016)

## 2.7 Bakteriyofajların Yaşam Döngüleri

Virüsler yarı canlı varlıklar ya da cansız bir yapıya sahip bulaşıcı ajanlar olarak tanımlanmışlardır. Virüsler, hücre ve nükleik membranlar gibi yarı geçirgen sınırlara, ribozomlar ve mitokondri gibi büyük ölçekli organellere ve biyokimyasal olarak aktif bir metabolizmaya sahip değildirler. Bu nedenle virüsler, canlı bir hücrenin yokluğunda gelişemez ve çoğalamazlar (de Farias vd., 2019).

Virüsler çok basit bir yapıya sahiptirler. Sadece nükleik asitlerinin replikasyonu ve üremeleri için gerekli olan proteinlerin sentezi sırasında ihtiyaç duyulan genetik bilgiyi taşırlar. Virüslerin hayatta kalması tamamen konakçılarının varlığının devam etmesine bağlıdır çünkü enfeksiyondan sonra viral genom, tüm aktif konakçı metabolizmasını kendi hücre bileşenlerini sentezlemek için değiştirir. Canlı konakçı hücreler olmadan virüsler kendi soylarını devam ettiremezler. Viral nükleik asit hücreden sorumluyken, virüs canlı bir varlık gibi davranır (Kurtböke, 2012; de Farias, 2019).

Bakteriyofajlar, diğer virüsler gibi zorunlu hücre içi parazitler olduklarından bakteri hücresine başarılı bir şekilde nüfuz etmeleri, yaşam döngülerinin devamı için gerekli bir koşuldur (Rakhuba vd., 2010). Yaşam tarzlarına bağlı olarak fajlar, virülan fajlar (litik) ve ılıman fajlar (lizogenik) olmak üzere iki gruba ayrılabilirler. Litik ve lizojenik döngüler sırasında faj gen ekspresyonunda diğer virüsler gibi konakçı RNA polimerazı kullanırlar. Konakçı RNA'nın, polimeraz lambda genomunu kopyalaması sonucu iki protein üretilir. Bunlar, CRO (baskılayıcı ve diğer aşamaların kontrolü için) ve N proteindir (Brigham vd., 2003; Strauch vd., 2007). Virüs, konakçı bakterinin enfeksiyonundan hemen sonra litik veya lizojenik yollardan birini benimser. Fajın litik ya da lizojenik döngüye girme kararı, esasen CI ve CRO proteinleri arasındaki bir rekabettir. CI litik döngüyü destekleyen CRO ile rekabet içindedir. Bu rekabetin amacı, proteinlerin OR operatörü adı verilen bir DNA uzantısına bağlanabilmeleridir. Bu DNA uzantısı, proteinlerin işgal edebileceği üç bölgeye sahiptir. Hangi bölgelerin hangi protein tarafından işgal edildiğine bağlı olarak, CI veya CRO proteinlerinin üretimi teşvik edilir. Her ikisi de aynı operatör bölgesine bağlanabilir. Bölgenin üç bağlanma noktası vardır. CRO ve CI, bu bölgeleri ters sırada işgal eder. Önce, operatörün tercih ettiği bölgeleri işgal edebilen protein daha fazla sentezlenmeyi uyararak diğer proteinin sentezini bloke eder. Daha fazla CI üretilirse lizojenik döngü devam eder. CRO sentezi fazla üretilirse

viral birleşme süreci, yani litik döngü başlar. Litik döngü, çevresel stres faktörlerine maruz kalma dâhil olmak üzere konakçı bakteriye zarar veren olaylar tarafından da tetiklenebilir (radyasyon, UV ışığa maruz kalma vb.). Litik yol izlenirse, viral genlerin geri kalanlarının transkripsiyonu gerçekleşir ve virüs partiküllerinin birleşmesi meydana gelir. N proteini, bu süreçte işlev görür ve transkripsiyonun sona ermemesini sağlar (Brigham vd., 2003).

Lizojeni, lizojenik durumdaki bir dizi operatöre bağlanan ve kendi genleri dışındaki tüm genlerin ifadesini baskılayan CI proteini tarafından yönetilir. Protein, baskılayıcı bir proteindir ve işlevi, operatör dizilerine bağlanmak ve transkripsiyonu önlemektir. CI ekspresyonu, faj genomunun konakçı genomuna entegre olmasını indüklemektedir. Entegre edildiğinde, lizojenik durumu korumak için sadece CI proteini üretilir (Brigham vd., 2003; Kutter ve Sulakvelidze, 2005).

### **2.7.1 Litik döngü**

Bakteriyofajlar, bakteriyel hücreyi çeşitli şekillerde enfekte edebilirler. Litik enfeksiyonda virülant fajlar, kendilerine duyarlı bakteriye absorbe olduktan sonra genetik materyallerini hücre içine enjekte ederler ve faj genomu, konakçı genomunu kontrol altına alıp hücrenin tüm olanaklarını kullanarak kendi replikasyonunu gerçekleştirir. Belli bir süre sonra yüksek sayıya ulaşan olgun fajlar, bakteri hücre duvarını parçalayarak ortama yayılırlar. Ortamda konakçı bakteri olduğu sürece bu işlem tekrarlanır. Konakçı bakterinin lize olması ve olgun fajların ortama yayılması ile son bulan bu döngü, litik döngü olarak adlandırılır (Chibeu, 2013; Harper ve Enright, 2011; Tunail, 2009). Litik döngü aşağıdaki adımlardan oluşur (Strauch vd., 2007):

1. Belirli bir reseptöre bağlanarak fajın bakteri hücre duvarı üzerindeki adsorpsiyonu,
2. Faj genomunun bakteri hücrelerine enjeksiyonu,
3. Faj genomunun replikasyonu,
4. Yeni kapsidlerin oluşumunda rol oynayan faj proteinlerinin sentezi ve montajı,
5. Kopyalanmış faj genomunun kapsüllenmesi,
6. Hücre lizisi ve yeni faj partiküllerinin salınmasıdır.

### **2.7.1.1 Belirli bir reseptöre bağlanarak fajın bakteri hücre duvarı üzerindeki adsorpsiyonu**

Faj vironunun enfeksiyonu başlatmak için önce duyarlı bir konakçı hücrenin yüzeyine adsorbe olması gerekir. Bu, faj kuyruk lifi ve çeşitli diğer uzantılar tarafından konakçı hücre yüzeyindeki reseptörlerin tanınmasıyla gerçekleştirilir (Shao ve Wang, 2008). Konakçıya reseptör eklendikten sonra virüs, hücreye girmenin bir yolunu bulmalıdır. Hem zarflı hem de zarfsız virüsler, endositoz mekanizmasını kullanarak konakçı hücreye bağlanmak ve hücreye girmek için yüzeylerinde bulunan proteinleri kullanırlar. Endositik veziküller, viral partikülleri viral replikasyon koşullarının optimal olduğu konakçı hücrenin perinükleer alanına taşırlar. Diğer enfeksiyon yolu ise, yalnızca viral genomu doğrudan konakçı sitoplazmaya enjekte etmektir (Kurtböke, 2012).

Bakteriyofajın litik döngüsünün birinci aşaması, faj ve hücre yüzeyindeki spesifik bağlanma alanı arasındaki etkileşimi kapsar. Fajın bakteri hücresi ile etkileşimindeki özgünlük, adsorpsiyonun özgünlüğü ile belirlenir. Bu da, reseptörlerin bakteriyel hücre yüzeyindeki yapısına ve yapısal özelliklerine bağlıdır. Gram negatif bakterilerin fajları, lipopolisakkarit bileşenleri ile diğer membran proteinleri ya da adhezinlerin kompleks reseptörleri ile interaksyona girebilir. Gram pozitif bakterilerin fajları, bakterinin dış çeperini oluşturan peptidoglukan tabakasına gömülü olan taykoik asit gibi bir veya birkaç molekülü algılayabilir (Rakhuba vd., 2010).

Reseptörün molekül yüzeyindeki yerleşimi, miktarı, konsantrasyonu ve boyutsal yönelimi, fajın adsorpsiyonu ve konakçıyı tanıması için kritik öneme sahiptir. İki değerlikli katyonlar, ( $Ca^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$  gibi) fajın bakteride barınması veya faj enfeksiyonu için gerekli değildirler. Fakat fajın konakçı hücreye nüfuz etmesi için iki değerlikli katyonlar gereklidir ve bakteriyel konağın fizyolojik durumu gibi dış faktörler, adsorpsiyon prosesinde anahtar rol oynarlar. Reseptör olarak fajlar tarafından kullanılan bazı yüzey moleküllerinin kaybı, fajın rekabetçi yeteneğinin azalması ve kaybolması ile sonuçlanabilir (Paranchych, 1966; Rakhuba vd., 2010).

*Gram negatif bakterilerin hücre duvarında bulunan reseptörler:* Gram negatif bakterilerin hücre duvarı, Gram pozitiflerden farklıdır. Ayırt edici ilk fark, taşıma kanallarını oluşturan porin proteinlerinin neden olduğu yüksek geçirgenliktir. İkinci fark

ise dış membranda bulunan lipopolisakkarit tabakasıdır. Bunun dışında, membranın çeşitli yerlerinde lokalize olan proteinler, bakteriyofaj reseptörleri olarak hizmet edebilirler. Dış zar proteinleri, 5 sınıfa ayrılabilir (Rakhuba vd., 2010; Brigham vd., 2003). Bunlar:

1. Peptidoglukan tabakası ile etkileşime giren yapısal proteinler,
2. Membran kanallarını oluşturan spesifik ve spesifik olmayan porinler,
3. Enzimler,
4. Yüksek afiniteye sahip substrat reseptörleri,
5. Salgılamadan sorumlu proteinleri taşıyanlardır.

Bakteriyofajın protein-LPS kompleksi ile bağlanması geri dönüşümlü olarak gerçekleşir. Bu kompleksin  $Mg^{+2}$  ile çökmesi, geri dönüşü olmayan faj bağlanmasına yol açar. Proteinlere ek olarak LPS, bakteriyofaj adsorpsiyonu için bir reseptör görevi gören Gram negatif bakterilerdeki dış zarın başka bir bileşenidir. İki tür LPS vardır: pürüzsüz (S) tipi ve kaba (R) tipi. Bazı bakteriyofajlar, her iki LPS tipine de adsorbe olabilirler. S-tipi LPS'ye özgü fajlar, farklı taksonomik grupların bakterilerindeki büyük O-antijen yapısı değişkenliği ile belirlenen son derece dar bir konakçı aralığı özgüllüğü sergilerken, R-tipini ve tersini tanıyan bakteriyofajlar, daha geniş bir konakçı aralığı gösterirler (Rakhuba vd., 2010).

*Gram pozitif bakterilerin hücre duvarında bulunan reseptörler:* Gram-pozitif bakterilerin hücre duvarı kalınlığı, 20 ile 40 nm arasında değişmektedir. Hücre duvarının ana bileşeni olan peptidoglukan tabakası dış ortama karşı koruyucu bir bariyer görevi görür ve bakterilerin 25 atm'ye kadar olan ozmotik basınç değişikliklerine dayanmasını sağlar. Peptidoglukan tabakasının ana bileşeni, *N*-asetil-glukozamin (NAG) ve *N*-asetil-muramik asit (NAM) tir. Ayrıca Gram-pozitif bakterilere özgü olan ve hücre duvarında glikolipid bağ yoluyla plazma zarına bağlanabilen taykoik asit bulunmaktadır. Buradaki O-asetil gruplarının varlığı, faj adsorpsiyonu için gereklidir (Kim vd., 2015; Malanovic ve Lohner, 2016). Pek çok bakteriyofaj, reseptör olarak bakteriyel pili, flagellayı, kapsülleri ve slime polisakkaritleri de kullanır. Flagella'ya adsorbe olan virüsler arasında, Enterobacteriaceae ailesinin temsilcilerinin çoğunlukta olduğu belirtilmiştir. Çoğu bakteri, kapsül veya slime şeklinde dış koruyucu katmanlara sahiptir. Bu tür bir katman, bakteriyofajın hücre duvarında lokalize olan reseptöre erişimini engelleyebilir. Gram

negatif bakteri kapsüllerinde bulunan bakteriyofaj reseptörlerinden biri, *Salmonella*, *Citrobacter* ve *E. coli* temsilcileri için tipik olan Vi-antijenidir (Brigham vd., 2003; Rakhuba vd., 2010).

### **2.7.1.2 Faj genomunun bakteri hücrelerine enjeksiyonu**

Nükleik asidin penetrasyonu, geri dönüşü olmayan adsorpsiyon aşamasından sonra gerçekleşir. Penetrasyon evresini, faj kapsidi içinde bulunan faj nükleik asidinin enjeksiyonu izler. Enfeksiyon sırasında kapsidin konakçı hücrenin dışında kaldığı, DNA'nın ise konakçıya enjekte edildiği görülmüştür. Ökaryotik viral enfeksiyon sırasında hem genom hem de kapsid birlikte konakçıya aktarılırken, bakteriyofajlar genomlarını yalnızca bakteriyel membran yoluyla enjekte ederek kapsidi dışarıda bırakır. Elektrokimyasal membran potansiyeli, ATP hidrolizi ve basınç, genetik materyalin bakteri hücrelerine aktarılması için gerekli olan enerjiyi sağlamaktadır (Rakhuba vd., 2010; Tunail, 2009; Molineux, 2001; Roos vd., 2007).

Penetrasyon, fajın kuyruk kısmındaki protein kılıfın kasılarak kuyruk tüpünün hücre duvarına girmesi olayıdır. ATP'nin yardımıyla genetik materyalinin sokulması sonucu, kuyruğunun kasılması gerçekleşir. Kuyruk tüpünün membran yüzeyine kadar girdiği düşünülmektedir. Bu aşama, faj gruplarına göre değişiklik göstermektedir. *Myoviridae*, kuyruğunun şırınga benzeri hareketini kullanarak genetik materyalini bakteri hücrelerine yerleştirirken, kuyruk kısmından yoksun olan *Podoviridae* fajı, küçük, diş benzeri kuyruk liflerini kullanarak bakteri peptidoglukanı enzimatik olarak parçaladıktan sonra genetik materyalini ekler (Sharma vd., 2017; Tunail, 2009; Chibeu, 2013). Faj genom enjeksiyonu, iki aşamada gerçekleşmektedir. Genomun yaklaşık yarısının çıkarıldığı birinci aşama basınçla gerçekleşirken, genomun tamamen içeri girdiği ikinci aşama proteinle tetiklenen bir enjeksiyon sürecidir. Enjeksiyon bittiğinde açılan bölgeler bakteri tarafından onarılmaktadır (Roos vd., 2007; Tunail, 2009).

### **2.7.1.3 Faj genomunun replikasyonu**

Farklı bakteriyofajların genom uzunluklarında büyük farklılıklar vardır. Enjeksiyondan sonra bakteriyel metabolik mekanizma, faj tarafından kendi genetik materyalinin (DNA veya RNA) birden fazla kopyasını oluşturmak için kullanılır. DNA virüsleri, kendilerini

doğrudan mRNA (haberci RNA) moleküllerine kopyalar ve daha sonra konak hücrenin ribozomlarını yönlendirmek için harekete geçer. RNA virüsleri söz konusu olduğunda ise reverse transkriptaz enzim, viral RNA'yı DNA'ya kopyalar ve daha sonra viral RNA'nın transkripsiyonu için DNA virüsünün yolunu izler (Roos vd., 2007).

#### **2.7.1.4 Yeni kapsidlerin oluşumunda rol oynayan faj proteinlerinin sentezi ve montajı**

İlk aşamada güçlü faj promotörleri, konakçı bakteri RNA polimerazı tarafından tanınır ve erken aşama proteinler sentezlenir. Bu genler, konakçı bakteri proteazını kısıtlar, restriksiyon enzimlerini bloke eder ve çeşitli makro moleküllerin sentezini sonlandırır. Bu enzimler arasında endonükleazlar ve RNA polimeraz'ın modifikasyonunda yer alan faktörler vardır. RNA polimeraz, faj genlerinin transkripsiyonunu bakterininkine tercih eder. Ardından, yeni faj DNA'sını sentezleyen ürünler ve faj partiküllerinin bileşenini kodlayan geç proteinlerin sentezi yapılır. Burada, üç çeşit geç proteinin eş zamanlı olarak sentezi gerçekleşir. Geç proteinler; vironu bir araya getirmek için gerekli olan proteinler (1), baş, kuyruk ve kuyruk lif proteinleri (2) ve hücre lizizinden sorumlu proteinleri (3) içerir. Geç sentez başladığında, başlıklar ve kuyruklar ayrı yollarda bir araya gelir. Başlangıçta boş olan baş, faj tipine bağlı olarak DNA ile dolar ve paketlenme, genellikle belirli diziler tanındığında ya da kafa dolu olduğunda sona erer. Daha sonra, bulaşıcı vironlar oluşturmak için kuyruklar birleşir. Taban plakaları ve kuyruk sivri uçları, önce ayrı bir kuyruğa monte edilmek yerine doğrudan başın altına tutunurken, DNA'nın hücre duvarından bakteri hücreğine geçmesine yardımcı olan diğer proteinler, başın içine yerleştirilirler (Kutter ve Sulakvelidze, 2005). Bunlar, hücre duvarını parçalayan endolizin enzimi ile birlikte holin proteindir. Sitoplazmik membranda gözenekler oluşturmak için uygun bir seviyeye ulaşana kadar hücre içinde birikirler (Hendrix, 2002).

#### **2.7.1.5 Kopyalanmış faj genomunun paketlenmesi**

Faj elemanları aynı anda hazır hale geldiklerinde ilk olarak faj DNA'sının kapsitte paketlenmesi gerçekleşir. DNA, prokapsidler adı verilen önceden birleştirilmiş ikosahedral protein kılıflara paketlenir. Çoğu fajda, bunların birleşmesi spesifik yapı iskeleti proteinleri ile ana yapısal proteinler arasındaki karmaşık etkileşimleri, ardından hem yapı iskeletinin hem de ana kafa proteinlerinin N-terminallerinin proteolitik

bölünmesini içerir. Paketleme sırasında veya öncesinde kafa genişler ve DNA'nın artan iç hacmi ile birlikte daha stabil hale gelir. DNA'nın paketlenmesi konsantrasyonlar nispeten sabittir (~500 ng/mL civarındadır) (Roos vd., 2007; Kutter ve Sulakvelidze, 2005; Tunail, 2009).

Viral birleşmenin en sıra dışı yönlerinden biri, çok uzun olan DNA molekülünün son derece stabil yerleştiği halde, enfeksiyon süreci başladığında DNA'nın hızlıca ve karışmadan çıkmasına izin veren bir şekilde prokapsid içine paketlenmesidir (Kutter ve Sulakvelidze, 2005).

### **2.7.1.6 Hücre lizisi ve yeni faj partiküllerinin salınması**

Montaj aşamasından sonra birinci aşamada olgun fajlar, hücreyi parçalayarak dışarı salınırlar. Konakçı bakterilerin parçalanma zamanlaması, iki bileşenli bir lizin-holin sistemi kullanılarak sıkı bir şekilde kontrol edilir. Lizin, peptidoglikandaki bağlanma bölgelerini parçalayan bir enzimdir. Holin ise peptidoglikanın lizine zamanında ulaşmasına izin vermek için iç zardaki gözenekleri oluşturan bir proteindir (Chibeu, 2013; Tunail, 2009). Bakteriyofaj lizinleri, bakteriyel peptidoglikanı spesifik olarak hedefleyen ve viral progeninin hücreden çıkışını kolaylaştıran, enfeksiyon sürecinde üretilen enzimlerdir. Neredeyse tüm dsDNA fajları, şeker bağlarını hedefleyen lizozimler, peptid bağlarını hedefleyen endopeptidazlar veya amid bağları üzerinde etkili amidazlar olan, bakteriyel peptidoglikana saldıran enzimler geliştirmiştir. Genel olarak muralitik enzimler veya endolizinler olarak adlandırılan bu litik enzimler, sitoplazma içinde üretilirler ve substratlarına ulaşmak için sitoplazmik zarı geçmelerini sağlayacak başka bir enzime ihtiyaç duyarlar. Bu enzim, zarı bozan ve lizinin peptidoglikanı indirgemesine izin veren bir holindir. Bu şekilde holin, hücre lizisinin zamanlamasını ve yeni fajların salınımı kontrol eder (Hanlon, 2007).

Hücre duvarının desteğinden yoksun kalan hücre, sitoplazma ve çevreleyen ortam arasındaki ozmotik basınç farkı nedeniyle patlar ve yeni fajların enfekte olacak yeni bir hücre bulmak için etrafa salınmasına izin verir (Hendrix, 2002). Enfeksiyonun ilk aşamasında, patlama sonrası 50-200 yeni faj etrafa yayılabilir. Bu durum, hücrenin neredeyse tüm kaynaklarını gerektirdiği için hücrenin zayıflamasına ve patlamasına neden olur. Başka bir deyişle, lizis ile konakçı bakteri hücrelerinin ölümü gerçekleşir

(Ngene vd., 2020). Holin-endolizin sistemi, karmaşık fajlar arasında görünüşte evrensel olmasına karşın, tek sarmallı dairesel DNA fajları (*Microviridae*) ve tek sarmallı RNA fajları gibi daha basit litik fajlar tarafından kullanılmaz. Bu virüsler için liziz, fajla kodlanmış bir muralitik aktiviteye sahip olmayan tek bir gen tarafından gerçekleştirilir (Wang, 2006).

### 2.7.2 Lizojenik döngü

Lizojenin doğası, 1915'te Felix D'Hérelle tarafından bakteriyofajların keşfinin ardından yıllarca çözülmeden kalmıştır. Virüsün bakteri kültürlerinde aniden ortaya çıkmasının ilk başta viral kontaminasyon sonucu olduğu düşünülmekteydi. Ancak, lizojeninin gerçek bir olgu olarak kabulü neredeyse 40 yıl sonra gerçekleşmiştir. Lizojenide yeni virüs parçacıkları yapılmaz. Bunun yerine virüs, genetik materyalini üretmeye devam etmektedir (Brigham vd., 2003).

Lizojenik (temperate) döngüde bakteriyofajlar, bakteri hücresine tutunur ve kendi genomunu bakteri hücresi içine enjekte eder. Faj genomu, konakçı bakterinin kromozomuna entegre olur ve konakçı hücre DNA'sının bir parçası haline gelerek bakteri DNA'sı ile birlikte çoğalır. Fajın konakçı genomuna katılmış olduğu bu forma, profaj denir. Bu hayat devri, lizojenik hayat döngüsü olarak adlandırılır. Profaj DNA, konakçı hücre genomuna kopyalandığından yavru hücreler, viral DNA'yı miras alır. Lizojenik konakçı bakteri, olumsuz çevresel koşullar altında litik döngüye girene kadar birçok nesil boyunca profajı taşıyabilir. Bir lizojenik hücre, mutajenik ajanlarla örneğin ultraviyole ışığa, mitomisin C ile yüksek sıcaklık veya strese maruz bırakıldıklarında indüklenerek lizojenik döngüden litik döngüye geçiş yapabilir. Bu süreçte profaj, hem kendi genlerinin transkripsiyonunu bloke eden baskılayıcı proteinin hem de yakından ilişkili bakteriyofajların sentezini yönetir. Profaj, litik döngüyü başlatır. Bunun sonunda yeni oluşan fajlar, parçalanmış konakçı hücreden salınırlar (Strauch vd., 2007; Hanlon, 2007).

Litik ve lizojenik enfeksiyon dışında filamentöz bakteriyofajlar, konakçı hücrede tahribata neden olmadan hücre duvarından ekstrüzyon yoluyla kaçabilirler ve bu süreçte viral partiküllerin salınması devam eder (Chibeu, 2013; Harper ve Enright, 2011; Hanlon, 2007). Lizojenik hayat devri süren ılımlı fajlar, konakçı genomuna entegre olduklarından konakçıda bazı durumlarda fenotipik değişimlere ve hatta profaj virülant gen taşıyorsa,

bakteri patojenitesi veya virülanslığının artmasına bile neden olabilmektedirler (Kutter ve Sulakvelidze, 2005). Bu işlem sırasında profaj DNA'sına bitişik bakteri genleri, enfektif faj DNA'sına dahil edilebilir ve devamında, bir sonraki konak hücreye aktarılabilirler. Bu süreç, transdüksiyon olarak bilinir ve genlerin bir bakteri hücresinden diğerine yatay transferinden sorumludur. Lizojenin konakçı bakteri için de faydası vardır. Virülans genlerin örnekleri arasında, konakçıya bağlanma, istila ve hayatta kalma için olanların yanı sıra toksin kodlayan bir gen içeriyorsa toksine sahip olmak, replikasyon stratejilerinin bir parçası olarak enfeksiyon oluşturan bakteriler için avantajlı olabilir. Transdüksiyonla elde edildiği bilinen önemli toksin genleri arasında *Clostridium botulinum* nörotoksini, *Corynebacterium diphtheriae*'nin difteri toksini, *Escherichia coli* O157'de bulunan Shiga toksinleri ve *Vibrio cholerae*'deki kolera toksini bulunmaktadır. Bu nedenle ılıman fajlar, faj terapisi için çok uygun değildirler. Litik fajlar, bakteriyi lize ettiklerinden ve genellikle daha geniş konakçı spesifikliğine sahip olduklarından patojenlere ve bozulma etmeni bakterilere karşı biyokoruyucu amacıyla kullanıma daha uygundur (Maura ve Debarbieux, 2011; Hanlon, 2007).

Lizojeni süreci, en yoğun olarak lambda olarak adlandırılan bir bakteriyofajda incelenmiştir. Lambda bakteriyofajında lizojen oluşumu, üç viral proteinin varlığına bağlıdır. Bunlar CI, CII ve CIII olarak adlandırılır. İlk olarak CI proteini, viral DNA'nın konakçı bakteriye girişini takiben, viral DNA'da bulunan protein için bilgileri yorumlayan konakçı moleküller kullanılarak üretilir. Bu noktada viral DNA, konakçı genomuna entegre değildir ancak serbest bir daire olarak bulunur (Hanlon, 2007; Brigham vd., 2003). CI, yeni virüs partiküllerini bir araya getiren çeşitli viral proteinleri üretmek için kullanılacak olan viral genom üzerindeki dizileri işgal etmeye çalışan sözde baskılayıcı bir proteindir. CI bu bölgeleri işgal ederek viral proteinlerin üretilmesini engeller. Hemen hemen aynı zamanda viral DNA, konakçı DNA'ya entegre olur ve CII ile CIII proteinleri üretilir. Bu son proteinler, viral bileşenlerin sentezini bloke etme görevinde CI'ye yardımcı olurlar. Yani bu proteinler, lizojenik durumun devam etmesini sağlarlar. CII proteini, konakçının transkripsiyon mekanizması tarafından CI üretimini daha verimli hale getirme işlevi görür. CII'nin kararlılığı, hücrenin enerji seviyesini ölçen faktörler tarafından belirlenir. Yeterli enerjiye sahip hücre, çok az cAMP'e sahiptir. Hücre enerji açlığı çektiğinde (hücre içi glikoz seviyesi düşük) ise cAMP konsantrasyonu yüksektir. Yüksek düzey cAMP, CII stabilizasyonunu ve dolayısı ile lizojeni destekler. CIII

proteini, CII proteininin konakçı enzimler tarafından parçalanmasını önlemeye yardımcı olur (Brigham vd., 2003; Kutter ve Sulakvelidze, 2005).

Lizojen oluşturulduktan sonra devam eden CI proteini üretimi, viral DNA'nın entegre durumunu korur. CI proteini, kendi transkripsiyonunu sürdürür. CI'in belirli bir DNA parçasına bağlanması, CI proteinini üretmek için genin tanınmasını ve kullanılmasını sağlar. Bu, pozitif kontrol olarak bilinir. Aynı zamanda protein, başka bir proteinin (CRO) negatif kontrolü olarak kullanılır. Negatif kontrolde CI'in DNA'nın bir bölgesine bağlanması, CRO genini tanınmasını ve CRO proteininin üretimini önler (Brigham vd., 2003).

## **2.8 Bakteriyofaj Direnç Sistemleri**

Bakteriler, sürekli olarak maruz kaldıkları faj saldırılarına karşı hayatta kalabilmek için yaşam döngülerinin herhangi bir aşamasında etkili olan mekanik olarak çeşitli savunma stratejileri geliştirmişlerdir (Seed, 2015). Bakteriler, faj adsorpsiyonunun önlenmesi (faj reseptörlerinin bloke edilmesi, hücre dışı matris üretimi, rekabetçi inhibitörlerin üretimi), faj genomlarının enjeksiyonunun engellenmesi, restriksiyon-modifikasyon sistemleri ve abortif enfeksiyon sistemleri dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar yoluyla fajlara karşı direnç mekanizmaları geliştirebilirler (Labrie vd., 2010; Lu ve Koeris, 2011). In vitro şartlardaki kültürel çalışmalar, faj direncinin saatler hatta günler arasında gelişebildiğini göstermiştir. Bakteriyofaj direnç sistemlerinin oluşmasındaki en önemli sorunlarından biri, faja dirençli bakteriyel patojenlerle karşılaşma veya faja duyarsız bakteri suşlarının ortaya çıkması riskidir. Bu nedenle faj direnci, hem doğal hem de insan yapımı çeşitli ekolojik ortamlarda çok önemli bir hayatta kalma fenotipidir. Faj karışımları (kokteyl), bu problemle başa çıkmak için kullanılan geleneksel yöntemlerinin başında gelmektedir (Lu ve Koeris, 2011).

### **2.8.1 Faj adsorpsiyonunun önlenmesi**

Faj proteinleri ve bakteriyel hücre yüzeyindeki reseptörler arasındaki spesifik etkileşimler yoluyla bakteriyel konakçılara fajların adsorpsiyonu, enfeksiyonun ilk adımıdır. Lipopolisakkaritler (LPS), kapsüler polisakkaritler, flagella ve dış zar proteinleri dahil olmak üzere çeşitli reseptörlerin varlığı tespit edilmiştir. Bir savunma

stratejisi olarak bakteriler, faj absorpsiyonunu önlemek için bu hücre yüzeyi reseptörlerinin mutasyon yoluyla reseptör yapısını değiştirebilirler, rekabetçi inhibitörler üretebilirler veya reseptörleri ek bir fiziksel bariyerle gizleyebilirler. Bu adsorpsiyon-bloke edici mekanizmalar, en az üç kategoriye ayrılabilir: faj reseptörlerinin bloke edilmesi, hücre dışı matris üretimi ve rekabetçi inhibitörlerin üretimi. Örneğin; *Pseudomonas fluorescens* SBW25, 300'den fazla bakteri nesli boyunca litik faj phi2 ile birlikte gelişmiştir. Bu birlikteliğin muhtemelen, bakteriyel reseptörlerin ve faj reseptör bağlayıcı proteinlerin sürekli modifikasyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir (Le vd., 2014; Labrie vd., 2010; Seed, 2015).

*Faj reseptörlerinin bloke edilmesi:* Bakteriler, faj yayılmasını sınırlamak için hücre yüzey reseptörlerinin yapısını veya üç boyutlu konformasyonunu değiştirebilirler. Yüzey reseptörlerinin ifadesi, rekabet eden fajlar tarafından da değiştirilebilir. Patogenez ve biyofilm oluşumunda önemli olan *P. aeruginosa* tip IV pilusun (TFP) mevcudiyeti lizogenik dönüşüm ile modüle edilebilir (Labrie vd., 2010).

*Hücre dışı matris üretimi:* Ekzopolisakkaritler hücre dışına salgılanan polisakkaritlerdir. Bakterileri zorlu çevre koşullarına karşı koruyarak ve bazı durumlarda fajlar ve reseptörleri arasında fiziksel bir bariyer oluşturarak fajın bakteriye erişimini önlerler. Bazı fajlar da bu hücre dışı polimerleri özel olarak tanımak ve hatta onları parçalamak için evrimleşmiştir. Fajlar, bu yapıları çeşitli enzim sistemleri ile parçalayabilirler. Polisakkarit parçalayıcı enzimler iki gruba ayrılırlar: hidrolazlar (polisakkarazlar olarak da bilinirler) ve liyazlar. Liyazlar, monosakkarit ile üronik asidin C4'ü arasındaki bağı koparır ve üronik asidin C4 ve C5'i arasında bir çift bağ oluşturur. Hidrolazlar, glikozidik bağdaki glikozil-oksijen bağı koparır. Bu viral enzimler ya faj yapısına bağlı (reseptör bağlama kompleksine bağlı) ya da parçalanmış bakteri hücrelerinden serbest çözünür enzimler olarak bulunabilmektedir (Orzechowska ve Mohammed, 2019; Labrie vd., 2010).

*Rekabetçi inhibitörlerin üretimi:* Bakteri ortamında doğal olarak bulunan moleküller, faj reseptörlerine spesifik olarak bağlanarak bu reseptörleri fajlar için kullanılamaz hale getirirler (Labrie vd., 2010).

### **2.8.2 Faj DNA girişini önleme**

Süper enfeksiyon dışlama sistemleri, faj DNA'sının konakçı hücrelere girişini engelleyen ve böylece spesifik fajlara karşı bağışıklık sağlayan proteinlerdir. Bu proteinlerin, zara sabitlendiği veya zar bileşenleriyle ilişkili olduğu tahmin edilmektedir. Bu proteinleri kodlayan genler, genellikle profajlarda bulunurlar. Bu da birçok durumda Süper enfeksiyon dışlama sistemlerinin faj-konak etkileşimlerinden ziyade faj-faj etkileşimleri için de önemli olduğunu düşündürmektedir. Uygun bir yüzey reseptörüne bağlandıktan sonra süper enfeksiyon dışlama sistemleri, konakçı hücrelerde faj DNA enjeksiyonunu bloke etme işlevi görebilir. Süper enfeksiyon dışlama sistemleri tipik olarak faj kodludur ve lizojenize edilmiş bir konağı, genellikle yakın ilişkili fajların enfeksiyonundan korumak için hareket eder. Sadece birkaçı karakterize edilmiş olmasına rağmen birçok farklı süper enfeksiyon dışlama sistemi tanımlanmıştır (Labrie vd., 2010; Seed, 2015).

### **2.8.3 Restriksiyon modifikasyon sistemleri**

Çoğu bakteri türü, restriksiyon-modifikasyon (R-M) sistemlerine sahiptir. Bu sistem iki aktiviteden oluşmaktadır. Bunlar; gelen yabancı genetik materyalinin kısıtlanması ve konakçı genetik materyalinin kısıtlamadan korunmasıdır. R-M sisteminin temel işlevinin hücreyi, virüsler de dahil olmak üzere istilacı DNA'ya karşı korumak olduğu düşünülmektedir (Seed, 2015). Hücre DNA'sının metilasyon yoluyla modifikasyonu DNA'yı korumaktadır fakat faj DNA'sında modifikasyon olmaması, onu endonükleazlar tarafından restriksiyona duyarlı hale getirmektedir (Loenen vd., 2014). Metillenmemiş faj DNA'sı, R-M sistemini barındıran bir hücreye girdiğinde ya restriksiyon enzimi tarafından tanınır ve hızla bozulur ya da daha düşük bir ihtimalle restriksiyonu önlemek için bir bakteriyel metilaz tarafından metillenir. Bu da, fajın litik döngüsünün başlamasına yol açar. Restriksiyon enzimi genellikle metilazdan daha aktif olduğundan, konakçıya giren faj DNA'sı genellikle parçalanır. Ancak konakçı DNA, her zaman metilaz aktivitesi ile korunur. Bu R-M sistemleriyle başa çıkmak için fajlar, birkaç anti-restriksiyon stratejisi geliştirmişlerdir. Bu stratejilerden biri, nokta mutasyonlarının birikmesi yoluyla genomlarında endonükleaz tanıma bölgelerinin olmamasıdır. Restriksiyon önleme sisteminin belki de en çarpıcı örneği, faj T4'te bulunmaktadır. Bu öldürücü fajın genomu, konakçı DNA'da bulunan sitozin yerine olağandışı bir baz olan hidroksimetilsitozini (HMC) içerir. Bu modifikasyon, faj T4 DNA'sının sitozin içeren spesifik dizileri tanıyan

R-M sistemlerine karşı geçirimsiz olmasına izin vermektedir (Stern ve Sorek; 2011; Labrie vd., 2010).

