



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

SALMONELLA ENTERITIDIS'E ÖZGÜN SEnt-P5 VE SEnt-P6
BAKTERİYOFAJLARIN KARAKTERİZASYONU

NİDA NUR URGANCI

Haziran 2019

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

SALMONELLA ENTERITIDIS'E ÖZGÜN SEnt-P5 VE SEnt-P6
BAKTERİYOFAJLARIN KARAKTERİZASYONU

NİDA NUR URGANCI

Yüksek Lisans Tezi

Danışman

Prof. Dr. Zeliha YILDIRIM

Haziran 2019

Nida Nur URGANCI tarafından **Prof. Dr. Zeliha YILDIRIM** danışmanlığında hazırlanan “**Salmonella Enteritidis’ özgün SEnt-P5 ve SEnt-P6 bakteriyofajların karakterizasyonu** ” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

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

Üye : Prof. Dr. Zülal KESMEN
Erciyes Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Hilal YILDIZ
Nevşehir Hacı Bektaş Veli 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...

Doç. 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.

Nida Nur URGANCI

ÖZET

SALMONELLA ENTERITIDIS'E ÖZGÜN SEnt-P5 VE SEnt-P6 BAKTERİYOFAJLARIN KARAKTERİZASYONU

URGANCI, Nida Nur

Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Zeliha YILDIRIM

Haziran 2019, 60 sayfa

Bu tezin amacı *Salmonella* Enteritidis'i enfekte eden SEnt-P5 ve SEnt-P6 bakteriyofajlarını saflaştırmak, morfolojik özelliklerini, konak hücre aralıklarını, enfeksiyon çokluğu değerlerini (MOI), konakçı hücreye karşı litik aktivitelerini, adsorpsiyon oranlarını, gelişme kurvelerini, pH, ısı işlem ve depolama koşullarında stabilitelerini tespit etmektir. Araştırma sonucunda, SEnt-P5 ve SEnt-P6 kodlu fajların kuyruklu ve *Siphoviridae* familyasına ait oldukları, MOI ve mutant frekans değerlerinin ise sırasıyla 0,01-0,0001 ve $5,92 \times 10^{-7}$ - $3,50 \times 10^{-7}$ olduğu belirlenmiştir. İnkübasyonun ilk 5 dakikasında konak hücrelerine %96-98 oranında adsorbe oldukları, latent periyotlarının 5-10 dk, patlama süreleri ile sayılarının sırasıyla 20 dk ve 277-351 olduğu saptanmıştır. Geniş pH (2-13) aralıklarına, yüksek sıcaklık (80-90°C) uygulamalarına karşı dirençli oldukları, 4, 25 ve 35, -20, -80°C'de 3 aylık depolama süresince stabilitelerini korudukları belirlenmiştir. Fajların etki ettiği konak hücre aralığının geniş olduğu, diğer *S. enterica* serovarlarına ve bazı *E. coli* suşlarına karşı da enfektif oldukları bulunmuştur. Her iki fajın hem 25 ve 35°C'de hem de buzdolabı sıcaklığında konak hücrelerini çok etkili bir şekilde imha ettikleri gözlenmiştir. Sonuç olarak SEnt-P5 ve SEnt-P6 fajları, gıda kaynaklı patojen olan *S. Enteritidis*'e karşı gıda endüstrisinde biyokoruyucu ajan olarak kullanılma potansiyeline sahiptirler.

Anahtar Kelimeler: Bakteriyofaj, biyokoruyucu, *Salmonella* Enteritidis

SUMMARY

CHARACTERIZATION OF SEnt-P5 AND SEnt-P6 PHAGES SPECIFIC FOR *SALMONELLA* ENTERITIDIS

URGANCI, Nida Nur

Nigde Ömer Halisdemir University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Food Engineering

Supervisor : Professor Dr. Zeliha YILDIRIM

June 2019, 60 sayfa

The aim of this thesis were to purify SEnt-P5 and SEnt-P6 bacteriophages infecting *Salmonella* Enteritidis and to determine their morphological properties, host ranges, multiplicity of infection (MOI), lytic activity against host cell, adsorption rates, growth curve, pH, heat treatment and storage stability. As a result of the study, SEnt-P5 and SEnt-P6 phages belong to the *Syphoviridae* family, and their MOI and mutant frequency values were 0.01-0.0001 and $5.92 \times 10^{-7} - 3.50 \times 10^{-7}$, respectively. It was determined that they adsorbed to their host cells by 96-98% in the first 5 minutes of incubation, and their latent periods, burst time and burst size were 5-10 min, 20 min and 277-351 PFU/mL, respectively. They were resistant to wide pH ranges (2-13) and high temperature (80-90°C), and they maintained their stabilities during 3 months storage at 4, 25, 35, -20 and -80°C. SEnt-P5 and P6 phages had wide host ranges and in addition to *S. Enteritidis*, they were infective against other *S. enterica* serovars and some *E. coli* strains. Both phages had strong infective effect against their host cells at either 25 and 35°C or refrigerator temperature. Consequently, SEnt-P5 and P6 phages have potency to be used as a biocontrol agent against food-borne pathogenic *S. Enteritidis* in the food industry.

Keywords : Bacteriophage, biopreservation, Salmonella Enteritidis

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca ne zaman kendisine danışsam beni anaç tavrıyla karşılayıp, zamanını, ilgisini, güler yüzünü, samimiyetini eksik etmeyen, hedeflerime ulaşmam için her zaman teşvikte bulunan, tez çalışmamın her aşamasında deneyim ve engin bilgileriyle yol gösteren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Zeliha YILDIRIM'a,

Çalışmalarım boyunca yardımını hiç esirgemeyen, bana bir hocadan daha çok abla olan Arş. Gör. Tuba SAKİN'e, her zaman bana inanıp destekleyen, başarılarıma kendi başarılarıymış gibi sevinen canım arkadaşlarım Gizem YILDARI ve Eda CEYLAN'a

Bu günlere gelmemde en büyük katkısı olan, attığım her adımda yanımda olup güvenen, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, beni sevgiyle büyüten, annem Ayşe URGANCI, babam Mehmet URGANCI başta olmak üzere aileme sonsuz teşekkürler.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
SUMMARY	v
ÖNSÖZ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGE VE KISALTMALAR	xi
BÖLÜM I GİRİŞ	1
BÖLÜM II KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. Bakteriyofaj	3
2.2. Bakteriyofajların Keşfi ve Tarihi	3
2.3. Bakteriyofajların Sınıflandırılması	4
2.3. Bakteriyofajların Morfolojisi ve Özellikleri	6
2.4. Bakteriyofajların Yaşam Şekilleri	8
2.4.1. Litik yaşam döngüsü	9
2.4.2. Lizojenik yaşam döngüsü	11
2.5. Bakteriyofajların Kullanım Alanları	12
2.6. Gıda Endüstrisinde Bakteriyofajların Biyokoruyucu Olarak Kullanımı	13
2.7. <i>Salmonella</i> Enteritidis'in Bakteriyofajlar Aracılığı ile Kontrolü	15
BÖLÜM III MATERYAL VE METOT	19
3.1. Bakteriler, Bakteriyofajlar ve Besi Ortamları	19
3.2. SEnt-P5 ve SEnt-P6 Fajların Tek Plak Yöntemiyle Saflaştırılması	19
3.3. Bakteriyofaj Stok Örneklerinin Hazırlanması	19
3.4. Bakteriyofaj Sayısının Çift Tabaka Agar Plak Metodu ile Belirlenmesi	20
3.5. Fajların Etki Ettiği Konakçı Aralığının Belirlenmesi	20
3.6. Fajların Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi	20
3.7. İnfeksiyon Çokluğu Değerinin Belirlenmesi	21
3.8. Bakteriyofaj Replikasyon (Gelişme) Kinetiği	22
3.9. Fajların Konakçı Hücreye Adsorpsiyon Oranının Belirlenmesi	22
3.10. Konakçı Hücreye Karşı Bakteriyofajların Litik Aktivitelerinin Belirlenmesi	23
3.11. Farklı Depolama Koşullarında Faj Stabilitelerinin Belirlenmesi	23

3.12. Fajların pH ve Sıcaklık Stabilite Değerlerinin Tespiti.....	23
3.13. Bakteriyofaja-Duyarsız Mutant Sıklığının Belirlenmesi	24
3.14.Fajların Buzdolabı Koşularında Konakçı Hücreye Karşı Aktivitelerinin Belirlenmesi	24
BÖLÜM IV BULGULAR VE TARTIŞMA	25
4.1. SEnt-P5 ve SEnt-P6 Fajların Saflaştırılması ve Stok Örneklerinin Hazırlanması...	25
4.2. Fajların Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi	26
4.3. Konakçı Aralığının Belirlenmesi	28
4.4. İnfeksiyon Çokluğu Değeri.....	33
4.5. SEnt-P5 ve SEnt-P6 Fajlarının Gelişme Kinetiği	34
4.6. Fajların Konakçı Hücreye Adsorpsiyon Oranının Belirlenmesi	37
4.7. SEnt-P5 ve SEnt-P6 Fajların Stabiliteleri	38
4.8. Bakteriyofaja-Duyarsız Mutant Sıklığının Belirlenmesi	43
4.9. Bakteriyofajların Konak Hücrelerine Karşı Litik Aktiviteleri.....	44
BÖLÜM V SONUÇLAR	48
KAYNAKLAR	50
ÖZ GEÇMİŞ	61

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Ackermann sınıflandırılması	6
Çizelge 3.1. Bakteriyofajların konak hücre aralığının belirlenmesinde kullanılan bakteriler	21
Çizelge 4.1. SEnt-P5 ve SEnt-P6 fajlarının konakçı aralığı	31
Çizelge 4.2. SEnt-P5 ve SEnt-P6 fajlarının 25°C’de konakçı hücrelerine tek ve kokteyl olarak litik aktivitesi.....	44
Çizelge 4.3. SEnt-P5 ve SEnt-P6 fajlarının 35°C’de konakçı hücrelerine tek ve kokteyl olarak litik aktivitesi.....	45
Çizelge 4.5. Yüksek dozda (10^9 pob/mL) SEnt-P5 ve SEnt-P6 fajlarının 5°C’de düşük dozda (10^3 kob/mL) konak hücrelerine karşı enfektif etkileri	46
Çizelge 4.6. Yüksek dozda (10^9 pob/mL) SEnt-P5 ve SEnt-P6 fajlarının 5°C’de yüksek dozda (10^6 kob/mL) konak hücrelerine karşı enfektif etkileri	47
Çizelge 4.7. Düşük dozda (10^6 pob/mL) SEnt-P5 ve S-P6 fajlarının 5°C’de düşük dozda (10^3 kob/mL) konak hücrelerine karşı enfektif etkileri	47
Çizelge 4.8. Düşük dozda (10^6 pob/mL) SEnt-P5 ve SEnt-P6 fajlarının 5°C’de yüksek dozda (10^6 kob/mL) konak hücrelerine karşı enfektif etkiler.....	47

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Bakteriyofajların tarihsel evrimi.....	4
Şekil 2.2. Bradley sınıflandırması.....	5
Şekil 2.3. Kompleks bir bakteriyofajın yapısı	7
Şekil 2.4. Bakteriyofajların litik yaşam döngüsü.....	9
Şekil 2.5. Bakteriyofajın konakçıya adsorbsiyonu ve penetrasyonu	9
Şekil 2.6. Fajın bakteri hücresi içinde üremesi ve gelişmesi	11
Şekil 2.7. Fajın bakteri hücresini lizise uğratması	11
Şekil 2.8. Bakteriyofajların lizojenik yaşam döngüsü	12
Şekil 4.1. SEnt-P5 fajının tek plak izolasyon yöntemiyle saflaştırılması.....	25
Şekil 4.2. SEnt-P5 fajının saflaştırıldıktan sonraki görünümü	25
Şekil 4.3. Çift tabaka agar yöntemiyle bakteriyofaj plak görüntüsü	26
Şekil 4.4. SEnt-P5 ve SEnt-P6 fajlarının TEM görüntüsü.....	27
Şekil 4.5. SEnt-P5 ve SEnt-P6 fajlarının konak hücrelere oluşturdukları plak çeşitleri	31
Şekil 4.6. SEnt-P5 fajının MOI değeri.....	34
Şekil 4.7. SEnt-P6 fajının MOI değeri.....	34
Şekil 4.8. SEnt-P5 fajının tek aşamalı gelişim kurvesi.....	36
Şekil 4.9. SEnt-P6 fajının tek aşamalı gelişim kurvesi.....	36
Şekil 4.10. SEnt-P5 ve SEnt-P6 fajlarının konak hücrelerine adsorbsiyon oranları.....	37
Şekil 4.11. SEnt-P5 ve SEnt-P6 fajlarının pH stabiliteleleri	39
Şekil 4.12. SEnt-P5 fajının sıcaklık stabilitesi.....	40
Şekil 4.13. SEnt-P6 fajının sıcaklık stabilitesi.....	40
Şekil 4.14. SEnt-P5 fajın düşük derecede (4, -20 ve -80°C) depolama koşullarında stabilitesi; G, %20 gliserollü ortam.....	41
Şekil 4.15. SEnt-P5 fajın 25 ve 35°C’de depolama koşullarında stabilitesi.....	42
Şekil 4.16. SEnt-P6 fajın düşük derecede (4, -20 ve -80°C) depolama koşullarında stabilitesi; G, %20 gliserollü ortam.....	42
Şekil 4.17. SEnt-P6 fajın 25 ve 35°C’de depolama koşullarında stabilitesi.....	43

SİMGE VE KISALTMALAR

Simgeler

μ	Mikron
kob/mL veya g	Mililitrede veya gramda koloni oluşturan birimi
pob/mL veya	Mililitrede veya gramda plak oluşturan birim
nm	Nanometre
mm	Mili metre
mM	Mili molar
kb	Kilo baz
<i>S. Enteritidis</i>	<i>Salmonella</i> Enteritidis
<i>S. Typhimurium</i>	<i>Salmonella</i> Typhimurium
<i>S. Choleraesuis</i>	<i>Salmonella</i> Choleraesuis
<i>S. Pullorum</i>	<i>Salmonella</i> Pullorum
<i>S. Dublin</i>	<i>Salmonella</i> Dublin
<i>S. Corvallis</i>	<i>Salmonella</i> Corvallis
<i>S. Gallinarum</i>	<i>Salmonella</i> Gallinarum
<i>E. coli</i> O157:H7	<i>Escherichia coli</i> O157:H7
SEnt-faj	<i>Salmonella</i> Enteritidis fajı
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>

Kısaltmalar

BHI	Brian Heart Infusion
LB	Luria Bertani
Tris-Cl	Tris-Klorid
Ca	Kalsiyum
CaCl ₂	Kalsiyum Klorür
NaCl	Sodyum Klorür
MgSO ₄	Magnezyum Sülfat
MOI	Çoklu Enfeksiyon Değeri
AB	Avrupa Birliği
ABD	Amerika Birleşik Devletleri

DNA	Deoksiribonükleik asit
RNA	Ribonükleik asit
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
STX	Shiga Toksini
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu
ATCC	Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu
BIM	Bakteriyofaja Duyarsız Mutant Sıklığı



BÖLÜM I

GİRİŞ

Salmonella, Enterobacteriaceae familyasına ait, Gram-negatif, fakültatif anaerobik bir bakteridir. *Salmonella* spp. doğada yaygın olarak bulunur, ancak hayvanların bağırsak sistemi ana habitatıdır. Salmonellanın başlıca rezervuarı çiftlik, evcil ve yabani hayvanların bağırsak sistemidir (Bell, 2002; Hald, 2013). *Salmonella* serovarlarının büyük bir kısmı patojeniktir ve ağırlıklı olarak hayvansal ürünler (yumurta, kanatlı eti vb) veya kontamine sebzeler önemli kaynak teşkil etmektedirler (CDC, 2015; Scallan vd., 2011). 2500'den fazla *Salmonella* serotipi bilinmekte ve dünyada en yaygın olanı *Salmonella* Enteritidis'tir. Gıda kaynaklı patojen bakteri olan *Salmonella* Enteritidis, küresel olarak önemli bir gıda güvenliği sorunudur. Tavuk yetiştiriciliğinde ve gıda endüstrisinde gelişmiş önleyici ve kontrol stratejilerin olmasına karşın, *Salmonella* Enteritidis enfeksiyonu hala sürekli bir sorun teşkil etmektedir.

Salmonella'nın neden olduğu gıda kaynaklı hastalık olan salmonellozis, birçok ülkede en çok bildirilen zoonotik hastalıklardan biridir. Bir tür akut bağırsak enfeksiyonu olan salmonellozise neden olan en önemli *Salmonella* serovarlardan birisi *Salmonella* Enteritidis'tir (Bhunia, 2008; Desin vd., 2013).

Günümüzde tüketicilerin kimyasal koruyucu madde içermeyen ve az işlenmiş gıdalara yönelmelerinden dolayı gıda kaynaklı mikrobiyal enfeksiyonları önlemek ve kontrol altına almak için yeni çevre dostu stratejilere ihtiyaç duyulmaktadır. Son yıllarda, bakteriyel patojenleri kontrol etmek için biyokoruyucuların kullanılmaları oldukça fazla ilgi görmektedir. Gıda güvenliğini artırmak ve raf ömrünü uzatmak için gıdalardaki istenmeyen mikroorganizmaların gelişimlerini önlemek veya bunları imha etmek için antagonistik mikroorganizmaların veya bunların metabolik ürünlerinin kullanılmasına biyokoruma denilmektedir. Gıda kaynaklı patojen ve bozulma etmeni bakterilerin imhasında en fazla ilgi gören biyokoruyucu, bakteriyofajlardır. Bakteriyofajlar, ayrıca antimikrobiyal maddelere dirençli patojenlerin neden olduğu enfeksiyon ve kontaminasyonlar için de olası alternatif bir biyolojik kontrol yöntemi olarak kabul görmektedirler.

Yüzyıllar önce keşfedilen bakteriyofajlar (fajlar olarak da bilinir) bakteri paraziti virüslerdir. Virüsler gibi, zorunlu parazitlerdir ve çoğalmak için konakçının çoğalma mekanizmasına ihtiyaç duyarlar. Bakteriyofajlar konak hücre olarak sadece bakterileri kullanırlar ve dolayısıyla sadece bakterileri enfekte ederek onlarda gelişebilen mikroorganizmalardır. Fajlar moleküler biyolojide sentral dogmanın (bilgilerin sırasıyla DNA'dan RNA'ya proteinlere iletilmesi) ortaya konmasında önemli rol oynamışlardır. Ayrıca ekosistemlerde önemli rolleri olduğu, bakteriyel evrimi ve virülansı desteklediği gösterilmiştir. Enfeksiyon, faj partikülünün, konakçı yüzey üzerindeki spesifik bir reseptörün spesifik tutunması ile başlamakta, ardından faj nükleik asidini hücre içerisine enjekte etmektedir. Bakteri hücresi içine faj genomu girdikten sonra, faj bakteri hücrelerini ve hücresel bileşenlerini ele geçirir ve savunma mekanizmasını etkisiz hale getirir. Daha sonra bakteriyel çoğalma mekanizmasını kullanarak kendi genlerini ve genomunu çoğaltır. Aynı zamanda proteinlerini de sentezler. Daha sonra faj bileşenleri birleşerek faj partikülü oluşur. Litik enfeksiyon döngüsünün sonunda, bakteri hücrelerini lize ederek faj partikülleri açığa çıkar. Lizogenik hayat döngüsünü süren fajlarda ise faj nükleik asidi bakteri kromozomuna entegre-olarak onun bir parçası haline geçmektedir (Ofir ve Sorek, 2018).

Litik veya virülant bakteriyofajlar güvenli gıda üretmek amacıyla “tarladan çatala” kadar olan gıda zincirinin her aşamasında örneğin üretim, dağıtım ve depolama aşamalarında kullanılabilme potansiyeline sahiptirler. Virülant fajlar gıdanın kalitesini olumsuz yönde etkilemeden bakteri hücrelerini parçalayarak bakterilerin imha olmasını sağlarlar (Ferguson vd., 2013).

Bu çalışmanın amacı; *Salmonella* Enteritidis'e karşı enfektif olan daha önce tarafımızca sırasıyla kanalizasyon ve mezbaha atık suyundan izole edilmiş SEnt-P5 ve SEnt-P6 kodlu iki bakteriyofajı saflaştırmak, morfolojik özelliklerini, konak hücre aralıklarını, plak etkinlik değerlerini, enfeksiyon çokluğu değerlerini, adsorpsiyon oranlarını, tek aşamalı gelişim kurvelerini, konakçı hücreye karşı litik aktivitelerini, pH ve sıcaklık stabilitelelerini belirlemektir.

BÖLÜM II

KAYNAK ARAŞTIRMASI

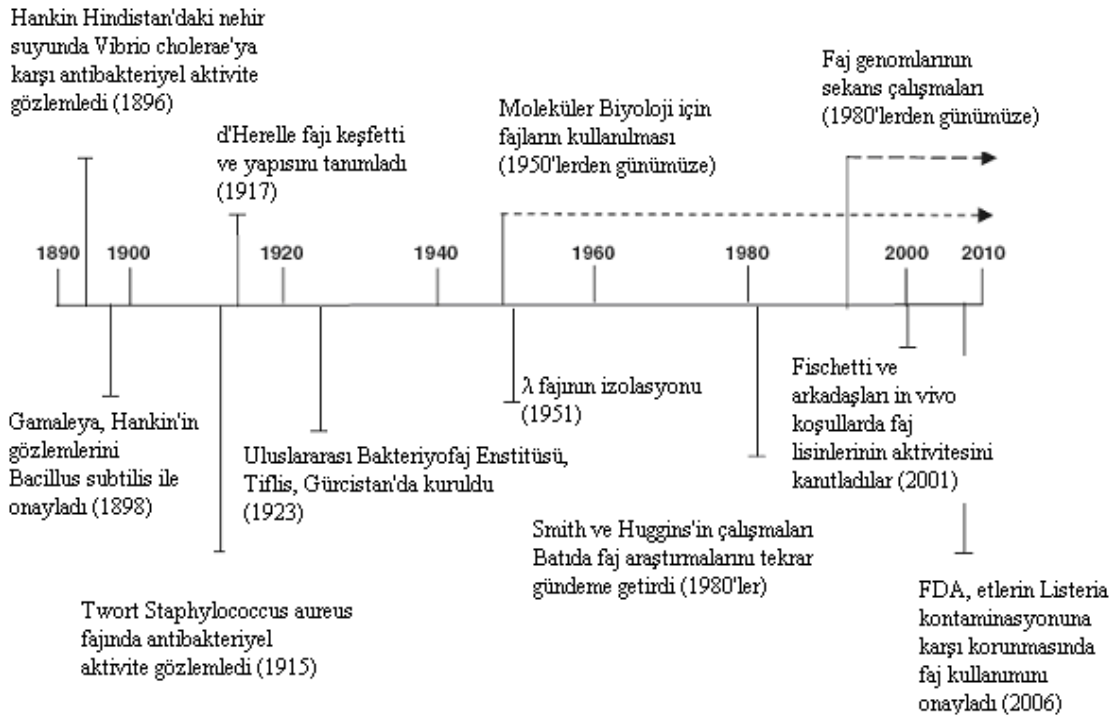
2.1. Bakteriyofaj

Bakteriyofaj “bakteri” ve “yemek” kelimelerinden oluşan, bakteri yiyen anlamına gelen Yunanca bir kelimedir. Bakteriyofajlar, kısaca fajlar bakterilerin bulunduğu hemen hemen her yerde özellikle de dere, akarsu, atık su, kanalizasyon, termal su, toprak, insan ve hayvan bağırsağı ile bunların dışkıları, gıdalar, gıda işletmelerinde oldukça fazla bulunurlar (Wommack ve Colwell, 2000). Yeryüzünde sayıları yaklaşık 10^{31} olan bu canlılar, dünyada en fazla bulunan mikroorganizmalardır (Brüssow ve Kutter, 2005). Fajlar sadece prokaryotik hücrelerden bakterileri enfekte eden ve çoğalan spesifik viral patojenik virüsler olduğundan insanlar, hayvanlar ve bitkiler için zararsızdırlar (Cann, 1993; McGrath vd. 2007).

