

T.C.
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI



GIDALARDA FAJ TERAPİ YÖNTEMİ İLE *ESCHERICHIA*
***COLI* O157:H7 VE *SALMONELLA* TYPHIMURIUM**
İNHİBİSYONUNDA KULLANILABİLECEK FAJLARIN
İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SELİN AKBAŞ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. İbrahim ÇAKIR

İKİNCİ TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Esra ACAR SOYKUT

BOLU, MART - 2024

KABUL VE ONAY SAYFASI

Selin AKBAŞ tarafından hazırlanan “**GIDALARDA FAJ TERAPİ YÖNTEMİ İLE *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 VE *SALMONELLA* TYPHIMURIUM İNHİBİSYONUNDA KULLANILABİLECEK FAJLARIN İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU**” adlı tez çalışması jürimiz tarafından Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans Tezi olarak oy birliği kabul edilmiştir. 29/03/2024

Jüri Üyeleri

Danışman
Prof. Dr. İbrahim ÇAKIR
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

Üye
Prof. Dr. Seda KARASU YALÇIN
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

Üye
Prof. Dr. Serap COŞANSU AKDEMİR
Sakarya Üniversitesi

İmza

.....

.....

.....

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. İbrahim KÜRTÜL
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu bildirir,

aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Teze ilişkin Turnitin adlı programında enstitü müdürlüğünce belirlenen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan benzerlik raporuna göre, tezin benzerlik oranı %30'u geçmemektedir.

.....

SELİN AKBAŞ

ÖZET

GIDALARDA FAJ TERAPİ YÖNTEMİ İLE *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 VE *SALMONELLA* TYPHIMURIUM İNHİBİSYONUNDA KULLANILABİLECEK FAJLARIN İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU
YÜKSEK LİSANS TEZİ
SELİN AKBAŞ
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDSİLİĞİ ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. İBRAHİM ÇAKIR)
(İKİNCİ DANIŞMAN: DOÇ. DR. ESRA ACAR SOYKUT)
BOLU, MART - 2024
XII+ 78

Gıda kaynaklı patojenlerin sebep olduğu enfeksiyonlar, dünyada birçok hastalığa, kronik komplikasyonlara ve dünyadaki ölümlerin üçte birine neden olan salgınlara yol açmaktadır. Bu ölümlerin başlıca nedenleri arasında ise gıda kaynaklı patojenlerin başında gelen *Escherichia coli* ve *Salmonella* serotipleri gösterilmektedir. Antibiyotiklerin fazla ve bilinçsiz kullanımı *Salmonella* serotipleri ve *E. coli* O157:H7'de antimikrobiyal direncin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Dünya çapında artan antibiyotik direnci ile fajların gıda, çevre, tıp alanında biyokontrol elemanı olarak kullanımı yeniden hız kazanmıştır. Bakteriyofaj uygulamaları, gıdaların muhafazası ve güvenliğinde etkili bir araçtır. Faj kokteylleri gıda hazırlama yüzeylerinin dekontaminasyonunda ve *Salmonella* Typhimurium, *E. coli* O157:57 kontaminasyon düzeyini azaltmak için gıda işleme tesisi ve gıda zincirinin farklı noktalarında uygulanmaktadır.

Bu çalışmada, Bolu ilinin çeşitli köylerinden toplanan 24 adet çiğ süt örneğinden, *S. Typhimurium* ve *E. coli* O157:H7'ye karşı yüksek litik aktivite gösteren 13 adet bakteriyofaj izole edilmiştir. Bu fajlar saflaştırılıp titreleri 10⁸ PFU/mL'ye ulaştıktan sonra DNA'ları izole edilmiş ve RFLP profilleri belirlenmiştir. Restriksiyon profillerine göre gruplara ayrılan fajlardan *S. Typhimurium* Ssüt12.2.2, Ssüt16.1.1, Ssüt10.2.4, Ssüt10.1.1 fajları ve *E. coli* O157:H7 E12.2.1, E13.2.1 ve E13.3.2 fajları seçilerek karakterize edilmiştir. Bu fajların karakterizasyonu için enfeksiyon çoklukları, konakçı aralıkları, latent dönemleri ve patlama boyutları belirlenmiştir. Karakterize edilen *E. coli* O157:H7 ve *S. Typhimurium* fajları için iki ayrı faj kokteyli hazırlanmış ve hindistan cevizi sütü örneğinde fajların *E. coli* O157:H7 ve *S. Typhimurium* üzerindeki etkinliği belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, faj kokteylinin MOI (Multiplicity of Infection): 1000 değerinde ortamdaki patojen varlığını tamamen ortadan kaldırdığını göstermiştir.

ANAHTAR KELİMELER: Bakteriyofaj, Patojen, Faj Terapi

ABSTRACT

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF PHAGES THAT CAN BE USED IN INHIBITION OF *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 AND *SALMONELLA* TYPHIMURIUM IN FOOD USING PHAGE THERAPY

METHOD

MSC THESIS

SELİN AKBAŞ

BOLU ABANT İZZET BAYSAL UNIVERSITY

INSTITUTE OF GRADUATE STUDIES

DEPARTMENT OF FOOD ENGINEERING

(SUPERVISOR: PROF. DR İBRAHİM ÇAKIR)

(CO-SUPERVISOR: ASSOC. PROF. DR. ESRA ACAR SOYKUT)

BOLU, MARCH 2024

XII+ 78

Infections caused by foodborne pathogens lead to many diseases, chronic complications and epidemics that cause one-third of the deaths in the world. Among the main causes of these deaths are *Escherichia coli* and *Salmonella* spp., which are the leading foodborne pathogens types are shown. Excessive and unconscious use of antibiotics has led to the emergence of antimicrobial resistance in *Salmonella* spp. and *E. coli* O157:H7 species. With the increasing antibiotic resistance worldwide, the use of phages as biocontrol elements in food, environment and medicine has accelerated again. Bacteriophage applications are also an effective tool in food preservation and safety. Phage cocktails are applied to decontaminate food preparation surfaces and at different points of the food processing facility and food chain to reduce the level of *Salmonella* Typhimurium, *E. coli* O157:H7 contamination.

In this study, 13 bacteriophages showing high lytic activity against *S. Typhimurium* and *E. coli* O157:H7 were isolated from 24 raw cow's milk collected from various villages of Bolu province. After these isolated phages were purified and their titers reached 10^8 PFU/mL, their DNAs were isolated and their RFLP profiles were determined. Among the phages divided into groups according to their restriction profiles, *S. Typhimurium* Ssüt12.2.2, Ssüt16.1.1, Ssüt10.2.4, Ssüt10.1.1 phages with the highest titers and *E. coli* O157:H7 E12.2.1, E13.2.1 and E13.3.2 phages were selected and characterized. To characterize these phages, infection abundances, host ranges, latent periods and burst sizes were determined. Two separate phage cocktails were prepared for the characterized *E. coli* O157:H7 and *S. Typhimurium* phages, and the effectiveness of the phages on *E. coli* O157:H7 and *S. Typhimurium* was determined in the coconut milk sample. The results obtained showed that the phage cocktail completely eliminated the presence of pathogens in the environment at an MOI (Multiplicity of Infection): 1000.

KEYWORDS: Bacteriophages, Pathogen, Phage Therapy

İÇİNDEKİLER

Sayfa

KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
ETİK BEYAN.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
ÇİZELGE LİSTESİ.....	x
KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ	xi
TEŞEKKÜR	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Gıda Kaynaklı Patojenler, Bulaşı Kaynakları ve Sebep Olduğu Hastalıklar	3
2.1.1 <i>E. coli</i> O157:H7.....	4
2.1.2 <i>S. Typhimurium</i>	4
2.2 Bakteriyofajlar	5
2.2.1 Bakteriyofajlar ve Genel Özellikleri	5
2.2.2 Bakteriyofajların Sınıflandırılması	6
2.2.3 Bakteriyofajların Yaşam Döngüleri	10
2.2.4 Faj Terapinin Tarihi ve Güncel Uygulamaları	12
3. MATERYAL VE YÖNTEM	19
3.1 Materyal	19
3.1.1 Mikroorganizmalar	19
3.1.2 Bakteriyofajlar	19
3.1.3 Besiyerleri ve Kimyasallar	21
3.1.3.1 Tryptic Soy Broth (TSB).....	21
3.1.3.1 Tryptic Soy Agar (%1.5).....	21
3.1.3.2 Tryptic Soy Yumuşak Agar (%0.5).....	21
3.1.3.3 Fizyolojik Tuzlu Su	21
3.1.3.4 SM (Faj Tamponu)	21
3.1.3.5 Kalsiyum klorür (1M)	22
3.1.4 Çözelti ve Solüsyonlar.....	22
3.1.4.1 Tris-borat-EDTA Tampon Çözeltisi	22
3.1.4.2 Agarose jel.	22
3.1.5 DNA İzolasyonu ve RFLP Analizi.....	22
3.1.4.3 Restriksiyon Enzimleri.....	22
3.1.5.1 Marker	23
3.1.5.2 Ethidium Bromit Çözeltisi	23
3.2 Yöntem	24

3.2.1 <i>Salmonella</i> Typhimurium Mikrobiyal Gelişme Kinetiği	24
3.2.2 <i>E. coli</i> O157:H7 Mikrobiyal Gelişme Kinetiği	24
3.2.3 Bakteriyofajların İzolasyonu ve Saflaştırılması	24
3.2.4 Bakteriyofajların zenginleştirilmesi	25
3.2.5 Bakteriyofajların titresinin belirlenmesi	26
3.2.6 Bakteriyofajların saklanması	26
3.2.7 Konakçı Aralığının Belirlenmesi	26
3.2.8 Bakteriyofajlardan DNA İzolasyonu	27
3.2.9 RFLP Yöntemi ile Fajların Tanımlanması	28
3.2.10 Bakteriyofajların Morfolojik Tanımlaması	28
3.2.11 Bakteriyofajların Tek Aşamalı Gelişme Eğrisi	29
3.2.12 Optimum MOI Değerinin Belirlenmesi	29
3.2.13 Model Gıda Ortamında Faj Etkinliğinin Belirlenmesi	29
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	31
4.1 Bakterilerin Mikrobiyal Gelişme Kinetiği	31
4.2 Bakteriyofajların İzolasyonu ve Saflaştırılması	33
4.3 Bakteriyofajların Konakçı Skalasının Belirlenmesi	34
4.3.1 <i>E. coli</i> O157:H7 fajlarının konakçı spektrumları	34
4.3.2 <i>S. Typhimurium</i> fajlarının konakçı spektrumları	36
4.4 Bakteriyofajların DNA İzolasyonu	39
4.5 Bakteriyofaj Genomlarının RFLP Analizi Sonuçları	40
4.5.1 <i>E. coli</i> O157:H7 Faj Genomlarının RFLP Profili	40
4.5.2 <i>S. Typhimurium</i> Faj Genomlarının RFLP Profili	48
4.6 Latent Dönem Süresinin ve Patlama Büyüklüğünün Belirlenmesi (Tek aşamalı gelişme eğrisi)	53
4.6.1 <i>E. coli</i> O157:H7 fajlarının gelişme eğrisi	54
4.6.2 <i>S. Typhimurium</i> fajlarının gelişme eğrisi	56
4.7 Fajların TEM Görüntüleri	59
4.8 Optimum MOI Değeri Sonuçları	64
4.9 Model Gıda Ortamında Faj Deneme Sonuçları	65
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	69
6. KAYNAKLAR	71