#### **2.8.4 Abortif enfeksiyon**

Şimdiye kadar açıklanan faj direnci stratejilerinin tümü, viral tehlikelerle karşı karşıya kalan bakteri hücrelerinin hayatta kalmasıyla sonuçlanmaktadır. Buna karşılık, abortif enfeksiyon (Abi) sistemleri, hücrenin ölümüne (intihar) yol açar. Böylece, faj yayılmasını sınırlar (Samson vd., 2013; Stern ve Sorek; 2011). Abi sistemleri genellikle profajlar ve plazmitler dahil olmak üzere mobil genetik elemanlar tarafından kodlanırlar. Bu sistemler mekanik olarak çeşitlidirler ve yeni virüslerin üretimini azaltmak veya ortadan kaldırmak için faj gelişiminin herhangi bir aşamasında harekete geçebilirler (Seed, 2015). Tipik olarak Abi sistemleri, replikasyon, transkripsiyon veya translasyon gibi önemli faj çoğaltma adımlarını hedeflerler. Sıklıkla Abi'ye, bir plazmit veya bir profaj üzerinde kodlanan ve bilinen herhangi bir proteine çok az veya hiç homoloji göstermeyen tek bir gen aracılık etmektedir. Bazı Abi genlerinin DNA replikasyonunda rol oynayan faj genlerini hedeflediği belirtilmiştir. Abi sistemleri üzerine çalışmalar, 50 yıldan fazla bir süre önce başlamıştır. Günümüzde bile, kısmen karmaşık oldukları ve kısmen de faj biyolojisindeki bilgi boşluklarından dolayı eylem biçimleri hala tam olarak anlaşılabilir değildir (Labrie vd., 2010; Stern ve Sorek; 2011).

#### **2.9 Bakteriyofajların Gıda Endüstrisinde Biyokoruyucu Olarak Kullanılması**

Modern teknolojiye paralel olarak gelişen üretim teknikleri, kalite kontrol, hijyen, hayvan yetiştiriciliği, bitkisel üretim, tüketici talepleri ve yaşam tarzındaki değişiklikler ve artan uluslararası ticaretten dolayı gıda güvenliği standartları, sürekli değişmektedir (Rocourt vd., 2003). Gıdalardaki mikroorganizmaların gelişmesini önlemekteki en etkili yöntemler; hijyenik üretim, akıllı üretim hattı, iyi tasarlanmış alet-ekipman ve bilinçli dezenfektan kullanımıdır (Maukonen vd., 2003). Gıda kaynaklı patojenler, uygun olmayan koşullarda gerçekleştirilen hasat, işleme, depolama, paketleme ve dağıtım işlemleri sırasında gıda ile temas halinde olabilmektedir. UV ışık, yüksek basınç uygulamaları, kuru ısı, buhar gibi fiziksel uygulamalar ve kimyasal koruyucular çiğ ürünlerdeki patojen bakteri sayısının azaltılmasında kullanılabilirler. Ancak, fiziksel ve kimyasal metotların organoleptik özellikler

üzerine olumsuz etkileri ve artan tüketici bilinci, bu tür yöntemlerin kullanımını sınırlamaktadır. Bu nedenlerden dolayı günümüzde gıda güvenliğini sağlayan, gıdanın duyuusal özelliklerini olumsuz yönde etkilemeyen ve insan sağlığı üzerine herhangi bir olumsuz etkisi olmayan doğal koruyuculara, özellikle biyokoruyuculara olan talep artmaktadır. Gıdaların raf ömrünü ve güvenliğini arttırmak amacıyla bakteriyofajların, laktik asit bakterilerinin veya bunların ürettiği inhibitör maddelerin kullanılmasına biyokoruma tekniği denilmektedir (Devlieghere vd., 2004; García vd., 2008).

Son yıllarda gıda endüstrisinde biyokoruyucu olarak bakteriyofajların kullanımı, giderek artmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi-USFDA, 2006 yılında *Listeria*'ya spesifik bakteriyofaj içeren Listsheld™ (eski adı LMP-102)'in tüketime hazır gıdalarda, 2007 yılında ise "Listex™ P100 (faj P100)'ün peynir ve et ürünlerinde kullanımına onay vermiştir. *E. coli* O157:H7'ye karşı aktif olan ve üç farklı bakteriyofajdan oluşan EcoShield™ faj kokteylinin kırmızı ette kullanımına ve kesim işlemlerinden önce canlı hayvanlara uygulanmasına da USFDA tarafından izin verilmiştir (Cooper, 2016; Lacroix, 2010). *Salmonella enterica*'ya karşı enfektif olan SalmFresh™, gıdalarda kullanımına izin verilen bir diğer bakteriyofaj kokteylidir (Garcia vd., 2010).

Fajlar, gıda güvenliğinin sağlanmasında ve gıdaların raf ömürlerinin uzatılmasında geleneksel yöntemlere çok uygun bir alternatif olma potansiyeline sahiptirler. Fajların meyve-sebze, süt, kanatlı eti ve kırmızı et ürünlerinde *P. aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. ve *Campylobacter jejuni* gibi patojen bakterilerin ve bozulma etmeni bazı bakterilerin gelişmelerini başarılı bir şekilde önledikleri birçok araştırmacı tarafından belirtilmiştir (Greer, 2005; Hudson vd., 2005; Rees ve Dodd, 2006).

Fajlar, toksik değildirler. Fajların konakçı hücrelerini tanımaları çok spesifik olduğundan hedef bakteriler haricinde diğer bakterilere ve hücrelere karşı etkili değildirler. Eldeki mevcut tüm deliller, yüksek konsantrasyonda oral yolla tüketilmelerinde dahi insanlara zararsız olduklarını göstermektedir. Tıbbi olarak fajların kullanımı sonucunda herhangi bir yan etkiye neden olmadıkları spesifik araştırmalarla ortaya konulmuştur (Hagens ve Loessner, 2010; Carlton vd., 2005). Gönüllü insanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, *E. coli*'yi enfekte eden T4 kolifajının  $10^5$  pob/mL düzeyinde içme suyuna ilave edilerek kullanılması durumunda hiçbir yan etkinin oluşmadığı gözlenmiştir (Bruttin ve Brüssow,

2005). Fajların güvenli olduğunu kanıtlayan diğer bir delil ise doğada ve özellikle gıdalarda, sindirim sistemimizde ve sularda yaygın olarak bulunmaları gösterilebilir (Hagens ve Loessner, 2010).

Son zamanlarda antibiyotiğe dirençli patojen bakterilerin sayısının çok hızlı bir şekilde artması, bakteriyofajların antibiyotiklere alternatif olarak kullanılabilirliğini gündeme getirmiş ve faj terapisine olan ilgi artmıştır (Harper ve Enright, 2011; Samal ve Nath, 2015).

Güvenli gıda uygulamalarında fajların, aşağıdaki amaçlar doğrultusunda kullanılacağı araştırmacılar tarafından ortaya konmuştur (García vd., 2008; 2010):

1. Biyosanitasyon ajanı olarak karkaslar ile taze meyve-sebze gibi çiğ ürünlerin dezenfekte edilmesinde,
2. Biyosanitasyon ajanı olarak alet-ekipman yüzeylerinin dezenfeksiyonunda,
3. Bozulabilir gıdaların üretiminde biyokoruyucu olarak,
4. Gıda kaynaklı patojen bakterilerin kontrolünde biyokorucu olarak,
5. Hayvanlarda bakteriyal enfeksiyonların kontrolü ve önlenmesinde faj terapisi olarak kullanılma potansiyeline sahiptirler.

Endüstriyel gıda üretimi süresince gıdadaki mikrobiyal kolonizasyonu azaltmak amacıyla fajlar, doğrudan gıda yüzeyine (örneğin; etler, taze meyve-sebzeler) uygulanabildikleri gibi gıda içine (örneğin; işlenmiş gıdalar, çiğ süt) ilave edilerek de kullanılabilirler. Deneysel veriler, fajların aktif olarak büyüyen bakterilere ve hatta etkinliğini kaybetmiş büyümeyen bakterilere karşı bile çok etkili olduklarını göstermektedir (Snyder ve Champness, 2007).

Konakçı bakteriyi 1°C gibi düşük sıcaklıklarda bile parçalamaları, buzdolabında muhafaza edilen gıdalarda patojen ve bozulma etmeni bakterilerin (özellikle psikrofil/psikrotrof bakterilerin) gelişimini sınırlamaları ve oda sıcaklığına alınan gıdalarda bakteriyel üremeyi kontrol etmeleri, fajların mükemmel bir gıda biyokoruyucu ajanı olduğunu göstermektedir (Greer, 1982; Greer, 1988; Bigwood vd., 2008).

Gıda endüstrisinde gıda kaynaklı patojen bakterilere karşı biyokoruma amacıyla kullanılacak bakteriyofajların aşağıda belirtilen özelliklere sahip olmaları gerekmektedir (Hagens ve Loessner, 2010).

1. İnhibitör spektrumu geniş olmalı, aynı tür veya cins'te bulunan tüm bakteriler üzerinde etkili olmalı,
2. Litik (virülant) olmalı,
3. Patojen olmayan suşların çoğalmasını sağlamalı,
4. Tam genom dizisi bilinmeli,
5. Viral olmayan DNA'yı (örneğin; bakteri DNA parçası) transduksiyonla aktarma mekanizmasından yoksun olmalı,
6. Alerjiye veya patojeniteye neden olan proteinleri kodlayan genlerden yoksun olmalı,
7. Ağızdan alımla ilgili yapılan çalışmalarda herhangi bir yan etki göstermemeli,
8. GRAS statüsünde olmalı,
9. Gıda işleme aşamalarına ve depolamaya dayanıklı olmalı,
10. Ticari boyutta üretimi mümkün olmalıdır.

Yukarıda da ifade edildiği üzere, *P. aeruginosa* doğada yaygın olarak bulunan bir bakteri olduğundan söz konusu bakteriyofajların da doğada yaygın olarak bulunabileceği kanısına varılabilir. Yurt dışında yapılan çalışmalarda birçok araştırmacı, kanalizasyon suları, atık sular, havuzlar, nehirler, karkas yüzeyleri, biftekler, toprak ve klinik örnekler gibi çok değişik ortamlardan *Pseudomonas* fajlarını izole ettiklerini belirtmişlerdir (Lopez vd., 2015; Hu vd., 2016; Samal ve Nath, 2015; Kumari vd., 2009a; Greer, 1982). *P. aeruginosa*'ın tavuk karkaslarının bozulmalarında büyük bir rol oynadığı bilinmektedir (Arnout-Rollier vd., 1999; Franzetti ve Scarpellini, 2007; Lopez vd., 2015).

## **2.10 *Pseudomonas aeruginosa*'nın Bakteriyofajlar Aracılığı ile Kontrolü**

Faj biyokontrolünün birçok avantajı vardır. Bu avantajlar; uygulama nispeten kolaydır, nispeten düşük maliyetlidir, daha büyük ekolojik sistemleri rahatsız etmez ve insanlar, hayvanlar ve bitkiler için güvenlidir (Kurtböke, 2012). Faj biyokontrolünün başarısını birkaç faktör etkileyebilir. Bunlar;

1. Hedef patojen popülasyonunun bulunduğu yer,
2. Uygulanan ekosistemlerde faj partiküllerinin kararlılığı, bozulması ve difüzyonu,
3. Faj uygulamasının zamanlaması,
4. Faj konakçı aralığı ve faja dirençli konakçı türevlerinin ortaya çıkışı,
5. Hedef bakterilerin yoğunluğu ve uygulanan fajlardır.

Etkili bir faj biyokontrolü için en uygun koşullar, her patojen-konakçı sistem için belirlenmelidir.

*Pseudomonas* bakteriyofajlarının gıda sistemlerinde antimikrobiyal ajan olarak kullanımına ilişkin çok fazla çalışmaya rastlanmamıştır. Yapılan bir çalışmada 13 farklı *Pseudomonas* bakteriyofajından oluşan faj kokteyli, *Pseudomonas* spp.'leri ile inoküle edilmiş UHT sütlere uygulandığında *Pseudomonas* sayısında 2 log'luk, çiğ süte uygulandığında ise toplam bakteri ve psikrotrofik bakteri sayısında 1 log'luk azalmaya neden olduğu belirtilmiştir. Sonuçlar, 13 fajın çiğ sütte biyokoruyucu ajan olarak uygulanma potansiyeline sahip olduğunu açığa çıkarmıştır (Hu vd., 2016).

O'Flynn vd. (2004) tarafından yapılan bir çalışmada, e11/2, e4/1 ve pp01 olmak üzere üç litik fajdan oluşan bir faj kokteylinin, deneysel olarak kontamine edilmiş et yüzeyindeki *E. coli* O157:H7'yi azaltma yetenekleri değerlendirilmiştir. Fajların, test edilen dokuz numunenin yedisinde bakterileri tamamen inhibe ettiği belirtilmiştir. Tavuk karkasları üzerine yapılan bir başka çalışmada, yaklaşık olarak  $10^4$  kob/cm<sup>2</sup> *Campylobacter jejuni* ile inoküle edilen tavuk derisi parçalarına bakteriyofaj uygulanmış ve uygulama sonrası, yüzeyi kaplayan *Campylobacter* sayısında yaklaşık olarak %95 oranında bir azalma olduğu bildirilmiştir. Kontamine tavuk yüzeylerindeki *C. jejuni* sayısını azaltmada fajların verimliliğini belirleyen başka bir çalışmada ise yüksek konsantrasyonda ( $10^7$  pob/mL) uygulanan  $\phi$ 2 fajının donmuş tavuk yüzeylerindeki *C. jejuni* sayısını azaltmada daha etkili olduğu araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (Chibeu, 2013).

*P. aeruginosa*, yüzeylerde biyofilm oluşturabilme özelliğine sahiptir. Yüzeylerde *P. aeruginosa* biyofilm büyümesini engellemek ve enfeksiyonlarını tedavi etmek için bakteriler arası algılama bozulması (quorum sensing disruption), enzimatik dağılma, klorlama, yıkama ve UV dezenfeksiyonu gibi birçok yöntem uygulanmıştır. Bununla birlikte, biyofilmlere karşı tamamen etkili olabilecek bir strateji belirlenememiştir. Yuan

vd. (2019), *P. aeruginosa*'nın oluşturduğu biyofilmleri kontrol etmek için terapötik potansiyele sahip bakteriyofajların kullanılmasına dayanan çalışmalarında, litik *P. aeruginosa* bakteriyofajı olan vB\_PaeM\_LS1'ı izole ve karakterize etmişlerdir. Litik etkiye sahip vB\_PaeM\_LS1 bakteriyofajının *P. aeruginosa* biyofilm oluşumunun büyümesinin inhibisyonu üzerinde yüksek bir potansiyel etki gösterdiğini ortaya koymuşlardır (Yuan vd., 2019).

*Pseudomonas* fajlarının terapi amacıyla hayvanlara uygulandığında, *Pseudomonas* sayısını etkin bir şekilde azalttığı ve dolayısıyla *Pseudomonas* enfeksiyonunu önlediği yönünde birçok çalışma bulunmaktadır (Kumari vd., 2009b; Hawkinsa vd. 2010; Khairnar vd., 2013). Bakteriyofajlar, faj terapisi olarak hayvanlardaki patojen kolanizasyonunu azaltmak amacı ile kesimden hemen önce ya da hayvanların büyümesi sırasında kullanılabilirler. Bu amaçla yapılan birçok çalışma bulunmaktadır (Greer ve Dilts, 1990; Fiorentin vd., 2005; Penziner vd., 2021; Cafora vd., 2019).

## BÖLÜM III

### MATERYAL VE METOT

#### 3.1 Materyal

*Pseudomonas aeruginosa* izolasyonunda kullanılan selektif besiyerleri; Pseudomonas agar base (PAB) (Merck, Almanya), Pseudomonas CFC Suplementi (LabM X108), Pseudomonas Agar F (King B) (Liofilchem), Pseudomonas Agar P (King A) (BD)'dir. İzole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının geliştirilmesinde Nutrient Broth E (NBE) (LabM, Almanya) ve Nutrient Agar (NA), baktariyofaj üretiminde Luria Bertani (LB) sıvı besiyeri (LabM, Almanya) ve Luria Bertani agar (LBA) kullanılmıştır.

#### 3.2 Metot

##### 3.2.1 *Pseudomonas aeruginosa* izolasyonu için gıda örneklerinin toplanması

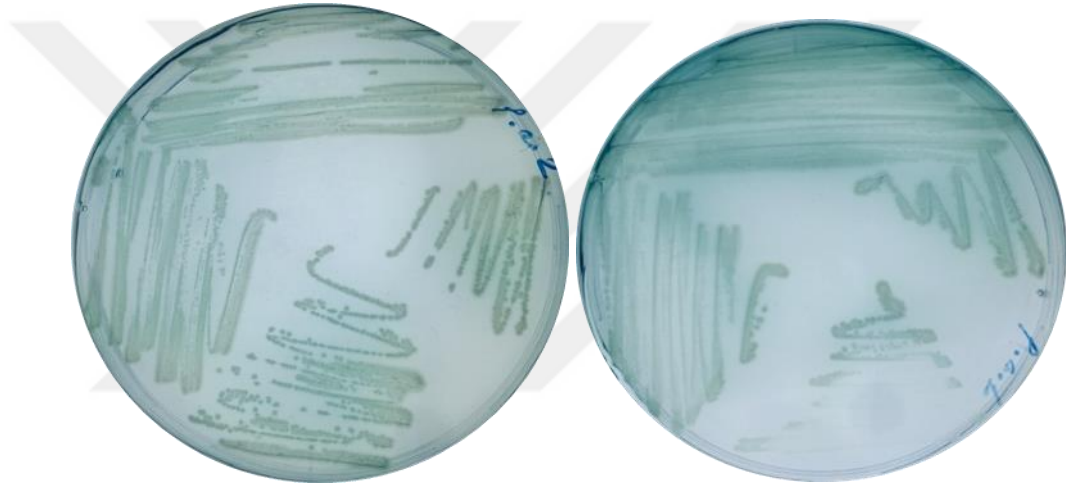
Çalışmamızın bakteri tarama aşaması, Mart 2017- Haziran 2019 tarihleri arasında Gümüşhane, Erzincan, Niğde ve Nevşehir illerinde yapılmıştır. Bu illerdeki çeşitli market, kasap ve kesimhanelerden toplanan 89 adet tavuk (tavuk göğsü, tavuk karkası, tavuk kanadı, kuşbaşı) ve kırmızı et (kıyım ve kuşbaşı), pazarlardan toplanan 20 farklı peynir örneği ve köylerden toplanan 35 farklı çiğ süt örneği ile birlikte toplamda 144 gıda örneği materyal olarak kullanılmıştır. Örnekler, tat-koku değişime neden olmayacak ve mikrobiyal yükleri etkilenmeyecek şekilde steril soğuk kaplarda (4°C) Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Gıda Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na getirilmiştir. *P. aeruginosa* izolasyonu, TS EN ISO 13720 Et ve Et Ürünlerinde Muhtemel *Pseudomonas spp.* sayımın'da belirtilen esaslara göre yapılmıştır (Url-1, 2011).

##### 3.2.2 Gıda örneklerinden *Pseudomonas aeruginosa* izolasyonu ve saflaştırılması

**İzolasyon işlemi:** Tavuk karkaslarının göğüs, bacak ve boyun yüzeylerinden, kıymanın ve etin çeşitli bölgelerinden aseptik koşullarda ve peynir örneklerinin rastgele bölgelerinden 25 g örnek alınıp steril stomacher poşetine konulmuş ve üzerine 225 mL fosfat tamponu ilave edilmiştir. Örnekler, stomacherde 2 dakika homojenize edildikten sonra  $10^{-4}$ 'e kadar seri dilüsyonlar hazırlanmış ve cephalothin-sodium fusidate-cetrimide

(CFC) ilave edilmiş Pseudomonas Selektif Agar Base (PSAB-CFC)'e ekim yapılmıştır. Sütlerden alınan örnekler ise homojenize edilip, ardından direkt olarak örnekten 1 mL alınarak  $10^{-4}$ 'e kadar seri dilüsyonlar hazırlanmış ve PSAB-CFC'ye ekim yapılmıştır. Ekim işleminin ardından  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 48 saat inkübasyon işlemine tabi tutulmuştur.

**Saflaştırma işlemi:** İnkübasyon işleminden sonra, her bir örnekten birkaç koloni rastgele seçilip Nutrient Agar (NA) ( $37^{\circ}\text{C}$ 'de 48 saat) kullanılarak saflaştırılmıştır (Şekil 3.1). Saflaştırma işlemi, iki gün aralıklar ile arka arkaya tekrarlanmıştır. Beşinci saflaştırma işleminin ardından bakteri kültürleri %20 gliserol içeren NB besiyerinde  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir.



**Şekil 3.1.** Pseudomonas Selektif Agar Base CFC'ye ekimi yapılan örnekler

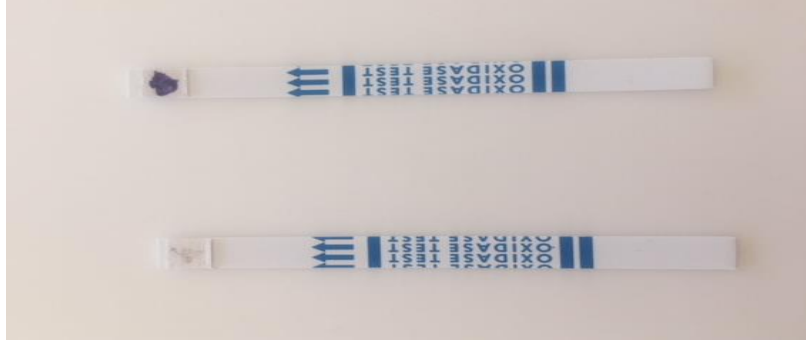
### 3.2.3 *Pseudomonas aeruginosa*'nın tanımlanması

#### 3.2.3.1 Morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testler

**Gram boyama:** Saflaştırma işlemini takiben seçilen izolatların 18-24 saatlik genç kültürleri, Gram boyama işlemine tabi tutulmuştur (Temiz, 2014). Gram negatif olan örneklerle çalışmaya devam edilmiştir.

**Oksidaz Testi:** NA besiyerinde saflaştırılan bakterilerden öze ile alınan koloniler N,N-dimethyl-1,4-phenylene diammonium chloride 0,1  $\mu\text{mol}$ ; 1-naphthol 1,0  $\mu\text{mol}$  içeren ticari oksidaz test striplerinin üzerine yayılıp 60 saniye içerisinde renk değişimi gözlenmiştir (Şekil 3.2). Reaksiyonu takiben pembe renk oluşturan koloniler oksidaz

negatif, mavi-mor renk oluşturan koloniler oksidaz pozitif olarak değerlendirilmiştir (Anonim, 2011). Oksidaz testi, *P. aeruginosa* için ayırt edici bir test olduğundan oksidaz pozitif örneklerle devam edilip negatif örnekler çıkarılmıştır.



**Şekil 3.2.** Oksidaz testi

**41°C’de üreyebilme yeteneği:** 41°C’de üreyebilme yeteneği, *P. aeruginosa* için önemli bir özellik olup *P. fluorescens*’dan ayırt edici bir özelliğidir (Şen ve Halkman, 2006). İzolatların 41°C’de büyüme yeteneği, NB sıvı besiyeri kullanılarak belirlenmiştir. İzolatlar, NB sıvı besiyerine inoküle edildikten sonra 41°C’de 36 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası tüplerde bulanık görüntü oluşumu pozitif kabul edilmiştir (Şekil 3.3) (Şen ve Halkman, 2006).



**Şekil 3.3.** 41°C’de üreme testi

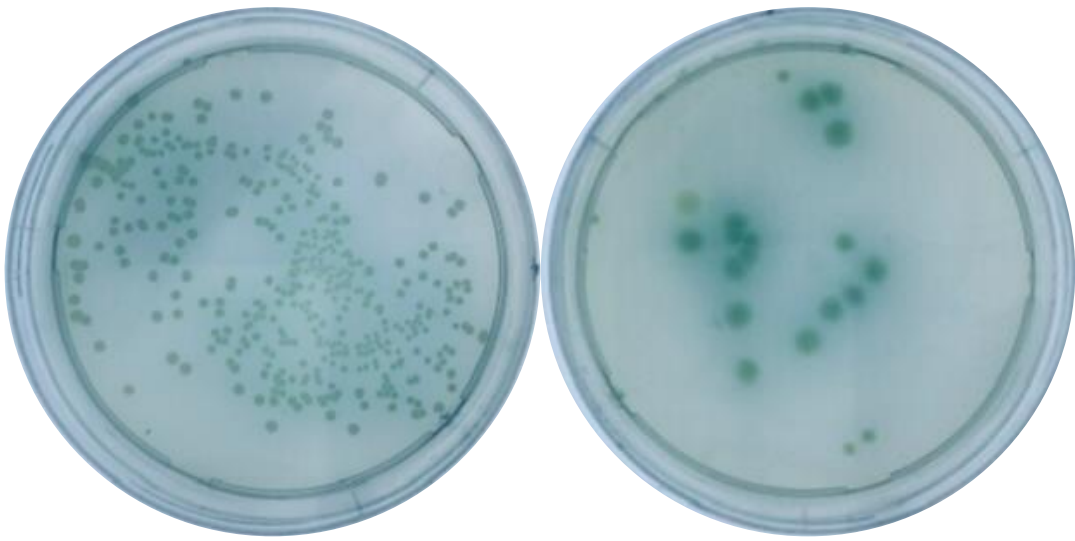
**Katalaz testi:** NA’ a aseptik koşullarda öze ile ekim yapılmıştır. Ekimi takiben 37 °C’de 24 saat inkübasyonda bırakılan petrilerin üzerine %3’lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisinden 4-5 damla damlatılmıştır. Gaz kabarcıklarının oluşumu, pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Temiz, 2014).

**Hareketlilik testi:** Yumuşak NA (%0,8 agar) içeren tüplere izolatlar, iğne uçlu öze ile ekilmiştir. 37°C’de her gün incelenerek, 72 saat inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.4). Büyüme esnasında hareketli olan bakteriler, tüpün dibine doğru burgu yaparak yayılma göstermişlerdir (Temiz, 2014).



**Şekil 3.4.** Hareketlilik testi

**Floresan pigmentlerini (flouressein) üretme yeteneği:** Floresan pigmentlerinin (Piyoverdin) üretimi için King B (Pseudomonas Agar F), *P. aeruginosa* için karakteristik olan pirenözün (Piyosiyanın) pigmentlerinin varlığını belirlemek amacıyla da King A (Pseudomonas Agar P) besiyeri kullanılmıştır. İzolatlar, besiyelerine ekim yapıldıktan sonra 37°C’de 5 gün inkübasyon işlemine tabi tutulmuştur. İnkübasyonu takiben King A besiyerinde mavi pigment oluşumu ve King B besiyerinde de yeşil pigment oluşumu (Şekil 3.5) pozitif kabul edilmiştir (Arnaut- Rollier vd., 1999; Franzetti ve Scarpellini, 2007).



**Şekil 3.5.** King B besiyerine ekim yapılan örnekler

**Jelatin hidrolizi:** %10-15 jelatin içerecek şekilde tüpte hazırlanan Nutrient broth besiyerine izolatlar, iğne uçlu öze ile ekilmiştir. Bir tüp, kontrol için inokülasyon yapılmadan inkübasyona bırakılmıştır. Ekim yapılan tüpler, 10-30 gün 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonu takiben sıvılaşıma görülen tüpler pozitif olarak kabul edilmiştir (Temiz, 2014).

**İndol testi:** Nutrient agardaki 24 saatlik kültürlerden tripton water içeren tüplere bakteri izolatları iğne uçlu öze kullanılarak ekilmiş ve bir tüp, kontrol olarak ekim yapılmadan bırakılmıştır. 37°C’de 2-7 gün inkübasyona bırakılan tüplere inkübasyonu takiben 0,5 mL Kovac’s ayracı damlatılmıştır. Tüplerin üst kısmında kırmızı renklerin oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir (Temiz, 2014). *P.aeruginosa*, indol negatif olduğu için bu aşamada pozitif olan izolatlar elenmiş ve negatif izolatlarla çalışmaya devam edilmiştir (Şekil 3.6).



**Şekil 3.6.** İndol testi

**Glukozdan asit üretimi:** İzolatların glikozdan asit üretime yeteneği Oxidative-Fermentative (OF) besiyeri kullanılarak Hugh ve Leifson’a göre kontrol edilmiştir. İzolatlar OF besiyerine inokule edildikten sonra 22°C’de 14 gün inkübasyon işlemine tabi tutulmuştur (Hugh vd., 1953).

**Kazein hidroliz testi:** Bu analiz için %10 yağsız süt tozu içeren agarlı-sütlü besiyeri kullanılmıştır. Nutrient agarda geliştirilen izolatlar, besiyerine steril öze yardımıyla ekilmiş ve 37°C’de 14 gün inkübasyon işlemine tabi tutulmuştur. İnkübasyon işlemi takiben petri plağın üzerine %10’luk HCl çözeltisi konulmuş ve bu işlemin ardından kolonilerin etrafında oluşan berrak hareler pozitif olarak değerlendirilmiştir (Arnaut-Rollier vd., 1999; Franzetti ve Scarpellini, 2007).

**Nişasta hidroliz testi:** Bu analizde %0,2 oranında çözülebilir nişasta içeren Yeast Agar kullanılmıştır. Agar'a steril öze ile çizgi şeklinde ekim yapıldıktan sonra 22°C'de 6 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon işleminin ardından agarların üzeri lugol solüsyonu ile kaplanmıştır. Pozitif reaksiyonlarda koloni etrafında renksiz bir halka oluşmuş (alfa-amilaz enziminin nişastayı hidrolize ettiğinin göstergesi), negatif durumlarda ise besiyeri mavi renk almıştır (Stanier vd., 1966).

### 3.2.3.2 Moleküler tanımlama

#### 3.2.3.2.1 16S rDNA dizi analizi

Bakteri DNA izolasyonu, GeneAll Exgene DNA izolasyon kiti kullanılarak gerçekteştirilmiştir. Örnekler 1.5 mL'lik tüpün içerisine öze yardımı ile alınmıştır. Üzerlerine 180 µl Bacterial Cell lysis buffer eklenmiş ve homojenize edilerek 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra, 20 µl RNase solüsyonu eklenerek vortekslenmiş ve 2 dakika beklenmiştir. Örneklerin üzerine 20 µl proteinaz K eklenip tekrar vortekslenmiştir. Devamında, 200 µl BL buffer ilave edilip vortekslenerek 56°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Ardından, 70°C'de 30 dakika inkübasyon işlemi tekrarlanmıştır. Örnekler çıkarılıp alt üst edilmiş ve 200 µl %96'lık etanol eklenip vortekslenmiştir. Karışım, sipin kolona aktarılıp 9000 × g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Toplama tüpü yenilenerek 600 µl BW buffer eklenmiş ve 9000 × g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Toplama tüpü tekrar yenilenerek 700 µl BW buffer eklenmiş ve 9000 × g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Ardından, 14000 × g'de 1 dakika daha santrifüj edilmiştir. Kolonlar temiz ependorflara konularak üzerlerine 50 µl elusyon buffer ilave edilip oda sıcaklığında 2 dakika bekletilmiş ve 14000 × g'de 1 dakika santrifüj edilerek DNA elde edilmiştir.

PCR işlemi, 8 µl ticari PCR master mix (GeneAll, Cat no.544-010), 6 µl dH<sub>2</sub>O, 1 µl ileri primer, 1 µl geri primer ve 4 µl DNA olmak üzere toplam 20 µl hacimde gerçekteştirilmiştir (Çizelge 3.1). 16S rRNA'nın V3 bölgesinin amplifikasyonu için PCR döngü şartları optimize edilmiştir. Buna göre; 95°C sıcaklıkta 5 dakika denatürasyon sonrasında yapışma sıcaklığı toplam 20 döngüde 61°C'den 50°C'ye düşürülmüş ve 50°C sıcaklıkta 10 döngü daha gerçekteştirilmiştir. Uzama aşaması, 72°C sıcaklıkta 30 saniye uygulanmış ve amplifikasyonu sonlandıran final uzama, 72°C sıcaklıkta 5 dakikada gerçekteştirilmiştir (Çizelge 3.2).

Morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal analizler açısından *P. aeruginosa* karakteristiği gösteren 22 izolatın moleküler tanımlanmaları, 16S rRNA'ya göre yapılmıştır. 16S rRNA dizi analizi, hizmet alımı karşılığında Atlas Biyoteknoloji'ye (Ankara) yaptırılmıştır. Gönderilen dizi analizi sonuçları, BLAST sistemi kullanılarak veri tabanı ile karşılaştırılmıştır. *P. aeruginosa* olarak tanımlanan 10 farklı suş, bakteriyofaj izolasyonunda kullanılmıştır.

Dizi analizi sonucu elde edilen baz dizileri, online veri tabanlarındaki DNA dizileri ile karşılaştırılmıştır. Bu veri tabanlarından en önemlileri, EMBL ve Genbank veri tabanlarıdır. Bu veri tabanlarından elde edilen dizileri daha önce depolanmış tüm dizilerle karşılaştırmak için BLAST ya da FASTA gibi algoritmalar kullanılır. ABD'nin Ulusal Bioteknoloji Enformasyon Merkezi'nin bünyesindeki (National Center for Biotechnology Information NCBI) BLAST (the Basic Local Alignments Search Tool) programı, internet erişimiyle kullanılabilmesi, hızı ve hassasiyeti sebepleriyle daha popülerdir (Ünsal, 2008).

**Çizelge 3.1.** Amplifikasyon için kullanılan primerlerin baz dizilimi

Oligonükleotid	Dizi (5'–3')	Amplikon uzunluğu	Kaynak
İleri primer 27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	27	Miller vd., 2013; Chen vd., 2015
Geri primer 1492R	TACGGYTACCTTGTTACGACTT	149	

M: Adenin veya Sitosin; Y: sitosin veya timin

**Çizelge 3.2.** PCR döngü şartları

İşlem basamağı	PCR Koşulları		Döngü sayısı
İlk denatürasyon	95 °C	5 dakika	X40
Denaturasyon	95 °C	30 saniye	
Yapışma	50 °C	30 saniye	
Uzama	72 °C	30 saniye	
Final uzama	72 °C	5 dakika	
	4 °C	∞	

### **3.2.4 Bakteriyofaj izolasyonu ve karakterizasyonu**

#### **3.2.4.1 Bakteriler ve besiyerleri**

Bakteriyofaj taramasında tez kapsamında tanımlanmış 10 adet *P. aeruginosa* suşu ile Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü kültür koleksiyonunda bulunan 3 adet *P. aeruginosa* (K. Üniversitesi, ATA Ünvl ve ATA Ünvl 2) suşu kullanılmıştır. Çalışmanın ilk aşama taraması için elimizde bulunan 13 farklı *P. aeruginosa* suşu kullanılmıştır. *P. aeruginosa* suşlarının geliştirilmesinde NB sıvı besiyeri kullanılmıştır. Bakteri kültürleri, %20 gliserol içeren NB besiyerinde -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

#### **3.2.4.2 Bakteriyofajların izolasyonunda kullanılan materyaller**

Bakteriyofajların taranmasında Nevşehir, Aksaray ve Niğde illerinde bulunan baraj (4 adet), gölet (1 adet), süt işletmesi (6 adet), kanalizasyon (18 adet) ve mezbahalardan (7 adet) alınan su ve/veya atık sular kullanılmıştır. Bakteriyofaj taranmasında kullanılan toplam örnek sayısı 36'dır. Toplanan örnekler, steril kaplara konularak Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na getirilmiştir. Su örnekleri, önce kaba filtreden geçirilerek partiküllerinden ayrılmış, ardından 7000 × g'de 20 dakika santrifüj işlemine tabi tutulduktan sonra süpernatant kısmı, 0,45 ve 0,22 µm membran filtresinden geçirilmiştir. Elde edilen filtrat, bakteriyofaj izolasyonunda kullanılmıştır.