2.2. Bakteriyofajların Keşfi ve Tarihi

Bakteriyofajların keşfi yüzyıllar öncesine dayanmaktadır. Fajlar ile ilgili ilk bilimsel tespitler, İngiliz bakteriyolog Ernest Hanbury Hankin tarafından 1896 yılında Hindistan’da bulunan Yamuna ve Ganj nehrindeki suların birçok bakteriye özellikle de *Vibrio cholerae*’ya karşı inhibe edici etkisi olduğunu gözlemlenmesiyle başlanmıştır. 1901 yılında ise Emmerich ve Löw antimikrobiyal bir maddenin bakteri kültürünü lize ettiğini öne sürmüştür (Kutter ve Sulakvelidze, 2005). 1915 yılında İngiliz bakteriyolog Frederick Twort katı besiyerinde bakteri kültürlerinde erimeler oluşturan bir ajan keşfetmiştir. 1917’de Kanadalı bakteriyolog Felix d’Herelle Fransa Pasteur Enstitüsü’nde yaptığı çalışmalarda bakterileri öldüren bir canlı keşfetmiş ve yürüttüğü çalışmalarda atık sulardan aldığı örneklerle filtrasyon işlemi uyguladıktan sonra bakteri içermeyen filtratları dizanteri bakteri kültürlerinin içine ilave ettiğinde söz konusu bakteriyi imha ettiğini gözlemlemiştir. Buna sebep olan canlıların ultravirüsler olduğunu öne sürmüş ve bunları “bakteriyofaj” olarak adlandırmıştır. Bu keşfin hemen sonrasında dizanteri hastalığı olan bir çocuğun tedavisini fajlarla yürütmüş ve başarı kaydetmiştir. İkinci Dünya Savaşı boyunca da dizanteri tedavisinde kullanmak için “polyfajin” adlı faj preparatı üretilmiştir (Adhya ve Merril 2006). 1923 yılında George

Eliava tarafından faj tedavisi ve faj çalışmalarının geliştirilebilmesi için Tiflis Grücistan'da Eliava Enstitüsü açılmıştır. Açılan bu enstitü sayesinde faj çalışması yürüten birçok bilim insanı çeşitli yöntemler geliştirip, fajları tedavi amacıyla kullanmışlardır. Yapılan araştırmalar sonucunda bakteriyofajların büyüklüklerinin virüslere benzer olduğu, bu nedenle yalnızca elektron mikroskopunda incelenebildiği ortaya çıkmıştır (Kurtboke, 2012). Fajların tarihsel gelişim evresi Şekil 2.1'de sunulmuştur.



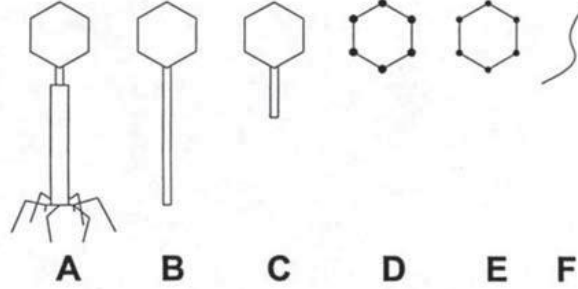
Şekil 2.1. Bakteriyofajların tarihsel evrimi (O'Flaherty vd., 2009)

2.3. Bakteriyofajların Sınıflandırılması

Fajların sınıflandırılmasında morfolojik ve moleküler özellikleri dikkate alınmaktadır. Bradley 1967 yılında sahip oldukları nükleik asit ve morfolojik yapılarına göre bakteriyofajları A, B, C, D, E ve F olmak üzere 6 tipe ayırmıştır:

- A tipi fajlar uzun kuyruklu, kılıflı, kasılabilen ve çift iplikli linear DNA'ya,
- B tipi fajlar uzun kuyruklu, kılıflı ve çift iplikli linear DNA'ya,
- C tipi fajlar kısa kuyruklu, kılıfsız ve çift iplikli linear DNA'ya,
- D tipi fajlar kuyruksuz, büyük kapsomerli, tek iplikçi DNA'ya,
- E tipi fajlar kuyruksuz, küçük kapsomerli, tek iplikçi RNA'ya,

- F tipi fajlar ise başsız, iplikçi ya da filamentöz, tek iplikçi RNA'ya sahiptirler (Şekil 2.2) (Bradley, 1967).



Şekil 2.2. Bradley sınıflandırması

Ackermann (2003 ve 2007) tarafından yapılan bakteriyofajlar morfolojik nükleik asit yapılarına göre yeniden sınıflandırılmış ve bu sınıflandırma “Ackermann Sınıflandırması” olarak adlandırılmıştır. Ackermann sınıflandırılmasında fajlar kuyruklu, polihedral, filamentöz ve pleomorfik fajlar olmak üzere 4 grup altında toplanmıştır. Bu sınıflandırmada fajlar tek bir takım Caudovirale altında 13 familyada toplanmıştır. Bakteriyofajların büyük bir oranının (%96'sının) kuyruklu fajlar grubunda yer aldığı, çift sarmallı DNA'ya ve uzun veya kısa bir kuyruğa sahip olduğu rapor edilmiştir. Kuyruklu fajlar içinde yer alan aileler *Myoviridae*, *Siphoviridae* ve *Podoviridae*'dir. *Myoviridae*'lar kuyruklu fajların %25'ini oluşturmakta ve kasılabilir kuyruğa, *Siphoviridae*'lar %61'ni oluşturmakta ve uzun kuyruğa, *Podoviridae*'lar %14'ünü oluşturmata ve kısa kuyruğa sahiptirler (Ackermann, 2003).

Polihedral bakteriyofajlar nükleik asit olarak tek veya çift zincirli DNA veya RNA içermekte ve bu grupta yer alan familyalar *Microviridae* (ssDNA), *Corticoviridae* (dsDNA), *Tectiviridae* (dsDNA), *Leviviridae* (ssRNA) ve *Cystoviridae* (dsRNA)'dır. Pleomorfik fajlar nükleik asit olarak DNA'ya sahiptirler ve bu grupta bulunan aileler *Plasmaviridae* (dsDNA) ve *Fuselloviridae* (dsDNA)'dır (Ackermann, 2003). Bakteriyofaj Ackerman sınıflandırılması Çizelge 2.1'de sunulmuştur (Ackerman, 2003 ve 2007).

Çizelge 1.1. Ackermann sınıflandırılması

Morfoloji	Nükleik Asit	Takım ve Familya	Cins	Örnek	Özellikleri
Kuyruklu	DNA, ds, L	<i>Caudovirales</i> <i>Myoviridae</i> <i>Siphoviridae</i> <i>Podoviridae</i>	15 6 6 3	T4 λ T7	Kontraktıl kuyruk Uzun kuyruk Kısa kuyruk
Polihedral	DNA, ss, C ds, C, T ds, L RNA, ss, L ds, L, S	<i>Microviridae</i> <i>Corticoviridae</i> <i>Tectiviridae</i> <i>Leviviridae</i> <i>Cystoviridae</i>	4 1 1 2 1	ϕ X174 PM2 PRD1 MS2 ϕ 6	Lipit içeren kompleks kapsid Lipoprotein kaplı kapsid
Filamentöz	DNA, ss, C ds, L ds, L	<i>Inoviridae</i> <i>Lipothrixviridae</i> <i>Rudoviridae</i>	2 1 1	fd TTV1 SIRV	Lipit zarf Uzun veya kısa filament TMV benzeri
Pleomorfik	DNA, ds, C, T ds, C, T	<i>Plasmaviridae</i> <i>Fuselloviridae</i>	1 1	L2 SSV1	Zarf, lipid, kapsid yok Limon formulu, kapsid yok

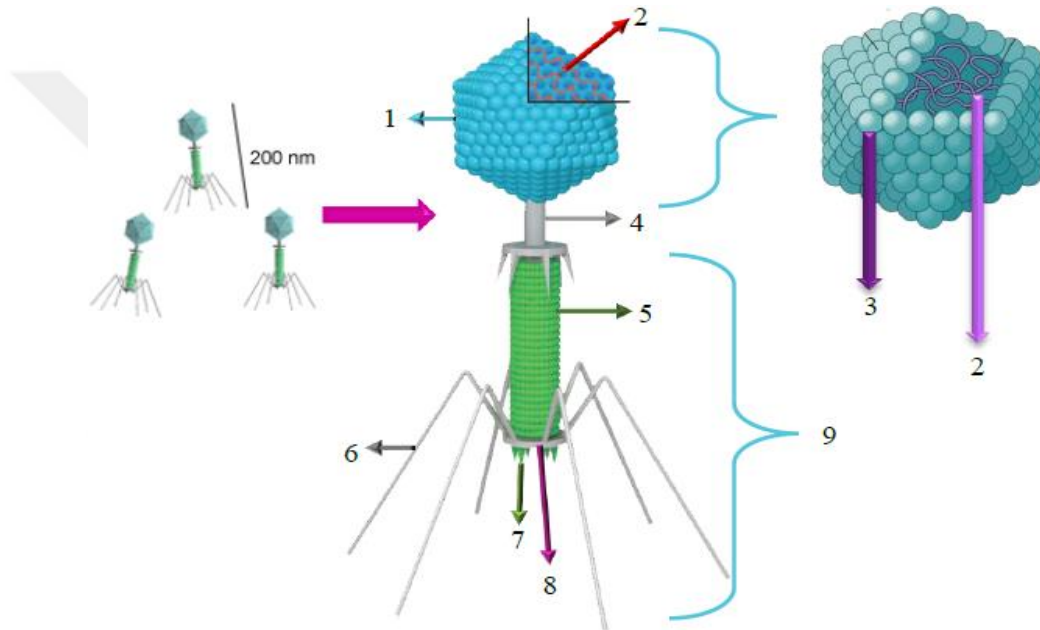
2.3. Bakteriyofajların Morfolojisi ve Özellikleri

Fajlar protein ve nükleik asitten meydana gelmektedir. Diğer virüsler gibi genetik materyallerini protein veya kapsit içerisinde bulundururlar. Fajlar nükleik asit olarak sadece tek ya da çift sarmallı DNA veya RNA bulundurabilir. Fajların büyük bir kısmı nükleik asit olarak DNA'ya sahiptir (Ackermann, 2007).

Yeryüzünde farklı türleri olan bakteriyofajların genomları da farklılık göstermektedir. Bir bakteri genomu büyüklüğüne yakın genoma sahip olabilirler. 500 kilo baz büyüklüğüne kadar faj genomları mevcuttur. Bakteriyofajlar ribozomları olmadığı için protein, hücresel mekanizmaları olmadığı için de enerji üretemeyen zorunlu hücre içi parazitleridir. Bu yüzden yaşamlarını devam ettirebilmek için spesifik bir konakçıya ihtiyaç duyarlar (Guttman vd. 2005). Fajların yapısında lipit bulunmadığı için kloroforma karşı dayanıklıdırlar ve bu özellikleri sayesinde bakteri ortamından ayırmak oldukça kolaydır (Kılıç 2008).

Fajlar bakterilerle kıyaslandığında oldukça küçük mikroorganizmalardır, ancak elektron mikroskopuyla görüntülenebilirler. Bir fajın ortalama ağırlığı 5×10^{-13} gramdır. Boyutları 24-200 nm arasında değişmekte ve tanımlanan en büyük faj olan T4 fajı 200 nm uzunluk ve 80-100 nm genişliğindedir (Ackermann ve Kropinsk, 2007).

Tipik bir faj içerisinde genetik materyali bulundurduğu bir baş, boyun, kuyruk ve kuyruk liflerinden meydana gelir. Baş kısmında nükleik asit moleküllerinin birleşerek yumak şeklini oluşturdukları yapı, protein kılıfıyla kaplı şekilde bulunur. Kapsit olarak adlandırılan bu protein kılıf, birbirine benzeyen alt birimlerden oluşmuş, prizma şeklinde bir yapıdır. Kapsitler genelde altıgen şekline sahip olup, polipeptit ünitelerinden meydana gelen kapsomerlerin bir araya gelmesiyle oluşur. Genetik materyali içeren nükleik asit ve kapsiti oluşturan karmaşık yapı ‘nükleokapsid’ olarak isimlendirilir (Ackermann, 2007; Regenmortel vd., 2000). Kompleks bir faj görüntüsü Şekil 2.3’de verilmiştir.



Şekil 2.3. Kompleks bir bakteriyofajın yapısı; 1, baş; 2, nükleik asit; 3, kapsomer; 4, boyun; 5, kuyruk kını; 6, kuyruk iplikçikleri; 7, kuyruk dikenleri; 8, taban plakası; 9, kuyruk

Bakteriyofajlarda baş ve kuyruk kısmını birbirine bağlayan bir boyun kısmı vardır. Kuyruk kısmı fajlarda değişik uzunlukta bulunmakla birlikte genel olarak 50-100 nm uzunluğuna ve 30 nm genişliğe sahiptir. Kuyruk yapısı da faj tipine göre değişiklik gösterir. Bazılarında hiç kuyruk bulunmazken, bazılarında ise kısa, basit ya da karmaşık yapıda bulunabilir. Faj kuyrukları konakçı hücreye adsorbsiyonu sağlamakla görevlidir. Fajdan genetik materyalin konakçı hücreye aktarımını sağlayan öz yapı kuyruk içerisinde yer alır. Bu öz yapıyı çevreleyen protein yapıya da kuyruk kını adı verilir. Kuyruk kını enfeksiyon sırasında kasılarak nükleik asidin konakçı hücreye aktarımını sağlar.

Fajlar kuyruk iplikçiklerine göre de farklılık gösterebilmektedir. Fajların bazıları topuz şeklinde uç yapısına sahipken, bazılarında hiçbir özgül uç yapısı bulunmamaktadır. Fajların konakçı spesifikliği kuyruk kısmında bulunan proteinlerden kaynaklanmaktadır. Kuyruk kısmında bulunan bu proteinler vasıtasıyla konakçı bakterilerin hücre çeperinde yer alan taykoyik asit, lipopolisakkarit, protein, pili ve flagella gibi reseptörlere bağlanır ve böylece konak hücresi dışında diğer mikrofloraya zarar vermez (Meaden ve Koskella, 2013). Kuyruk iplikçiklerinde yer alan lizozim enzimi sayesinde spesifik bakterisinin hücre duvarını lize ederek genetik materyalini sitoplazmaya enjeksiyonunu sağlar (Kutter ve Sulakvelidze, 2005). Çoğu fajların spesifikliği çok yüksek olmasına karşın bazı fajların spesifikliği biraz daha düşük olduğu ve dolayısıyla birçok bakteriyi enfekte edebildikleri bildirilmektedir. Ricci ve Piddock (2010) tarafından yapılan bir çalışmada Salmonella'ya spesifik ST27, ST29 ve ST35 fajların sadece TolC reseptörlerine sahip Salmonella serovarları enfekte ettiği, Enterobacteriaceae familyasında yer alan diğer türlere karşı etkili olmadığı ortaya konmuştur. Ancak spesifikliği daha düşük olan bazı fajların, birçok bakteri türünü enfekte ettiği bildirilmiş ve bu durum “yerel adaptasyon” olarak ifade edilmiştir (Flores vd., 2011; Koskella vd., 2011).

2.4. Bakteriyofajların Yaşam Şekilleri

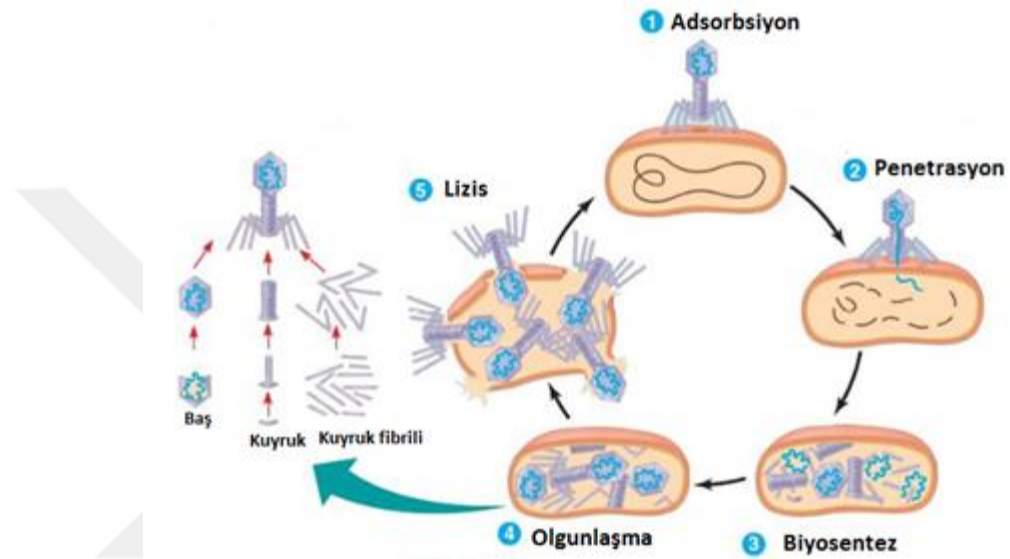
Bakteriyofajların ribozom ve hücrel mekanizmaları bulunmadığından protein ve enerji üretmediklerinden zorunlu hücre içi parazitleridir. Fajlar çoğalmak amacıyla başka bir hücreye girerek replike olmak zorundadırlar. Bu duruma ‘enfeksiyon’, enfekte ettiği hücreye “konakçı” denir ve her fajın konakçısı kendine özgüdür. Fajlar, konakçı hücrelerini enfekte ettikleri zaman genellikle iki farklı hayat döngüsü ile yaşamlarını devam ettirirler: litik veya virülant ve lizojenik veya ılıman. Ayrıca fajlarda çok nadir de olsa “filamentli” olarak isimlendirilen üçüncü bir yaşam döngüsü de mevcuttur. Filamentli yaşam döngüsünde litik ve lizojenik döngülerde olduğu gibi faj çoğalmak için konakçının çoğalma mekanizması kullanılır, ancak filamentli sistemde konak hücre ölümü, sürekli faj üretimi ve fajların çevreye salınımı gerçekleşmemektedir (Ye vd. 2013).

Bir bakteriyofajın hangi yaşam döngüsüne sahip olacağı operatör bölgesine bağlanan CRO ve CI proteinleri arasındaki önceliğe bağlıdır. CI proteini ile bağlanma

gerçekleşiyorsa lizojenik yaşam döngüsü, CRO proteini ile bağlanma gerçekleşiyorsa litik yaşam döngüsüne girmektedir (Guttman vd., 2005).

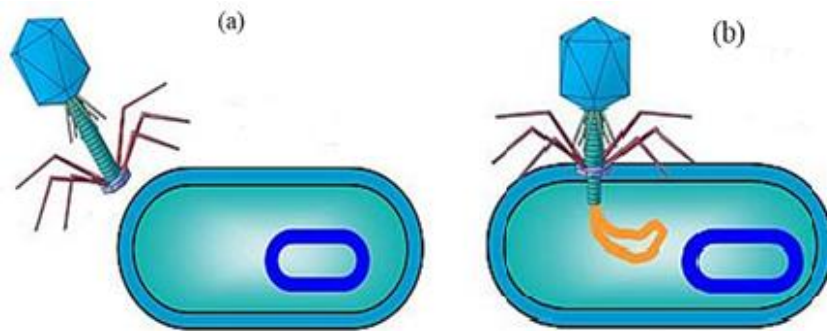
2.4.1. Litik yaşam döngüsü

Litik fajların çoğalma evreleri adsorbsiyon, penetrasyon, biyosentez, olgunlaşma ve lizis olmak üzere 5 aşamadan meydana gelir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Bakteriyofajların litik yaşam döngüsü

Adsorbsiyon veya tutunma: Kuyruklu fajların adsorbsiyonu, kuyruk lifleri sayesinde hedef bakterinin kapsül yüzeyine tutunmasıyla başlar (Şekil 2.5). Kuyuksuz fajların adsorbsiyonu ise kapsomerlere özgül reseptörlerin tutunmasıyla gerçekleşir. Enfeksiyonun ilk ve en önemli aşaması olan adsorbsiyonda fajın konakçı bakteriye spesifikliğı belirlenir.

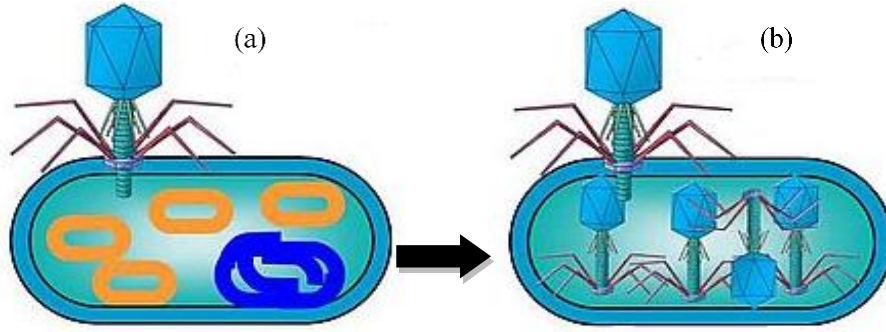


Şekil 2.5. Bakteriyofajın konakçıya adsorbsiyonu (a) ve penetrasyonu (b)

Gram-negatif bakterilerle tutunma; oligosakkaritler, lipopolisakkaritler ve proteinler gibi reseptörlerle sağlanırken, Gram-pozitif bakterilerde ise murein tabakasının karmaşık yapıda olmasından dolayı taykoyik asit gibi değişik bağlanma bölgeleri bulunur. Birçok faj tutunma için Ca^{2+} , Mg^{2+} gibi iki değerlikli iyonlara ihtiyaç duyar. Bu iyonlar bakteri ve faj partiküllerinin negatif yüklerini nötrleyerek adsorbsiyonu kolaylaştırır. Adsorbsiyon aşaması faj ve bakterinin birbirine temasından ortalama 5 dakika sonra sona ermiş olur (Guttman vd., 2005).

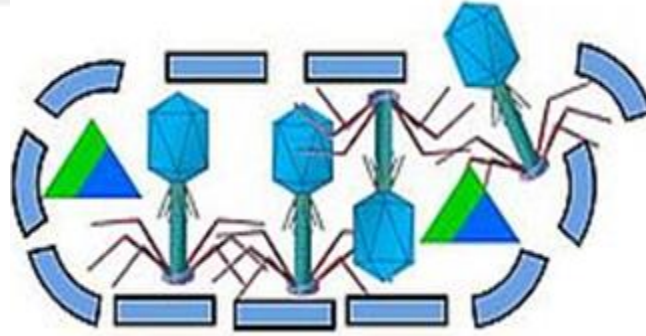
Penetrasyon: Bakteriyofajın konakçı hücreye tutunduktan sonra genetik materyalini aktardığı aşama olup, bu mekanizma tüm fajlar için spesifiktir. Fajlar genetik bilgiyi konakçı hücreye enjekte ettiği sırada kuyruk lifleri kısalır ve bu sayede kuyruk, bakteri hücre duvarına penetre olmuş olur. Kapsit içindeki genetik materyal kuyruk içindeki kanaldan geçerek periplazmik boşluğa gelir ve fajın bakteri hücre membranında meydana getirdiği küçük delikten kolayca hücre sitoplazmasına geçer (Şekil 2.5). Açılan delik bakteri hücresi tarafından hemen onarılır. Genetik materyalin salınımdan sonra bakteri hücre duvarında kalan faj kılıfı “hayalet faj”, konakçının içerisine enjekte olan nükleik asit de ‘vejetatif faj’ olarak adlandırılır (Molineux 2001; Roos vd., 2007).

Biyosentez ve Olgunlaşma: Fajların konakçı hücre içerisinde çoğalma ve gelişme dönemidir. Bu dönemde baş, kuyruk ve diğer faj yapıları sentezlenir. Latent dönem olarak da adlandırılan bu dönem, fajların genetik bilgilerinin konakçı hücrenin sitoplazmasına girmesinden olgun fajların oluşumuna kadar geçen süreyi kapsar. Faj genetik materyali bakteri hücresine girdikten sonra bakteri ribozomları protein sentezine başlar. Faj bakteri hücresinin metabolizmasını bozar, kendi genomunun replikasyonunu sağlar. Bakteriyofaj bileşenleri ve enzimleri sentezlenir ve ayrı ayrı sentezlenen faj bileşenleri birleşmeye başlar (Şekil 2.5). Ayrı ayrı sentezlenen bakteriyofaj yapı taşları bir araya gelerek olgun faj partiküllerini (virion) meydana getirir (Hendrix, 2002; Sulakvelidze ve Kutter, 2005).



