



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

Salmonella Typhimurium ve *Escherichia coli* O157:H7'NİN
SÜTTE GELİŞİMİ ÜZERİNE BAKTERİYOFAJLARIN ETKİSİ

BİLGER TAŞ

Mayıs 2018

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

Salmonella Typhimurium ve *Escherichia Coli* O157:H7'NİN SÜTTE GELİŞİMİ
ÜZERİNE BAKTERİYOFAJLARIN ETKİSİ

BİLGER TAŞ

Yüksek Lisans Tezi

Danışman

Prof. Dr. Zeliha YILDIRIM

Mayıs 2018

Bilger TAŞ tarafından **Prof. Dr. Zeliha YILDIRIM** danışmanlığında hazırlanan "**Salmonella Typhimurium ve Escherichia coli O157:H7'nin Sütte Gelişimi Üzerine Bakteriyofajların Etkisi**" adlı bu çalışma jürimiz tarafından Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

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

Üye : [Doç.Dr. Hasan TANGÜLER
Niğde Ömer Halisdemir 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 V.

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.


Bilger TAŞ

ÖZET

SALMONELLA TYPHİMURİUM VE *ESCHERİCHİA COLI* O157:H7'NİN SÜTTE GELİŞİMİ ÜZERİNE BAKTERİYOFAJLARIN ETKİSİ

TAŞ, Bilger

Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Zeliha YILDIRIM

Mayıs,2018 54 Sayfa

Bakteriyofajlar, bakterileri enfekte eden viral ajanlardır. Bu projenin amacı 4 farklı STyph- ve 5 farklı Eco-fajlarının *Salmonella* Typhimurium ve *Escherichia coli* O157:H7'ye karşı tek tek ve kombine olarak virülant etkilerini hem brain hearth infusion (BHI) besiyeri hem de UHT sütte saptamaktır. *S. Typhimurium* ve *E. coli* O157:H7 (10^3 ve 10^6 kob/ml düzeyinde) ile kontamine edilen BHI besiyeri ve UHT süt örnekleri 10^9 pob/ml düzeyinde STyph-fajları ve Eco fajları ile muamele edildikten sonra buzdolabı ve oda sıcaklığında depolama işlemine tabi tutulmuşlardır. Araştırma sonucunda Eco- ve STyph-fajları *E. coli* O157:H7 ve *S.Typhimurium*'u 10^3 kob/ml düzeyinde içeren BHI ve süt örneklerine 10^9 pob/ml seviyesinde uygulandığında buzdolabı ve oda sıcaklığında konakçı bakteri sayısını belirlenemeyecek seviyenin altına düşürdükleri, 10^6 kob/ml *S. Typhimurium* ve *E. coli* O157:H7 içeren BHI ve süt örneklerinde ise Eco- ve STyph-fajlarının konak bakteri sayısını etkili şekilde azalttığı belirlenmiştir. Eco- ve STyph-fajlarının depolama süresince hem buzdolabı hem de oda sıcaklığında stabilitelerini korudukları gözlenmiştir. Çalışma sonucunda STyph- ve Eco-fajlarının UHT sütte konak hücreleri olan *S. Typhimurium* ve *E. coli* O157:H7'e karşı biyokoruyucu ajan olarak kullanılma potansiyeline sahip oldukları saptanmıştır.

Anahtar sözcükler: Bakteriyofaj, *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* O157:H7, süt, biyokoruyucu

SUMMARY

EFFECT OF BACTERIOPHAGES ON THE GROWTH OF *SALMONELLA* *TYPHIMURIUM* AND *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 IN MILK

TAŞ, Bilger

Niğde Ömer Halisdemir University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Food Engineering

Supervisor : Professor Dr. Zeliha YILDIRIM

May 2018, 54 pages

Bacteriophages are viral agents that infect bacteria. The objective of this study was to determine virulent effects of 4 different STyph- or 5 different Eco-phages against *Salmonella* Typhimurium and *Esherichia coli* O157:H7 in the form of individual and cocktail in BHI broth and UHT milk during storage at either refrigerator or room temperatures. BHI broth and UHT milk samples contaminated with *S. Typhimurium* and *E. coli* O157:H7 at the level of 10^3 ve 10^6 CFU/ml were treated with STyph- and Eco phages at 10^9 pob/ml level and then stored at refrigerator or room temperature. As a result of the study, when the Eco- and STyph-phages were applied at the level of 10^9 PFU/ml in the form of individual and cocktail to BHI and UHT milk samples contaminated with *E. coli* O157:H7 and *S. Typhimurium* at the level of 10^3 CFU/ml, the viable cells number of their host bacteria in all samples kept at refrigerated or room temperatures decreased to undetectable level during storage. STyph- and Eco-Phages decreased very effectively the number of *S. Typhimurium* and *E. coli* O157:H7 in BHI and UHT milk containing high level (10^6 CFU/ml). Eco- and STyph-phages maintained their stability during storage under either refrigerator or room temperature. The bacterial cell number of the control samples containing only *S. Typhimurium* or *E. coli* O157:H7 were not changed significantly during refrigerator storage, but increased in the samples stored at room temperature. As a result of this study, Eco- and STyph-phages have potential usage against *S. Typhimurium* or *E. coli* O157:H7 in milk as biopreservatives.

Key words: Bacteriophage, *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* O157:H7, milk, biopreservation

ÖN SÖZ

Tez çalışmamı gerçekleştirdiğim bu süre boyunca değerli bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan, kullandığı her kelimenin hayatıma kattığı önemini asla unutmayacağım saygı değer danışman hocam Sayın; Prof. Dr. Zeliha YILDIRIM'a, çalışma süresince tüm zorlukları benimle göğüsleyen ve hayatımın her evresinde bana destek olan değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca bu çalışmaya TOVAG 213O035 numaralı proje ile destek sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'na teşekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
SUMMARY	v
ÖN SÖZ	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
SİMGE VE KISALTMALAR	xii
BÖLÜM I GİRİŞ	1
BÖLÜM II KAYNAK ARAŞTIRMASI	4
2.1 Bakteriyofaj	4
2.1.1 Bakteriyofajların tarihsel gelişimi ve yapılan araştırmalar	4
2.1.2 Fajların tanımlanması ve sınıflandırılması	6
2.2 Bakteriyofajların Yapıları ve Çeşitleri	9
2.3 Bakteriyofajların Yaşam Şekilleri	11
2.4 Fajların uygulama alanları	14
2.4.1 Bakteriyofajların biyokorucu olarak gıda endüstrisinde kullanımı	14
2.5 Gıda Endüstrisinde Kullanılabilecek Fajlarda Aranılan Özellikler	16
2.6 Bakteriyofajların Güvenirliği	17
BÖLÜM III MATERYAL METOT	23
3.1 Materyal	23
3.2 Metot	23
3.2.1 Faj stoklarının hazırlanması	23
3.2.2 Süt örneklerinin hazırlanması	23
3.2.3 Süt örneklerinin bakteriyofaj ve test bakterileri ile inokülasyonu	24
3.2.5 Bakteriyofaj titresinin belirlenmesi	24
3.2.6 İstatistiksel değerlendirme	25
BÖLÜM IV	26
4.1 BHI Besiyerinde Eco- ve STyph-Fajların Konakçı Bakterilerine Karşı Litik Aktiviteleri	26

4.2 UHT Sütte Eco- ve STyph-Fajların Konakçı Bakterilerine Karşı Litik Aktiviteleri.....	33
BÖLÜM V SONUÇLAR.....	43
KAYNAKLAR	45
ÖZGEÇMİŞ	54



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Bakteriyofajların doğada dağılımları.....	4
Çizelge 2.2. Bakteriyofajların sınıflandırılması ve temel özellikleri	8
Çizelge 4.1. Eco-fajlarının (10^9 pob/ml) buzdolabı sıcaklığında BHI sıvı besiyerine 10^3 kob/ml düzeyinde inokule edilen <i>E. coli</i> O157:H7 üzerine inhibitör etkisi	26
Çizelge 4.2. Eco-fajlarının (10^9 pob/ml) oda sıcaklığında BHI sıvı besiyerine 10^3 kob/ml düzeyinde inokule edilen <i>E. coli</i> O157:H7 üzerine inhibitör etkisi	27
Çizelge 4.3. STyph-fajlarının (10^9 pob/ml) buzdolabı sıcaklığında BHI sıvı besiyerine 10^3 kob/ml düzeyinde inokule edilen <i>S. Typhimurium</i> SRII üzerine inhibitör etkisi.....	27
Çizelge 4.4. STyph-fajlarının (10^9 pob/ml) oda sıcaklığında BHI sıvı besiyerine 10^3 kob/ml düzeyinde inokule edilen <i>S. Typhimurium</i> SRII üzerine inhibitör etkisi	27
Çizelge 4.5. Eco-fajlarının (10^9 pob/ml) buzdolabı sıcaklığında BHI sıvı besiyerine 10^6 kob/ml düzeyinde inokule edilen <i>E. coli</i> O157:H7 üzerine inhibitör etkisi	29
Çizelge 4.6. Eco-fajlarının (10^9 pob/ml) oda sıcaklığında BHI sıvı besiyerine 10^6 kob/ml düzeyinde inokule edilen <i>E. coli</i> O157:H7 üzerine inhibitör etkisi	29
Çizelge 4.7. STyph-fajlarının (10^9 pob/ml) buzdolabı sıcaklığında BHI sıvı besiyerine 10^6 kob/ml düzeyinde inokule edilen <i>S. Typhimurium</i> SRII üzerine inhibitör etkisi.....	32
Çizelge 4.8. STyph-fajlarının (10^9 pob/ml) oda sıcaklığında BHI sıvı besiyerine 10^6 kob/ml düzeyinde inokule edilen <i>S. Typhimurium</i> SRII üzerine inhibitör etkisi	32
Çizelge 4.9. Eco-fajlarının (10^9 pob/ml) buzdolabı sıcaklığında UHT süte 10^3 kob/ml düzeyinde inokule edilen <i>E. coli</i> O157:H7 üzerine inhibitör etkisi	34
Çizelge 4.10. Eco-fajlarının (10^9 pob/ml) oda sıcaklığında UHT süte 10^3 kob/ml düzeyinde inokule edilen <i>E. coli</i> O157:H7 üzerine inhibitör etkisi	34

Çizelge 4.11. STyph-fajlarının (10^9 pob/ml) buzdolabı sıcaklığında UHT süte 10^3 kob/ml düzeyinde inokule edilen <i>S. Typhimurium</i> SRII üzerine inhibitör etkisi	34
Çizelge 4.13 Eco-fajlarının (10^9 pob/ml) buzdolabı sıcaklığında UHT süte 10^6 kob/ml düzeyinde inokule edilen <i>E. coli</i> O157:H7 üzerine inhibitör etkisi	37
Çizelge 4.14. Eco-fajlarının (10^9 pob/ml) oda sıcaklığında UHT süte 10^6 kob/ml düzeyinde inokule edilen <i>E. coli</i> O157:H7 üzerine inhibitör etkisi	39
Çizelge 4.15. STyph-fajlarının (10^9 pob/ml) buzdolabı sıcaklığında UHT süte 10^6 kob/ml düzeyinde inokule edilen <i>S. Typhimurium</i> SRII üzerine inhibitör etkisi	40
Çizelge 4.16. STyph-fajlarının (10^9 pob/ml) oda sıcaklığında UHT süte 10^6 kob/ml düzeyinde inokule edilen <i>S. Typhimurium</i> SRII üzerine inhibitör etkisi.	42

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Bakteriyofaj tarihindeki önemli gelişmeler	6
Şekil 2.2. Bradley'e göre fajların sınıflandırılması	7
Şekil 2.3. Başlıca faj grupların şematik gösterimi	8
Şekil 2.4. Tipik bir bakteriyofajın yapısı	10
Şekil 2.5. Bakteriyofajlarda litik ve lizojenik hayat devri	12
Şekil 4.1. Eco-fajlarının (10^9 pob/ml) buzdolabı sıcaklığında 10^3 kob/ml düzeyinde <i>E. coli</i> O157:H7 inokule edilen BHI sıvı besiyerinde stabilitesi.....	28
Şekil 4.2. Eco-fajlarının (10^9 pob/ml) oda sıcaklığında 10^3 kob/ml düzeyinde <i>E. coli</i> O157:H7 inokule edilen BHI sıvı besiyerinde stabilitesi.....	28
Şekil 4.3. STyph-fajlarının (10^9 pob/ml) buzdolabı sıcaklığında 10^3 kob/ml düzeyinde <i>S. Typhimurium</i> SRII inokule edilen BHI sıvı besiyerinde stabilitesi	28
Şekil 4.5. Eco-fajlarının (10^9 pob/ml) buzdolabı sıcaklığında 10^6 kob/ml düzeyinde <i>E. coli</i> O157:H7 inokule edilen BHI sıvı besiyerinde stabilitesi.....	30
Şekil 4.6. Eco-fajlarının (10^9 pob/ml) oda sıcaklığında 10^6 kob/ml düzeyinde <i>E. coli</i> O157:H7 inokule edilen BHI sıvı besiyerinde stabilitesi.....	31
Şekil 4.7. STyph-fajlarının (10^9 pob/ml) buzdolabı sıcaklığında 10^6 kob/ml düzeyinde <i>S. Typhimurium</i> SRII inokule edilen BHI sıvı besiyerinde stabilitesi	32
Şekil 4.8. STyph-fajlarının (10^9 pob/ml) oda sıcaklığında 10^6 kob/ml düzeyinde <i>S. Typhimurium</i> SRII inokule edilen BHI sıvı besiyerinde stabilitesi.....	33
Şekil 4.9. Eco-fajlarının (10^9 pob/ml) buzdolabı sıcaklığında 10^3 kob/ml düzeyinde <i>E. coli</i> O157:H7 inokule edilen UHT süt stabilitesi	35
Şekil 4.10. Eco-fajlarının (10^9 pob/ml) oda sıcaklığında 10^3 kob/ml düzeyinde <i>E. coli</i> O157:H7 inokule edilen UHT süt stabilitesi	35
Şekil 4.11. STyph-fajlarının (10^9 pob/ml) buzdolabı sıcaklığında 10^3 kob/ml düzeyinde <i>S. Typhimurium</i> SRII inokule edilen UHT süt stabilitesi	36
Şekil 4.13. Eco-fajlarının (10^9 pob/ml) buzdolabı sıcaklığında 10^6 kob/ml düzeyinde <i>E. coli</i> O157:H7 inokule edilen UHT süt stabilitesi.....	37
Şekil 4.14. Eco-fajlarının (10^9 pob/ml) oda sıcaklığında 10^6 kob/ml düzeyinde <i>E. coli</i> O157:H7 inokule edilen UHT süt stabilitesi.....	39

Şekil 4.15. STyph-fajlarının (10^9 pob/ml) buzdolabı sıcaklığında 10^6 kob/ml düzeyinde <i>S. Typhimurium</i> SRII inokule edilen UHT süt stabilitesi.....	40
Şekil 4.16. STyph-fajlarının (10^9 pob/ml) oda sıcaklığında 10^6 kob/ml düzeyinde <i>S.</i> <i>Typhimurium</i> SRII inokule edilen UHT süt stabilitesi.....	42



SİMGE VE KISALTMALAR

Simgeler

Açıklama

μ	Mikron
kob/ml	Mililitrede koloni oluşturma
pob/ml	Mililitrede plak olurturma
nm	Nanometre
pob/g	Gramda plak olurturma
μm	Mikrometre

Kısaltmalar

Açıklamalar

<i>S. Typhimurium</i>	<i>Salmonella Typhimurium</i>
<i>E. coli</i> O157:H7	<i>Escherichia coli</i> O157:H7
STyph- faj	<i>Salmonella Typhimurium</i> Fajı
Eco- faj	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 Fajı
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
EHEC	Enterohemorojik <i>E. coli</i>
BHI	Brain Hearth Infusion
HACCP	Tehlike Analizleri ve Kritik Kontrol Noktaları
MOI	Çoklu Enfeksiyon Değeri

BÖLÜM I

GİRİŞ

Çiğ süt ve uygun koşullarda üretilmeyen süt ve süt ürünleri *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* gibi salgınlara neden olan patojen mikroorganizmalar içerebilmektedir (Small vd., 2003).

E. coli insan bağırsak sisteminde baskın olarak bulunan patojen olmayan fakültatif anaerobik florayı oluşturmaktadır. Ancak, bazı *E. coli* suşları gastrointestinal, idrar yolları, merkezi sinir sistemi hastalıklara ve sepsisemiye neden olabilmektedir. *E. coli* serotiplerinden patojenitesi en yüksek olan enterohemorajik (EHEC) grupta yer alan *E. coli* O157:H7'dir. EHEC gıda endüstrisinde en çok karşılaşılan mikrobiyolojik problemlerden birisidir. Çünkü bakteri çok düşük dozlarda insanlarda akut hastalıklara neden olabildiği gibi doğada da çok yaygın olarak (hayvanlar, toprak, su) bulunmaktadır. EHEC'nin ekolojisi tam olarak bilinmemesine karşın insanlardaki *E. coli* enfeksiyonlarının kaynağı hayvanlar, insanlar ve bulaşık gıdalardır (Bell, 2002). Gıdalarda EHEC'in kontrolü bu patojenin spesifik özelliklerinden dolayı kompleks bir problemdir. Isıl işleme duyarlılığı diğer enterobakterilere benzemesine karşın asidik pH'lara karşı oldukça toleranslı bir patojendir. EHEC açısından riskli gıdalar çiğ veya yeterli ısıl işlem uygulanmamış süt ve süt ürünleri, et ve et ürünleri ile elma suyudur (Jordan vd., 1999; Steele vd., 1982; Besser vd., 1993; Zhao vd., 1993; Mead vd., 1999).

Salmonella dünyada gıda kaynaklı hastalıklardan sorumlu olan diğer bir Gram-negatif patojen bakteridir. İnsanlar ve hayvanlar tarafından tüketildiğinde gıda kaynaklı hastalıklardan salmonellozise neden olmaktadır. Salmonellozisin belirtileri arasında mide bulantısı, kusma, karın krampları, ishal, ateş ve baş ağrısı bulunmaktadır. Semptomlar bulaşık gıda tüketildikten 6-48 saat sonra görülmeye başlamaktadır. İnsanlarda salmonellozis, organizma gastrointestinal bölgeyi geçip epitel dokuda inflamasyona neden olduğu zaman ortaya çıkmaktadır. *Salmonella*'nın 2600'den fazla serotipi bulunmaktadır. *Salmonella* Enteritidis ve *S. Typhimurium* insanlarda *Salmonella* salgınlara neden olan en önemli serovarlardır (Cormican vd., 2002). Amerika Birleşik Devletlerinde salmonellozisten yılda 600 kişinin öldüğü ve 1,4 milyon kişinin hastalandığı belirtilmektedir. Salgının temel kaynağının yapraklı yeşil bitkiler ve

domates ile kırmızı ve kanatlı et ürünlerinin olduğu belirtilmektedir (Mead vd., 1999; Wright vd., 2009; Coffey vd., 2010).

Verilen bilgilerden de anlaşılacağı üzere, *S. Typhimurium* ve *E. coli* O157:H7 doğada yaygın olarak bulunmakta olduğundan, düşük sıcaklıklarda gelişebilmekte olduğundan, gıda ve gıdanın temas ettiği yüzeylere tutunabilmekte olduklarından gıda endüstrisi için önemli sorunların kaynağı konumundadırlar.

Gıdaların mikrobiyolojik kalitesini iyileştirmek, güvenliğini arttırmak ve korumak için laktik asit bakterilerinin koruyucu kültür, bunların ürettikleri antimikrobiyal bileşiklerin koruyucu madde veya bakteriyofajların koruyucu bileşen olarak kullanılmasına biyokoruma denilmektedir. Biyokoruma yöntemleriyle gıdaların hem güvenliği hem de raf ömürleri arttırılabilmektedir. Son yıllarda gıda endüstrisinde bakteriyofajların biyokontrol aracı olarak kullanımıyla ilgili çalışmaların sayısı önemli ölçüde artış göstermiştir. Yapılan çalışmalarda fajların insan sağlığını olumsuz yönde etkilemeden ve gıdaların kimyasal, fiziksel ve duyuşsal özelliklerinde herhangi bir değişime neden olmadan gıda kaynaklı patojen ve bozulma etmeni bakterilerin kontrolünde oldukça etkin rol oynadıkları belirlenmiştir (Greer, 2005; Garcia vd., 2008; Coffey vd., 2010).