#### **3.2.4.3 Bakteriyofajların izolasyonu**

Su örneklerinden elde edilen filtratların test edilecek bakteriye karşı bakteriyofaj içerip içermedikleri zenginleştirme yöntemi ile belirlenmiştir. Zenginleştirme yönteminde litik fajların sayısını artırmak amacıyla filtre edilen örneklerden 20 mL alınarak aktif olarak geliştirilmiş test bakterileri olan *P. aeruginosa* suşları (2 mL) ile inoküle edilmiş ve üzerine 3 kat konsantre edilmiş NB sıvı besiyeri (3 mL) konulup karıştırılmış ve 37°C'de 24 saat inkübasyon işlemine tabi tutulmuştur. İnkübasyon işleminden sonra kloroform (50 µl/mL) ilave edilmiş ve kuvvetlice karıştırılarak bakteri hücrelerinin liziz olması sağlanmıştır. Böylece, hücre içinde oluşan fajların da açığa çıkması sağlanmıştır. Daha

sonra kültürler,  $7000 \times g$ 'de 20 dakika santrifüj edilerek hücresel kalıntılar uzaklaştırılmış ve süpernatantlar  $4^{\circ}C$ 'de muhafaza edilmiştir. Zenginleştirilen örneklerde bakteriyofaj varlığı, test bakterisine karşı spot (noktalama) ve çift tabaka agar plak yöntemi ile belirlenmiştir (Adams, 1959).

#### **3.2.4.4 Spot ve çift tabaka agar plak metodu**

Bakteriyofaj varlığının tespitinde yararlanılan spot yönteminde, aktif olarak geliştirilen test bakteri kültürlerinden  $300 \mu l$  alınarak  $45-50^{\circ}C$ 'deki NB yumuşak agara (%0,7 agar) ilave edilip karıştırıldıktan sonra bu karışım, katılaşmış NA içeren petriler üzerine yayılmıştır. Yumuşak agar katılaştıktan sonra (30 dakika sonra) zenginleştirme yapılmış su örneğinden  $20 \mu l$  nokta şeklinde konulmuş ve kuruması için yaklaşık 30 dakika bekletildikten sonra petriler ters çevrilerek  $37^{\circ}C$ 'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon işlemini takiben berrak zon oluşup oluşmadığı belirlenmiştir.

Faj varlığı tespit edilen örneklerin faj titrelerinin belirlenmesinde de çift tabaka agar plak metodu kullanılmıştır. Bunun için faj süspansiyon örneklerinden seri dilüsyon hazırlanmıştır. Dilüsyonlardan alınan  $100 \mu l$ 'lik faj örneği ile  $100 \mu l$  konakçı hücre örneği  $45-50^{\circ}C$ 'deki NB yumuşak agara ilave edilip karıştırıldıktan sonra, katılaşmış NB agar içeren petriler üzerine yayılmıştır.  $37^{\circ}C$ 'de 24-48 saat inkübasyon işleminden sonra plak sayımı yapılmış ve faj titresi plak oluşturma birimi (pob/mL) şeklinde ifade edilmiştir (Adams, 1959).

#### **3.2.4.5 Bakteriyofajların saflaştırılması**

Faj varlığı saptanan faj süspansiyonlarını saflaştırmak için tek plak izolasyon yöntemi kullanılmıştır. Besiyerine tek düşen plaklardan herhangi biri, steril cam Pastör pipet ile alınıp magnezyum tuz (SM) tampon ( $50 \text{ mM Tris-Cl}$ ,  $\text{pH } 7,5$ ,  $99 \text{ mM NaCl}$ ,  $8 \text{ mM MgSO}_4$ ,  $0,01\%$  jelatin) içerisine konulmuş ve 2 saat çalkalamalı inkübatörde  $37^{\circ}C$ 'de inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben bu çözelti, kloroform ekstraksiyonu ( $50 \mu l/ml$ ) ve santrifüj işlemine ( $4^{\circ}C$  ve  $8000 \times g$ 'de 20 dakika) tabi tutulmuştur. Elde edilen supernatant, steril bir tüpe aktarılmış ve ardından seri dilüsyonlar hazırlanıp çift tabaka agar yöntemi ile ekim yapılmıştır. Konakçı hücreyi yeniden enfekte etme ve plak saflaştırma işlemi en az üç kez tekrar edilmiştir (Stenholm vd., 2008).

### 3.2.4.6 Faj stoklarının hazırlanması

Yüksek sayıda faj elde etmek amacıyla saflaştırılan faj örneklerinden 0,1 mL alınıp 1:100 oranında aktif olarak geliştirilmiş konakçı bakteri içeren NB besiyeri içerisine ilave edilmiş ve faj sayısının artması için gece boyunca çalkalamalı inkübatörde 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon işlemini takiben kültür, 0,45 ve 0,22 µm gözenek çaplı steril membran filtreden geçirilmiştir. Yüksek sayıda faj içeren filtrat, %20 gliserol çözeltisi içinde -80°C'de muhafaza edilmiştir (Kocharunchitt vd., 2009). Hazırlanan faj örneklerindeki faj sayısı, çift tabaka plak agar metodu ile belirlenmiş ve sonuçlar mililitredeki plak oluşturma birimi (pob/mL) şeklinde ifade edilmiştir (Adams, 1959).

### 3.2.4.7 Fajların etki ettiği konakçı aralığının belirlenmesi

İzole edilen fajların etki ettiği konakçı spektrumunu belirlemek için izolasyon aşamasında kullanılan *P. aeruginosa* suşlarına (toplam 13 adet) ilaveten kültür koleksiyonumuzda bulunan *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersenia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Bacillus* ve *Enterococcus*'un farklı tür veya suşları test bakterileri olarak kullanılmıştır. Konak hücre aralığının belirlenmesi için aktif gelişen bakteri kültürlerinden (OD<sub>600</sub>=0,3) 0,3 mL alınıp 45-50°C'deki NB yumuşak agar içerisine ilave edilerek karıştırıldıktan sonra daha önce NB agar (%1,5) konulmuş petrilere dökülmüştür. Yumuşak agar katılaştıktan sonra (yaklaşık 30 dakika) üzerine faj örneklerinden 10 µL nokta halinde konulmuştur. İnkübasyon işleminden (37°C'de 24 saat) sonra petrilere berrak zon oluşup oluşmadığı incelenmiştir. Bu aşamada sadece izole edilip saflaştırılan bakteriyofaj örnekleri, 13'ü farklı *P. aeruginosa* suşu olmak üzere toplamda 49 bakteriyeye karşı test edilmiştir (Çizelge 3.3). Konak hücre aralığının belirlenmesi sonucunda inhibitör spektrumu geniş ve litik aktivitesi kuvvetli olan 2 faj seçilmiş ve çalışmanın bundan sonraki aşamalarında bu iki faj kullanılmıştır.

### 3.2.4.8 Bakteriyofajların elektron mikroskopuyla incelenmesi

Faj örnekleri, karbon kaplı bakır grid üzerine damlatılıp kurutulmuştur. Sonra, %2 uranil asetat (pH 4) ile negatif olarak boyanmıştır (Yu vd., 2016). Boya kuruduktan sonra örnekler, geçirimsiz (transmisyon) elektron mikroskopunda (TEM) (JEOL JEM-2100 UHR, Japan) 100 kV'ta incelenmiştir.

**Çizelge 3.3.** *P. aeruginosa* suşlarını enfekte eden fajların konak hücre aralığının belirlenmesinde kullanılan bakteriler

<i>P. aeruginosa</i> ATAÜ1	<i>S. Enteritidis</i> MET-S1-742
<i>P. aeruginosa</i> ATAÜ2	<i>Salmonella Typhimurium</i> LT2 SR II
<i>P. aeruginosa</i> KÜ	<i>S. Typhimurium</i> Tr90
İzole edilen <i>P. aeruginosa</i> suşları	<i>S. Typhimurium</i> Tr87
<i>E. coli</i> O157:H7 NCTC 12900	<i>S. Typhimurium</i> MET-S1-625
<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43888	<i>S. Virchow</i> DMC8
<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 35150	<i>S. Infantis</i> DMC7
<i>E. coli</i> O157:H7 AİBÜ	<i>S. Thompson</i> DMC47
<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. Anatum</i> DMC90
<i>E. coli</i> BC21	<i>S. Telaviv</i> DMC62
<i>E. coli</i> DCα	<i>S. Montavide</i> DMC81
<i>E. coli</i> NÜ	<i>S. Kentucky</i> DMC35
<i>E. coli</i> CFAJ	<i>S. Carvalis</i> DMC86
<i>Salmonella Enteritidis</i> DMC3	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115
<i>Salmonella Enteritidis</i> DMC31	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
<i>Salmonella Enteritidis</i> DMC8	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10875
<i>S. Enteritidis</i> DMC22	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9 AÜ
<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13075	<i>Citrobacter freundii</i> AÜ
<i>S. Enteritidis</i> MET-S1-512	<i>Enterobacter aerogenes</i> AÜ
<i>S. Enteritidis</i> MET-S1-411	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212

#### 3.2.4.9 Bakteriyofaj DNA'sının saflaştırılması

Bakteriyofaj DNA'larını izole etmek için NORGEN faj DNA izolasyon kiti (Cat. 46800, 46850) kullanılmıştır. Kit protokolüne uygun olarak öncelikle, en az  $10^8$ - $10^{10}$  pob/mL faj süpernatantı içeren örnekten 1 mL alınarak epondorf tüp içine ilave edilmiştir. Üzerine 10 µL DNase I uygulaması, konakçı genomik DNA kirlenmesinden kaçınmak için ilave edilip 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Sonrasında, 75°C'de 5 dakika boyunca DNase inaktivasyonuna bırakılmıştır. İnkübasyonu takiben liziz buffer B'den 500 µL ilave edilmiş ve 10 saniye şiddetli bir şekilde vortekslenip yine bu aşamada DNA konsantrasyonunu artırmak amacı ile 4 µL (20 mg/mL) proteinaz K ilave edilmiş ve 55°C'de 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında 320 µL izopropanol ilave edilmiştir. Toplam lizat hacminin 650 µL'ye kadar olan kısmı, toplama tüpü yerleştirilmiş spin kolona eklenerek  $6000 \times g$ 'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Bu işleme tüm lizat kolondan geçirilene kadar devam edilmiştir. Sonrasında 400 µL yıkama solüsyon A spin kolona uygulanarak  $6000 \times g$ 'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. İşlem sonrasında sıvı kısım uzaklaştırılarak kolon ile toplama tüpü birleştirilmiştir. Bu işlem 3 kez art arda tekrar edilmiştir. Son olarak, kolonu tamamen kurutmak için  $14000 \times g$ 'de 2

dakika boyunca santrifüj işlemi yapılmıştır. Kolon 1,7 mL temiz elüsyon tüpüne konularak üzerine 75 µL elüsyon buffer B tamponu ilave edilmiş ve 6000 × g'de 1 dakika santrifüj edilip DNA kazanımı sağlanmıştır. İzole edilen faj DNA'larının konsantrasyonları, Invitrogen™ Qubit™ 3 Fluorometer (ThermoFisher Scientific) kullanılarak ölçülmüştür. İzole edilen faj DNA'ları birkaç gün içinde kullanılacaksa -20 °C'de, eğer uzun süre muhafaza edilecekse -80 °C'de depo edilmiştir.

#### **3.2.4.10 Bakteriyofaj genom büyüklüğünün restriksiyon enzimleri ile belirlenmesi**

Fajların moleküler karakterizasyonu ve faj DNA büyüklüğünü belirlemek için izole edilen faj DNA'ları, restriksiyon enzimleri ile kesim işlemine tabi tutulmuştur. Bu amaçla marker olarak *HindIII* ile kesilen λ faj DNA'sı kullanılmıştır. İzole edilen faj DNA'larını kesmek için *EcoRI*, *BamHI* ve *HindIII* gibi üç adet restriksiyon enziminden yararlanılmıştır (Buzdik, 2000).

Her bir faj DNA'sı örneği için üç farklı enzim ile kesme işlemi uygulanmıştır. Bunun için 60 µL distile su, 7,5 µL 10xFast Digest green buffer, 7 µL faj DNA örneği ve 1 µL restriksiyon enzimi karıştırılmış ve 36°C'de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol olarak *HindIII* ile kesilen λ DNA markırı, her bir örnek için agaroz jele yüklenmiştir. Kesimi takiben örnekler 1 × TAE buffer (40 mM tris-asetat ve 1 mM EDTA, pH 8.0) (Sigma) içindeki %0,8'lik agaroz jelde 90 V'da 2 saat boyunca yürütülmüştür (Kumari vd., 2009a).

#### **3.2.4.11 İnfeksiyon çokluğu değerinin belirlenmesi**

İnfeksiyon çokluğu değerinin (MOI) belirlenmesi için aktif gelişen konakçı hücre yaklaşık 10<sup>8</sup> kob/mL seviyesinde steril ependorf tüplere konulmuş ve bu tüplere bakteriyofaj stok solüsyonundan hazırlanan dilüsyonlar ilave edilerek karıştırılmıştır. Adsorpsiyon için 15 dakika bekletildikten sonra santrifüj (5000 × g'de 10 dakika) edilmiş ve serbest bakteriyofaj içeren süpernatantlar uzaklaştırılmıştır. Tüplerde kalan pelet, NB besiyeri ile süspansiyon edilerek 37°C'de 4 saat inkübasyon işlemine tabi tutulmuştur. Bu sürenin sonunda bakteriyofaj titresi, çift tabaka agar plak yöntemi ile belirlenmiştir. Faj örneklerinin MOI değeri aşağıda verilen eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır (Yang vd., 2010).

$$MOI = \frac{\text{Faj titresi (pob)}}{\text{Bakteri sayısı (kob)}} \quad (3.1)$$

### 3.2.4.12 Bakteriyofajların tek aşamalı gelişim kurvelerinin belirlenmesi

Bakteriyofajların tek aşamalı gelişim kurvelerinin belirlenmesi için aktif olarak NB besiyerinde geliştirilmiş ( $OD_{600}=0,4-0,5$ ) bakteri konakçı hücrelerinden 50 mL alınıp santrifüj ( $6000 \times g$ 'de 15 dakika) edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen pelete, 0,5 mL taze NB besiyeri ilave edilmiş daha sonra 0,5 mL faj solüsyonuyla (yaklaşık  $10^8$  pob/mL) karıştırılmıştır. Fajın konakçı hücreye adsorpsiyonunu sağlamak amacıyla 15 dakika bekletilip devamında  $8000 \times g$ 'de 15 dakika santrifüj işlemi yapılmıştır. Serbest fajlar uzaklaştırılıp kalan pelet kısmı, 100 mL taze NB besiyeri içinde süspansiyeye edilmiş ve  $37^\circ\text{C}$ 'de inkübasyon işlemine tabi tutulmuştur. İnkübasyon süresi boyunca 5 dakika aralıklarla örnek alınıp çift tabaka agar plak yöntemi ile faj titresi tespit edilmiştir (Yang vd., 2010). Fajların patlama büyüklüklerinin hesaplanmasında aşağıda verilen eşitlik kullanılmıştır.

$$\text{Patlama büyüklüğü} = \frac{\text{En yüksek faj titresi } \left(\frac{pfu}{mL}\right)}{\text{Latent dönemdeki faj titresi } \left(\frac{pfu}{mL}\right)} \quad (3.2)$$

### 3.2.4.13 Fajların konakçı hücreye adsorpsiyon oranının belirlenmesi

Fajların konakçı hücreye adsorpsiyon oranları, aktif olarak gelişen *P. aeruginosa* suşları'na MOI değeri 0,0005 olacak şekilde faj ilave edilerek belirlenmiştir. Fajların konakçı hücreye adsorpsiyonu üzerine iki değerlikli iyonların etkisini belirlemek için de ayrı bir tüpte konakçı-faj karışımına 10 mM  $\text{CaCl}_2$  ilave edilmiş ve  $37^\circ\text{C}$ 'de çalkalamalı inkübatörde inkübasyon işlemine tabi tutulmuştur. İnkübasyon işleminin 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50 ve 60'ıncı dakikalarında örnek ( $150 \mu\text{L}$ ) alınıp, 1:10 oranında SM tamponu ve kloroform ( $50 \mu\text{L/mL}$ ) ile karıştırılıp santrifüj ( $7000 \times g$ 'de 10 dakika) edilmiştir. Süpernatant yeni bir tüpe aktararak adsorbe olmayan bakteriyofaj sayısı, çift tabakalı agar plak metodu ile belirlenmiştir. Faj adsorpsiyon oranı, inkübasyon işlemi süresince plak oluşum biriminde meydana gelen azalmanın oranı olarak belirlenmiştir. Faj adsorpsiyon oranı aşağıda verilen eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır (Suárez vd., 2008).

$$\% \text{ Adsorpsiyon} = \frac{\text{Başlangıç faj titresi} - \text{Adsorbsiyon sonrası faj titresi} \cdot 100}{\text{Başlangıç faj titresi}} \quad (3.3)$$

#### **3.2.4.14 Fajların pH ve sıcaklık stabilite değerlerinin tespiti**

Farklı pH değerlerinde fajların stabilitelerini belirlemek amacıyla yaklaşık  $10^8$  pob/mL faj partikülü içeren örneklerin pH değerleri, 1-13 arasında ayarlanmıştır. Bu pH değerlerinde 1 saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra faj sayısı, çift plaka agar plak metodu ile belirlenmiştir. Isıl işlemin etkisini tespit etmek için faj örnekleri 50, 60, 70, 80 ve  $90^\circ\text{C}$ 'de 5, 15, 30, ve 60 dakika ısıl işleme tabi tutulmuştur. Bu işlemi takiben canlı kalan faj sayısı, çift tabaka agar plak yöntemiyle saptanmıştır (Yang vd., 2010).

#### **3.2.4.15 Konak hücreye karşı bakteriyofajların litik aktivitelerinin belirlenmesi**

*P. aeruginosa* suşları'nın faj varlığında gelişiminin belirlenmesi amacıyla bir gece önce geliştirilen konakçı hücre, %0,1 oranında 10 mM  $\text{CaCl}_2$  içeren taze NB besiyerine (600 mL) inoküle edilip 4, 25 ve  $37^\circ\text{C}$ 'de çalkalamalı (120 rpm) inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyon işleminin 3'üncü saatinde kültür, eşit kısımlara (100'er mL) steril koşullarda bölünerek,  $10^8$  - $10^9$  pob/mL düzeyinde enfeksiyon etmeni fajlar ile tek tek ve kombine olarak inoküle edildikten sonra aynı inkübasyon koşullarında inkübe edilmiştir. İnkübasyon işlemi süresince (8 saat) belirli aralıklarla örnek alınarak spektrofotometrede 600 nm'de okuma yapılmıştır. Pozitif kontrol örneği olarak sadece *P. aeruginosa* suşlarını içeren NB besiyerleri, negatif kontrol örneği olarak da NB besiyeri kullanılmıştır (Lopez vd., 2015).

#### **3.2.4.16 Fajların biyokoruyucu olarak tavuk etinde kullanım olanaklarının belirlenmesi**

##### **3.2.4.16.1 Tavuk eti örneklerinin hazırlanması**

Çalışmada kullanılacak taze tavuk göğüs etleri, Erzincan'daki marketlerden temin edilmiş ve aseptik koşullarda Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Gıda Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na götürülmüştür. Tavuk göğüs etleri yüzeyden yaklaşık 1 cm kalınlığında kesildikten sonra yüzey alanları  $2 \times 2$  cm ve ağırlıkları 5 gram olacak şekilde kesilip steril stomacher poşetlerine konulmuştur.

##### **3.2.16.2 Tavuk eti örneklerinin bakteriyofaj ve test bakterisi ile inokülasyonu**

Bu aşamada, gıda örneği olarak steril koşullarda yaklaşık 4 cm<sup>2</sup> büyüklüğünde kesilen tavuk göğüs eti örneklerine test bakterisi olarak *Pseudomonas aeruginosa* RM11 suşu, 10<sup>3</sup> ve 10<sup>6</sup> kob/g düzeyinde olacak şekilde ilave edilmiş ve bakterinin ete absorbe olması için 20-30 dakika beklenmiştir. Et örneklerine fajlar tek tek ve kombine olarak yaklaşık 10<sup>8</sup> pob/mL düzeyinde inoküle edildikten sonra buzdolabı sıcaklığında (4°C) depolama işlemine tabi tutulmuştur. Depolamanın 0.gün, 2. saat, 1.gün, 3.gün, 5.gün ve 8. günlerinde örnekler alınıp 20 mL fosfat tamponu ilave edilerek stomacher'de 2 dakika süreyle parçalanarak homojen örnekler hazırlanmıştır. Bu işlemi takiben seri dilüsyonlar hazırlanmış ve bakteri sayımı ile faj titresi belirlenmiştir. Denemelerde pozitif kontrol örneği olarak sadece bakteri veya fajla inoküle edilen tavuk eti, negatif kontrol olarak bakteri ve fajla inoküle edilmemiş et örnekleri kullanılmıştır.

#### **3.2.4.17 İstatistiksel değerlendirme**

Üç paralel olarak gerçekleştirilen araştırmadan elde edilen sonuçların istatistiksel değerlendirilmesi, SPSS (version 11.0; SPSS, Chicago, IL, USA) paket programı ile varyans analizi (ANOVA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

## BÖLÜM IV

### BULGULAR VE TARTIŞMA

#### 4.1 *Pseudomonas aeruginosa* İzolasyonu ve Tanımlanması

##### 4.1.1 *Pseudomonas aeruginosa* izolasyonu, morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerin belirlenmesi

*P. aeruginosa* çubuk şeklinde, Gram negatif, katalaz, jelatin ve sitrat pozitif ve indol negatiftir. Enterobacteriaceae familyasının aksine genellikle oksidaz pozitif bir bakteridir. Uçta bulunan tek polar flagella ile hareketli bir bakteri olup spor veya kapsül oluşturma yeteneği bulunmaz. *P. aeruginosa*'nın 4°C veya daha düşük sıcaklıklarda üreyebilen türleri olduğu gibi, 41°C'de üreyebilen türleri de vardır ve 37 ile 41°C'de optimum üreme göstermektedirler. *P. aeruginosa*'nın 41°C'de üreyebilme özelliği, onu *P. putida* ve *P. fluorescens*'den ayırmaktadır. *P. aeruginosa*'nın pigment oluşturan ve oluşturmayan suşları bulunmaktadır. Pigment oluşturan suşlar King A besiyerinde mavi (piyosiyenin), King B besiyerinde ise yeşil (piyoverdin) pigment oluşturmaktadır (Levinson, 2008; Virupakshaiah ve Hemalata, 2016). Pigment oluşturan suşların pigment oluşturmayan suşlara göre proteolitik ve hemolitik aktivitesinin, hareket yeteneğinin ve virülans gen bölgelerinin daha fazla olduğu belirtilmektedir (Maçin, 2014).

*P. aeruginosa*, yüksek genetik plastisitesi ve çeşitli ortamlara uyum sağlama potansiyeli ile karakterize edilen bir bakteridir. *Pseudomonas* türleri, sıklıkla topraktan ve sudan izole edilmekte ve bitki, böcek, hayvan ve insanların çeşitli anatomik bölgelerinde kolonize olabilmektedirler. Birçok virülans faktöre sahip olan *P. aeruginosa* gıda zehirlenmelerine neden olabilmektedir (Benie vd., 2017; Streeter and Katouli, 2016). *P. aeruginosa* türleri, insanlar ve hayvanlar için fırsatçı patojenler olarak kabul edildiğinden tıbbi açıdan, bazıları ise fitopatojen olduklarından tarım sektöründe çok önemlidirler (Franzetti ve Scarpellini, 2006; Streeter ve Katouli, 2016).

Araştırmamızda Mart 2017- Haziran 2019 tarihleri arasında Gümüşhane, Erzincan, Niğde ve Nevşehir'in çeşitli market, kasap ve kesimhanelerden toplanan toplam 80 adet tavuk eti, 9 adet kırmızı et (kıyma ve parça et), pazardan toplanan 20 adet peynir örneği ve

köylerden toplanan 35 adet çiğ süt örneği olmak üzere toplamda 144 adet gıda örneği materyal olarak kullanılmıştır (Çizelge 4.1).

Gıda örneklerden elde edilen seri dilüsyonlar, PSAB-CFC besiyerine ekim yapılmış ve 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen toplam 208 izolata, öncelikle Liofilchemsrl oksidaz test çubukları ile oksidaz testi uygulanmıştır. İlk etapta oksidaz pozitif izolatlarla çalışmaya devam edilmiş ve bu izolatlara Gram boyama, katalaz, oksidaz, hareketlilik, 41°C’de büyüme, King A, King B, indol ve jelatin hidroliz testleri yapılmıştır. Oksidaz pozitif sonuç veren izolatların sonuçları, Çizelge 4.2 ve 4.3’de verilmiştir. Peynir örneklerinden izole edilen izolatların hepsi oksidaz negatif sonuç vermiştir.

Tavuk, kırmızı et ve peynir örneklerinde izole edilen izolatların hiçbirinin King A ve King B besiyerinde mavi ve yeşil pigment oluşturmadıkları belirlenmiştir. Çiğ süt örneklerinden izole edilen izolatların büyük oranda King A ve King B besiyerinde mavi ve yeşil pigment oluşturdıkları tespit edilmiştir (Çizelge 4.2 ve 4.3).

**Çizelge 4.1.** *Pseudomonas aeruginosa* türlerinin izole edildiği materyallere göre dağılımları

<b>Çalışılan Gıda Örneği</b>	<b>Örnek Sayısı</b>	<b>İzolat Sayısı</b>
Tavuk eti ürünleri (karkas, tavuk göğsü, tavuk kanadı, kuşbaşı)	80	101
Kırmızı et (kıyma, kuşbaşı)	9	15
Süt (Çiğ süt)	35	72
Peynir	20	20
<b>TOPLAM</b>	<b>144</b>	<b>208</b>

**Çizelge 4.2.** Piyasadaki çeşitli kasaplardan, kesim evlerinden toplanan bazı tavuk, kırmızı et ve peynir örneklerinden izole edilen izolatların morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri

Örnek/İzolat	Gram Boyama	41 °C'de Gelişme	Hareket	Katalaz	İndol	Nişasta Hidroliz	Jelatin Hidroliz	Glikoz Hidrolizi	Kazein Hidroliz	King A	King B
Tavuk 1.1	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-
Tavuk 1.2	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-
Tavuk 2.1	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-
Tavuk 2.2	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-
Tavuk 3.1	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Tavuk 3.2	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
Tavuk 3.3	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-
Tavuk 4.1	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-
Tavuk 5.1	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-
Tavuk 5.2	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-
Tavuk 6.1	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-
Tavuk 6.2	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
Tavuk 7.1	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-
Tavuk 7.2	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-
Tavuk 8.1	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
Tavuk 8.2	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Tavuk 9.1	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-
Tavuk 9.2	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-
Tavuk 9.3	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Tavuk 10.1	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-
Tavuk 10.2	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
Tavuk 11.1	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-
Tavuk 11.2	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-
Tavuk 12.1	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-
Tavuk 12.2	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
Tavuk 13.1	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-

Tavuk 13.2	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
Tavuk 14.1	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
Tavuk 14.2	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
Tavuk 15.1	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-
Tavuk 15.2	-	+	-	+	+ az	-	-	+	+	-	-
Tavuk 16.1	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-
Tavuk 16.2	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
Tavuk 17.1	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-
Tavuk 18.1	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-
Tavuk 18.2	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
Tavuk 18.3	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-
Tavuk 19.1	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
Tavuk 19.2	-	+	+	+	+ az	-	-	+	+	-	-
Tavuk 20.1	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
Tavuk 20.2	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
Tavuk 21.1	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Tavuk 21.2	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-
Tavuk 22.1	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
Tavuk 22.2	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-
Tavuk 23.1	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-
Tavuk 23.2	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-
Tavuk 24.1	-	+	+	-az	+	+	+	+	+	-	-
Tavuk 24.2	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-
Tavuk 25.1	-	+	+	-	+	+/-	+	+	+	-	-
Tavuk 25.2	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-
Tavuk 26.1	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-
Tavuk 26.2	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-
Tavuk 27.1	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
Tavuk 28.1	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-
Tavuk 28.2	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-
Tavuk 29.1	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-

Tavuk 29.2	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-
Tavuk 30.1	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
Tavuk 30.2	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Tavuk 31.1	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Tavuk 31.2	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-
Tavuk 32.1	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
Tavuk 32.2	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Tavuk 33.1	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-
Tavuk 34.1	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-
Tavuk 35.1	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Tavuk 35.2	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-
Tavuk 36.1	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
Tavuk 37.1	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
Tavuk 38.1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Tavuk 38.2	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-
Tavuk 39.1	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-
Tavuk 39.2	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
Tavuk 40.1	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-
Tavuk 40.2	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Tavuk 41.1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Tavuk 41.2	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-
Tavuk 42.1	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-
Tavuk 42.2	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-
Tavuk 43.1	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
Tavuk 43.2	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
Tavuk 43.3	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-
Tavuk 44.1	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
Tavuk 44.2	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Tavuk 45.1	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-
Tavuk 46.1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Tavuk 46.2	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-

Tavuk 47.1	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Tavuk 47.2	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Tavuk 47.3	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
Tavuk 48.1	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-
Tavuk 48.2	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
Tavuk 48.3	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
Tavuk 49.1	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
Tavuk 49.2	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
Tavuk 49.3	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
Tavuk 50.1	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-
Tavuk 50.2	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
Tavuk 51.1	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
Tavuk 51.2	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
Tavuk 52.1	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
Tavuk 52.2	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
Tavuk 53.1	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Tavuk 53.2	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
Tavuk 54.1	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Tavuk 54.2	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
Tavuk 55.1	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
Et 1.1	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
Et 1.2	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Et 2.1	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-
Et 2.2	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Et 3.1	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
Et 4.1	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Et 5.1	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Et 5.2	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
Et 6.1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Et 7.1	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-
Et 8.2	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-

Et 8.1	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-
Et 8.2	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-
Et 9.1	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Et 9.2	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-

**Çizelge 4.3.** Süt üreticilerinden toplanan çiğ süt örneklerinden izole edilen izolatların morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri

Örnekler	Gram Boyama	Katalaz	Oksidaz	Hareketlilik	41°C'de Büyüme	King A Testi	King B Testi	Jelatin Hidrolizi	İndol
Süt 1.1	-	+	+	+	+	Mavi	Yeşil	+	-
Süt 1.2	-	+	+	+	+	Mavi	Yeşil	+	-
Süt 1.3	-	+	+	+	+	Mavi	Yeşil	+	-
Süt 2.1	-	+	+	-	+	Mavi	Yeşil	+	-
Süt 2.2	-	+	+	-	+	Mavi	Yeşil	+	-
Süt 2.3	-	+	+	+	+	Mavi	Yeşil	+	-
Süt 3.1	-	+	+	-	+	Mavi	Yeşil	+	-
Süt 3.2	-	+	+	+	-	Mavi	Yeşil	-	-
Süt 3.3	-	+	+	-	+	Mavi	Yeşil	+	-
Süt 4.1	-	+	+	+	+	Mavi	Yeşil	+	-
Süt 4.2	-	+	+	+	+	Mavi	Yeşil	+	-
Süt 5.1	-	+	+	+	+	Mavi	Yeşil	+	+
Süt 5.2	-	+	+	-	+	Mavi	Yeşil	+	+
Süt 6.1	-	+	+	+	+	Mavi	Yeşil	-	-
Süt 6.2	-	+	+	+	-	Mavi	Yeşil	+	-
Süt 7.1	-	+	+	+	+	Mavi	Yeşil	+	-
Süt 7.2	-	+	+	+	+	Mavi	Yeşil	+	-
Süt 8.1	-	+	+	+	+	Mavi	Yeşil	+	-
Süt 8.2	-	+	+	+	+	Mavi	Yeşil	-	-
Süt 8.3	-	+	+	-	+	Mavi	Yeşil	+	-
Süt 9.1	-	+	+	-	+	Mavi	Yeşil	-	-

Süt 10.1	-	+	+	+	+	Mavi	Yeşil	+	-
Süt 10.2	-	+	+	+	+	Mavi	Yeşil	+	-
Süt 11.1	-	+	+	+	+	Mavi	Yeşil	+	+
Süt 11.2	-	+	+	+	+	Mavi	Yeşil	+	-
Süt 12.1	-	+	+	+	+	Mavi	Yeşil	+	-
Süt 12.2	-	+	+	-	+	Mavi	Yeşil	+	-
Süt 13.1	-	+	+	+	+	Mavi	Yeşil	+	-
Süt 14.1	-	+	+	+	+	Mavi	Yeşil	-	-
Süt 14.2	-	+	+	-	+	Mavi	Yeşil	+	-
Süt 14.3	-	+	+	+	+	Mavi	Yeşil	+	-
Süt 15.1	-	+	+	-	+	Mavi	Yeşil	+	-
Süt 15.2	-	+	+	+	+	Mavi	Yeşil	+	-
Süt 16.1	-	+	+	+	-	Mavi	Yeşil	-	-
Süt 16.2	-	+	+	+	+	Mavi	Yeşil	+	-
Süt 16.3	-	+	+	-	+	Mavi	Yeşil	+	-
Süt 17.1	-	+	+	+	+	Mavi	Yeşil	+	+
Süt 17.2	-	+	+	-	+	Mavi	Yeşil	+	+
Süt 18.1	-	+	+	-	+	Mavi	Yeşil	+	-
Süt 18.2	-	+	+	+	+	Mavi	Yeşil	+	-
Süt 19.1	-	+	+	+	+	Mavi	Yeşil	+	-
Süt 19.2	-	+	+	+	+	Mavi	Yeşil	-	+
Süt 20.1	-	+	+	+	+	Mavi	Yeşil	+	+
Süt 20.2	-	+	+	+	+	Mavi	Yeşil	+	+
Süt 21.1	-	+	+	+	+	Mavi	Yeşil	+	-
Süt 21.2	-	+	+	+	+	Mavi	Yeşil	+	-
Süt 22.1	-	+	+	+	+	Mavi	Yeşil	+	-
Süt 22.2	-	+	+	+	+	Mavi	Yeşil	+	-
Süt 23.1	-	+	+	+	+	Mavi	Yeşil	+	-
Süt 24.1	-	+	+	+	+	Mavi	Yeşil	+	-
Süt 24.2	-	+	+	+	+	Mavi	Yeşil	+	-
Süt 25.1	-	+	+	+	+	Mavi	Yeşil	+	-

Süt 25.1	-	+	+	-	+	Mavi	Yeşil	+	-
Süt 26.1	-	+	+	+	+	Mavi	Yeşil	+	-
Süt 26.2	-	+	+	+	+	Mavi	Yeşil	+	-
Süt 27.1	-	+	+	+	+	Mavi	Yeşil	+	-
Süt 28.1	-	+	+	+	+	Mavi	Yeşil	+	-
Süt 28.2	-	+	+	+	+	Mavi	Yeşil	+	-
Süt 29.1	-	+	+	+	+	Mavi	Yeşil	+	-
Süt 29.2	-	+	+	+	+	Mavi	Yeşil	+	-
Süt 30.1	-	+	+	+	+	Mavi	Yeşil	+	-
Süt 30.2	-	+	+	+	+	Mavi	Yeşil	+	-
Süt 31.1	-	+	+	+	-	-	-	+	+
Süt 31.2	-	+	+	+	-	-	-	+	+
Süt 32.1	-	+	+	+	-	-	-	+	+
Süt 32.2	-	+	+	+	+	-	-	+	-
Süt 33.1	-	+	+	+	-	-	-	+	+
Süt 33.2	-	+	+	+	-	-	-	+	+
Süt 34.1	-	+	+	+	-	-	-	+	+
Süt 34.2	-	+	+	+	-	-	-	+	+
Süt 35.1	-	+	+	+	+	-	-	+	+
Süt 35.2	-	+	+	+	+	-	-	+	+

#### 4.1.2 *P. aeruginosa* izolatlarının moleküler tanımlanması

Biyokimyasal analiz sonucunda mavi ve yeşil pigment oluşturan ve süttten izole edilen 12 bakteri izolatu ile tavuk örneğinden izole edilen mavi ve yeşil pigment oluşturmayan 10 izolat 16S rRNA geni V3 bölgesine göre dizi analizine tabi tutulmuştur. İzolatların 16S rRNA geni V3 bölgesinin dizi analiz sonuçları, BLAST sistemi kullanılarak veri tabanı ile karşılaştırılmıştır. Örneklerin 20-600 bp uzunluğundaki 16S rRNA gen fragmentinin dizi analiz sonuçları gen bankasında karşılık geldiği bölgenin benzerlik oranları ve Accession sayıları Çizelge 4.4'te verilmiştir. 16S rRNA bölgesine göre analizleri yapılan süttten izole edilen ve mavi-yeşil pigment oluşturan 12 örnekten 10 tanesinin *P. aeruginosa*'nın farklı suşlarından oluştuğu, 2 örneğin NCBI veri tabanında herhangi bir sekans ile benzerlik göstermediği, tavuktan izole edilen 10 örnekten 5 tanesinin *Proteus mirabilis*, *Enterobacter xiangfangensis*, *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas veronii* ve *Esherichia coli* olduğu belirlenmiş 5 tanesi ise tanımlanamamıştır. Tanımlanan *P. aeruginosa* suşlarının 16S rRNA V3 bölgesi dizilerinin, NCBI veri tabanında tanımlı olan sekanslar ile %96-100 aralığında benzerlik göstermiştir.