Şekil 2.6. Fajın bakteri hücresi içinde üremesi ve gelişmesi; (a) biyosentez; (b) olgunlaşma aşaması

Lizis: Bakteri hücresi içinde belli bir sayıya ulaşan ve olgunlaşan fajlar kendi enzim ve proteinlerini kullanarak bakteriyi lize eder ve bakterilerden çıkarak serbest hale geçerler (Şekil 4.7). Lizisin meydana gelebilmesi için iki bileşen kullanılır: lizin ve holin proteinleri. Bunlardan viral protein olan holin proteinleri hücre membranında gözenekler oluşturur. Viral enzim olan endolizin veya lizin enzimi ise hücre duvarını (peptidoglukan) parçalar. Holin iç membranda porlar açarak lizin enziminin peptidoglukan tabakaya ulaşmasına hücrenin lize olmasına neden olmaktadır (Hanlon, 2007).

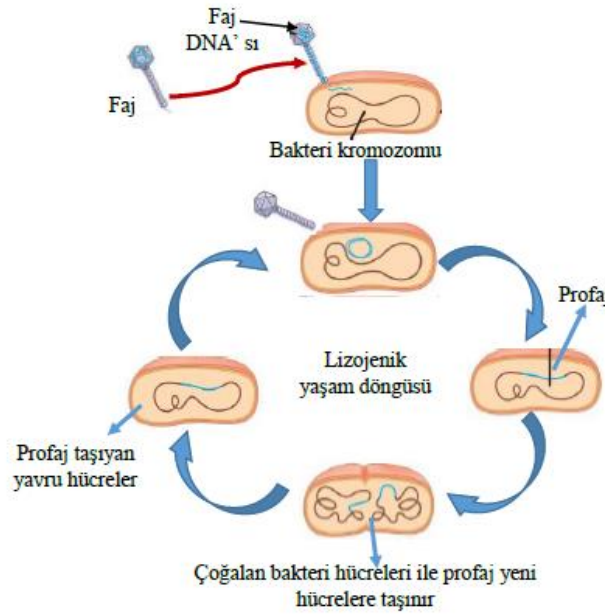


Şekil 2.7. Fajın bakteri hücreni lizise uğratması

2.4.2. Lizojenik yaşam döngüsü

Lizojenik yaşam döngüsünde litik döngüde olduğu gibi faj konakçı hücrene adsorbe olur ve kendi DNA'sını bakteri hücrene enjekte eder. Ancak bu penetrasyon aşamasından sonra yeni sentezlenmiş faj partüküllerinin oluşumu yani latent dönem gerçekleşmez. Faj DNA'sının bakteri kromozomuna rekombinasyon yoluyla girmesine 'lizojeni', konakçı hücrenin DNA'sına bağlanan faj genetik materyaline de 'profaj' denir. Kromozomunda bu şekilde faj taşıyan bakteri 'lizojenik bakteri' olarak

isimlendirilir. Lizojenik döngünün litik döngüden en temel farkı fajın konakçı hücreni lize etmemesidir. Koşullar uygun oldukça konak hücrede faj var olmaya devam eder. Konakçı hücrenin çoğalmasına olanak sağladığı için hücrenin yeni jenerasyonlarında da faj varlığını sürdürür. Fakat ortam şartları konakçı hücre için uygun olmadığında, yani besin kaynaklarının tükenmesi ve inkübasyon sıcaklığının değiştirilmesi durumunda, konak bakteri hücresi mitomisin C gibi antibiyotik, azot gazı ve UV ışınlarına maruz bırakılması durumunda profajlar etkin hale geçerek litik hayat devrine girerek virülant faja dönüşür, bu olay ‘faj indüksiyonu’ olarak adlandırılır (Lacroix, 2011).



Şekil 2.8. Bakteriyofajların lizojenik yaşam döngüsü

2.5. Bakteriyofajların Kullanım Alanları

Bakteriyofajların uygulama alanları faj tedavisi, faj tiplendirilmesi, rekombinant DNA teknolojisinde gen aktarım aracı (vektör), gıda endüstrisinde biyosanitasyon ve biyokoruyucu olmak üzere 5 grupta incelemek mümkündür. Bunlardan ilki olan faj terapisinde, insan ve hayvanlarda bakteri kaynaklı enfeksiyonlara karşı antibiyotiklere alternatif olarak fajlar kullanılmaktadır. Yapılan birçok çalışmada hastalık etmeni olan *Shigella*, *E. coli*, *Vibrio cholera*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* gibi bakterilere karşı fajların oldukça etkili olduğu ortaya konmuştur. Faj tiplendirmede fajlar, bozulma etmeni ve gıda kaynaklı patojen bakterilerin gıdalarda varlıklarının tespitinde ve bakterilerin tanımlanmasında kullanım potansiyelini ifade etmektedir. Ayrıca fajlar gıda endüstrisinde biyosanitasyon aracı olarak alet ekipmanların

yüzeylerinin dezenfeksiyonlarının sağlanmasında ve biyofilm oluşumunun önlenmesinde, biyokoruyucu olarak işlenmiş gıdalarda, taze sebze-meyvelerde ve karkaslarda kontaminasyonun önlemesi ve gıda güvenliğinin sağlanması amacıyla kullanılma potansiyeline sahiptirler (EFSA, 2009; Garcia vd., 2008; Haq vd., 2012; Schmelcher ve Loessner, 2014).

Faj terapisi, biyosanitasyon ve biyokoruyucu amacıyla kullanılacak fajların litik veya virülant fajlar olması gerekmektedir. Lizojenik fajlar nükleik asitlerini bakteri kromozomuna rekombine ederek konakçı bakteri hücrelerini lize etmeden fenotipik değişimlere neden olurlar. Ayrıca lizojenik fajların nükleik asit genomunda kodlanan patojenik genler var ise enfekte ettikleri bakteri hücrelerinin patojenitesinin artmasına da neden olabilmektedirler. Lizojenik hayat döngüsü sonucunda patojenik özellik kazanan veya patojenitesi artan bakterilere örnek olarak *V. cholerae*, *Clostridium botulinum*, *E. coli* verilebilir. Kolera etmeni ctxA ve ctxB toksinleri, stx1 ve stx2 shiga toksinleri ve botulinum toksini faj kodludurlar (Hagens ve Loessner, 2010; Ikeda ve Tomizawa, 1965; O'Brien vd., 1984; Waldor ve Mekalanos, 1996).

2.6. Gıda Endüstrisinde Bakteriyofajların Biyokoruyucu Olarak Kullanımı

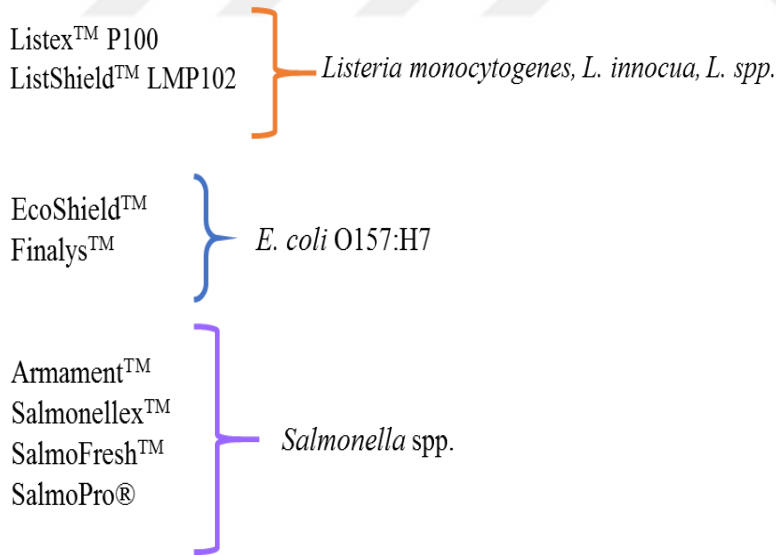
Gelişen teknoloji ve gıda güvenliği yasalarına rağmen günümüzde mikrobiyal kaynaklı gıda zehirlenmeleri ve gıda kaynaklı hastalıklar göz ardı edilemeyecek şekilde sorun yaratmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) bildirdiği verilere göre her yıl sanayileşmiş ülkelerin nüfusunun %5-10'unun gıda kaynaklı hastalıklardan zarar görmektedir (CDC, 2013). Avrupa Birliği'nde (AB) gıda kaynaklı enfeksiyonlara sebep olan başlıca bakteriler *Campylobacter*, *Salmonella* ve *Listeria*'dır. Bu bakterilerin sebep olduğu hastalıkların her yıl 380.000 insanı etkilediği verilerle ortaya konmuştur (EFSA, 2009).

Gıdalar tarladan çatala, üretim proseslerin her aşamasında patojen bakterilerin bulaşmasına maruz kalabilirler. Bu nedenle gıda zincirinin her aşamasında gıdaya bulaşabilen patojen bakterilere karşı gıda güvenliğini sağlamak amacıyla bakteriyofajların doğal antimikrobiyal ajan olarak kullanılma potansiyelleri günümüzde oldukça fazla ilgi görmektedir. Fajlar doğada kolayca bulunabilme ve kolay izole edilebilmeleri, patojen bakterilere karşı spesifik inhibitör etki göstermeleri, tanımlanan

bir yan etkileri olmamaları, kolay üretilebilmeleri özelliklerinden ötürü antibiyotiklere ve kimyasal koruyuculara karşı alternatif olabilecekleri gösterilmiştir. Bunların yansıra ilave edildikleri gıdaların fiziksel, kimyasal ve duyuşal özelliklerini olumsuz etkilememeleri, insan ve hayvanlara toksik etki göstermemeleri, yalnızca hedef patojen ve bozulmaya sebep olan bakterilerin gelişmesini kontrol altında tutmaları da fajların üstün nitelikleri arasında yer almaktadır (Atterbury vd., 2005; Greer, 2005; Martinez vd., 2008; Coffey vd., 2010; Tabla vd., 2012; Bueno vd., 2012).

FDA tarafından onaylanan *Listeria monocytogenes*'e karşı etkili olan ListShield™ ve Listex™ -P100 koktely fajları hazır olarak tüketilen et ürünlerinde ve ambalaj materyallerinde kullanılmaktadır. Ayrıca bakterileri tanımlamada gıdalarda patojen bakteri bulunup bulunmadığını belirmede ve moleküler biyolojide model sistem olarak kullanılmaktadırlar.

FDA tarafından gıda kaynaklı patojenik bakterilerden *Listeria* spp., *E. coli* O157:H7 ve *Salmonella* spp. karşı kullanımına onay verilen faj preparatları aşağıda sunulmuştur (FDA, 2006 ve 2011; USDA FSIS, 2018).



Gıdalarda biyokoruyucu olarak kullanılacak fajların sahip olması gereken özellikler aşağıda verilmiştir (Garcia vd., 2008; Hagens ve Loessner, 2010).

- i) Nükleik asit sekansı bilinmelidir.
- ii) Genomunda toksik genler bulunmamalıdır.

- iii) Litik ve GRAS statüsünde olmalıdır.
- iv) Etki ettiği konakçı spektrum aralığı geniş olmalıdır.
- v) Gıda üretim ve depolama koşullarında stabilitesini koruyabilmelidir.
- vi) Büyük hacimde ve kolay üretilebilmelidir.

2.7. *Salmonella* Enteritidis'in Bakteriyofajlar Aracılığı ile Kontrolü

Salmonella enfeksiyonları dünya çapında olduğu gibi Türkiye'de de en önemli gıda kaynaklı hastalıklar arasında yer alır. Bu enfeksiyonların bulaşma kaynakları kanatlı hayvanlar başta olmak üzere birçok hayvanın ve insanların gastrointestinal sistemidir. Uygun koşullar altında *Salmonella* toprakta ve suda uzun süre canlı kalabilmekte, insandan insana, insandan hayvana ve hayvansal gıdalardan insana geçebilmektedir (Bell ve Kyriakides, 2002; Cormican vd., 2002).

Enterobacteriaceae familyasında yer alan *Salmonella*, Gram-negatif, çubuk şekilli, fakültatif anaerob, kapsülsüz, sporsuz ve flagellaya sahip hareketli bakterilerdir. Birçok besiyerinde kolayca çoğalabilen *Salmonella*'nın en iyi üreme sıcaklığı 37°C olmakla birlikte üreme sıcaklıkları 20-42°C arasında değişmekte ve gelişme pH'sı 7.2'dir. Birçok *Salmonella* katalaz pozitif, oksidaz negatiftir ve hidrojen sülfid üretirler. Ayrıca karbon kaynağı olarak sitrat kullanır, üreyi hidrolize ederek parçalar ve lisini dekarboksile ederler. *Salmonella*, iki tür ve altı alt türden oluşmakla birlikte 2600'den fazla serovar içermektedir. *Salmonella*'nın sahip olduğu iki tür *S. enterica* ve *S. bongori*'dir. *S. enterica* ise *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* ve *indica* olmak üzere 6 farklı alt türüne ayrılmaktadır. İnsanlarda gıda kaynaklı hastalıklara yol açan en yaygın serovar *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis yani kısaca *S. Enteritidis*'dir (Bell ve Kyriakides, 2002(a); Cormican vd., 2002; Andino ve Hanning, 2015).

Salmonella enterica serovarlarının sebep olduğu gıda kaynaklı hastalığa salmonellozis ya da tifoid olmayan salmonellozis denmektedir. Bu hastalığa sebep olan başlıca serovarlar *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Newport* ve *S. Heidelberg* olup kaynaklarının çiftlik hayvanları olduğu ve fekal ya da oral yolla yayıldığı bilinmektedir. *S. Enteritidis*, salmonellozise sebep olan en önemli serovarlardan biridir. Salmonellozis bir akut bağırsak enfeksiyonu olup belirtileri mide bulantısı, kusma ve ishaldir. Enfektif

dozu gıdanın çeşidine, tüketen kişinin yaşı ve fizyolojisine, bakterinin serotipine göre farklılık göstermekle birlikte çoğunlukla 10^6 - 10^9 arasında değişmektedir. WHO'nun (Dünya Sağlık Örgütü) verilerine göre de son 30 yılda gıda kaynaklı insan hastalıklarına sebep olan *Salmonella* serotipleri içerisinde *S. Enteritidis*'in çarpıcı bir şekilde öne çıktığı belirtilmiştir (Wright vd., 2009; Coffey vd., 2010).

Bu bilgiler doğrultusunda son yıllarda *Salmonella*'yı enfekte eden bakteriyofajlar üzerinde çalışmalar yoğunlaşmış ve fajların karakterize edildiği literatür taramalarında gözlenmiştir.

Carey-Smith vd. (2006) yaptıkları çalışmada kanalizasyon suyundan izole ettikleri 2 *Salmonella* fajın *Siphoviridae* familyasına ait olduklarını, FGCSSa1 fajın baş çapının 107 nm, kuyruk uzunluğunun 123 nm, kuyruk çapının 20 nm; FGCSSa2 fajın baş çapının 66 nm, kuyruk uzunluğunun 112 nm, kuyruk çapının ise 9 nm olduğu ifade etmişlerdir. FGCSSa1 fajının patlama büyüklüğünün 139 plak/hücre ve latent periyodunun 50 dk, konak hücresine 4 dakika içinde %99 oranında adsorbe olduğunu belirtmişlerdir.

Yapılan başka bir çalışmada hayvan dışkılarından izole edilen *S. Typhimurium*'a karşı etkili olan st104a ve st104 fajların *Siphoviridae*, felix 01 fajın ise *Myoviridae* familyasına ait olduğu ifade edilmiştir. st104a fajın baş çapı ve kuyruk uzunluğunun sırasıyla 59 nm ve 131 nm iken, st104b fajın 59 nm ve 128 nm olduğu belirtilmiştir. Felix 01 fajın baş çapının 70 nm, kuyruk uzunluğunun 115 nm olduğu, latent periyodunun 60 dk ve patlama büyüklüğünün 14 plak/hücre olduğu belirtilmiştir (O'Flynn vd., 2006).

Akhtar vd. (2014) yaptıkları çalışmada hayvan dışkısı ve kanalizasyondan izole edilen 13 adet *S. Typhimurium* fajların *Siphoviridae* ve *Myoviridae* familyasına ait oldukları bildirilmiştir.

Huang vd. (2018) yaptıkları çalışmada *S. Enteritidis*'i enfekte eden LPSE1 bakteriyofajın *Siphoviridae* ailesine ait olduğunu, 70 nm çapında ikozahedral bir başa, 116,6 nm uzunluğunda ve 6,6 nm genişliğinde kontraktil olmayan uzun bir kuyruğa sahip olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca latent periyodu ve patlama büyüklüğünün

sırasıyla 20 dk ve 94 plak/hücre olarak rapor edilmiştir. LPSE1 fajının pH stabiliteleri incelendiğinde geniş pH aralıklarında (4-12) oldukça stabil olduğu, fakat pH 3'ün altında ve 12'nin üzerindeki değerlerde canlı kalan faj sayılarında azalma olduğu, 70°C sıcaklığa direnç gösterirken 80°C'de 30 dk ısıtma işlemi faj sayılarında azalma ve aynı sıcaklıkta 60 dk işleme tabi tutulduğunda tamamen imha olduğu bildirilmiştir.

Park vd. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada, bataklıktan izole edilen *S. Typhimurium*'u enfekte eden SFP₁₀ fajın *Myoviridae* familyasına ait olduğu, 68,75 nm çapında ikozahedral bir başa, 41,67 nm uzunluğunda ve 12,90 nm çapında kontraktil kuyruğa sahip olduğu bildirilmiştir. Bu fajın patlama büyüklüğünün 200 plak/ hücre'den daha fazla ve latent periyodunun 25 dakika olduğu, adsorbsiyon oranının 2.50×10^{-8} ml/dk olduğu ifade edilmiştir. Fajın 20-60°C arasında uygulanan ısıtma işlemine dayanıklı olduğu, ancak 70°C'de faj sayısında %54 oranında azaldığı ve 75°C'de tamamen imha olduğu belirtilmiştir. Ayrıca 4-10 pH aralığında faj sayısının sabit kaldığı, pH 2 ve altındaki değerlerde ve pH 12 ve üzerindeki değerlerde fajın aktivitesini kaybettiği ifade edilmiştir.

Yapılan bir başka çalışmada *S. Enteritidis* ve *S. Choleraesuis*'i enfekte eden AR1 ve LG1 fajları izole edilmiş ve bu fajların *Myoviridae* familyasına ait olduğu, AR1 fajının 74 nm çapında izometrik bir başa, 16 nm çapa ve 116 nm uzunluğunda kontraktil bir kuyruğa sahip olduğu belirtilmiştir. LG1 fajının ise 68 nm çapında izometrik bir başa, 15 nm çapa ve 111 nm uzunluğuna sahip kontraktil bir kuyruğa sahip olduğu ifade edilmiştir. AR1 ve LG1 fajlarının patlama büyüklüğü ve latent periyotlarının sırasıyla 38-177 plak/hücre ve 40-52 dk olduğu belirtilmiştir (Goodridge vd., 2003).

Yapılan bir başka çalışmada, tavuklardan *Salmonella* serovarlarını enfekte eden Salmacey1, Salmacey2 ve Salmacey3 olarak adlandırılan fajlar izole edilmiş ve Salmacey1 ile Salmacey2 fajlarının *Siphoviridae*, diğerinin ise *Myoviridae* familyasına ait oldukları ifade edilmiştir. Salmacey1, Salmacey2 ve Salmacey3 fajlarının patlama büyüklükleri ve latent periyotları sırasıyla 80-90-110 plak/hücre ve 35-40-60 dk olarak belirlenmiştir (Mahmouda vd., 2018).

Wong vd. (2014) yaptıkları çalışmada, tavuk dışkılarından izole ettikleri *S. Typhimurium*'u enfekte eden Φ st1 fajının latent periyodunun 40 dk ve patlama

büyüküklüğüünün 22 plak/hücre, optimum MOI değerinin 0,1, konakçı hücre sine ilk 5 dakika içerisinde %86,1 oranında adsorbe olduğunu bulmuşlardır. Adsorpsiyon oranının pH 7-9'da arasında %88,4-92,2 olduğunu ifade etmişlerdir.

Yapılan bir başka çalışmada *Salmonella Pullorum*'u enfekte eden PSPu-95 ve PSPu-116 fajların sırasıyla *Siphoviridae* ve *Myoviridae* familyasına ait olduğu bulunmuştur. PSPu-95 fajın yuvarlak bir başa sahip olduğu ve baş çapının 57,14 nm, kuyruk uzunluğunun ise 103,57 nm olduğu tespit edilmiştir. PSPu-116 fajının 74,3 nm çapında ikozahedral bir başa ve 114,2 nm uzunluğunda bir kuyruğa sahip olduğu ifade edilmiştir. PSPu-95 ve PSPu-116 fajlarının patlama büyüklüklerinin sırasıyla 77,5 ve 86 plak/hücre, latent periyotlarının ise 20 dk olduğu rapor edilmiştir. pH 4-10 aralığında fajların canlılığını koruduğu, 70°C'de 60 dk uygulanan ısıl işlem sonunda fajların tamamen ölmediği, ancak 80°C'de ısıl işleme maruz bırakıldıklarında her iki fajın da imha olduğu bildirilmiştir. PSPu-95 ve PSPu-116 fajlarının konakçı aralıklarının geniş olduğu, PSPu-95 fajın 20 konakçıdan 17'sine litik etki gösterdiği (%85), PSPu-116 fajının ise 14'üne litik etki gösterdiği (%70) belirtilmiştir. Enterotoksin üreten *E. coli* K88 bakterisine karşı da litik etki gösterip parlak plak oluşturduğu ifade edilmiştir (Bao vd., 2011).

Bao vd. (2015) yaptıkları çalışmada *S. Enteritidis*'e enfektif, plak büyüklükleri 0,5-1,0 mm arasında yuvarlak ve parlak zon oluşturan iki faj izole etmişlerdir. Fajların *Myoviridae* familyasına ait olup kontraktıl bir kuyruğa sahip oldukları belirtilmiştir. PA13076 fajının yuvarlak ve çapı 66 nm olan bir başa, genişliği 18 nm ve uzunluğu 90 nm olan kuyruğa sahip olduğu; PC2184 fajının ise ikozahedral ve çapı 65 nm olan bir başa, genişliği 17 nm ve uzunluğu 106 nm olan bir kuyruğa sahip olduğu belirtilmiştir. İki fajın da 30 ve 50°C aralığındaki ısıl işlemlerde stabilitesini koruduğu, PA13076 fajının 70°C'de, PC2184 fajının ise 80°C'de 60 dk ısıl işlem sonunda öldüğu belirtilmiştir. Fajların 6-11 pH aralığında stabilitelerini koruduğu, bu değerin üstü veya altındaki pH değerininde faj sayılarında düşüş meydana geldiği ifade edilmiştir. Hem PA13076 fajının hem de PC2184 fajının etki ettiği konakçı aralıklarının geniş olduğu, fajların 311 *Salmonella* konakçısından sırasıyla 222'sine (%71,4) ve 298'ine (%95,8) litik etki gösterdiği rapor edilmiştir.

BÖLÜM III

MATERYAL VE METOT

3.1. Bakteriler, Bakteriyofajlar ve Besi Ortamları

Araştırmada kullanılan bakteri suşları ve bakteriyofajlar Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nün kültür koleksiyonundan sağlanmıştır. *Salmonella* Enteritidis'in geliştirilmesi için Brain Heart Infusion (BHI) sıvı besiyeri kullanılmıştır. Bakteri kültürleri %20 gliserol içeren BHI besiyerinde -80°C'de muhafaza edilmiştir. SEnt-P5 ve SEnt-P6 bakteriyofajların örneklerinin hazırlanmasında ise Luria Bertani (LB) besiyeri kullanılmıştır.