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1. T4 bakteriyofajının yapısı.	6
Şekil 2.2. Bradley'in faj sınıflandırması.	7
Şekil 2.3. <i>Caudoviricetes</i> takımının taksonomik yapısı.	9
Şekil 2.4. Litik ve lizogenik faj döngüsü.	10
Şekil 4.1. <i>S. Typhimurium</i> 'un gelişme eğrisi.	32
Şekil 4.2. <i>E. coli</i> O157:H7'nin gelişme eğrisi.	33
Şekil 4.3. <i>S. Typhimurium</i> suşundan izole edilmiş fajlar.	33
Şekil 4.4. <i>S. Typhimurium</i> ve <i>E. coli</i> O157:H7 suşlarına etkili bazı fajların jel görüntüleri.	39
Şekil 4.5. <i>E. coli</i> O157:H7 fajlarının <i>EcoRI</i> (2-6. kuyucuklar), <i>EcoRV</i> (9-13. kuyucuklar) ve <i>BamHI</i> (16-20. kuyucuklar) enzimi ile kesimi.....	41
Şekil 4.6. <i>E. coli</i> O157:H7 fajlarının <i>HindIII</i> (2-6. kuyucuklar), <i>PstI</i> (9-13. kuyucuklar) ve <i>XbaI</i> (16-20. kuyucuklar) enzimi ile kesimi.	43
Şekil 4.7. <i>E. coli</i> O157:H7 fajlarının <i>ScaI</i> (2-6. kuyucuklar) enzimi ile kesimi.	46
Şekil 4.8. <i>S. Typhimurium</i> fajlarının <i>EcoRV</i> (2-9. kuyucuklar ve <i>XbaI</i> (12-19. kuyucuklar) enzimi ile kesimi.	49
Şekil 4.9. <i>S. Typhimurium</i> fajlarının <i>ScaI</i> enzimi ile kesimi.....	52
Şekil 4.10. <i>E. coli</i> O157:H7 E13.2.1 fajının gelişme eğrisi.	54
Şekil 4.11. <i>E. coli</i> O157:H7 E13.3.2 fajının gelişme eğrisi.	55
Şekil 4.12. <i>E. coli</i> O157:H7 E12.2.1 fajının gelişme eğrisi.	55
Şekil 4.13. <i>S. Typhimurium</i> Ssüt10.1.1 fajının gelişme eğrisi.	56
Şekil 4.14. <i>S. Typhimurium</i> Ssüt10.2.4 fajının gelişme eğrisi.	57
Şekil 4.15. <i>S. Typhimurium</i> Ssüt12.2.2 fajının gelişme eğrisi.	58
Şekil 4.16. <i>S. Typhimurium</i> Ssüt16.1.1 fajının gelişme eğrisi.	58
Şekil 4.17. <i>E. coli</i> O157:H7 E13.2.1. fajların TEM görüntüleri.....	60
Şekil 4.18. <i>E. coli</i> O157:H7 E13.3.2 fajlarını TEM görüntüleri.....	60
Şekil 4.19. <i>E. coli</i> O157:H7 E12.2.1 fajının TEM görüntüsü.....	61
Şekil 4.20. <i>S. Typhimurium</i> Ssüt10.1.1 fajının TEM görüntüsü	61
Şekil 4.21. <i>S. Typhimurium</i> Ssüt10.2.4 fajının TEM görüntüsü	62
Şekil 4.22. <i>S. Typhimurium</i> Ssüt12.2.2 fajının TEM görüntüsü	62
Şekil 4.23. <i>S. Typhimurium</i> Ssüt16.1.1 fajının TEM görüntüsü	63
Şekil 4.24. MOI 0,01, MOI 0,1, MOI 1, MOI 10, MOI 100, MOI 1000 değerlerinde uygulanan <i>S. Typhimurium</i> faj kokteylinin <i>S. Typhimurium</i> üzerinde 24 saatlik süreçteki etkisi.	64
Şekil 4.25. MOI 1, MOI 10, MOI 100, MOI 1000 değerlerinde uygulanan <i>E. coli</i> O157:H7 faj kokteylinin <i>E. coli</i> O157:H7 üzerinde 24 saatlik süreçteki etkisi.	65
Şekil 4.26. <i>S. Typhimurium</i> 'um model gıda ortamında fajlarla engellenmesi.	66
Şekil 4.27. <i>E. coli</i> O157:H7'nin model gıda ortamında fajlarla engellenmesi.	67

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Faj temel özellikleri ve sınıflandırılması- Ackerman sınıflaması..	8
Çizelge 2.2. <i>E. coli</i> ve <i>Salmonella</i> serotipleri için geliştirilen faj preperatları..	13
Çizelge 3.1. Tez çalışması kapsamında kullanılan bakteriyofajlar ve izolasyon kaynakları.....	20
Çizelge 3.2. SM tampon bileşimi.	22
Çizelge 3.3. RFLP analizinde kullanılan enzimler.	23
Çizelge 3.4. Marker hazırlanmasında kullanılan enzimler.	23
Çizelge 3.5. Restriksiyon karışımının hazırlanmasında kullanılan bileşenler ve oranları.	28
Çizelge 4.1. <i>S. Typhimurium</i> gelişme eğrisi analizinde elde edilen absorbans değerleri ve mikroorganizma sayıları.....	31
Çizelge 4.2. <i>E. coli</i> O157:H7 gelişme eğrisi analizinde elde edilen absorbans değerleri ve mikroorganizma sayıları.....	32
Çizelge 4.3. <i>E. coli</i> O157:H7 fajlarının konakçı skalası.....	35
Çizelge 4.4. <i>S. Typhimurium</i> fajlarının konakçı skalası.....	38
Çizelge 4.5. <i>EcoRV</i> restriksiyon enzim kesimi sonucuna göre oluşan farklı faj grupları.	41
Çizelge 4.6. <i>E. coli</i> O157:H7 fajlarının <i>EcoRV</i> enzim kesimine göre oluşan fragment büyüklükleri.....	42
Çizelge 4.7. <i>HindIII</i> restriksiyon enzim kesimi sonucuna göre oluşan farklı faj grupları.	43
Çizelge 4.8. <i>E. coli</i> O157:H7 fajlarının <i>HindIII</i> enzim kesimine göre oluşan fragment büyüklükleri.....	44
Çizelge 4.9. <i>XbaI</i> restriksiyon enzim kesimi sonucuna göre farklı faj grupları.....	44
Çizelge 4.10. <i>E. coli</i> O157:H7 fajlarının <i>XbaI</i> enzim kesimine göre oluşan fragment büyüklükleri.	45
Çizelge 4.11. <i>ScaI</i> restriksiyon enzim kesimi sonucuna göre farklı faj grupları.....	46
Çizelge 4.12. <i>E. coli</i> O157:H7 fajlarının <i>ScaI</i> enzim kesimine göre oluşan fragment büyüklükleri.	47
Çizelge 4.13. <i>EcoRV</i> restriksiyon enzim kesimi sonucuna göre farklı faj grupları.	49
Çizelge 4.14. <i>S. Typhimurium</i> fajlarının <i>EcoRV</i> enzim kesimine göre oluşan fragment büyüklükleri.	50
Çizelge 4.15. <i>XbaI</i> restriksiyon enzim kesimi sonucuna göre farklı faj grupları.....	50
Çizelge 4.16. <i>S. Typhimurium</i> fajlarının <i>XbaI</i> enzim kesimine göre oluşan fragment büyüklükleri.	51
Çizelge 4.17. <i>ScaI</i> restriksiyon enzim kesimi sonucuna göre farklı faj grupları.....	52
Çizelge 4.18. <i>S. Typhimurium</i> fajlarının <i>ScaI</i> enzim kesimine göre oluşan fragment büyüklükleri.	53
Çizelge 4.19. Fajların morfolojik özellikleri.....	63

KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ

dk	: dakika
g	: gram
MOI	: Enfeksiyon Çokluğu Değeri
POB	: Plak Oluşturan Birim



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, bilgileri ve tecrübeleri ile yoluma ışık tutup, bu yolda emin adımlar ile devam etmemi sağlayan değerli danışmanlarım Prof. Dr. İbrahim ÇAKIR ve Prof. Dr. Esra ACAR SOYKUT'a,

Laboratuvar tecrübesini yanımda kazandığım bu yolda bana tüm bilgi ve deneyimini aktaran, her zorlukta yanımda olup birlikte çözüm bulduğum, kalbindeki iyiliğin sonsuz olduğuna inandığım canım dostum Yük. Gıda Müh. Şeyma Betül ENCU'ya,

Çalışma hayatım boyunca hep yanımda olan çalışma arkadaşlarım; Aslı YILDIRIM, Büşra ARICI, Özlem ŞAHİN, Merve ERTEM, Gamze YAMAN'a

Hayatın tüm noktalarında hep yanımda olup desteklerini hissettiğim ve tüm zorluklarda yanımda olan annem ve babam Şükran AKBAŞ ve Emin AKBAŞ ile abim Ali AKBAŞ'a sonsuz teşekkür ederim.

Selin AKBAŞ

1. GİRİŞ

Gıda kaynaklı patojenlerin sebep olduğu enfeksiyonlar, dünyada birçok hastalığa, kronik komplikasyonlara neden olan salgınlara yol açmaktadır (Heredia ve Garcia, 2018). Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nun yapmış olduğu araştırma baz alındığında dünya çapında her yıl 600 milyon kişi kontamine olmuş gıda ve su tüketiminden dolayı hastalanırken 33 milyon kişi hayatını kaybetmektedir (Rani vd., 2021). Bu ölümlerin başlıca nedenleri arasında ise gıda kaynaklı patojenlerin başında gelen *Escherichia coli* ve *Salmonella* serotipleri gösterilmektedir (Assefa ve Bion, 2018). Antibiyotiklerin fazla ve bilinçsiz kullanımı *Salmonella* serotipleri ve *E. coli* O157:H7'de antimikrobiyal direncin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bu nedenle patojenik bakterileri etkisiz hale getirmek ve çevresel riskleri azaltmak için etkin yöntemlere acilen ihtiyaç duyulmaktadır (Ye vd., 2019). Bakteriyofajlar (fajlar) bakterileri spesifik olarak enfekte eden virüslere verilen isimdir. Dünya çapında artan antibiyotik direnci ile fajların gıda, çevre, tıp alanında biyokontrol elemanı olarak kullanımı yeniden hız kazanmıştır (Wang vd., 2019).

Faj sayısının, bakteri sayısının yaklaşık on katı olduğu ve gezegende 10^{31} faj olduğu tahmin edilmektedir (Yang vd., 2020). Fajların, doğal özgüllükleri, doğanın birçok yerinde bulunmaları, insanlara ve hayvanlara zararsız olmaları, bir türe karşı spesifik olmaları gibi birçok avantajları bulunmaktadır (Endersen ve Coffey, 2020; Pinto vd., 2020). Fajlar hem antibiyotiğe duyarlı hem de antibiyotiğe dirençli bakterilere karşı etkili olduğundan son yıllarda iyi bir alternatif olarak kabul edilir (Phongtang vd., 2019). Ayrıca bakteriyofaj uygulamaları, gıdaların muhafazası ve güvenliğinde de etkili bir araçtır. Bakteriyofajlar doğal antimikrobiyallerdir ve farklı gıda ürünlerinde bakteriyel patojenlerin kontrolünde etkinliğini kanıtlamıştır (Kumar vd., 2020). Faj kokteyli gıda hazırlama yüzeylerinin dekontaminasyonunda ve *Salmonella* Typhimurium, *E. coli* O157:H7 kontaminasyon düzeyini azaltmak için gıda işleme tesisi ve gıda zincirinin farklı noktalarında uygulanmaktadır (Moye vd., 2018; Thung vd., 2019).