Laboratuvarımızda TÜBİTAK tarafından desteklenen proje kapsamında kanalizasyon, gıda işletme atık suları, mezbaha atık suları, dere, balık işletmeleri, yalak ve akarsudan *S. Typhimurium*'u enfekte eden 33 ve *E. coli* O157:H7'yi enfekte eden 37 faj izole edilip saflaştırılmıştır. İzole edilen *S. Typhimurium* fajlardan ve *E. coli* fajlardan inhibitör spektrumu en geniş ve litik aktivitesi en belirgin olan 4'er tane STyph-fajı ve 5 tane Eco-fajı seçilmiş ve karakterize edilmişlerdir. STyph-fajlarının genomunda *sefC*, *pefA*, *spvC*, *sopE* ve *gipA*; Eco-fajların genomunda ise *stx1* ve *stx2* virülant gen bölgelerinin olmadığı; Eco-fajların genom büyüklüklerinin 33 kb, STyph-fajların ise 30-33 kb olduğu belirlenmiştir. TEM analizi sonucunda fajların kuyruklu oldukları, Myoviridae ve Siphoviridae familyasında yer aldıkları görülmüştür. Eco-fajlarının çoklu enfeksiyon değeri (MOI) ve mutant sıklığı değerlerinin sırasıyla 0,1-0,001 ile 10^{-7} - 10^{-8} ; STyph-fajlarının ise 0,01-0,0001 ile 10^{-7} arasında değiştiği bulunmuştur. Eco-fajlarının latent ve patlama süreleri ile patlama sayılarının sırasıyla 10-15 dk, 20-35 dk ve 72-144 adet; STyph-fajlarının ise 10-20 dk, 25-30 dk ve 86-149 arasında değiştiği bulunmuştur. Fajların geniş pH aralığına ve yüksek sıcaklığa dayanıklı oldukları da belirlenmiştir. Fajların konakçı bakterilerine karşı 20, 30 ve 37°C'de oldukça enfektif

oldukları; inkübasyon işleminin ilk 5 dakikası içerisinde konakçı hücrelerine %94,4-99,8 oranında adsorbe oldukları ve ayrıca adsorpsiyonda Ca^{+2} iyonlarının önemli rol oynamadığı belirlenmiştir.

Projenin amacı *S. Typhimurium* ve *E. coli* O157:H7'ye karşı etkili olan ve karakterize edilen 4'er farklı STyph- ve 5 farklı Eco-bakteriyofajların spesifik konakçıları üzerindeki tek tek ve kombine virülant etkilerini hem brain hearth infusion (BHI) besiyeri hem de UHT süt ortamında saptayarak bakteriyofajların süt endüstrisinde biyokoruyucu olarak kullanım olanağını tespit etmektir.



BÖLÜM II

KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1 Bakteriyofaj

Bakteriyofajlar veya fajlar Dünya üzerinde en fazla bulunan mikroorganizmalardır (10^{31} parçacık) (Brüssow ve Kutter, 2005). Fajlara genellikle bakterilerin bulunduğu her yerde rastlanır. Dolayısıyla fajlar doğada oldukça yaygın olup deniz suyu, kanalizasyon, dere ve akarsu, kirli sular, termal sular, toprak, bitki, hayvan ve insan bağırsağı ile dışkı, gıdalar ve gıda işletmelerinde yüksek sayılarda bulunabilmektedirler (Mc Grath vd., 2007). Çizelge 2.1 fajların doğada dağılım durumları verilmiştir (Sharp, 2001). Bakteriyofajlar, bakterileri spesifik olarak enfekte eden ve bakterilerde çoğalan virüslerdir. Dolayısıyla, fajlar bakteri paraziti olduklarından (sadece bakterilerde çoğalabildiklerinden) insanlar, hayvanlar ve bitkiler için zararsızdırlar (Ackermann, 2007).

Çizelge 2.1. Bakteriyofajların doğada dağılımları

Ortam	Sayı
Deniz suyu	10^6-10^7 pob/cm ³
Toprak	10^7 pob/g
Kanalizasyon	10^6-10^7 pob/cm ³
Kanalizasyon (elektron mikroskobu)	10^8-10^{10} toplam faj partikül sayısı
İnsan feçesi	10^5-10^7 pob/cm ³

2.1.1 Bakteriyofajların tarihsel gelişimi ve yapılan araştırmalar

Bakteriyofajlar ile ilgili ilk bilimsel gözlemler, 1896 yılında M. Ernest Hankin tarafından yapılmış ve Hindistan'daki Ganj ve Jumma nehir sularında *Vibrio cholerae*'ye karşı faj kaynaklı antibakteriyel aktivite saptamıştır. Yapılan çalışmada M. Ernest Hankin *Vibrio cholerae*'nin Ganj Nehri suyunda öldüğünü, ancak su kaynatıldığında bu özelliğini kaybettiğini ve bu olaya canlı bir varlığın sebep olduğunu ileri sürmüştür (Kutter, 1997; Stone 2002; O'Flaherty vd., 2009).

Bakteriyofajlar İngiliz mikrobiyolog Frederick Twort ve Kanadalı Felix d'Herelle tarafından birbirinden bağımsız olarak 1915-1920 yılları arasında bakterileri öldürmeyi başarabilen bir canlı olarak keşfedilmiştir (Duck-Worth, 1976). O zaman bilinen ajanlardan daha güçlü olduğu için bakteriyofajlar araştırmacıların hemen ilgisini çekmiş ve bu alanda çalışmaların yoğunlaşmasına neden olmuştur (Fruciano ve Bourne, 2007).

Dünya çapında yürütülen ve hem terapötik hem de profilaktik ajanlar olarak kullanılan faj uygulamasının etkinliğini doğrulayan denemeler yapılmıştır. Hindistan'da yapılan bir araştırmada kolera salgınını kontrol etmek için geleneksel yöntemler olan potasyum permanganat ile aşılama ve su dezenfeksiyonu yöntemi uygulandığında salgının ortalama 26 günde kontrol altına alındığı fakat kontamine suya bakteriyofajlar ilave edildiğinde salgının 48 saatte kontrol altına alındığı belirtilmiştir. Penisilin antibiyotikinin keşfinden sonra bakteriyofajla ilgili yapılan araştırmalar azalmıştır. Ancak Londra'daki St. Mary's Hastanesi'nde yapılan araştırmalarda da penisilin fajla beraber kombine uygulandığında tedavi süresinin kısaldığı gözlenmiştir (Himmelweit, 1945).

Elektron mikroskopunun keşfiyle (1940) Alman fizikçi Max Delbruck'ın liderliğindeki Phage Grubu tarafından bakteriyofajların yapısını ve fizyolojisini anlamada önemli ilerleme sağlanmıştır (Summers, 1993).

Emory Ellis ve ekibi, d'Herelle'in "bakteriyofajlar zorunlu hücre içi parazitlerdir" iddiasını doğrularak "Tek Aşamalı Gelişme Kurvesi" adı verilen yöntemi geliştirmişlerdir. Böylece doğru, istatistiksel olarak geçerli ölçümlerle, bakteriyofaj büyüme sürecini, fajın bakteriye penetrasyonunu ve bakteriyofaj partiküllerinin bakteri hücresi içinde çoğalma ve gelişme sürecini elektron mikroskobu ile görselleştirmişlerdir. Böylece, faj çoğalması ve bakteriyel metabolizma arasındaki bağlantı kurulmuştur (Pennazio, 2006). Şekil 2.1'de faj tarihindeki önemli gelişmeler özetlenmiştir.



Şekil 2.1. Bakteriyofaj tarihindeki önemli gelişmeler (O'Flaherty vd., 2009)

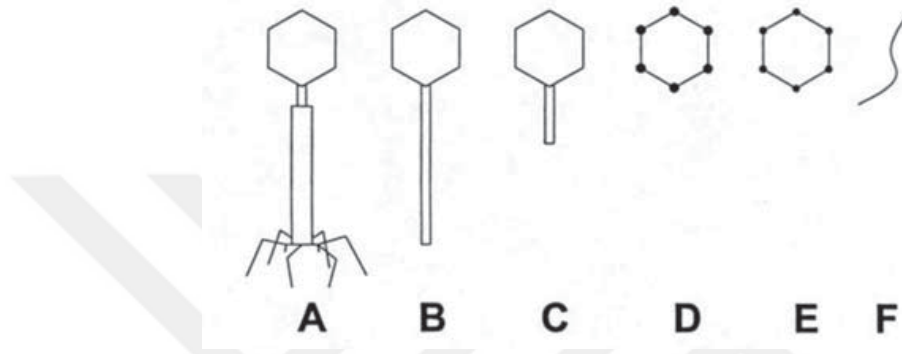
2.1.2 Fajların tanımlanması ve sınıflandırılması

Elektron mikroskopunun keşfiyle beraber fajların sınıflandırılması çalışmaları başlamış ve fajların ilk kez sınıflandırılması d'Hérelle tarafından yapılmıştır. d'Hérelle'ye göre fajlar, birçok ırktan oluşan tek bir faj grubu olarak sınıflandırılmıştır (d'Hérelle, 1918). Holmes (1948) ise fajları bir alt-sınıf, tek bir aile ve Virülans sınıfının tek bir cinsi olarak sınıflandırmıştır ve çalışma arkadaşlarıyla beraber morfoloji ve nükleik asit türüne dayanan virüs sınıflandırma sistemi geliştirdiler ve bu sisteme göre kuyruklu fajlar için Urovirales, filamentli fajlar için Inoviridae ailesi ve ϕ X tipi fajlar için Microviridae ailesini önermişlerdir (Lwoff vd. 1962).

Bradley (1967) tarafından yapılan sınıflandırma önemli bir dönüm noktası oluşturmaktadır. Bradley (1967), taşıdıkları nükleik asit tipine ve morfolojik yapılarına (baş ve kuyruk özelliklerine) göre fajları 6 basit tipe (A-F) ayırmıştır (Şekil 2.2):

- A tipi faj: Kasılabilen kılıflı, kuyruklu çift iplikli linear DNA fajlar
- B tipi faj: Uzun kuyruklu, kılıflı çift iplikli linear DNA fajlar

- C tipi faj: Kısa kuyruklu, kılıfsız çift iplikli linear DNA fajlar
 - D tipi faj: Kuyruksuz, büyük kapsomerli, tek iplikçi DNA fajlar
 - E tipi faj: Kuyruksuz, küçük kapsomerli, tek iplikçi RNA fajlar
 - F tipi faj: Başsız, ipliksi ya da filamentöz, tek iplikçi RNA fajlar
- A, B ve C tipi fajlar çift zincirli DNA, D tipi fajlar tek zincirli DNA, E ve F tipi fajlar ise tek zincirli RNA içerirler.



Şekil 2.2. Bradley'e göre fajların sınıflandırılması (Bradley, 1967)

Virüslerin sınıflandırılmasında temel olarak genomik materyalin yapısı dikkate alınmaktadır. Bakteriyofaj genomu ya tek zincirli ya da çift zincirli DNA veya RNA'dan oluşmakta ve genom büyüklükleri 4 ile 725 kb arasında değişmektedir (Sharp, 2001).

İlerleyen yıllarda fajların morfolojik özellikleri yanında nükleik asit yapılarının da dikkate alındığı "Ackermann Sınıflaması" olarak adlandırılan, diğer bir sınıflandırma modeli geliştirilmiştir (Ackermann, 2003). Bu modele göre fajlar dört yapısal gruba ayrılmış ve 1 takım, 13 aile ve 31 cins olarak tanımlanmıştır (Çizelge 2.2). Şekil 2.3'te başlıca faj gruplarının şematik gösterimi verilmiştir (Ackermann, 2003; Ackermann, 2007).

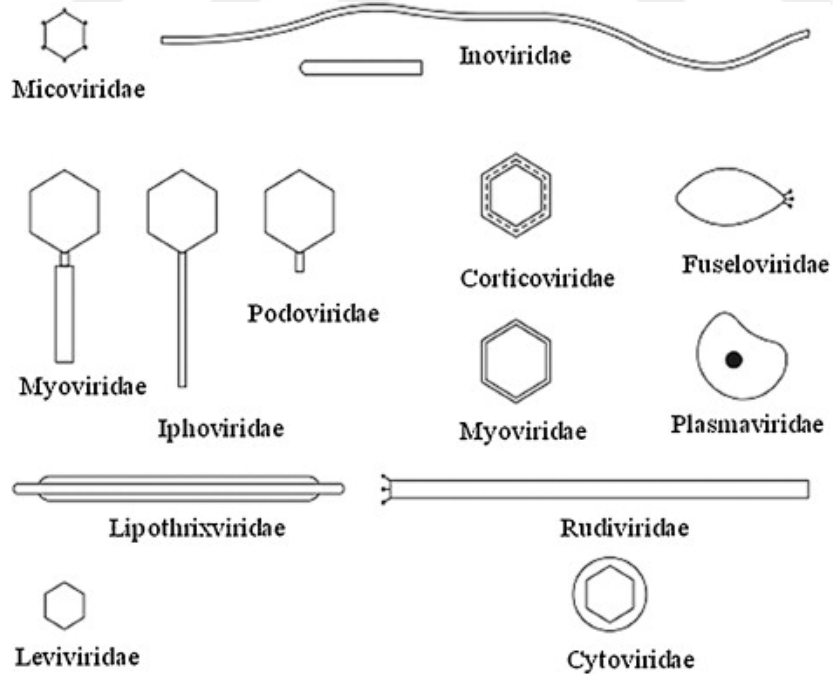
5500'den fazla fajın elektron mikroskopisi ile yapılan incelemede %96'sının kuyruklu ve Caudovirales takımında olduğu, %24,5'nun kontraktıl kuyruklu Myoviridae, %61'nin kontraktıl olmayan uzun kuyruklu Siphoviridae, %14'nün ise kısa kuyruklu Podoviridae familyasına ait olduğu tespit edilmiştir. Sadece %3,7'nin polihedral, ipliksi

veya pleomorfik olduğu belirtilmiştir (Ackermann, 2007).

Çizelge 2.2. Bakteriyofajların sınıflandırılması (Ackermann sınıflandırması) ve temel özellikleri (Ackermann, 2003; Ackermann, 2007)

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>Rudiviridae</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 formlu, kapsid yok

C, dairesel; L, linear; S, segmentli; T, süperhelikal; 1, tek zincirli; 2, çift zincirli.



Şekil 2.3. Başlıca faj gruplarının şematik gösterimi

Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi (ICTV, International Committee of Taxonomy of Viruses) fajları nükleik asit yapıları ve morfolojilerine göre 14 aileye ayırmıştır. Morfolojik özelliklerine göre tüm fajlar 20 morfortipte toplanmaktadır (Tunail, 2009).

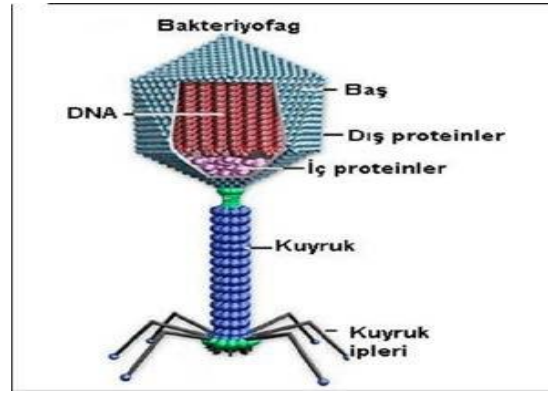
2.2 Bakteriyofajların Yapıları ve Çeşitleri

Kimyasal olarak protein ve nükleik asitten oluşan fajların bileşimi incelendiğinde %60'ı protein ve %40'ı nükleik asittir. Diğer bir ifadeyle bir faj partikülü temel olarak nükleik asit ve kapsit adı verilen protein kılıfından oluşmaktadır. Nükleik asit ya DNA ya da RNA'dır. İkisi birden fajlarda bulunmaz ve DNA/RNA nükleer membranla çevrili olmayıp kapsit ile çevrilidir. Ayrıca fajlarda DNA veya RNA çift veya tek sarmallı olabilmektedir. Fajların çoğunda nükleik asit olarak DNA bulunmaktadır (Ackermann ve Kropinsk, 2007).

Bakteriyofajların optimum gelişme sıcaklığı 37°C, optimum pH değerleri ise 6,0-6,5'tir. Bir fajın ağırlığı 5×10^{-13} gramdır. Fajlar, enerji üretebilecek hiçbir genetik bilgiye sahip olmadıklarından yaşamak ve çoğalmak için konak bakteriye gereksinim duymaktadırlar. Yapılarında lipit bulunmadığı için bakterileri hızla öldüren kloforma dayanıklıdır (Kılıç 2008).

Fajlar baş, boyun, kuyruk, taban ve taban uzantıları gibi kısımlardan oluşup, baş kısmı yumak şeklinde olup nükleik asit molekülünü barındırmaktadır. Nükleik asit molekülü ise kapsit protein kılıfı ile sarılmış durumdadır. Kapsit, prizma şeklinde olup birbirine benzer kapsomer adı verilen alt birimlerden oluşmaktadır (Ergüllü, 1982; Kılıç, 2010). Şekil 2.4' de tipik bir kuyruklu bakteriyofajın 2 ve 3 boyutlu yapısı görülmektedir.

Genellikle yüksek düzeyde konakçı-spesifik olup sadece spesifik türleri veya suşları enfekte etmektedirler. Fajların konakçı spesifliği, kuyruk kısmında bulunan ve duyarlı bakterilerin yüzey moleküllerini tanıyan proteinlerden kaynaklanmaktadır. Çok farklı şekil ve boyutta faj bulunmaktadır. Fajların büyüklükleri (uzunlukları) 24-200 nm arasında değişmektedir. En büyük faj T4 fajı olup yaklaşık 200 nm uzunluğunda ve 80-100 nm genişliğindedir. Diğer fajlar küçüktür (Ackermann ve Kropinsk, 2007; Ackermann, 2007; Regenmortel vd., 2000).



Şekil 2.4. Tipik bir bakteriyofajın yapısı (Anonim, 2010a)

Fajlar temel özelliklerine göre kuyruklu, polihedral, filamentöz ve pleomorfik fajlar olarak incenebilmektedir (Regenmortel vd., 2000).

Kuyruklu fajlar: 5000'e yakın üyesi ile bakteriyofajların %96'sını oluşturmaktadır. Nükleik asit olarak çift sarmallı DNA'ya sahiptirler. Bu DNA'yı saran kapside ve düz görünüşlü uzun veya kısa kuyruğa sahiptirler. Aynı zamanda, kuyruklu fajlar, DNA içeriği ve bileşimi, boyutları, ince yapısı ve fizyolojisinde aşırı derecede çeşitlilik göstermektedir. Örneğin, DNA boyutları 17 ile 700 kb, kuyruk uzunlukları 10 ile 800 nm arasında değişmekte ve kalınlığı 30 nm'dir (Ackermann, 2003). Kuyruk ucunda altıgen şeklinde olan bir taban levhası bulunmaktadır. Bu levhaya kuyruk dikenleri ve iplikçikleri yerleşmiş durumdadır. Taban levhasında genellikle 6 adet diken ve/veya 6 adet kuyruk iplikçigi yer almaktadır (Ergüllü, 1982; Kınık vd., 2000). Kuyruk kısmı bakteriyofajlarda tutunma veya adsorbsiyon organeli olarak görev yapmaktadır. Ayrıca genetik maddenin bakteriye transferinde bir kanal ya da köprü vazifesi de görmektedir. Kuyruk kılıfının kasılması sayesinde genetik madde kuyruk içerisinden bakteriye nakledilir (Ergüllü, 1982; Ackermann, 2003).

Kuyruklu fajlar üç aileye ayrılır: *Myoviridae*, *Siphoviridae* ve *Podoviridae*. *Myoviridae*'ler, kuyruklu fajların% 25'ini oluşturmakta ve kasılabilir kuyruğa sahiptirler. Kuyruklu fajların %61'ni oluşturan *Siphoviridae*, uzun kuyruğa; kuyruklu fajların %14'ünü oluşturan *Podoviridae*, kısa kuyruğa sahiptirler. *Myoviridae* ailesinde bulunan

fajlara örnek olarak T4, P1, P2, Mu, SPO1; *Siphoviridae* ailesinde bulunanlara T1, T5, L5, c2, ψ M; *Podoviridae* ailesinde bulunanlara T7, P22, ϕ 29 örnek olarak verilebilir (Ackermann, 2003).