3.2. SEnt-P5 ve SEnt-P6 Fajların Tek Plak Yöntemiyle Saflaştırılması

Bakteriyofaj örneklerinden seri dilüsyonlar hazırlanarak konakçı hücrelerine karşı ekim yapılmış ve en fazla 10-15 plak düşen Petri kutusundan tek bir plak steril cam Pastör pipeti ile alınıp SM tamponun (50 mM Tris-Cl, pH 7,5; 99 mM NaCl, 8 mM MgSO₄, % 0,01 jelatin) içerisine konulmuş ve minimum 2 saat karıştırılmıştır. Kloroform ekstraksiyonu (50 µl/mL) ve santrifüj (9000 × g, 20 dk, 4°C) işleminden sonra supernatant steril bir tüpe aktarılmıştır. Konakçı hücreyi yeniden enfeksiyon ve plak saflaştırma işlemi en az üç kez tekrar edilerek bakteriyofajlar saflaştırılmıştır. Hazırlanan bakteriyofaj örnekleri %30 gliserol içeren çözeltide -80°C'de muhafaza edilmiştir (Stenholm vd., 2008). SEnt-P5 bakteriyofajın konakçı hücresi *Salmonella* Enteritidis MET-S1-742, SEnt-P6 bakteriyofajın konakçı hücresi *Salmonella* Enteritidis DMC3'tür.

3.3. Bakteriyofaj Stok Örneklerinin Hazırlanması

Saflaştırılan fajlardan yüksek sayıda faj elde etmek amacıyla, faj plak sıyırma tekniği kullanılmıştır. Bu yöntemde geliştirilen faj örneklerinden seri dilüsyonlar (10⁻¹-10⁻⁷) hazırlanmıştır. Bu dilüsyonlardan 100 µL ve aktif gelişen bakteri kültürlerinden 100 µL alınıp 45-50°C'deki 3 mL LB yumuşak agar (% 0,7 agar) ilave edilip karıştırıldıktan sonra daha önce LB agar (%1,5) konulmuş Petrilerin üzerine dökülmüştür. Oda sıcaklığında 30 dk yumuşak agarın katılaşması için bekletildikten sonra petriler ters

çevrilerek 37°C'de 24 saat inkübasyon işlemine tabi tutulmuştur. İnkübasyon işlemini takiben tamamen bakterilerin lize olduğu Petriler alınarak sıyırma işlemine tabi tutulmuştur. Sıyırma işlemi için petrilere 3 mL SM tamponu eklenmiş ve faj içeren yumuşak agar sıyırılıp steril tüplere aktarılmıştır. Tüpler düzenli olarak karıştırılarak oda sıcaklığında 2-3 saat bekletilmiştir. Santrifüj işleminden (8000 × g 'de 30 dk) sonra süpernatant steril membrandan (0,22 µm) filtre edilmiş ve faj sayımı yapılmıştır.

3.4. Bakteriyofaj Sayısının Çift Tabaka Agar Plak Metodu ile Belirlenmesi

Hazırlanan bakteriyofaj örneklerinin titresi çift plaka agar plak metodu ile belirlenmiştir (Adams, 1959). Seri dilüsyonlar hazırlanan bakteriyofaj örneklerinden 100 µL ve aktif gelişen konak bakteri hücre kültürlerinden 100 µL alınıp 45-50°C'deki LB yumuşak agara (%0,7 agar) ilave edilip karıştırıldıktan sonra içerisinde katı halde LB agar (%1,5 agar) bulunan petrilere dökülmüştür. Gece boyunca 37°C'de inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon işlemi sonunda petrilere oluşan faj plakları sayılmış ve sonuçlar plak oluşturma birimi (pob/mL) şeklinde verilmiştir.

3.5. Fajların Etki Ettiği Konakçı Aralığının Belirlenmesi

SEnt-P5 ve SEnt-P6 fajların konak hücre aralığının belirlenmesi için kültür koleksiyonumuzda bulunan *Salmonella enterica* serovaryoları ile *E. coli*, *Shigella*, *Yersinia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Bacillus* ve *Enterococcus*'un farklı tür veya suşları kullanılmıştır (Çizelge 3.1).

3.6. Fajların Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

Faj örnekleri 100.000 × g'de 1 saat ultra santrifüj (HITACCHI Himac-CP 100 WX, Tokyo-Japonya) işlemine tabi tutulmuş ve süpernatant kısmı atıldıktan sonra pelet 100 µl SM tamponunda çözündürülmüştür. Hazırlanan faj örnekleri %2 uranil asetat (pH 4) ile negatif olarak boyanmıştır. Elektron mikro grafikleri hizmet alımı karşılığında Selçuk Üniversitesi İleri Araştırma Merkezinde transmisyon elektron mikroskobu (JEOL JEM-2100 UHR, Japonya) kullanılarak elde edilmiştir (Uchiyama vd., 2008).

Çizelge 3.1. Bakteriyofajların konak hücre aralığının belirlenmesinde kullanılan bakteriler

Bakteri	Kod	Bakteri	Kod
<i>Salmonella</i> Enteritidis	DMC3	<i>Salmonella</i> Infantis	DMC7
	DMC8		DMC20
	DMC21	<i>Salmonella</i> Thompson	DMC47
	DMC22		DMC44
	DMC30	<i>Salmonella</i> Anatum	DMC90
	DMC 31	<i>Salmonella</i> Telaviv	DMC62
	DMC43	<i>Salmonella</i> Montavide	DMC81
	DMC 84	<i>Salmonella</i> Kentucky	DMC35
	MET-S1-M411	<i>Salmonella</i> Corvallis	DMC86
	MET-S1-M512		DMC36
	MET-S1-M742	<i>Salmonella</i> Dublin	1 HÜ
	ATCC 13075		hif S.h.ha 9
	SL 1344	<i>Salmonella</i> Gallinarum	2 NÜ
	KÜVF29	<i>Salmonella</i> Nahanga	DMC15
<i>Salmonella</i> Typhimurium	LT2 SR II	<i>Salmonella</i> Pullorum	
	MA1 LT2/pNK972	<i>Salmonella</i> Agona	DMC59
	MA53 T-POP	<i>E. coli</i> O157:H7	NCTC 12900
	Tr90		ATCC 43888
	Tr87		ATCC 35150
	LT2 TH3923		RSKK
	DMC4	<i>E. coli</i> O157	AİBÜ
	SL 134	<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115
	Wild type 14028	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
	MET-S1-625	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 10875
	AİBÜ	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9	AÜ
ATCC 14028	<i>Citrobacter freundii</i>	AÜ	
<i>Salmonella</i> Virchow	DMC8	<i>Enterobacter aerogenes</i>	AÜ
	DMC5	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212

3.7. İnfeksiyon Çokluğu Değerinin Belirlenmesi

Bakteriyofajların optimum enfeksiyon çokluğu değerini (MOI, Multiplicity of Infection) belirlemek için aktif gelişen konak hücre (yaklaşık 10^8 kob/mL) endorf tüplere konulmuş ve bu tüplere bakteriyofaj stok solüsyonundan 10/1, 1/1, 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000, 1/1000000 (faj/bakteri) oranını sağlayacak şekilde faj ilave edilerek karıştırılmıştır. Adsorpsiyon için 15 dk bekletildikten sonra santrifüj ($6000 \times g$ 'de 10 dk) edilmiş ve serbest bakteriyofaj içeren süpernatantlar uzaklaştırılmıştır. Tüplerde

kalan pelet LB besiyeri ile süspansiyeye edilerek 35°C’de 4 saat inkübasyon işlemine tabi tutulmuştur. Bu sürenin sonunda bakteriyofaj sayısı çift tabaka agar yöntemiyle belirlenmiş ve aşağıdaki eşitlik yardımıyla MOI değeri hesaplanmıştır. En yüksek faj sayısı veren dilüsyon optimum MOI değeri olarak kabul edilmiştir (Yang vd., 2010).

$$MOI = \frac{\text{Faj Titresi (pob)}}{\text{Bakteri Sayısı (kob)}}$$

3.8. Bakteriyofaj Replikasyon (Gelişme) Kinetiği

Bakteriyofajların gelişme kurvesi tek aşamalı gelişme testi ile belirlenmiştir (Adams, 1959; Sillankorva vd., 2008). Aktif olarak LB besiyerinde gelişen (OD₆₀₀=0,4) bakteri konakçı hücrelerden 50 mL alınıp santrifüj edilmiş (7000 × g’de 15 dk) ve süpernatant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra pelet 0,5 mL taze LB besiyeri ile süspansiyeye edilmiştir. Bakteri süspansiyonuna 0,5 mL faj solüsyonu (10⁸ pob/ml) ilave edilip karıştırılmıştır. Fajın konakçı hücreye adsorpsiyonu için 15 dk bekletildikten hemen sonra 7000 × g’de 15 dk santrifüj edilerek adsorbe olmayan serbest fajlar uzaklaştırılmıştır. Pelet 100 mL taze LB besiyeri içinde süspansiyeye edilmiş ve 37°C’de çalkalamalı inkübatörde inkübasyon işlemine (120 devir/dk) tabi tutulmuştur. İnkübasyon işlemi süresince 5 dakika aralıklarla örnek alınıp santrifüj işleminden sonra filtratta çift tabakalı agar plak yöntemi ile faj sayısı belirlenmiştir.

3.9. Fajların Konakçı Hücreye Adsorpsiyon Oranının Belirlenmesi

Fajların konakçı hücreye adsorpsiyon oranı aktif olarak gelişen *Salmonella* Enteritidis’e MOI değeri 0,0005 olacak şekilde faj ilave edilmiştir. Fajların konakçı hücreye adsorpsiyonu üzerine iki değerlikli iyonların etkisini belirlemek için de ayrı bir tüpte konakçı-faj karışımına 10 mM CaCl₂ ilave edilmiş ve 35-37°C’de çalkalamalı inkübatörde inkübasyon işlemine tabi tutulmuştur. İnkübasyon işleminin 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50 ve 60’ncü dakikasında örnek (150 µL) alınıp 1:10 oranında SM tamponu ve kloroform (50 µL/mL) ile karıştırılmış ve santrifüj edilmiştir (8000 × g’de 15 dk). 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 ifade edilmiştir (Suarez vd., 2008).

$$\% \text{ Adsorbsiyon} = \frac{\text{Başlangıç faj titresi} - \text{Adsorbsiyon sonrası faj titresi}}{\text{Başlangıç faj titresi}} \times 100$$

3.10. Konakçı Hücreye Karşı Bakteriyofajların Litik Aktivitelerinin Belirlenmesi

Salmonella Enteritidis'in faj varlığında gelişiminin belirlenmesi amacıyla bir gece önce geliştirilen konakçı hücre taze LB besiyerine (150 mL) inoküle edildikten sonra 25 ile 37°C'de çalkalamalı (120 devir/dk) inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyon işleminin 3'üncü saatinde kültür 3 eşit kısma steril koşullarda (50'er mL) bölünerek 10⁹ pob/mL düzeyinde enfeksiyon etmeni fajları ile tek tek ve kombine olarak inoküle edildikten sonra aynı inkübasyon koşullarında inkübe edilmiştir. İnkübasyon işlemi süresince belirli aralıklarla örnekler alınıp dilüsyonlar hazırlanmış ve LB agar (%1,5 agar) içeren Petrilere yayma yöntemiyle ekimler yapılmıştır. Petri örnekleri 35-37°C'de 24-48 saat inkübasyon işlemine tabi tutulduktan sonra Petrilere oluşan koloniler sayılmış ve bakteri sayısı koloni oluşturan bakteri (kob/mL) şeklinde sunulmuştur.

3.11. Farklı Depolama Koşullarında Faj Stabilitelerinin Belirlenmesi

SEnt-P5 ve SEnt-P6 fajların farklı depolama sıcaklıklarında stabilitesini belirlemek amacıyla hazırlanan bakteriyofaj örnekleri (10⁹ pob/mL) 25, 37, 4, -20, -80°C'de muhafaza edilmiş ve depolamanın belirli aralıklarında örnekler alınıp faj sayımı gerçekleştirilmiştir. 25 ve 37°C'de muhafaza edilen örneklerde 0., 12'nci saatleri ile 1, 2, 4, 6, 8, 15, 30 ve 90'uncü günlerinde; 4 °C'de ve -20, -80°C'de tutulan örneklerde depolamanın 0, 1, 15, 30 ve 90'uncü günlerinde faj sayımları yapılmıştır. Ayrıca -20 ve -80°C'de faj örneklerinin stabilitesi hem gliserollü (%20) hem de gliserolsuz ortamda belirlenmiştir.

3.12. Fajların pH ve Sıcaklık Stabilitelerinin Tespiti

Farklı pH değerlerinde fajların stabilitesini belirlemek amacıyla yaklaşık 10⁹ pob/mL faj partikülü içeren örneklerin pH değerleri 1-13 arasında ayarlanmış ve bu pH değerlerinde 1 saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra çift plaka agar plak metodu ile

faj sayısı tespit edilmiştir. Isıl işlemin etkisini belirlemek için faj örnekleri 50, 60, 70, 80, 90 ve 100°C’de 5, 15, 30, ve 60 dk ısıtılma tabi tutulmuş ve bu işlemi takiben canlı kalan faj sayısı çift tabaka agar plak yöntemiyle saptanmıştır.

3.13. Bakteriyofaja-Duyarsız Mutant Sıklığının Belirlenmesi

Bakteriyofaja-duyarsız mutantların sıklığının belirlenmesi için aktif geliştirilen konakçı hücre (10^9 kob/mL) faj süspansiyonu ile MOI değeri 100 olacak şekilde karıştırılmış ve bakteri-faj karışımı 37°C’de 10 dk inkübe edilmiştir. Karışımdan dilüsyonlar hazırlanıp LB agara ekim yapılarak gece boyunca 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Gelişen koloniler sayılarak bakteriyofaja dayanıklı mutant sıklığı belirlenmiştir (Garcia vd., 2007).

$$\text{Bakteriyofaja Dayanıklı Mutant Sıklığı} = \frac{\text{Gelişen Bakteri Sayısı}}{\text{Başlangıç Bakteri Sayısı}} \times 100$$

3.14. Fajların Buzdolabı Koşullarında Konakçı Hücreye Karşı Aktivitelerinin Belirlenmesi

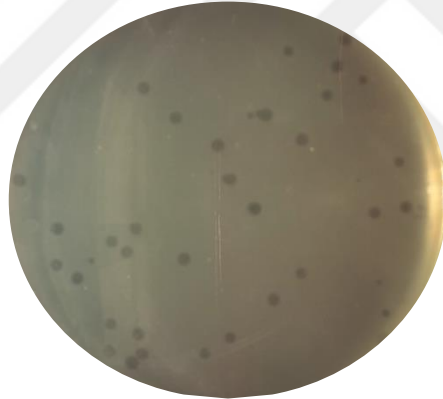
Fajların buzdolabı koşullarında konakçı hücreleri olan *S. Enteritidis* MET-S1-742 ve *S. Enteritidis* DMC3’e karşı enfektif etkisini belirlemek amacıyla LB besiyerine 10^3 ve 10^6 kob/mL olacak şekilde konakçı hücre inoküle edilmiştir. Sonra bu besiyerlerine sırasıyla 10^6 ve 10^9 pob/mL olacak şekilde faj ilavesi yapılarak 5°C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 0, 3, 6, 9 ve 24’üncü saatlerinde örnekler alınıp LB agar ekim yapılmak suretiyle canlı konakçı hücre sayısı ile faj sayısı belirlenmiştir. Faj sayısının belirlenmesi esnasında örnekler kloroform ilavesi yapılmıştır (Hudson vd., 2013).

BÖLÜM IV

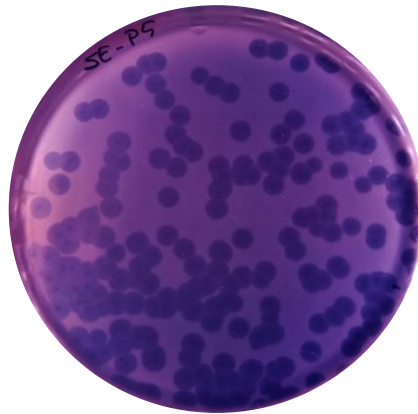
BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. SEnt-P5 ve SEnt-P6 Fajların Saflaştırılması ve Stok Örneklerinin Hazırlanması

Bakteriyofajların saflaştırılmasında tek plak izolasyon yöntemi kullanılmıştır. Fajın kendi morfolojisine uygun plaklar belirlenerek her biri tek plak olacak şekilde steril cam pastör pipeti ile alınıp SM tamponu içeren ayrı ependorf tüplerinin içerisine konulmuş ve minimum 2 saat karıştırılmıştır (Şekil 4.1). Kloroform ekstraksiyonu (50 µl/mL) ve santrifüj (9000 × g, 20 dk, 4°C) işleminden sonra supernatant steril bir tüpe aktarılmıştır. Konakçı hücreyi yeniden enfeksiyon ve plak saflaştırma işlemi en az üç kez tekrar edilerek tek bir tip bakteriyofaj izole edilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.1. SEnt-P5 fajının tek plak izolasyon yöntemiyle saflaştırılması



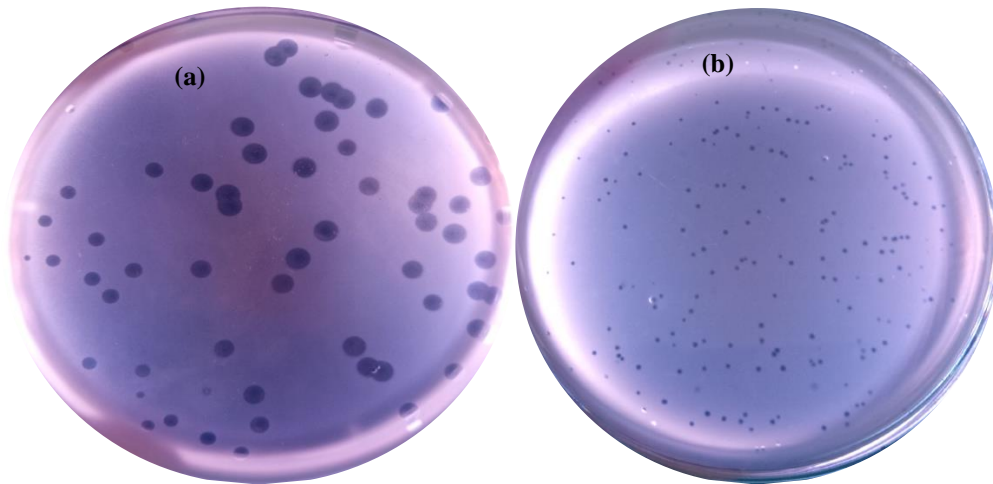
Şekil 4.2. SEnt-P5 fajının saflaştırıldıktan sonraki görünümü

Plak sıyırma yöntemiyle hazırlanmış SEnt-P5 ve SEnt-P6 fajlarından seri dilüsyonlar hazırlanarak kendi konak hücreleri olan sırasıyla *S. Enteritidis* MET-S1-M742 ve *S. Enteritidis* DMC3'e karşı çift tabaka agar plak metodu ile analiz edilmişlerdir. İnkübasyon işlemi (37°C'de 18-24 saat) sonrasında oluşan faj plakları sayılmış ve SEnt-P5 ve SEnt-P6 faj solusyonlarının titrelerinin sırasıyla 6×10^{10} ve 6×10^9 pob/mL olduğu tespit edilmiştir.

4.2. Fajların Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

SEnt-P5 ve SEnt-P6 fajlarının plak görünüşleri Şekil 4.3'te verilmiştir. Şekilde de görüldüğü üzere her iki fajın plak görünüşleri birbirlerinden oldukça farklı olduğu tespit edilmiştir. Dijital kumpasla ölçülen faj çapları incelendiğinde SEnt-P5 fajının $1,38 \pm 0,03$ mm iç çapa sahip net lizis olan bir merkez plak ve bunu çevreleyen bir dış plakla birlikte toplam plak çapının $3,88 \pm 0,21$ mm olduğu, SEnt-P6 fajının plak çapının ise $0,93 \pm 0,09$ mm olduğu gözlemlenmiştir.

Salmonella'ya özgü fajları toplu iğnesi başı büyüklüğünden 1 mm ve yaklaşık 3 mm çapa kadar değişen ebatlarda plaklar ürettiği belirtilmiştir (Lappe vd., 2009). Φ st1 (Wong vd., 2014), PC2184 ve PA13076 fajların (Bao vd., 2015), 0,5-1,0 mm çaplarında berrak plaklar ürettiği bildirilmiştir.

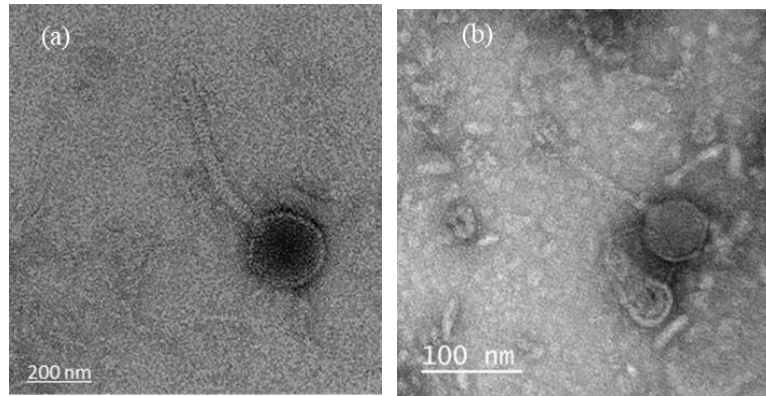


Şekil 4.3. Çift tabaka agar yöntemiyle bakteriyofaj plak görüntüsü; (a) *S. Enteritidis* MET-S1-M742'yi enfekte eden SEnt-P5 fajı; (b) *S. Enteritidis* DMC3'ü enfekte eden SEnt-P6 fajı

Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) kullanılarak SEnt-P5 ve SEnt-P6 fajların morfolojik yapıları görüntülenmiştir. SEnt-P5 ve SEnt-P6 fajların uzun, kontraktıl

olmayan kuyruğa sahi ve *Siphoviridae* familyasına ait oldukları tespit edilmiştir (Şekil 4.4). SEnt-P5 fajının baş çapının $61,23 \pm 1,21$ nm, kuyruk uzunluğunun $91,61 \pm 0,88$ nm, kuyruk çapının $9,13 \pm 0,41$ nm olduğu belirlenmiştir. SEnt-P6 fajının baş çapının $59,78 \pm 0,66$ nm, kuyruk uzunluğunun $106,62 \pm 1,02$ nm ve kuyruk kalınlığının ise $9,55 \pm 0,14$ nm olduğu saptanmıştır.

Bakteriyofajların %90'ından fazlasının Caudovirales takımına ait olduğu ve bu takım içinde yer alan fajların ikozahedral simetrik bir başa, çift zincirli bir DNA'ya ve çeşitli uzunluktaki kuyruklara sahip olduğu bildirilmektedir. Caudovirales takım içinde yer alan familyalar *Myoviridae* (uzun sert kontraktıl kuyruklu), *Siphoviridae* (uzun esnek kontraktıl olmayan kuyruklu) ve *Podoviridae* (kısa kontraktıl olmayan kuyruklu)'dır (Garcia vd., 2010). Fajlar morfolojik şekillerine bağlı olarak kuyruklu, polihedral, filamentöz ve pleomorfik olmak üzere 4 grupta toplanmaktadır. İncelenen fajların (5500 adet) %96,2'sinin "kuyruklu fajlar", %3,8'nin ise polihedral, filamentöz ve pleomorfik olduğu bildirilmektedir. Kuyruklu fajlar, lineer çift sarmal DNA'ya, ikosahedral kapside ve helikal yapıda kuyruğa sahiptirler. DNA büyüklükleri 17-500 kb, kuyruk uzunlukları da 10-800 nm arasında değişmektedir (Ackermann 2007 ve 2012).



Şekil 4.4. SEnt-P5 (a) ve SEnt-P6 (b) fajlarının TEM görüntüsü

Tanımlanan *Salmonella* fajlarının çoğunun, çift sarmallı DNA'ya sahip kuyruklu virüsler olduğu ve Caudovirales takımının *Myoviridae*, *Siphoviridae* ve *Podoviridae* familyasında yer aldıkları belirtilmektedir (Thung vd., 2017, Lappe vd., 2009; Bao vd., 2015, Akhtar vd., 2014; O'Flynn vd., 2006; Augustine vd., 2013; Tiwari vd., 2013). Ackermann (2009), tarafından incelenen 177 *Salmonella* fajının % 91'inin Caudovirales takımına ait olduğunu ve bunların % 24'ünün *Myoviridae*, % 31'in *Siphoviridae* ve % 33'ünün ise *Podoviridae* familyasında olduğu bildirilmiştir. Kalan % 9'unun ise

Inoviridae, Leviviridae, Microviridae ve Tectiviridae familyasında bulunduğu ifade edilmiştir.