Wong vd. (2015), Karbapenem'e dirençli *Pseudomonas* spp. izole etmek amacı ile Hong Kong'daki iki farklı süpermarketten temin edilen toplam 16, 8 tavuk ve 8 domuz eti örneklerinin sekizinden toplam 16 izolat elde etmişlerdir. Tavuk ve domuz eti için izolasyon oranlarının sırasıyla; %63 (5/8) ve %38 (3/8) olduğu ve 16S rRNA sekanslama analizi sonucunda, bu izolatların *P. putida* (n=11), *P. otitidis* (n=4) ve *P. aeruginosa* (n=1) olduğunu doğrulamıştır. *P. aeruginosa* izolatu E1-17, MLST analizi ile ST1756 olarak tespit edilmiştir.

Farklı gıda örneklerinden (et ve sebze) izole edilen *Pseudomonas* izolatlarının 16S rRNA analizi sonucunda *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas migulae*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Pseudomonas chicorii*'e ait oldukları belirlenmiştir (Franzetti ve Scarpellini, 2007).

Yapılan bir çalışmada sığır eti (114), taze balık (45) ve tütülenmiş balık (30) içeren farklı hayvansal ürünlerden izole edilen 225 izolatlardan 204 tanesinin (%91,1) *P. aeruginosa* olduğu 16sRNA analizi ile tespit edilmiştir (Benie et al., 2017).

**Çizelge 4.4.** 16S rRNA tam sekans analizi ile tanımlanan süttten izole edilen bakteriler

Örnekler	Tanımlanan Bakteri	Blast Benzerliği	Accession Number	İzolatların İsimlendirilmesi
Süt 10.1	<i>P. aeruginosa</i>	%98	KC237280.1	<i>P. aeruginosa</i> RM10
Süt 11.2	<i>P. aeruginosa</i>	%98	KX744459.1	<i>P. aeruginosa</i> RM11
Süt 18.1	<i>P. aeruginosa</i>	%99	FJ972527.1	<i>P. aeruginosa</i> RM18
Süt 19.1	<i>P. aeruginosa</i>	%96	JQ659896.1	<i>P. aeruginosa</i> RM19
Süt 21.2	<i>P. aeruginosa</i>	%99	MN985505.1	<i>P. aeruginosa</i> RM21
Süt 22.2	<i>P. aeruginosa</i>	%98	MK045608.1	<i>P. aeruginosa</i> RM22
Süt 23.1	Tanımlanamadı	-	-	
Süt 24.2	<i>P. aeruginosa</i>	%99	MT043903.1	<i>P. aeruginosa</i> RM24
Süt 26.2	Tanımlanamadı	-	-	
Süt 29.1	<i>P. aeruginosa</i>	%99	JQ657724.1	<i>P. aeruginosa</i> RM29
Süt 16.2	<i>P. aeruginosa</i>	%98	KY412444.1	<i>P. aeruginosa</i> RM16
Süt 30.1	<i>P. aeruginosa</i>	%100	MK123308.1	<i>P. aeruginosa</i> RM30
Tavuk 3.1	<i>Aeromonas caviae</i>	%90		
Tavuk 5.1	<i>Aeromonas sobria</i>	%89		
Tavuk 9.1	<i>Aeromonas salmonicida</i>	%91		
Tavuk 14.1	<i>Aeromonas veronii</i>	%100		
Tavuk 15.2	<i>Aeromonas salmonicida</i>	%97		
Tavuk 2.1	Tanımlanamadı	-		
Tavuk 19.2	Tanımlanamadı	-		
Tavuk 28.2	Tanımlanamadı	-		
Tavuk 34.1	Tanımlanamadı	-		
Tavuk 49.1	Tanımlanamadı	-		

Keskin ve Ekmekçi (2008), su (17 adet), bazı sebzeler (maydanoz, dereotu, marul, kabak, domates, turp, soğan, kereviz, havuç, lahana), sığır eti (16 adet), tavuk göğsü ve tavuk kanadı (11 adet), balık (6 adet), çiğ süt (19 adet) ve peynir (8 adet) örneklerinde *P. aeruginosa* varlığını tespit etmek amacıyla yaptıkları çalışmada çiğ süt ve et örneklerinde *P. aeruginosa* varlığını tespit etmişlerdir.

Başka bir çalışmada, süt ve süt ürünleri örneklerinden izole edilen 34 izolattan 26'sı (%76,5) *P. aeruginosa* olarak tanımlanmıştır. Bunlardan çiğ süt örneklerinden izole edilen 4 *Pseudomonas* izolatatının tamamı *P. aeruginosa* olarak belirlenirken, dondurma örneklerinden izole edilen 10 izolatatın 3'ünün (%30), peynir örneklerinden izole edilen 20 izolatatın 19'unun (%95) *P. aeruginosa* olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, et örneklerinden

izole edilen 120 *Pseudomonas* izolatının 31'inin (%28,5) de *P. aeruginosa* olduğu tespit edilmiştir (Aydın, 2010).

Farklı çalışmalarda, çiğ sütte *P. aeruginosa* varlığının %4 ile %76,5 arasında değiştiği bildirilmektedir (Cheung and Westhoff, 1983; Juffs, 1973; Mickova vd., 1989; Uraz ve Çıtak, 1998; Keskin ve Ekmekçi, 2008; Aydın, 2010).

Meng vd. (2017), soğukta muhafaza edilen çiğ sütlerden (n=88) *Pseudomonas* spp. izole (144 adet) ettiklerini ve bu izolatların büyük bir kısmının *P. fluorescens* (61 izolat) ve *P. fragi* (37 izolat) olduğunu bildirmişlerdir.

#### 4.2 Bakteriyofaj İzolasyonu

Bakteriyofajlar, toprak, su, canlı ve cansız yüzeyler ile taze ve işlenmiş gıdalar dahil olmak üzere tüm ortamlarda bulunabilirler. Bu zamana kadar yapılan çalışmalar incelendiğinde, *Pseudomonas*'a ait bakteriyofajların kanalizasyon (Knezevic vd. 2009; Karumidze vd. 2012; Kumari vd., 2009a), hastane (Essoh vd., 2015; Yuan vd., 2019;), mezbaha (Prasad vd., 2010) ve fabrika atık suları (Sillankorva vd., 2008; Adnan vd., 2020) ve doğal su kaynakları (Knezevic vd. 2009; Jagdale vd., 2019) gibi farklı ortamlardan; tavuk karkasları (Lopez, 2015), et, süt gibi (Tanaka vd., 2020; Whitman ve Marshall, 1971) farklı gıdalardan izole edildikleri tespit edilmiştir (López-Cuevas vd., 2019). Mevcut çalışmada, bakteriyofaj taraması için Niğde, Nevşehir ve Aksaray illerindeki farklı baraj, gölet, kanal, süt işletmesi atık suyu, kanalizasyon suyu ve mezbaha atık sularından örnekler alınmıştır. Bu aşamada toplam 36 örnek üzerinde tarama işlemi gerçekleştirilmiştir. *P. aeruginosa*'yı enfekte eden bakteriyofaj tarama sonuçları, Çizelge 4.5'te sunulmuştur.

Faj taramasının ilk aşamasında Aksaray, Nevşehir (Avanos ve Gülşehir) ve Niğde'de bulunan mezbahalardan toplanan atık sularda *P. aeruginosa* RM22, RM11, RM10, RM18 ve RM24 suşlarına karşı litik aktivite sahip fajlar tespit edilmiştir. İncelenen mezbaha atık su örneklerinde 19 farklı morfolojiye sahip bakteriyofaj tespit edilmiştir. Ancak bu örneklerden sekizi, plaklarının hem çok küçük olması hem de bulanık olmaları nedenleriyle kullanılmamıştır (Çizelge 4.5). Geriye kalan 11 bakteriyofaj örneği,

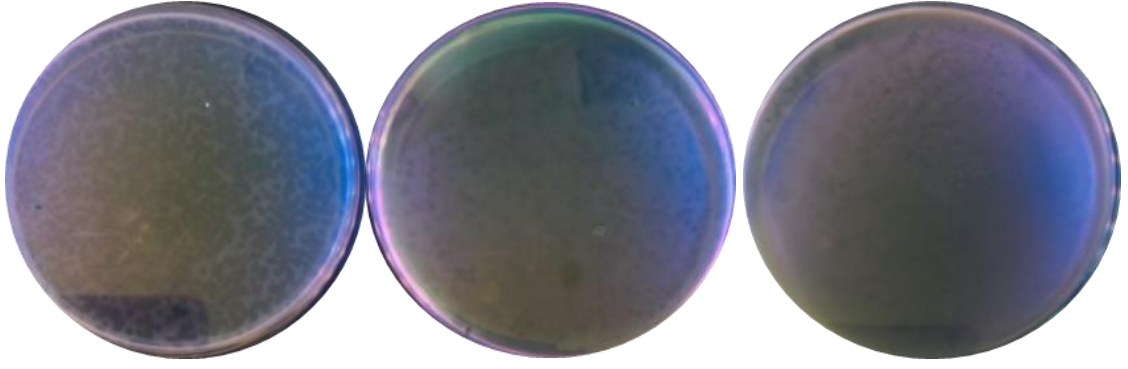
saflaştırılma işlemine tabi tutulmuştur. Aktivite gösteren örneklerden seri dilüsyonlar hazırlanmış ve saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir.

Bakteriyofaj taramasında kullanılan 6 adet süt fabrikası atık suyundan 12 adet faj izole edilmiştir fakat elde edilen 5 bakteriyofaj plağının çok küçük, geriye kalanların ise bulanık olmasından dolayı kullanılmamıştır (Şekil 4.1 ve Çizelge 4.5). *P. aeruginosa*'ya karşı gölet suyundan izole edilen örneklerde litik aktiviteye sahip faj tespit edilememiştir. Baraj sularında da litik aktiviteye sahip fajlar tespit edilmiştir. İncelenen kanalizasyon ve baraj sularından 85 adet faj izole edilmiştir. Bunlardan plak büyüklüğü ve litik aktivite bakımından uygun olan 24 adet bakteriyofaj seçilmiş ve seri dilüsyonlar hazırlanarak en az üç kez saflaştırma işlemine tabi tutulmuştur (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.5'te görüldüğü üzere, *P. aeruginosa*'ya karşı bakteriyofaj açısından kanalizasyon atık sularının etkili bir kaynak olduğu gözlenmiştir. Fajların genellikle parlak litik plak oluşturdukları ve aktivitelerinin yüksek olduğu görülmüştür.

Benzer şekilde Arumugam vd. (2018) de kanalizasyon sularının *P. aeruginosa* fajları açısından iyi bir kaynak olduğunu tespit etmişlerdir. *P. aeruginosa* PAO1, *P. aeruginosa* ATCC 9027 ve klinik suşlara karşı Hindistan'daki kanalizasyon sularından toplanan 32 farklı örnekten toplamda 94 bakteriyofaj izole etmişlerdir.

Knezevic vd. (2009), ırmak, kanal, gölet, toprak, kanalizasyon ve hayvan fecesinden aldıkları örneklerde *P. aeruginosa*'ya karşı etkili fajları sadece ırmak, göl ve kanalizasyon sularında tespit ettiklerini ve kanalizasyon sularının faj açısından daha iyi bir kaynak olduğunu belirtmişlerdir. *Pseudomonas*'a özgü fajların, sulu ekosistemlerde çok daha fazla olduklarını ifade etmişlerdir. Karumidze vd. (2012), Ong vd. (2020), Menon vd. (2021) ve Oliveira vd. (2020), *P. aeruginosa*'ya spesifik fajları kanalizasyon suyundan izole ettiklerini bildirmişlerdir.



**Şekil 4.1.** Süt fabrikası atık suyundan izole edilen bakteriyofajların görüntüleri



**Çizelge 4.5.** Niğde, Nevşehir ve Aksaray'dan toplanan atık su örneklerinden *Pseudomonas aeruginosa* suşlarına karşı bakteriyofaj tarama sonuçları

Atık Su	<i>P. aeruginosa</i> suşları									
	RM22	RM11	RM10	RM19	RM18	RM29	RM30	RM16	RM24	RM21
Baraj-1	-	+	+(kp)	+	+	-	-	-	-	-
Baraj-2	-	-	+	+(kp)	-	+(kp)	-	+/-	+	-
Baraj-3	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Baraj-4	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
Gölet	-	+/-	-	-	-	+/-	-	-	-	-
Süt İşletmesi-1	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-
Süt İşletmesi-2	+(kp)	+/-	-	-	-	-	-	-	-	+(kp)
Süt İşletmesi-3	-	+/-	+	-	-	-	-	-	-	-
Süt İşletmesi-4	-	+(kp)	-	+/-	+(kp)	-	-	+/-	-	-
Süt İşletmesi-5	-	-	-	-	-	-	-	+(kp)	-	-
Süt İşletmesi-6	-	+(kp)	-	-	-	-	-	-	-	-
Kanalizasyon-1	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
Kanalizasyon-2	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
Kanalizasyon-3	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+
Kanalizasyon-4	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
Kanalizasyon-5	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+
Kanalizasyon-6	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-
Kanalizasyon-7	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+
Kanalizasyon-8	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
Kanalizasyon-9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Kanalizasyon-10	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
Kanalizasyon-11	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+
Kanalizasyon-12	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Kanalizasyon-13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Kanalizasyon-14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kanalizasyon-15	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+
Kanalizasyon-16	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Mezbaha-1	+	+	+	-	+(kp)	-	-	-	-	-	-
Mezbaha-2	-	+(kp)	-	-	+(kp)	-	-	-	-	-	-
Mezbaha-3	+	+	+	-	+(kp)	-	-	-	-	-	-
Mezbaha-4	-	+(kp)	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Mezbaha-5	-	+	+(kp)	-	+	-	-	-	-	-	-
Mezbaha-6	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Mezbaha-7	-	-	+/-	-	-	+/-	-	-	-	-	-

+ kuvvetli faj aktivitesi, +/-, bulanık veya zayıf faj aktivitesi; kp, çok küçük plaklar; - faj aktivitesi yok

**Çizelge 4.6.** Bakteriyofajların tarandığı ortamlar ve elde edilen izolat sayıları

Çalışılan Materyal	Örnek Sayısı	Faj Sayısı	Çalışmaya Devam Edilen Bakteriyofaj Sayısı
Baraj suyu	4	29	2
Gölet	1	2	0
Mezbaha atık suyu	7	19	11
Süt Fabrikası atık suyu	6	12	0
Kanalizasyon suyu	16	59	22
<b>TOPLAM</b>	<b>34</b>	<b>121</b>	<b>35</b>

### **4.3 Atık Sulardan İzole Edilen Bakteriyofaj Örneklerinin Saflaştırılması ve Faj Titreleri**

Bir örnekteki faj titresinin belirlenmesi, ilgili fajın incelenmesinde önemli bir adımdır. Bakteriyel enfeksiyon için uygun dozajda faj seçmek, faj montaj reaksiyonlarının etkinliğini in-vitro analiz etmek ve oluşturulmuş bir döngüdeki birincil rekombinant fajların sayısını tespit etmek önemlidir. Yaygın bir belirleme yöntemi olarak kullanılan plak deneyi, çeşitli seyreltme aşamalarında test numunelerinde bulunan faj sayısını tespit etmek için kullanılmaktadır (Yang., vd. 2016).

Çalışmamızda, seçilen 35 litik bakteriyofaj tek plak yöntemiyle saflaştırılıp faj stokları oluşturulmuş ve %20 gliserol içeren çözeltide  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir. Saflaştırılan faj izolatlarının titreleri çift tabaka agar plak metoduyla belirlenmiş ve Çizelge 4.7'de sunulmuştur. Saflaştırılan faj örneklerin titrelerinin  $9,6 \times 10^6$ - $8,0 \times 10^{10}$  pob/mL arasında değiştiği tespit edilmiştir.

### **4.4 Fajların Etki Ettiği Konakçı Aralıkları**

Bakteriyofajlar, zorunlu hücre içi parazitlerdir ve diğer herhangi bir virüs grubu gibi konakçıya özgüdürler. Bu nedenle yalnızca bakteri hücrelerini enfekte ederler. Fajların özgünlüğü, viral reseptörlerinin bakteriyel reseptörlerle olan etkileşiminden kaynaklanır. Polisakkaritler, lipopolisakkaritler, proteinler, peptidoglikan, murein, teikoik asit, kapsül proteinleri, pili ve flagella gibi bakteriyel moleküller, fajın konakçı ile olan etkileşimini sınırlandırabilirler. Konakçı bakteriyofaj aralığı, tür veya tür düzeyinde olduğu kadar dar veya cins veya sınıf düzeyinde olduğu kadar geniş olabilir (López-Cuevas vd., 2019). Bakteriyofajlar genellikle dar bir konakçı aralığı sergilerler. Bu durum, çoğunlukla bir bakteri cinsi ile sınırlıdır. Ancak, bir cins içindeki sınırlı sayıda türle veya bir tür içindeki sınırlı sayıda bakteri suşu ile de sınırlı olabilmektedir (Jarvis vd., 1991). Biyolojik kontrol uygulamaları için en iyi virülant bakteriyofajlar, mümkün olan en geniş konakçı aralığına sahip olanlardır. Bunlar, genellikle bir bakteri cinsi içindeki birçok türe karşı aktif olduklarından polivalent bakteriyofajlar veya geniş konakçı aralıklı (WHR) bakteriyofajlar olarak adlandırılırlar. Böylece, gıdalardaki veya diğer ortamlardaki belirli cinsi özel olarak hedeflemek ve ortadan kaldırmak için uygulanabilirler (EFSA, 2009).

**Çizelge 4.7.** Saflaştırılan bakteriyofaj örneklerinin titreleri

<b>Faj Örneği</b>	<b>Fajın Adlandırılması</b>	<b>Konak Hücresi</b>	<b>Stok Faj Örneklerinin Titresi (pob/mL)</b>
Baraj-3	vB_Pae-B3	<i>P. aeruginosa</i> RM21	$5,5 \times 10^8$
Baraj-4	vB_Pae-B4	<i>P. aeruginosa</i> RM21	$8,0 \times 10^{10}$
Kanalizasyon-1	vB_Pae-K1	<i>P. aeruginosa</i> RM16	$8,5 \times 10^9$
Kanalizasyon-1	vB_Pae-K2	<i>P. aeruginosa</i> RM30	$6,6 \times 10^8$
Kanalizasyon-1	vB_Pae-K3	<i>P. aeruginosa</i> RM16	$5,0 \times 10^9$
Kanalizasyon-2	vB_Pae-K4	<i>P. aeruginosa</i> RM22	$4,0 \times 10^9$
Kanalizasyon-3	vB_Pae-K5	<i>P. aeruginosa</i> RM11	$3,2 \times 10^9$
Kanalizasyon-3	vB_Pae-K6	<i>P. aeruginosa</i> RM16	$3,6 \times 10^8$
Kanalizasyon-3	vB_Pae-K7	<i>P. aeruginosa</i> RM11	$2,5 \times 10^8$
Kanalizasyon-3	vB_Pae-K8	<i>P. aeruginosa</i> RM21	$3,1 \times 10^8$
Kanalizasyon-5	vB_Pae-K9	<i>P. aeruginosa</i> RM16	$4,0 \times 10^7$
Kanalizasyon-5	vB_Pae-K10	<i>P. aeruginosa</i> RM11	$1,4 \times 10^{10}$
Kanalizasyon-6	vB_Pae-K11	<i>P. aeruginosa</i> RM21	$2,2 \times 10^8$
Kanalizasyon-6	vB_Pae-K12	<i>P. aeruginosa</i> RM22	$5,0 \times 10^9$
Kanalizasyon-7	vB_Pae-K13	<i>P. aeruginosa</i> RM24	$4,0 \times 10^8$
Kanalizasyon-7	vB_Pae-K14	<i>P. aeruginosa</i> RM30	$7,0 \times 10^8$
Kanalizasyon-9	vB_Pae-K15	<i>P. aeruginosa</i> RM11	$4,7 \times 10^8$
Kanalizasyon-9	vB_Pae-K16	<i>P. aeruginosa</i> RM11	$1,3 \times 10^8$
Kanalizasyon-12	vB_Pae-K17	<i>P. aeruginosa</i> RM24	$3,7 \times 10^8$
Kanalizasyon-15	vB_Pae-K18	<i>P. aeruginosa</i> RM21	$1,0 \times 10^{10}$
Kanalizasyon-15	vB_Pae-K19	<i>P. aeruginosa</i> RM10	$4,0 \times 10^7$
Kanalizasyon-15	vB_Pae-K20	<i>P. aeruginosa</i> RM21	$3,0 \times 10^9$
Kanalizasyon-16	vB_Pae-K21	<i>P. aeruginosa</i> RM21	$1,7 \times 10^8$
Kanalizasyon-16	vB_Pae-K22	<i>P. aeruginosa</i> RM16	$2,0 \times 10^8$
Mezbaha-1	vB_Pae-M1	<i>P. aeruginosa</i> RM11	$9,0 \times 10^6$
Mezbaha-1	vB_Pae-M2	<i>P. aeruginosa</i> RM21	$1,6 \times 10^7$
Mezbaha-1	vB_Pae-M3	<i>P. aeruginosa</i> RM11	$9,0 \times 10^6$
Mezbaha-1	vB_Pae-M4	<i>P. aeruginosa</i> RM22	$1,9 \times 10^7$
Mezbaha-5	vB_Pae-M5	<i>P. aeruginosa</i> RM18	$3,0 \times 10^7$
Mezbaha-5	vB_Pae-M6	<i>P. aeruginosa</i> RM24	$4,2 \times 10^7$
Mezbaha-5	vB_Pae-M7	<i>P. aeruginosa</i> RM24	$4,6 \times 10^7$
Mezbaha-5	vB_Pae-M8	<i>P. aeruginosa</i> RM24	$4,1 \times 10^7$
Mezbaha-6	vB_Pae-M9	<i>P. aeruginosa</i> RM18	$4,0 \times 10^7$
Mezbaha-3	vB_Pae-M10	<i>P. aeruginosa</i> RM11	$3,0 \times 10^7$
Mezbaha-4	vB_Pae-M11	<i>P. aeruginosa</i> RM18	$3,0 \times 10^7$

Bir faj, reseptörlere erişemez hale gelirse veya faj, reseptör bağlayıcı proteine (RBP) tamamlayıcı olmazsa bakteriyel konağı etkili bir şekilde enfekte etme yeteneğini kaybeder. Sonuç olarak reseptörler, bakteriyofaja duyarsız mutant (BIM) suşların ortaya çıkmasında önemli bir rol oynar. BIM'lerin gelişimini en aza indirmek için son çalışmalarda, bakteri suşu bir faja duyarlı değilse veya bir faja direnç geliştirirse, formüle edilen başka bir faj tarafından parçalanacağı varsayılarak, aralarında farklı reseptör bağlayıcı proteinler içeren fajlar dikkate alınır. Ancak, fajların diğer hedef olmayan bakterileri ortadan kaldırmamasına da dikkat edilmelidir. Bu anlamda bazı endişeler söz konusudur. Örneğin; çok değerlikli fajların kullanılması, ortamdan gelen doğal bakteriyel mikrobiyota üzerinde olası olumsuz etkilere sahip olabilir. Çok değerlikli fajların bir başka olası dezavantajı da BIM'ler geliştirebilmeleridir (López-Cuevas vd., 2019). Bu bağlamda BIM'lerin oluşumu, bakteriyofajların biyokontrol ajanları olarak kullanılmasının uzun vadeli etkinliğini tehlikeye atabilecek bir olgudur (Galarce vd., 2016).

Faj izolatlarının uygun biyokontrol adayları olup olmadığını belirlemek için en ideal yöntem, iyi tanımlanmış bir bakteri koleksiyonunun (konakçı aralığı analizi) suşlarına karşı bakteriyofajların test edilmesidir. Faj tedavisi ve biyokontrol çalışmalarında çok sayıda bakteri türünü öldürebilen geniş bir konakçı aralıklı faj, geniş spektrumlu bir antibiyotiğe eşdeğer niteliktedir (Mkwata vd., 2021).

Çalışmamızda, saflaştırma işlemine tabi tutulan toplamda 35 adet bakteriyofaj örneğinin etki ettiği konakçı spektrumunu belirlemek için, *P. aeruginosa* suşları ve kültür koleksiyonumuzda bulunan *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersenia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Bacillus* ve *Enterococcus*'un farklı tür veya suşları test bakterileri olarak kullanılmıştır. Diğer bir ifade ile izole edilen bakteriyofajlar, konakçı aralığı aktivitelerinin tespit edilmesi amacı ile 13 tanesi *P. aeruginosa* suşu olmak üzere toplam 49 bakteri suşuna karşı test edilmiştir. *P. aeruginosa*'ya özgü fajların konak hücre aralık sonuçları Çizelge 4.8-4.11'de verilmiştir.

Çizelge 4.8'de görüldüğü üzere, izole edilen fajların hiçbirisinin *P. aeruginosa* KÜ, ATAÜ1 ve ATAÜ2 suşlarına karşı enfektif olmadıkları belirlenmiştir. En yüksek konakçı aralığına sahip olan fajların, vB\_Pea-K6, vB\_PeaK10 ve vB\_PeaK13 olduğu ve bunları sırasıyla vB\_Pea-K8 ve vB\_Pae-K20 fajlarının takip ettiği gözlenmiştir. vB\_Pea-K6,

vB\_Pea-K10 ve vB\_PeaK13 fajlarının test edilen 13 farklı *P. aeruginosa* suşlarından 10 tanesi (%76,92), vB\_Pea-K8 fajının 9 tanesi (%69,23), vB\_Pea-K20 fajının ise 8 tanesi (%61,54) üzerinde litik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. İzole edilen üç fajın 7, altı fajın 6, bir fajın 5, üç tanesinin ise 4 farklı *P. aeruginosa* suşlarına karşı etkili oldukları tespit edilmiştir (Çizelge 4.8). vB\_Pae-B3, vB\_PeaM1, vB\_Pea-M5 ve vB\_Pae-K15 fajlarının *P. aeruginosa* suşlarına ilaveten *Salmonella enteritidis* MET-S1-742'ye, vB\_Pae-M6, M7 ve M11 fajlarının ise *E. coli* O157:H7 ATT 35150'ye karşı enfektif etkiye sahip oldukları belirlenmiştir (Çizelge 4.9). İzole edilen hiçbir fajın *Salmonella typhimurium* ve diğer test edilen *Salmonella enterica* serovarları ile diğer Gram-negatif ve Gram-pozitif bakteriler üzerine etkili olmadıkları tespit edilmiştir (Çizelge 4.10 ve 4.11). Kanalizasyon suyundan izole edilen fajların konakçı aralığının daha geniş olduğu görülmüştür (Çizelge 4.8).

BrSP1 fajının test edilen 37 farklı *P. aeruginosa* suşunun 19'una (%51,4) karşı litik aktivite sergilediği belirtilmiştir (Melo vd., 2019).

Arumugam vd. (2018) tarafından yapılan bir çalışmada izole edilen 94 fajdan sadece AP025 ve AP006 fajlarının MDR *P. aeruginosa* suşlarına karşı iyi aktivite gösterdikleri ve analiz edilen suşların %30 ile %39,2'sine karşı etkili oldukları belirlenmiştir.

19 farklı *Pseudomonas* fajının, test edilen 33 farklı *P. aeruginosa* suşlarının 5 ile 26 tanesini enfekte ettiği bildirilmiştir. Fajlardan  $\delta$  ve 001A fajlarının en geniş spektruma sahip olduğu ve *P. aeruginosa* suşlarının sırasıyla %72,7 ve %75,8'ini enfekte ettiği bildirilmiştir (Knezevic vd., 2009). *Pseudomonas*'a özgü  $\phi$ KMV ve LKD16 fajlarının, sırasıyla 74 adet *P. aeruginosa* suşlarının %2 ve %5'inde plak oluşturabildiği belirtilmiştir (Ceysens vd., 2006). Ong vd., (2020),  $\phi$ A01 ve  $\phi$ A02 fajlarının, sırasıyla klinik *P. aeruginosa* suşlarının (58 adet) %36,2 (%27,29'sında berrak, %8,62'sinde bulanık plak) ve %48,82'sini (%20,69'sında berrak, %24,14'sinde bulanık plak) enfekte ettiğini bildirmişlerdir.

*P. aeruginosa*'ya spesifik olan AM.P2 fajının, konak hücresi dışında test edilen Gram negatif bakterilerden *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Acinetobacter baumannii*'ye, Gram pozitif *Staphylococcus aureus*'a karşı enfektif etkiye sahip olmadığı belirtilmiştir (Menon vd., 2021).

Bu tez çalışmasında konak hücre aralığı en geniş ve litik aktivitesinin daha iyi olduğu belirlenen vB\_Pea-K10 ve vB\_Pea-K13 fajları, karakterize etmek ve gıdaya uygulamak maksatlarıyla seçilmiş ve çalışmanın bundan sonraki aşamalarında kullanılmıştır (Şekil 4.2).

#### 4.5 vB\_Pea-K10 ve vB\_Pea-K13 Fajlarının Morfolojik Özellikleri

Litik (virülant) fajlar, konak hücrelerine karşı tipik berrak plaklar oluştururken konakçı hücreleri (ılıman fajlar) lizogenize etme yeteneği gösterebilen fajlar, bulanık plaklar oluştururlar (Hyman, 2019).

vB\_Pea-K10 ve vB\_Pea-K13 fajlarının morfolojik özelliklerini ortaya koymak amacıyla oluşturdukları plak yapısı incelenmiş ve TEM analizi gerçekleştirilmiştir. Her iki fajın konak hücrelerine karşı gösterdiği plakların berrak olduğu ancak boyutlarının farklı olduğu gözlenmiştir. Dijital kumpasla yapılan ölçümde vB\_Pae-K13 fajının plak çapının  $3,47\pm 0,09$  mm, vB\_Pae-K10 fajının plak çapının ise  $1,49\pm 0,05$  mm olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.2). Fajların berrak plaklar oluşturması fajların litik karaktere sahip olduklarını göstermektedir.

Knezevic vd. (2009), kanalizasyon, göl ve ırmaktan izole edilen 19 adet *P. aeruginosa*'ya özgü fajların plak çaplarının 0,5-5,0 mm arasında değiştiğini ve bazı fajların plaklarında halelerin olduğunu ifade etmişlerdir. vB\_PaeM\_USP\_1, vB\_PaeM\_USP\_2, vB\_PaeM\_USP\_3, vB\_PaeM\_USP\_18 ve vB\_PaeM\_USP\_25 fajlarının berrak plaklar oluşturdukları ve plak çaplarının 0,8-2,4 mm arasında değiştiği belirtilmiştir (Oliveira vd., 2020).

Hastane atık suyundan izole edilen *P. aeruginosa*'ya özgü fajların turbit ve berrak plaklar oluşturdukları ve plak çaplarının 1,0-3,0 mm arasında değiştiği belirtilmiştir (Pires vd., 2011). Jurczak-Kurek vd. (2016) yaptıkları çalışmada izole ettikleri *P. aeruginosa* fajlarının çaplarının 1-2 mm arasında olduğunu belirtmişlerdir. Genel bir değerlendirme yapıldığında, faj plaklarının fajdan faj ve test edilen konak hücreye bağlı olarak farklılık sergilediği görülebilmektedir.