Bu çalışmada, *S. Typhimurium* ve *E. coli* O157:H7'ye karşı yüksek litik aktivite gösteren 13 adet faj örneği, Bolu ilinin çeşitli köylerinden toplanan 24 adet çiğ inek sütü örneğinden izole edilmiştir. Bu fajların saflaştırılıp titreleri 10^8

PFU/mL'ye ulaştıktan sonra DNA'ları izole edilmiş ve RFLP profilleri belirlenmiştir. Restriksiyon profillerine göre gruplara ayrılan fajlardan *S. Typhimurium* Sst12.2.2, Sst16.1.1, Sst10.2.4, Sst10.1.1 fajları ve *E. coli* O157:H7 E12.2.1, E13.2.1 ve E13.3.2 fajları seçilerek karakterize edilmiştir. Bu fajların karakterizasyonu için enfeksiyon çoklukları, konakçı aralıkları, latent dönemleri ve patlama boyutları belirlenmiştir. Karakterize edilen *E. coli* O157:H7 ve *S. Typhimurium* fajları ile iki ayrı faj kokteyli hazırlanmış ve hindistan cevizi sütü örneğinde fajların *E. coli* O157:H7 ve *S. Typhimurium* zerindeki etkinliği belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, faj kokteylinin MOI (Multiplicity of Infection) 1000 değerinde ortamdaki patojen varlığını tamamen ortadan kaldırdığını göstermiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Gıda Kaynaklı Patojenler, Bulaşı Kaynakları ve Sebep Olduğu Hastalıklar

Gıdalarda meydana gelen bozulmalar, gıdanın dış görünüş, kıvam, tat, kokusunda meydana gelen değişikliklerin sonucunda kalite kayıplarının oluşması sonucunda tüketici tarafından talep edilmeyen gıda ürünleri olarak tanımlanabilir. Gıda bozulmasına biyolojik, kimyasal ve fiziksel faktörler sebep olmaktadır fakat başlıca sebep mikroorganizmaların ortamda gelişmesi ve faaliyetini devam ettirmesidir. Bazı mikrobiyolojik faaliyetler yalnızca gıdalarda bozulmalara sebep olmaktadır. Ancak ortamda patojen özellik gösteren bakterinin bulunması ve mikrobiyal aktivitelerini devam ettirmesi halinde hem gıda bozulmaları hem de bu gıdaları tüketen insanlarda gıda zehirlenmeleri meydana gelmektedir (Diao vd., 2018). Gıda kaynaklı patojenlerin neden olduğu hastalıklar dünya çapında önemli halk sağlığı sorunlarından. Patojenler ile kontamine olmuş gıdaların tüketilmesi sonucunda insanlarda birçok hastalık ve hatta ölümler meydana gelmektedir (Schirone vd., 2019). Kontaminasyon havanın, toprağın suyun kirlenmesi nedeni ile olabileceği gibi gıdanın işlenmesi sırasında hasattan sofraya kadar olan bütün aşamalarda risk oluşturmaktadır (Uesma ve Manukumar, 2018).

Salmonella spp., *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* ve patojenik *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Enterococcus* spp. en fazla sayıda salgına neden olan gıda kaynaklı patojenlerdir. Bunlar arasında *S. aureus*, *Salmonella* serotipleri ve *E. coli* dünya çapında çeşitli gıdalar yoluyla yayılan en önemli türlerden üçüdür (Yu vd. 2021; Foddai ve Grand, 2020).

FDA'ya göre insanda hastalığa neden olan patojenlerin bulaşı kaynaklarına bakıldığında, *Campylobacter* spp. çiğ ve az pişmiş kümes hayvanları etinde, *Salmonella* spp. et, kümes hayvanları eti ve yumurtada, *E. coli* et ve pastörize edilmemiş süt, *Clostridium botulinum* konserve gıdalar, *S. aureus*, *Bacillus* spp., *Listeria* spp. çiğ ve az pişmiş et, sebzeler, pastörize edilmemiş süt ve yumuşak peynir tüketilmesi sonucunda hastalığa neden olmaktadır (Safavieh vd., 2015).

Gıda kaynaklı patojenlerin neden olduğu hastalıklar intoksikasyon, toksikoenfeksiyon ve enfeksiyon olarak üç sınıfa ayrılmaktadır. Toksin ile kontamine olmuş gıdanın tüketilmesi sonucunda zehirlenme, patojen ile kontamine

olmuş gıdanın tüketildiğinde patojenin konakçının vücudunda toksin üretmesi sonucunda toksikoenfeksiyon, gıda kaynaklı patojenin tüketilmesi sonucunda ise gıda kaynaklı enfeksiyon meydana gelmektedir (Anvar vd., 2021). Gıda kaynaklı enfeksiyonların neden olduğu bağırsak dışı enfeksiyonlar arasında kan dolaşımı enfeksiyonları (BSI), menenjit ve salmonellozun neden olduğu enfeksiyonlardır. *L. monocytogenes* menenjit, shiga toksini üreten *E. coli* hemolitik üremik sendrom (HUS), *C. botulinum* felç ve bebek botulizmuna neden olmaktadır (Riley, 2020).

2.1.1 *E. coli* O157:H7

Escherichia coli, *Enterobacteriaceae* familyasına ait, sıcak kanlı hayvan ve insan bağırsağında bulunan, çubuk şeklinde, Gram negatif bir bakteridir (Niveditha vd., 2021). *E. coli* suşlarının birçoğu patojenik etki göstermez iken enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), enteropatojenik *E. coli* (EPEC), enteroinvaziv *E. coli* (EIEC), enterohemorajik *E. coli* (EHEC), enteroagregatif *E. coli* (EAEC) ve diffuse adhering *E. coli* (DAEC) suşları patojenik özellik göstermektedir (Halkman vd., 2019). *E. coli* O157:H7, *E. coli* bakteri türünün virulent bir suşudur ve gıda kaynaklı hastalıklara sebep olan ilk beş patojen arasında yer almaktadır (Ayalew Assefa vd., 2018).

İlk olarak 1980’li yıllarda az pişmiş hamburger köftesini tüketen hemorajik kolit hastalarından izole edilen Shiga toksini üreten *E. coli* O157:H7 gıda kaynaklı hastalıkların başlıca nedenleri arasındadır (Rani vd., 2021). Enterohemorajik *E. coli* O157:H7 Shiga toksini üreterek insanlarda kanlı ishal, yüksek ateş, mide krampı, kusma, hemolitik üremik sendrom, trombotik trombositopenik purpura, böbrek yetmezliği gibi hastalıklara sebep olmaktadır (Niveditha vd., 2021; de Assis vd., 2021).

Araştırmalar sonucunda *E. coli* O157:H7 salgınlarının bulaş kaynakları arasında pişmemiş sığır eti, pastörize edilmemiş süt ve kontamine olmuş su ve gıda ürünleri bulunmaktadır (de Assis vd.,2021; Lee vd., 2021). Gıda kaynaklı hastalıklardan 1982-2006 yılları arasında meydana gelenlerin %52 oranında gıdalardan, %9 oranında ise su, hayvan teması ve kişiden kişiye fekal bulaş yolu ile olduğu bildirilmiştir (Rani vd., 2021; Ma vd., 2019).

2.1.2 *S. Typhimurium*

Salmonella, *Enterobacteriaceae* familyasına ait, Gram negatif, çubuk şeklinde, fakültatif anaerop bir bakteridir (Jajere vd., 2019). *Salmonella* cinsi *S. enterica* ve *S. bongori* olmak üzere iki türe (Dos Santos vd., 2019) ve 2659 serotipe

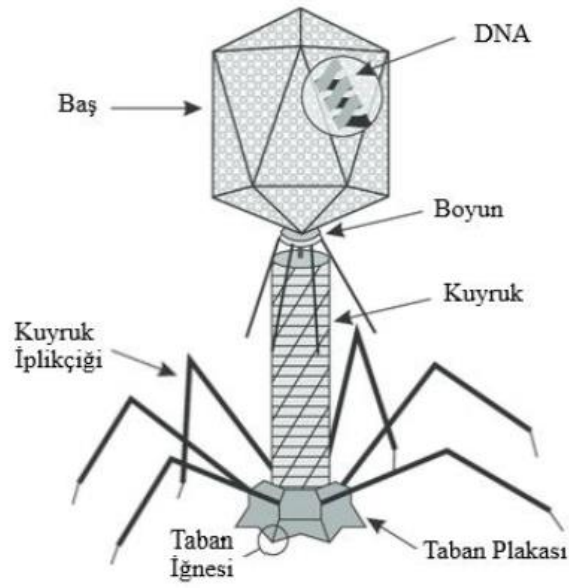
ayrılmaktadır (Shebs-Maurine vd., 2021). Bu serotipler arasında gıda kaynaklı hastalıklara neden olan *S. Typhimurium*, yaygın olarak izole edilmesi, zoonotik potansiyeli ve geniş konakçı yelpazesine sahip olmasından dolayı *Salmonella* serotipleri arasında öne çıkmaktadır (Herrero-Fresno vd., 2018; Sattar vd., 2022). *S. Typhimurium*'un bulaş kaynakları; çiğ veya pişmemiş yumurta, kümes hayvanları eti, hayvansal gıdalar, çiğ süt, sebze ve meyvelerdir (Fulgione vd., 2018; Silveira vd., 2018). Enfeksiyonun neden olduğu karın krampı, ishal, bulantı, kusma, ateş semptomları kontamine olmuş gıdaların tüketilmesinden 12-72 saat sonra ortaya çıkmaktadır (Esmael vd., 2021). Bununla birlikte, dehidrasyon durumlarında ve bakteriler gastrointestinal sistemin ötesine geçtiğinde yaşamı tehdit eden durumlar ortaya çıkabilmektedir (Moye vd., 2018). Enfeksiyon için risk grubunda ise bağışıklığı düşük kişiler, yaşlılar, hamileler, bebekler bulunmaktadır (Walker vd., 2021).