Carey-Smith vd. (2006) kanalizasyon suyundan izole ettikleri 2 *Salmonella* fajın *Siphoviridae* familyasına ait olduklarını belirtmişlerdir. FGCSSa1 fajın baş çapının 107 nm, kuyruk uzunluğunun 123 nm, kuyruk çapının 20 nm; FGCSSa2 fajın baş çapının 66 nm, kuyruk uzunluğunun 112 nm, kuyruk çapının ise 9 nm olduğu bildirilmiştir. O’Fynn vd. (2006) hayvan dışkılarından izole edilen *S. enterica* serovar Typhimurium’a karşı etkili olan st104a ve st104 fajların *Siphoviridae*, felix 01 fajın ise *Myoviridae* familyasına ait olduğu ifade edilmiştir. St104a fajın baş çapı ve kuyruk uzunluğunun sırasıyla 59 nm, 131 nm iken, st104b fajın 59 nm ve 128 nm olduğu belirtilmiştir. Felix 01 fajın baş çapının 70 nm, kuyruk uzunluğunun ise 115 nm olduğu rapor edilmiştir. Başka bir çalışmada hayvan dışkısı ve kanalizasyondan izole edilen *S. Typhimurium* fajların (13 adet) *Siphoviridae* ve *Myoviridae* familyasına ait oldukları bildirilmiştir (Akhtar vd., 2014).

Huang vd. (2018) yaptıkları çalışmada *S. Enteritidis*’i enfekte eden LPSE1 bakteriyofajın *Siphoviridae* ailesine ait olduğunu, 70 nm çapında isometrik bir başa, 116,6 nm uzunluğunda ve 6,6 nm genişliğinde kontraktil olmayan uzun bir kuyruğa sahip olduğunu belirtmişlerdir. Park vd. (2012) çalışmalarında bataklıktan izole edilen *S. Typhimurium*’u enfekte eden SFP₁₀ fajın *Myoviridae* familyasına ait olduğunu, 68,75 nm çapında isometrik bir başa ve 12,90 nm kuyruk çapına sahip olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca kontraktil ve kontraktil olmayan kuyruğa sahip olduklarını tespit etmiş ve uzunluklarının sırasıyla 131,25 ve 41,67 nm olduğunu tespit etmişlerdir (Park vd., 2012). Yapılan bir başka çalışmada *S. Enteritidis* ve *S. Choleraesuis*’i enfekte eden AR1 fajı izole edilmiş ve bu fajın *Myoviridae* familyasına ait olduğu, 74 nm çapında izometrik bir başa, 16 nm çap ve 116 nm uzunluğunda kontraktil bir kuyruğa sahip olduğu belirtilmiştir (Goodridge vd., 2003).

4.3. Konakçı Aralığının Belirlenmesi

SEnt-P5 ve SEnt-P6 fajların etki ettiği konakçı spektrumunun belirlenmesi için *Salmonella enterica*, *E. coli*, *Shigella*, *Yersinia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Bacillus* ve *Enterococcus*’un farklı tür, suş veya serovarları kullanılmış

ve sonuçlar Çizelge 4.1’de verilmiştir. Oluşan faj plaklarının netlik veya berraklık derecesine bağlı olarak sonuçlar 4 ayrı sınıfta değerlendirilmiştir. Buna göre büyük berrak faj plakları “+++”; küçük berrak plaklar “++”; bulanık faj plakları “+”; plak oluşmayanlar “-” olarak değerlendirilmiştir. Oluşan faj plaklarına örnek Şekil 4.5’de verilmiştir.

Çizelge 4.1’de görüldüğü üzere SEnt-P6 fajının enfektif etki gösterdiği konak hücre aralığının SEnt-P5 fajına göre daha fazla olduğu belirlenmiştir. SEnt-P6 fajın test edilen 14 farklı *S. Enteritidis* serovarlarından 12 tanesine karşı çok kuvvetli litik aktivite gösterdiği, 2 tanesine karşı ise enfektif olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca test edilen 12 farklı *S. Typhimurium* serovarlarından 6 tanesine, diğer *Salmonella enterica* serovarlarından 4 tanesine (2 adet *S. Dublin*, 2 adet *S. Corvallis*, 1 adet *S. Gallinarum* ve 1 adet *S. Pullorum* suşuna) karşı kuvvetli litik aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir. SEnt-P6 fajının *Salmonella enterica* serovarlarına ilaveten *E. coli* DS α ve *E. coli* CFAI’ye karşı yüksek, *E. coli* O157 AİBÜ ile *E. coli* ATCC 25922’ye karşı zayıf inhibitör etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

SEnt-P5 fajının da 14 farklı *S. Enteritidis* serovarlarından 12 tanesine karşı enfektif etkiye sahip olduğu, ancak bunlarda sadece 7 tanesine karşı enfektif etkisinin yüksek olduğu, 5 tanesine karşı da enfektif etkinin zayıf (bulanık plak) olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.1). Ayrıca diğer *Salmonella enterica* serovarlarından 2 tanesine karşı çok kuvvetli (*S. Typhimurium* LT2 TH3923 ve *S. Typhimurium* ATCC 14028), 3 tanesine karşı kuvvetli (*S. Dublin* hif S.h.ha 9 *S. Corvallis* DMC36 ile *S. Corvallis* DMC86), 13 tanesine karşı da zayıf inhibitör etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. Test edilen *E. coli* suşlarından ise sadece *E. coli* CFAI’ye karşı yüksek, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35150 ve *E. coli* DS α ’ye karşı zayıf enfektif etkiye sahip olduğu görülmüştür (Çizelge 4.1).

SEnt-P5 ve SEnt-P6 fajlarının her ikisinin de test edilen *Shigella*, *Yersinia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Bacillus* ve *Enterococcus* türlerine karşı enfektif aktiviteye sahip olmadıkları gözlenmiştir (Çizelge 4.1).

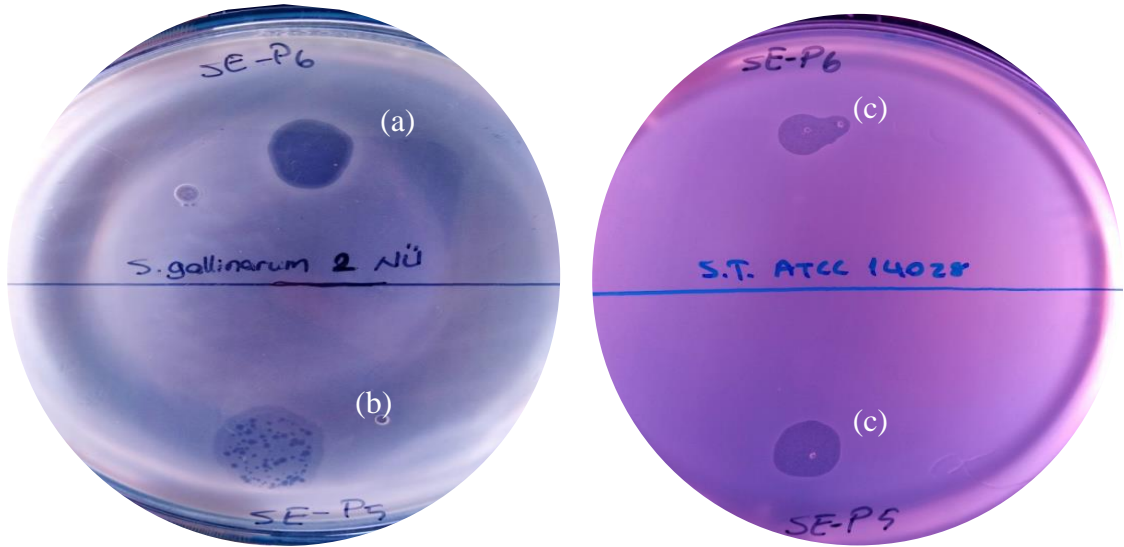
SEnt-P5 ve SEnt-P6 fajların etki ettikleri konakçı aralığının geniş olması bakteri üzerinde spesifik olmayan reseptörlere bağlanmalarından kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Ducworth vd., 1981, Akhtar vd., 2014).

Bu çalışmanın sonuçlarına benzer olarak bazı *Salmonella* bakteriyofajlarının örneğin SSP5, SSP6, PSPu-95, PSPu-4-116, Felix 01, st104a ve st104b'nin etki ettiği konakçı aralıklarının geniş olduğu bildirilmiştir (Bao vd., 2011; Kocharunchitt vd., 2009; Kostrzynska vd., 2002; O'Flynn vd., 2006).

Bao vd. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada tavuk işletme atık suyundan izole edilen *S. Enteritidis* karşı enfektif olan PA13076 ve PC2184 fajlarının konakçı aralıklarının geniş olduğu; PA13076 fajın test edilen 311 adet epidemik *Salmonella* izolatlarından 222'sine, PC2184 fajın ise 298'ne karşı enfektif aktiviteye sahip olduklarını bulmuşlardır.

Santos vd. (2010) atık sudan izole edilen PVP-SE1 kodlu *S. Enteritidis* litik fajın, birçok *Salmonella* serotipine ve *E. coli*'ye karşı etkili olduğunu bildirmişlerdir. Yıldırım vd. (2018), yaptıkları bir çalışmada çeşitli atık sulardan izole edilen *S. Enteritidis* bakterifajlarının bazılarının inhibe ettiği konakçı aralıklarının çok geniş, bazılarının ise dar olduğunu ifade etmişlerdir.

Carey-Smith vd. (2006), *S. Enteritidis*'i enfekte eden FGCSSa1 fajının 8 *Salmonella* bakterisinden 5 tanesine litik, 1 tanesine zayıf aktivite (bulanık), FGCSSa2 fajının ise sadece *Salmonella* bakterilerinden 3'üne zayıf etki gösterdiğini, ancak her iki fajın *E. coli*'ye karşı aktivite göstermediği bildirilmiştir. Yapılan başka çalışmada da *Salmonella*'yı enfekte eden 3 fajın, sadece 4 *Salmonella* serovar'ına karşı etkili olduğu ortaya konmuştur (Borie vd., 2008).



Şekil 4.5. SEnt-P5 ve SEnt-P6 fajlarının konak hücrelere oluşturdukları plak çeşitleri; (a) büyük berrak faj plağı; (b) küçük berrak faj plağı; (c) bulanık faj plağı

Çizelge 4.1. SEnt-P5 ve SEnt-P6 fajlarının konakçı aralığı

Bakteri Kültürleri	SEnt-P5 Fajı	SEnt-P6 Fajı
<i>S. Enteritidis</i> DMC3	+	+++
<i>S. Enteritidis</i> DMC8	+++	+++
<i>S. Enteritidis</i> DMC22	+++	+++
<i>S. Enteritidis</i> DMC43	+	+++
<i>S. Enteritidis</i> MET-S1-M411	+++	+++
<i>S. Enteritidis</i> DMC30	+	+++
<i>S. Enteritidis</i> DMC31	+	+++
<i>S. Enteritidis</i> DMC 94	+++	+++
<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13075	+	+++
<i>S. Enteritidis</i> SL 1344	+++	+++
<i>S. Enteritidis</i> MET-S1-M742	+++	+++
<i>S. Enteritidis</i> KÜVF29	++	+++
<i>S. Enteritidis</i> MET-S1-M512	-	-
<i>S. Enteritidis</i> DMC21	-	-
<i>S. Typhimurium</i> LT2 TH3923	+++	+++
<i>S. Typhimurium</i> MA1 LT2/pNK972	+	+++
<i>S. Typhimurium</i> DMC4	+	+++
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	+++	+++
<i>S. Typhimurium</i> LT2 SR2	+	+++
<i>S. Typhimurium</i> wild type 14028	+	+++
<i>S. Typhimurium</i> MA53 T-POP	+	+
<i>S. Typhimurium</i> SL 134	+	+
<i>S. Typhimurium</i> TR 87	+	+

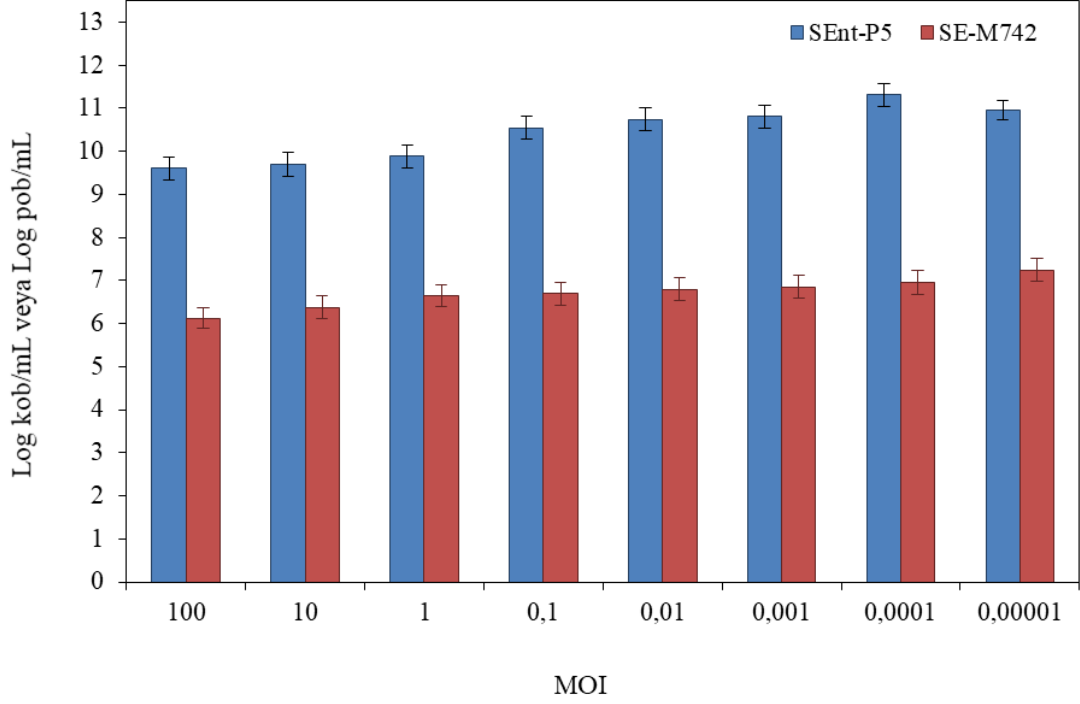
<i>S. Typhimurium</i> TR 90	-	+
<i>S. Typhimurium</i> AİBÜ	-	+
<i>S. Typhimurium</i> MET-S1-M625	+	+
<i>S. Dublin</i> 1 HÜ	+	+++
<i>S. Dublin</i> hif S.h.ha 9	++	+++
<i>S. Corvallis</i> DMC36	++	+++
<i>S. Corvallis</i> DMC86	++	+++
<i>S. Gallinarum</i> 2 NÜ	+	+++
<i>S. Pullorum</i>	+	+++
<i>S. Thompson</i> DMC44	-	+
<i>S. Thompson</i> DMC47	-	+
<i>S. Vichow</i> DMC5	-	+
<i>S. Agona</i> DMC59	+	+
<i>S. Montevideo</i> DMC81	-	+
<i>S. Kentucky</i> DMC35	+	+
<i>S. Infantis</i> DMC20	-	-
<i>S. Infantis</i> DMC12	-	-
<i>S. Infantis</i> DMC7	-	-
<i>S. Virchow</i> DMC8	-	-
<i>S. Anatum</i> DMC90	-	-
<i>S. Nahanga</i> DMC15	-	-
<i>S. Telaviv</i> DMC62	-	-
<i>E. coli</i> O157 AİBÜ	-	+
<i>E. coli</i> ATCC 25922	+	+
<i>E. coli</i> ATCC 35150	+	-
<i>E. coli</i> DSα	+	+++
<i>E. coli</i> CFAI	++	+++
<i>E. coli</i> ATCC 43888	-	-
<i>E. coli</i> ATCC 12900	-	-
<i>E. coli</i> BL 21	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	-
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10875	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9 AÜ	-	-
<i>Citrobacter freundii</i> AÜ	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> AÜ	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	-	-

+++ , büyük berrak faj plağı; ++ , küçük berrak faj plağı; + , bulanık faj plağı; - , faj plağı oluşmayan.

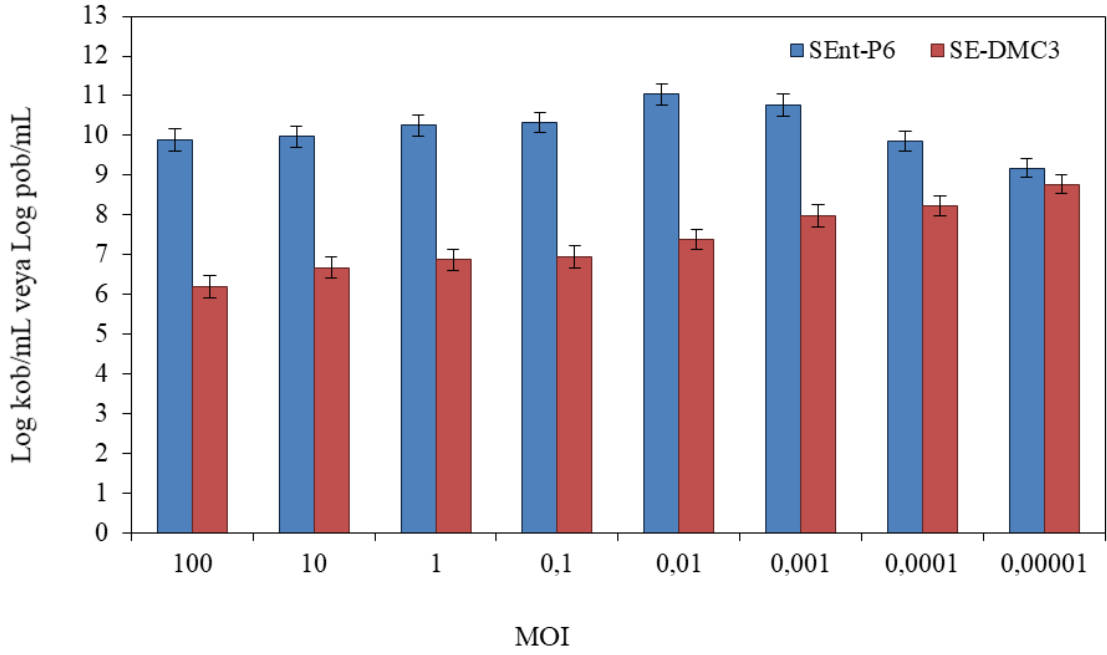
4.4. İnfeksiyon Çokluğu Değeri

SEnt-P5 ve SEnt-P6 fajlarının optimal MOI değeri, MOI analizi kullanılarak belirlenmiştir. Optimum MOI değeri, maksimum faj üretiminin elde edildiği MOI değeri olarak tanımlanmaktadır. MOI değeri, konakçı başına düşen enfektif fajların sayısı olarak da tanımlanmakta ve faj ile konakçı hücre arasındaki ilişkiyi ifade etmektedir. Yapılan analiz sonucunda SEnt-P5 ve SEnt-P6'nın optimum MOI değeri sırasıyla 0,01 ve 0,0001 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.6 ve 4.7). Farklı MOI değerleri uygulamasının sonunda bakteri sayımı da gerçekleştirilmiş ve analiz sonucunda SEnt-P5 fajının uygulandığı örneklerde analiz sonucunda konakçı bakterisi olan *S. Enteritidis* MET-S1-M742 bakteri sayısının tüm MOI değerlerinde 6,12 ile 7,24 log arasında değiştiği, SEnt-P6 fajının uygulandığı örneklerde ise en yüksek MOI ve en düşük MOI değeri örneğinde *Salmonella* sayısının 6,19 ve 9,18 log olduğu belirlenmiştir. Her iki faj uygulanan örneklerde MOI değeri düştükçe yani bakteri başına düşen faj sayısı azaldıkça bakteri sayısının arttığı ve bu artışın SEnt-P6 fajının uygulandığı örnekte daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Bazı araştırmacılar, *Salmonella* bakteriyofajının MOI değerinin 0,1 ile 0,00001 arasında değiştiğini bildirmişlerdir (Carey-Smith vd., 2006; McLaughlin vd., 2008; Wong vd., 2014). *S. Enteritidis*'i enfekte eden PA13076 ve PC2184 fajlarının MOI değerlerinin 0.0001 olduğu rapor edilmiştir idi (Bao vd., 2015). Düşük MOI oranı, fajların ticari hazırlanma maliyetinin azaltılmasında etkili olduğundan faj üretiminde ve büyük ölçekli uygulamalarda bir avantaj teşkil etmektedir (Toro vd., 2005; Raya vd., 2006).



Şekil 4.6. SEnt-P5 fajının MOI değeri



Şekil 4.7. SEnt-P6 fajının MOI değeri

4.5. SEnt-P5 ve SEnt-P6 Fajlarının Gelişme Kinetiği

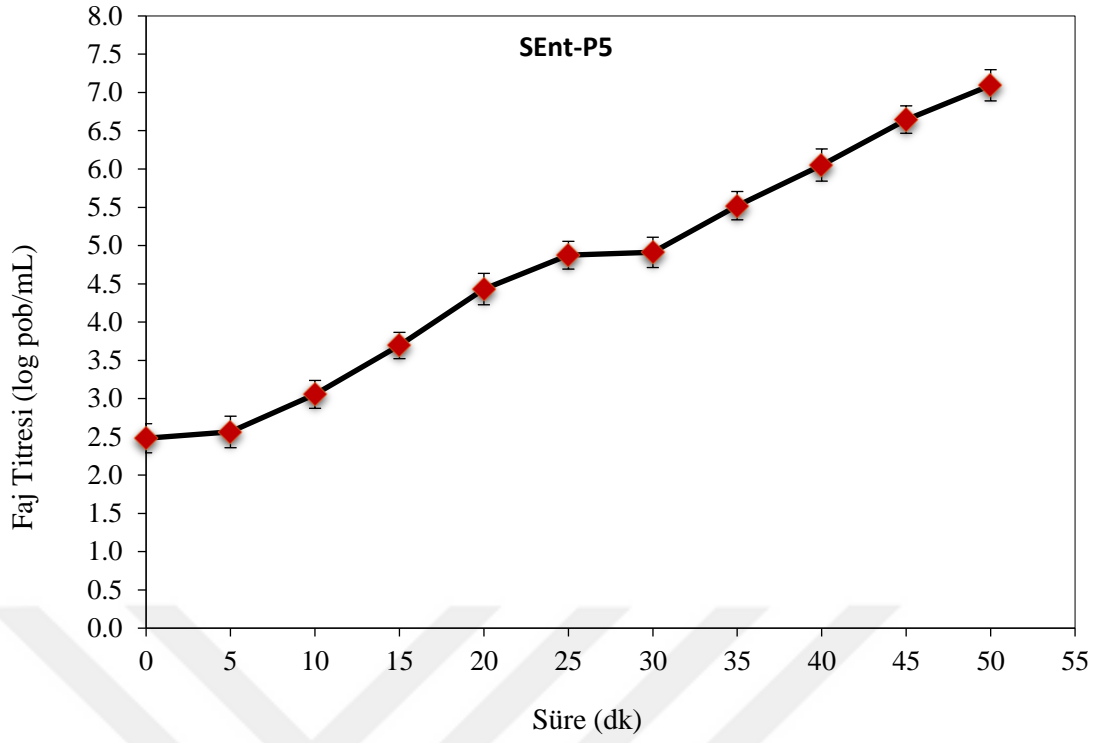
SEnt-P5 ve SEnt-P6 bakteriyofajlarının gelişme kurveleri Şekil 4.8 ve Şekil 4.9 sunulmuştur. SEnt-P5 fajının latent süresinin 5 dk, patlama süresinin 20 dk ve patlama büyüklüğünün 277 plak/hücre olduğu bulunmuştur. SEnt-P6 fajının latent süresi,

patlama süresi ve patlama sayısının sırasıyla 10 dk, 20 dk ve 351 plak/hücre olduğu saptanmıştır. Verilerden de anlaşıldığı üzere her iki fajın latent sürelerinin oldukça az, patlama büyüklüklerinin ise oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.8 ve 4.9).