**Çizelge 4.8.** İzole edilen fajların farklı *P. aeruginosa* suşlarına karşı enfektif etkileri

	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>												
	RM22	RM10	RM18	RM11	RM30	RM21	RM24	RM29	RM16	RM19	KÜ	ATAÜ1	ATAÜ2
vB_Pae-B3	+	-	+*	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-
vB_Pae-B4	+*	+	+*	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-
vB_Pae-M1	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-M2	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-
vB_Pae-M3	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-M4	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-M5	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-M6	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
vB_Pae-M7	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
vB_Pae-M8	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-M9	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-M10	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-M11	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K1	-	+	+*	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
vB_Pae-K2	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-
vB_Pae-K3	+*	+	+	+	+	+	+	+*	-	+	-	-	-
vB_Pae-K4	-	+	-	-	+*	+*	-	+	+	-	-	-	-
vB_Pae-K5	+	+	+*	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
vB_Pae-K7	+	+	+*	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-
vB_Pae-K8	+	+	+	+	+*	+	+	+	+	+	-	-	-
vB_Pae-K9	-	+	+	+	+*	+	+	+	-	+	-	-	-
vB_Pae-K10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

vB_Pae-K11	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-
vB_Pae-K12	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
vB_Pae-K13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
vB_Pae-K14	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
vB_Pae-K15	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K16	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K17	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-
vB_Pae-K18	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-
vB_Pae-K19	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
vB_Pae-K20	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-
vB_Pae-K21	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-
vB_Pae-K22	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-

+, berrak litik plak; +\*, bulanık plak; -, plak oluşumu yok;  
KÜ, Kırklareli Üniversitesi; ATAÜ, Atatürk Üniversitesi

**Çizelge 4.9.** İzole edilen fajların farklı *E. coli* ve *Salmonella enteritidis* suşlarına/serovarlarına karşı enfektif etkileri

	<i>E.coli</i> O157:H7					<i>E. coli</i>				<i>Salmonella enteritidis</i>							
	25922	35150	43888	12900	AİBÜ	BC21	DCα	NÜ	CFAI	DM C3	DM C31	MET -S1-512	DMC8	DM C22	ATTC 13075	MET-S1-411	MET-S1-742
vB_Pae-B3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
vB_Pae-B4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-M1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
vB_Pae-M2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
vB_Pae-M3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
vB_Pae-M4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
vB_Pae-M5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

vB_Pae-M6	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-M7	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-M8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-M9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
vB_Pae-M10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-M11	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
vB_Pae-K16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+, berrak litik plak; +\*, bulanık plak; -, plak oluşumu yok;

**Çizelge 4.10.** İzole edilen fajların farklı *Salmonella typhimurium* ve diğer *Salmonella enterica* serovarlarına karşı enfektif etkileri

	<i>Salmonella typhimurium</i>				S. Telavis DMCG2	S. Infantis DMC20	S. Thomson DMC 47	S. Carvalis DMC 86	S. Anatum DMC90	S. Montevide DMC81	S. Virchow DMC8	S. Kentucky DMC35
	Tr90	SR II	Tr87	ATTC 14028								
vB_Pae-B3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-B4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-M1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-M2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-M3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-M4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-M5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-M6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-M7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-M8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-M9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-M10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-M11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

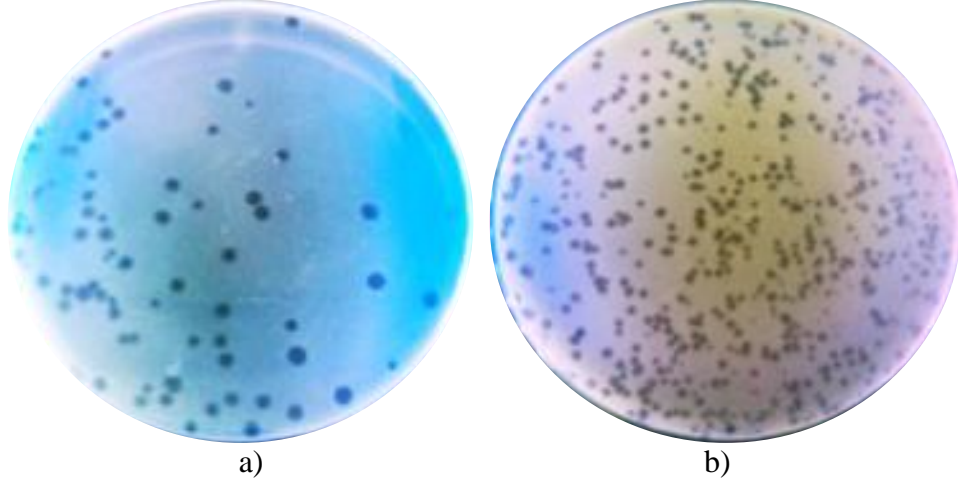
vB_Pae-K12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Çizelge 4.11.** İzole edilen fajların diğer bazı Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilere karşı enfektif etkileri

	<i>Enterobacter aerogenes</i> AÜ	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9 AÜ	<i>Citrbacter ferundi</i> AÜ	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC92212	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10875	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923
vB_Pae-B3	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-B4	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-M1	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-M2	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-M3	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-M4	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-M5	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-M6	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-M7	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-M8	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-M9	-	-	-	-	-	-	-

vB_Pae-M10	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-M11	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K1	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K2	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K3	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K4	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K5	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K6	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K7	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K8	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K9	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K10	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K11	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K12	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K13	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K14	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K15	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K16	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K17	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K18	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K19	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K20	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K21	-	-	-	-	-	-	-
vB_Pae-K22	-	-	-	-	-	-	-

+, berrak litik plak; +\*, bulanık plak; -, plak oluşumu yok;  
AÜ, Ankara Üniversitesi



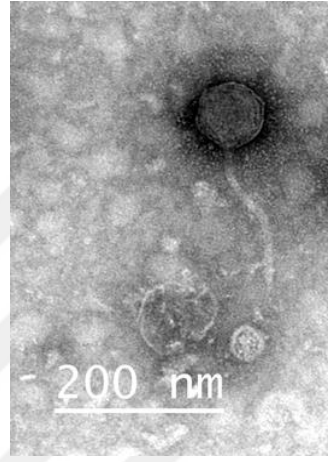
**Şekil 4.2.** vB\_Pea-K13 (a) ve vB\_Pea-K10 (b) fajlarının konuk hücreleri RM24 ve RM11'e karşı oluşturdukları plak görüntüleri

Fajların virion morfolojisi, elektron mikroskobu ile incelenmektedir. Ancak, ipliksi fajların yalnızca mikroskopik analiz temelinde tanımlanmasının zor olması ve diğer filamentlerle karıştırılma riski nedenleriyle yalnızca kuyruklu viral parçacıkların elektron mikroskobunda incelenmesi daha uygun olmaktadır. Ayrıntılı sınıflandırma için belirlenen parametreler: kafa çapı, kuyruğa dik genişlik, kafa uzunluğu, kuyruk çapı ve kuyruk uzunluğudur (Jurczak-Kurek, 2016).

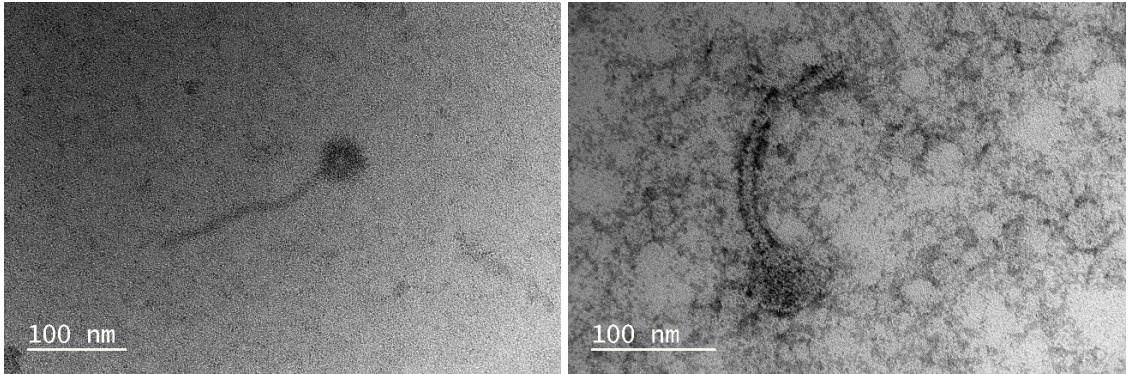
Kuyruklu fajların olumsuz koşullarda en kararlı grup olduğu, kasılabilen, kasılmayan veya kısa kuyruklu fajlar arasında duyarlılık açısından önemli bir fark olmadığı belirtilmektedir. Ayrıca, büyük kapsitli (100 nm çapında) fajların kapsit çapı 60 nm olan fajlardan daha iyi hayatta kaldığı bildirilmektedir (Ackermann, 2004).

Transmisyon elektron mikroskobu kullanılarak yapılan inceleme sonucunda hem vB\_Pae-K10 fajının hem de vB\_Pae-K13 fajının *Caudovirales* takımı içinde uzun esnek kontraktıl olmayan kuyruğa sahip *Siphoviridae* ailesine ait oldukları belirlenmiştir (Şekil 4.3 ve 4.4). Fajların yapısal boyutlarının ölçümleri Çizelge 4.12'de verilmiştir. Çizelge 4.12 incelendiğinde vB\_Pae-K10 fajının, baş çapı ( $87,24 \pm 2,57$  nm) ve kuyruk genişliği ( $13,19 \pm 0,61$ ) bakımından vB\_Pae-K13 fajından ( $50,87 \pm 1,11$  nm ve  $11,91 \pm 0,46$  nm) daha büyük olduğu, kuyruk uzunluğu bakımından ise daha küçük ( $126,60 \pm 6,0$  nm karşı  $177,12 \pm 2,78$  nm) olduğu görülmüştür. Daha önce belirtildiği gibi, vB\_Pae-K10 fajı vB\_Pae-K13 fajından daha küçük plaklar oluşturmuştur. Bu durum, Jurczak-Kurek vd. (2016)'nin yaptıkları çalışmadan elde ettikleri bulgular ile uyum göstermektedir.

Genel kural olarak kuyruk uzunluğu <40 nm olan fajlar *Podoviridae*, uzun kuyruklu (>40) ve kuyruk çapı  $\geq 16$  nm olan fajlar *Myoviridae*, uzun kuyruklu (>40) ve kuyruk çapı <16 nm olanlar *Siphoviridae* olarak sınıflandırılmaktadır. *Myoviridae* ve *Siphoviridae* arasındaki diğer bir önemli farklılık ise kontraktıl ve kontraktıl olmayan kuyruk yapılarına sahip olmalarıdır (Ackermann, 1998). vB\_Pae-K10 ve vB\_Pae-K13 fajları *Siphoviridae* familyasının tipik özelliklerini taşımaktadırlar. *Siphoviridae* familyasına ait fajlar oldukları tespit edildiği için vB\_PaeS-K10 ve vB\_PaeS-K13 olarak yeniden adlandırılmışlardır.



Şekil 4.3. vB\_PaeS-K10 fajının elektron mikroskobu görüntüsü



Şekil 4.4. vB\_PaeS-K13 fajı elektron mikroskobu görüntüleri

*P. aeruginosa*'ya karşı enfektif olan fajların *Caudovirales* takımının *Myoviridae* (Yuan vd., 2019; Adnan vd., 2020; Arumugam vd., 2018; Gua vd., 2019; Oliveira vd., 2020; Ong vd., 2020), *Siphoviridae* (Jamal vd., 2017; Knezevic vd., 2009; Arumugam vd., 2018; Melo vd., 2019; Karumidze vd., 2012) ve *Podoviridae* (Knezevic vd., 2009;

Karumidze vd., 2012; Menon vd., 2021) familyasında yer aldığı birçok çalışmalarla ortaya konmuştur.

**Çizelge 4.12.** *P. aeruginosa* bakteriyofajlarının yapısal özelliklerine ait ölçümler

Bakteriyofaj Özelliği	vB_PaeS-K10	vB_PaeS-K13
Baş çapı (nm)	87,24±2,57	50,87±1,11
Kuyruk uzunluğu (nm)	126,60±6,0	177,12±2,78
Kuyruk kalınlığı (nm)	13,19±0,61	11,91±0,46

Knezevic vd. (2009), karakterize ettikleri yedi fajdan ikisinin ( $\delta$ , I) *Podoviridae*, beşinin (001A, J-2,  $\sigma$ -1,  $\sigma$ -3 ve J-3) ise *Siphoviridae* familyasına ait olduklarını belirtmişlerdir. *Siphoviridae* familyasına ait olan fajların baş büyüklüklerinin 61,27-8,25 nm, kuyruk uzunluklarının 113,32-258,13 nm ve kuyruk genişliklerinin 9,66-12,65 nm arasında olduğu bildirilmiştir.

*P. aeruginosa*'ya spesifik 5 farklı bakteriyofajın ikisinin (AP025 ve AP006) *Myoviridae*, üç fajın (AP002, AP067 ve AP084) ise *Siphoviridae* familyasına ait oldukları, *Myoviridae* ailesine ait olan fajların kapsit çaplarının 68 ve 63 nm, kuyruk uzunluklarının 108 ve 80 nm, kuyruk kalınlıklarının ise 9 nm olduğu bildirilmiştir. *Siphoviridae* ailesine ait olan fajların ise kafa çaplarının 60-63 nm aralığında, kuyruk uzunluklarının ise 110-136 nm aralığında olduğu bildirilmiştir (Arumugam vd., 2018).

vB\_PaeM\_LS1 bakteriyofajın *Myoviridae* ailesinde yer aldığı, 70 nm çapında bir izometrik kafaya ve 120 nm uzunluğunda kontraktıl kuyruğa sahip olduğu bildirilmiştir (Yuan vd., 2019).

*P. aeruginosa*-2995'in suşuna karşı enfektif olan AZ1 bakteriyofajın *Siphoviridae* ailesinin bir üyesi olduğu, baş genişliğinin 61 nm, baş uzunluğunun 49 nm, kuyruk uzunluğunun 128 nm ve kuyruk genişliğinin 10-15 nm olduğu belirtilmiştir (Jamal vd., 2017).

Yukarıda özetlenen çalışmalar incelendiğinde *P. aeruginosa* suşlarına karşı izole edilen bakteriyofajların baş çapı, kuyruk uzunluğu ve kalınlığı bakımından benzer morfolojik özellikler taşıdığı görülebilir. Bu tez çalışması kapsamında TEM mikroskopunda incelenen fajların, benzer şekilde literatür ile uyumlu morfolojik özelliklere sahip oldukları görülebilir (Çizelge 4.12).

#### 4.6 Bakteriyofaj DNA'sının Saflaştırılması ve Genom Büyüklüğü

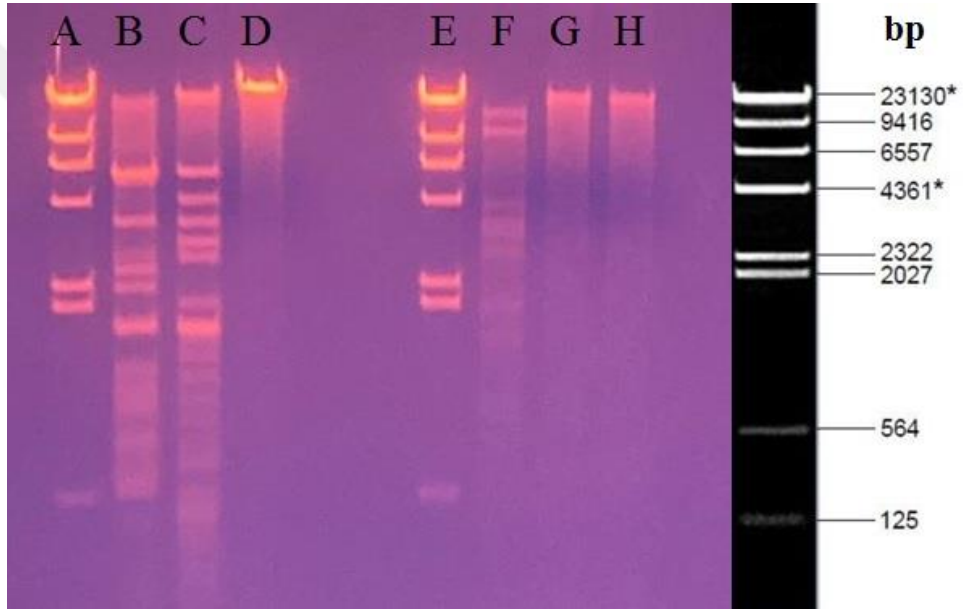
Faj DNA'sının kesilmesinin amacı, faj DNA'sının boyutunun belirlenmesidir. Çeşitli restriksiyon enzimleri kullanılarak yapılan bu işlem sonucunda, faj DNA uzunluğunu hesaplamada yardımcı olacak farklı bantlar elde edilmektedir. Restriksiyon endonükleazlar, kısa DNA dizilerini spesifik olarak tanıyan ve DNA'yı kesen enzimlerdir. Başlıca biyolojik işlevleri, konakçı genomunu yabancı DNA'ya (özellikle bakteriyofaj DNA'sına) karşı korumaktır. Restriksiyon enzimleri belirli bir nükleotit bölgesini tanır ve DNA'da çift zincirli bir kesik oluşturur. Tanınan nükleotit bölgesi dört veya sekiz baz dizisinden oluşur ve çoğunluğu palindromiktir (baz dizisi baştan sona ve sondan başa aynıdır) (Pingoud ve Jeltsch, 2001).

Bu tez çalışmasında bakteriyofajların moleküler karakterizasyonu için vB\_PaeS-K10 ve vB\_PaeS-K13 faj DNA örnekleri, *EcoRI*, *BamHI* ve *HindIII* restriksiyon enzimleri ile kesim işlemine tabi tutulmuştur. Jel elektroforez sonucuna göre bakteriyofajların, 54,20 kb ve 44,06 kb uzunlukta nükleik asite sahip oldukları belirlenmiştir. Kesim sonucunda *P. aeruginosa* faj DNA örneklerinin her ikisinin de *EcoRI*'e duyarlı olduğu ve her iki fajın da genetik olarak farklı olduğu belirlenmiştir. Fajların genetik materyal olarak dsDNA barındırdığını doğrulayan farklı bant uzunlukları sergilediği belirlenmiştir (Şekil 4.5). vB\_PaeS-K10 fajı, *EcoRI*'ın yanı sıra *HindIII* enzimi tarafından da kesilirken, *BamHI* enzimi tarafından kesilememiştir. vB\_PaeS-K13 örneği ise sadece *EcoRI* ile kesilebilmiş, *BamHI* ve *HindIII* restriksiyon enzimleri ile kesilmemiştir.

vB\_PaeS-K10 fajı *EcoRI* enzimi ile kesildiğinde 13 bant elde edilmiştir. Elde edilen bant büyüklükleri sırası ile; 22,36 kb, 6,0 kb, 5,60 kb, 3,94 kb, 3,20 kb, 2,80 kb, 2,40 kb, 1,90 kb, 1,55 kb, 1,40 kb, 1,30 kb, 1,0 kb ve 0,75 kb olup toplam genom büyüklüğü 54.20 kb olarak belirlenmiştir. Aynı faj *HindIII* enzimi ile kesildiğinde 13 bant elde edilmiştir. Elde edilen bant büyüklükleri sırası ile; 24,60 kb, 6,0kb, 4,33 kb, 3,85kb, 3,32 kb, 2,90 kb, 2,0

kb, 1,80 kb, 1,60 kb, 1,42 kb, 1,20 kb, 0,80 kb ve 0,40 kb olup toplam genom büyüklüğü 54,20 kb olarak belirlenmiştir. *Bam*HI enzimi ile kesildiğinde ise 1 bant elde edilmiş ve elde edilen bant büyüklüğünün 26,93 kb olduğu görülmüştür (Şekil 4.5).

vB\_PaeS-K13 fajı *Eco*R1 enzimi ile kesildiğinde 7 bant elde edilmiştir. Elde edilen bant büyüklükleri sırası ile; 17,79 kb, 11,70 kb, 4,20 kb, 3,57 kb, 3,05 kb, 2,0 kb ve 1,78 kb olup toplam genom büyüklüğü 44,06 olarak belirlenmiştir. Söz konusu faj *Hind*III ve *Bam*HI enzimleriyle kesildiğinde 1 bant elde edilmiş ve elde edilen bantların büyüklükleri sırasıyla 23,89 kb ve 23,13 kb olarak hesaplanmıştır. Bant büyüklükleri LabImage programı ile belirlenmiştir (Şekil 4.5).



**Şekil 4.5.** *P. aeruginosa* fajlarından izole edilen DNA'ların restriksiyon enzimleri ile kesilmesi sonucu elde edilen bant görüntüleri. A, *Hind*III enzimi ile kesilen  $\lambda$  DNA Markırı; B, *Eco*R1 ile kesilen vB\_PaeS-K10 fajı; C, *Hind*III ile kesilen vB\_PaeS-K10 fajı; D, *Bam*HI ile kesilen vB\_PaeS-K10 fajı; E, *Hind*III enzimi ile kesilen  $\lambda$  DNA Markırı; F, *Eco*R1 ile kesilen vB\_PaeS-K13 fajı; G, *Hind*III ile kesilen vB\_PaeS-K13 fajı; H: *Bam*HI ile kesilen vB\_PaeS-K13 fajı

Samal ve Nath (2015) yaptıkları bir çalışmada *P. aeruginosa* 'ya spesifik 11 bakteriyofajın DNA'larını *Eco*R1 ve *Hind*III restriksiyon enzimleri ile kesim işlemine tabi tutmuşlar ve sadece iki faj DNA'sının *Eco*R1 enzimi ile kesilebildiğini, diğer faj DNA'larının kesilmediğini ifade etmişlerdir. Ayrıca hiçbir faj DNA'sının *Hind*III enzimi ile kesilmediğini belirtmişlerdir. Ward vd. (1993), birçok bakteriyofajın DNA'sının

restriksiyon enzimlerinin faj DNA'sının kesilmesini engelleyecek şekilde modifiye edilmiş DNA içerdikleri için kesilemediğini ileri sürmektedirler.

PRΦL2 faj DNA'sı *EcoRI* ve *HindIII* enzimleri kesilme işlemine tabi tutulduğunda sırasıyla iki ve üç farklı bant oluştuğu ve genom büyüklüğünün 25.403 kb olduğu belirlenmiştir. SSΦL8 faj DNA'sı aynı enzimler ile kesildiğinde 3 farklı bant oluştuğu ve genom büyüklüğünün 29,877 kb olduğu bildirilmiştir. Bu şekilde elde edilen restriksiyon modelleri, fajların genetik olarak birbirinden farklı olduğunu göstermiştir (Jagdale vd., 2019).

*P. aeruginosa* PAO'ya özgü beş farklı fajın genom büyüklüklerinin 23,0-24,0 kb aralığında olduğu ve fajların hepsinin *HinfI* ve *BsuRI*'ye duyarlı oldukları, genetik materyal olarak dsDNA içerdikleri ve genetik olarak farklı oldukları belirtilmiştir (Kumari vd., 2009a).

Adnan vd. (2020), MA1 faj DNA'sının *EcoRI* restriksiyon enzimi ile kesilmesi sonucunda 1-20 kb arasında değişen farklı boyutlarda 5 bant oluştuğunu, genom büyüklüğünün yaklaşık 50 kb olduğunu ve fajın nükleik asit olarak dsDNA'ya sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Buzdik (2000), yaptığı çalışmada *P. aeruginosa*'ya spesifik #3 bakteriyofajının DNA'sının *BamHI*, *NotI*, *PstI*, *EcoRI*, *TaqI* ve *HindIII* restriksiyon enzimleri ile kesilemediğini ve genom büyüklüğünün 10-15 kb olduğunu belirtmişlerdir.

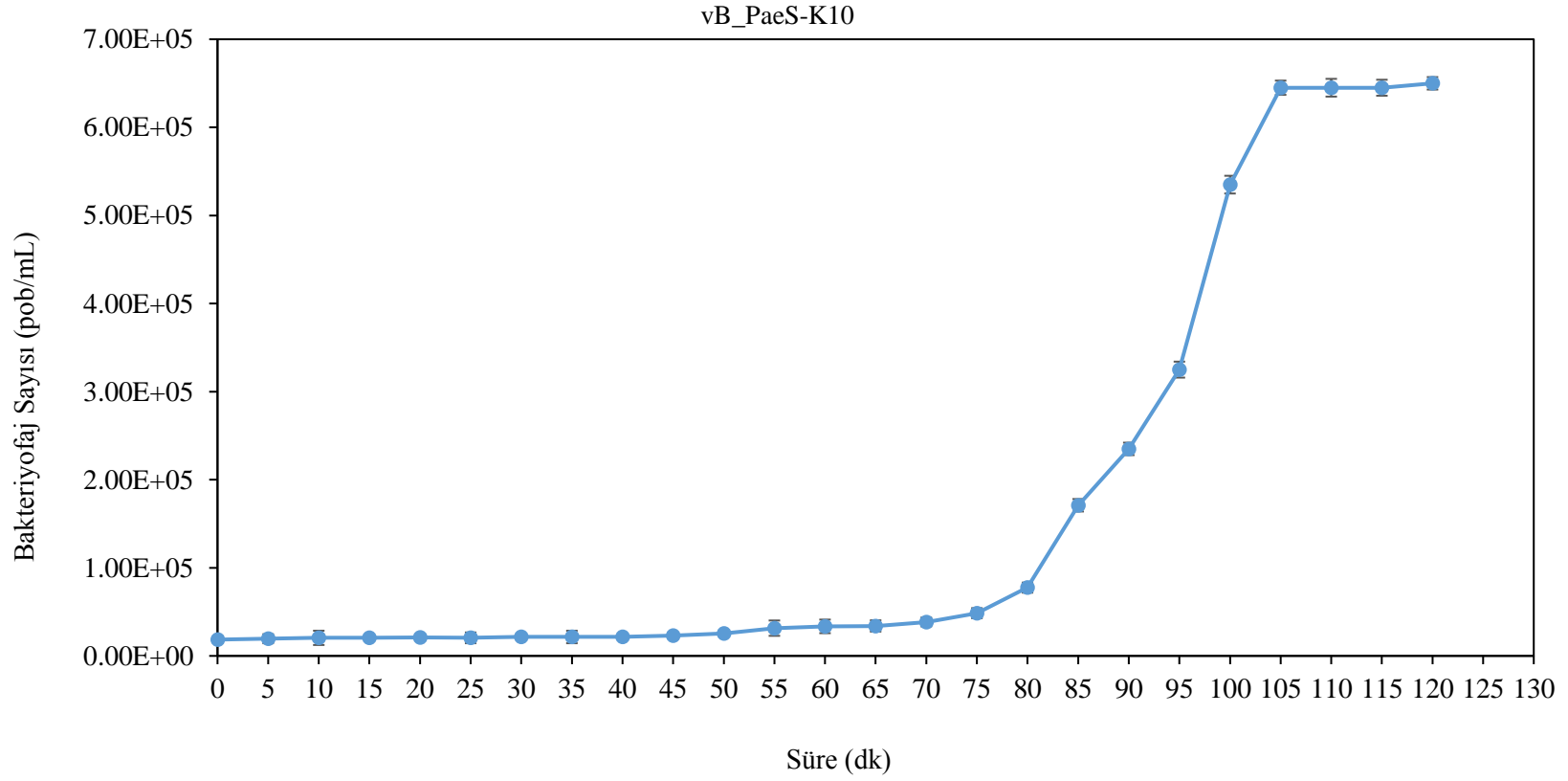
#### **4.7 Bakteriyofajların Tek Aşamalı Gelişim Kurveleri**

Tek aşamalı gelişim kurvesi, bakteriyofajların latent dönem, patlama zamanı ve patlama büyüklükleri hakkında bilgi vermektedir. Latent dönem, bakteriyofajın konakçıya bağlamasından yeni fajların ortama yayılmasına kadar geçen süreyi belirtir. Bu süre sonunda bakteri dışına yayılarak serbest hale gelen bakteriyofaj sayısının latent dönemin başlangıcında enfeksiyona maruz kalan bakteri sayısına oranı patlama büyüklüğüdür (Yordpratum vd., 2011). Tek aşamalı gelişim kurvesi iki bölümden oluşmaktadır. Bunlar; latent dönem ve lizis dönemdir. Latent dönem de 2 aşamayı kapsamaktadır. İlk aşama, eklips dönem olup faj bileşenlerinin ayrı ayrı sentezlendiği ve henüz bir araya gelmediği

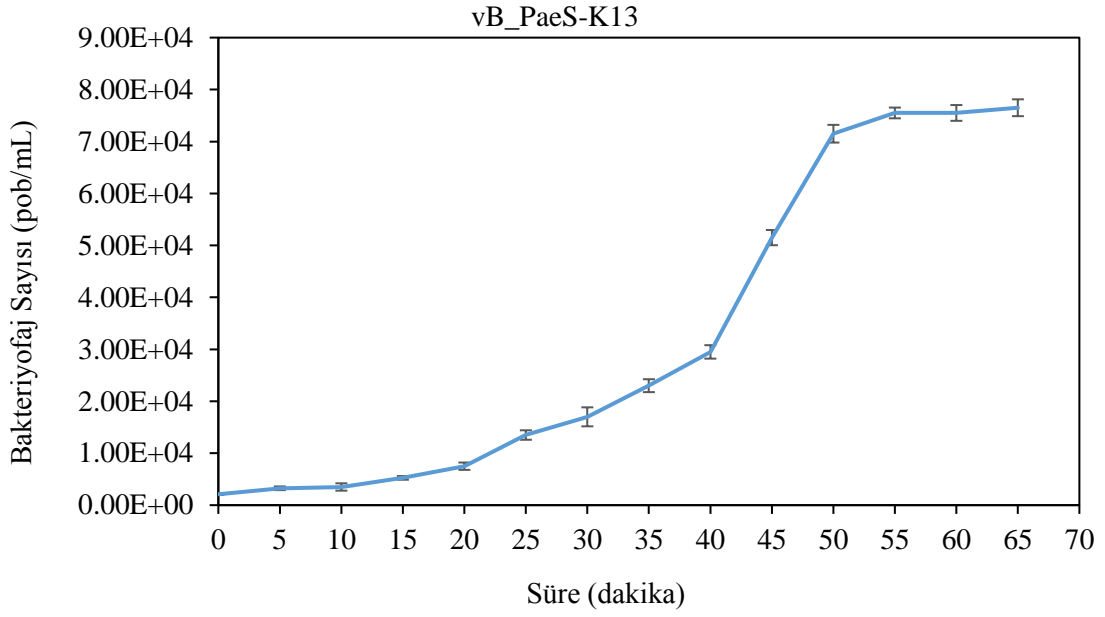
dönemdir. İkinci aşama ise montaj ya da olgunlaşma dönemi olup, faj bileşenlerinin bir araya toplandığı ve olgun faj partiküllerinin oluştuğu aşamadır. Liziz dönem, montajı tamamlanan olgun faj partiküllerinin litik enzimler ile hücreyi liziz ederek patlayıp dışarı salındığı dönemdir (Tunail, 2009).

vB\_PaeS-K10 ve vB\_PaeS-K13 fajlarının tek aşamalı gelişme kurveleri Şekil 4.6 ve 4.7’de, latent dönemleri, patlama zamanları ve patlama büyüklükleri ise Çizelge 4.13’de verilmiştir.





Şekil 4.6. vB\_PaeS-K10 fajı tek aşamalı gelişim kurvesi



Şekil 4.7. vB\_PaeS-K13 faji tek aşamalı gelişim kurvesi

Çizelge 4.13. Bakteriyofajların latent dönemleri, patlama zamanları ve patlama büyüklükleri

Bakteriyofaj	Latent Dönem (dk)	Patlama Zamanı (dk)	Patlama Büyüklüğü (pob/Hücre)
vB_PaeS-K10	75	30	34,86
VB_PaeS-K13	20	35	35,95

Çalışmamızda vB\_PaeS-K10 fajının latent periyodunun 75 dakika, patlama zamanının 30 dakika ve patlama büyüklüğünün 34,86 olduğu; vB\_PaeS-K13 faji için ise bu değerlerin sırasıyla 20, 35 dakika ve 35,95 olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.6 ve 4.7).

Whitman ve Marshall (1971), psikrofilik *Pseudomonas fragi*'ye özgü WY ve PSI fajlarının gelişim kurvelerini 7°C ve 20°C'de belirledikleri bir çalışmada, her iki fajın farklı büyüme kinetikleri gösterdiklerini saptamışlardır. 7°C'deki PSI fajının latent periyodunun 1,5-2 saat, WY fajını latent periyodunun ise 3,5-4 saat sürdüğü, patlama büyüklüklerinin ise sırasıyla 118 ve 529 olduğu belirlenmiştir. 20°C'de gerçekleştirilen tek aşamalı gelişim kurvesi deneylerinin, 7°C'deki değerlerden daha büyük patlama boyutları ve daha kısa latent periyotları gösterdiği tespit edilmiştir.

*P. aeruginosa*'ya spesifik MA-1 bakteriyofajının latent periyodu ve patlama boyutunun sırasıyla 30 dakika ve 330 viryon olduğu bildirilmiştir (Adnan vd., 2020). vB\_PaeM\_LS1 fajının latent süresinin yaklaşık olarak 30 dakika, ortalama patlama boyutunun 98 olduğu tespit edilmiştir (Yuan vd., 2019).

vB\_PaeM\_SCUT-S1. D S1 fajının latent periyodunun 40 dakika, patlama süresinin 10 dakika ve patlama sayısının 134 viryon, vB\_PaeM\_SCUT-S2 fajı için bu değerlerin sırasıyla 25 dakika, 30 dakika ve 40 viryon olduğu bildirilmiştir (Guo vd., 2019).

vB\_PaeS-K10 ve vB\_PaeS-K13 fajlarına benzer olarak vB\_PaeM\_USP\_1, vB\_PaeM\_USP\_2, vB\_PaeM\_USP\_3, vB\_PaeM\_USP\_18 ve vB\_PaeM\_USP\_25 fajlarının latent periyotlarının yaklaşık 30 dakika olduğu, patlama büyüklüklerinin 22 ile 46 faj partikülü arasında değiştiği belirtilmiştir (Oliveira vd., 2020). Patlama büyüklüğünün bakteriyel gelişme oranı ile ilişkili olduğu, bakteriyel gelişme hızı ile doğrusal olarak arttığı belirtilmektedir (Nabergoj vd., 2018).

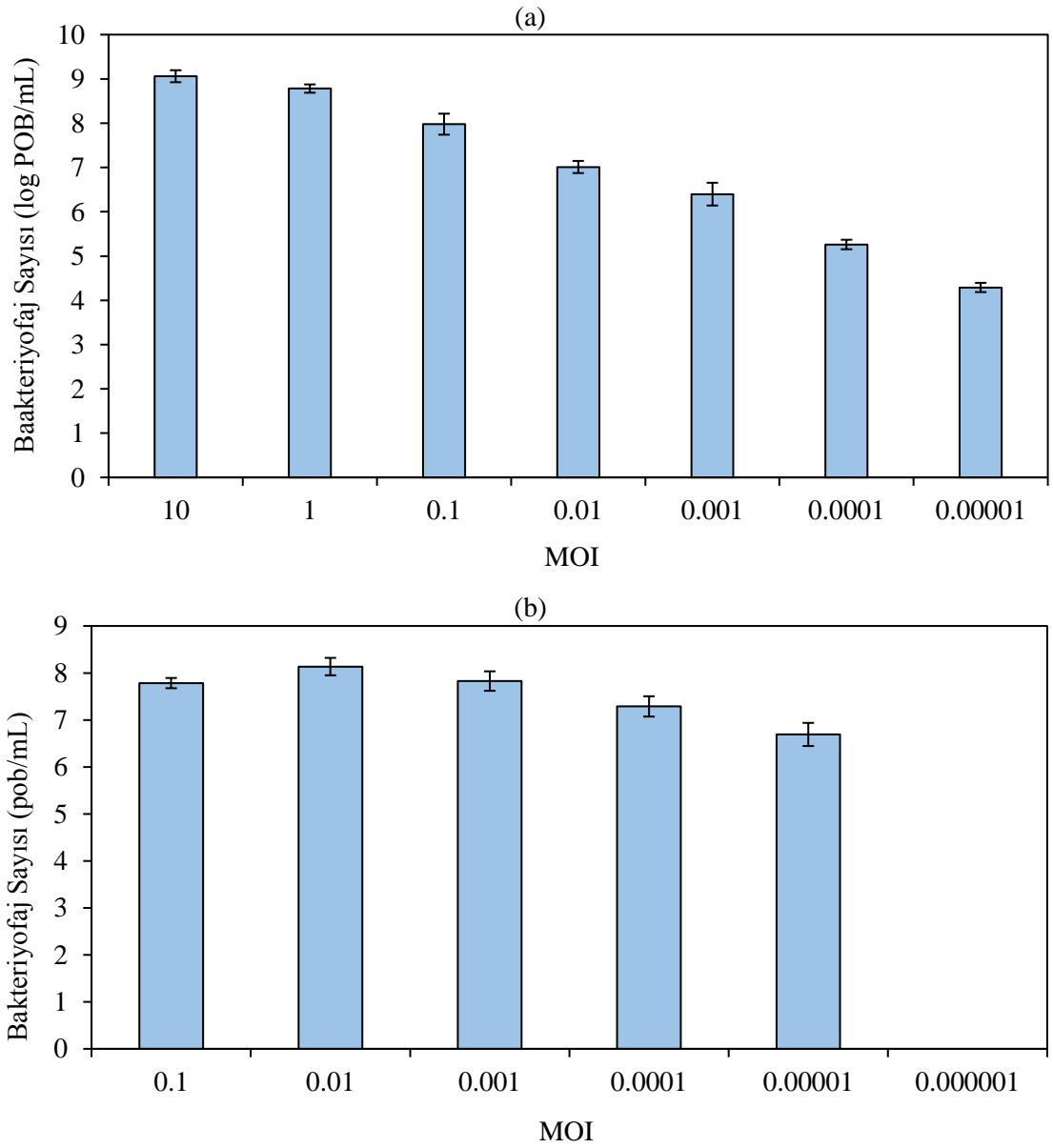
#### **4.8 Enfeksiyon Çokluğu Değeri**

Enfeksiyon çokluğu değeri (MOI), bir konak hücreyi enfekte eden faj sayısı olarak ifade edilmektedir. Çoklu enfeksiyon, kelimenin tam anlamıyla, faj sayısının bakteri sayısına oranıdır (yalnızca bakteriye saldıran ve daha sonra bakteriyi enfekte eden fajların sayıları hesaba katılır). Anti-faj direnç mekanizmasına sahip bakterilerde adsorbe olan fajların tümü etkili bir enfeksiyon gerçekleştiremez. Bu nedenle etkili faj adsorpsiyonu, etkili faj enfeksiyonuna dönüşmez. Yani, adsorpsiyon ile enfeksiyon aynı anlama sahip değildir. Bu durumu, tam anlamıyla tanımlayan MOI kavramıdır (Abedon, 2016). Bakteriyofaj sayısının artması, bakteri-faj arasındaki enfeksiyon çokluğu değerine bağlı olarak değişmektedir. Bu nedenle seçilen bakteriyofajların en yüksek sayıya ulaşması için uygun MOI tespit edilmelidir (Pringsulaka vd., 2011).