Polihedral fajlar: DNA içeren ve DNA içermeyen olarak iki ana başlık altında toplanmaktadır. Polihedral fajlar içerisinde *Microviridae* (ssDNA), *Corticoviridae* (dsDNA), *Tectiviridae* (dsDNA), *Leviviridae* (ssRNA) ve *Cystoviridae* (dsRNA) bulunmaktadır.

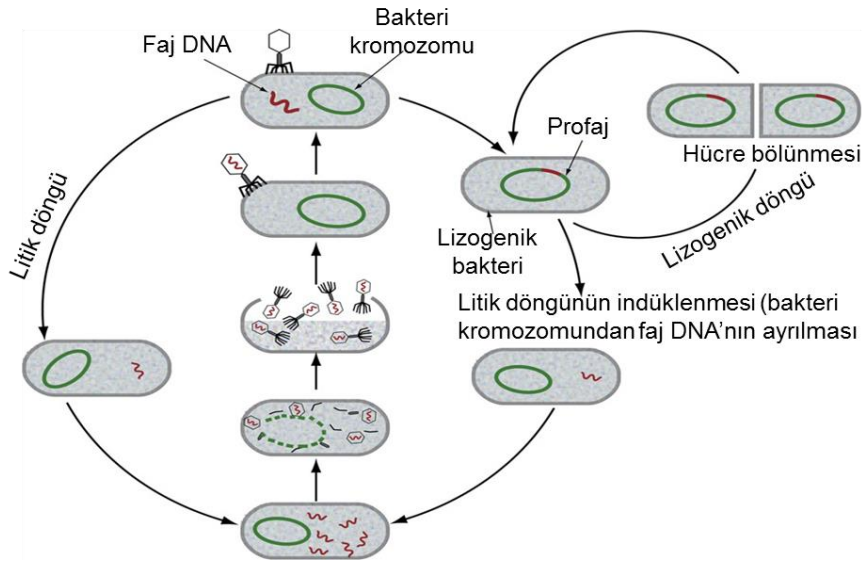
Pleomorfik fajlar: Bu grup içinde Plasmaviridae (dsDNA) ve Fuselloviridae (dsDNA) yer almaktadır (Ackermann, 2003).

2.3 Bakteriyofajların Yaşam Şekilleri

Bakteriyofajların litik (virülant) ve lizojenik (ılıman) olmak üzere iki tür yaşam şekilleri bulunmaktadır. Konak bakteri hücrelerini enfekte edip onları lize eden (parçalayan) fajlara virülant faj denilmektedir. Lizojenik yaşamda faj bakteriyi lize etmez, bakteri kromozomu ile birleşerek hücre içinde tutuklu kalır. Yani bakteri içinde faj çoğalması bakterinin canlılığını ve çoğalmasını olumsuz bir şekilde etkilemez. Bu yüzden bu tür fajlara bakterilerin yaşamlarını etkilemediği için temperate ya da ılımlı faj adı verilir. Bir bakteriyofajın yaşam şeklinin ne olacağı ise, operatör bölgesine bağlanan CRO ve CI proteinleri arasındaki önceliğe bağlıdır. CI proteini ile gerçekleşiyorsa lizojenik yaşam döngüsü, CRO proteini ile gerçekleşiyorsa litik yaşam döngüsü gerçekleşmektedir. Yani proteinlerden hangisi operatöre önce bağlanırsa, kendi sentezine başlar ve diğer proteinin sentezini yok eder (Hendrix, 2002; Guttman vd., 2005).

Litik ve lizojenik yaşam tiplerinde, fajın konak hücreye adsorbsiyonu ve DNA'sını enjekte etme (penetrasyon) aşamaları aynıdır (Şekil 2.5). Lizojenik hayat devri süren ılımlı fajlar, enfeksiyondan sonra konak hücre genomuna entegre olur ve profaj şeklini alır. Bu da konak hücrede bazı durumlarda fenotipik değişimlere ve hatta profaj virulent gen taşıyorsa bakteri patojenitesinin artmasına bile neden olabilmektedir (O'Brien vd., 1984; Guttman vd., 2005).

Litik fajların çoğalma evreleri adsorpsiyon, penetrasyon, biyosentez, olgunlaşma ve lizis aşamalarından oluşmaktadır (Şekil 2.5). Litik döngü, lizojenik döngüden ‘Latent Dönem’ olarak adlandırılan periyodun başlaması ile ayrılmaktadır (Hendrix, 2002). Litik hayat döngüsünde faj, bakteri hücre duvarına tutunduktan (adsorpsiyon) sonra nükleik asidini hücre içerisine enjekte eder. Bakteri yüzeyinde bulunan pilus, taykoik asit, flagella, lipoprotein, protein, lipopolisakkarit ve hücre duvarının diğer bazı bölgeleri faj adsorbsiyon noktaları ya da reseptörleridir. Adsorbsiyonun ilk basamağında bakteri yüzeyi ile faj arasındaki interaksiyon geri dönüşümlü iken zaman geçtikçe bu bağlanma kuvvetlenerek geri dönüşümsüz bir hale gelir. Faj, penetrasyon aşamasında genomunu konak hücreye enjekte eder. Biyosentez aşamasında faj, bakterinin metabolizmasını kullanarak kendi yapısal bileşenleri ile enzimlerini sentezler ve faja ait genom çoğalır. Olgunlaşma aşamasında ise ayrı ayrı sentezlenen bu yapı taşları bir araya gelerek olgun faj partikülleri meydana gelir. Bakteri içerisinde bol miktarda gelişen ve olgunlaşan fajlar belirli bir sayıya ulaştıktan sonra bakteriyi lize ederek serbest hale gelirler ve yeni bakterileri enfekte ederek hayat döngülerini devam ettirirler. Litik bakteriyofaja örnek olarak T4 fajı verilebilir (Şekil 2.5) (Hanlon, 2007; Sulakvelidze ve Kutter, 2005).



Şekil 2.5. Bakteriyofajlarda litik ve lizojenik hayat devri

Spesifik bir konak hücreye fajın başarıyla bağlanabilmesi, fajın ve faj reseptör yüzeyinin uyumu bir anahtar kilit ilişkisine benzetilebilmektedir. Fajların büyük

çoğunluğu, hücre duvarı üzerine sınırlı sayıdaki reseptörler ile adsorbe olurken, bazı fajlar tüm hücre yüzeyine homojen bir şekilde adsorbe olmaktadır (Kınık vd., 2000; Kılıç, 2008).

Lizojenik yaşam döngüde, ılıman faj, litik döngüde olduğu gibi konak hücreye adsorbe olduktan sonra nükleik asidini bakteri hücresinin içine enjekte etmektedir (Şekil 2.5). Faj genomu bakteri kromozomu ile birleşerek hücre içinde tutuklu kalmaktadır. Yani bakteri içinde faj çoğalması bakterinin canlılığını ve çoğalmasını etkilememektedir. Bakterilerin yaşamlarını etkilemedikleri için bu tür fajlara temperate ya da ılımlı faj adı verilmektedir. Lizojenik hayat döngüsünde bakteri canlılığını, üreme ve çoğalma yeteneğini kaybetmemektedir. DNA'sı ile bütünleşmiş faj taşıyan bakteriye lizogen bakteri, bu olaya lizogeni ve bağlanan faja da profaj adı verilir. Lizojenik bakteriler de diğer bakteriler gibi çoğalırlar ve hayati fonksiyonlarını devam ettirirler. Böylece bir lizojenik bakteriden iki yavru lizojenik bakteri meydana gelir (Şekil 2.5). Lizojenik faja örnek olarak lamda fajı verilebilir (Hogg, 2005; Kılıç, 2008). Lizojenik yaşam döngüsünde faj DNA'sının bakteri hücreğine girişiyle, CI proteinin üretimi başlamakta ve yeni faj parçalarının üretimi için gereken bilginin genom üzerinden okunması engellenmektedir. Sonuç olarak da, litik döngüye geçiş mümkün olamamaktadır (Birge, 2000). Profaj, konakçı bakteri DNA'sından aşağıdaki yollardan biri ile serbest kalarak virülant faj durumuna geçmektedir (Acar Soykut ve Tunail 2009a; Hogg, 2005; Kılıç, 2008):

a) Bakteri DNA'sına zarar veren uygulamalar:

- Radrasyon, UV ışığı ile muamele
- Reaktif oksijen radikaller,
- Antibiyotikler: Mitomisin C antibiyotiğinin düşükdozdaki

uygulamalarından sonra,

b) Bakterinin gelişme koşulların değişimi:

- İnkübasyon sıcaklığındaki değişim
- Besin maddelerinin azalması

Faj terapisi ve biyokoruyucu ajan olarak litik fajlar uygun olmasına karşın lizojenik fajlar uygun değildir (Prescott vd., 2005).

2.4 Fajların uygulama alanları

Fajların uygulama alanlarını dört başlık altında toplayabiliriz (Haq vd., 2012; Schmelcher ve Loessner, 2014; Garcia vd., 2008):

- a) Moleküler biyolojide model sistem olarak kullanılırlar: Rekombinant DNA teknolojisinde vektör olarak kullanılırlar ve böylece bakterilere istenilen genlerin ekspresyonu sağlanmış olmaktadır.
- b) Faj tiplendirme: Bakteri tanımlanmasında ve patojen bakterilerin gıdalarda olup olmadığının belirlenmesinde kullanılmaktadırlar.
- c) Faj terapisi: Hayvan ve insanlarda bakteriyel enfeksiyonlara karşı antibiyotiklere alternatif olarak önerilmektedir. Birçok çalışmada *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli*, *Vibrio cholera* ve *Staphylococcus* enfeksiyonlarında fajların etkili olduğu belirlenmiştir.
- d) Biyokoruyucu: Gıda kaynaklı patojen ve bozulma etmeni bakterilere karşı, gıda ekipmanların yüzey dekontaminasyonunda ve biyofilm oluşumunu engellemek amacıyla kullanılmaktadır. ListShield™ ve Listex™ -P100 (Intralytix Inc., USA) bir bakteriyofaj karışımı olup *Listeria monocytogenes*'e karşı etkilidir. FDA tarafından hazır tüketilen et ürünleri ve ambalaj materyallerinde kullanımına izin verilmiştir.

2.4.1 Bakteriyofajların biyokorucu olarak gıda endüstrisinde kullanımı

Modern teknolojilere, iyi üretim uygulamaları, iyi hijyen uygulamaları, kalite kontrol, risk değerlendirmesi ve HACCP gibi emniyet konseptlerine rağmen, son yıllarda bildirilen gıda kaynaklı hastalıkların ve zehirlenmelerin sayısı artmaktadır. Avrupa Birliği'nde (AB) en sık görülen gıda kaynaklı enfeksiyonlar; *Campylobacter*, *Salmonella* ve *Listeria* gibi bakterilerden ve virüslerden kaynaklanmaktadır. Gıda kaynaklı hastalıkların, her yıl 380.000 AB vatandaşını etkilediği bildirilmiştir (EFSA, 2009).

Patojen bakteriler, hasat/kesim, işleme, depolama veya paketlenme, sağım veya fermantasyon sırasında yiyeceklere bulaşabilmektedirler. Bakteriyel patojenlere karşı doğal biyolojik koruyucu olarak bakteriyofajlar, gıda ürünlerinin üretimden tüketime kadar güvenliğini sağlamak için kullanılabilir potansiyeline sahiptirler. Güvenli

olmaları, nispeten kolay kullanımları, kendi kendine replikasyon ve kendi kendini sınırlayan doğaları ve yüksek spesifik antimikrobiyal aktivite göstermeleri, fajları antibiyotiklere tercih ettiren bir alternatif oluşturmaktadır. Gıda güvenliği alanındaki bakteriyofajların kullanımı birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir. Faj biyokontrol yönteminin broyler tavuklarda ve tavuk ürünlerinin *Campylobacter* ve *Salmonella* ile kolonizasyonunu azaltmada etkili olduğu ifade edilmiştir (Atterbury vd., 2005; Martinez vd., 2008; Tabla vd., 2012; Bueno vd., 2012; Oliver et al., 2000).

“Tarlardan çatala” konsepti bakteriyel kontaminasyonun olabileceği tüm aşamalardaki (kritik kontrol noktalarında) kalite güvencesini kapsamaktadır. En sık rastlanılan gıda patojenleri *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Campylobacter* ve *Listeria*'dır (Douglas vd., 2008). Bakteriyofajlar tarladan çatala yaklaşımıyla gıda zincirinin her aşamasında patojenlere karşı biyokoruyucu/biyokontrol amacıyla kullanılabilir. Çiftlik hayvanlarında görülen hastalıkların önlenmesi/azaltılması (faj terapi), karkasların, taze meyve-sebze gibi çiğ ürünlerin dekontaminasyonu, alet-ekipman ve yüzeylerin dezenfeksiyonu (biyosanitasyon ve biyokontrol), hızlı bozulan gıdaların raf ömrünün uzatılması (biyokoruyucu) amacıyla uygulama alanları bulmuşlardır (Garcia vd., 2008). Bundan dolayı firmalar çeşitli patojenlerin fajlarını ticari olarak üretmeye başlamışlardır. Gıda endüstrisinde, EBI Food Safety firmasının ürettiği Listex™ P100 peynir ve et ürünlerinde *Listeria*'ya karşı kullanılmaktadır. FDA ise 2006 yılında hazır et ve tavuk ürünlerinde *Listeria*'ya karşı Intralytix firmasının LMP 102 ürününün kullanımını onaylamıştır (Carlton vd., 2005; Garcia vd., 2008). Bebek mamalarında salgınlara neden olan *Enterobacter sakazakii*'nin inhibisyonunun da faj kaynaklı biyokoruma yöntemleriyle sağlanabildiği belirtilmektedir (Kim vd., 2007).

Bakteriyofajlar çevrede çok fazla bulunduğu için ve üretimin mikrobiyal ekolojisini değiştirmeden, spesifik hedefleri olan gıda kaynaklı patojenlere karşı etkili bir şekilde kullanılabilirliği belirtilmektedir (Goodburn ve Wallace, 2012). Son yıllarda gıda endüstrisinde bakteriyofajların biyokontrol aracı olarak kullanımıyla ilgili çalışmaların sayısı önemli ölçüde artış göstermiştir. Yapılan çalışmalarda fajların insan sağlığını olumsuz yönde etkilemeden ve gıdaların kimyasal, fiziksel ve duyuşal özelliklerinde herhangi bir değişime neden olmadan gıda kaynaklı patojen ve bozulma etmeni bakterilerin kontrolünde oldukça etkin rol oynadıkları belirlenmiştir (Greer, 2005; Garcia vd., 2008; Coffey vd., 2010).

Bakteriyofajlar, gıda kontaminasyonunun bir göstergesi olarak kullanılacakları gibi gıda güvenliğini sağlamak için patojenlere karşı (biyolojik kontrol) bir araç olarak da kullanılabilirler. Bununla birlikte, gıda güvenliğindeki fajların geleceği; sıkı düzenlemeler ve herhangi bir faj ürününe herhangi bir onay verilmeden önce daha fazla klinik çalışmaya ihtiyaç duyulduğundan, bu bağlamda birçok engel oluşturabilir. Ayrıca çiftçinin ve genel halkın faj kullanımının güvenliği ve imkânı konusunda da aydınlatılması gerekmektedir (EFSA, 2009).

2.5 Gıda Endüstrisinde Kullanılacak Fajlarda Aranacak Özellikler

Genel olarak fajların güvenli olması, bütün fajların patojenik bakterilerin biyokontrolünde kullanımına uygundur anlamına gelmemelidir. Bunun nedeni litik fajların aksine, temperate fajların çoğunlukla konakçıları öldürmemeleri, çoğu durumda bakteriyel kromozoma entegre olmalarıdır. Böylece enfekte ettikleri konakçının fenotipinde değişime neden olurlar. Çoğu lizojenik faj genleri bakteride sessiz mutanta neden olmasına karşın fajlar moron genler (bağımsız olarak transkrip olabilen) de içerebildiklerinden bakteride fenotipik değişime neden olabilir ve hatta bazen konakçının virülans veya patojenitesinde artmaya da neden olabilmektedirler (Hagens ve Loessner, 2010). Lizojenik dönüşümle patojenitesi artan bakterilere örnek olarak *Vibrio cholerae* verilebilir. Kolera toksini CTX Φ fajında bulunan *ctxA* ve *ctxB* genleri tarafından kodlanmaktadır (Waldor ve Mekalanos, 1996). Diğer bir örnek ise Shiga-benzeri toksin (STX) üreten *E. coli* verilebilir. STX konakçı genomuna entegre olan fajın *stx1* ve *stx2* genleri tarafından kodlanmaktadır (O'Brien vd., 1984). Lizojenik durum dışında göz önünde bulundurulması gereken diğer bir husus genleşmiş transduksiyon yapabilen fajlardır. Genleşmiş transdüksiyonda faj başına, faj DNA'sı yerine bakteri DNA'sının bir parçası girmekte ve paketlenmektedir. Oluşan fajlar halen hedef bakteriyi tanımakta, tutunmakta ve viral olmayan DNA'yı alıcı bakteri genomuna rekombine edebilme ve bakteriye yeni genler aktarabilme yeteneğine sahip olabilmektedirler. Bakteriye entegre edilen gene bağlı olarak bu rekombinasyon işlemi zararlı veya zararsız olabilir. Aktarılan gen virülansa neden olan bir ürün kodluyorsa bu durumda patojen olmayan bakteri patojenik bir bakteriye dönüşebilmektedir (Ikeda ve Tomizawa, 1965). Bu bilgiler ışığında gıda endüstrisinde gıda kaynaklı patojen bakterilere karşı biyokoruma amacıyla kullanılacak bakteriyofajların aşağıda belirtilen özelliklere sahip olmaları gerekmektedir (Hagens ve Loessner, 2010).

- a) İnhibitör spektrumu geniş olmalı. Diğer bir ifade ile aynı tür veya cins'te bulunan tüm bakteriler üzerinde etkili olmalı
- b) Litik (virülant) olmalı
- c) Patojen olmayan suşların çoğalmasını sağlamalı
- d) Tam genom dizisi bilinmeli
- e) Viral olmayan DNA'yı (örneğin bakteri DNA parçası) transdüksiyonla aktarma mekanizmasından yoksun olmalı
- f) Alerjiye veya patojeniteye neden olan proteinleri kodlayan genlerden yoksun olmalı
- g) Ağızdan alımla ilgili yapılan çalışmalarda herhangi bir yan etki göstermemeli
- h) GRAS statüsünde olmalı
- i) Gıda işleme aşamalarına ve depolamaya dayanıklı olmalı
- j) Ticari boyutta üretimi mümkün olmalı

2.6 Bakteriyofajların Güvenirliği

Fajların konakçı hücrelerini tanımları çok spesifik olduğundan hedef bakteriler haricinde diğer bakterilere ve hücrelere karşı etkili değildirler. Eldeki mevcut tüm deliller yüksek konsantrasyonda oral yolla tüketilmelerinde dahi insanlara zararsız olduklarını veya toksik etkili olmadıklarını göstermektedir. Tıbbi olarak fajların kullanımı sonucunda herhangi bir yan etkiye neden olmadığı spesifik araştırmalarla da ortaya konulmuştur. Fajlar eski Sovyetler Birliği'nde insanlarda bakteriyel enfeksiyonları tedavi etmek için yaygın şekilde kullanılmışlardır. Araştırmalar sonucunda hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilerin neden olduğu bulaşıcı hastalıkların klinik tedavisi veya profilaksisi için uygun oldukları ortaya konmuş ve bu insanlarda faj kaynaklı herhangi bir olumsuz etkiyle karşılaşılmamıştır (Hanlon, 2007; Sulakvelidze ve Kutter, 2005). Ayrıca tavşanlara yüksek dozlarda *Listeria* fajı içeren Listex P100 verildiğinde de herhangi bir yan etkiyle karşılaşılmamıştır (Hagens ve Loessner, 2010; Carlton vd., 2005). Gönüllü insanlar üzerinde yapılan bir çalışmada ise *E. coli*'yi enfekte eden T4 kolifajı 10^5 pob/mL düzeyinde içme suyuna ilave edilerek kullanıldığında hiçbir yan etkinin oluşmadığı gözlenmiştir (Bruttin ve Brussow, 2005).