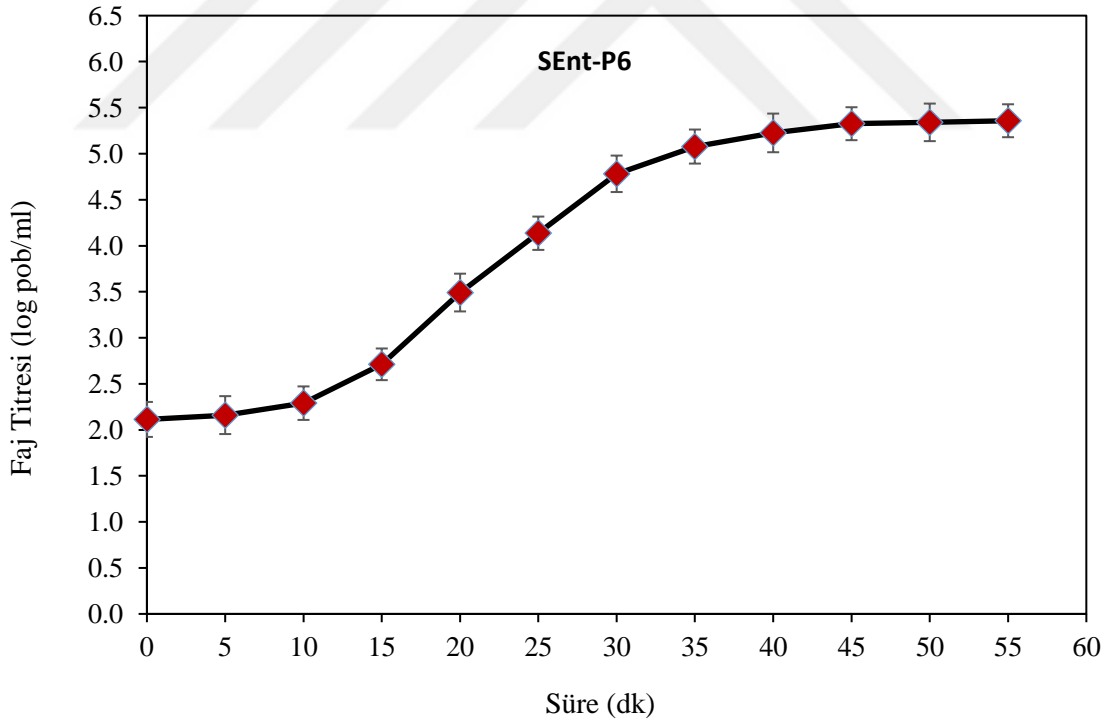
Salmonella spesifik fajların çoğunun patlama büyüklüklerinin 100-200 partikül arasında değiştiği ve kısa latent periyoduna sahip oldukları bir çok araştırmacı tarafından belirtilmiştir (Carey-Smith vd., 2006; McLaughlin vd., 2006). Ancak *Salmonella* spesifik Φ st1, Felix 01, Ent1 ve Φ SP-1 fajlarının latent periyotlarının uzun ve patlama büyüklüklerinin düşük olduğu bildirilmiştir (Wong vd., 2014; O'Flynn vd., 2006; Turner vd., 2012; Augustine vd., 2013). *Salmonella* Φ st1 (Wong vd., 2014) ve Felix 01 (O'Flynn vd., 2006) fajlarının latent periyotlarının sırasıyla 40 ve 60 dk, patlama büyüklüklerinin ise 22 ve 14 plak/hücre olduğu belirtilmiştir. Farklı faj izolatların latent periyodu ve patlama büyüklüklerinde görülen varyasyonun analizlerin gerçekleştirilmesinde kullanılan farklı besiyeri, konakçı hücre, pH ve sıcaklık değerlerinden kaynaklandığı ifade edilmektedir (Hadas vd., 1997; You vd., 2001; Guttman vd., 2005; Muller-Merbach vd., 2007). *Salmonella* fajları Salmacey1, Salmacey2 ve Salmacey3'ün tek aşamalı gelişim kurvesine göre patlama büyüklükleri sırasıyla 80, 90 ve 110 plak/hücre olduğu, latent periyotlarının ise 35, 40 ve 60 dakika olduğu çalışmalarla ortaya konmuştur (Mahmoud vd., 2018).Yapılan bir başka çalışmada *Salmonella* spesifik FGCSsa1 fajının patlama büyüklüğü 139 plak/hücre ve latent periyodunun ise 50 dakika olduğu belirtilmiştir (Carey-Smith vd., 2006).

Salmonella spesifik PR04-1, PR04-16, PR21-11 ve PR21-26 fajlarının patlama büyüklüklerinin 100-230 pob/hücre olduğu rapor edilmiştir (McLaughlin vd., 2008).

Kısa latent süresi ve yüksek patlama büyüklüğü önemli özelliklerdir, çünkü fajların latent periyotlarının kısa ve patlama büyüklüğünün yüksek olması faj replikasyonun çok hızlı gerçekleşeceğinin ve dolayısıyla daha fazla faj üretiminin olacağına bir göstergesidir.



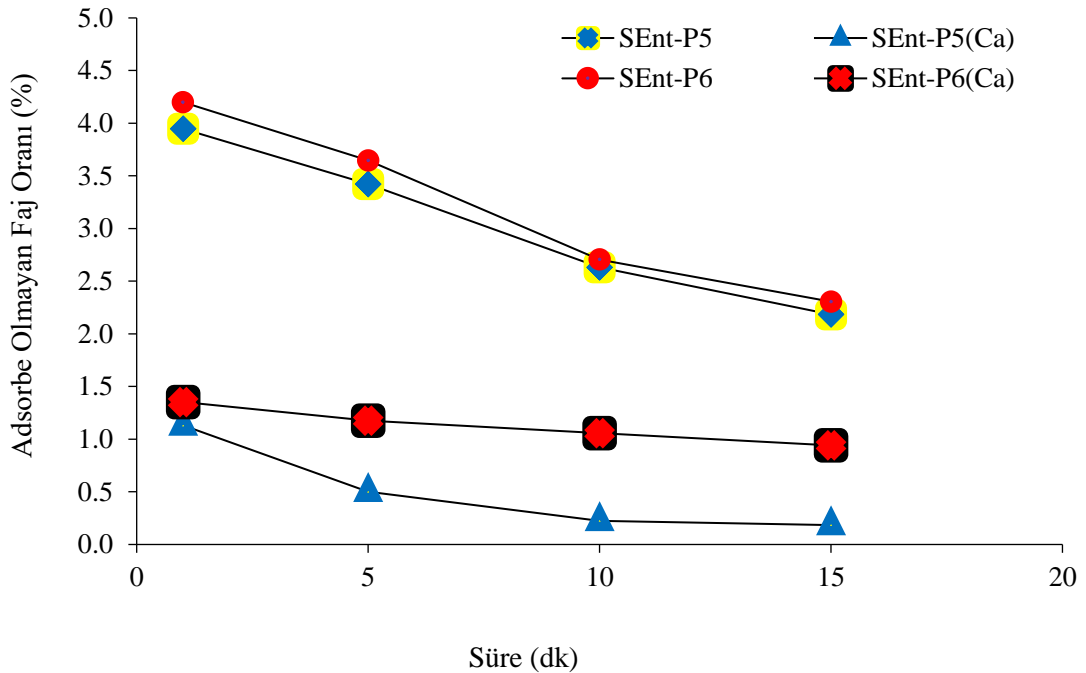
Şekil 4.8. SEnt-P5 fajının tek aşamalı gelişim kurvesi



Şekil 4.9. SEnt-P6 fajının tek aşamalı gelişim kurvesi

4.6. Fajların Konak Hücreye Adsorpsiyon Oranının Belirlenmesi

Adsorpsiyon fajın konak hücrelerine enfeksiyonun ilk aşamasıdır. Genellikle ortamda bulunan divalent iyonların varlığından etkilendiği belirtilmektedir (Kropinski vd., 2018). Bundan dolayı SEnt-P5 ve SEnt-P6 fajlarının konakçı hücrelerine adsorpsiyon oranları hem iki değerlikli iyon (Ca iyonu) varlığında hem de yokluğunda belirlenmiştir. Yapılan analiz sonucunda SEnt-P5 ve SEnt-P6 fajlarının Ca-iyonları yokluğunda konak hücrelerine sırasıyla inkübasyonun ilk 5 dakikasında konak hücrelerine adsorbe olmayan oranın sırasıyla %3,42 (adsorbe olan miktar %96,58) ve %3,62 (adsorbe olan oran %96,35) olduğu bulunmuştur. Ca-iyonlar varlığında adsorbe olamayan faj oranın biraz azaldığı ve sırasıyla %0,50 (adsorbe olan miktar %99,50) ve %1,82 (adsorbe olan miktar %98,28) olduğu belirlenmiştir. Elde edilen verilerden de anlaşıldığı üzere Ca-iyonlarının SEnt-P5 ve SEnt-P6 fajlarının konak hücrelerine adsorpsiyonunda çok önemli bir etkiye sahip olmadığı ($p>0,05$), ancak adsorpsiyon oranlarını biraz iyileştirdiği gözlenmiştir. Yang vd. (2010) ve Suárez vd. (2008) de benzer sonuçlar elde etmiştir. Carey-Smith vd. (2006) gerçekleştirdikleri bir çalışmada *S. Enteritidis*'i enfekte eden FGCSSa1 fajının konak hücrelerine 4 dakika içinde %99 oranında adsorbe olduğunu belirtmişlerdir.



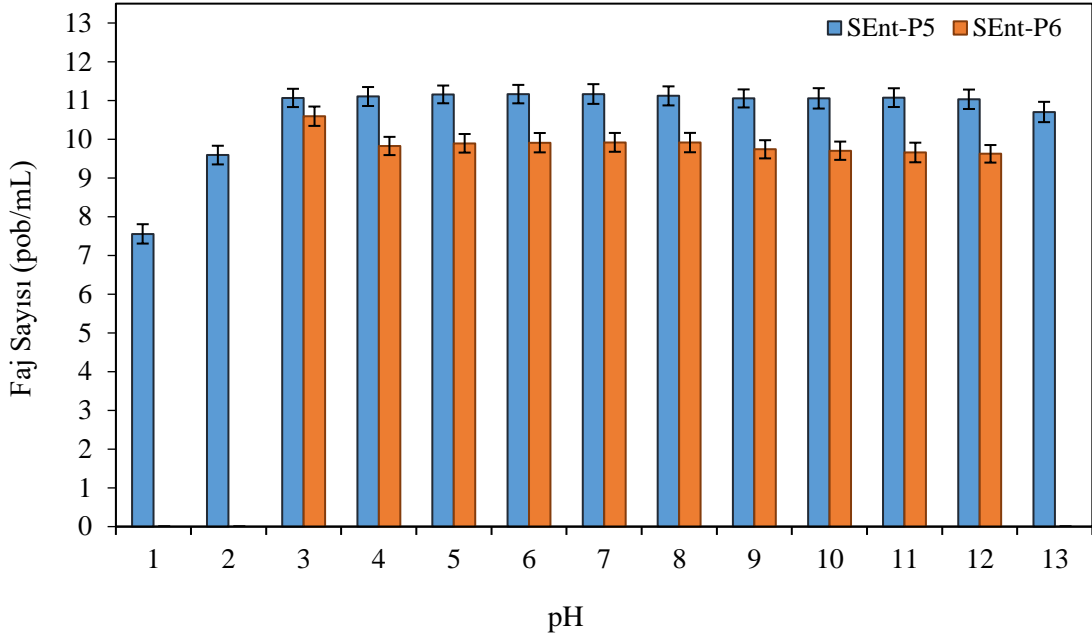
Şekil 4.10. SEnt-P5 ve SEnt-P6 fajlarının konak hücrelerine adsorpsiyon oranları

4.7. SEnt-P5 ve SEnt-P6 Fajların Stabiliteleri

SEnt-P5 ve SEnt-P6 fajlarının stabiliteleri farklı pH, farklı sıcaklık ve farklı depolama sıcaklıklarında belirlenmiştir.

SEnt-P5 fajının pH 1 ve 13 dahil olmak üzere bu aralıklarda, SEnt-P6 fajının ise pH 2 ve 12 dahil olmak üzere bu aralıktaki değerlerde stabilitesini koruduğu ortaya konmuştur (Şekil 4.11). SEnt-P5 fajının pH 1 ve 2’de sayısında 3,61 ve 1,58 log’luk ($p<0.005$), pH 13’te ise 0,46’luk azalma olduğu ($p<0.005$) tespit edilmiştir. SEnt-P6 fajının pH 1, 2 ve 13 değerlerinde aktivitesini tamamen kaybettiği, pH3 ile pH 12 değerleri arasında aktivitesinde önemli bir kaybın olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.11). SEnt-P5 ve SEnt-P6 fajlarının geniş pH aralıklarına dayanıklı olması gıda endüstrisindeki kullanımlar için skalanın geniş olacağını göstermektedir. Ayrıca vücuda alındığında mide suyu asitliğine (pH 1,0-2,5) de dayanıklılık gösterebilecekleri ortaya konulmuştur.

Salmonella Pullorum bakteriyofajı olan PSPu-95’in pH 5-10, PSPu-4-166’nın ise pH 6-9 arasında aktivitesini koruduğu, belirtilen pH değerlerinin altında ve üstünde aktivitesinde azalma meydana geldiği bildirilmiştir (Bao vd., 2011). *S. Enteritidis* fajlarından PA13076’in pH 6 ile 9, PC2184’nin ise pH 5 ile 11 arasında stabil oldukları, belirtilen pH değerlerin altında ve üstünde aktivitesinin azaldığı belirtilmiştir (Bao vd., 2015). O’Flynn vd. (2006) st104a ve Felix 01 fajlarının mide suyu asitliğinde (pH 2,5) 120 dk canlı kalabildiklerini, ancak st104a fajın belirtilen pH koşullarında aktivitesini koruyamadığını bulmuşlardır.

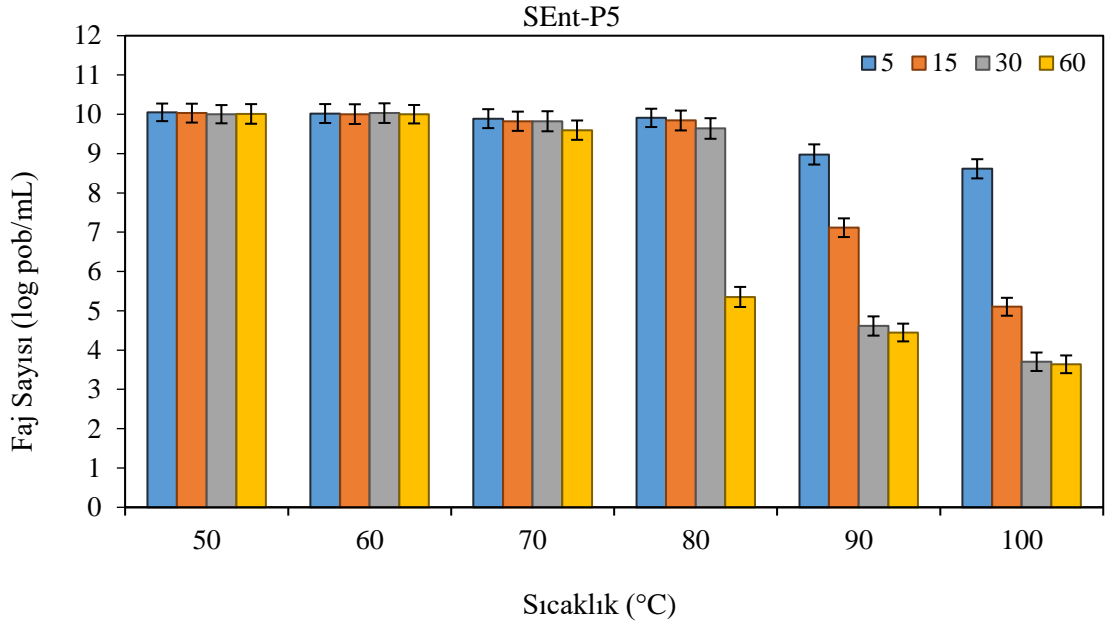


Şekil 4.11. SEnt-P5 ve SEnt-P6 fajlarının pH stabiliteleri

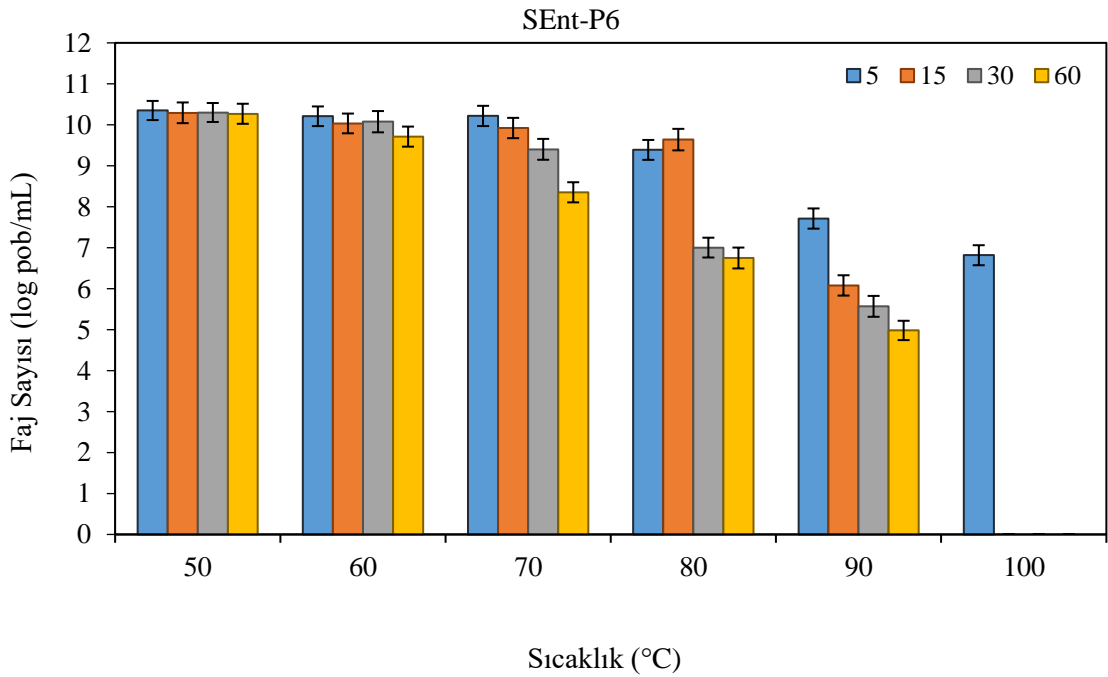
SEnt-P5 ve SEnt-P6 fajlarının uygulanan ısıl işlemlere karşı dirençleri Şekil 4.12 ve 4.13'te sunulmuştur. SEnt-P5 fajının 50-70°C'de 5-60 dk ve 80°C'de 5-30 dk uygulanan ısıl işlemlerde biyolojik aktivitesini koruduğu, belirtilen sıcaklık ve sürelerin üzerinde aktivitesinde azalma meydana geldiği belirlenmiştir. 100°C'de 5, 15, 30 ve 60 dk uygulanan ısıl işlem sonucunda SEnt-P5 fajın sayısında sırasıyla 1,44, 4,95, 6,35 ve 6,41 log'luk azalma olduğu saptanmıştır (Şekil 4.12). SEnt-P6 fajının ısı stabilitesinin SEnt-P5 fajına göre biraz düşük olduğu gözlenmiştir. SEnt-P6 fajın 50-60°C'de 5-60 dk, 70°C'de 5-30 dk, 80°C'de 5-15 dk ısıl işleme maruz bırakıldığında hemen hemen aktivitesini koruduğu görülmüştür. 90°C'de 60 dk ve 100°C'de 5 dk uygulanan ısıl işlem sonucunda sayısında sırasıyla 5,34 ve 3,53 log'luk azalma olduğu belirlenmiştir. 100°C'de 15 dk ve üzerinde uygulanan ısıl işlemlerde aktivitesini tamamen kaybettiği bulunmuştur (Şekil 4.13). SEnt-P5 ve SEnt-P6 fajlarının yüksek derecede uygulanan ısıl işlemlere dayanıklı olması gıda endüstrisinde biyokoruyucu olarak kullanılmasında önemli bir özellik olarak değerlendirilmektedir. Çünkü yüksek derece ısıl işleme tabi tutulan gıdalarda da kullanılabilme özelliği katmaktadır.

S. Pullorum bakteriyofajı olan PSPu-95 ile PSPu-4-166'nın 60°C'de 60 dk uygulanan ısıl işlem koşullarında aktivitesini korudukları, 70°C'de 30 ve 60 dk uygulanan ısıl işlem koşullarında aktivitesinde sırasıyla 0,05 ve 0,15 log'luk azalma olduğu, ancak 80°C'de her iki bakteriyofajın aktivitesini tamamen kaybettiği belirtilmiştir (Bao vd.,

2011). PA13076 ve PC2184 *S. Enteritidis* fajların 50 ve 60°C’de 30 dk uygulanan ısıtma işleme dayanıklı oldukları, PA13076 fajın 70°C’de, PC2184 fajın ise 80°C’de 60 dk uygulanan ısıtma işleme aktivitesini tamamen kaybettikleri ifade edilmiştir (Bao vd., 2015). LPSE1 fajın 4-12 pH değerleri arasında ve 70°C’de 30 dk uygulanan ısıtma işleme dayanıklı olduğu, 80°C’de 60 dakika uygulanan ısıtma işlemi ile aktivitesini tamamen kaybettiği ifade edilmiştir (Huang vd., 2018).