2.2 Bakteriyofajlar

2.2.1 Bakteriyofajlar ve Genel Özellikleri

Bakteriyofaj, bakterileri enfekte eden virüslere verilen isimdir. Bakteriyofajlar dünya çapında çok çeşitli ve sayıları oldukça fazladır (10^{31}). Çok sıcak ve çok soğuk ortamlar da dahil olmak üzere gezegenin birçok yerinde fajlara rastlamak mümkündür. Fajlar gıdaların muhafazasından, hastalıkların tedavi edilmesine kadar geniş bir kullanım alanına sahiptir (Gordillo Altamirano & Barr, 2019; Sharma vd., 2017). Fajlar çevre dostudur ve çevrede doğal olarak çoğalıp, biyolojik olarak da kolayca parçalanabilirler. Birçok yerde bulunan fajların saflaştırılmaları ve zenginleştirilmeleri kolay olmaktadır. Kalıntı bırakmayan bu mikroorganizmaların üretim maliyetleri düşük olduğundan kimyasallara karşı iyi bir alternatif olarak karşımıza çıkmaktadırlar (Sabri vd., 2021)

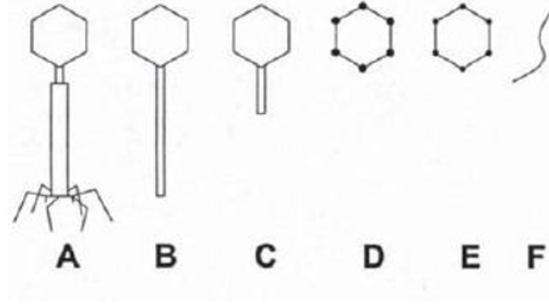
Faj genomlarının boyutu değişkendir (~3,5 kb ila ~540 kb arasında değişir) ve tek veya çift sarmallı DNA'dan (ssDNA, dsDNA) veya RNA'dan (ssRNA, dsRNA) oluşur. Genellikle 20-200 nm uzunluğundaki faj, DNA ile dolu bir kafa, yakalı uzun kuyruklar, kısa sivri uçlu bir taban plakası ve genetik materyali aktarmaya yardımcı kuyruk liflerinden oluşmaktadır (Zuppi vd., 2022). Şekil 2.1'de, *Escherichia coli*'ye etkili T4 fajının genel yapısı verilmiştir (Tokarz-Deptuła vd., 2011).



Şekil 2.1. T4 bakteriyofajının yapısı.

2.2.2 Bakteriyofajların Sınıflandırılması

Bakteriyofajların sınıflandırılmasına yönelik çalışmalar elektron mikroskobu ve preparat hazırlama tekniklerinin gelişmesi ile ortaya çıkmıştır. Fajların sınıflandırılması ile ilgili ilk çalışma 1967 yılında Bradley tarafından gerçekleştirilmiştir. Bradley sınıflamasında fajlar; nükleik asit tipine, konakçı aralığına ve morfolojik yapısına göre 6 basit (A-F) sınıfa ayrılmaktadır (Şekil 2.2). Daha sonraki yıllarda fajların morfolojik yapılarının yanı sıra nükleik asit yapılarının da dikkate alındığı “Ackermann Sınıflandırması” geliştirilmiştir (Çizelge 1) (Acar Soykut ve Tunail, 2009).



Tip	Nükleik Asit	Özellik	Örnek
A	DNA, 2, L	Polihedral baş, uzun kuyruk etrafında kontraktıl kılıf kuyruk levhası (hegzaganol) kuyruk iğnesi ve fibrilleri	T2, T4, T6
B	DNA, 2, L	Polihedral baş, kontraktıl kılıfı olmayan uzun kuyruk	T1, T5, λ
C	DNA, 2, L	Polihedral baş, kontraktıl kılıfı olmayan kısa kuyruk	T3, T7, P22
D	DNA, 1, C	Kuyruksuz, ikosahedral baş, kapsid üzerinde çok büyük kapsomer	Φ X174, S13
E	RNA, 1, L	Kuyruksuz, ikosahedral baş, kapsid üzerinde çok küçük kapsomer	F2R17, Fr, MS2
F	RNA, 1, L	Fleksibl filamentöz	FE, fd, M13

1: Tek iplikçik L: Lineer

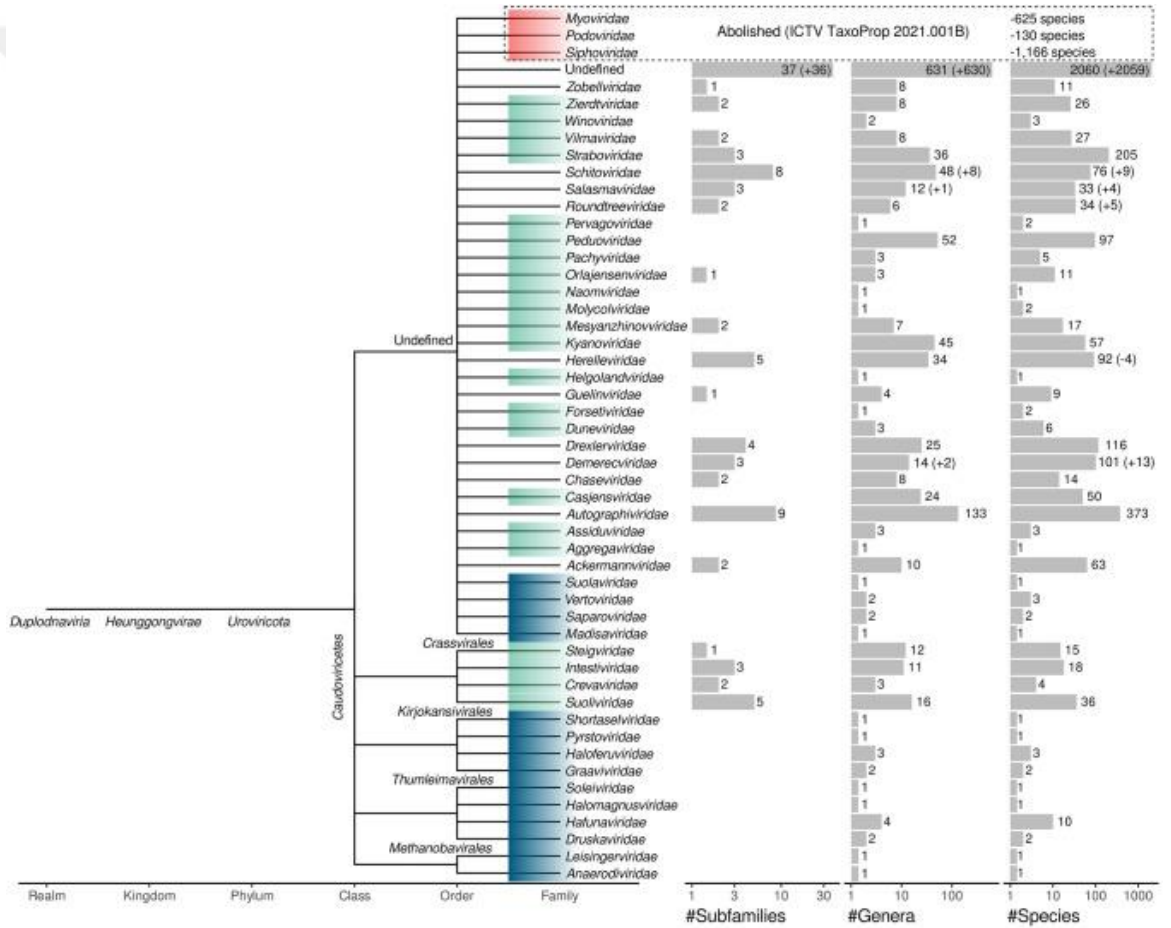
Şekil 2.2. Bradley'nin faj sınıflandırması.

Çizelge 2.1. Faj temel özellikleri ve sınıflandırılması-Ackermann sınıflaması.

Morfoloji	Nükleik Asit	Takım ve Aile	Cins	Örnek	Üye Sayısı	Özellikleri
Kuyruklu	DNA, ds, L	<i>Caudovirales</i>	15		4950	
		<i>Myoviridae</i>	6	T4	1243	Kontraktıl kuyruk
		<i>Siphoviridae</i>	6	λ	3011	Uzun kuyruk
		<i>Podoviridae</i>	3	T7	696	Kısa kuyruk
Polihedral	DNA, ss, C	<i>Microviridae</i>	4	Φ X174	40	Lipid içeren kompleks
	ds, C, T	<i>Corticoviridae</i>	1	PM2	3	Kapsid
	Ds, L	<i>Tectiviridae</i>	1	PRD1	19	Lipoprotein kaplı
	RNA, ss, L	<i>Leviviridae</i>	2	MS2	39	Kapsid
	Ds, L, S	<i>Cystoviridae</i>	1	Φ 6	1	Lipid zarf
	DNA, ss, C	<i>Inoviridae</i>	2	Fd	57	Uzun ve kısa filament
		<i>Lipothrixviridae</i>	1	TTV1	6	Lipid zarf
		<i>Rudiviridae</i>	1	SIRV1	2	TMV benzeri yapı
Pleomorfik	DNA, ds, C, T	<i>Plasmaviridae</i>	1	L2	6	Kapsid yok, lipid zarf
	Ds, C, T	<i>Fuselloviridae</i>	1	SSV1	8	Kapsid yok, limon formu
ds: çift sarmal, C: sirküler, S: parçalı, ss: tek sarmal, L: lineer, T: süper helikal						

Eski faj taksonomisi sınıflandırmasına göre, bakteriyofajların morfolojik özellikleri baz alınarak kuyruklu bakteriyofajlar olarak bilinen *Caudovirales* üç aileye ayrılıyordu. Bunlar uzun kasılabilen kuyruklu *Myoviridae*, uzun kasılmayan kuyruklu *Siphoviridae* ve kısa kasılmayan kuyruklu *Podoviridae* aileleriydi (Iwasaki vd., 2018). Fakat ICTV (Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi) ciddi bir değişiklik yaparak *Caudovirales* sınıfını kaldırmış ve bunun yerine ikosaedral

kapsitli ve çift sarmallı genomuna sahip tüm kuyruklu bakteriyal ve arkeal virüsleri gruplandırmak için *Caudoviricetes* sınıfı oluşturulmuştur (Şekil 2.3). *Caudoviricetes* sınıfı artık dört takıma atanan 14 aileyi içermektedir. Bu takımlardan üçü, arkeleri enfekte eden virüsleri kapsar. Henüz aile veya takım sıralamasında sınıflandırılmamış 37 alt aile ve 631 cinse ek olarak 33 aile daha kurulmuş ancak henüz bir takıma atanmamıştır. Ayrıca podovirüs, miyovirüs ve sifovirüs gibi tanımlayıcıların bilim tarihi için önemi açıktır. Bu terimlerin, bakteriyofajların ayırt edici özelliklerini betimlemek için kullanımına karar verilmiş olmakla birlikte, bu terimler taksonomik olarak bir anlam ifade etmemektedir (Turner vd., 2022).



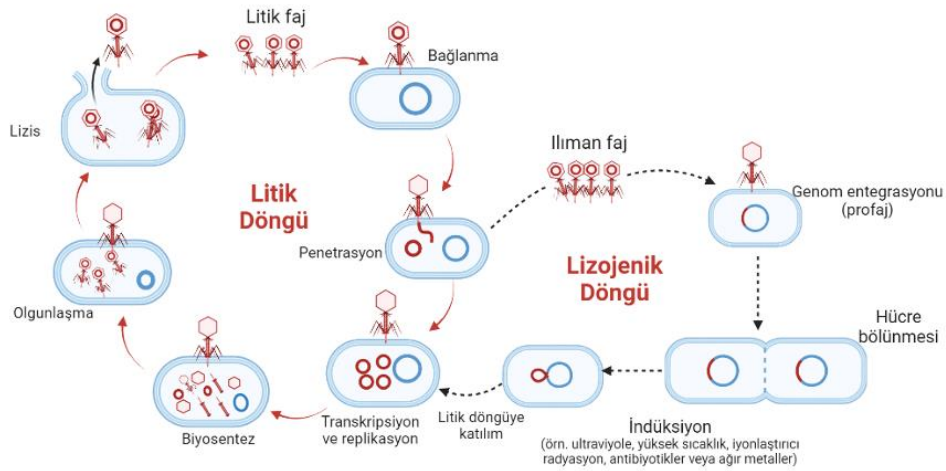
Şekil 2.3. *Caudoviricetes* takımının taksonomik yapısı.