Fajların güvenli olduğunu kanıtlayan diğer bir delil ise doğada ve özellikle gıdalarda, sindirim sistemimizde ve sularda yaygın olarak bulunmaları gösterilebilir. Deniz

sularında mililitrede 10^7 - 10^9 pob/g düzeyinde fajın bulunduğu belirtilmektedir (Hagens ve Loessner, 2010). Bakteriyofajlar direkt olarak bakterilerle ilişkili olduğundan çok ekstrem koşullarda işlem görmemiş tüm gıdalar faj içerebilmektedir. Fermente gıdalar ve taze sebzeler incelediğinde, bakteriyofajlarca hayli zengin olduğu görülmektedir.

Fermente gıdalar daha çok fermantasyon işlemini gerçekleştiren bakteriler üzerinde etkili olan fajlar açısından oldukça zengindirler. Süt ürünleri incelendiğinde, peynir ve peyniraltı suyunun bakteriyofaj açısından iyi bir kaynak olduğu görülmektedir. İsveç Emmental peynirinde *Propionibacterium freudenreichii*'yi enfekte eden fajların düzeyinin 7×10^5 pob/g (Gautier vd., 1995), Arjantin süt ürünlerinde ise faj düzeyinin 10^9 pob/g olduğu belirtilmiştir (Suarez vd., 2002). Fermente edilmeyen gıdalarda da fajların bulunması en önemli hususu oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalarda *E. coli* fajlarının taze tavuk, domuz, sığır eti, mantar, marul, çiğ sebzeler ve hazır gıdalarda yaklaşık 10^4 pob/g düzeyinde bulunduğu bildirmiştir (Allwood vd., 2004). Verilen bilgilerden de anlaşılacağı gibi yediğimiz gıdalarla her gün çok fazla miktarda faj tüketmekteyiz. Dolayısıyla fajların güvenle tüketilebilir ve GRAS statüsünü alabilir nitelikte oldukları görülmektedir (Hagens ve Loessner, 2010).

2.7 S. Typhimurium ve E. coli O157:H7'nin Süt Endüstrisindeki Önemi

Çiğ süt ve uygun koşullarda üretilmeyen süt ve süt ürünleri *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* gibi salgınlara neden olan patojen mikroorganizmalar içermektedir (Small vd., 2003).

Salmonella dünyada gıda kaynaklı hastalıklardan sorumlu başlıca patojen bakterilerden biridir. *Salmonella*'nın 2600'den fazla serotipi bulunmaktadır. *Salmonella Enteritidis* ve *S. Typhimurium* insanlarda salmonella salgınlara neden olan en önemli serovarlardır (Bell ve Kyriakides, 2002; Cormican vd., 2002). *Salmonella* insanlarda üç farklı hastalığa neden olmaktadır: enterik humma (tifo ve paratifo), salmonellozis (akut gastroenterit, enterokolit) ve bakteremiye (sepsis). Salmonellozis bir tür akut bağırsak enfeksiyonu olup Avrupa ülkelerinde gıda kaynaklı hastalıklar içerisinde campylobacteriosis'ten sonra ikinci sırada yer almaktadır. Salmonellozise neden olan en önemli serovarlar *S. Typhimurium* ve *S. Enteritidis*'tir. Salmonellozisin inkübasyon süresi 12-24 saat arasında değişmektedir. Enfektif dozu tüketici yaşı ve herhangi bir

hastalığa sahip olup olmamasına, serotipe ve fizyolojik şartlara bağlı olarak $1-10^9$ kob/g arasında değişebilmektedir. Yetişkin kişilerde hastalık oluşturması için gerekli enfektif doz 10^5-10^{10} kob/g'dır. Bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde de enfektif doz oldukça düşüktür. Semptomlar bulaşık gıda tüketildikten 6 ile 48 saat sonra görülmeye başlamaktadır. İnsanlarda salmonellozis, *S. Typhimurium* gastrointestinal bölgeyi geçip epitel dokuda enflamasyona neden olduğu zaman ortaya çıkmaktadır (Cormican vd., 2002; Coffey vd., 2010; Yıldırım vd., 2016). Amerika Birleşik Devletlerinde salmonellosisten yılda 600 kişinin öldüğü ve 1,4 milyon kişinin hastalandığı belirtilmektedir. Salgının temel kaynağının yapraklı yeşil bitkiler ve domates ile kırmızı ve kanatlı et ürünlerinin olduğu belirtilmektedir (Mead vd., 1999; Wright vd., 2009; Coffey vd., 2010).

E. coli, hem insanda hem de hayvan bağırsağında baskın olarak bulunan, patojen olmayan fakültatif anaerobik florayı oluşturan Gram-negatif bakterilerden biridir. Genellikle, *E. coli* suşları konukçularına zararsızdırlar. Bununla birlikte, insanlarda ve hayvanlarda hastalıklara neden olan patojenik suşlar da bulunmaktadır. Bu suşlar virülans faktörlerine göre gruplandırılmıştır. Patojen gruplar; Enteropatojenik (EPEC), enteroinvasif (EIEC), enterotoksijenik (ETEC), enterohemorrajik (EHEC), diffüz aderans (DAEC) ve enteroagregatif (EAggEC)'dir (Bhunja, 2008; Hartland ve Leong, 2013; Kaper vd., 2004; Willshaw vd., 2000). EHEC enfeksiyonunun ölüm oranı (mortalitesi) diğer *E. coli* enfeksiyonlarına kıyasla daha yüksektir (Hagens ve Loessner, 2010).

EHEC grubunda yer alan *E. coli* serovarlarının en karakteristik özellikleri şiddetli kanlı ishale (hemorajik kolit) neden olmalarıdır. Patojeniteleri ürettikleri Shiga benzeri toksinlerden kaynaklandığı için bu gruba Shiga-toksin üretici *E. coli* (STEC)'de denilmektedir. EHEC grubu içinde yer alan en önemli serovar *E. coli* O157:H7'dir. *E. coli* O157:H7 çok düşük dozlarda insanlarda akut hastalıklara neden olabildiği gibi doğada da çok yaygın olarak (hayvanlar, toprak, su) bulunduğundan gıda endüstrisinde en çok karşılaşılan mikrobiyolojik sorunlardan birisidir. Ekolojisi tam olarak bilinmemesine karşın insanlardaki *E. coli* O157:H7 enfeksiyonların kaynağı hayvanlar, insanlar ve bulaşık gıdalardır. EHEC'in enfektif dozu 10-100 kob/g'dır. Gıdalarda *E. coli* O157:H7'nin kontrolü bu patojenin spesifik özelliklerinden (asidik pH'lara karşı toleranslı, buzdolabı sıcaklığında gelişebilmekte) dolayı oldukça zordur (Bell, 2002;

Yıldırım vd., 2016). EHEC açısından riskli gıdalar çiğ veya yeterli ısıl işlem uygulanmamış süt ve süt ürünleri, et ve et ürünleri ile elma suyudur (Steele vd., 1982; Besser vd., 1993; Zhao vd., 1993; Jordan vd., 1999; Mead vd., 1999).

E. coli O157:H7 insanlarda hemorajik kolit (bağırsak enfeksiyonu), hemolitik üremik sendrom (böbrek yetmezliği, HUS) ve nörolojik bir hastalık olan trombotik trombositopenik purpura gibi ciddi hastalılara neden olmaktadır. Küçük çocuklarda gözlenen ve sık rastlanan hemolitik üremik sendromda ölümcül sonuçlar doğurabilmektedir (Bell, 2002; O'Flynn vd., 2004).

2.8 S. Typhimurium ve E. coli O157:H7'nin Bakteriyofajlar Aracılığıyla Kontrolü ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Gıda kaynaklı hastalıkların başlıca etmenlerinden birisi olan *Salmonella*'nın fajlar vasıtasıyla biyokontrolü amacıyla *in vivo* ve *in vitro* (gıda sistemleri) çalışmalar yapılmıştır. Tavuk eti ve ürünlerinde yapılan çalışmalarda, litik bakteriyofajlar tavuk derisine çoklu enfeksiyon değeri (MOI) 1 olacak şekilde uygulandığında *S. Enteritidis* sayısında yaklaşık 1 log'luk; MOI değeri 100-1000 olacak şekilde uygulandığında patojen bakterilerin sayısında çok hızlı bir şekilde öyle ki 48 saat içinde 2 log'luk azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (Goode vd., 2003). Uygulanan bakteri düzeyi 2 log ve faj konsantrasyonu 10^5 olduğunda *Salmonella* sayısını tespit edilemeyecek seviyenin altına düşürdüğü ve depolama süresince de bakterinin tespit edilmediği belirtilmiştir.

S. Enteritidis ile kontamine edilmiş (10^3 log) hindi karkaslarının $5,5 \cdot 10^8$ veya 10^{10} pob düzeyinde PHL 4 faj ile muamele edilmesi sonucunda, *Salmonella* sayısının tespit edilmeyecek düzeye düştüğü bildirilmiştir (Higgins vd., 2005).

Cheddar peyniri üretiminde SJ2 fajı starter kültürü ile birlikte *Salmonella* ile kontamine edilmiş süte uygulandığında birkaç aylık depolama sonunda *Salmonella* sayısının tespit edilemeyecek düzeye indiği, faj içermeyen kontrol örneğinde ise *Salmonella* sayının arttığı tespit edilmiştir (Modi vd., 2001). Fiorentin vd., (2005) tavuk derisine inoküle edilen *Salmonella* fajlarının *Salmonella* sayısını önemli ölçüde azalttığını belirtmişlerdir.

Tavuk göğsü ve pastörize tam yağlı sütte *S. Enteritis*'e karşı PA13076 and PC2184 fajlarının inhibör etkilerini belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada, gıda örnekleri 1×10^4 kob/ml düzeyinde *S. Enteritis* ATCC13076 and CVCC2184 serovarları ile tek tek ve kombine olarak kontamine edilmişlerdir. Daha sonra tavuk göğsü ve süt örneklerine PA13076 and PC2184 fajları ile tek tek ve kokteyl olarak 1×10^8 pob/ml düzeyinde uygulanmış, 4 °C ve 25 °C de 5 saat inkübasyon işlemine tabi tutulmuşlardır. Araştırma sonucunda fajların stabilitelerini sütte korudukları ve fajların hem tek başlarına hem de kombine olarak süte uygulandıklarında *S. Enteritis* sayısını düşürdükleri belirtilmiştir. Ancak PC2184 fajının inhibitör etkisinin PA13076 fajına göre daha fazla olduğu, PC2184 fajının pastörize sütte *S. Enteritis* sayısında yaklaşık 4 log'luk azalmaya neden olurken, A13076 fajının yaklaşık 1,5-2,0 log'luk azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (Bao vd., 2015).

Farklı gıdalarda (hindi eti, çikolatalı süt, sosis, deniz mahsülleri ve yumurta sarısı gibi) gerçekleştirilen çalışmalarda bakteriyofajların *Salmonella* sayısını belirlenemeyecek seviyenin altına düşürdüğü ortaya konmuştur (Guenther vd., 2012).

Bakteriyofajların biyokontrol ajanı olarak kullanımı ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda, *E.coli* O157:H7 sayısını etkili bir şekilde azalttığı belirtilmiştir (Abuladze vd., 2008).

Yapılan bir çalışmada EcoM-AG2, EcoM-AG3 ve EcoM-AG10 *E. coli* bakteriyofajları kokteyl şeklinde *E. coli* O126:H7'ye karşı yağsız sütte uygulandığında *E. coli* hücre sayısında 4, 10 ve 25°C'de gerçekleştirilen depolama işleminin sonunda (15 gün) sırasıyla 1,2, 1,0 ve 8,3 log'luk azalmaya neden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca kokteyl halinde uygulanan fajların her üç depolama sıcaklığında sütte stabilitelerini korudukları belirtilmiştir. Ancak, test edilen bakteriyofajların *E. coli* O126:H7'ye karşı enfektif etkilerinin 4°C ve 10°C'ye göre 25°C'de daha yüksek olduğu ve depolamanın 1'inci gününden itibaren 25°C koşullarında *E. coli* hücre sayısının tespit edilemeyecek seviyenin altına düşürdüğü ifade edilmiştir (Tolba vd., 2014).

Fajlar gıdalara direkt olarak uygulandığı gibi gıdaya karıştırılarak da uygulanabilmektedir. Yapılan bir çalışmada üç farklı fajın karışımı 10^3 kob/g *E. coli* O157:H7 ile inoküle edilen ete uygulandığında, 37°C'de muhafaza edilen et örneklerin

7'sinde söz konusu bakterinin tespit edilemediği, 2 örnekte ise bakterinin 10 kob/g düzeyinde bulunduğu görülmüştür (O'Flynn vd., 2004).

O'Flaherty vd. (2005) tarafından yapılan bir çalışmada, bakteriyofaj ısıtma işlemi uygulanmış süte uygulandığında *Staphylococcus aureus* sayısında 6 log'luk azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. Garcia vd. (2007) tarafından gerçekleştirilen başka bir çalışmada, *S. aureus* ile kontamine edilen UHT süte bakteriyofaj 88 ve 35'i uygulandığında *S. aureus* sayısında 3,5 log'luk azalma meydana geldiğini bulmuşlardır.



BÖLÜM III

MATERYAL METOT

3.1 Materyal

Araştırmada kullanılan UHT inek sütü Niğde'deki marketten, bakteriyofaj ise Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nden temin edilmiştir.

Bu çalışmada, TÜBİTAK tarafından desteklenen 213O035 numaralı proje kapsamında izole edilen ve tanımlanan *Salmonella* Typhimurium SR-II ve *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 35150'ye karşı etkili STyph-F1, F2, F3 ve F4 ile Eco-F1, F2, F3, F4 ve F5 kodlu fajlar kullanılmıştır. *S. Typhimurium* ve *E. coli* O157:H7 serotipleri % 20 gliserol içeren brain hearth infusion (BHI) besiyerinde -80°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2 Metot

3.2.1 Faj stoklarının hazırlanması

Yüksek sayıda faj elde etmek amacıyla saflaştırılan faj örneklerinden 0,1 ml alınıp 1:100 oranında aktif konakçı bakteri içeren BHI besiyeri içerisine ilave edilmiş ve faj sayısının artması için gece boyunca çalkalamalı inkübatörde 35-37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon işlemi takiben kültür 0,45 ve 0,22 µm gözenek çaplı steril membran filtrelerden geçirilmiştir. Yüksek sayıda faj içeren filtrat hemen kullanılacak ise 4°C'de, uzun süre muhafaza edilecek ise %30 gliserol içeren SM tamponu içinde -80°C'de muhafaza edilmiştir (Kocharunchitt vd., 2009). Hazırlanan örneklerdeki faj sayısı çift tabaka plak agar metodu ile belirlenmiş ve sonuçlar mililitredeki plak oluşturma birimi (pob/ml) şeklinde ifade edilmiştir (Adams, 1959).

3.2.2 Süt örneklerinin hazırlanması

Çalışmada gıda maddesi olarak kullanılan tam yağlı UHT sütler Niğde'deki bir marketten temin edilmiş ve analize başlanıncaya kadar buzdolabı koşullarında muhafaza edilmiştir.

3.2.3 Süt örneklerinin bakteriyofaj ve test bakterileri ile inokülasyonu

Oda sıcaklığı ve buzdolabı sıcaklığında steril şişede bulunan tam yağlı UHT sütler *S. Typhimurium* ve *E. coli* O157:H7 ile iki farklı düzeyde (yaklaşık 10^3 ve 10^6 kob/ml düzeyinde) inoküle edilmiştir. Her bir süt örneği 12 ve 13 eşit kısma bölünerek (4 farklı faj, 1 faj karışımı, 1 konakçı kontrol, 5 faj kontrol ve 1 süt kontrol) ve bakterilerin ortama adapte olmaları için 20 dk bekletilmiştir. Hazırlanan süt örneklerine bakteriyofajlar tek tek ve kombine olarak ilave edildikten sonra oda ve buzdolabı sıcaklığında ayrı ayrı muhafaza edilmiştir. Enfektif bakteriyofaj konsantrasyonu 10^8 - 10^9 pob/ml düzeyinde kullanılmıştır. Depolamanın belirli sürelerinde örnekler alınıp hem bakteri sayımı hem de faj titresi belirlenmiştir. Kontrol örneği olarak katkısız, sadece konakçı hücre içeren ve sadece faj içeren süt örnekleri kullanılmıştır. Ayrıca aynı bakteriyofajların BHI besiyerinde *S. Typhimurium* ve *E. coli* O157:H7 üzerindeki inhibitör etkileri de belirlenmiştir.

3.2.4 *S. Typhimurium* ve *E. coli* O157:H7 sayımı

Buzdolabı (4-5°C) ve oda sıcaklığında muhafaza edilen süt örneklerinden depolamanın belirli sürelerinde örnekler alınıp mikrobiyolojik analizler yapılmıştır. *E. coli* O157:H7 sayımı 35-37°C'de 24-48 saat Sorbitol MacConkey (SMAC) agar, *S. Typhimurium* sayımı ise 35-37°C'de 24-48 saat Salmonella-Shigella (SS) agar kullanılarak yapılmıştır.

3.2.5 Bakteriyofaj titresinin belirlenmesi

Faj titresinin belirlenmesinde çift tabaka plak agar metodu kullanılmıştır. Bu amaçla depolamanın belirli periyodlarında alınan örneklerden dilüsyonlar hazırlanmıştır. Dilüsyonlardan alınan 100 µl'lik hacim, konakçı hücre içeren (300 µl) 45-50°C'deki BHI yumuşak agara ilave edilip karıştırıldıktan sonra katılaşmış BHI agar içeren petrilerin üzerine yayılmıştır. İnkübasyon işleminden (35-37°C'de 24-48 saat) sonra plak sayımı yapılmış ve faj titresi plak oluşturma birimi (pob/ml) şeklinde ifade edilmiştir (Adams, 1959).

3.2.6 İstatiksel değerlendirme

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



BÖLÜM IV

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1 BHI Besiyerinde Eco- ve STyph-Fajların Konakçı Bakterilerine Karşı Litik Aktiviteleri

Sıvı besiyerinde Eco- ve STyph-fajlarının konak bakterilerine karşı litik aktivitelerini belirlemek amacıyla yapılan çalışmada 10^3 ve 10^6 kob/ml düzeyinde *E. coli* O157:H7 ATCC 35150 ve *S. Typhimurium* SRII inokule edilen BHI besiyerlerine 10^9 pob/ml dozda Eco- ve STyph-fajları ilave edilmiş ve hem buzdolabı hem de oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir. Örneklerde oda sıcaklığında 24 °C ve buzdolabı koşulları 4 °C de depolama işlemi gerçekleştirilmiştir.

Buzdolabı ve oda sıcaklığında muhafaza edilen bakteri düzeyi 10^3 kob/ml ve faj içeriği 10^9 pob/ml olan örneklerde Eco- ve STyph-fajların konakçı hücre sayısını depolamanın 1'inci gününden itibaren tespit edilemeyecek seviyenin altına düşürdüğü belirlenmiştir (Çizelge 4.1-4.4) ($p < 0,01$). Söz konusu örneklerde bakteri hücre sayısında depolama işlemi süresince önemli bir değişimin olmadığı saptanmıştır ($p > 0,05$). Eco- ve STyph-faj sayılarının depolamanın birinci gününde biraz arttığı ve 8 günlük depolama süresince stabilitelelerini muhafaza ettikleri gözlenmiştir ($p > 0,05$) (Şekil 4.1-4.4). Bakteriyofaj içermeyen kontrol örneklerinde ise *E. coli* O157:H7 (Çizelge 4.1 ve 4.2) ve *S. Typhimurium* sayısında (Çizelge 4.3 ve 4.4) depolama süresince düşük düzeyde bir artış ($p > 0,05$) meydana geldiği bulunmuştur.

Çizelge 4.1. Eco-fajlarının (10^9 pob/ml) buzdolabı sıcaklığında BHI sıvı besiyerine 10^3 kob/ml düzeyinde inokule edilen *E. coli* O157:H7 üzerine inhibitör etkisi

Örnek	Depolama Süresi (Gün)				
	0	1	3	5	8
Eco-F1	3,35±0,14	1>	1>	1>	1>
Eco-F2	3,32±0,17	1>	1>	1>	1>
Eco-F3	3,27±0,09	1>	1>	1>	1>
Eco-F4	3,25±0,11	1>	1>	1>	1>
Eco-F5	3,30±0,13	1>	1>	1>	1>
Kokteyl	3,24±0,08	1>	1>	1>	1>
EC*	3,28±0,16	3,33±0,28	3,45±0,11	3,51±0,26	3,62±0,32

EC*, sadece *E. coli* O157:H7 içeren örnek, kontrol örneği.