Enfeksiyon çokluğu değeri açısından sonuçlar incelendiğinde en çok faj üremesinin gerçekleştiği MOI değeri vB\_PaeS-K10 fajı için 10, vB\_PaeS-K13 fajı için ise 0,01 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.8). Gıda uygulamalarında bakteriyofajın MOI değerinin düşük olması, kullanılacak faj miktarının azalmasına neden olduğu için önemli bir avantaj olarak kabul edilmektedir (Sharma, 2013). Ancak, yüksek MOI değerine sahip

bakteriyofajlar, “dışarıdan liziz (lysiz from without, LO)” adı verilen işleme bakterileri öldürmede oldukça etkili olabilirler. Bu süreç, çok sayıda bakteriyofajın her bir bakteri hücresine yapışmasını hızlandırır. Bakteri hücresi, çok sayıda bakteriyofajın hücre duvarına açtığı delikleri hızlı bir şekilde onaramaz. Bu durum, hücre duvarını ve zar bütünlüğünü zayıflatır. Sonuç olarak, hücre lizizi gerçekleşir (Monk vd., 2010).

Fitopatojen *Pseudomonas* spp.'ye karşı etkili PRϕL2 ve SSϕL8 bakteriyofajlarının optimum MOI değerlerinin sırasıyla 0,1 ve 0,01 olduğu bildirilmiştir (Jagdale vd., 2019).



**Şekil 4.8.** vB\_PaeS-K10 ve vB\_PaeS-K13 bakteriyofajlarının MOI değerleri: vB\_PaeS-K10 (a) ve vB\_PaeS-K13 (b)

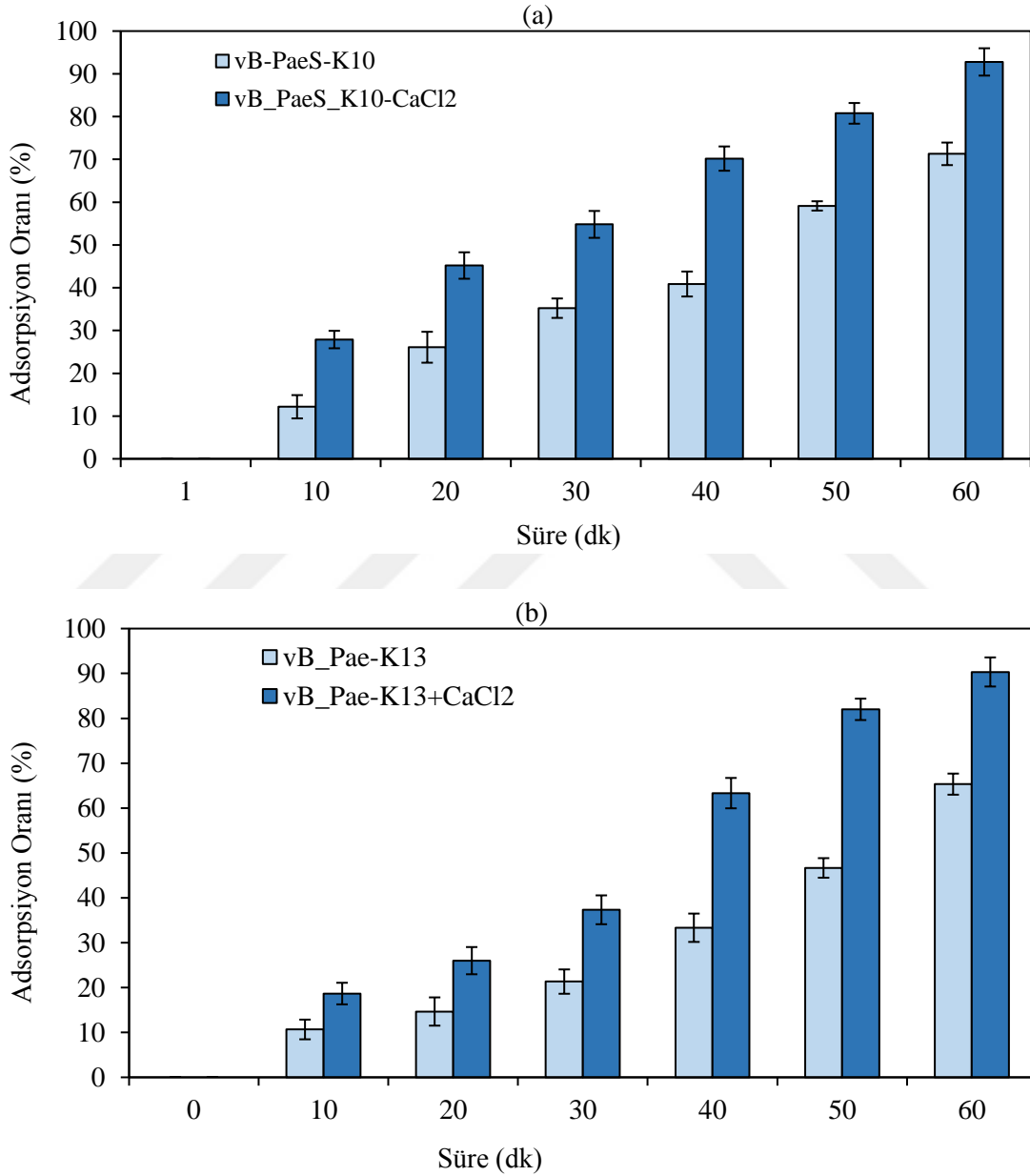
#### 4.9 Fajların Konakçı Hücreye Adsorpsiyonu

Adsorpsiyon hızı, her bir faj-konakçı çiftinin değer özelliğidir ve faj/konak konsantrasyonuna bağlı olarak değişebilir. Bakteriyofajlar, viryon hareketinden sorumlu belirli yapılara sahip olmadıkları ve sonuç olarak bağımsız hareket edemedikleri için adsorpsiyon süreci, aktif kütle yasası ile tanımlanan rastgele faj-hücre çarpışmasının sonucudur. Bu nedenle, viryonların ve bakteri hücrelerinin konsantrasyonu arttıkça, rastgele çarpışmaların sayısının artma eğiliminde olduğu ve bunun da daha yüksek adsorpsiyon oranına yol açtığı görülebilir. Adsorpsiyon hızı ayrıca, bir dizi farklı spesifik olmayan fiziksel-kimyasal faktörlere (pH, sıcaklık, belirli maddelerin ve iyonların ortamdaki varlığı), konakçı fizyolojik durumuna ve kültür koşullarına bağlıdır. Konakçı hücre yüzeyindeki virion adsorpsiyonu, genellikle 2 aşamalı bir süreçtir: Geri döndürülebilir ve geri döndürülemez bağlanma. Her ikisinde de moleküler etkileşim mekanizmalarının adsorpsiyon aşamaları, farklı faj konak sistemlerine özeldir ve farklı taksonomik grupların temsilcilerinde önemli ölçüde farklılık gösterebilir. Kural olarak nükleik asidin penetrasyonu, geri dönüşü olmayan adsorpsiyon aşamasından sonra gerçekleşir. Bu işlemin mekanizmaları her faj veya faj grubu için spesifiktir. Elektrokimyasal membran potansiyeli, ATP molekülleri ve peptidoglikan tabakasının enzimatik bölünmesi gibi parametrelerin her biri veya her üç faktör, genetik materyalin bakteri hücresine nüfuz etmesi için hayati öneme sahip olabilir (Rakhuba vd., 2010).

Bakteriyofajların konakçılara adsorbe olma ve enfekte etme kabiliyetlerini etkileyen en önemli faktörler bakteri hücresi ve bakteriyofaj sayılarıdır. Bakterileri ortadan kaldırmak için bakteriyofajların kullanımına ilişkin yapılan birçok çalışmada, genellikle mililitre başına yaklaşık olarak  $10^7$  veya  $10^8$  hücre gibi yüksek konsantrasyonda tek bir bakteriyofaj suşu ile tek bir bakteri hücresi kullanılmaktadır (EFSA, 2009). *Pseudomonas* bakteriyofajları ile yapılan çalışmalar, mL başına  $10^2$  hedef hücreye kadar az miktarlarda bakteriyofajla da replikasyonun meydana geldiğini göstermiştir (Kokjohn ve Sayler, 1991; Greer, 2005).

Adsorpsiyon oranı, yalnızca konakçı fizyolojik durumuna ve kültürel koşullara bağlı değildir. Aynı zamanda, sıcaklık, pH, ozmolarite, iyonik güç, elektrolit gereksinimleri ( $Mg^{+2}$  ve  $Ca^{+2}$  gibi iki değerlikli katyonlar), adsorpsiyon kofaktörleri (faj T4 durumunda L-triptofan) ve hatta karıştırma durumu gibi çeşitli spesifik olmayan fiziksel-kimyasal

faktörlerden de etkilenebilir (Nabergoj vd., 2018). Bazı virüsler, belirli katyonlar tarafından inaktivasyona karşı korunurken bazı katyonlar, virüsleri inaktive edebilirler. Genel olarak, iyonik tuzların ve katyon değerlerinin konsantrasyonu'nun artması, virüs bağlanmasını artırır. Parçacık yapısı, fiziksel, kimyasal ve biyolojik faktörlerle bağlanma-ayrılma ve inaktivasyon da belirleyici bir faktör olabilir (Kurtböke, 2012).



**Şekil 4.9.** Bakteriyofajların konak hücrelerine adsorpsiyon oranları: vB\_PaeSE-K10 fajı (a) ve vB\_PaeS\_K13 fajı (b)

vB\_PaeS-K10 ve vB\_PaeS-K13 fajlarının konak hücrelerine adsorpsiyon oranları iki değerlikli  $Ca^{+2}$  iyonları varlığı ve yokluğunda incelenmiş ve sonuçlar, Şekil 4.9'da sunulmuştur. Şekillerde de görüldüğü üzere  $Ca^{+2}$  iyonlarının her iki fajın konak hücrelerine adsorpsiyon oranları üzerine etkisi önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ). vB\_PaeS-K10 ve vB\_PaeS-K13 fajlarının konak hücreleri olan *P. aeruginosa* RM11 ve *P. aeruginosa* RM24'e adsorpsiyon oranlarının inkübasyon işlemin ilk 10 dakikasında sırasıyla %12,17 ve %10,67 olduğu, inkübasyonun 60'ıncı dakikasında %71,30 ile %66,33 çıktığı (çok hızlı bir şekilde adsorbe oldukları) gözlenmiştir. Bu oranların  $Ca^{+2}$  iyonları varlığında inkübasyonun 10'uncu dakikasında %27,88 ve %18,67, 60'ıncı dakikasında %92,79 ve %90,33 olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.9).

Benzer şekilde, MA1 fajının konak hücreye adsorpsiyonu üzerine  $Mg^{++}$  ve  $Ca^{++}$  iyonlarının etkisinin önemli olduğu belirtilmiştir (Adnan vd., 2020).

Jamal vd. (2017) de yaptıkları çalışmada,  $Ca^{+2}$  iyonlarının *P. aeruginosa*'ya özgü AZ1 bakteriyofajının konakçıya adsorpsiyon sürecini stabilize ettiğini ve adsorbe olan hücre sayısını arttırdığını ortaya koymuşlardır.

#### **4.10 Konak Hücreye Karşı Bakteriyofajların Litik Aktiviteleri**

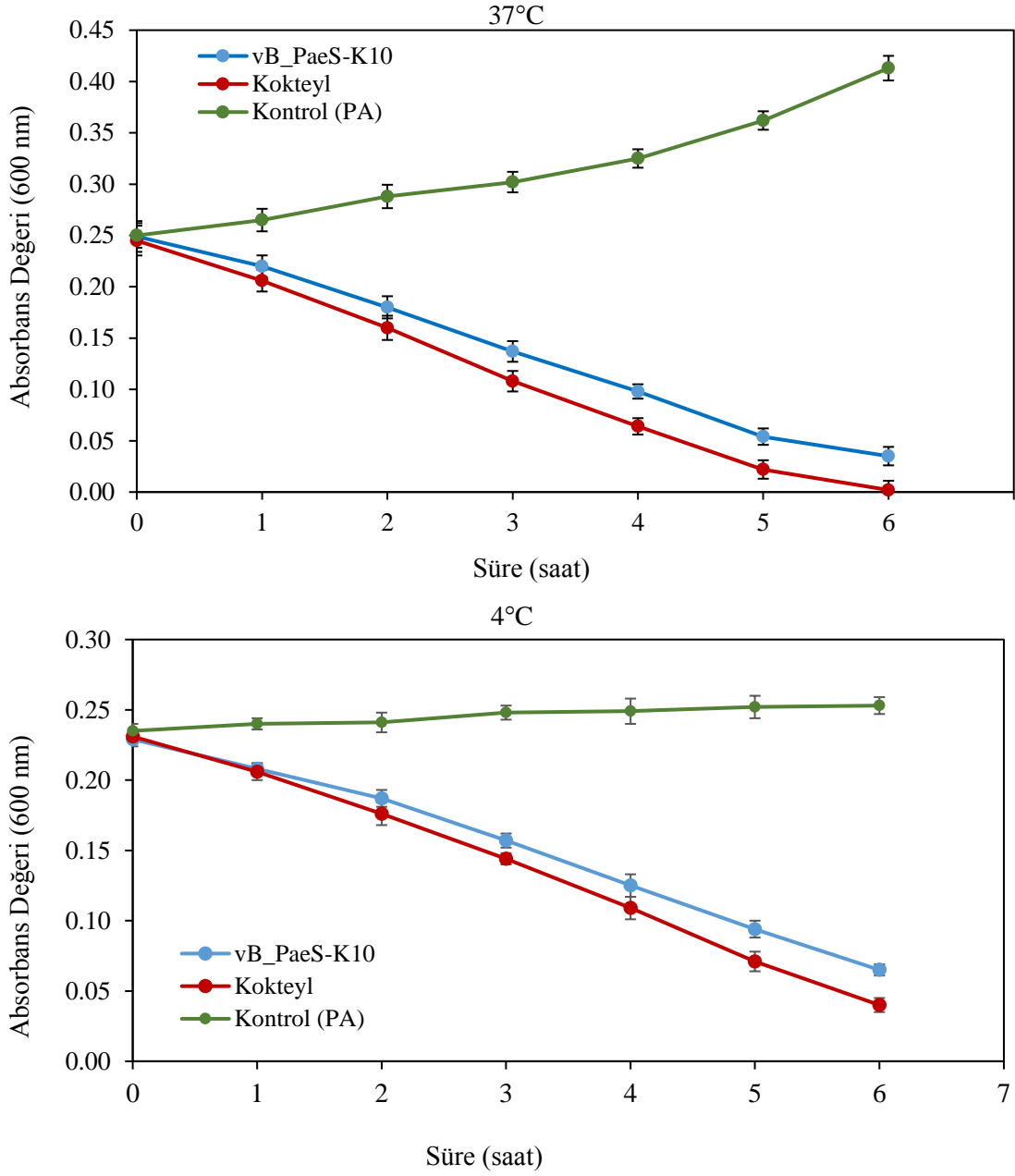
Bakteriyofajların litik aktiviteleri, hem tek başlarına hem de kokteyl olarak ( $10^8$  pob/mL) konak hücrelerine (5,50-5,85 log kob/mL) karşı iki farklı sıcaklıkta, 4 ve  $37^{\circ}C$ 'de ayrı ayrı nutrient sıvı besiyerinde test edilerek belirlenmiştir. Analiz sonuçları, Şekil 4.10 ve 4.11'de sunulmuştur. Şekillerden de görüldüğü üzere, vB\_PaeS-K10 ve vB\_PaeS-K13 fajları gerek tek başlarına gerekse kokteyl olarak uygulandıklarında  $37^{\circ}C$ 'de *P. aeruginosa* konak hücre sayısının, inkübasyon işleminin 1'inci saatinden itibaren azalmaya başladığı görülmektedir. *P. aeruginosa* RM11 bakterisine vB\_PaeS-K10 bakteriyofajı ve kokteyl (vB\_PaeS-K10 + vB\_PaeS-K13) ayrı ayrı uygulandığında 600 nm'de adsorbans değerleri başlangıçta 0,25-0,26 civarındayken, 6. saat sonunda adsorbans değerlerinin sırasıyla 0,035 ve 0,002'ye düştüğü gözlenmiştir (Şekil 4.10). *P. aeruginosa* RM24 bakterisine vB\_PaeS-K13 ve kokteyl faj uygulandığında 600 nm'deki adsorbans değerlerinin 0,25-0,26'dan 0,041 ve 0,006'ya düştüğü saptanmıştır. Bakteriyofaj uygulanmayan, sadece *P. aeruginosa* içeren kontrol örneklerinde bakteri sayısının inkübasyon süresi boyunca arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.11). Altı saatlik

inkübasyon süresi içerisinde, bakteriyofaj uygulanmayan kontrol örneklerinde *P. aeruginosa* RM11 ve *P. aeruginosa* RM24 hücre yoğunluğunun sırasıyla 0,25'den 0,41'e ve 0,27'den 0,68'e yükseldiği belirlenmiştir (Şekil 4.10-4.11).

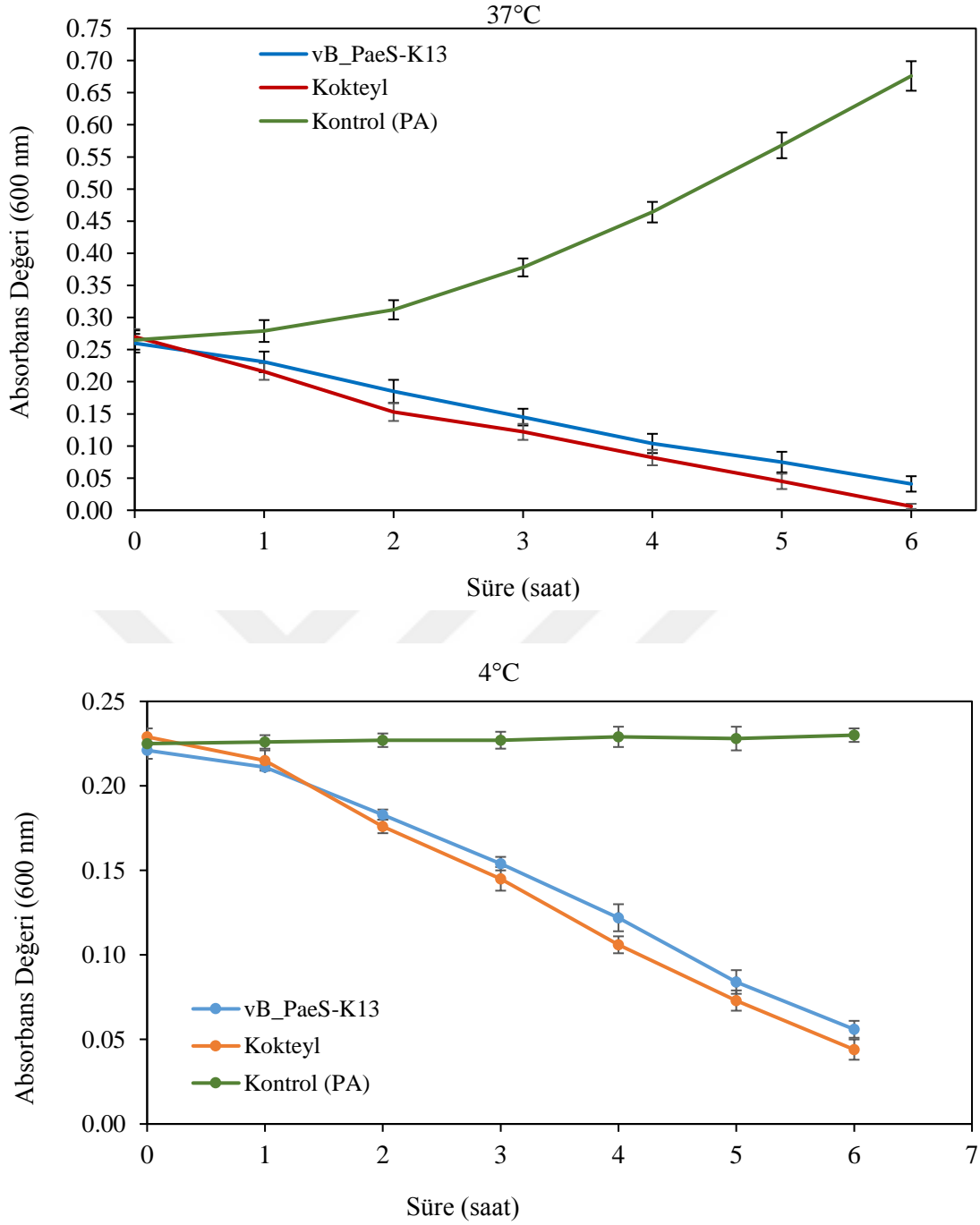
vB\_PaeS-K10 ve vB\_PaeS-K13 fajlarının konak hücreleri olan *P. aeruginosa* RM11 ve *P. aeruginosa* RM24 bakterileri üzerine inhibitör etkileri NB besiyerinde tek tek ve kokteyl olarak buzdolabı koşullarında da belirlenmiştir. Yapılan analiz sonucunda fajların tek başlarına ve kokteyl olarak kullanıldıklarında depolama işlemi sırasında bakteri absorbans değerlerinin azaldığı ve konak hücrelerine karşı litik aktivite sergiledikleri gözlenmiştir (Şekil 4.10-4.11). vB\_PaeS-K10 bakteriyofajı ve kokteyl faj uygulaması sonucunda *P. aeruginosa* RM11 hücre yoğunluğunun 6 saatlik inkübasyon işleminin sonunda sırasıyla 0,23'ten 0,065 ve 0,23'ten 0,040'a düştüğü belirlenmiştir. *P. aeruginosa* RM24 hücre yoğunluğunun ise vB\_PaeS-K13 faj uygulamasında 0,22'den 0,056'ya, kokteyl faj uygulaması sonucunda 0,23'ten 0,044'e düştüğü gözlenmiştir (Şekil 4.10-4.11). Sonuçlardan da görüldüğü üzere bakteriyofajların 37°C ile 4°C'deki litik aktiviteleri karşılaştırıldığında litik aktivitelerinin 37°C'de daha iyi olduğu gözlenmiştir.

Enzimler, durağan fazdaki bakteri hücrelerine karşı etkili olurken, bakteriyofaj partikülleri daha çok metabolik olarak aktif ve replike olan hücrelere karşı yüksek etkinlik göstermektedirler (Park vd., 2011). Litik aktivite sürecinde bakteri yoğunluğunda etkili bir düşüş için aktif bakteri metabolizmasına ihtiyaç vardır. 4°C'de bakteri mekanizması yeterince aktif olmadığı için 37°C'ye göre biraz daha yavaş bir düşüş gözlenmemiştir. Bu durum, faj ve bakteri arasında yeterince etkileşim oluşamamasına ya da fajın çoğalması için uygun koşulların tam olarak sağlanamamasına da bağlanabilir.

*P. aeruginosa* ATCC 27853, BOIJ0 ve Lfar01 suşlarına karşı *Pseudomonas* BrSP1 fajının litik aktivitesinin belirlendiği bir çalışmada, faj uygulaması sonucunda bakteri hücre popülasyonunda kayda değer bir azalma olduğu ve bakteri üremesinin yaklaşık 12 saate kadar kontrol altında kaldığı, ancak 24 saat sonunda enfekte olan ve olmayan numunelerin hücre yoğunluğunun hemen hemen aynı olduğu belirlenmiştir (de Melo vd., 2019).



**Şekil 4.10.** vB\_PaeS-K10 fajının 37°C ve 4°C'de *P. aeruginosa* RM11'e karşı litik aktivitesi

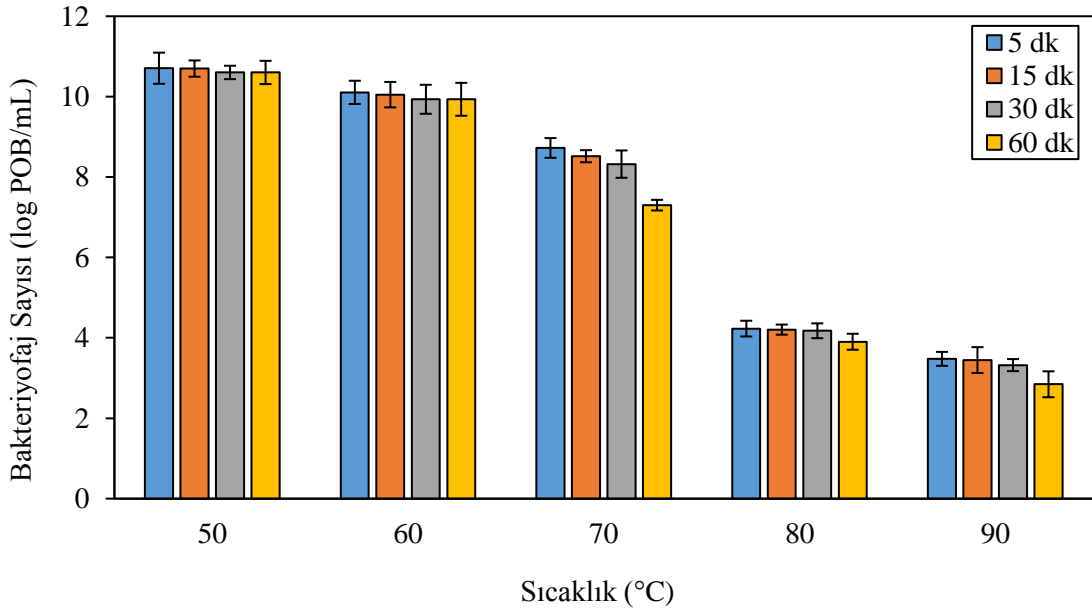


**Şekil 4.11.** vB\_PaeS-K13 fajının 37°C ve 4°C'de *P. aeruginosa* RM24'e karşı litik aktivitesi

#### 4.11 Fajların pH ve Sıcaklık Stabiliteleri

*P. aeruginosa* fajlarının termal stabilite sonuçları Şekil 4.12 ve 4.13'te verilmiştir. Şekilde de görüldüğü üzere her iki fajın 50°C ve 60°C'de 5, 15, 30 ve 60 dakika uygulanan ısıl işlem koşullarında aktivitelerini korudukları ve dolayısıyla faj titrelerinde bir

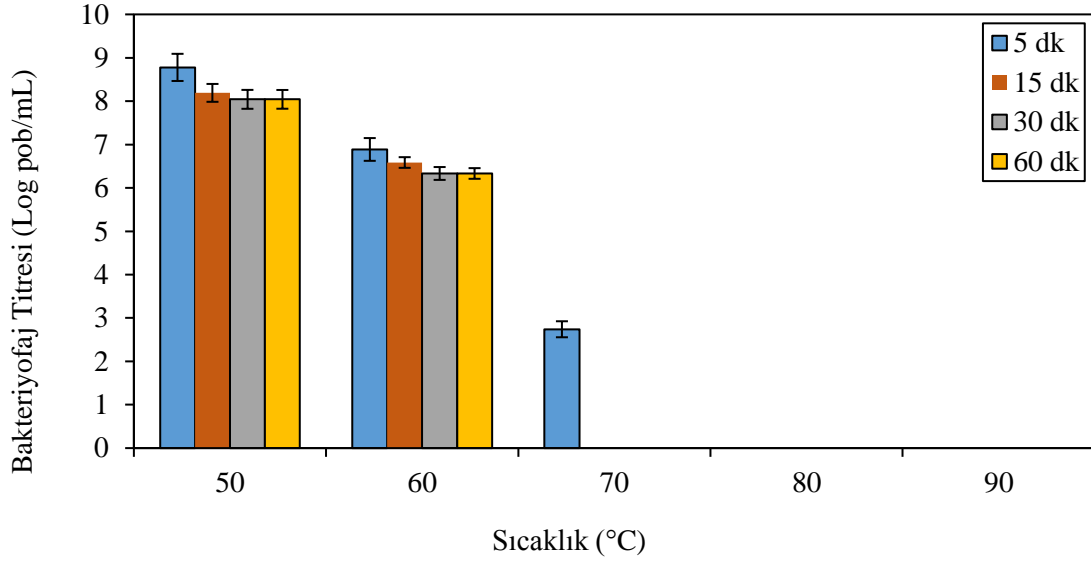
değişimin olmadığı belirlenmiştir ( $p<0,05$ ). vB\_PaeS-K10 fajının termal stabilitesinin vB-PaeS-K13 fajına göre daha iyi olduğu gözlenmiştir. vB-PaeS-K13 fajının 70 °C’de 5 dakika uygulanan ısı işleminden sonra faj titresinde 6,04 log’luk azalma olduğu, aynı sıcaklıkta 30 dakika sonra aktivitesini tamamen kaybettiği belirlenmiştir (Şekil 4.13). vB\_PaeS-K10 fajının 70°C’de uygulanan ısı işlem normlarında aktivitesinde yaklaşık 2,0-2,5’log’luk azalma olduğu ( $p<0,05$ ), 90°C’de 5, 15, 30 ve 60 dakika uygulanan ısı işlemlerden sonra titresinde sırasıyla 7,12, 7,15, 7,28 ve 7,76’luk düşüşler olduğu gözlenmiştir ( $p<0,05$ ). 95°C’de 5 dakika ısı işleminden sonra vB\_PaeS-K10 fajı aktivitesini tamamen kaybetmiştir (Şekil 4.12).



**Şekil 4.12.** vB\_PaeS-K10 fajının sıcaklık stabilitesi

MA-1 bakteriyofajının sıcaklık stabilitesini ortaya koymak amacıyla yapılan çalışmada ilgili faj, 37-80°C’de 1 saat inkübasyon işlemine tabi tutulmuş ve sonuçta 37-65°C aralığında aktivitesini koruduğu, 70°C’de aktivitesinde önemli düzeyde düşme meydana geldiği ve 80°C’de aktivitesini tamamen kaybettiği tespit edilmiştir (Adnan vd., 2020).

*Pseudomonas fragi*’ye özgü ps1 ve wy’ fajlarının 60°C’de 30 dakika ısı işleme tabi tutulduklarında aktivitelerinde sırasıyla %99 ve %39 düzeyinde bir azalma olduğu bildirilmiştir (Whitman ve Marshall, 1971).



**Şekil 4.13.** vB\_PaeS-K13 fajının sıcaklık stabilitesi

Bakteriyofajların ısıya dayanıklılığı, kaynak ve konakçı sistem ile ilişkilidir. Bakteriyofajlar genellikle konakçı bakterilerinden daha fazla ısıya dayanıklıdırlar. Bu durum, konakçı bakteri öldükten sonra fajların hayatta kalabileceklerini göstermektedir (Greer, 1988; 2005). Fajlar, çoğu vejetatif bakteriden daha fazla ısıya dayanıklı olabileceğinden, bazı gıdalara rutin olarak uygulanan ısıl işlemlerden kurtulabilirler (Hudson vd., 2005).

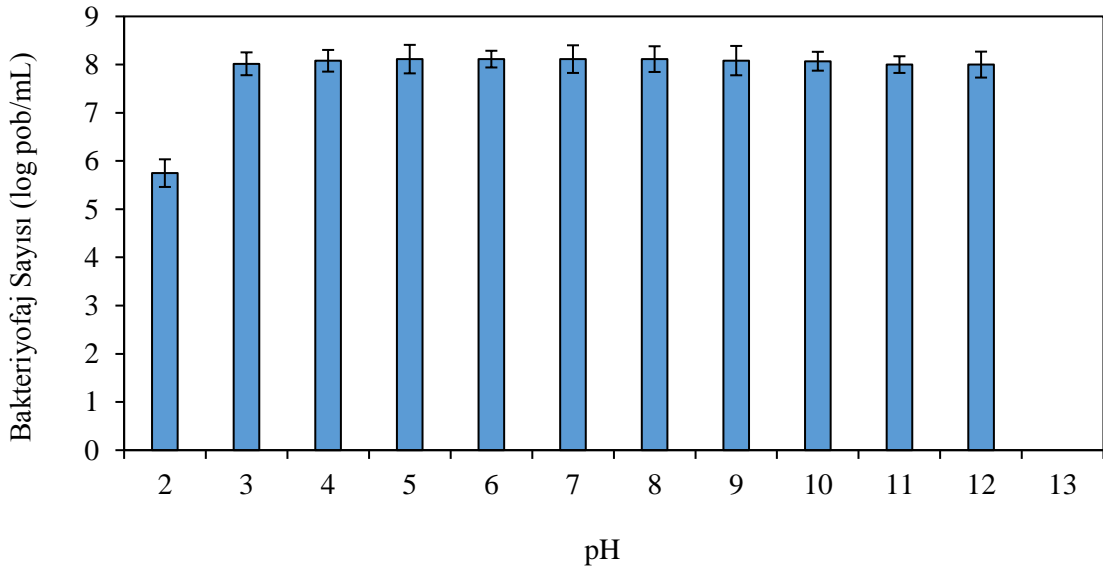
Biyoteknolojik amaçlar için termostabil faj partiküllerinin elde edilmesiyle ilgili çalışmalara dayanarak, faj kapsid proteinleri içinde disülfid çapraz bağların oluşumunun, fajın termal denatürasyona karşı stabilizasyonunda önemli bir rol oynayabileceği öne sürülmüştür (Jurczak-Kurek vd., 2016). Caldeira ve Peabod (2007) tarafından yapılan bir çalışmada, yüksek ısıya dayanıklı *Pseudomonas* RNA fajı olan PP7'yi disülfid bağlarını indirgeyen 1,4-ditiyotreitol varlığında ve yokluğunda 90°C'de 2 dakika ısıl işleme tabi tutmuşlar ve 1,4-ditiyotreitol ile muamele edilen PP7 fajının belirtilen ısıl işlemlerden sonra aktivitesini kaybettiğini gözlemlemişlerdir.