Şekilde 2021 yılında oluşturulan yeni bakteri arke ve virüs aileleri mavi ve yeşil renk ile sınıflandırmadan kaldırılan aileler ise kırmızı renk ile gösterilmiştir (Turner vd., 2022).

2.2.3 Bakteriyofajların Yaşam Döngüleri

Litik Fajlar

Litik fajlar için, üreme döngüsünde bağlanma, penetrasyon, transkripsiyon, biyosentez, olgunlaşma ve lizis dahil olmak üzere altı aşama yer almaktadır ve bunlar genellikle enfekte konakçı bakterilerin yok edilmesiyle sonuçlanmaktadır (Ye vd., 2019). Bakteriyofajın bakteriyi enfekte etmesi adsorpsiyon (bağlanma) basamağı ile başlamaktadır (Şekil 2.4). Adsorpsiyon basamağı konakçı hücre duvarı ile kuyruklu fajlarda taban fibrillerinin ya da kuyruksuz fajlarda kapsomerlerin yüksek uyumu ile gerçekleşmektedir. Bakteriyofajın bakteriye özgünlüğünde adsorpsiyon basamağı önemli rol oynamaktadır. Bakteri yüzeyindeki pilus, teikoik asit, flagella, lipoprotein, protein ve lipopolisakkarit molekülleri ve hücre duvarının bazı diğer bileşenleri bakteriyofaj adsorpsiyon bölgeleri olarak bilinmektedir.



Şekil 2.4. Litik ve lizojenik faj döngüsü.

Bununla birlikte, ortamın pH değeri, Mg^{+2} , Ca^{+2} gibi iyonların varlığı ile elektrostatik etkileşimler adsorpsiyon basamağını etkileyebilmektedir (Sağlam vd., 2017). Penetrasyon basamağında faj nükleik asidini enzimatik reaksiyonlar aracılığıyla konakçı bakteri hücresinin içine aktarmaktadır. Zarar görmeden konakçı bakterinin hücre zarını geçen faj nükleik asidi, periplazmik boşluk içinde bulunan nükleazlardan ve restriksiyon enzimlerinden korunmak için DNA/RNA'sını yapışkan uçlar vasıtasıyla hızla daireselleştirmekte veya lineer uçlarını korumaya almaktadır. Ardından faj DNA/RNA'sı, konakçı bakterinin RNA

polimerazına tanıtılmakta ve erken genlerin transkripsiyonu gerçekleşmektedir. Erken genler ile faj genomu korunmakta ve konakçı bakteri, fajın çoğalabilmesine olanak sağlayacak şekilde yeniden yapılandırılmaktadır. İlerleyen aşamada, konakçı bakteride yeni faj DNA/RNA'sının sentezlenmesinde kullanılacak ürünleri kodlayan ara genlerin ve faj partiküllerinin şekillenmesi ile DNA/RNA'sının paketlenmesini sağlayan enzimleri kodlayan bir dizi geç genlerin transkripsiyonu gerçekleşmektedir (Guttman vd., 2005). Viral genomun girişinden hemen sonra, faj genomunu kopyalamak ve hücrenin sentetik kapasitesini faj üremesine yönlendirecek şekilde hücresel mekanizmayı değiştirmek için gerekli olan proteinlerin ekspresyonu başlamaktadır. Bu aşamada faj DNA'sının birkaç kopyasının sentezi meydana gelmektedir. Olgunlaşma veya morfogenez aşaması, yeni faj bileşenlerinin virionlar halinde bir araya geldiği dönemdir. Montaj kendiliğinden veya spesifik enzimlerin yardımıyla gerçekleşebilmektedir. Liziz aşamasında ise spesifik enzimler hücre duvarını içeriden hidrolize ederek döngüyü yeniden başlatabilen ve yeni duyarlı konakçı hücreleri enfekte edebilen bulaşıcı fajları serbest bırakmaktadır (Hanlon vd., 2007).

Lizogenik Fajlar

Ilıman fajlar, konakçıların genomuna bir profaj olarak entegre olabilir veya bir lizojen oluşturan kromozom dışı elementler olarak varlığını sürdürebilmektedir (Luque ve 2020). Lizojenik replikasyon döngüsünde faj ayrıca duyarlı bir konakçı bakteriye bağlanır ve genomunu konakçı hücre sitoplazmasına sokar. Bununla birlikte, faj genomu bunun yerine bakteriyel hücre kromozomuna entegre edilir veya bir epizomal element olarak muhafaza edilir; her iki durumda da kopyalanır ve zarar vermeden yavru bakteri hücrelerine aktarılır. Entegre faj genomlarına profajlar adı verilir ve bunları içeren bakterilere lizojenler adı verilir. Profajlar, çoğunlukla değişen çevresel koşullara yanıt olarak litik bir replikasyon döngüsüne geri dönebilmekte ve konakçıları öldürebilmektedir (Ptashne, 2006).

Ilıman fajlar konakçının biyolojisini etkiler ve bu etkinin sonucuna ise ortamda buluna konakçı veya konakçı olmayan hücre toplulukları etkilenir. Bu etkinin sonucunda ise profajların entegre edilmesi hücre genomunu düzenler, profajlar yeni işlevler kazandırabilir ya da mevcut olan metabolizma, fajlara karşı bağışıklık gibi işlevleri değiştirerek hücre fizyolojisini etkilerler, transdüksiyon yoluyla antibiyotik direnç gösteren bakteri DNA'sının transferini kolaylaştırır ve

son olarak bakteri türlerini parçalayıp ve hücreleri lize ederek bakterilerin hücre yapısını değiştirebilir (Howard-Varona vd., 2017).

2.2.4 Faj Terapinin Tarihi ve Güncel Uygulamaları

Birinci Dünya Savaşı zamanlarında savaştaki askerleri tedavi etmek için Felix d'Herelle tarafında mikroorganizma yiyen virüsler keşfedilmiştir (Gordillo vd., 2019). Fakat bakterisidal aktiviteye dair ilk gözlemler 1986'da Ernest Hankin tarafından Hindistan'da Ganj Nehri suyundan alınan örneğin incelenmesi sonucunda bakteri yok eden özelliğin olduğunu keşfetmiştir. (Hankin, 1986). Brown Enstitüsü'nde virüsler ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır Frederick Twort ise, gözlemlenen bu anti-bakteriyel aktiviteye bir virüsün aracılık ettiğini öne süren ilk kişiydi fakat dönemin maddi yetersizlikleri nedeni ile Twort çalışmalarına devam edememiştir (Twort, 1961). Bakteriyofajlar daha sonra, Felix d'Herelle tarafından Pasteur Enstitüsü'nde kesin olarak keşfedildi ve bakteriyofaj olarak adlandırıldı (d'Herelle, 1961). d'Herelle 1917 yılında Paris'teki Hospital des Enfants-Malades'te dizanteri hastalarında faj tedavisini uygulamış ve tedavinin başlamasından itibaren geçen 24 saatte hastalarda iyileşme gözlemlenmiştir (Bruynoghe ve Maisin, 1921). Faj terapi çalışmaları 1930 ve 1940'ların başında hız kazanmış ancak, antibiyotiklerin keşfedilmesinin ardından bilim insanları bu alanda çalışmalara yönelmiş ve faj terapi çalışmaları geri planda kalmıştır. Yirminci yüzyılın başından itibaren bakterilerin artan antibiyotik direncinden dolayı patojenlerin biyokontrolü için faj terapi çalışmaları yeniden gündeme gelmiş ve hızlanmıştır (Abedon vd., 2011). Günümüzde ise çoklu ilaca dirençli bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisi ve faj terapi alanındaki çalışmalar Gürcistan'ın Tiflis kentindeki Eliava Bakteriyofajlar, Mikrobiyoloji ve Viroloji Enstitüsü'nde ve Polonya'nın Wrocław kentindeki Ludwik Hirszfild İmmünoloji ve Deneysel Terapi Enstitüsü'nün Bakteriyofaj Terapi Birimi'nde devam etmektedir (García vd., 2019). Ayrıca dünya çapında birçok şirket gıda güvenliğinin sağlanması için fajlar üzerinde çalışmalar yapmakta ve faj preparatlarını ticarileştirmektedir. Çizelge 2.2'de *E. coli* ve *Salmonella* spp. türleri için geliştirilmiş faj preparatları görülmektedir (Moye vd., 2018).

Çizelge 2.2. *E. coli* ve *Salmonella* serotipleri için geliştirilen faj preparatları.

Firma Adı	Faj Preperatı	Konakçı Bakteri
FINK TEC GmbH (Hamm, Almanya)	Secure Shield E1	<i>E. coli</i>
Intralix, Inc. (Baltimore, MD, Amerika Birleşik Devletleri)	Ecocide® (EcocidePX™)	<i>E. coli</i> O157:H7
Intralix, Inc. (Baltimore, MD, Amerika Birleşik Devletleri)	EcoShield™	<i>E. coli</i> O157:H7
Intralix, Inc. (Baltimore, MD, Amerika Birleşik Devletleri)	SalmoFresh™	<i>Salmonella</i> spp.
Micreos Food Safety (Wageningen, Hollanda)	PhageGuard S™	<i>Salmonella</i> spp. <i>E. coli</i> O157:H7
Passport Food Safety Solutions (West Des Moines, IA, Amerika Birleşik Devletleri)	Finalyse®	<i>E. coli</i> O157:H7
Phagelux (Shanghai, Çin)	SalmoPro®	<i>Salmonella</i> spp.

Yirminci yüzyılın en önemli keşiflerinden olan antibiyotikler patojen mikroorganizmaların tedavisinde önemli bir rol oynamıştır. Fakat antibiyotiklerin bilinçsiz, düzensiz ve uzun süreli kullanılmasında dolayı patojenler antibiyotiklere karşı direnç kazanmıştır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nın raporuna göre ilaca dirençli patojenlerin neden olduğu enfeksiyonlar en üst seviyeye ulaşmıştır. İlaça dirençli *E. coli* ve *Salmonella* gibi gıda kaynaklı patojenler de gıda endüstrisinde ortaya çıkmıştır. Avrupa antimikrobiyal direnç surveys ağı (EARS-Net) verilerine göre, *E. coli*'nin sefalosporinlere karşı direncinin Avrupa'da önemli ölçüde arttığı; sefalosporinlerin, florokinolonların ve aminoglikozitlerin *E. coli* üzerindeki kombine tedavi etkisinin ise önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir (Ge vd., 2022).

Önceki yıllarda patojen bakterilerden kaynaklanan hastalıklar ve enfeksiyonlar antibiyotik tedavisi uygulanarak önlenilmekteyken, günümüzde bakterilerin antibiyotiklere karşı direnç kazanması antibiyotikle tedavi yöntemini gittikçe zorlaştırmakta, bunun sonucu olarak da faj çalışmalarının hız kazanarak ve antibiyotikle tedavinin yerini alma yolunda ilerlemesini sağlamaktadır (Kong vd., 2019). Faj tedavisinin geleneksel antibiyotik tedavisine kıyasla birçok avantajı vardır. Fajlar zorlu çevre şartlarından etkilenmedikleri için etkili kalmakta ve konakçı bakteri popülasyonu büyük ölçüde azalınca kadar etkinliklerini devam ettirmektedirler. Bugüne kadar izole edilen çoğu faj, konakçıları için nispeten yüksek bir özgünlüğe sahiptir. Bu özelliğinden dolayı fajlar, insan mikrobiyotasına da zarar vermeden antibiyotiklerin yol açtığı kimyasal etkileri ortadan

kaldırabilmektedir. Fajlar izole edilmesi ve çoğaltılması kolay olduğundan ekonomik yönden diğer yöntemlere kıyasla maliyeti daha düşüktür. Buna ilave olarak fajlar, gıdaların işlenmesi ve muhafazası sırasında uygulanan işlemlere ve çevresel koşullara dayanıklılık gösterdikleri için gıdaların raf ömrünü uzatma potansiyeline sahiptir (Doss vd., 2017; Sillankorva vd., 2012).