Çizelge 4.2. Eco-fajlarının (10^9 pob/ml) oda sıcaklığında BHI sıvı besiyerine 10^3 kob/ml düzeyinde inokule edilen *E. coli* O157:H7 üzerine inhibitör etkisi

Örnek	Depolama Süresi (Gün)				
	0	1	3	5	8
Eco-F1	3,38±0,13	1>	1>	1>	1>
Eco-F2	3,36±0,12	1>	1>	1>	1>
Eco-F3	3,42±0,10	1>	1>	1>	1>
Eco-F4	3,33±0,11	1>	1>	1>	1>
Eco-F5	3,39±0,08	1>	1>	1>	1>
Kokteyl	3,30±0,14	1>	1>	1>	1>
EC*	3,43±0,16	5,39±0,21	6,88±0,19	6,97±0,15	6,82±0,17

EC*, sadece *E. coli* O157:H7 içeren örnek, kontrol örneği.

Çizelge 4.3. STyph-fajlarının (10^9 pob/ml) buzdolabı sıcaklığında BHI sıvı besiyerine 10^3 kob/ml düzeyinde inokule edilen *S. Typhimurium* SRII üzerine inhibitör etkisi

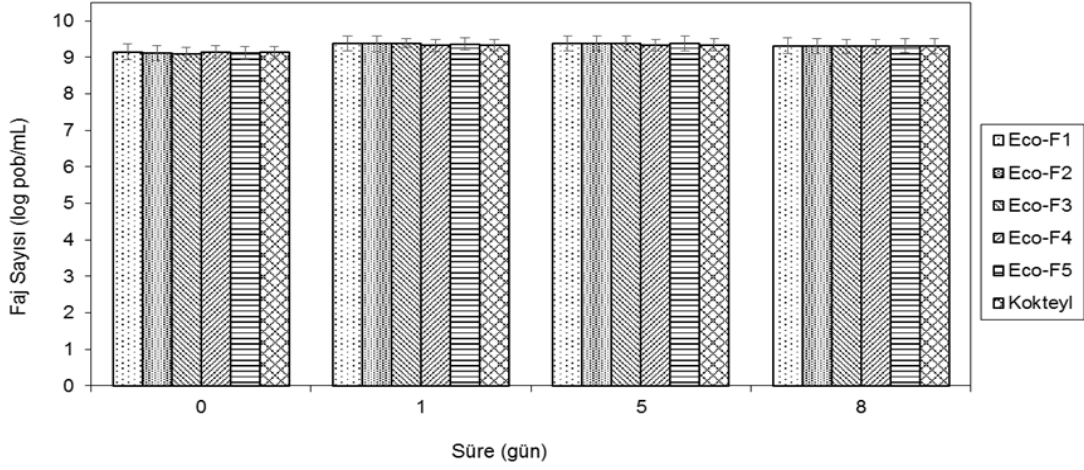
Örnek	Depolama Süresi (Gün)				
	0	1	3	5	8
Styph-F1	3,25±0,11	1>	1>	1>	1>
Styph-F2	3,29±0,14	1>	1>	1>	1>
Styph-F3	3,31±0,16	1>	1>	1>	1>
Styph-F4	3,34±0,19	1>	1>	1>	1>
Kokteyl	3,27±0,10	1>	1>	1>	1>
SRII*	3,35±0,12	3,39±0,13	3,48±0,20	3,52±0,18	3,45±0,16

SRII*, sadece *S. Typhimurium* SRII içeren örnek, kontrol örneği

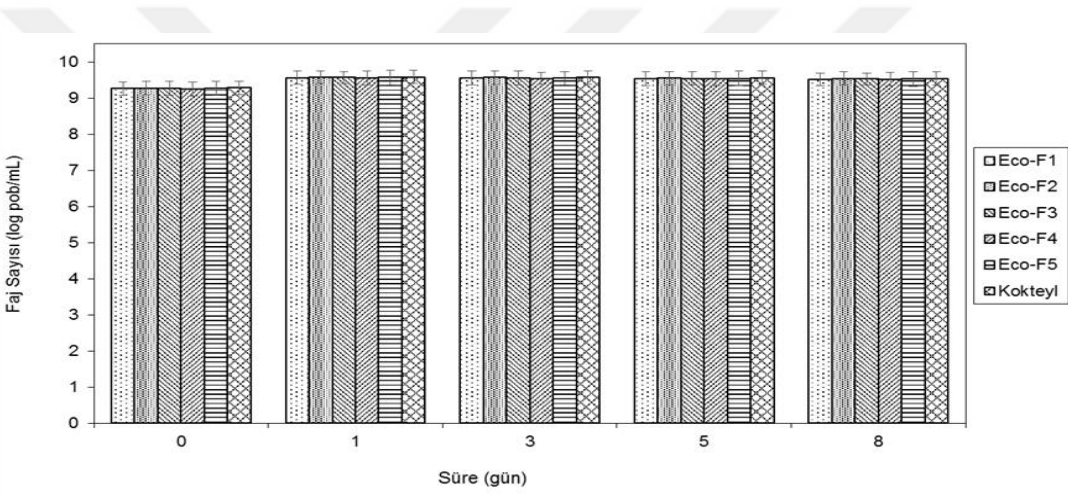
Çizelge 4.4. STyph-fajlarının (10^9 pob/ml) oda sıcaklığında BHI sıvı besiyerine 10^3 kob/ml düzeyinde inokule edilen *S. Typhimurium* SRII üzerine inhibitör etkisi

Örnek	Depolama Süresi (Gün)				
	0	1	3	5	8
Styph-F1	3,48±0,16	1>	1>	1>	1>
Styph-F2	3,52±0,13	1>	1>	1>	1>
Styph-F3	3,56±0,12	1>	1>	1>	1>
Styph-F4	3,49±0,19	1>	1>	1>	1>
Kokteyl	3,54±0,18	1>	1>	1>	1>
SRII*	3,50±0,20	5,32±0,18	5,98±0,21	6,23±0,13	6,38±0,23

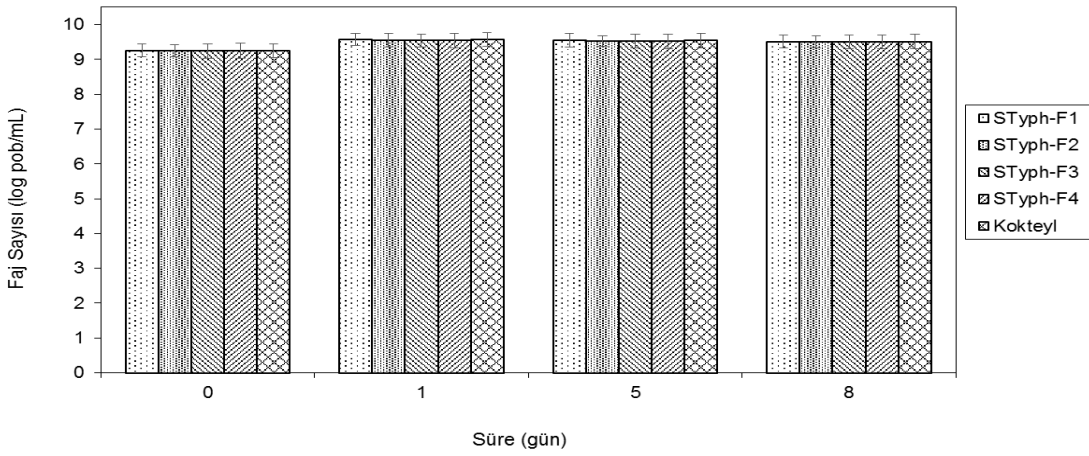
SRII*, sadece *S. Typhimurium* SRII içeren örnek, kontrol örneği



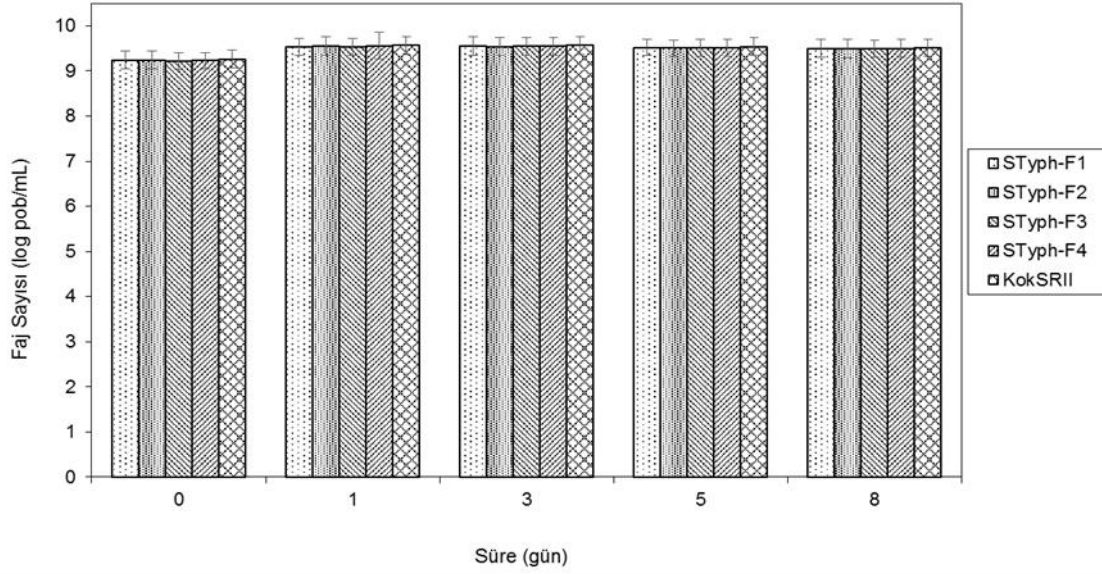
Şekil 4.1. Eco-fajlarının (10^9 pob/ml) buzdolabı sıcaklığında 10^3 kob/ml düzeyinde *E. coli* O157:H7 inokule edilen BHI sıvı besiyerinde stabilitesi



Şekil 4.2. Eco-fajlarının (10^9 pob/ml) oda sıcaklığında 10^3 kob/ml düzeyinde *E. coli* O157:H7 inokule edilen BHI sıvı besiyerinde stabilitesi



Şekil 4.3. STyph-fajlarının (10^9 pob/ml) buzdolabı sıcaklığında 10^3 kob/ml düzeyinde *S. Typhimurium* SR11 inokule edilen BHI sıvı besiyerinde stabilitesi



Şekil 4.4. STyph-fajların (10^9 pob/ml) oda sıcaklığında 10^3 kob/ml düzeyinde *S. Typhimurium* SRII inokule edilen BHI sıvı besiyerinde stabilitesi

Çizelge 4.5. Eco-fajlarının (10^9 pob/ml) buzdolabı sıcaklığında BHI sıvı besiyerine 10^6 kob/ml düzeyinde inokule edilen *E. coli* O157:H7 üzerine inhibitör etkisi

Örnek	Depolama Süresi (Gün)				
	0	1	3	5	8
Eco-F1	6,56±0,10	1>	1>	1,15±0,07	1,12±0,05
Eco-F2	6,48±0,17	1,24±0,08	1,26±0,10	1,29±0,11	1,27±0,07
Eco-F3	6,55±0,12	1,33±0,08	1,36±0,11	1,40±0,09	1,43±0,10
Eco-F4	6,53±0,22	1,39±0,09	1,42±0,12	1,45±0,04	1,48±0,14
Eco-F5	6,49±0,14	1,12±0,10	1,09±0,08	1,15±0,06	1,18±0,07
Kokteyl	6,41±0,11	1,07±0,06	1,11±0,05	1,10±0,10	1,09±0,09
EC*	6,48±0,16	6,51±0,13	6,55±0,15	6,58±0,12	6,62±0,18

EC*, sadece *E. coli* O157:H7 içeren örnek, kontrol örneği.

Çizelge 4.6. Eco-fajlarının (10^9 pob/ml) oda sıcaklığında BHI sıvı besiyerine 10^6 kob/ml düzeyinde inokule edilen *E. coli* O157:H7 üzerine inhibitör etkisi

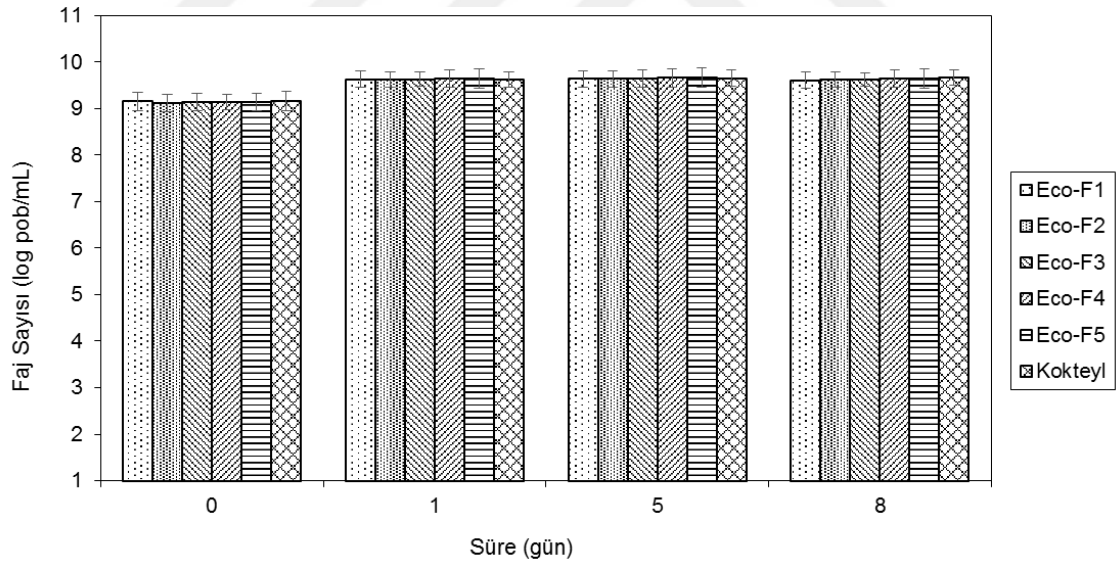
Örnek	Depolama Süresi (Gün)				
	0	1	3	5	8
Eco-F1	6,53±0,18	1>	1>	1,25±0,05	1,48±0,08
Eco-F2	6,51±0,11	1,15±0,09	1,44±0,11	1,93±0,13	2,41±0,16
Eco-F3	6,48±0,15	1,20±0,10	1,53±0,12	2,02±0,15	2,57±0,17
Eco-F4	6,49±0,17	1,38±0,07	1,72±0,09	2,25±0,21	2,79±0,15
Eco-F5	6,42±0,13	1>	1,27±0,10	1,63±0,09	2,15±0,10
Kokteyl	6,47±0,11	1>	1,39±0,09	1,81±0,13	2,22±0,17
EC*	6,44±0,19	8,18±0,23	8,37±0,25	8,53±0,14	8,67±0,22

EC*, sadece *E. coli* O157:H7 içeren örnek, kontrol örneği.

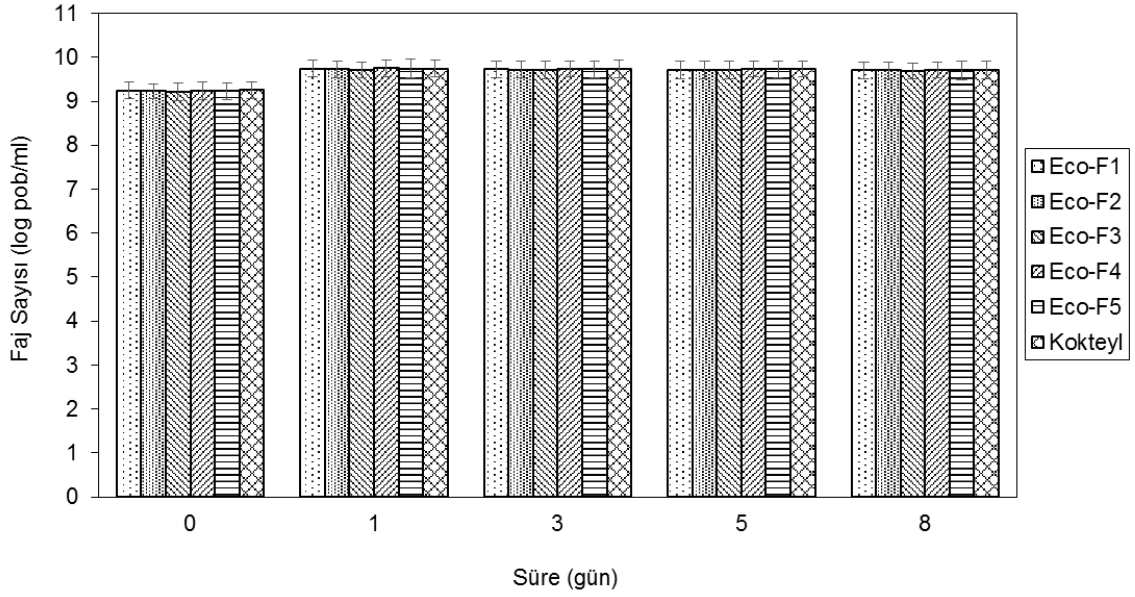
İnoküle edilen bakteri 10^6 kob/ml ve faj miktarı 109 pob/ml olan örnekler incelendiğinde Eco-F1, F2, F3, F4, F5 ve kokteyl fajlarının BHI sıvı besiyerinde buzdolabı koşullarında depolamanın 1'inci gününde sırasıyla 6,56, 5,24, 5,22, 5,14, 5,37 ve 5,34 log pob/ml; oda sıcaklığında ise 6,53, 5,36, 5,28, 5,11, 6,42 ve 6,47 log pob/ml düzeyinde bir azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$) (Çizelge 4.5 ve 4.6).

Buzdolabında muhafaza edilen bakteriyofaj içeren ve içermeyen (kontrol) örneklerde depolama süresi boyunca bakteri sayısında önemli bir değişimin olmadığı ($p > 0,05$) (Çizelge 4.5), oda sıcaklığında muhafaza edilen örneklerde depolama süresinin uzamasıyla konak bakteri sayısında bir artış meydana gelmediği belirlenmiştir (Çizelge 4.6).

Eco-fajlarının sayısının da depolamanın 1'inci gününde bir artış olduğu ve depolama süresince de stabiliteğini korudukları belirlenmiştir (Şekil 4.5 ve 4.6).



Şekil 4.5. Eco-fajlarının (10^9 pob/ml) buzdolabı sıcaklığında 10^6 kob/ml düzeyinde *E. coli* O157:H7 inoküle edilen BHI sıvı besiyerinde stabilitesi



Şekil 4.6. Eco-fajlarının (10^9 pob/ml) oda sıcaklığında 10^6 kob/ml düzeyinde *E. coli* O157:H7 inokule edilen BHI sıvı besiyerinde stabilitesi

STyph-F1, F2, F3, F4 ve kokteyl fajlarının ise buzdolabı sıcaklığında depolamanın 1'inci gününde sırasıyla 5,11, 5,48, 5,18, 5,35 ve 5,39 log kob/ml; oda sıcaklığında ise 5,00, 5,29, 5,06, 5,24 ve 5,23 log kob/ml seviyesinde bir azalmaya sebep olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.7 ve 4.8). Buzdolabında tutulan örneklerde depolama süresince Salmonella sayısında önemli bir değişimin olmadığı ($p>0,05$), oda sıcaklığında muhafaza edilen örneklerde ise bakteri sayısının arttığı saptanmıştır ($p<0,05$). Bakteriyofaj içeren örneklerde depolamanın 1'inci gününde STyph-faj sayısında artış olduğu, depolama süresince de fajların stabitlerini korudukları bulunmuştur (Şekil 4.7 ve 4.8). Oda sıcaklığında tutulan kontrol örneğinde 8 günlük depolama esnasında bakteri sayısında önemli düzeyde artış meydana geldiği belirlenmiştir.

Hudson vd. (2013) kanalizasyon suyundan izole ve karakterize ettikleri FAHEc1 bakteriyofajını $>10^7$ pob/ml seviyesinde uyguladıklarında sıvı besiyerinde (LB broth) 5°C 'de *E. coli* O157:H7 sayısında 4 log'luk azalmaya neden olduğunu bildirmişlerdir.