Bakteriyofajların farklı pH değerlerine karşı stabilitelemlerini belirlemek için yapılan analiz sonucunda, *P. aeruginosa*'yı enfekte eden her iki fajın pH 2-12 değerleri arasında aktivite gösterdikleri, ancak pH 1 ve 13 değerlerinde aktivitelemlerini kaybettikleri tespit edilmiştir (Şekil 4.14 ve 4.15). pH 2 değerinde vB\_PaeS-K10 ve vB\_PaeS-K13 fajlarının

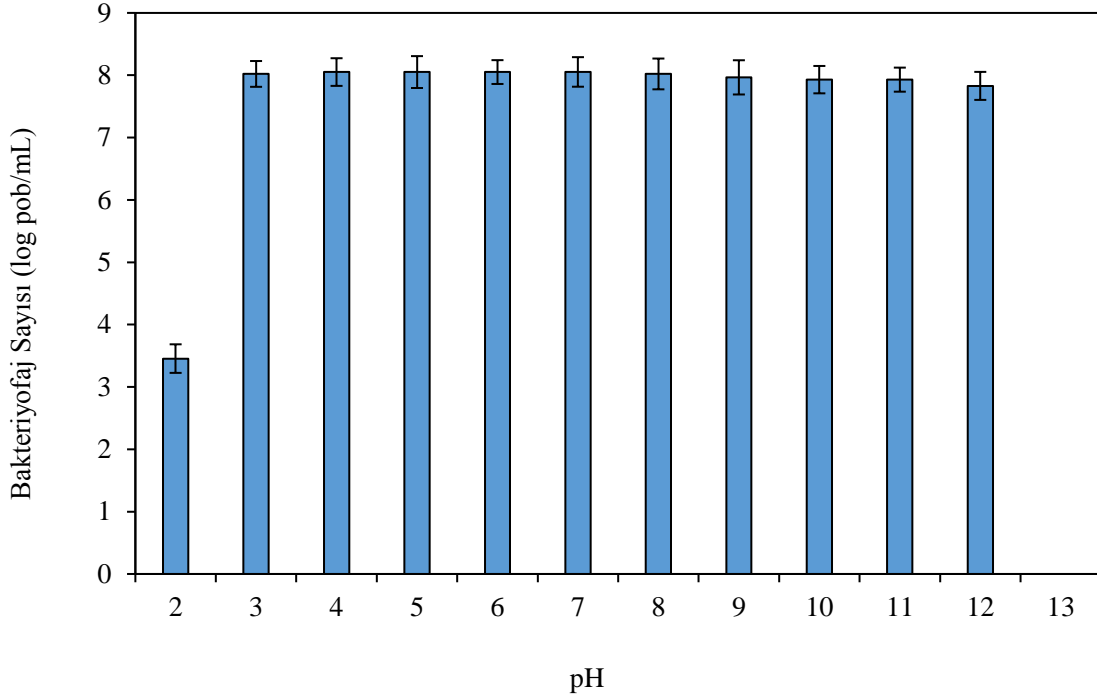
aktivitesinde sırasıyla 2,37 ve 4,85 log pob/mL düzeyinde azalma olduğu görülmüştür ( $p < 0,05$ ). vB\_Pae-K13 fajı için ise 4,60 log'luk bir düşüş gözlenmiştir. Her iki fajın pH 3-12 arasında stabil biyolojik aktivite sergiledikleri ve faj titrelerinde önemli bir değişimin olmadığı saptanmıştır ( $p > 0,05$ ). Bu durum, ilgili fajların geniş bir pH aralığında aktivite gösterebildiğini ve hem asidik hem de bazik ortamlarda rahatlıkla kullanılacaklarını ortaya koymaktadır.

Faj MA-1'in pH stabilitesi, 37°C'de 15 saat süresince yapılan analizler sonucunda belirlenmiş ve en yüksek stabilite pH 7'de gözlenmiştir. Faj MA-1, pH 5, 7, 9 ve 11'de stabilite gösterirken, pH 3'te en düşük aktiviteyi göstermiştir. PH 1'de plak oluşumu gözlenmezken, pH 7'de yüksek plak oluşumu gözlenmiştir (Adnan vd., 2020).

Whitman ve Marshall (1971), psi fajının asit inaktivasyonuna wy fajından daha duyarlı olduğunu ve pH 3'te her iki fajın aktivitesinde %99'un üzerinde bir azalma meydana geldiğini belirtmişlerdir. Kanalizasyon sularından izole edilen 10 farklı *Pseudomonas* fajının pH 2'de aktivitelerini tamamen kaybettikleri, pH 4'te 2 fajın aktivitelerini tamamen, geriye kalanların ise %10 ile %86,7 oranında korudukları, pH 10'da da 7 fajın aktivitelerini tamamen korudukları belirlenmiştir. pH 12'de ise faj aktivitelerinde önemli düzeyde azalmaların (%26,7-99) olduğu belirtilmiştir (Jurczak-Kurek vd., 2016).



Şekil 4.14. vB\_PaeS-K10 fajının pH stabilitesi



Şekil 4.15. vB\_PaeS-K13 fajının pH stabilitesi

#### 4.12 Fajların Biyokoruyucu Olarak Tavuk Etinde Kullanım Olanaklarının Belirlenmesi

vB\_PaeS-K10 ve vB\_PaeS-K13 bakteriyofajlarının ikisi de *P. aeruginosa* RM11 suşuna karşı etkili olduklarından tez çalışmasının bu kısmında, söz konusu bakteri test bakterisi olarak kullanılmıştır. *P. aeruginosa* fajlarının tavuk etinde konak bakterisine karşı etkinliğini belirlemek amacıyla, aseptik koşullarda hazırlanan tavuk göğsü etleri 3,08-3,12 log kob/g ve 5,30-5,46 log kob/g düzeyinde 8,30-8,39 log pob/g dozda vB\_PaeS-K10, vB\_PaeS-K13 ve kokteyl faj ile ayrı ayrı muamele edildikten sonra buzdolabında (4°C) muhafaza edilmiştir.

Yapılan çalışma sonucunda 3,08-3,12 log kob/g düzeyinde *P. aeruginosa* RM11 ile kontamine edilen tavuk göğsü örneklerinde fajların tek tek ve kokteyl olarak uygulandıklarında depolamanın birinci gününden itibaren ve depolama süresince *Pseudomonas* sayısını tespit edilebilir seviyenin altına düşürdüğü belirlenmiştir (Çizelge 4.14). Bakteriyofaj uygulanmayan kontrol örneğinde ise depolamanın 5'inci gününe kadar *P. aeruginosa* RM11 sayısında önemli bir değişimin olmadığı, depolamanın sekizinci gününde düşük düzeyde de olsa bir azalma ( $p>0,05$ ) olduğu gözlenmiştir

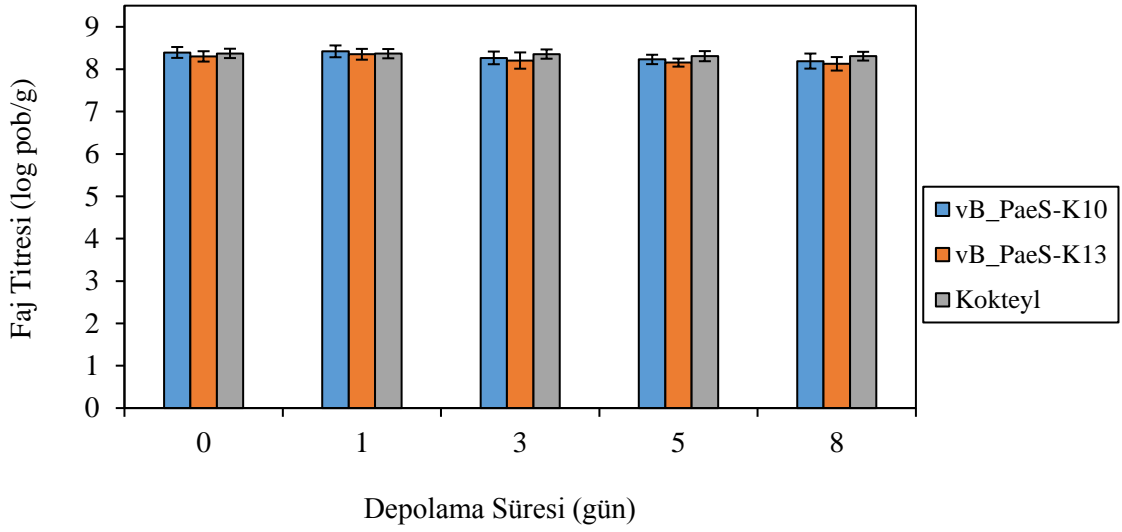
(Çizelge 4.14). Söz konusu aynı örneklerde faj sayılarında depolama süresince önemli bir değişimin olmadığı ( $p>0,05$ ) ve dolayısıyla depolama süresince fajların stabilitelerini korudukları gözlenmiştir (Şekil 4.16).

Yüksek düzeyde (5,30-5,40 log kob/g) *P. aeruginosa* RM11 ile inoküle edilen tavuk göğüs eti örneklerine de vB\_PaeS-K10 ve vB\_PaeS-K13 fajları ve kokteylleri 8,30-8,39 log pob/g düzeyinde uygulandığında *Pseudomonas* sayısının etkili bir şekilde azaldığı saptanmıştır (Çizelge 4.15). vB\_PaeS-K10 ve vB\_PaeS-K13 fajları sırasıyla depolamanın 2'nci saatinde 0,23 ile 0,54 log'luk ( $p>0,05$ ), birinci gününde 2,78 ile 3,44 log'luk ( $p<0,05$ ) ve üçüncü gününde ise 3,50 ile 4,22 log'luk ( $p<0,05$ ) azalmaya neden olmuştur. vB\_PaeS-K10 fajının depolamanın 8'inci gününde, vB\_PaeS-K13 fajının ise depolamanın 5'inci gününde *Pseudomonas* sayısını tespit edilebilir düzeyin altına indirdiği belirlenmiştir. vB\_PaeS-K10 ve vB\_PaeS-K13 fajları kokteyl halinde kullanıldıklarında sinerjist etki oluşturarak depolamanın ikinci saatinde 2,02 log'luk azalmaya neden olmuş ve depolamanın birinci gününden itibaren *Pseudomonas* sayısını tespit edilebilir seviyenin altına düşürmüştür. Bu azalma, hem kontrol hem de diğer fajlarla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüşü ifade etmektedir ( $p<0,05$ ) (Çizelge 4.15). Faj uygulanmayan, sadece *P. aeruginosa* RM11 ile inoküle edilen kontrol örneğinde ise bakteri sayısı, depolamanın 5'inci gününe kadar hemen hemen sabit kalmış ( $p>0,05$ ), 8'inci gününde ise bakteri sayısında biraz azalma meydana gelmiştir. Bu azalmanın başlangıç bakteri kontaminasyon seviyesi ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir ( $p<0,05$ ) (Çizelge 4.15).

**Çizelge 4.14.** 4°C'de depolanan tavuk etlerine yaklaşık  $10^3$  kob/g düzeyinde inoküle edilen *P. aeruginosa* RM11 suşuna karşı *P. aeruginosa* fajlarının inhibitör etkisi

Örnekler	4°C'de Depolama					
	0. saat	2. saat	1. gün	3. gün	5. gün	8. gün
vB_PaeS-K10	3,08±0,03 <sup>Aa</sup>	2,95±0,23 <sup>Aa</sup>	1>	1>	1>	1>
vB_PaeS-K13	3,10±0,10 <sup>Aa</sup>	2,16±0,35 <sup>Ab</sup>	1>	1>	1>	1>
Kokteyl	3,09±0,09 <sup>Aa</sup>	1>	1>	1>	1>	1>
PA*	3,12±0,09 <sup>Aa</sup>	3,15±0,08 <sup>Aa</sup>	3,30±0,09 <sup>Ba</sup>	3,30±0,10 <sup>Aa</sup>	3,02±0,43 <sup>Aa</sup>	2,59±0,13 <sup>Ab</sup>

\*PA, kontrol, sadece *Pseudomonas aeruginosa* RM11 içeren kontrol örneğidir. Büyük harfler aynı sütundaki değerler arasındaki istatistiksel farkları, küçük harfler aynı satırdaki değerler arasındaki istatistiksel farkları göstermektedir.



**Şekil 4.16.** *P. aeruginosa* fajlarının 4°C’de yaklaşık 3,10 log kob/g düzeyinde *P. aeruginosa* RM11 ile inoküle edilen tavuk etlerinde stabilitesi

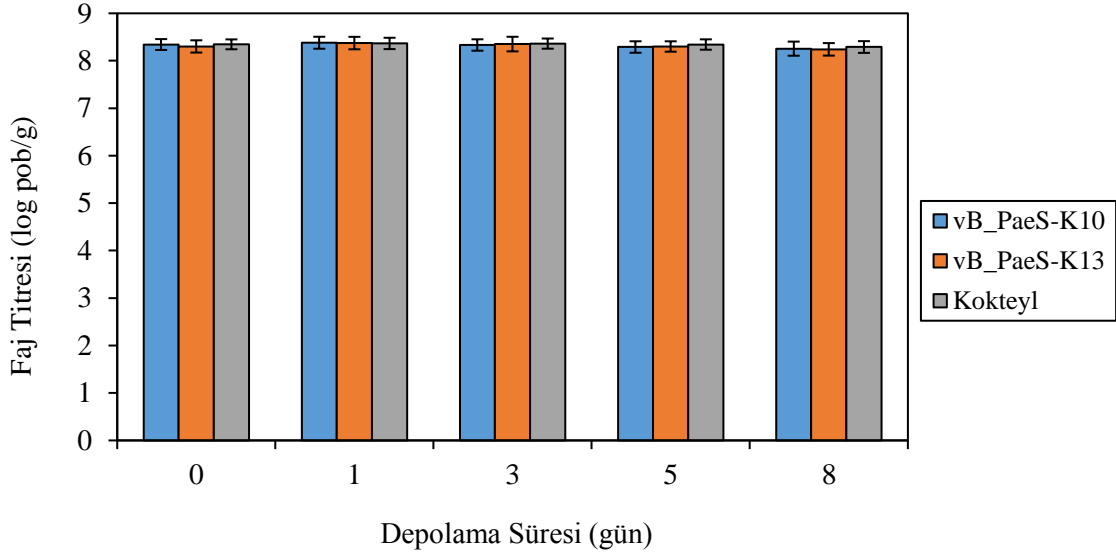
**Çizelge 4.15.** 4°C’de depolanan tavuk etlerine yaklaşık 10<sup>5</sup> kob/g düzeyinde inoküle edilen *P. aeruginosa* RM11 bakterisine karşı *P. aeruginosa* fajlarının inhibitör etkisi

Örnekler	4°C’de Depolama					
	0. saat	2. saat	1. gün	3. gün	5. gün	8. gün
vB_PaeS-K10	5,37±0,16 <sup>Aa</sup>	5,14±0,17 <sup>Aa</sup>	2,59±0,12 <sup>Ab</sup>	1,87±0,29 <sup>Ac</sup>	1,62±0,21 <sup>Acd</sup>	1>
vB_PaeS-K13	5,40±0,04 <sup>Aa</sup>	4,86±0,21 <sup>Ab</sup>	2,02±0,10 <sup>Ac</sup>	1,24±0,18 <sup>Ad</sup>	1>	1>
Kokteyl	5,36±0,15 <sup>Aa</sup>	3,34±0,92 <sup>Bb</sup>	1>	1>	1>	1>
PA*	5,30±0,07 <sup>Aa</sup>	5,32±0,09 <sup>Aa</sup>	5,35±0,07 <sup>Ba</sup>	5,41±0,13 <sup>Ba</sup>	5,08±0,17 <sup>Bab</sup>	4,60±0,33 <sup>Ab</sup>

\*PA, kontrol, sadece *Pseudomonas aeruginosa* RM11 içeren kontrol örneğidir. Büyük harfler aynı sütundaki değerler arasındaki istatistiksel farkları, küçük harfler aynı satırdaki değerler arasındaki istatistiksel farkları göstermektedir.

Aynı örneklerde depolama süresince faj sayısı incelendiğinde, vB\_PaeS-K10, vB\_PaeS-K13 ve kokteyl fajlarının 8 günlük depolama süresince aktivitelerini korudukları ve sayılarında önemli bir değişimin olmadığı görülmüştür ( $p>0,05$ ) (Şekil 4.17).

Sonuçlardan da görüldüğü gibi, kokteyl şeklinde uygulama, fajları tek tek uygulamaktan daha etkili sonuç vermektedir. Ayrıca, bakteri yükü düşük katı gıda örneklerinde faj uygulaması, başlangıç bakteri yükü fazla olan örneklere göre bakteri sayısında daha fazla azalma meydana getirmektedir.



**Şekil 4.17.** *P. aeruginosa* fajlarının 4°C’de yaklaşık 5,37 log kob/g düzeyinde *P. aeruginosa* RM11 ile inoküle edilen tavuk etlerinde stabilitesi

Kümes hayvanları ve kırmızı et, kesimden önceki ve hemen sonraki koşullar ve derinin karkas üzerinde tutulması nedenleriyle yoğun bir şekilde kontamine olma riskine sahiptir (EFSA, 2009). Bakteriyofajlar, et ürünlerindeki canlı bakteri hücrelerini etkin bir şekilde azaltmak için kullanılabilir. Buradaki önemli nokta, kesim sonrası veya işleme sonrası uygulamalarda bakteriyofajların canlı kalabilmelerini sağlamaktır (Cooper, 2016). Bakteriyofajların bakteri yükünü azaltmak için depolama koşullarında canlı kalmaları, et ürünlerinin raf ömrünü korumak için önemli bir kriterdir. Kümes hayvanı etleri, gıdalardaki bakteriyofaj aracılı biyokontrolün etkinliğini incelemek için tartışmasız en yaygın olarak kullanılan etler olmuştur. *Campylobacter* ve *Salmonella* cinslerinin üyeleri, tavuk eti üzerinde en sık hedeflenen patojenlerdir. Yapay olarak kontamine edilen tavuk derisinde faj tedavisini takiben *C. jejuni* ve *S. enteritidis* sayılarında önemli düşüşler kaydedilmiştir. Ayrıca, *S. enteritidis* veya *S. typhimurium* ile enfekte edilmiş tavuk ve hindi karkaslarında yüksek seviyede faj uygulaması ile *Salmonella* sayılarında önemli düşüşler tespit edilmiştir (Higgins vd., 2005).

Araştırmalar, bakteriyofajların bakteri hücrelerinin metabolik olarak aktif olduğu sıcaklıklarda bakterileri enfekte etmekte daha etkili olduklarını göstermektedir. Bakteriyofaj çoğalması, konakçı bakteri hücrelerinin biyokimyasal süreçlerine bağlı olduğu için bu yaklaşım mantıklıdır. Ayrıca bakteriyofajlar, 4°C’den daha düşük sıcaklıklarda bile bakteri hücreleri lizisini indükleyebilmektedirler (Cooper, 2016).

Sığır eti ürünlerinde bakteri sayısını kontrol altında tutmak için bakteriyofajların kullanıldığı çalışmalarda hem bozulmaya neden olan hem de patojenik bakteriler hedef alınmıştır. *Pseudomonas* gibi bozulma etmeni olan organizmalar ile yapay olarak kontamine edilmiş sığır etleri, bakteriyofajlar ile muamele edildiğinde ürünlerin raf ömürlerinde artış gözlenmiştir (Greer, 1982; 1986). *Pseudomonas* ile enfekte sığır etine bakteriyofaj uygulandığında bakteri büyümesinde önemli bir azalma sağlanmış ancak bu azalma, perakende sığır etinin raf ömrü üzerinde önemli bir etki yaratmak için yeterli bulunmamıştır (Greer ve Dilts, 1990).

Çalışmamıza benzer şekilde (faj uygulamasıyla bakteri sayısındaki azalma), *Salmonella* ve *E. coli* fajları ile yapılan çalışmalarda kırmızı et ve tavuk etinde biyokoruyucu olarak kullanılan fajların patojen bakterileri kontrol altına aldığı, özellikle düşük bakteri konsantrasyona karşı yüksek faj uygulamalarında bakteri sayılarının tespit edilemeyecek seviyelere düştüğü bildirilmiştir (O'Flynn vd., 2004; Carter vd., 2012; Spricigo vd., 2013; Demirarslan vd., 2021; Yildirim vd., 2021).

DeneySEL düzeyde, genellikle fajların taze ürünlerde enfektif etkisini belirlemek için yüksek bakteri konsantrasyonları kullanılır. Ancak, taze ürünlerdeki patojenik bakteri popülasyonu yoğunluğu genellikle düşüktür (López-Cuevas vd., 2019). Ayrıca, gıda ortamında faj-hedef bakteri etkileşimi şansını artırmak için yüksek faj konsantrasyonları kullanılır. Bu sayede de bakteriyofajların bir dizi gıda ürünündeki patojenleri kontrol etmede etkili oldukları gösterilmiştir (López-Cuevas vd., 2019).

## BÖLÜM V

### SONUÇLAR

Çeşitli gıdalardan *P. aeruginosa* bakterisine ait 10 farklı suşun izole edilmesi, izole edilen suşların biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle doğrulanması ve bu suşlara karşı enfeksiyon aktivitesine sahip bakteriyofajların izole edilmesi bu tez çalışmasının ilk basamağını oluşturmaktadır. Çalışmanın devamında izole edilen ve saflaştırılan bakteriyofajlardan geniş konakçı aralığı ve litik aktiviteye sahip olan iki faj seçilerek karakterize edilmiş (tek aşamalı gelişim kurvesi, MOI değeri, litik aktiviteleri, adsorpsiyon oranı, sıcaklık, pH ve restriksiyon enzimleri ile genom büyüklüğünün belirlenmesi) ve tavuk etinde biyokorucuyucu olarak kullanım olanakları belirlenmiştir. Araştırma sonucunda elde edilen bulgular aşağıda özetlenmiştir.

- a) *Pseudomonas aeruginosa* suşlarını izole etmek için toplam 144 örnek toplanmış ve tipik *Pseudomonas* özellikleri gösteren gıda örneklerinden elde edilen izolatlardan 22 tanesi 16S rRNA moleküler tanımlama işlemine tabi tutulmuştur. Süt örneklerinden izole edilen 10 izolat, *P. aeruginosa* suşu olarak tanımlanmıştır. Bunlar; *P. aeruginosa* RM10, *P. aeruginosa* RM11, *P. aeruginosa* RM18, *P. aeruginosa* RM19, *P. aeruginosa* RM21, *P. aeruginosa* RM22, *P. aeruginosa* RM24, *P. aeruginosa* RM29, *P. aeruginosa* RM16 ve *P. aeruginosa* RM30'dur.
- b) *Pseudomonas aeruginosa* etkili faj taraması için baraj, gölet, kanal, süt işletmesi atık suyu, kanalizasyon suyu ve mezbaha atık sularından toplam 36 adet örnek alınmış ve bu örneklerden 121 faj izole edilmiştir. Bunlardan plak büyüklüğü ve litik aktivite bakımından uygun olan 35 adet bakteriyofaj seçilmiş ve seri dilüsyonlar hazırlanarak en az üç kez saflaştırma işlemine tabi tutulmuştur. Saflaştırılan faj örneklerin titrelerinin  $9,6 \times 10^6$ - $8,0 \times 10^{10}$  pob/mL arasında değiştiği tespit edilmiştir.
- c) İzole edilen fajlardan en fazla konakçı aralığına sahip olan fajların, vB\_Pae-K6, vB\_Pae-K10 ve vB\_Pae-K13 olduğu ve test edilen 13 farklı *P. aeruginosa* suşlarından 10 tanesi (%76,92) üzerinde litik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Bu fajları ise sırasıyla vB\_Pea-K8 ve vB\_Pae-K20 fajının takip ettiği ve *P. aeruginosa* suşlarından 9 tanesi (%69,23), vB\_Pea-K20 fajının ise 8 tanesi (%61,54) üzerinde litik etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir.

- d) Elde edilen bakteriyofajlardan konak hücre aralığı en geniş ve litik aktivitesi daha iyi olduğu belirlenen vB\_Pae-K10 ve vB\_Pae-K13 fajları bu tez çalışmasında kullanılmak için seçilmiştir. Seçilen bu fajların faj titreleri sırası ile  $1,4 \times 10^8$ - $1,4 \times 10^{10}$  olarak belirlemiştir.
- e) *P. aeruginosa* fajlarının plak morfolojileri incelendiğinde plak çapları, vB\_Pae-K13 için  $3,47 \pm 0,09$  mm ve vB\_Pae-K10 için  $1,49 \pm 0,05$  mm olarak belirlenmiştir.
- f) Elektron mikroskobu ile incelenmeleri sonucu her iki fajın *Caudovirales* takımından *Siphoviridae* familyasına ait oldukları belirlenmiştir. vB\_Pae-K10 ve vB\_Pae-K13 fajlarının baş çapları sırası ile 87,24 ve 50,87 nm ve kuyruk uzunlukları ise 126,6 ve 177,12 nm olarak bulunmuştur. Söz konusu fajlar, vB\_PaeS-K10 ve vB\_PaeS-K13 olarak adlandırılmıştır.
- g) vB\_PaeS-K10 ve vB\_PaeS-K13 bakteriyofajlarının DNA'ları izole edilmiş ve DNA örnekleri, *EcoRI*, *BamHI* ve *HindIII* restriksiyon enzimleri ile kesim işlemine tabi tutulmuştur. Jel elektroforez sonucuna göre bakteriyofajların 54,20 (vB\_PaeS-K10) ve 44,06 (vB\_PaeS-K13) kb uzunlukta nükleik aside sahip oldukları belirlenmiştir. Kesim sonucunda, *P. aeruginosa* bakteriyofaj örneklerinin her ikisinin de *EcoRI*'e duyarlı oldukları ve her iki bakteriyofajın da genetik olarak farklı oldukları belirlenmiştir. vB\_Pae-K10 fajı, hem *EcoRI* hem de *HindIII* ile kesildiğinde 13 bant oluşturmuş, *BamHI* ile kesilememiştir. vB\_Pae-K13 fajı ise *EcoRI* ile kesildiğinde 7 bant oluşurken, *HindIII* ve *BamHI* ile kesim işlemi gerçekleştirilememiştir. Fajların genetik materyal olarak ds DNA barındırdığını doğrulayan farklı bant uzunlukları sergiledikleri belirlenmiştir.
- h) vB\_PaeS-K10 ve vB\_PaeS-K13 fajlarının latent periyotlarının sırasıyla 75 ve 20 dakika, patlama sürelerinin 30 ve 35 dakika ve patlama büyüklüklerinin ise 34,86 ve 35,95 olduğu belirlenmiştir.
- i) vB\_Pae-K10 ve vB\_Pae-K13 fajlarının MOI değerlerinin sırası ile 10 ve 0,01 olduğu tespit edilmiştir.
- j) vB\_PaeS-K10 ve vB\_PaeS-K13 fajlarının konuk hücrelerine adsorpsiyonu üzerinde  $Ca^{+2}$  iyonlarının ve inkübasyon süresinin etkisinin önemli olduğu saptanmış, inkübasyon işleminin 60'ıncı dakikasında  $Ca^{+2}$  iyonları yokluğunda adsorpsiyon oranlarının sırasıyla %71,30 ile %66,33,  $Ca^{+2}$  iyonları varlığında ise bu oranın %92,79 ve %90,33'e ulaştığı gözlenmiştir.

- k) Her iki bakteriyofajın tek başlarına ve kokteyl olarak litik aktivite testinde 4 ve 37°C’de inkübasyon koşullarında sıvı besiyerinde konak hücre yoğunluklarını etkili bir şekilde düşürdükleri ve litik aktivitelerinin 4°C’ye göre 37°C’de daha iyi olduğu saptanmıştır.
- l) vB\_PaeS-K10 fajının 50°C ve 60°C’de 5-60 dakika arasında uygulanan ısı işlemlerde aktivitelerini tamamen koruduğu, 95°C’de 5 dakika uygulanan ısı işleminden sonra aktivitesini tamamen kaybettiği belirlenmiştir. vB\_PaeS-K13 fajının 50°C’de 5-60 dakika arasında uygulanan ısı işlem uygulamalarında aktivitesini koruduğu, 70°C’de 30 dakikadan sonra aktivitesini tamamen kaybettiği belirlenmiştir.
- m) Her iki fajın pH 3-12 değerleri arasında aktivitelerini tamamen korudukları, pH 1 ve 13 değerinde aktivitelerini kaybettikleri gözlenmiştir.
- n) Gıda modelinde fajların enfektif etkilerini belirlemek amacıyla yapılan çalışmada her iki fajın ayrı ayrı ve kokteyl (8,30-8,39 log pob/g) olarak 3,08-3,12 log kob/g düzeyinde *P. aeruginosa* RM11 ile kontamine edilen tavuk göğsü örneklerine uygulandıklarında depolamanın birinci gününden itibaren ve depolama süresince *Pseudomonas* sayısını tespit edilebilir seviyenin altına düşürdüğü tespit edilmiştir. Fajların aynı sevide 5,30-5,46 log kob/g düzeyinde kontamine edilen tavuk göğsü örneklerine uygulandıklarında 8 günlük buzdolabı koşullarında depolama işlemi sonunda çok etkili bir şekilde *Pseudomonas* sayısını azalttıkları saptanmıştır. Fajlar kokteyl şeklinde uygulandıklarında litik aktivitelerinin sinerjik etkiden dolayı arttığı belirlenmiştir. vB\_PaeS-K13 fajının enfektif etkisinin vB\_PaeS-K10 fajına göre daha iyi olduğu bulunmuştur. Her iki fajın depolama süresince tavuk göğsü etinde stabiliteyi korudukları belirlenmiştir. Faj uygulanmayan kontrol örneklerinde ise *P. aeruginosa* RM11 sayısında depolamanın 5’inci gününe kadar önemli bir değişimin olmadığı, depolamanın 8’inci gününde bakteri sayısında biraz azalma meydana geldiği görülmüştür.

Bu tez çalışmasında vB\_PaeS-K10 ve vB\_Pae-K13 fajlarının ve bunların karışımlarının (kokteyl) tavuk eti örneklerinde buzdolabı sıcaklığındaki depolama koşullarında stabiliteyi korudukları ve fajların çok etkili bir şekilde *P. aeruginosa* RM11’in gelişimini önledikleri belirlenmiştir. Fajların kokteyl halinde uygulanması durumundaysa özellikle düşük düzeydeki kontaminasyonlarda etkilerinin daha

yüksek olduğu ve gıda endüstrisinde biyokoruyucu olarak kullanılma potansiyeline sahip oldukları belirlenmiştir.



## KAYNAKLAR

Abedon, S.T., “Phage therapy dosing: The problem (s) with multiplicity of infection (MOI)”, *Bacteriophage* 6(3), e1220348, 2016.

Ackermann, H.W., “5500 Phages examined in the electron microscope”, *Archives of Virology* 152(2), 227-243, 2007.

Ackermann, H.W., “Bacteriophage observations and evolution”, *Research in Microbiology* 154(4), 245-251, 2003.

Ackermann, H.W., “Bacteriophage taxonomy”, *Microbiology Australia* 32(2), 90-94, 2011.

Ackermann, H.W., “Frequency of morphological phage descriptions in 1995”, *Archives of Virology* 141(2), 209-218, 1996.

Ackermann, H.W., “Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000”, *Archives of Virology* 146(5), 843-857, 2001.

Ackermann, H.W., “Tailed bacteriophages: the order *Caudovirales*”, *Advances in Virus Research* 51, 135-201, 1998.

Ackermann, H.W., Tremblay, D., Moineau, S., “Long-term bacteriophage preservation”, *WFCC Newsletter* 38, 35-40, 2004.

Adams, M.H., Bacteriophages, *Interscience Publishers Inc.*, New York, 1959.

Adnan, M., Shah, M.R.A., Jamal, M., Jalil, F., Andleeb, S., Nawaz, M.A. and Kamil, A., “Isolation and characterization of bacteriophage to control multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* planktonic cells and biofilm”, *Biologicals* 63, 89-96, 2020.

Akan, İ.M., Et ve bazı et ürünleri ile soğuk hava depolarında *Pseudomonas* türlerinin izolasyonu ve identifikasyonu, Yüksek Lisans Tezi, **Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**, Konya, 2009.

Arnaut-Rollier, I., Vauterin, L., De Vos, P., Massart, D.L., Devriese, L.A., De Zutter, L. and Van Hoof, J., "A numerical taxonomic study of the *Pseudomonas* flora isolated from poultry meat", **Journal of Applied Microbiology** 87, 15-28, 1999.

Arumugam, S.N., Rudraradhya, A.C., Sadagopan, S., Sukumaran, S., Sambasivam, G. and Ramesh, N., "Analysis of susceptibility patterns of *Pseudomonas aeruginosa* and isolation, characterization of lytic bacteriophages targeting multi drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*", **Biomedical and Pharmacology Journal** 11(2), 1105-1117, 2018.

Atterbury, R.J., "Bacteriophage biocontrol in animals and meat products", **Microbial Biotechnology** 2(6), 601-612, 2009.

Aydın, G., Çeşitli gıda ürünlerinden izole edilen *Pseudomonas* türlerinde siderofor varlığı, serum direnci, genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (gsbl) üretimi ve antibiyotik direncinin belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, **Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 2010.

Azelmad, K., Hamadi, F., Mimouni, R., Amzil, K. and Latrache, H., "Physicochemical characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from catering substratum surface and investigation of their theoretical adhesion", **Surfaces and Interfaces** 12, 26-30, 2018.

Baltch, A.L. and Smith, R.P., *Pseudomonas aeruginosa*: infections and treatment, **Infectious Disease and Therapy Series** (12), 1994.

Barker, A.P., Vasil, A.I., Filloux, A., Ball, G., Wilderman, P.J. and Vasil, M.L., "A novel extracellular phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa* is required for phospholipid chemotaxis", **Molecular Microbiology** 53(4), 1089-1098, 2004.

Bassett, K.D., Use of bacteriophage as an antimicrobial in food products, MSc Thesis, **Kansas State University Food Science Institute**, Kansas, 2007.

Benie, C.K.D., Dadié, A., Guessennd, N., N'gbesso-Kouadio, N.A., Kouame, N.Z.D., N'golo, D.C. and Dosso, M., "Characterization of virulence potential of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from bovine meat, fresh fish, and smoked fish", **European Journal of Microbiology and Immunology** 7(1), 55-64, 2017.

Bigwood, T., Hudson, J.A., Billington, C., Carey-Smith, G.V. and Heinemann, J.A., "Phage inactivation of foodborne pathogens on cooked and raw meat", **Food Microbiology** 25(2), 400-406, 2008.

Bilgehan, H., Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları, **Fakülteler Kitabevi**, İzmir, 1993.

Bradley, D.E., "Ultrastructure of bacteriophage and bacteriocins", **Bacteriological Reviews** 31(4), 230, 1967.

Brigham, N., Lerner, K.L. and Lerner, B.W., "World of microbiology and immunology", **Vol. A. New York: Thomson Gale** 335-6, 2003.

Bruttin, A. and Brüssow, H., "Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: a safety test of phage therapy", **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 49(7), 2874-2878, 2005.

Buzdik, J.M., "Phage isolation and investigation", **Dartmouth Undergraduate Journal of Science** Vol. III, No. 1, 37-43, 2000.