Fajların, faj terapi uygulamalarında kullanılabilmesi için doğru bir şekilde sınıflandırılmış ve özelliklerinin belirlenmiş olması gerekmektedir. Bu durum hem uygulamanın güvenliği açısından hem de bakteri eliminasyonunun mümkün olduğunca etkin bir şekilde sağlanabilmesi açısından önemlidir. Bu amaçla incelenen özelliklerin başında replikasyon parametreleri gelmektedir. Latent dönem süresi, patlama büyüklüğü ve % adsorpsiyon oranı gibi parametrelerden yola çıkılarak fajların replikasyon özellikleri ortaya konmakta, bu özellikler de fajın, faj terapi amacıyla kullanıma uygun olup olmadığını ortaya koymaktadır. Örneğin faj terapi çalışmaları için kullanılacak fajlarda latent dönem süresinin kısa, patlama büyüklüğü değerininse yüksek olması istenmektedir (Tayyarcan, 2017).

Replikasyon parametrelerinin yanı sıra izole edilen fajların doğru bir şekilde sınıflandırılması gerekmektedir. Fajlar sınıflandırılırken kullanılan yöntemlerden biri konakçı dizgelerinin belirlenmesidir, ancak bu her koşulda geçerliliği olan çok doğru bir yaklaşım değildir. Çünkü bir konakçıya etkili birden fazla faj olabildiği gibi bir fajın lize edebildiği birden fazla konakçı da olabilmektedir. Bu durum sınıflandırma için olmasa da patojenlerin kontrolü için önemlidir ve fajların kullanımında avantaj sağlamaktadır. Ancak ister biyokontrol ve/veya biyokoruyucu ajan olarak, isterse faj terapi uygulamalarında kullanılacak olsunlar mutlaka etkili oldukları konakçıların belirlenmesi, yani konakçı dizgelerinin çıkarılması gerekmektedir. Bir faj ne kadar çok konakçıya etkili olabiliyorsa o kadar etkin kullanılabilir.

Fajların sınıflandırılması için kullanılan temel parametrelerden biri de morfolojik yapılarıdır. Fajların morfolojik yapısı geçirimli elektron mikroskobu (Transmisyon Elektron Mikroskobu, TEM) kullanılarak ortaya konmakta (Bao vd., 2011; Litt ve Jarono, 2017) ve Bradley Sınıflamasına göre morfolojik yapı bakımından birbirlerinden ayrılmaktadır (Bradley, 1967). Sınıflandırmada temel olan diğer parametre de genetik farklılıkların ortaya konmasıdır. Bu amaçla, birçok alanda kullanılabilen ve en güvenilir yöntemlerden biri olan restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (restriction fragment length polymorphism, RFLP)

çalışmalarının gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Bu sayede aynı konakçı spektrumuna sahip iki fajın birbirinden farklı olduğu ortaya konabilmektedir. Dolayısıyla fajlar ile yapılan genetik çalışmaların başlangıcında restriksiyon enzimleri ile kesim analizleri ve oluşan fragmentlerin DNA/DNA hibridizasyon çalışmaları yapılabilmektedir. Temel analizler olarak gerçekleştirilen bu çalışmalardan sonra fajların farklılığı ortaya konmakta ve bir sonraki çalışmalara geçilmektedir. Bu bağlamda, literatürde *S. Typhimurium* ve *E. coli* O157:H7 fajlarının sınıflandırılmasında RFLP analizinin kullanıldığı pek çok çalışma bulmak mümkündür. Bu çalışmalardan birinde 33 adet *S. Enteritidis* fajının sınıflandırılması için kullanılan yöntemlerden biri de RFLP olmuş ve bu amaçla *EcoRI* ile *HindIII* restriksiyon enzimleri kullanılmıştır (James vd., 2001). Bir başka çalışmada *EcoRV* enzimi kullanarak faj DNA fragmentlerinin RFLP profilleri çıkarılarak sınıflandırma gerçekleştirilmiştir (Sillankarvo vd., 2010). *HindIII* ve *EcoRV* enzimlerinin kullanıldığı başka bir çalışmada, *Salmonella* fajlarının sınıflandırılması ve karakterizasyonu için RFLP analizinin yanı sıra, litik spektrumun çıkarıldığı ve faj replikasyon parametrelerinin ortaya konduğu görülmüştür (Santos vd., 2010). Moreno Switt ve arkadaşlarının çalışmasında, özdeş genom büyüklüklerini ve benzer veya özdeş lizis profillerini temsil eden *Salmonella* faj izolatları ayrıca *EcoRI* enzimi kullanılarak RFLP analizi ile karakterize edilmiştir. Bu çalışmada faj izolatları *EcoRI* enzimine direnç gösterdiğinde RFLP analizi için ek enzimler (*RsaI*, *KpaI*, *HpaI*, *PsaI* ve *SalI*) kullanıldığı belirtilmiştir (Mareno Switt vd., 2013). *E. coli* O157:H7 fajlarının kullanıldığı bir çalışmada RFLP analizi için *EcoRI* ve *HindIII* restriksiyon enzimlerinin kullanıldığı bildirilmiştir (Niu vd., 2012). Bir başka çalışmada ise *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*, *PstI*, *XbaI*, *AseI*, *BglII*, *EcoRV*, *MluI*, *SacI* ve *SalI* enzimleri kullanılmış, bunlardan *HindIII*, *XbaI* ve *EcoRV* enzimlerinin yüksek aktivite gösterdiği belirtilmiştir. Ayrıca *EcoRV*'nin en farklı hidrolize ürün bantlarını oluşturduğu ve sürekli kültürden alınan fajların kaynağını belirlemek için kullanıldığı belirtilmiştir (Kunisaki ve Tanji, 2010). *E. coli* O157:H7 fajlarının RFLP analizlerini içeren diğer çalışmalarda ise *EcoRI*, *HindIII*, *SmaI* (Osawa vd., 2000) ve *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *BamHI*, *XbaI*, *PstI* restriksiyon enzimlerinin kullanıldığı görülmüştür (López-Cuevas vd., 2011).

Fajların güvenli olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuş ve hayvan/insanlarda tedavi amacıyla kullanımı yaygınlaşmış olsa da bazı fajların bakteriyel virölense önemli katkıda bulundukları veya transdüksiyon yoluyla gerçekleşen yatay gen transferlerinde vektör özelliği gösterdikleri de bilinmektedir. Bir dizi insan patojeni için virölens faktörleri; plazmitler, bakteriyofajlar, konjugatif transpozonlar, bütünleyici ve konjugatif elementler ve patojenite adaları gibi mobil ve bütünleştirici genetik elemanlar üzerinde kodlanmaktadır. Tarihsel olarak, fajlar, patojenik bakterilerin ortaya çıkmasında önemli rol oynadığı bilinen, en çok çalışılmış ve en iyi bilinen elemanlardandır (Wagner ve Wolder, 2002). Zamanla, bir dizi toksin geninin de fajlar tarafından kodlandığı keşfedilmiştir ve buna göre bakteriyel patojenitede fajların rolü, toksin genlerinin bakteri suşları arasında yayılmasına yol açmaktır. Bununla birlikte, toksin genlerinin bakteriyofajlar tarafından kodlanan çeşitli virölans faktörlerinin yalnızca bir alt kümesi olduğu gittikçe daha açık bir hale gelmiştir. Örneğin, bazı fajlar, faj tarafından kodlanmayan virölens genlerinin ekspresyonunu arttıran düzenleyici faktörleri şifrelerken, diğerleri, virölenslik özelliği ile ilgili bakteriyel bileşenleri değiştiren enzimleri kodlamaktadır. Buna ilave olarak fajlar, bakteriyel virölense doğrudan katkıda bulunmalarını sağlayan özelliklere de sahip olabilmektedir (Wagner ve Wolder, 2002). Virölens faktörlerini kodlayan bakteriyofajlar, bakteriyel konakçıları, faj lizojenik dönüşümü olarak bilinen bir süreçte, patojenik olmayan bir suştan patojenik bir suşa veya artmış virölense sahip bir suşa dönüşürebilmektedir. Bu virölens faktörleri, *Podoviridae*, *Siphoviridae*, *Myoviridae* ve *Inoviridae* ailelerinin üyesi olan bir dizi morfolojik çeşitlilikle bakteriyofaj üzerinde bulunmaktadır (Boyd ve Brüssow, 2002). Örneğin, patojenik olmayan *E. coli* suşlarının, Shiga toksin genlerinin (Stx I ve II) faj aracılığıyla transferi sonucu enterohemorajik suşlara dönüştüğu gösterilmiştir (Müller vd., 2002; Muniesa vd., 2000). Enterohemorajik *E. coli* suşları, STEC suşları ve *Shigella dysenteriae* serotip1 suşları, hepsi de lambdoid fajlar tarafından kodlanan Shiga toksinleri (Stx1, Stx2) ve enterohemolizin (Hly) üretimine bağlı olarak ciddi hemorajik kolit ve hemolitik üremiye neden olan bakterilerdir. Stx bir AB5 toksini olup aktif bir A alt birimi ile beş özdeş B alt birimi içermektedir. Suşa bağlı olarak, stx geni farklı fajlar aracılığıyla kodlanabilmekte ve çok farklı miktarlarda toksin üretimi gerçekleşebilmektedir. Örneğin, *E. coli* O157 suşları olan Sakai ve EDL933'ün genomik sekansları çıkarılarak birçoğu virölensle ilgili genleri

kodlayan ve lambdoid olan, sırasıyla 18 ve 12 profajın varlığı ortaya konulmuştur (Boyd, 2012).

S. Typhimurium ve *E. coli* O157:H7 fajlarının gıda alanında pek çok uygulaması bulunmaktadır. Bu uygulamaları konu eden çalışmalardan birinde, faj kokteyllerinin kümes hayvanlarındaki ortalama *S. Enteritidis* sayılarını 0,3-1,3 log birimi azalttığı bildirilmiştir (Sklar vd., 2001). Bir başka çalışmada, *Salmonella* faj SJ2 aktivitesi, Cheddar peynir üretiminde test edilmiştir (Modi vd., 2001). Fajların varlığında pastörize peynirlerde 89 gün sonra canlı *Salmonella*'ya rastlanmazken, bu bakteri çiğ süt peynirlerinde yaklaşık 50 KOB/mL dolaylarında canlı kalmıştır. Diğer bir çalışmada *S. Typhimurium* ve *Campylobacter jejuni* üzerine etkili fajlar, çeşitli enfeksiyon çokluğu değerlerinde ham ve pişmiş sığır eti üzerine aşılansmış farklı yoğunlukta konakçı bakterilerin üzerine ilave edilmiş ve depolama sıcaklığına göre 2-3 log birimden 5,9 log birim üstüne kadar önemli ölçüde konakçı inaktivasyonu sağlandığı belirlenmiştir (Bigwood vd., 2008). Bu konuda *E. coli* fajları kullanılarak yapılan çalışmalardan birinde patojen gelişimini önlemek için et yüzeyine faj uygulaması yapılmıştır. Bunun için 10^3 KOB/g *E. coli* O157:H7 ile kontamine edilmiş et yüzeylerine üç farklı faj içeren bir karışım uygulanmış ve örneklerin çoğunda, 37°C'de depolandıktan sonra canlı hiçbir hücre saptanamadığı bildirilmiştir (O'flynn vd., 2004). Fajların yüzey dezenfeksiyonu için kullanıldığı bir başka çalışmada, paslanmaz çelik yüzeyler 30 mL 10^8 KOB/mL *E. coli* O157 süspansiyonuna ve daha sonra da 5×10^7 POB/mL (Plak Oluşturan Birim/mL)'lik bir faj KH1 süspansiyonuna daldırılmıştır. Bu yaklaşım, 1 günlük uygulama sonunda *E. coli* sayısını 1,2 log birim azaltmıştır (Sharma vd., 2005).