Çizelge 4.7. STyph-fajlarının (10^9 pob/ml) buzdolabı sıcaklığında BHI sıvı besiyerine 10^6 kob/ml düzeyinde inokule edilen *S. Typhimurium* SRII üzerine inhibitör etkisi

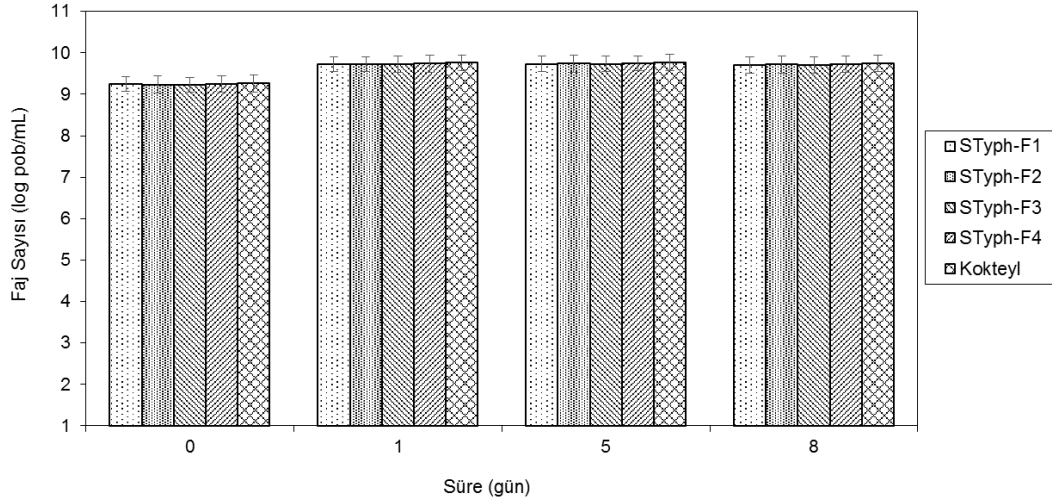
Örnek	Depolama Süresi (Gün)				
	0	1	3	5	8
Styph-F1	6,46±0,20	1,35±0,11	1,38±0,10	1,42±0,08	1,46±0,09
Styph-F2	6,48±0,18	1>	1,15±0,12	1,12±0,13	1,16±0,06
Styph-F3	6,45±0,17	1,27±0,10	1,32±0,08	1,36±0,07	1,39±0,11
Styph-F4	6,49±0,10	1,14±0,09	1,15±0,12	1,17±0,10	1,21±0,12
Kokteyl	6,39±0,22	1>	1,08±0,05	1,11±0,10	1,09±0,08
SRII*	6,43±0,13	6,46±0,16	6,50±0,19	6,57±0,22	6,64±0,24

SRII*, sadece *S. Typhimurium* SRII içeren örnek, kontrol örneği

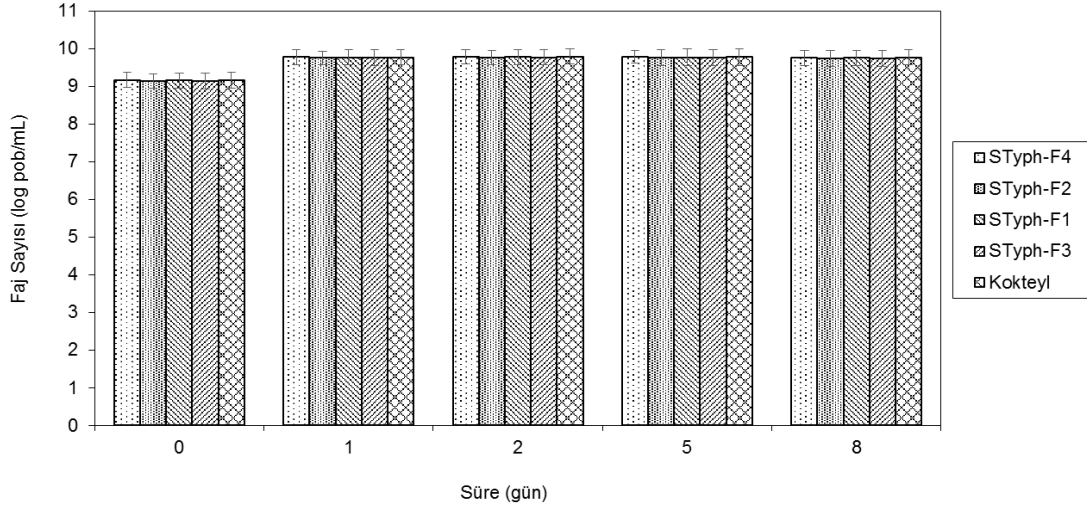
Çizelge 4.8. STyph-fajlarının (10^9 pob/ml) oda sıcaklığında BHI sıvı besiyerine 10^6 kob/ml düzeyinde inokule edilen *S. Typhimurium* SRII üzerine inhibitör etkisi

Örnek	Depolama Süresi (Gün)				
	0	1	3	5	8
Styph-F1	6,49±0,15	1,49±0,12	2,09±0,14	2,63±0,20	3,14±0,20
Styph-F2	6,45±0,11	1,16±0,10	1,61±0,17	2,19±0,13	2,72±0,17
Styph-F3	6,47±0,19	1,41±0,13	1,92±0,10	2,57±0,16	3,06±0,12
Styph-F4	6,48±0,16	1,24±0,11	1,77±0,12	2,25±0,19	2,83±0,10
Kokteyl	6,44±0,23	1,21±0,09	1,68±0,13	2,17±0,11	2,79±0,19
SRII*	6,43±0,17	7,54±0,20	7,76±0,19	8,13±0,22	8,24±0,25

SRII*, sadece *S. Typhimurium* SRII içeren örnek, kontrol örneği



Şekil 4.7. STyph-fajlarının (10^9 pob/ml) buzdolabı sıcaklığında 10^6 kob/ml düzeyinde *S. Typhimurium* SRII inokule edilen BHI sıvı besiyerinde stabilitesi



Şekil 4.8. STyph-fajlarının (10^9 pob/ml) oda sıcaklığında 10^6 kob/ml düzeyinde *S. Typhimurium* SRII inokule edilen BHI sıvı besiyerinde stabilitesi

42 UHT Sütte Eco- ve STyph-Fajların Konakçı Bakterilerine Karşı Litik Aktiviteleri

UHT sütte Eco ve STyph-fajlarının buzdolabı ve oda sıcaklığında konakçı bakterilerine karşı inhibitör etkisine bakılmıştır. Bu amaçla düşük (10^3 kob/ml) ve yüksek (10^6 kob/ml) düzeyde *E. coli* O157:H7 ATCC 35150 ve *S. Typhimurium* SRII ile inokule edilen süt örneklerine 10^9 pob/ml düzeyinde faj katılmış, buzdolabı ve oda sıcaklığında inhibitör etkileri incelenmiştir. Eco-fajları ve STyph-fajları 10^9 pob/ml doz uygulandığında 10^3 kob/ml düzeyinde *E. coli* O157:H7 ve *S. Typhimurium* SRII ile inokule edilmiş hem buzdolabı hem de oda sıcaklığında muhafaza edilen süt örneklerinde depolamanın birinci gününden itibaren depolama süresince bakteri hücre sayısını belirlenemeyecek seviyenin altına düşürdüğü belirlenmiştir (Çizelge 4.9-4.12) ($p < 0,01$).

Çizelge 4.9. Eco-fajlarının (10^9 pob/ml) buzdolabı sıcaklığında UHT süte 10^3 kob/ml düzeyinde inokule edilen *E. coli* O157:H7 üzerine inhibitör etkisi

Örnek	Depolama Süresi (Gün)						
	0	1	2	5	8	10	15
Eco-F1	3,26±0,23	1>	1>	1>	1>	1>	1>
Eco-F2	3,31±0,29	1>	1>	1>	1>	1>	1>
Eco-F3	3,29±0,31	1>	1>	1>	1>	1>	1>
Eco-F4	3,28±0,19	1>	1>	1>	1>	1>	1>
Eco-F5	3,29±0,27	1>	1>	1>	1>	1>	1>
Kokteyl	3,29±0,22	1>	1>	1>	1>	1>	1>
EC*	3,28±0,18	3,34±0,28	3,70±0,11	3,78±0,26	3,60±0,32	3,46±0,34	3,01±0,30

*EC, sadece *E. coli* O157:H7 inokule edilen UHT süt örneği (kontrol örneği)

Çizelge 4.10. Eco-fajlarının (10^9 pob/ml) oda sıcaklığında UHT süte 10^3 kob/ml düzeyinde inokule edilen *E. coli* O157:H7 üzerine inhibitör etkisi

Örnek	Depolama Süresi (Gün)						
	0	1	2	5	8	10	15
Eco-F1	3,41±0,10	1>	1>	1>	1>	1>	1>
Eco-F2	3,40±0,11	1>	1>	1>	1>	1>	1>
Eco-F3	3,41±0,18	1>	1>	1>	1>	1>	1>
Eco-F4	3,42±0,09	1>	1>	1>	1>	1>	1>
Eco-F5	3,43±0,14	1>	1>	1>	1>	1>	1>
Kokteyl	3,42±0,12	1>	1>	1>	1>	1>	1>
EC*	3,41±0,15	5,71±0,24	6,89±0,12	7,65±0,18	7,81±0,13	7,98±0,22	8,11±0,16

*EC, sadece *E. coli* O157:H7 inokule edilen UHT süt örneği (kontrol örneği)

Çizelge 4.11. STyph-fajlarının (10^9 pob/ml) buzdolabı sıcaklığında UHT süte 10^3 kob/ml düzeyinde inokule edilen *S. Typhimurium* SRII üzerine inhibitör etkisi

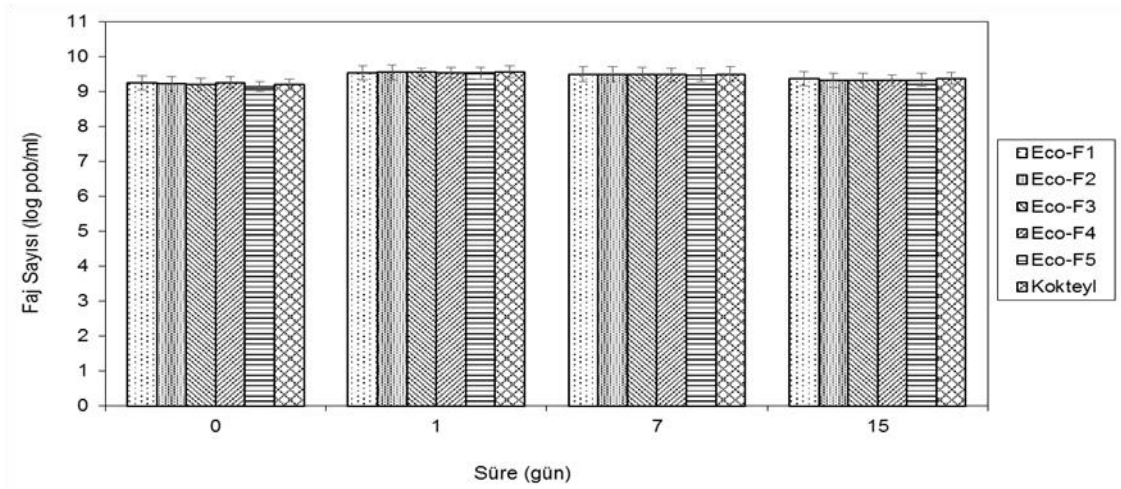
Örnek	Depolama Süresi (Gün)						
	0	1	2	5	8	10	15
STyph-F1	3,39±0,09	1>	1>	1>	1>	1>	1>
STyph-F2	3,38±0,17	1>	1>	1>	1>	1>	1>
STyph-F3	3,37±0,11	1>	1>	1>	1>	1>	1>
STyph-F4	3,42±0,10	1>	1>	1>	1>	1>	1>
Kokteyl	3,36±0,12	1>	1>	1>	1>	1>	1>
STyph*	3,33±0,13	3,38±0,24	3,56±0,17	3,40±0,21	3,16±0,13	3,02±0,10	2,76±0,09

*STyph, sadece *S. Typhimurium* SRII inokule edilen UHT süt örneği (kontrol örneği)

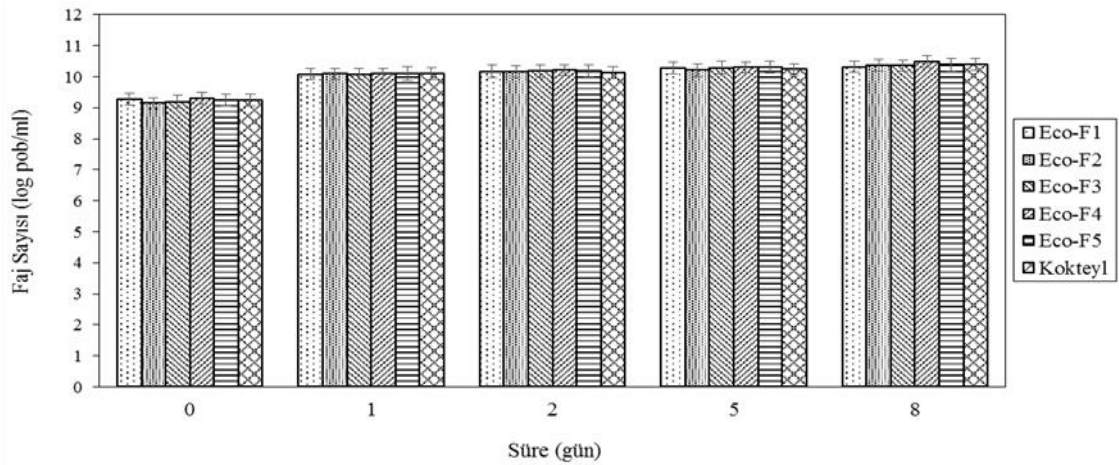
Çizelge 4.12. STyph-fajlarının (10^9 pob/ml) oda sıcaklığında UHT süte 10^3 kob/ml düzeyinde inokule edilen *S. Typhimurium* SRII üzerine inhibitör etkisi

Örnek	Depolama Süresi (Gün)						
	0	1	2	5	8	10	15
STyph-F1	3,53±0,11	1>	1>	1>	1>	1>	1>
STyph-F2	3,50±0,14	1>	1>	1>	1>	1>	1>
STyph-F3	3,47±0,18	1>	1>	1>	1>	1>	1>
STyph-F4	3,45±0,20	1>	1>	1>	1>	1>	1>
Kokteyl	3,49±0,22	1>	1>	1>	1>	1>	1>
STyph*	3,50±0,26	3,95±0,14	4,68±0,17	4,61±0,12	3,99±0,22	3,04±0,16	2,35±0,11

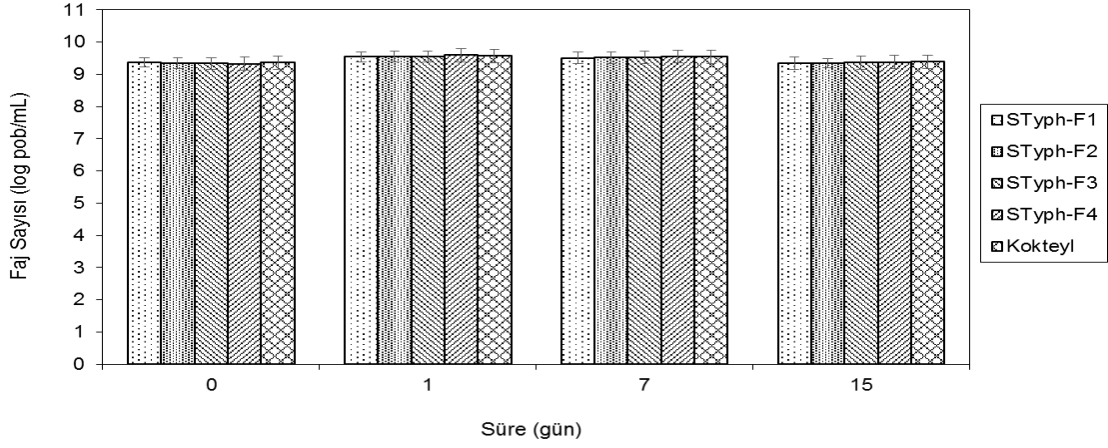
*STyph, sadece *S. Typhimurium* SRII inokule edilen UHT süt örneği (kontrol örneği)



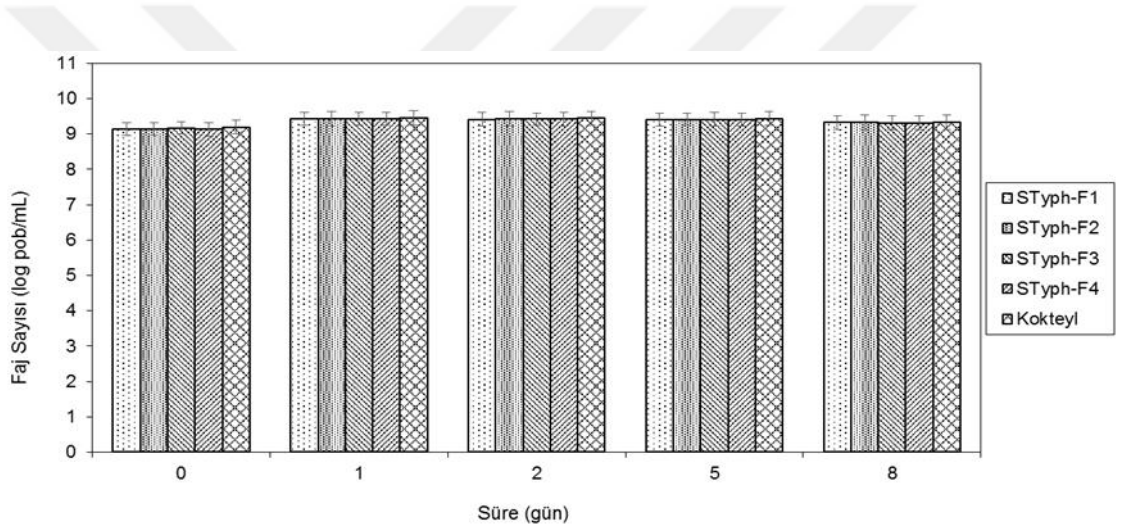
Şekil 4.9. Eco-fajlarının (10^9 pob/ml) buzdolabı sıcaklığında 10^3 kob/ml düzeyinde *E. coli* O157:H7 inokule edilen UHT süte stabilitesi



Şekil 4.10. Eco-fajlarının (10^9 pob/ml) oda sıcaklığında 10^3 kob/ml düzeyinde *E. coli* O157:H7 inokule edilen UHT süte stabilitesi



Şekil 4.11. STyph-fajlarının (10^9 pob/ml) buzdolabı sıcaklığında 10^3 kob/ml düzeyinde *S. Typhimurium* SRII inokule edilen UHT süte stabilitesi



Şekil 4.12. STyph-fajlarının (10^9 pob/ml) oda sıcaklığında 10^3 kob/ml düzeyinde *S. Typhimurium* SRII inokule edilen UHT süte stabilitesi

Söz konusu süt örneklerinde Eco- ve STyph-faj sayılarının depolamanın birinci gününde biraz arttığı ($p>0,05$) ve depolama süresince de faj sayısında önemli bir değişimin olmadığı ve dolayısıyla söz konusu fajların süte stabilitelelerini korudukları saptanmıştır ($p>0,05$) (Şekil 4.9-4.12).