Cafora, M., Deflorian, G., Forti, F., Ferrari, L., Binelli, G., Briani, F. and Pistocchi, A., "Phage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* infections in a cystic fibrosis zebrafish model", **Scientific Reports** 9(1), 1-10, 2019.

Caldeira, J.C. and Peabody, D.S., “Stability and assembly in vitro of bacteriophage PP7 virus-like particles”, *Journal of Nanobiotechnology* 5(1), 1-10, 2007.

Carlton, R.M., Noordman, W.H., Biswas, B., De Meester, E.D. and Loessner, M.J., "Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application", *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 43(3), 301-312, 2005.

Carter, C.D., Parks, A., Abuladze, T., Li, M., Woolston, J., Magnone, J. and Sulakvelidze, A., “Bacteriophage cocktail significantly reduces *Escherichia coli* O157: H7 contamination of lettuce and beef, but does not protect against recontamination”, *Bacteriophage* 2(3), 178-185, 2012.

Cavallo, J.D., Fabre, R., Leblanc, F., Nicolas-Chanoine, M.H. and Thabaut, A., "Antibiotic susceptibility and mechanisms of beta-lactam resistance in 1310 strains of *Pseudomonas aeruginosa*: A French multicentre study", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 46(1), 133-136, 1996.

Çelik, B., Doğadan ve klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas* bakterilerinin değişik fenotipik özelliklerinin farklı yöntemlerle araştırılması, Doktora Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 2009.

Ceyssens, P.J., Lavigne, R., Mattheus, W., Chibeu, A., Hertveldt, K., Mast, J. and Volckaert, G., “Genomic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* phages LKD16 and LKA1: Establishment of the  $\phi$ KMV subgroup within the T7 supergroup”, *Journal of Bacteriology* 188(19), 6924-6931, 2006.

Chen, T.R., Wei, Q.K. and Chen, Y.J., “*Pseudomonas spp.* and *Hafnia alvei* growth in UHT milk at cold storage”, *Food Control* 22(5), 697-701, 2011.

Chen, Y.L., Lee, C.C., Lin, Y.L., Yin, K.M., Ho, C.L. and Liu, T., “Obtaining long 16S rDNA sequences using multiple primers and its application on dioxin-containing samples”, *BMC Bioinformatics* 16(18), 1-11, 2015.

Cheung, B.A. and Westhoff, D.C., "Isolation and identification of ropy bacteria in raw milk", *Journal of Dairy Science* 66(9), 1825-1834, 1983.

Chibeu, A., Bacteriophages in food safety. Microbial pathogens and strategies for combating them: Science, technology and education, *Formatex*, 1041-1052, 2013.

Cooper, I.R., "A review of current methods using bacteriophages in live animals, food and animal products intended for human consumption", *Journal of Microbiological Methods* 130, 38-47, 2016.

Cornelis, P. and Dingemans, J., "*Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections", *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 3, 75, 2013.

de Farias, S.T., Jheeta, S. and Prosdocimi, F., "Viruses as a survival strategy in the armory of life", *History and philosophy of the life sciences* 41(4), 1-11 2019.

de Melo, A.C.C., da Mata Gomes, A., Melo, F. L., Ardisson-Araújo, D.M., de Vargas, A.P.C., Ely, V.L. and Wolff, J.L.C., "Characterization of a bacteriophage with broad host range against strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from domestic animals", *BMC microbiology* 19(1), 1-15, 2019.

Demirarslan, Ö.A., Alasalvar, H. and Yildirim, Z., "Biocontrol of *Salmonella Enteritidis* on chicken meat and skin using lytic SE-P3, P16, P37, and P47 bacteriophages", *LWT* 137, 110469, 2021.

Devlieghere, F., Vermeiren, L. and Debevere, J., "New preservation technologies: possibilities and limitations", *International Dairy Journal* 14(4), 273-285, 2004.

Dogan, B. and Boor, K.J., "Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas spp.* isolated from fluid milk products and dairy processing plants", *Applied and Environmental Microbiology* 69(1), 130-138, 2003.

Düğenci, S.T., Bazı gram negatif bakterilerin bakteriyosin üretimlerinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, **Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 2014.

Ekinciöğlü, P., Klinik *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının antibiyotiklere duyarlılık durumu ve serotiplendirilmesi, Doktora Tezi, **Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**, Kayseri, 2012.

Erles, K., “Understanding viruses”, **In Practice** 33(7), 302-308, 2011.

Essoh, C., Latino, L., Midoux, C., Blouin, Y., Loukou, G., Nguetta, S.P.A. and Pourcel, C., “Investigation of a large collection of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages collected from a single environmental source in Abidjan, Côte d’Ivoire”, **PloS One** 10(6), e0130548, 2015.

European Food Safety Authority (EFSA). “The use and mode of action of bacteriophages in food production-Endorsed for public consultation 22 January 2009-Public consultation 30 January–6 March 2009”, **EFSA Journal** 7(5), 1076, 2009.

Feldman, M., Bryan, R., Rajan, S., Scheffler, L., Brunnert, S., Tang, H. and Prince, A., “Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection”, **Infection and Immunity** 66(1), 43-51., 1998.

Fiorentin, L., Vieira, N.D. and Barioni Jr, W., “Oral treatment with bacteriophages reduces the concentration of *Salmonella Enteritidis* PT4 in caecal contents of broilers”, **Avian Pathology** 34(3), 258-263, 2005.

Franzetti, L. and Scarpellini, M., "Characterisation of *Pseudomonas spp.* isolated from foods", **Annals of Microbiology** 57(1), 39-47, 2007.

Galarce, N., Escobar, B., Rojas, V., Navarro, C., Turra, G., Robeson, J. and Borie C., “Application of a virulent bacteriophage cocktail leads to reduction of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis counts in processed meat products”, **Biocontrol Scie Technol** 26(4):462–475, 2016.

García, P., Martínez, B., Obeso, J.M. and Rodríguez, A., "Bacteriophages and their application in food safety", *Letters in Applied Microbiology* 47, 479-485, 2008.

Garcia, P., Rodriguez, L., Rodriguez, A. and Martinez, B., "Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins", *Trends in Food Science and Technology* 21(8), 373-382, 2010.

Geornaras, I., Kunene, N.F., von Holy, A. and Hastings, J.W., "Amplified fragment length polymorphism fingerprinting of *Pseudomonas* strains from a poultry processing plant", *Applied and Environmental Microbiology* 65(9), 3828-3833, 1999.

Giamarellou, H., "Therapeutic guidelines for *Pseudomonas aeruginosa* infections", *International Journal of Antimicrobial Agents* 16(2), 103-106, 2000.

Greer, G.G., "Bacteriophage control of foodborne bacteria", *Journal of Food Protection* 68(5), 1102-1111, 2005.

Greer, G.G. and Dilts, B.D., "Inability of a bacteriophage pool to control beef spoilage", *International Journal of Food Microbiology* 10(3-4), 331-342, 1990.

Greer, G.G., "Effect of phage concentration, bacterial density, and temperature on phage control of beef spoilage", *Journal of Food Science* 53, 1226-1227, 1988.

Greer, G.G., "Psychrotrophic Bacteriophages for Beef Spoilage *Pseudomonas*", *Journal of Food Protection* 45(14), 1318-1325, 1982.

Guo, Y., Chen, P., Lin, Z. and Wang, T., "Characterization of two *Pseudomonas aeruginosa* viruses vB\_PaeM\_SCUT-S1 and vB\_PaeM\_SCUT-S2", *Viruses* 11(4), 318, 2019.

Hagens, S. and Loessner, M.J., "Bacteriophage for biocontrol of foodborne pathogens: calculations and considerations", *Current Pharmaceutical Biotechnology* 11(1), 58-68, 2010.

Hanlon, G.W., "Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections", *International Journal of Antimicrobial Agents* 30.2, 118-128, 2007.

Harper, D.R. and Enright, M.C., "Bacteriophages for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections", *Journal of Applied Microbiology* 111, 1-7, 2011.

Hawkinsa, C., Harpera, D., Burchb, D., Änggårda, E. and Soothill J., "Topical treatment of *Pseudomonas aeruginosa* otitis of dogs with a bacteriophage mixture: A before/after clinical trial", *Veterinary Microbiology* 146, 309–313, 2010.

Hendrix, R.W., Bacteriophage  $\lambda$  and Its Relatives, In Modern Microbial Genetics, *A John Willey&Sons Publication*, New York, 2002.

Higgins, J.P., Higgins, S.E., Guenther, K.L., Huff, W., Donoghue, A.M., Donoghue, D.J. and Hargis, B.M., "Use of a specific bacteriophage treatment to reduce Salmonella in poultryproducts", *Poult. Sci.* 84 (7), 1141-1145, 2005.

Hilbert, F., Scherwitzel, M., Paulsen, P. and Szostak, M.P., "Survival of *Campylobacter jejuni* under conditions of atmospheric oxygen tension with the support of *Pseudomonas spp*", *Applied and Environmental Microbiology* 76(17), 5911-5917, 2010.

Høiby, N., Ciofu, O. and Bjarnsholt, T., "*Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis", *Future Microbiology* 5 (11): 1663–1674, 2010.

Horcajada, J.P., Montero, M., Oliver, A., Sorlí, L., Luque, S., Gómez-Zorrilla, S. and Grau, S., "Epidemiology and treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections", *Clinical Microbiology Reviews* 32(4), e00031-19, 2019.

Hu, Z., Meng, X.C. and Liu, F., "Isolation and characterisation of lytic bacteriophages against *Pseudomonas spp.*, a novel biological intervention for preventing spoilage of raw milk", *International Dairy Journal* 55, 72-78, 2016.

Hudson, J.A., Billington, C., Carey-Smith, G. and Greening, G., "Bacteriophages as biocontrol agents in food", *Journal of Food Protection* 68(2), 426-437, 2005.

Hugh, R. and Leifson, E., "The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria", *Journal of Bacteriology* 66(1), 24-26, 1953.

Hyman, P., "Phages for phage therapy: isolation, characterization, and host range breadth", *Pharmaceuticals* 12(1), 35, 2019.

Jacob, F., "Induced Biosynthesis and Mode of Action of a Pyocine, an Antibiotic obtained from *Ps. pyocyanea*", *Ann. Inst. Pasteur* 86(2), 149-60, 1954.

Jagdale, S., Ahiwale, S., Gajbhiye, M. and Kapadnis, B., "Green approach to phytopathogen: Characterization of lytic bacteriophages of *Pseudomonas sp.*, an etiology of the bacterial blight of pomegranate", *Microbiological Research* 228, 126300, 2019.

Jamal, M., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M.A., Hussain, T. and Das, C.R., "Isolation and characterization of a bacteriophage and its utilization against multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*-2995", *Life Sciences* 190, 21-28, 2017.

Jarvis, A.W., Fitzgerald, G.F., Mata, M., Mercenier, A., Neve, H., Powell, I.B. and Teuber, M., "Species and type phages of lactococcal bacteriophages", *Intervirology* 32(1), 2-9, 1991.

Juffs, H.S., "Identification of *Pseudomonas spp.* isolated from milk produced in South Eastern Queensland", *Journal of Applied Bacteriology* 36(4), 585-598, 1973.

Jurczak-Kurek, A., Gašior, T., Nejman-Faleńczyk, B., Bloch, S., Dydecka, A., Topka, G. and Węgrzyn, A., "Biodiversity of bacteriophages: morphological and biological properties of a large group of phages isolated from urban sewage", *Scientific Reports* 6(1), 1-17, 2016.

Karumidze, N., Thomas, J.A., Kvatadze, N., Goderdzishvili, M., Hakala, K.W., Weintraub, S.T. and Hardies, S.C., "Characterization of lytic *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages via biological properties and genomic sequences", *Applied Microbiology and Biotechnology* 94(6), 1609-1617, 2012.

Keskin, D. ve Ekmekçi, S., "Investigation of the incidence of *Pseudomonas aeruginosa* in foods and the effect of salt and pH on *P. aeruginosa*", *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry* 36(1), 41-46, 2008.

Keskin, D., *Pseudomonas spp*'nin gıdalarından izolasyonu, identifikasyonu, rastlanma sıklığı ve *P.aeruginosa* 'ya bazı antimikrobiyal ajanların etkisi, Doktora Tezi, *Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İzmir, 2004.

Khairnar, K., Raut, M.P., Chandekar, R.H., Sanmukh, S.G. and Paunekar, W.N., "Novel bacteriophage therapy for controlling metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* infection in Catfish", *BMC Veterinary Research* 9(264), 1-9, 2013.

Kim, S.J., Chang, J. and Singh, M., "Peptidoglycan architecture of Gram-positive bacteria by solid-state NMR", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1848(1), 350-362, 2015.

King, A. and Phillips, I., "The identification of pseudomonads and related bacteria in a clinical laboratory", *Journal of Medical Microbiology* 11(2), 165-176, 1978.

Knezevic, P., Obreht, D. and Petrovic, O., "Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* specific phages with broad activity spectra", *Current Microbiology* 59(2), 173-180, 2009.

Kocharunchitt, C., Ross, T. and McNeil, D.L., "Use of bacteriophages as biocontrol agents to control Salmonella associated with seed sprouts", *International Journal of Food Microbiology* 128, 453-459, 2009.

Kokjohn, T.A. and Sayler, G.S., "Attachment and replication of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages under conditions simulating aquatic environments", *Microbiology* 137(3), 661-666, 1991.

Kumari, S., Harjai, K. and Chhibber, S., "Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* PAO specific bacteriophages isolated from sewage samples", *American Journal of Biomedical Sciences* 1(2), 91-102, 2009a.

Kumari, S., Harjai, K. and Chhibber, S., "Bacteriophage treatment of burn wound infection caused by *Pseudomonas aeruginosa* PAO in BALB/c mice", *American Journal of Biomedical Sciences* 1(4), 385-394, 2009b.

Kurtböke, İ. (Ed.), Bacteriophages, *BoD–Books on Demand (InTech)*, 2012.

Kutter, E., Kuhl, S., Alavidze, Z. and Blasdel, B.G., "Phage therapy: bacteriophages as natural, self-limiting antibiotics", *Textbook of Natural Medicine* 112, 945-956, 2005.

Kutter, E. and Sulakvelidze, A., Bacteriophages: Biology and Applications, *CRC Press*, New York, 2005.

Laarman, A.J., Bardoel, B.W., Ruyken, M., Fernie, J., Milder, F.J., van Strijp, J.A. and Rooijackers, S.H., "*Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease blocks complement activation via the classical and lectin pathways", *The Journal of Immunology* 188(1), 386-393, 2012.

Labrie, S.J., Samson, J.E. and Moineau, S., "Bacteriophage resistance mechanisms", *Nature Reviews Microbiology* 8(5), 317-327, 2010.

Lacroix, C. (Ed.), Protective Cultures, Antimicrobial Metabolites and Bacteriophages for Food and Beverage Biopreservation, *Elsevier*, 2010.

Le Berre, R., Nguyen, S., Nowak, E., Kipnis, E., Pierre, M., Quenee, L. and Faure, K., “Relative contribution of three main virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia”, *Critical Care Medicine* 39(9), 2113-2120, 2011.

Le, S., Yao, X., Lu, S., Tan, Y., Rao, X., Li, M. and Hu, F., “Chromosomal DNA deletion confers phage resistance to *Pseudomonas aeruginosa*”, *Scientific Reports* 4(1), 1-8, 2014.

Levinson, W., Tıbbi Mikrobiyoloji ve İmmünoloji, Çeviri Editörü/Editörleri, Tuncay Özgünen, *Güneş Tıp Kitabevleri*, Ankara, 2008.

Lister, P.D., Wolter, D.J. and Hanson, N.D., “Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms”, *Clinical Microbiology Reviews* 22(4), 582-610, 2009.

Liu, G.Y. and Nizet, V., “Color me bad: microbial pigments as virulence factors”, *Trends in Microbiology* 17(9), 406-413, 2009.

Loenen, W.A., Dryden, D.T., Raleigh, E.A. and Wilson, G.G., “Type I restriction enzymes and their relatives”, *Nucleic Acids Research* 42(1), 20-44, 2014.

Lopez, M.E.S., Carvalho, M.M.D., Gouvêa, D.M., Batalha, L.S., Neves, I.O. and Mendonça, R.C.S., "Isolation and characterization of lytic bacteriophages as an alternative to prevent *Pseudomonas spp.* in poultry industry", *MOJ Food Processing and Technology* 1(3):00018, 1-6, 2015.

López-Cuevas, O., Medrano-Félix, J.A., Castro-Del Campo, N. and Chaidez, C., “Bacteriophage applications for fresh produce food safety”, *International Journal of Environmental Health Research* 1-16, 2019.

Lu, T.K. and Koeris, M.S., “The next generation of bacteriophage therapy”, *Current Opinion in Microbiology* 14(5), 524-531, 2011.

Lyczak, J.B., Cannon, C.L. and Pier, G.B., “Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist”, *Microbes and Infection* 2(9), 1051-1060, 2000.

Maçin, S., Pigmentli ve pigmentsiz *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının virulans faktörlerinin fenotipik ve genotipik olarak karşılaştırılması, Uzmanlık Tezi, *Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi*, Ankara, 2014.

Malanovic, N. and Lohner, K., “Gram-positive bacterial cell envelopes: The impact on the activity of antimicrobial peptides”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1858(5), 936-946, 2016.

Maukonen, J., Mättö, J., Wirtanen, G., Raaska, L., Mattila-Sandholm, T. and Saarela, M., "Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review", *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 30, 327-356, 2003.

Maura, D. and Debarbieux, L., "Bacteriophages as twenty-first century antibacterial tools for food and medicine", *Applied Microbiology and Biotechnology* 90(3), 851-859, 2011.

McLaughlin, M.R., Balaa, M.F., Sims, J. and King, R., “Isolation of Salmonella bacteriophages from swine effluent lagoons”, *Journal of Environmental Quality* 35(2), 522-528, 2006.

Meng, L., Zhang, Y., Liu, H., Zhao, S., Wang, J. and Zheng, N., “Characterization of *Pseudomonas spp.* and associated proteolytic properties in raw milk stored at low temperatures”, *Frontiers in Microbiology* 8, 2158, 2017.

Menon, N.D., Kumar, M.S., Satheesh Babu, T.G., Bose, S., Vijayakumar, G., Baswe, M. and Kumar, G.B., “A Novel N4-like bacteriophage isolated from a wastewater source in South India with activity against several multidrug-resistant clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates”, *Mosphere* 6(1), e01215-20, 2021.

Merril, C., Scholl, D. and Adhya, S., Phage therapy. In *The Bacteriophages*, Calendar, R. (Ed.), *Oxford University Press*, Oxford, 2006.

Michel-Briand, Y. and Baysse, C., “The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*”, *Biochimie* 84(5-6), 499-510, 2002.

Mickova, V., Lukasova, J. and Konecný, S., “*Pseudomonas aeruginosa* in raw and pasteurized milk”, *Veterinarni Medicina* 34(7), 411-419, 1989.

Miller, C.S., Handley, K.M., Wrighton, K.C., Frischkorn, K.R., Thomas, B.C. and Banfield, J.F., “Short-read assembly of full-length 16S amplicons reveals bacterial diversity in subsurface sediments”, *PloS One* 8(2), e56018, 2013.

Mkwata, H.M., Omoregie, A.I. and Nissom, P.M., “Lytic bacteriophages isolated from limestone caves for biocontrol of *Pseudomonas aeruginosa*”, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 102011, 2021.

Molineux, Ian J., "No syringes please, ejection of phage T7 DNA from the virion is enzyme driven", *Molecular Microbiology* 40.1, 1-8, 2001.

Monk, A.B., Rees, C.D., Barrow, P., Hagens, S. and Harper, D.R., “Bacteriophage applications: where are we now?”, *Letters in Applied Microbiology* 51(4), 363-369, 2010.

Morales, P.A., Aguirre, J.S., Troncoso, M.R. and Figueroa, G.O., “Phenotypic and genotypic characterization of *Pseudomonas spp.* present in spoiled poultry fillets sold in retail settings”, *LWT* 73, 609-614, 2016.

Müller, M.M., Hörmann, B., Sylđatk, C. and Hausmann, R., “*Pseudomonas aeruginosa* PAO1 as a model for rhamnolipid production in bioreactor systems”, *Applied Microbiology and Biotechnology* 87(1), 167-174, 2010.

Murray, P.R., Tıbbi Mikrobiyoloji, Çeviri Editörü, B., Şener, *Atlas Kitapçılık*, Ankara, 2007.

Nabergoj, D., Modic, P. and Podgornik, A., “Effect of bacterial growth rate on bacteriophage population growth rate”, *MicrobiologyOpen* 7(2), e00558, 2018.

Newman, J.W., Floyd, R.V. and Fothergill, J.L., “The contribution of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors and host factors in the establishment of urinary tract infections”, *FEMS Microbiology Letters* 364(15), 2017.

Ngene, A.C., Aguiyi, J.C., Uzal, U., Egber, J.O., Onyimba, I.A., Umera, A.E. and Nnadi, N.E., “Bacteriophages as bio-control agent against food-borne pathogen *E. coli* O157:H7”, *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 15(2), 23-36, 2020.

O'Flynn, G., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F. and Coffey, A., "Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7", *Applied and Environmental Microbiology* 70, 3417-3424, 2004.

Oliveira, V.C., Bim, F.L., Monteiro, R.M., Macedo, A.P., Santos, E.S., Silva-Lovato, C.H. and Watanabe, E., “Identification and characterization of new bacteriophages to control multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* biofilm on endotracheal tubes”, *Frontiers in Microbiology* 11, 2020.

Ong, S.P., Azam, A.H., Sasahara, T., Miyanaga, K. and Tanji, Y., “Characterization of *Pseudomonas* lytic phages and their application as a cocktail with antibiotics in controlling *Pseudomonas aeruginosa*”, *Journal of Bioscience and Bioengineering* 129(6), 693-699, 2020.

Orlova, E., Bacteriophages and their structural organization, In: Kurtboke, I., (Ed.), Bacteriophages, Rijeka, Croatia: *InTech*, pp. 3-30, 2012.

Orzechowska, B. and Mohammed, M., The war between bacteria and bacteriophages. In Growing and Handling of Bacterial Cultures (p. 107), London: *IntechOpen*, 2019.

Paranchych, W., “Stages in phage R17 infection: the role of divalent cations”, *Virology* 28(1), 90-99, 1966.

Park, S.Y., Lee, J.Y., Chang, W.S., Choy, H.E. and Kim, G.J., “A coupling process for improving purity of bacterial minicells by holin/lysine”, *Journal of Microbiological Methods* 86(1), 108-110, 2011.

Passerini, L., Lam, K., Costerton, J.W. and King, E.G., “Biofilms on indwelling vascular catheters”, *Critical Care Medicine* 20(5), 665-673, 1992.

Pennazio, S., “The origin of phage virology”, *Biology Forum/Rivista di Biologia* 99, No. 1, 103-129, 2006.

Penziner, S., Schooley, R.T. and Pride, D.T., “Animal models of phage therapy”, *Frontiers in Microbiology* 12, 2021.

Pingoud, A. and Jeltsch, A., “Structure and function of type II restriction endonucleases”, *Nucleic Acids Research* 29(18), 3705-3727, 2001.

Pires, D., Sillankorva, S., Faustino, A. and Azeredo, J., “Use of newly isolated phages for control of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and ATCC 10145 biofilms”, *Research in Microbiology* 162(8), 798-806, 2011.

Plisson, C., White, H.E., Auzat, I., Zafarani, A., São-José, C., Lhuillier, S. and Orlova, E.V., “Structure of bacteriophage SPP1 tail reveals trigger for DNA ejection”, *The EMBO Journal* 26(15), 3720-3728, 2007.

Prasad, Y., Kumar, D., Sharma, A.K., Nisha, D. and Ninawe, A.S., “Isolation and efficacy characterizations of lytic bacteriophages against antibiotic resistant *Pseudomonas fluorescens* from Sub-Himalayan region”, *Biochem. Cell. Arch* 10(1), 21-29, 2010.

Pringsulaka, O., Patarasinpaiboon, N., Suwannasai, N., Atthakor, W. and Rangsiruji, A., “Isolation and characterisation of a novel *Podoviridae*-phage infecting *Weissella cibaria*

N 22 from Nham, a Thai fermented pork sausage”, *Food Microbiology* 28(3), 518-525, 2011.

Rajmohan, S., Dodd, C.E.R. and Waites, W.M., "Enzymes from isolates of *Pseudomonas fluorescens* involved in food spoilage", *Journal of Applied Microbiology* 93(2), 205-213, 2002.

Rakhuba, D.V., Kolomiets, E.I., Dey, E.S. and Novik, G.I., “Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell”, *Pol J Microbiol* 59(3), 145-55, 2010.

Rees, C.E. and Dodd, C.E., "Phage for rapid detection and control of bacterial pathogens in food", *Advances in Applied Microbiology* 59, 159-186, 2006.

Rocha, A.J., Barsottini, M.R.D.O., Rocha, R.R., Laurindo, M.V., Moraes, F.L.L.D. and Rocha, S.L.D., “*Pseudomonas aeruginosa*: virulence factors and antibiotic resistance genes”, *Brazilian Archives of Biology and Technology* 62, 2019.

Rocourt, J., Moy, G., Vierk, K. and Schlundt, J., "The present state of foodborne disease in OECD countries", *WHO Library Cataloguing-in-Publication Data Switzerland*, 2003.

Roos, W.H., Ivanovska, I.L., Evilevitch, A. and Wuite, G.J.L., “Viral capsids: mechanical characteristics, genome packaging and delivery mechanisms”, *Cellular and Molecular Life Sciences* 64(12), 1484-1497, 2007.

Salmond, G.P. and Fineran, P.C., “A century of the phage: past, present and future”, *Nature Reviews Microbiology* 13(12), 777-786, 2015.

Samal, S.K. and Nath, G., "Isolation and molecular characterization of specific bacteriophages for treatment of human infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*", *Medical Microbiology and Diagnosis* 4(4), 1-6, 2015.

Samson, J.E., Magadán, A.H., Sabri, M. and Moineau, S., “Revenge of the phages: defeating bacterial defences”, *Nature Reviews Microbiology* 11(10), 675-687, 2013.

Seed, K.D., “Battling phages: how bacteria defend against viral attack”, *PLoS Pathog* 11(6), e1004847, 2015.

Şen, A. ve Halkman, A.K., "Çiğ sütte *Pseudomonas aeruginosa* sayılması için yöntem modifikasyonları üzerine çalışmalar", *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi* 4, 2-13, 2006.

Shao, Y. and Wang, I.N., “Bacteriophage adsorption rate and optimal lysis time”, *Genetics* 180(1), 471-482, 2008.

Sharma, M., “Lytic bacteriophages: potential interventions against enteric bacterial pathogens on produce”, *Bacteriophage* 3(2), e25518, 2013.

Sharma, S., Chatterjee, S., Datta, S., Prasad, R., Dubey, D., Prasad, R.K. and Vairale, M.G., “Bacteriophages and its applications: an overview”, *Folia Microbiologica* 62(1), 17-55, 2017.

Sillankorva, S., Neubauer, P. and Azeredo, J., “Isolation and characterization of a T7-like lytic phage for *Pseudomonas fluorescens*”, *BMC Biotechnology* 8(1), 1-11, 2008.

Smith, H.W. and Huggins, M.B., “Effectiveness of phages in treating experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves, piglets and lambs”, *Microbiology* 129(8), 2659-2675, 1983.

Snyder, L. and Champness, W., Molecular Genetics of Bacteria, *Asm Press*, Washington, DC, USA, 2007.

Soberón-Chávez, G., Lépine, F. and Déziel, E., “Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*”, *Applied Microbiology and Biotechnology* 68(6), 718-725, 2005.

Soothill, J.S., "Treatment of experimental infections of mice with bacteriophages", *Journal of Medical Microbiology* 37(4), 258-261, 1992.

Spicigo, D.A., Bardina, C., Cortés, P. and Llagostera, M., "Use of a bacteriophage cocktail to control Salmonella in food and the food industry", *International Journal of Food Microbiology* 165(2), 169-174, 2013.

Stanier, R.Y., Palleroni, N.J. and Doudoroff, M., "The aerobic Pseudomonads a taxonomic study", *Microbiology* 43(2), 159-271, 1966.

Stenholm, A.R., Inger D. and Mathias M., "Isolation and characterization of bacteriophages infecting the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*", *Applied and Environmental Microbiology* 74, 4070-4078, 2008.

Stern, A. and Sorek, R., "The phage-host arms race: shaping the evolution of microbes", *Bioessays* 33(1), 43-51, 2011.

Strauch, E., Hammerl, J.A. and Hertwig, S., "Bacteriophages: new tools for safer food?", *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 2(2), 138-143, 2007.

Streeter, K. and Katouli, M., "*Pseudomonas aeruginosa*: A review of their pathogenesis and prevalence in clinical settings and the environment", *Infection Epidemiology and Microbiology (Infection Epidemiology and Medicine)* 2, 25-32, 2016.

Suárez, V.B., Maciel, N., Guglielmotti, D., Zago, M., Giraffa, G. and Reinheimer, J. "Phage-resistance linked to cell heterogeneity in the commercial strain *Lactobacillus delbrueckii* subsp. lactis Ab1", *International Journal of Food Microbiology* 128, 401-405, 2008.

Takeya, K., Minamishima, Y., Ohnishi, Y. and Amako, K., "Rod-shaped pyocin 28", *Journal of General Virology* 4(2), 145-149, 1969.

Tanaka, C., Nakayama, T., Toba, T. and Kashiwagi, A., “Complete genomic sequence of *Pseudomonas lactis* bacteriophage HU1 isolated from raw cow’s milk”, *Archives of Virology* 165(1), 215-217, 2020.

Tang, Y., Ali, Z., Zou, J., Jin, G., Zhu, J., Yang, J. and Dai, J., “Detection methods for *Pseudomonas aeruginosa*: history and future perspective”, *RSC advances* 7(82), 51789-51800, 2017.

Temiz, A., Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri, *Hatipoğlu Yayınevi*, Ankara, 2014.

Titer, P., “Isolation of bacteriophage from sewage and determination of phage titer”, *Bacteriophage* 37(1):277–84, 2016.

Tunail, N., Genel Mikrobiyoloji Kitabı, *Pelin Ofset*, Ankara, 2009.

Url-1, 2011.  
<https://intweb.tse.org.tr/Standard/Standard/Standard.aspx?081118051115108051104119110104055047105102120088111043113104073086057115068119077055052050070089>, Erişim Tarihi: 21 Temmuz 2021.

Ünlütürk, A. ve Turantaş, F., Gıda Mikrobiyolojisi Kitabı, *Meta Basım Matbaacılık*, İzmir, 2015.

Ünsal, B., Phylogenetic analysis of bacterial communities in kefir by metagenomics, Yüksek Lisans Tezi, *İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü*, İzmir, 2008.

Uraz, G. ve Çıtak, S., “An investigation about the distribution and isolation of *Pseudomonas* from raw milk samples obtained from different areas”, *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 22(5), 469-474, 1998.

Van Delden, C. and Iglewski, B.H, “Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections”, *Emerging Infectious Diseases* 4(4), 551, 1998.

Van Delden, C., Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*, In Virulence and Gene Regulation (pp. 3-45), **Springer**, Boston, 2004.

Vihavainen, E.J. and Björkroth, J., “Microbial ecology and spoilage of poultry meat and poultry meat products”, **Handbook of Poultry Science and Technology, Secondary Processing** 2, 485-493, 2010.

Virupakshaiah, D.B.M. and Hemalata, V.B., “Molecular identification of *Pseudomonas aeruginosa* from food borne isolates”, **Int J Curr Microbiol App Sci** 5(6), 1026-1032, 2016.

Wang, I.N., “Lysis timing and bacteriophage fitness”, **Genetics** 172(1), 17-26, 2006.

Wang, J., Hu, B., Xu, M., Yan, Q., Liu, S., Zhu, X. and Hu, J., “Therapeutic effectiveness of bacteriophages in the rescue of mice with extended spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* bacteremia”, **International Journal of Molecular Medicine** 17(2), 347-355, 2006.

Ward, T.E., Bruhn, D.F., Shean, M.L., Watkins, C.S., Bulmer, D. and Winston, V., “Characterization of a new bacteriophage which infects bacteria of the genus *Acidophilium*”, **Journal of General Virology** 74, 2419-2425, 1993.

Whitman, P.A. and Marshall, R.T., “Characterization of two psychrophilic *Pseudomonas* bacteriophages isolated from ground beef”, **Applied Microbiology** 22(3), 463-468, 1971.

Wong, M.H.Y., Chi Chan, E.W. and Chen, S., “Isolation of carbapenem-resistant *Pseudomonas spp.* from food”, **Journal of Global Antimicrobial Resistance** 3(2), 109-114, 2015.

Wood, S.J., Goldufsky, J.W., Bello, D., Masood, S. and Shafikhani, S.H., “*Pseudomonas aeruginosa* ExoT induces mitochondrial apoptosis in target host cells in a manner that depends on its GTPase-activating protein (GAP) domain activity”, **Journal of Biological Chemistry** 290(48), 29063-29073, 2015.

Woods, D.E., “Comparative genomic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* virulence”, ***Trends in Microbiology*** 12(10), 437-439, 2004.

Xu, Z., Xie, J., Soteyome, T., Peters, B.M., Shirliff, M.E., Liu, J. and Harro, J.M., “Polymicrobial interaction and biofilms between *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*: an underestimated concern in food safety”. ***Current Opinion in Food Science*** 26, 57-64, 2019.

Yang, H., Liang, L., Lin, S. and Jia, S., "Isolation and characterization of a virulent bacteriophage AB1 of *Acinetobacter baumannii*", ***BMC Microbiology*** 10(1), 131, 2010.

Yang, L., Li, C., Zhai, S.Q., Zheng, H., Fu, L.Z. and Li, D.J., “An improved plating assay for determination of phage titer”, ***African Journal of Biotechnology*** 15(23), 1078-1082, 2016.

Yıldırım, Z., Sakin, T., Akçelik, M. ve Akçelik, N., “Identification and characterization of lytic bacteriophages specific to foodborne pathogenic *Escherichia coli* O157: H7”, ***Food Science and Technology International*** 27(1), 56-72, 2021.

Yordpratum, U., Tattawasart, U., Wongratanacheewin, S. and Sermswan, R.W., “Novel lytic bacteriophages from soil that lyse *Burkholderia pseudomallei*”, ***Fems Microbiology Letters*** 314, 81-88, 2011.

Yu, P., Mathieu, J., Li, M., Dai, Z. and Alvarez, P.J.J., “Isolation of polyvalent bacteriophages by sequential multiple host approaches”, ***Applied and Environmental Microbiology*** 82(3), 808- 815, 2016.

Yuan, Y., Qu, K., Tan, D., Li, X., Wang, L., Cong, C. and Xu, Y., “Isolation and characterization of a bacteriophage and its potential to disrupt multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* biofilms”, ***Microbial Pathogenesis***, 128, 329-336, 2019.

Zhong, Z., Gao, R., Chen, Q. and Jia, L., “Dual-aptamers labeled polydopamine-polyethyleneimine copolymer dots assisted engineering a fluorescence biosensor for

sensitive detection of *Pseudomonas aeruginosa* in food samples”, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 224, 117417, 2020.



## ÖZGEÇMİŞ

Nazife YILMAZ ..... yılında .....’de doğdu. İlk ve orta öğrenimini .....’de tamamladı. 2002 yılında kazandığı ..... Üniversitesi ..... Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü’nden ..... yılında mezun oldu. .... yılında ..... Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı’nda başladığı Yüksek Lisans eğitimini ..... yılında tamamladı. Şuan Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü’nde Öğretim Görevlisi olarak çalışmaktadır.