Bu tez çalışması kapsamında *E. coli* ve *Salmonella* Typhimurium fajlarının tek aşamalı gelişme eğrileri çıkarılarak replikasyon parametreleri belirlenmiş, böylece faj terapide kullanım potansiyeli en yüksek olan fajlar seçilmiştir. Fajların tanımlanması ve sınıflandırılması amacıyla morfolojik özelliklerinin belirlenmesinde TEM görüntülerinden; moleküler tanımlamada faj genomik materyalinin RFLP analizlerinden elde edilen veriler kullanılmıştır. Çalışmada ayrıca seçilen fajların gıda ortamında *E. coli* ve *Salmonella* Typhimurium inhibisyonunda etkinliğini göstermek amacıyla model gıda olarak Hindistan cevizi

sütüne ilave edilen bakterilerin faj uygulaması sonucu etkinlik denemeleri gerçekleştirilmiştir.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Mikroorganizmalar

Bu tez çalışması kapsamında BAİBÜ Gıda Mühendisliği Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan *S. Typhimurium* ve *E. coli* O157:H7 suşları, bu suşlara özgü bakteriyofajların izolasyonu ve karakterizasyonunda kullanılmıştır.

Bu suşlara özgü izole edilen fajların konakçı spektrumunun belirlenmesinde BAİBÜ Gıda Mühendisliği Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* SS9027 ve *Bacillus cereus* suşları, Tarım ve Orman Bakanlığı, Bolu İl Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğünden temin edilen *Salmonella* NETC 12694, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *E. coli* O157:H7 ATCC 4388 suşları ile daha önceki projeler kapsamında izole edilen *Listeria monocytogenes* suşları kullanılmıştır.

3.1.2 Bakteriyofajlar

Tez çalışması kapsamında, *E. coli* O157:H7'ye etkili fajlar BAİBÜ/BAP 2018.29.02.1371 nolu “*Listeria monocytogenes*’in Bakteriyofajlar ile Biyokontrolü” adlı projede kullanılan faj izolasyon materyallerinden; *S. Typhimurium* suşuna özgü fajlar ise Bolu ili merkez köylerindeki süt üreticilerinden doğrudan toplanılan çiğ süt örneklerinden izole edilmiştir (Çizelge 3.1.).

Çizelge 3.1. Tez çalışması kapsamında kullanılan bakteriyofajlar ve izolasyon kaynakları.

Konakçı Bakteri	Faj	İzolasyon Kaynağı
<i>E. coli</i> O157:H7	E2.1	Çiğ süt BAİBÜ BAP Proje No: 2018.29.02.1371)
	E2.2	
	E2.3	
	E12.1.1	
	E12.1.2	
	E12.2.1	
	E12.2.2	
	E12.3.1	
	E12.3.2	
	E12.3.3	
	E13.1.1	Ördek gaytası (BAİBÜ BAP Proje No: 2018.29.02.1371)
	E13.2.1	
	ES16.1	16 nolu çiğ süt örneği (Sultanbey Köyü)
	ES16.2	
	ES24.1	24 nolu çiğ süt örneği (Kasaplar Köyü)
<i>S. Typhimurium</i>	Ssüt 10.1.1	10 nolu çiğ süt örneği (Karaköy Köyü)
	Ssüt 10.2.1	
	Ssüt 10.2.2	
	Ssüt 10.2.3	
	Ssüt 10.2.4	
	Ssüt 12.1.1	12 nolu çiğ süt örneği (Doğancı Köyü)
	Ssüt 12.1.2	
	Ssüt 12.2.1	
	Ssüt 12.2.2	
	Ssüt 16.1.1	16 nolu çiğ süt örneği (Sultanbey Köyü)
	Ssüt 16.1.2	
	Ssüt 16.2.1	
	Ssüt 19.1	19 nolu çiğ süt örneği (Sandallar Köyü)
	Ssüt 19.2	
	Ssüt 19.3	
	Ssüt 20.1.1	20 nolu çiğ süt örneği (Sandallar Köyü)
	Ssüt 20.2.1	
	Ssüt 20.2.2	

3.1.3 Besiyerleri ve Kimyasallar

3.1.3.1 Tryptic Soy Broth (TSB)

Tryptic Soy Broth (Merck 1.05459) besiyeri bu çalışmada bakteri kültürlerinin canlandırılması ve yeniden stoklarının hazırlanması amacı ile kullanılmıştır. TSB, 30 g tartılmış ve 1000 mL saf su içerisinde çözündürülmüştür. Hazırlanan besiyeri tüpler içersine 3 mL dağıtılmış ve 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir.

3.1.3.1 Tryptic Soy Agar (%1.5)

Tryptic Soy Agar bu çalışmada konakçı bakterilerin mikrobiyal büyüme kinetiği oluşturulmasında ve bakterilere özgü fajların izolasyonu, titresinin belirlenmesi, saflaştırılması, konakçı aralığının belirlenmesi, gelişme eğrisi çıkarılması, adsorbsiyon oranının belirlenmesi, sıcaklık stabilitesi belirlenmesi, optimum MOI değerinin saptanması ile gerçek örnek denemesinde kullanılmıştır. TSA, TSB besiyerinden 30 g ve agardan 15 g tartılıp 1000 mL saf su içerisinde çözündürülmüş ve 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Sterilizasyon işleminin ardından steril 1 M CaCl₂ eklenmiş ve steril petri kutularına dağıtılmıştır (Acar Soykut ve Tunail, 2007)

3.1.3.2 Tryptic Soy Yumuşak Agar (%0.5)

Tryptic Soy Yumuşak Agar, bakterilere özgü fajların izolasyonu, titresinin belirlenmesi, saflaştırılması, konakçı aralığının belirlenmesi, gelişme eğrisi çıkarılması, adsorbsiyon oranının belirlenmesi, sıcaklık stabilitesi belirlenmesinde kullanılmıştır. TSB besiyerinden 30 g ve agardan 5 g tartılıp 1000 mL saf su içerisinde çözündürülmüş ve agarın erimesi için kaynatma işlemi uygulanmıştır. Hazırlanan yumuşak agar tüplere 3 mL dağıtılmış ve 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir (Acar Soykut ve Tunail, 2007)

3.1.3.3 Fizyolojik Tuzlu Su

Fizyolojik Tuzlu Su (FTS; %0.85), konakçı bakterilerin ve konakçı bakteriye özgü fajların seri dilüsyonlarının hazırlanmasında kullanılmıştır. Sodyum klorür 8,5 g tartılıp 1000 mL saf su içerisinde çözündürülmüş ve tüplere 9 mL dağıldıktan sonra 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir.

3.1.3.4 SM (Faj Tamponu)

Faj tamponu hazırlanmasında aşağıda verilen içerik 1000 mL çift destile su ile tamamlanıp 121°C’de 15 dk otoklavda sterilize edildikten sonra oda sıcaklığında muhaza edilmiştir (Acar Soykut ve Tunail, 2007).

Çizelge 3.2. SM Tamponunun bileşimi

Bileşen	Miktar
NaCl	5.8 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	2 g
1M Tris.Cl (pH 7.5)	50 mL
Jelatin çözeltisi (%2)	5 mL
Çift destile su	1000 mL

3.1.3.5 Kalsiyum klorür (1M)

Sigma-Aldrich marka kalsiyum klorür, 11 g tartılıp balon joje içerisinde 100 mL'ye tamamlanmış ve tüplere dağıtılıp 121°C'de 15 dakika otoklavlanıp sterilize edilmiştir.

3.1.4 Çözelti ve Solüsyonlar

Tris-borat-EDTA Tampon Çözeltisi

TBE (0.5X) tampon çözeltisi hazırlanmasında Thermo Scientific™ 10X TBE Buffer çözeltisinden 50 mL alınıp çift destile su ile 1000 mL'ye tamamlanmış ve ardından hazırlanan çözelti, kirliliklerinden uzaklaştırmak için 0.22 µm steril filtreden geçirilmiştir.

3.1.4.1 Agarose jel

Agarose jel çözeltisi %0.8'lik olarak hazırlanmıştır. Bu amaçla 0.8 g agaroz (Merck, Almanya) üzerine 100 mL saf su eklenip mikrodalgada ısıtılarak agarozun erimesi sağlanmıştır (Acar Soykut ve Tunail, 2007).

3.1.5 DNA İzolasyonu ve RFLP Analizi

3.1.4.2 Restriksiyon Enzimleri

RFLP yönteminde kullanılan restriksiyon enzimlerinin listesi Çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. RFLP analizinde kullanılan enzimler.

Restriksiyon Enzimi	Marka ve Kodu
<i>EcoRI</i> (10 U/ μ L)	Thermo Scientific™ ER0271
<i>EcoRV</i> (10 U/ μ L)	Thermo Scientific™ ER0301
<i>BamHI</i> (10 U/ μ L)	Thermo Scientific™ ER0051
<i>HindIII</i> (10 U/ μ L)	Thermo Scientific™ ER0501
<i>PstI</i> (10 U/ μ L)	Thermo Scientific™ ER0611
<i>XbaI</i> (10 U/ μ L)	Thermo Scientific™ ER0681
<i>ScaI</i> (10 U/ μ L)	Thermo Scientific™ ER0431

Marker

Marker hazırlanmasında aşağıda verilen içerik PCR tüplerinde birleştirip 65°C’de 5 dk ardından buzda 3 dk bekletilip hazır hale getirilmiş ve jele yüklenmiştir.

Çizelge 3.4. Marker hazırlanmasında kullanılan bileşenler

Bileşen	Miktar
Marker	1 μ L
Yükleme tamponu	1 μ L
Bidistile su	4 μ L
Toplam Hacim	6 μL

Ethidium Bromit Çözeltisi

Hazırlanan %0.8’lik agarose jel 45-50°C’ye ulaştığında hazırlanan jel miktarının oranında ethidium bromide (Thermo Scientific™ 17896) eklenmiş ve ardından jel tankına dökülmüştür.