Eco-fajları 10^9 pob/ml seviyesinde 10^6 kob/ml *E. coli* O157:H7 içeren buzdolabında muhafaza edilen süte uygulandığında depolamanın 1'inci gününde Eco-F1 fajının hücre sayısını belirlenemeyecek seviyenin altına (6,44 log kob/ml) düşürdüğü, Eco-F2, F3, F4, F5 ve kokteyl fajlarının ise sırasıyla 5,19, 5,17, 5,09, 5,35 ve 5,40 log kob/ml düzeyinde azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir ($p<0,01$) (Çizelge 4.13). Depolama süresinin uzamasıyla birlikte söz konusu örneklerde *E. coli* sayısında çok önemli bir

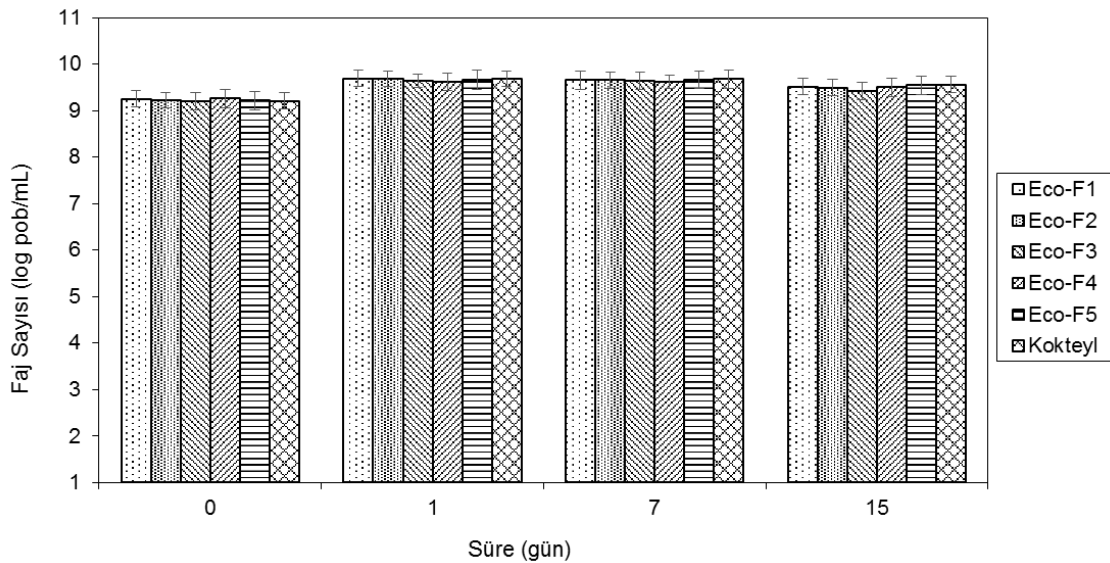
değişimin olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$). Depolamanın sonunda Eco-F1, F2, F3, F4, F5 ve kokteyl fajlarını içeren süt örneklerinde bakteri hücre sayısının sırasıyla 1,14, 1,40, 1,51, 1,63, 1,36 ve 1,23 log kob/ml olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.13).

Söz konusu örneklerde faj sayısının depolamanın birinci günü önemsiz düzeyde arttığı ($p>0,05$), depolama sürecinde de örneklerin faj sayılarında önemli bir değişimin olmadığı gözlenmiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.13). Kontrol süt örneğinde ise *E. coli* sayısının depolamanın 10'uncu gününe kadar düşük düzeyde arttığı ve daha sonra azaldığı belirlenmiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.13).

Çizelge 4.13. Eco-fajlarının (10^9 pob/ml) buzdolabı sıcaklığında UHT süte 10^6 kob/ml düzeyinde inokule edilen *E. coli* O157:H7 üzerine inhibitör etkisi

Örnek	Depolama Süresi (Gün)						
	0	1	2	5	8	10	15
Eco-F1	6,44±0,15	1>	1,09±0,08	1,12±0,10	1,15±0,12	1,18±0,14	1,14±0,16
Eco-F2	6,51±0,10	1,32±0,08	1,30±0,09	1,34±0,12	1,39±0,19	1,42±0,22	1,40±0,07
Eco-F3	6,56±0,09	1,39±0,07	1,42±0,09	1,47±0,08	1,50±0,15	1,55±0,25	1,51±0,08
Eco-F4	6,54±0,20	1,45±0,10	1,48±0,16	1,54±0,13	1,57±0,22	1,60±0,19	1,63±0,19
Eco-F5	6,59±0,23	1,24±0,14	1,26±0,11	1,30±0,18	1,35±0,17	1,38±0,17	1,36±0,15
Kokteyl	6,60±0,22	1,20±0,09	1,19±0,08	1,22±0,11	1,24±0,14	1,27±0,21	1,23±0,13
EC*	6,61±0,08	6,78±0,17	6,86±0,25	6,94±0,20	7,04±0,12	6,92±0,19	6,65±0,21

*EC, sadece *E. coli* O157:H7 inokule edilen UHT süt örneği (kontrol örneği)



Şekil 4.13. Eco-fajlarının (10^9 pob/ml) buzdolabı sıcaklığında 10^6 kob/ml düzeyinde *E. coli* O157:H7 inokule edilen UHT süte stabilitesi

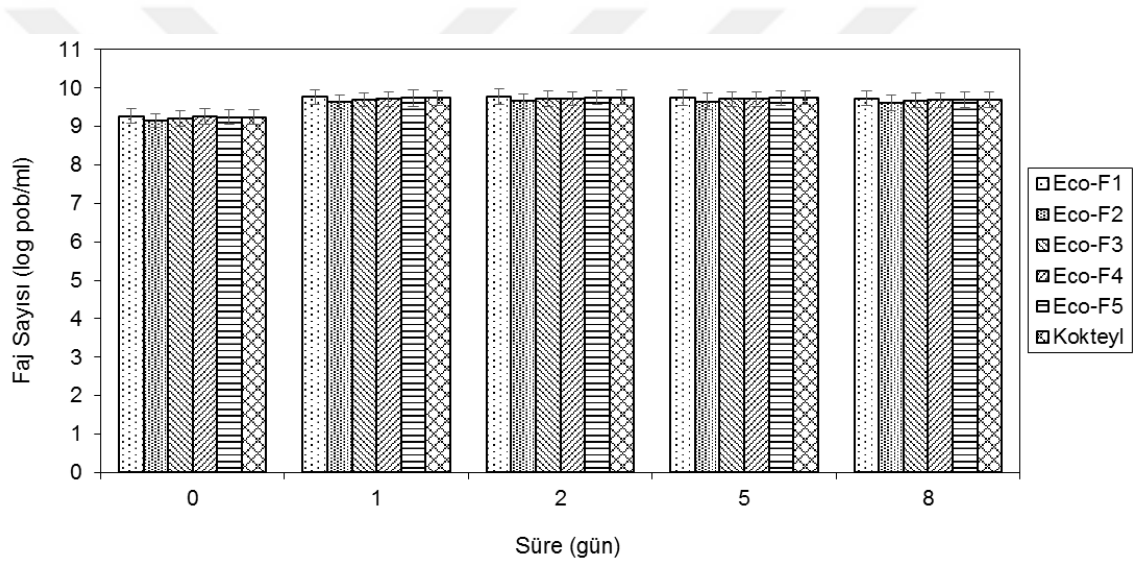
Eco-fajlarını 10^9 kob/ml, *E. coli* O157:H7'yi ise 10^6 kob/ml düzeyinde içeren ve oda sıcaklığında muhafaza edilen süt örneklerinde depolamanın 1'inci gününde Eco-F1, Eco-F2, F3, F4 ve F5 fajlarının konakçı hücre sayısında sırasıyla 5,34, 5,10, 5,14, 4,96 ve 5,14 log kob/ml, faj örneklerinin kokteyl halinde uygulandığı örnekte de ise 5,23 log kob/ml düzeyinde azalmaya neden olduğu bulunmuştur ($p<0,05$) (Çizelge 4.14). Depolama süresinin ilerlemesiyle birlikte fajla muamele edilen örneklerde bakteri hücre sayısının arttığı belirlenmiştir ($p<0,05$). *E. coli* hücre sayısında en fazla artışın Eco-F4, F3, F2 ve F5 örneğinde olduğu, bunları daha sonra kokteyl faj örneği ve Eco-F1 fajı içeren örnekte olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.14). Depolama sonunda Eco-F1, F2, F3, F4, F5 ve kokteyl örneklerinde ise *E. coli* sayısının 2,69, 3,56, 3,65, 3,89, 3,17 ve 2,81 log kob/ml olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.14). Kontrol örneğinde ise *E. coli* O157:H7 sayısının depolama süresince arttığı, 6,47 log kob/ml'den 8,66 log kob/ml'ye ulaştığı belirlenmiştir ($p<0,05$) (Çizelge 4.14). Söz konusu örneklerde faj sayısının depolamanın 1'inci gününde arttığı ($p<0,05$), daha sonra örneklerin faj sayısında önemli bir değişimin olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.14).

Tolba vd. (2014) tarafında yapılan bir çalışmada *E. coli* bakteriyofajları (EcoM-AG2, EcoM-AG3 ve EcoM-AG10) kokteyl şeklinde *E. coli* O126:H7'ye karşı yağsız sütte uygulandığında *E. coli* hücre sayısında 4, 10 ve 25°C'de gerçekleştirilen depolama işleminin sonunda (15 gün) sırasıyla 1,2, 1,0 ve 8,3 log'luk azalmaya neden olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca kokteyl halinde uygulanan fajların bütün depolama koşullarında sütte stabilitelelerini koruduğunu bildirmişlerdir. EcoM-AG2, EcoM-AG3 ve EcoM-AG10 fajların enfektif etkilerinin 4 ve 10°C'ye göre 25°C'de daha yüksek olduğu, depolamanın 1'inci gününden itibaren 25°C koşullarında *E. coli* hücre sayısının belirlenemeyecek seviyenin altına düştüğü ifade edilmiştir.

Çizelge 4.14. Eco-fajlarının (10^9 pob/ml) oda sıcaklığında UHT süte 10^6 kob/ml düzeyinde inokule edilen *E. coli* O157:H7 üzerine inhibitör etkisi

Örnek	Depolama Süresi (Gün)					
	0	1	2	4	5	8
Eco-F1	6,48±0,17	1,14±0,06	1,49±0,08	1,85±0,11	2,27±0,15	2,69±0,18
Eco-F2	6,41±0,19	1,31±0,07	1,76±0,10	2,39±0,14	2,91±0,17	3,56±0,22
Eco-F3	6,49±0,24	1,35±0,09	1,83±0,13	2,51±0,17	3,06±0,19	3,65±0,20
Eco-F4	6,42±0,29	1,46±0,11	1,91±0,16	2,76±0,21	3,18±0,15	3,89±0,21
Eco-F5	6,39±0,16	1,25±0,13	1,53±0,07	2,12±0,09	2,63±0,12	3,17±0,24
Kokteyl	6,43±0,11	1,20±0,06	1,49±0,14	1,97±0,12	2,42±0,18	2,81±0,27
EC*	6,47±0,22	7,90±0,20	8,24±0,16	8,42±0,23	8,55±0,27	8,66±0,31

*EC, sadece *E. coli* O157:H7 inokule edilen UHT süt örneği (kontrol örneği)



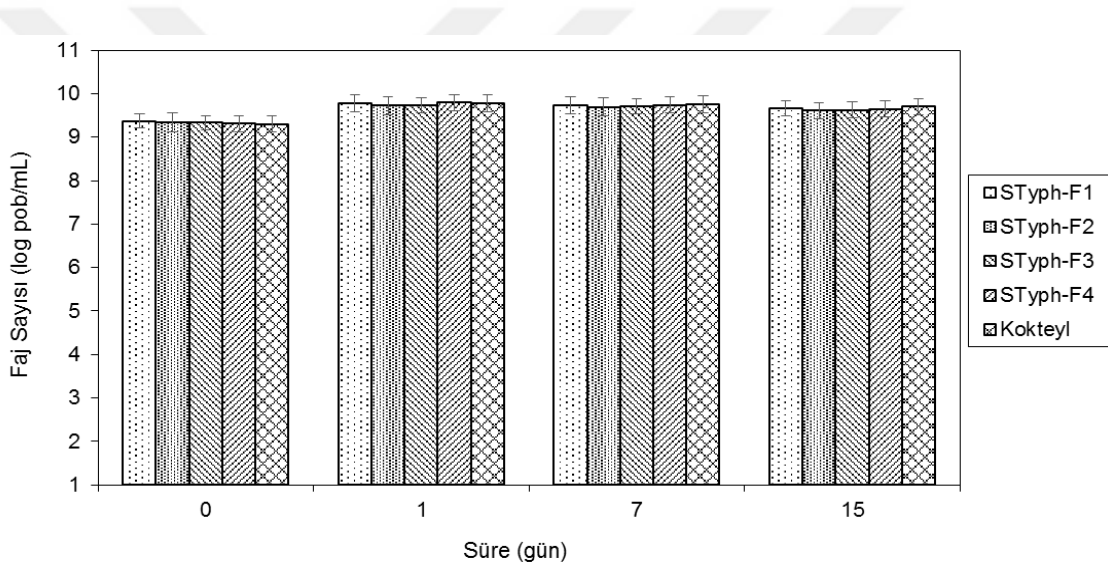
Şekil 4.14. Eco-fajlarının (10^9 pob/ml) oda sıcaklığında 10^6 kob/ml düzeyinde *E. coli* O157:H7 inokule edilen UHT süte stabilitesi

STyph-fajları 10^9 pob/ml düzeyinde *S. Typhumurium* SRII ile 10^6 kob/ml seviyesinde inokule edilen sütlere uygulandığında buzdolabında depolamanın 1'inci gününde STyph-F1, F2, F3, F4 ve kokteyl fajlarının kendi konakçı hücre sayısını sırasıyla 4,99, 5,35, 5,06, 5,14 ve 5,28 log kob/ml düşürdüğü ($p < 0,05$), depolama süresinin uzamasıyla birlikte *S. Typhumurium* SRII sayısında önemli bir değişimin olmadığı belirlenmiştir ($p > 0,05$) (Çizelge 4.15). Kontrol süt örneğinde ise *S. Typhumurium* SRII sayısının depolamanın 5'inci gününe kadar düşük düzeyde arttığı, daha sonra sayısında biraz azalma meydana geldiği ($p > 0,05$) (Çizelge 4.15). Faj uygulanan süt örneklerinde depolamanın 1'inci gününde faj sayısının biraz arttığı, depolama sürecinde de faj sayılarında önemli bir değişimin olmadığı gözlenmiştir ($p > 0,05$) (Şekil 4.15).

Çizelge 4.15. STyph-fajlarının (10^9 pob/ml) buzdolabı sıcaklığında UHT süte 10^6 kob/ml düzeyinde inokule edilen *S. Typhimurium* SRII üzerine inhibitör etkisi

Örnek	Depolama Süresi (Gün)						
	0	1	2	5	8	10	15
STyph-F1	6,49±0,26	1,50±0,13	1,53±0,16	1,57±0,12	1,60±0,09	1,58±0,07	1,45±0,10
STyph-F2	6,42±0,19	1,07±0,07	1,10±0,07	1,13±0,05	1,10±0,09	1,08±0,10	1,07±0,05
STyph-F3	6,47±0,14	1,41±0,12	1,45±0,08	1,47±0,11	1,49±0,10	1,51±0,09	1,48±0,11
STyph-F4	6,38±0,21	1,24±0,22	1,21±0,11	1,25±0,07	1,28±0,08	1,31±0,12	1,27±0,04
Kokteyl	6,41±0,28	1,13±0,24	1,15±0,12	1,17±0,09	1,13±0,06	1,10±0,05	1,09±0,08
STyph*	6,37±0,15	6,56±0,25	6,65±0,18	6,75±0,23	6,69±0,12	6,47±0,16	6,26±0,27

*STyph, sadece *S. Typhimurium* SRII inokule edilen UHT süt örneği (kontrol örneği)



Şekil 4.15. STyph-fajlarının (10^9 pob/ml) buzdolabı sıcaklığında 10^6 kob/ml düzeyinde *S. Typhimurium* SRII inokule edilen UHT süte stabilitesi

STyph-fajları (10^9 pob/ml) *S. Typhimurium* SRII ile 10^6 kob/ml düzeyinde inokule edilen ve oda sıcaklığında muhafaza edilen süt örneklerinde depolamanın 1'inci gününde STyph-F1, F2, F3, F4 ve kokteyl fajlarının kendi konakçı hücre sayısında sırasıyla 4,90, 5,19, 4,97, 5,11 ve 5,17 log kob/ml azalmaya neden olduğu ($p < 0,01$) belirlenmiştir (Çizelge 4.16). Depolama işlemi süresince kontrol örneğinde *S. Typhimurium* sayısının belli bir düzeyde arttığı ve depolama işleminin uzamasıyla azaldığı gözlenmiştir (Çizelge 4.16). Salmonella sayısının çok fazla artmamasının nedeni laktoz bulunan ortamda iyi gelişmemesinden kaynaklanmaktadır. Faj uygulanan süt örneklerinde depolamanın 1'inci gününde faj sayısının biraz arttığı ($p < 0,05$),

depolama sürecinde de bütün süt örneklerin faj sayısında önemli bir değişimin olmadığı gözlenmiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.16).

Bao vd. (2015) yaptıkları bir çalışmada PA13076 and PC2184 fajlarının tavuk göğsü ve pastörize tam yağlı sütte *S. Enteritidis*'e karşı inhibitör etkilerini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada gıda örneklerini 1×10^4 kob/ml düzeyinde *S. Enteritidis* ATCC13076 ve CVCC2184 serovarları ile tek tek ve kombine olarak kontamine etmişler ve daha sonra bu gıda örneklerine PA13076 and PC2184 fajlarını tek tek ve kokteyl olarak 1×10^8 pob/ml düzeyinde ekleyip 4 ve 25°de 5 saat inkübe etmişlerdir. Çalışma sonucunda fajların gerek tek başlarına gerekse kokteyl olarak uygulanması durumunda stabilitelelerini sütte tam olarak korudukları ve faj sayılarının başlangıçta ilave edilen düzeyde biraz yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Test edilen fajların hem tek başlarına hem de kombine olarak süte uygulandıklarında *S. Enteritidis* sayısını düşürdükleri, PC2184 fajının inhibitör etkisinin PA13076 fajına göre daha fazla olduğunu belirtmişlerdir. PC2184 fajının pastörize sütte *S. Enteritidis* sayısında yaklaşık 4 log'luk azalmaya neden olurken, PA13076 fajı yaklaşık 1,5-2,0 log'luk azalmaya neden olduğu bildirilmiştir.

Süt ve süt ürünlerinde yapılan çalışmalarda, bakteriyofaj ısıl işlem uygulanmış süte uygulandığında *S. aureus* sayısında 6 log'luk azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (O'Flaherty vd., 2005). Garcia vd. (2007), *S. aureus* ile kontamine edilen UHT süte bakteriyofaj 88 ve 35'i ilave ettiklerinde patojen bakteri sayısında 3,5 log'luk azalma meydana geldiğini belirtmişlerdir.

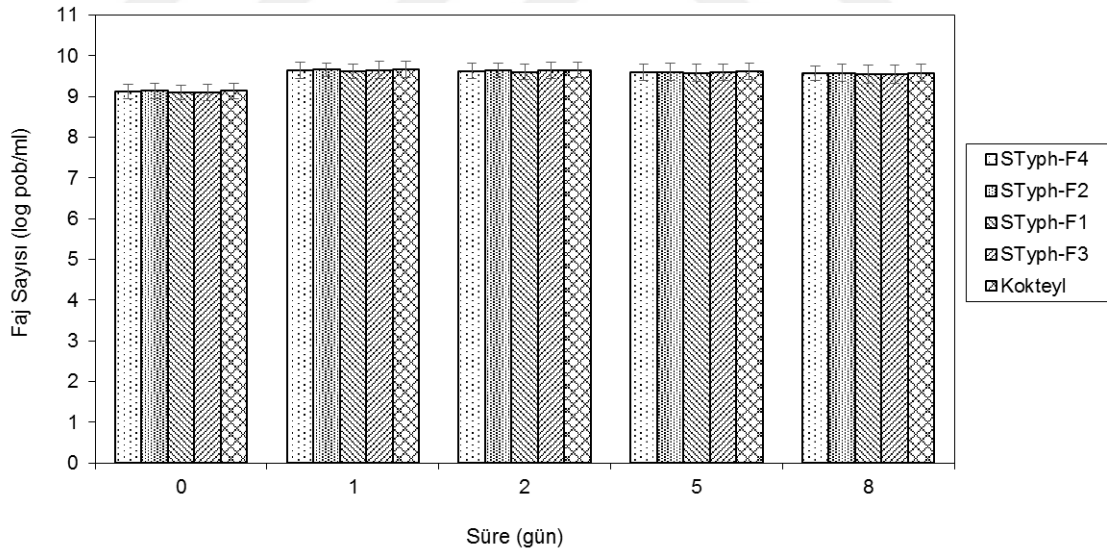
Bu çalışmada STpyh ve Eco-fajlarının konak bakterilerine karşı sıvı besiyeri ortamında UHT süte göre daha etkili oldukları belirlenmiştir. Gıda matriksin bileşimi ile yapısına ve çevresel koşullara bağlı olarak bakteriyofajların difüzyonu iyileşebilmekte veya azalabilmektedir. Katı ortamda bakteriyofajların difüzyonu sınırlı olduğundan bakteri yüzeylerine faj adsorpsiyonunun azaldığı ve buna bağlı olarak bakteriyofajların efektif kapasitelerinde bir düşme olduğu belirtilmektedir (Marco vd., 2010). Guenther vd. (2009) sosis, füme somon ve deniz ürünleri gibi katı gıda matrislerinde difüzyonlarının azalmasından dolayı bakteriyofaj kullanımının sınırlı olduğunu belirtmişlerdir. Gıdanın yapısında bulunan bileşikler bakterileri fajlardan koruyabilir. O'Flaherty vd. (2005) çiğ

sütte bulunan bağışıklık faktörlerinin fajların bakteriye adsorpsiyonunu engellediğini bildirmişlerdir. Gill vd. (2006) tarafından yapılan bir çalışmada süt serum proteinlerinde yer alan bazı proteinlerin fajların bakteri yüzeyine adsorpsiyonunu engellediğini ortaya koymuşlardır.