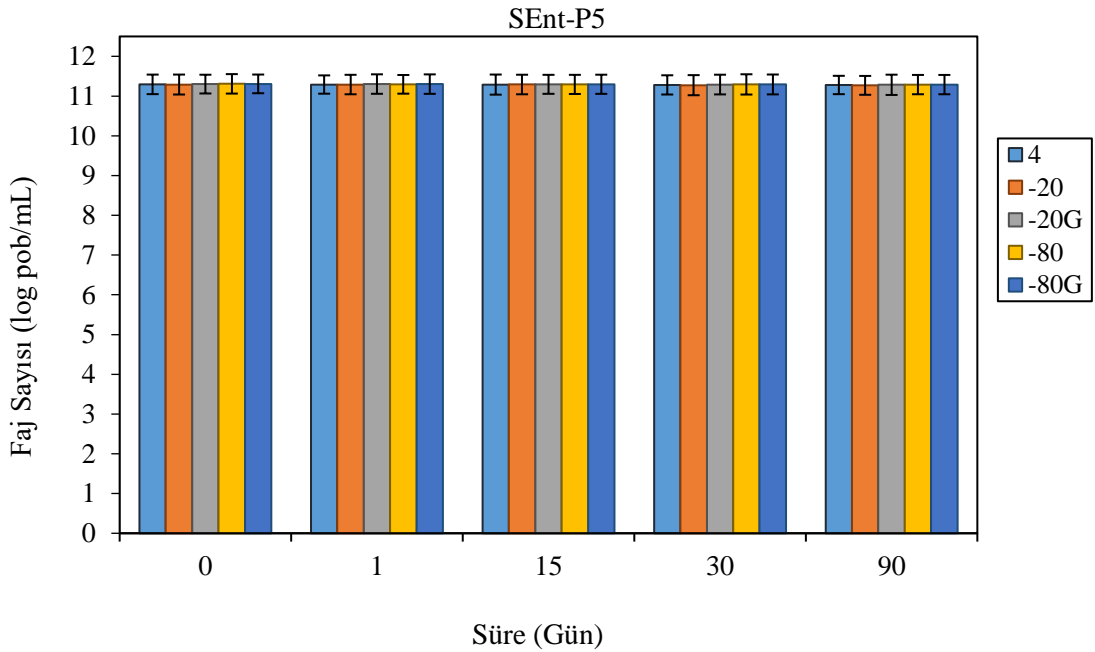


Şekil 4.12. SEnt-P5 fajının sıcaklık stabilitesi

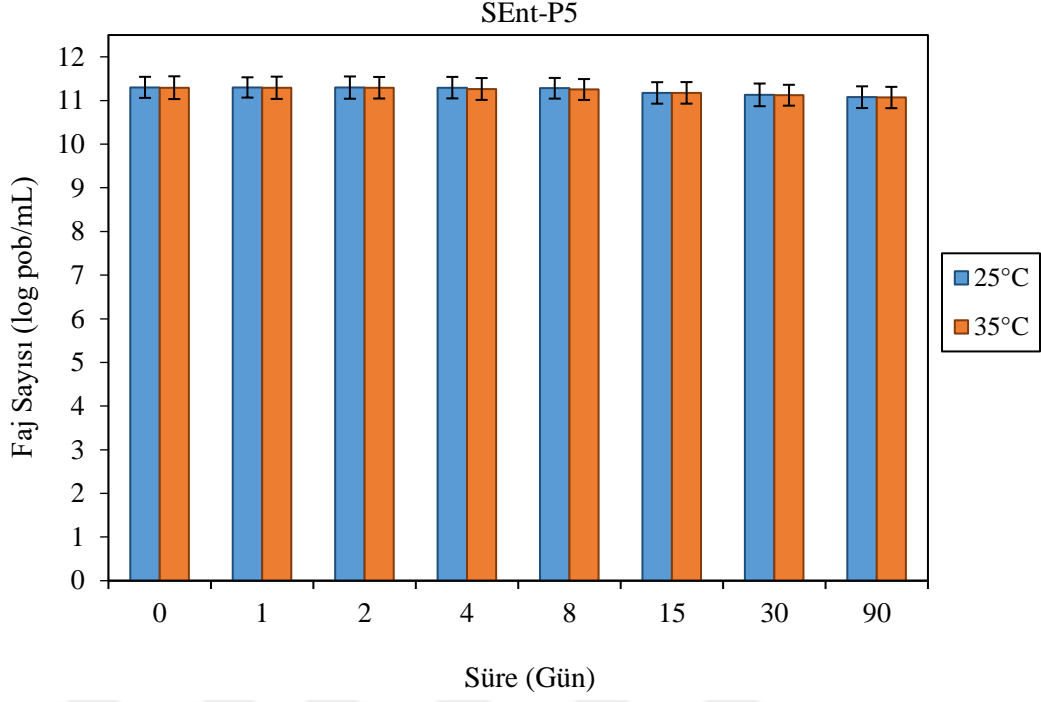


Şekil 4.13. SEnt-P6 fajının sıcaklık stabilitesi

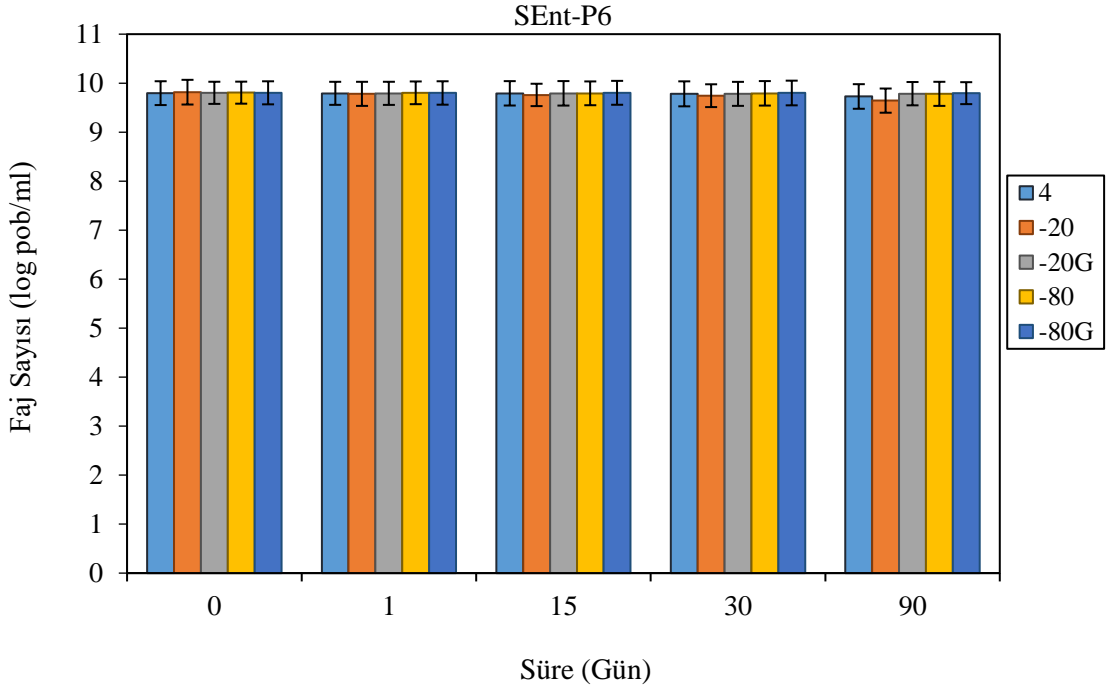
SEnt-P5 ve SEnt-P6 fajlarının farklı depolama koşullarında stabiliteleri de belirlenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda, SEnt-P5 fajı 25, 35, 4, -20, -80°C’de 3 ay depolama süresince stabilitesini korudukları belirlenmiştir (Şekil 4.14 ve 4.15). SEnt-P6 fajın ise 4, -20, -80°C’de 3 ay depolama süresince stabilitesini koruduğu (Şekil 4.16 ve 4.17), ancak 25 ve 35°C’de 3 aylık depolama sonucunda biyolojik aktivitesinde (sayısında) 0.94 ve 3.30 log’luk azalma meydana geldiği tespit edilmiştir. Ayrıca -20 ve -80°C’de depolama işlemi gliserollü ortamda da gerçekleştirilmiş ve stabilitelerinde tamamen korudukları gözlenmiştir (Şekil 4.14 ve 4.16). Bu sonuçta her iki fajın çok düşük sıcaklıklarda depolama işlemi sırasında kriyoprotektan ajan olan gliserollü kullanmadan da biyolojik aktivitelerini koruduklarını ortaya koymuştur.



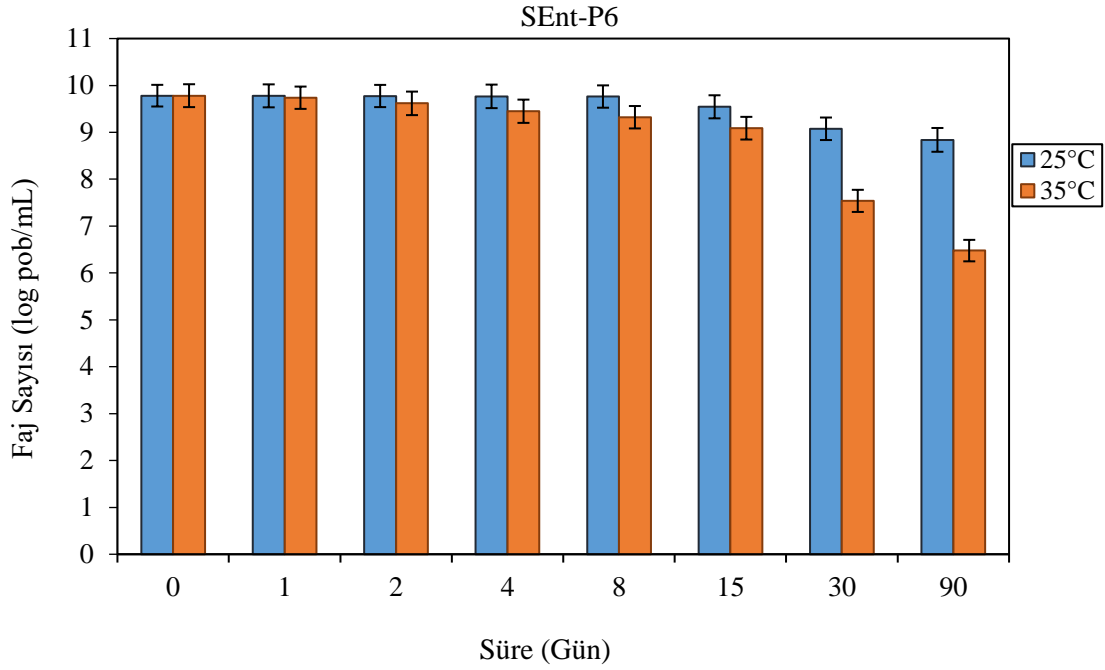
Şekil 4.14. SEnt-P5 fajın düşük derecede (4, -20 ve -80°C) depolama koşullarında stabilitesi; G, %20 gliserollü ortam



Şekil 4.15. SEnt-P5 fajın 25 ve 35°C’de depolama koşullarında stabilitesi



Şekil 4.16. SEnt-P6 fajın düşük derecede (4, -20 ve -80°C) depolama koşullarında stabilitesi; G, %20 gliserollü ortam



Şekil 4.17. SEnt-P6 fajın 25 ve 35°C'de depolama koşullarında stabilitesi

4.8. Bakteriyofaja-Duyarsız Mutant Sıklığının Belirlenmesi

Bakteriyofaj duyarsız mutant (BIM) sıklığının belirlenmesinde kullanılan eşitlik aşağıda verilmiştir.

$$\text{Bakteriyofaja Dayanıklı Mutant Sıklığı} = \frac{\text{Gelişen Bakteri Sayısı}}{\text{Başlangıç Bakteri Sayısı}} \times 100$$

SEnt-P5 ve SEnt-P6 fajlarına dayanıklı mutant sıklığı değerleri sırasıyla $5,92 \times 10^{-7}$ ve $3,50 \times 10^{-7}$ olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar, her iki fajın mutant frekanslarının çok düşük olduğunu ve dolayısıyla virülant veya litik fajlar olduğunu göstermektedir. Lizojenik fajların mutant frekans değerleri litik fajlara göre daha yüksektir. SEnt-P5 ve SEnt-P6 fajların mutant sıklığı, Salmonella'ya özgü st104a, st104b ve felix 01 fajlarına göre daha düşük olduğu gözlenmiştir (O'Flynn vd., 2006). *S. enterica* serovarlarına karşı etkili olan st104a, st104b ve felix 01 fajlarının mutant sıklıklarının sırasıyla $2,90 \times 10^{-4}$, $2,90 \times 10^{-4}$ ve $2,35 \times 10^{-6}$ kob/mL olduğu bildirilmiştir. *E. coli* O157:H7'ye spesifik e11/2, e4/1c ve pp01 bakteriyofajların mutant sıklığı değerlerinin ise $1,2 \times 10^{-6}$, $3,3 \times 10^{-4}$ ve $1,9 \times 10^{-6}$ kob/mL olduğu, fajlar kokteyl olarak kullanıldığında duyarsız mutant sıklığı değerlerinin 1,1- $1,5 \times 10^{-6}$ arasında değiştiği belirtilmiştir (O'Flynn vd., 2004).

4.9. Bakteriyofajların Konak Hücrelerine Karşı Litik Aktiviteleri

Bakteriyofajların litik aktiviteleri hem tek başlarına konak hücrelerine karşı hem de kokteyl olarak her bir fajın (10^9 kob/mL) konak hücrelerine (5,51-5,87 log kob/mL) karşı iki farklı sıcaklıkta (25 ve 35°C) ayrı ayrı BHI besiyerinde test edilerek belirlenmiştir. Analiz sonuçları Çizelge 4.2 ve 4.3'te sunulmuştur. Çizelgelerden de görüldüğü üzere SEnt-P5 ve SEnt-P6 fajları gerek tek başlarına gerekse kokteyl olarak uygulandıklarında *Salmonella* konak hücre sayısını inkübasyon işleminin 1'inci saatinden itibaren inkübasyon işlemi süresince hem 25°C hem de 35°C'de tespit edilebilir seviyenin altına (10 kob/mL veya 1 log kob/mL>) düşürdüğü gözlenmiştir (Çizelge 4.2 ve 4.3). Bakteriyofaj uygulanmayan sadece *S. Enteritidis* içeren kontrol örneklerinde (SE-M742 ve SE-DMC3) *Salmonella* sayısının inkübasyon süresince arttığı, ancak bakteri sayısındaki artışın 35°C'de daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.2 ve 4.3).

ΦAPCEc01, ΦAPCEc02, ΦAPCEc03 kolifajlar yalnız uygulandıklarında *E. coli* sayısını önemli düzeyde azalttıkları, ancak kombine olarak kullanıldıklarında *E. coli* gelişimini tamamen inhibe ettikleri belirtilmiştir (Dalmasso vd., 2016).

Çizelge 4.2. SEnt-P5 ve SEnt-P6 fajlarının 25°C'de konakçı hücrelerine tek ve kokteyl olarak litik aktivitesi

Örnekler	İnkübasyon Süresi (Saat)					
	0	1	2	3	4	5
M742	5,82±0,14	5,96±0,17	6,20±0,12	6,51±0,10	6,92±0,18	7,52±0,19
SEnt-P5/M742	5,80±0,10	1>	1>	1>	1>	1>
Kokteyl-M742	5,81±0,12	1>	1>	1>	1>	1>
DMC3	5,87±0,15	6,01±0,18	6,32±0,13	6,75±0,20	7,17±0,21	7,61±0,17
SEnt-P6/DMC	5,84±0,17	1>	1>	1>	1>	1>
Kokteyl-DMC3	5,82±0,13	1>	1>	1>	1>	1>

SEnt-M742, *S. Enteritidis* MET-S1-M742; Kokteyl, SEnt-P5 ve SEnt-P6 fajlarının karışımı; SEnt-DMC3, *S. Enteritidis* DMC3.

Çizelge 4.3. SEnt-P5 ve SEnt-P6 fajlarının 35°C’de konakçı hücrelerine tek ve kokteyl olarak litik aktivitesi

Örnekler	İnkübasyon Süresi (Saat)					
	0	1	2	3	4	5
M742	5,52±0,19	5,71±0,14	6,05±0,21	6,53±0,23	7,41±0,15	8,01±0,17
SEnt-P5/M742	5,54±0,13	1>	1>	1>	1>	1>
Kokteyl-M742	5,51±0,15	1>	1>	1>	1>	1>
DMC3	5,75±0,20	5,91±0,17	6,80±0,16	7,39±0,24	8,36±0,22	8,49±0,26
SEnt-P6/DMC	5,78±0,11	1>	1>	1>	1>	1>
Kokteyl-DMC3	5,79±0,14	1>	1>	1>	1>	1>

SEnt-M742, *S. Enteritidis* MET-S1-M742; Kokteyl, SEnt-P5 ve SEnt-P6 fajlarının karışımı; SEnt-DMC3, *S. Enteritidis* DMC3.

SEnt-P5 ve SEnt-P6 fajlarının konak hücreleri olan *S. Enteritidis* MET-S1-M742 ve *S. Enteritidis* DMC3 bakterileri üzerine inhibitör etkileri BHI besiyerinde iki farklı faj (10^6 ve 10^9 pob/mL) ve bakteri (10^3 ve 10^6 kob/mL) konsantrasyonunda buzdolabı koşullarında (5°C) da belirlenmiştir.

SEnt-P5 ve SEnt-P6 fajları 10^3 kob/mL düzeyinde konak hücre içeren ortama yüksek dozda yani 10^9 pob/mL düzeyinde uygulandığında *Salmonella* sayısını depolamanın 1’inci saatinden itibaren tespit edilemeyecek seviyenin altına düşürdüğü belirlenmiştir ($p<0,05$) (Çizelge 4.5).

SEnt-P5 ve SEnt-P6 bakteriyofajları 10^9 pob/mL seviyesinde yüksek dozda 10^6 kob/mL *Salmonella* içeren besiyerine uygulandığında inkübasyonun 1’inci saatinden sonra konak hücre sayılarında sırasıyla 4,21 ve 3,91 log’luk ($p<0,05$), 3’üncü saatinde 4,94 ve 4,70’luk azalmaya ($p<0,05$) neden oldukları ve depolamanın 6’ncı saatinde sonra tespit edilebilir seviyenin altına düşürdükleri saptanmıştır (Çizelge 4.6).

Bakteriyofajlar 10^6 pob/mL düzeyinde 10^3 kob/mL seviyesinde konak hücre içeren ortama uygulandıklarında SEnt-P5 fajın depolamanın 1’inci saatinden itibaren *Salmonella* sayısını tespit edilebilir seviyenin altına düşürdüğü, SEnt-P6 fajın ise 1,60 log’luk azalmaya neden olduğu ($p<0,05$), ancak depolamanın 3’üncü saatinden sonra canlı kalan *Salmonella* sayısını belirlenemeyecek seviyenin altına düşürdüğü tespit edilmiştir (Çizelge 4.7).

Her iki faj yüksek dozda (10^6 kob/mL) konak hücrelerini içeren besiyerlerine düşük yani 10^6 pob/mL düzeyinde uygulandığında enfektif etkilerinin azaldığı görülmüştür (Çizelge

4.8). SEnt-P5 ve SEnt-P6 fajların depolamanı 1'inci saatinde sırasıyla 3,51 ve 4,84 log'luk azalmaya neden oldukları ($p<0,05$) ve depolama süresince canlı kalan bakteri sayısının düşük düzeyde de olsa devam ettiği belirlenmiştir. Depolama işleminin sonunda, SEnt-P5 fajı 3,82 log'luk ($p<0,05$), SEnt-P6 fajı ise 3,71 log'luk azalmaya ($p<0,05$) neden olmuştur (Çizelge 4.8).

Bütün örneklerde SEnt-P5 ve SEnt-P6 fajların sayılarının depolamanın 1'inci saatinden sonra biraz arttığı ve daha sonraki sürelerde sayılarında önemli bir değişim olmadığı gözlenmiştir ($p>0,05$) (Çizelge 4.5, 4.6, 4.7 ve 4.8). Bakteriyofaj içermeyen kontrol örneklerinde ise bakteri sayısında 24 saatlik depolama süresinde önemli bir değişimin olmadığı bulunmuştur ($p>0,05$) (Çizelge 4.5, 4.6, 4.7 ve 4.8).

FAHEc1 fajı, $>10^7$ pob/mL seviyesinde uygulandığında, 5°C 'de LB besiyerinde *E. coli* O157:H7'nin sayısını 4 log kadar azalttığı bildirilmiştir (Hudson vd., 2013). BPECO19 fajı 1×10^9 pob/mL düzeyinde uygulandığında LB besiyerinde 1×10^5 kob/mL *E. coli* O157:H7'yi tamamen inhibe ettiği rapor edilmiştir (Seo et al. 2016).

Çizelge 4.5. Yüksek dozda (10^9 pob/mL) SEnt-P5 ve SEnt-P6 fajlarının 5°C 'de düşük dozda (10^3 kob/mL) konak hücrelerine karşı enfektif etkileri

Örnekler	Depolama Süresi (saat)					
	0	1	3	6	9	24
K1*	3,32±0,11	3,34±0,14	3,36±0,16	3,42±0,10	3,45±0,13	3,51±0,12
K2*	3,25±0,13	3,28±0,17	3,36±0,14	3,43±0,12	3,49±0,19	3,55±0,16
SEnt-P5/M742*	3,35±0,14	1>	1>	1>	1>	1>
SEnt-P6/DMC3*	3,27±0,11	1>	1>	1>	1>	1>
SEnt-P5**	9,24±0,25	9,54±0,27	9,57±0,28	9,58±0,24	9,59±0,19	9,60±0,23
SEnt-P6**	9,25±0,25	9,51±0,28	9,59±0,29	9,61±0,14	9,64±0,20	9,68±0,27

*, Salmonella hücre sayısı log kob/mL olarak verilmiştir.

** , Faj sayısı log pob/mL olarak verilmiştir.

K1, sadece *S. Enteritidis* MET-S1-M742 içeren kontrol 1; K2, sadece *S. Enteritidis* DMC3 içeren kontrol 2 örneği.

Çizelge 4.6. Yüksek dozda (10^9 pob/mL) SEnt-P5 ve SEnt-P6 fajlarının 5°C 'de yüksek dozda (10^6 kob/mL) konak hücrelerine karşı enfektif etkileri

Örnekler	Depolama Süresi (saat)					
	0	1	3	6	9	24
K1*	6,50±0,13	6,56±0,19	6,64±0,21	6,73±0,23	6,84±0,19	7,01±0,23
K2*	6,29±0,19	6,34±0,21	6,36±0,17	6,38±0,23	6,43±0,18	6,49±0,20
SEnt-P5/M742*	6,48±0,19	2,27±0,12	1,54±0,10	1>	1>	1>
SEnt-P6/DMC3*	6,30±0,15	2,39±0,11	1,60±0,13	1>	1>	1>
SEnt-P5**	9,19±0,21	9,52±0,24	9,55±0,26	9,59±0,29	9,61±0,30	9,65±0,27
SEnt-P6**	9,09±0,24	9,41±0,27	9,65±0,18	9,79±0,25	9,82±0,29	9,94±0,26

*, Salmonella hücre sayısı log kob/mL olarak verilmiştir.

** , Faj sayısı log pob/mL olarak verilmiştir.

K1, sadece *S. Enteritidis* MET-S1-M742 içeren kontrol 1; K2, sadece *S. Enteritidis* DMC3 içeren kontrol 2 örneği.

Çizelge 4.7. Düşük dozda (10^6 pob/mL) SEnt-P5 ve S-P6 fajlarının 5°C 'de düşük dozda (10^3 kob/mL) konak hücrelerine karşı enfektif etkileri

Örnekler	Depolama Süresi (saat)					
	0	1	3	6	9	24
K1*	3,31±0,12	3,34±0,10	3,36±0,14	3,42±0,16	3,44±0,13	3,51±0,16
K2*	3,24±0,10	3,29±0,13	3,46±0,16	3,57±0,19	3,60±0,15	3,72±0,11
SEnt-P5/M742*	3,28±0,10	1>	1>	1>	1>	1>
SEnt-P6/DMC3*	3,25±0,14	1,65±0,11	1>	1>	1>	1>
SEnt-P5**	6,41±0,19	6,66±0,22	6,67±0,17	6,75±0,24	6,76±0,18	6,79±0,16
SEnt-P6**	6,25±0,19	6,42±0,16	6,48±0,20	6,51±0,13	6,56±0,17	6,58±0,12

*, Salmonella hücre sayısı log kob/mL olarak verilmiştir.

** , Faj sayısı log pob/mL olarak verilmiştir.

K1, sadece *S. Enteritidis* MET-S1-M742 içeren kontrol 1; K2, sadece *S. Enteritidis* DMC3 içeren kontrol 2 örneği.

Çizelge 4.8. Düşük dozda (10^6 pob/mL) SEnt-P5 ve SEnt-P6 fajlarının 5°C 'de yüksek dozda (10^6 kob/mL) konak hücrelerine karşı enfektif etkiler

Örnekler	Depolama Süresi (saat)					
	0	1	3	6	9	24
K1*	6,25±0,23	6,29±0,21	6,37±0,18	6,46±0,24	6,53±0,15	6,66±0,14
K2*	6,22±0,12	6,28±0,15	6,31±0,17	6,37±0,19	6,38±0,11	6,41±0,20
SEnt-P5/M742*	6,24±0,13	3,51±0,19	3,20±0,20	2,93±0,12	2,60±0,11	2,42±0,15
SEnt-P6/DMC3*	6,19±0,18	4,84±0,11	3,62±0,09	2,71±0,11	2,59±0,12	2,48±0,10
SEnt-P5**	6,42±0,17	6,74±0,20	6,78±0,18	6,82±0,21	6,84±0,17	6,87±0,24
SEnt-P6**	6,18±0,17	6,42±0,20	6,51±0,22	6,70±0,19	6,82±0,24	6,95±0,16

*, Salmonella hücre sayısı log kob/mL olarak verilmiştir.

** , Faj sayısı log pob/mL olarak verilmiştir.

K1, sadece *S. Enteritidis* MET-S1-M742 içeren kontrol 1; K2, sadece *S. Enteritidis* DMC3 içeren kontrol 2 örneği.

BÖLÜM V

SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında *S. Enteritidis*'i enfente eden SEnt-P5 ve SEnt-P6 kodlu fajları saflaştırılarak, morfolojik özellikleri, etki ettiği konak hücre aralığı, enfeksiyon çokluğu değerleri, adsorpsiyon oranları, tek aşamalı gelişim kurveleri, konakçı hücrelerine karşı litik aktiviteleri, pH, sıcaklık ve depolama stabiliteleri belirlenmiştir. Araştırma sonucunda elde edilen bulgular aşağıda özetlenmiştir.