Çizelge 4.16. STyph-fajlarının (10^9 pob/ml) oda sıcaklığında UHT süte 10^6 kob/ml düzeyinde inokule edilen *S. Typhimurium* SRII üzerine inhibitör etkisi

Örnek	Depolama Süresi (Gün)					
	0	1	2	4	5	8
STyph-F1	6,32±0,21	1,42±0,05	1,74±0,16	2,02±0,11	2,33±0,10	2,64±0,12
STyph-F2	6,34±0,20	1,15±0,06	1,39±0,07	1,87±0,09	2,16±0,10	2,31±0,08
STyph-F3	6,43±0,26	1,46±0,13	1,66±0,10	1,95±0,11	2,29±0,09	2,57±0,07
STyph-F4	6,46±0,22	1,35±0,09	1,51±0,10	1,84±0,09	2,27±0,07	2,45±0,12
Kokteyl	6,37±0,30	1,20±0,07	1,44±0,09	1,82±0,12	2,20±0,12	2,38±0,14
STyph*	6,29±0,25	6,88±0,26	7,20±0,19	7,02±0,28	6,88±0,22	6,64±0,17

*STyph, sadece *S. Typhimurium* SRII inokule edilen UHT süt örneği (kontrol örneği)



Şekil 4.16. STyph-fajlarının (10^9 pob/ml) oda sıcaklığında 10^6 kob/ml düzeyinde *S. Typhimurium* SRII inokule edilen UHT süte stabilitesi

BÖLÜM V

SONUÇLAR

Bu çalışmada 4 farklı *Styph*- ve 5 farklı *E. coli* O157:H7 fajlarının kendi konak bakterileri karşı tek tek ve kombine olarak virülant etkileri hem sıvı besiyerinde (BHI) hem de UHT sütte belirlenmiştir. Araştırmada elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

- a) Buzdolabı ve oda sıcaklığında muhafaza edilen bakteri düzeyi 10^3 kob/ml ve faj içeriği 10^9 pob/ml olan BHI örneklerindedeki Eco- ve *Styph*-fajların konakçı hücre sayısını depolamanın 1'inci gününden itibaren depolama süresince tespit edilemeyecek seviyenin altına düşürdüğü belirlenmiştir ($p < 0,01$). Eco ve *STyph*-fajlarının BHI sıvı besiyerinde depolama işlemi boyunca stabilitelerini korudukları ($p > 0,05$) ve bakteriyofaj içermeyen kontrol örneklerinde ise *E. coli* O157:H7 ve *S. Typhimurium* sayısında depolama işlemi süresince biraz arttığı gözlenmiştir.
- b) Faj seviyesi aynı (10^9 pob/ml) ancak bakteri seviyesi 10^6 kob/ml olan örnekler incelendiğinde BHI sıvı besiyerinde buzdolabı ve oda sıcaklığında depolamanın 1'inci gününde Eco-fajlarının konak hücre sayısında 5,11-6,53; *STyph*-fajlarının ise 5,00-6,48 log'luk azalmaya neden olduğu ($p < 0,05$) bulunmuştur. Eco- ve *STyph*-fajların depolama işlemi süresince stabilitelerini muhafaza ettikleri saptanmıştır. Buzdolabında muhafaza edilen faj uygulanan örneklerde konak bakteri sayısında önemli bir değişimin olmadığı, ancak oda sıcaklığında muhafaza edilen örneklerde depolama süresinin uzamasıyla birlikte konak bakteri sayılarının biraz arttığı belirlenmiştir.
- c) BHI sıvı besiyerinde olduğu gibi, Eco- ve *STyph*-fajları düşük yani 10^3 kob/ml seviyesinde *E. coli* O157:H7 ve *S. Typhimurium* içeren hem buzdolabı ve oda sıcaklığında muhafaza edilen süt örneklerine yüksek dozda (10^9 pob/ml) uygulandığında konak hücre sayısını depolamanın 1'inci gününden itibaren muhafaza süresince belirlenemeyecek seviyenin altına düşürdüğü belirlenmiştir ($p < 0,05$). Her iki faj örneklerinin UHT süt örneklerinde depolama işlemi boyunca stabilitelerini muhafaza ettikleri tespit edilmiştir ($p > 0,05$). Ayrıca bakteriyofaj içermeyen kontrol örneklerinde ise buzdolabı koşullarında *E. coli* O157:H7

sayısında önemli bir değişimin olmadığı, oda sıcaklığında muhafaza edilen örneklerde biraz arttığı, *S. Typhimurium* sayısının ise depolama işleminin uzamasıyla birlikte sayısında biraz azalma meydana geldiği bulunmuştur.

- d) Yüksek düzeyde bakteri (10^6 kob/ml) ve yüksek dozda faj içeren UHT süt örnekleri incelendiğinde Eco-fajlarının buzdolabı sıcaklığında tutulan örneklerde *E. coli* O157:H7 sayısında 5,14-6,56 log'luk; oda sıcaklığında muhafaza edilen süt örneklerinde 5,11- 6,53 log'luk azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. Buzdolabı sıcaklığında muhafaza edilen ve bakteriyofaj uygulanan süt örneklerinde ve kontrol örneğinde depolama işlemi süresince konak bakteri sayısında önemli bir değişimin olmadığı görülmüştür. Oda sıcaklığında muhafaza edilen süt örneklerinde ise bakteriyofajla muamele edilen örneklerde depolamanın birinci gününden itibaren *E. coli* O157:H7 sayısının 8 günlük depolama süresince arttığı belirlenmiştir. Ayrıca buzdolabı sıcaklığında 15, oda sıcaklığında 10 günlük gerçekleştirilen depolama işlemi süresince Eco-fajlarının stabilitelelerini korudukları belirlenmiştir. Bakteriyofaj içermeyen kontrol örneğinde ise bakteri sayısının arttığı gözlenmiştir.
- e) *S. Typhimurium* SRII ile 10^6 kob/ml seviyesinde kontamine edilen sütlere STyp-fajları 10^9 kob/ml düzeyinde uygulandığında buzdolabı sıcaklığında depolamanın 1'inci gününde *Salmonella* sayısında 5,35-4,99 log'luk; oda sıcaklığında 4,90-5,19 log'luk azalmaya neden oldukları bulunmuştur. Buzdolabında 15 gün tutulan örneklerde *S. Typhimurium* SRII sayısında önemli bir değişimin olmadığı; oda sıcaklığında tutulan faj içeren ve içermeyen örneklerde ise bakteri sayısının arttığı belirlenmiştir. Faj örneklerinin depolama süresince her iki depolama sıcaklığında korudukları belirlenmiştir.
- f) Bakteriyofaj örneklerinin kendi konak bakterilerine karşı UHT süte göre BHI sıvı besi ortamında biraz daha fazla etkili oldukları belirlenmiştir.

Bu tez çalışması incelenen Eco-fajları ve STyp-fajlarının sütte stabilitelelerini hem buzdolabı hem de oda sıcaklığında korudukları ve gıda kaynaklı patojen bakteriler üzerinde etkili oldukları ve süt endüstrisinde biyokoruyucu olarak kullanma potansiyeline sahip olduklarını ortaya koymuştur.

KAYNAKLAR

Abuladze, T., Li, M., Menetrez, M. Y., Dean, T., Senecal, A. and Sulakvelidze, A., “Bakteriophages reduce experimental contamination of hard surfaces, tomato, spinach, broccoli and ground beef by *Escherichia coli* O157:H7”, *Applied and Environmental Microbiology* 74, 6230-6238, 2008.

Acar Soykut, E. ve Tunail, N. “Termofilik faj taksonomisi”, *Gıda* 34(4):251-258, 2009a.

Acar Soykut, E. ve Tunail, N. “Süt endüstrisinde sorun yaratan termofilik fajlar”, *Gıda* 34(2): 107-113, 2009b.

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

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

Atterbury, RJ., Dillon, E., Swift, C., Connerton, PL., Frost, JA. and Dodd, CE., “ Correlation of *Campylobacter* bacteriophage with reduced presence of hosts in broiler chicken ceca”, *Appl Environ Microbiol.* 71, 4885-4887, 2005.

Bell, C., and Kyriakides, A., “ Salmonella: A practical approach to the organism and its control in foods”, *Oxford: Blackwell Science* 2002.

- Bell, C., “Approach to the control of entero-haemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC)”, *International Journal of Food Microbiology* 78, 197–216, 2002.
- Besser, R.E., Lett, S.M. and Weber, J.T., “An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider”, *Journal of American Medical Associate* 269, 2217–2220, 1993.
- Bhunia, A.K., “Foodborne microbial pathogens: Mechanisms and pathogenesis”, *Springer Nature*, New York, 2008.
- Birge, E.A., “*Bacterial and Bacteriophage Genetics*”, *Springer-Verlag* 4th Edition, 550- 560, New York, 2000.
- Bradley, “Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins”, *Journal of Bacteriology* 31, 230–314, 1967.
- Bruttin, A. and Brussow, H., “Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: A safety test of phage therapy”, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49, 2874-8, 2005.
- Brüssow, H. and 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* vol. 158, no. 1, 23-27, 2012.
- Carlton, R.M., Noordman, W.H., Biswas, B., de Meester, E.D., and Loessner, M.J., “Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: genome sequence, bioinformatics analyses, oral toxicity study, and application”, *Reg. Toxicol. Pharmacol* 43, 301-312, 2005.

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., Daly, M., and et al., “Salmonella enterica serotype Bredeney: antimicrobial susceptibility and molecular diversity of isolates from Ireland and Northern Ireland”, *Applied and Environmental Microbiology* 68, 181–186, 2002.

EFSA http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale1178620753812_1211902031795.html, 2009.

Ergüllü, E., “Bakteriyofaj ve süt teknolojisinde yarattığı sorunlar”, *Gıda* 7(5), 239- 245, 1982.

d’Hérelle, F. “Technique de la recherche du microbe filtrant bactériophage (Bacteriophagum intestinale)”, *C. R. Soc. Biol.* 81, 1160– 1162, 1918.

Fiorentin, L., Vieira, N. D., and Barioni J.W., “Use of lytic bacteriophages to reduce *Salmonella* Enteritidis in experimentally contaminated chicken cuts”, *Revista Brasileira de Ciência Avícola* 7, 255-260, 2005

Fruciano, D. E., and Bourne, S., “Phage as an antimicrobial agent: d’Herelle’s heretical theories and their role in the decline of phage prophylaxis in the West”, *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology* 18, 19-26, 2007.

Garcia, P., Madera, C., Martinez, B., and 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.

Gautier M, Rouault A, Sommer P, Briandet R., “Occurrence of *Propionibacterium freudenreichii* bacteriophages in Swiss cheese”, *Applied and Environmental Microbiology* 61, 2572–2576, 1995.

Gill, J. J., Sabour, P. M., Leslie, K. E., and Griffiths, M. W. “Bovine whey proteins inhibit the interaction of *Staphylococcus aureus* and bacteriophage K”. *Journal of Applied Microbiology* 101, 377–386, 2006.

Goodburn, C., and Wallace, C., “The microbiological efficacy of decontamination methodologies for fresh produce: a review”, *Food Control* 32, 418-427, 2012.

Goode, D., Allen, V.M., and Barrow, P.A., “Reduction of experimental *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of chicken skin by application of lytic bacteriophages”, *Applied and Environmental Microbiology* 69, 5032-5036, 2003.

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

Guenther, S., Huwyler, D., Richard, S., and Loessner, M. J. Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 93–100, 2009.

Guenther, S., Herzig, O., Fieseler, L., Klumpp, J., and Loessner, M. J., “Biocontrol of *Salmonella* Typhimurium in RTE foods with the virulent bacteriophage FO1-E2”, *International Journal of Food Microbiology* 154, 66-72, 2012.

Guttman B, Raya RA, and Kutter E., “Basic Phage Biology”, In *Bacteriophages Biology and Applications*, E Kutter, A Sulakvelidze (eds), 29-67, *CRC Press* USA., 2005.

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

Hagens, S., and Loessner M.J., “Application of bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens”, *Applied Microbiology and Biotechnology* 76, 513–519, 2007.

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.

Hartland, E.L., and Leong, J.M., “Enteropathogenic and enterohemorrhagic *E. coli*: ecology, pathogenesis, and evolution”, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3, 15, 2013.

Hendrix, R.W., “Bacteriophage λ and Its Relatives, In Modern Microbial Genetics”, 2nd *UN Streips and RE Yasbin (eds), A John Willey&Sons, Inc., Publication*, New York, 2002.

Higgins, J. P., S.E. Higgins, K.L. Guenther, W. Huff, A.M. Donoghue, D.J. Donoghue, and B.M. Hargis., “Use of a specific bakteriofage treatment to reduce *Salmonella* in poultry products”, *Poultry Science*. 84, 1141-1145, 2005.

Himmelweit, F., “Combined action of penicillin and bacteriophage on staphylococci”, *Lancet* 249, 104-105, 1945.

Hogg, M. A., “The social identity perspective”, *In S. A. Wheelan (Ed.), The handbook of group research and practice*, 133–157. Thousand Oaks, CA: Sage, 2005a.

Bao, H., Zhang, P., Zhang, H., Zhou, Y., Zhang, L., and Wang, R. “Bio-control of *Salmonella* Enteritidis in foods using bacteriophages”, *Viruses* 7(8), 4836-4853, 2015.

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.

Jordan, K.N., Oxford, L. and O’Byrne, C.P., “Survival of low-pH stress by *Escherichia*

coli O157:H7: correlation between alterations in the cell envelope and increases acid tolerance”, *Applied and Environmental Microbiology* 65, 3048–3055, 1999.

Kaper, J. B., Nataro, J. P., and Mobley, H. L., “Pathogenic *Escherichia coli*”, *Nature Reviews Microbiology* 2, 123-140, 2004.

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

Kılıç, S., “Süt Mikrobiyolojisi”, *Sidas Medya Ltd. Şti.* Çankaya, İzmir, 643., 2010.

Kınık, Ö., Uysal, H., Kavas, G., “Pratik Faj Kontrolü”, *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi*, İzmir, 109, 2000.

Kim, K.P., Klumpp, J., and Loessner., M.J. “*Enterobacter sakazakii* bacteriophages can prevent bacterial growth in reconstituted infant formula”, *International Journal of Food Microbiology* 115, 195-203, 2007.

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

Kutter, E., “Phage Therapy, Phage Biology”, *Ever Green* 1-15, 1997.

Lwoff, A., Horne, R.W. and Tournier, P. “ A system of viruses”, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 27, 51–62, 1962.

Marco, M. B., Reinheimer, J.A. and Quiberoni, A. “Phage adsorption to *Lactobacillus plantarum*: influence of physiological and environmental factors”, *International Journal of Food Microbiology*, 138, 270–275, 2010.

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, G.F., and van Sinderen, D., “Bacteriophages in dairy products: Pros and cons.”, *Biotechnology Journal* 2, 450-455, 2007.

Mead, P., Slutsker, L., and Deitz, V., “Food related illness and death in the United States”, *Emergence Infection Disease* 5, 607–625, 1999.

Modi, R., Hirvi, Y., Hill, A., and Griffiths, M.W., “Effect of phage on survival of *Salmonella enteritidis* during manufacture and storage of cheddar cheese made from raw and pasteurized milk”, *Journal of Food Protection* 64, 927–933, 2001.

O’Flaherty S, Coffey A, Meaney WJ, Fitzgerald GF, and Ross RP, “Inhibition of bacteriophage K proliferation on *Staphylococcus aureus* in raw bovine milk”, *Letters in Applied Microbiology* 41, 274–279, 2005.

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’Flaherty, S., Coffey, A., Meaney, W. J., Fitzgerald, G. F., and Ross, R. P. “Inhibition of bacteriophage K proliferation on *Staphylococcus aureus* in raw bovine milk”, *Letters in Applied Microbiology* 41, 274–279, 2005.

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

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.

Oliver, S. P., Jayarao, B. M., and Almeida, R. A., “Foodborne pathogen in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications” *Foodborne Pathogen and Disease*, vol. 2, no. 2, 115-129, 2005.

Pennazio, S., “The origin of phage virology”, *Rivista Di Biologia* 99, 103-129, 2006.

Prescot, L.M., John, P. and Harley, D.A., *Microbiology* 372-384. New York: McGraw Hill International Edition Publishing, 2005.

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

Small, A., Reid, C.A., and Buncic, S., “Conditions in lairages at abattoirs for ruminants in southwest England and in vitro survival of *Escherichia coli* O157, *Salmonella* Kedougou, and *Campylobacter jejuni* on lairage-related substrates”, *Journal of Food Protection* 66, 1570–1575, 2003.

Steele, B.T., Murphy, N., Arbus, G.S., and Rance, C.P., “An outbreak of hemolytic uremic syndrome associated with ingestion of fresh apple juice”, *Journal of Pediatrics* 101, 963–965, 1982.

Stone, R., “Stalin’s Forgotten Cure”, *Science* 298,728-731, 2002.

Suárez, V. B., Quiberoni, A., Binetti, A. G. and Reinheimer, J. A., “Thermophilic lactic acid bacteria phages isolated from Argentinian dairy industries”, *Journal of Food Protection* 65 (10), 1597-1604, 2002.

Sulakvelidze, A. and Kutter, E., “Bacteriophage therapy in humans”, *Bacteriophages: Biology and Application*. Boca Raton: CRC Press, 2005: 381-436

Summers, W. C., “How bacteriophage came to be used by the phage group”, *Journal of the History of Biology* 26, 255-267, 1993.

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

Tolba, M.H., Meshref A.M.S., and Zeinhom, M.M.A. “Biocontrol of *Escherichia coli* O126:H7 in skim milk using bacteriophages”, *American Journal of Animal and Veterinary Sciences* Volume 9, Issue 4, 221-229, 2014.

Tunail, N., “Mikrobiyoloji”, *Pelin Ofset* Ankara, 448, 2009.

Van Regenmortel, M.H.V. Introduction to the species concept. In: M. H. V. Van Regenmortel, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, E. B. Carstens, M. K. Estes, S. M., Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. J. McGeoch, C. R. Pringle & R. B. Wickner (2000) Virus taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, New York & San Diego (Academic Press): 3–16, 2000.

Waldor, M.K. and Mekalanos, J.J., “Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin”, *Science* 272, 4-1910, 1996.

Willshaw, G., Cheasty, T. and Smith, H. R., “*Escherichia coli*. In B. M. Lund, T. C. Baird- Parker, & G. W. Gould (Eds.)”, The Microbiological Safety and Quality of Food. Maryland, USA: *Aspen Inc.*, 2000.

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.

Zhao, T., Doyle, M.P. and Besser, R.E., “Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider with and without preservatives”, *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 2526–2530, 1993.

ÖZGEÇMİŞ

17.08.1989 Mersin doğumlu olan Bilger Taş ilk, orta ve lise öğrenimini Nevşehir’ de tamamladı. 2008 senesinde Abant İzzet Baysal Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, Gıda Mühendisliği bölümünü kazandı ve 2013 senesinde öğrenimini tamamladı. Üniversite öğrenimini tamamladıktan sonra 2014 senesinde Niğde Ömer Halis Demir Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü’nde yüksek lisans öğrenimine başladı. 2013 senesinden beri özel sektörde çeşitli alanlarda çalışma hayatı devam etti ve halen Nevşehir’ de meyve suyu üreten özel bir firmada sorumlu yönetici olarak görev yapmaktadır.