- a) Saflaştırıldıktan sonra hazırlanan SEnt-P5 ve SEnt-P6 faj stok çözeltilerin faj titreleri sırasıyla 6×10^{10} ve 6×10^9 olduğu tespit edilmiştir.
- b) SEnt-P5 fajının $1,38 \pm 0,03$ mm iç çapa sahip net lizis olan bir merkez plak ve bunu çevreleyen bir dış plakla toplam plak çapının $3,88 \pm 0,21$ mm, SEnt-P6 fajının plak çapının ise $0,93 \pm 0,09$ mm olduğu belirlenmiştir.
- c) Her iki fajın *Siphoviridae* familyasına ait olduğu belirlenmiştir. SEnt-P5 ve SEnt-P6 fajlarının baş çaplarının sırasıyla $61,23 \pm 1,21$ ve $59,78 \pm 0,66$ nm, kuyruk uzunluklarının ise $91,61 \pm 0,88$ ve $106,62 \pm 1,02$ nm olduğu gözlenmiştir.
- d) Konak hücre aralıklarını 60 farklı tür, suş veya serovar (14 adet *S. Enteritidis*, 12 adet *S. Typhimurium*, 19 adet diğer *Salmonella enterica* serovarıları, 8 adet *E. coli*, 7 adet diğer bakteriler) kullanılmıştır. Her iki fajın, özellikle SEnt-P6 fajın etki ettiği konak hücre aralığının çok geniş olduğu tespit edilmiştir. SEnt-P5 fajın toplam 13 bakteriye (bunlardan 7 tanesi *S. Enteritidis*, 5 tanesi diğer *S. enterica* serovarıları, 1 tanesi *E. coli*) karşı litik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. SEnt-P6 fajın test edilen bakterilerden 24 tanesine (12 tanesi *S. Enteritidis*, 6 tanesi *S. Typhimurium*, 4 tanesi diğer *S. enterica* serovarıları, 2 tanesi *E. coli*) karşı kuvvetli litik aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır.
- e) SEnt-P5 ve SEnt-P6 fajlarının MOI değerleri 0,001-0,0001, mutant sıklık değerlerinin $5,92 \times 10^{-7}$ - $3,50 \times 10^{-7}$; konak hücreye adsorpsiyon oranlarının inkübasyonun ilk 5 dakikasında Ca'suz ortamda %96,58- 96,35, Ca'lu ortamda ise %99,50-98,28 olduğu bulunmuştur.
- f) Latent sürelerinin 5-10 dakika, patlama sürelerinin 20 dakika ve patlama sayılarının 277-351 plak/hücre olduğu gözlenmiştir.

- g) Fajların geniş pH aralıklarında aktivitelerini korudukları gözlenmiştir. SEnt-P5 fajının pH 1-13, SEnt-P6 fajının ise pH 2-12 aralığında aktivitelerini korudukları belirlenmiştir.
- h) SEnt-P5 ve SEnt-P6 fajlarının yüksek sıcaklık uygulamalarına oldukça dayanıklı oldukları saptanmıştır. SEnt-P5 fajının 80°C'de 30 dakika boyunca ısıtılma işlemi uygulanmasının sonucunda stabilitesini koruduğu, ancak bu sıcaklık ve süre arttıkça canlı kalan faj sayısında azalma meydana geldiği, 100°C'de 60 dk uygulanan ısıtılma işlemi sonucunda fajların tamamen ölmediği görülmüştür. SEnt-P6 fajının 80°C'de 15 dk ısıtılma işlemi süresi arttıkça canlı kalan faj sayısının azaldığı ve 100°C'de 15 dk'da canlılığını yitirdiği belirlenmiştir.
- i) Yüksek (25 ve 35°C) ve düşük (4, -20, -80°C) sıcaklıklarda 3 ay (90 gün) depolama işlemi süresince de SEnt-P5 ve SEnt-P6 fajlarının stabilitesini korudukları belirlenmiştir. Yüksek depolama sıcaklıklarında uzun süre muhafaza koşullarında aktivitelerinde biraz azalma meydana geldiği gözlenmiştir.
- j) SEnt-fajları $2,4 \times 10^9$ pob/mL seviyesinde 5,51-5,87 log kob/mL konak hücrelerini içeren besiyerine 25 ve 35°C'de tek başlarına ve kokteyl olarak uygulandıklarında Salmonella sayısını tespit edilebilir seviyenin altına indirdikleri bulunmuştur. Ayrıca SEnt-P5 ve SEnt-P6 fajlarının buzdolabı sıcaklığında da konak hücrelerini çok etkili bir şekilde enfekte ettikleri tespit edilmiştir. Ancak, faj konsantrasyonu düşük (10^6 pob/mL), bakteri konsantrasyonu yüksek (10^6 kob/mL) tutulduğunda bu etkinin azaldığı gözlenmiştir.

Sonuç olarak, SEnt-P5 ve SEnt-P6 fajlarının etki ettiği konak hücre aralıklarının geniş olması, kuvvetli litik olmaları, 25, 35 ve 5°C'de konak hücrelerini çok etkili bir şekilde inhibe etmeleri, geniş pH değerlerinde ve yüksek derecede uygulanan ısıtılma işlemlere dayanıklı olmaları gıda endüstrisi için önemli özelliklerdir. Bu özelliklerinden dolayı gıdalarda gıda kaynaklı patojenik bakteri olan *Salmonella* Enteritidis kontrolünde biyokoruyucu olarak kullanılma potansiyeline sahip olabilecekleri söylenebilir.

KAYNAKLAR

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

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

Ackermann, H. W. ve Kropinsk, A. M., “Curated list of prokaryote viruses with fully sequenced genomes”, *Research in Microbiology* 158, 555-566, 2007.

Ackermann, H.W., Bacteriophages,1, Martha R.J. ClokieAndrew M. Kropinski, Canada, 2009.

Ackermann, H.W., Advances in virus research, 82, Małgorzata Łobocka, Waław T. Szybalski, *Science Direct*, Canada, 2012.

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

Adhya, S. ve Merril, C. The road to phage therapy, *Nature*, 443:754, 2006.

Akhtar, M., Viazis, S., ve Diez-Gonzalez, F. “Isolation, identification and characterization of lytic, wide host range bacteriophages from waste effluents against *Salmonella enterica* serovars”. *Food Control*, 38, 67-74, 2014.

Andino, A. ve Hanning, I., “*Salmonella enterica*: Survival, Colonization and Virulence Differences among Serovars”, *Scientific World Journal* 1, 179-201, 2015.

Atterbury, R. J., Dillon, E., Swift, C., Connerton, P. L., Frost, J. A. and Dodd, C. E., “Correlation of *Campylobacter* bacteriophage with reduced presence of hosts in broiler chicken ceca”, *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 4885-4887, 2005.

Augustine, J., Louis, L., Varghese, S.M. ve Bhat, S.G., “Isolation and partial characterization of FSP-1, a *Salmonella* specific lytic phage from intestinal content of broiler chicken” *J Basic Microbiol*, 53, 111–20, 2013.

Bao, H., Zhang, H. ve Wang, R. “Isolation and characterization of bacteriophages of *Salmonella enterica* serovar Pullorum”, *Poultry Science*, 90, 2370–7, 2011.

Bao, H., Zhang, P., Zhang, H., Zhou, Y., Zhang, L. ve Wang, R. “Bio-Control of *Salmonella* Enteritidis in Foods Using Bacteriophages”, *Viruses*, 7, 4836-4853, 2015.

Bell, C., Approach to the control of entero-hemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). *International Journal of Food Microbiology*, 78, 197-216, 2002.

Bell, C., Kyriakides, A. Salmonella. “In: Foodborne Pathogens Hazard Risk Analysis ve Control”, Blackburn, C.W., McClure, P.J., *Woodhead Publishing Limited*, England, 307-331, 2002.

Bell, C. and Kyriakides, A., “Salmonella: A practical approach to the organism and its control in foods”, *Oxford: Blackwell Science* 1, 35-45, 2002. (a)

Bhunia, A.K. “Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis”, Springer Science+Business Media, LLC, 2008.

Borie C., Albala I., Sánchez P., Sánchez M.L., Ramírez S., Navarro C., Morales M.A., Retamales J. ve Robeso J. “Bacteriophage Treatment Reduces Salmonella Colonization of Infected Chickens”, *American Association of Avian Pathologists*, 52:1, 64-67, 2008.

Bradley, K., “Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins”, *Journal of Bacteriology* 31, 230–314, 1967.

Brüssow, H. ve E. Kutter., “Bacteriophages: Biology and Applications”, *Phage Ecology*, 129-164, 2005.

Bueno, E., García, P., Martínez, B. and Rodríguez, A., “Phage inactivation of *Staphylococcus aureus* in fresh and hard type cheese”, *International Journal of Food Microbiology* 158(1), 23-27, 2012.

Cann, A. J., Principles of Molecular Virology. *Academic Press*, Harcourt Brace and Company Publishers, New York, NY, 1993.

Carey-Smith, G. V., Billington, C., Cornelius, A. J., Hudson, A., Heinemann, J. A., “Isolation and characterization of bacteriophages infecting *Salmonella* spp.”, *FEMS Microbiology Letters*, 258, 182–6, 2006.

CDC, “2015 Surveillance Report”, <https://www.cdc.gov/foodnet/pdfs/%20FoodNet-Annual-Report-2015-508c.pdf>, 2015.

Coffey, B., Mills, S., Coffey, A., McAuliffe, O. and Ross, R. P., “Phage and their lysins as biocontrol agents for food safety applications”, *Annual Review of Food Science and Technology* 1, 449-468, 2010.

Cormican, M., DeLappe, N., O’Hare, C., Doran, G., Morris, D., Corbett-Feeney, G., Fanning, S. and Daly, M., “*Salmonella enterica* serotype Bredeney: antimicrobial susceptibility and molecular diversity of isolates from Ireland and Northern Ireland”, *Applied and Environmental Microbiology* 68, 181–186, 2002.

Dalmasso, M., Strain, R., Neve, H., Franz, C. M. A., Cousin, F. J., Ross, R. P. ve Hill, C., “Three new *Escherichia coli* phages from the human gut show promising potential for phage therapy”, *Public Library of Science*, 2016.

Desin, T.S., Köster, W., Potter, A.A., “*Salmonella* vaccines in poultry: past, present and future”, *Expert Rev. Vaccines* 12, 87–96, 2013.

Duckworth, D.H., Glenn, J. ve McCORQUODALE D.J., “Inhibition of bacteriophage replication by extrachromosomal genetic elements”, *Microbiological Research*, 45(1):52-71, 1981.

EFSA http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale1178620753812_1211902031795,
12 Ocak 2019.

FDA, “GRAS Notice 000218: LISTEXTM P100 Bacteriophage”,
<https://www.fda.gov/media/117177/download>, 21 Ağustos 2006.

FDA,[https://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/ResearchAreas/SafePracticesforFood
Processes/ucm091265.htm](https://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/ResearchAreas/SafePracticesforFoodProcesses/ucm091265.htm), 15 Ekim 2011.

Ferguson, S., Roberts, C., Handy, E. ve Sharma, M. “Lytic bacteriophages reduce
Escherichia coli O157”. *Bacteriophage* 3:1, e24323, 2013.

Flores, C.O., Meyer, J.R., Valverde, S., Farr, L. ve Weitz, J.S.,” Statistical structure of
host–phage interactions”, *PNAS*, 108(28):288-297, 2011.

Garcia, P., Madera, C., Martinez, B. ve Rodriguez, A., “Biocontrol of *Staphylococcus
aureus* in curd manufacturing processes using bacteriophages”, *International Dairy
Journal*, 17, 1232–1239, 2007.

Garcia, P., Martinez, B., Obeso, J. M. and Rodriguez, A., “Bacteriophages and their
application in food safety”, *Letters in Applied Microbiology*, 47, 479-485, 2008.

Garcia, P., Martinez, B., Rodríguez, L. ve Rodriguez, A., “Synergy between the phage
endolysin LysH5 and nisin to kill *Staphylococcus aureus* in pasteurized milk”,
International Journal of Food Microbiology, 141, 151-155, 2010.

Goodridge, L., Gallaccio, A. ve Griffiths, M.W., “Morphological, host range, and
genetic characterization of two coliphages” 69(9) : 5367, 2003.

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

Guttman B, Raya R.A. and Kutter E., Bacteriophages Biology and Applications: Basic Phage Biology, *CRC Press*, USA., 2005.

Hadas, H., Einav, M., Fishov, I. ve Zaritsky, A., “Bacteriophage T4 development depends on the physiology of its host *Escherichia coli*”, *Microbiology*, 143, 179–185, 1997.

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

Hald, T. “Pathogen Updates: Salmonella. In: Foodborne Infections and Intoxications”, Morris, J.G., Potter, M.E., Elsevier Inc., *Academic Press*, 4, 67-97, San Diego, CA, USA, 2013.

Hanlon, G.W., “Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections”, *International Journal of Antimicrobial Agents* 30, 118-128, 2007.

Haq, I.U., Chaudhry, W.N., Akhtar, M.N., Andleeb, S., Ishtiaq, and Qadri, I., “Bacteriophages and their implications on future biotechnology: a review”, *Virology Journal* 9, 9, 2012.

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

Huang, C., Virk. S.M., Shi, J., Zhou, Y., Willias, S.P., Morsy, M.K., Abdelnabby, H.E., Liu, J., Wang, X. ve Li, J. “Isolation, characterization, and application of bacteriophage LPSE1 against *Salmonella enterica* in Ready to Eat (RTE) Foods”, *Front. Microbiol*, 9:1046, 2018.

Hudson, J.A., Billington, C., Cornelius, A.J., Wilson, T., On, S.L., Premaratne, A. ve King, N.J. “Use of a bacteriophage to inactivate *Escherichia coli* O157:H7 on beef”, *Food Microbiol.*, 36, 14-21, 2013.

Ikeda, H. and Tomizawa, J.I., “Transducing fragments in generalized transduction by phage P1. I. Molecular origin of the fragments”, *Journal of Molecular Biology* 14, 85-129, 1965.

Kılıç, S., Süt Endüstrisinde Laktik Asit Bakterileri, *Ege Üniversitesi Basımevi*, Bornova, İzmir, 451, 2008.

Kocharunchitt, C., Ross, T. ve 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.

Koskella, B., Thompson, J.N., Preston, G.M. ve Buckling, A., “Local Biotic Environment Shapes the Spatial Scale of Bacteriophage Adaptation to Bacteria”, *The University of Chicago Press Journals*, 177(4): 440-451, 2011.

Kostrzynska, M., Campos, M.C., Griffiths, M. ve Lepp, D., “Biocontrol of *Salmonella enterica serovar* Typhimurium DT104 on poultry products using bacteriophages” 35, Proc. Agric. Agric.-Food Canada Food Network Meet., Lacombe, Alberta, Canada, 2002.

Kropinski, A.M. “Bacteriophage research: What we have learnt and what still needs to be addressed”, *Research in Microbiology*, 169:481–487, 2018.

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

Kurtboke, I., Bacteriophages, <https://www.intechopen.com/>, 5 Mart 2012.

Lacroix, C., “Protective cultures, antimicrobial metabolites and bacteriophages for food and beverage biopreservation”, Cambridge, UK: *Woodhead Publishing Limited*, 2011.

Lappe, N.D., Doran, G., O'Connor, J., O'Hare, C. ve Cormican M. "Characterization of bacteriophages used in the *Salmonella enterica* serovar Enteritidis phage typing scheme", *Journal of Medical Microbiology*, 58, 86–93, 2009.

Mahmouda, M., Askorab, A., Barakata, A.B., Rabiea, O. ve Hassanc, S.E. "Isolation and characterization of polyvalent bacteriophages infecting multi drug resistant *Salmonella* serovars isolated from broilers in Egypt" , *International Journal of Food Microbiology*, 266, 8-13, 2018.

Martínez, B., Obeso, M.J., Ana Rodríguez, A. and García, P., "Nisin-bacteriophages cross-resistance in *Staphylococcus aureus*", *International Journal of Food Microbiology* 122, 253-258, 2008.

Mc Grath, S., Fitzgerald F. ve van Sinderen, D., Bacteriophages in dairy products: Pros and cons. *Biotechnology Journal* 2: 450-455, 2007.

McLaughlin, M.R. ve King, R.A., "Characterization of *Salmonella* bacteriophages isolated from swine lagoon effluent", *Current Microbiology*, 56:208–213, 2008.

Meaden, S. ve Koskella, B., " Exploring the risks of phage application in the environment", *Frontiers in Microbiology*, 4, 358, 2013.

Molineux, I.J., "No syringes please, ejection of phage T7 DNA from the virion is enzyme driven", *Molecular Microbiology*, 40:1–8, 2001.

O'Brien, A. D., Newland, J. W., Miller, S. F., Holmes, R. K., Smith, H. W. and Formal, S. B., "Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea", *Science* 226 (4675), 694-696, 1984.

Ofir, G. Ve Sorek, R., " Contemporary Phage Biology: From Classic Models to New Insights", *Cell*, 172, 1260-1270, 2018.

O'Flaherty, S., Ross, R.P., and Coffey, A., "Bacteriophage and their lysins for elimination of infectious bacteria", *FEMS Microbiology Review* 33, 801–819, 2009.

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

O'Flynn, G., Coffey, A., Fitzgerald, G.F. ve Ross, R.P. "The newly isolated lytic bacteriophages st104a and st104b are highly virulent against *Salmonella enterica*", *Journal of Applied Microbiology*, 101, 251–259, .2006.

Park, M., Lee, J., Shin, H., Kim, M., Choi, J., Kang, D., Heu, S. ve Ryua S. "Characterization and Comparative Genomic Analysis of a Novel Bacteriophage, SFP10, Simultaneously Inhibiting both *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7" , *Asm Journal* 78(1): 59-63, 2012.

Raya, R.R., Varey, P. ve Oot, R.A., "Dyen MR. Isolation and characterization of a new T-even bacteriophage, CEV1, and determination of its potential to reduce *Escherichia coli* O157:H7 levels in sheep", *Applied and Environmental Microbiology*, 72:6405–6410, 2006.

Ricci, V. ve Piddock, L. J. V.," Exploiting the Role of TolC in Pathogenicity: Identification of a Bacteriophage for Eradication of Salmonella Serovars from Poultry", *Applied and Environmental Microbiology*, 76(5):1704-1706, 2010.

Roos, W.H., Ivanovska, I.L., Evilevitch, A. ve Wuite, G.JL.," Viral capsids: Mechanical characteristics, genome packaging and delivery mechanisms", *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(12):1484–1497, 2007.

Santos, S.B., Fernandes, E., Carvalho, C.M., Sillankorva, S., Krylov, V.N., Pleteneva, E. A., Shaburova, O.V., Nicolau, A., Ferreira, E.C. ve Azeredo, J. “Selection and characterization of a multivalent Salmonella phage and its production in a nonpathogenic *Escherichia coli* strain” *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 7338–7342, 2010.

Scallan, E., Hoekstra, R.M., Angulo, F.J., Tauxe, R.V., Widdowson, M.A. ve Roy, S.L., “Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens”, *Emerging Infectious Diseases*, 17, 7–15, 2011.

Schmelcher, M. ve Loessner, M.J., “Application of bacteriophages for detection of foodborne pathogens”, *Bacteriophage* 4, 28-137, 2014.

Suarez, V., Moineau, S., Reinheimer, J. ve Quiberoni, A. “Argentinean *Lactococcus lactis* bacteriophages: genetic characterization and adsorption studies”, *Journal of Applied Microbiology*, 104, 371-379, 2008.

Tabla, R., Martinez, B. ve Rebollo, J.E., “Bacteriophage performance against *Staphylococcus aureus* in milk is improved by high hydrostatic pressure treatments”, *International Journal of Food Microbiology* 156(3), 209-213, 2012.

Thung, T.Y., Premarathne, J.M.K.J.K., Chang, W.S., Loo, Y.Y., Chin, Y.Z., Kuan, C.H., Tan, C.W., Basri, D.F., Radzi, C.W.J.W.M. ve Radu, S., “Use of a lytic bacteriophage to control Salmonella Enteritidis in retail food”, *LWT - Food Science and Technology*, 78,22-225, 2017.

Tiwari, B.R., Kim, S. ve Kim, J., “A virulent *Salmonella enterica* serovar Enteritidis phage SE2 with a strong bacteriolytic activity of planktonic and biofilmed cells”, *Journal of Bacteriology and Virology*, 43(3):186-194, 2013.

Toro, H., Price, S.B., McKee, S. ve Hoerr, F.J., “Use of bacteriophages in combination with competitive exclusion to reduce Salmonella from infected chickens” *Avian Diseases*, 49:118–124, 2005.

Turner, D., Hezwani, M., Nelson, S. ve Salisbury, V., “Characterization of the *Salmonella* bacteriophage vB_SenS-Ent1”, *Journal of General Virology*, 93:2046–2056, 2012.

Uchiyama, J., Rashel, M., Maeda, Y., Takemura, I., Sugihara, S. ve Akechi, K., “Isolation and characterization of a novel *Enterococcus faecalis* bacteriophage phiEF24C as a therapeutic candidate” *FEMS Microbiology*, 278: 200– 206, 2008.

USDA, Foodborne illness cost calculator: Salmonella. 2013, <https://www.ers.usda.gov/webdocs/DataFiles/48464/Salmonella.xlsx?v=0> , 20 Haziran 2018.

Waldor, M. K. and Mekalanos, J. J., “Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin”, *Science* 272, 1904-1910, 1996.

WHO, <https://www.who.int/mediacentre/%20factsheets/fs139/en/>, 12 Haziran 2018, 2017.

Wommack, K.E. ve Colwell, R.R. “Virioplankton, pp. viruses in aquatic ecosystems”, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64: 69–114, 2000.

Wong, C.L., Sieo, C.C., Tan, W.S., Abdullah, N., Hair-Bejo, M., Abu, J. ve Ho, Y.W. “Evaluation of a lytic bacteriophage, Φ st1, for biocontrol of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in chickens”, *International Journal of Food Microbiology*, 172, 92–101, 2014.

Wright, A. C., Danyluk, M. D. and Otwell, W. S., “Pathogens in raw foods: what the salad bar can learn from the raw bar”, *Current Opinion Biotechnology* 20, 172–77, 2009.

Yang, H., Liang, L., Lin, S. ve Jia, S. “Isolation and characterization of a virulent bacteriophage AB1 of *Acinetobacter baumannii*”, *BMC Microbiology*, 10,1-10, 2010.

Ye, J., Kostrzynska, M., Dunfield, K., Warriner, K. “Evaluation of a biocontrol preparation consisting of *Enterobacter asburiae* JX1 and a lytic bacteriophage cocktail to suppress the growth of *Salmonella Javiana* associated with tomatoes”, *Journal of Food Protection* 72, 2284–2292, 2009.

Yildirim, Z, Sakin, T. ve Çoban, F. “Isolation of lytic bacteriophages infecting *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis” *Acta Biologica Hungarica*, 69:350–369, 2018.



ÖZ GEÇMİŞ

Nida Nur URGANCI 25.07.1994 tarihinde Ankara ilinde dünyaya geldi. İlköğretim ve liseyi Ankara'da tamamladı. 2012 yılında Samsun 19 Mayıs Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği bölümünde lisans eğitimine başladı. Lisans eğitimini 2017 yılında tamamladı. 2015 yılında Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı.



Tez Çalışmasında Üretilen Eserler

Bu tez çalışmasından 1 adet uluslararası poster bildiri üretilmiş ve 1 proje yarışmasına sunulmuştur. Üretilen çalışmalar aşağıda sunulmuştur.

Urgancı, N. N. ve Yıldırım, Z., “Hastalık etmeni *Salmonella* Enteritidis’in doğal düşmanı olan bakteriyofajların izolasyonu”, **2.Ar-Ge ve Proje Pazarı**, Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi, 2019.

Urgancı, N. N., Sakin, T. ve Yıldırım, Z., “*Salmonella* Enteritidis’i enfekte eden SEnt-P5 fajının karakterizasyonu” **International Turkic World Congress On Science And Engineering**, Niğde, 2019.