3.2 Yöntem

3.2.1 *Salmonella* Typhimurium Mikrobiyal Gelişme Kinetiği

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Gıda Mühendisliği kültür koleksiyonunda bulunan *Salmonella* Typhimurium suşu, 5 mL TSB besiyerine aşınlanmış ve 37°C'de 18-24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda aktif bakteri kültüründen %1 oranında alınmış ve 200 mL steril TSB besiyerine yeniden aşılama yapıp 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin başladığı andan, 300 dk'ya kadar her 30 dk'da bir kültür karıştırıldıktan sonra 2 mL örnek alınmış ve spektrofotometrede okuma ile kültürel sayım işlemleri gerçekleştirilmiştir. Spektrofotometrede okuma işleminde ilk olarak kör numune (ekim yapılmamış steril besiyeri) kullanılarak sıfırlama işlemi yapılmıştır. Ardından her 30 dk'da bir aşınmış bakteri kültüründen 2 mL spektrofotometre küvetine alınmış ve 600 nm dalga boyunda okuma yapılmıştır. Bu işlem ile eş zamanlı olarak aşınmış bakteri kültürünün FTS ile 10⁻⁸'e kadar seri dilüsyonları hazırlanmış ve yayma yöntemi kullanılarak mikrobiyolojik ekimleri yapıp 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin bitiminde gerekli dilüsyonlardan yapılan ekimlerde koloni sayımı yapılmış ve bakteri sayıları hesaplanmıştır (Şener, 2021; Zorlugenç, 2009).

3.2.2 *E. coli* O157:H7 Mikrobiyal Gelişme Kinetiği

3.2.3 Bakteriyofajların İzolasyonu ve Saflaştırılması

Faj izolasyonu için Bolu'nun çeşitli köylerinden toplanan çiğ süt örneklerinden 100'er mL alınarak içerisine kazeinin çökmesi için 6 mL %10'luk laktik asit eklenmiştir. Oda sıcaklığında bir süre kazeinin çökmesi bekledikten sonra çiğ süt örnekleri kaba filtre kağıdından süzölmüş ve 8000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda elde edilen süpernatanta, miktarının %10'u kadar kloroform eklenerek örnek bakteri kalıntılarından uzaklaştırılmıştır. Hazırlanan örneklerden 5'er mL steril tüplere alınmış ve üzerlerine son konsantrasyonu 10 mM olan CaCl₂ ile logaritmik fazda olan kültürden 100 µL aktarılmış ve 15-20 dakika oda sıcaklığından bekletildikten sonra, üzerine çift kuvvette 5 mL TSB ilave edilmiş ve 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda hücre artıklarını ve kalıntılarını uzaklaştırmak için 8000 rpm'da 10 dakika santrifüj işlemi uygulanmış, süpernatant yeni steril bir tüpe aktarılmıştır. Süpernatant üzerine miktarının %10'u oranında kloroform eklenmiştir. Bu işlem bir önceki günün içinde faj olduğu kabul edilen örnek kullanılarak üç pasaj olacak şekilde tekrar edilmiştir.

Son pasajdaki faj varlığını belirlemek için çift tabaka agar yöntemi kullanılmıştır. Steril tüpler içerisinde bulunan 3 mL TSB yumuşak agar içerisine logaritmik fazdaki kültür eklenmiş (*E. coli* O157:H7: 5 µL, *Salmonella* Typhimurium: 150 µL) ve daha sonra petri kutularındaki agar üzerine dökülmüştür. Yumuşak agar katılaştıktan sonra petri kutusunda daha önceden işaretlenmiş bölgelere 10 µL süpernatant damlatılmış ve 37°C’de 18-24 saat inkübasyon sonunda işaretlenen bölgelerde liziz oluşumuna bakılmıştır (Acar Soykut ve Tuanil, 2007; Esmael vd., 2021).

Titresi 10^7 - 10^8 ’e yükselen fajlar için tek plak yöntemi kullanılarak saflaştırma işlemine geçilmiştir. Saflaştırma işlemi yapılan fajın, FTS’de 10^{-7} ’ye kadar seri dilüsyonları hazırlanmış ve 3 mL yumuşak agar içerisine seri dilüsyonlardan 100 µL, logartmik fazdaki bakteriden (*E. coli* O157:H7: 5 µL, *Salmonella* Typhimurium: 150 µL) ve son konsantrasyonu 10 µL olacak şekilde CaCl_2 eklenmiştir. Ardından petri kutularında önceden dökülmüş olan agar üzerine yayılmış ve 37°C’de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda farklı plak morfolojileri dikkate alınarak, liziz plakları steril mikroenjektör ile kesilerek Eppendorf tüpüne alınmış ve üzerine 100 µL TSB eklenerek fajın sıvı besiyerine geçmesi sağlanmıştır. Bu işlem sonrasında Eppendorf tüpü içerisine 10 µL logartmik fazdaki bakteri ve CaCl_2 (10 mM) eklenmiş ve adsorbsiyon için oda sıcaklığında 15 dakika beklenmiştir. Adsorbsiyon işlemi tamamlandıktan sonra 1 mL sıvı besiyeri eklenmiş ve inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon işleminin ardından hücre artıkları ve kalıntıları uzaklaştırmak için 12500 rpm’de 5 dakika santrifüj yapılmış ve %10 oranında kloroform eklenmiştir. Bu işlem üç kez olacak şekilde tekrar edilerek fajın saflaştırılması sağlanmıştır.

3.2.4 Bakteriyofajların zenginleştirilmesi

Zenginleştirme işleminde, steril Eppendorf tüpü içerisine 50 µL bakteriyofaj, logaritmik fazdaki bakteri ve son konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde CaCl_2 eklenmiş ve adsorbsiyonun gerçekleşmesi için oda sıcaklığında 15 dakika beklenmiştir. Bu süre sonunda ortama 1 mL TSB eklenmiş ve 37°C’de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda hücre artıkları ve kalıntıları uzaklaştırmak için 12500 rpm’de 5 dakika santrifüj yapılmış ve elde edilen

süpernatant üzerine miktarının %10'u kadar kloroform eklenmiştir. Bu işlem fajların titresi 10^7 - 10^8 'e ulaşınca kadar tekrarlanmıştır.

3.2.5 Bakteriyofajların titresinin belirlenmesi

Bakteriyofajların 10^{-6} 'ya kadar seri dilüsyonları hazırlanmış ve çift tabaka agar yöntemi kullanılarak titreleri belirlenmiştir. Bunun için içerisinde 3 mL TSB yumuşak agar bulunan tüp içerisine logaritmik fazdaki bakteri eklenmiş ve önceden petri kutusuna dökülmüş agar üzerine yayılmıştır. Yumuşak agarın katılaşması için bir süre beklenmiş ve önceden petri kutusu üzerine işaretlenmiş bölgelere seri dilüsyonu hazırlanmış faj, 10'ar μ L damlatılmış ve 37°C 'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda işaretli bölgelerdeki faj plakları sayılmış ve faj titresini belirlenmiştir.

$$\text{Faj titresini} = \frac{\text{plak sayısı}}{\text{dilüsyon faktörü} \times \text{filtrat hacmi } (\mu\text{L})} \times \frac{1000 \mu\text{L}}{\text{mL}}$$

3.2.6 Bakteriyofajların saklanması

Titresi 10^7 - 10^8 'e yükselmiş bakteriyofajlar, 0.45 μm veya 0.22 μm por çapındaki steril filtrelerden geçirilmiş ve ardından %50 oranında gliserollü ortamda -20°C 'de muhafaza edilmiştir.

3.2.7 Konakçı Aralığının Belirlenmesi

Fajların konakçı aralığının belirlenmesinde; izole edilen 5 adet *E. coli* O157:H7, 8 adet *Salmonella* Typhimurium fajı kullanılmıştır. Seçilen fajlar, kültür koleksiyonumuzda bulunan *S. Typhimurium* (Ankara), *S. Enteritidis* (Ankara), *Listeria* spp. 3, 4, 10, 12, 15, 18, 26 kodlu bakteriler ile spot test uygulamak suretiyle karşılaştırılmış ve homolog konakçıları dışında litik aktivite gösterip göstermedikleri belirlenmiştir.

Konakçı aralığının belirlenmesinde, içerisinde 3 mL TSB yumuşak agar bulunan tüp içerisine logaritmik fazdaki kültür eklenmiş ve petri kutusunda önceden dökülmüş agar üzerine yayılmıştır. Ardından agar üzerine steril mikro enjektör yardımıyla 10 μ L faj damlatılmış ve 37°C 'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda işaretlenmiş bölgelerde faj plaklarının olup olmadığı kontrol edilmiştir (Esmael vd., 2021).

3.2.8 Bakteriyofajlardan DNA İzolasyonu

Titresi 10^7 - 10^8 olan bakteriyofajlar önceden belirtilen yöntem kullanılarak yüksek hacimde zenginleştirilmiştir. Elde edilen 40 mL'lik faj solüsyonu 4°C'de 17500 rpm hızda 90 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası faj peletleri 200 µL SM tampon içerisinde çözülmüştür (Karaynir, 2021). Çöktürme işleminin ardından konsantre faj süspansiyonuna bakteriyel nükleik asitleri parçalamak için 1 µL DNase, 0.8 µL RNase, 1 µL tampon eklenmiş ve 37°C'de bir saat inkübasyona bırakılmıştır (Chen vd., 2019). Bu aşamadan sonra Thermo Scientific™ GeneJET Viral DNA/RNA Purification Kit prosedürü kullanılarak, DNA izolasyonuna geçilmiştir.

1. Konsantre faj süspansiyonu üzerine 200 µL liziz çözültisi ve 50 µL proteinaz K eklenip vortekslenmiş ve 56°C'de 15 dakika bekletilmiştir. Ardından örnek, yüksek hızda 3-5 saniye santrifüj edilmiştir.
2. Üzerine 300 µL etanol eklenip vortekslenmiş ve ardından oda sıcaklığında 3 dakika bekletilmiştir.
3. Bir sonraki aşamaya geçilmeden önce spin kolonları hazırlamak için 50 µL kolon hazırlama sıvısından ilave edilmiş ve sıvının tamamen kolondan geçmesi için beklenilmiştir.
4. Yaklaşık 200 µL faj lizatu spin kolonlar üzerine transfer edilmiş ve 6000 g'de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj işleminin ardından yıkama tüpü atılıp yerine yeni yıkama tüpü yerleştirilmiştir.
5. Spin kolon üzerine 700 µL Yıkama Tamponu 1 eklenmiş ve 6000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminin ardından yıkama tüpü atılıp yerine yeni yıkama tüpü yerleştirilmiştir.
6. Spin kolon üzerine bu sefer 500 µL Yıkama Tamponu 2 eklenmiş ve 6000 g'de 1 dakika tekrar santrifüjlenmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında yıkama tüpü atılıp yerine yeni yıkama tüpü yerleştirilmiştir ve bu işlem iki kez gerçekleştirilmiştir.
7. Yıkama tamponu 2 ile yıkama işleminin ardından 16000 g'de 3 dakika santrifüj yapılmış ve yıkama tüpü atılıp yerine steril 1.5 mL'lik Eppendorf tüpü yerleştirilmiştir.

8. Genom toplama çözeltisi 56°C’de önceden ısıtılmış ve spin kolon üzerine 50 µL eklenip oda sıcaklığında beklenmiştir. Ardından 13000 g’de 1 dakika santrifüj edilmiş ve spin kolon atılmıştır.
9. Tüm işlemler sonunda izole edilen bakteriyofaj DNA’ları sonraki aşamalarda kullanılmak üzere -18°C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.9 RFLP Yöntemi ile Fajların Tanımlanması

E. coli O157:H7 fajları *EcoRI*, *EcoRV*, *BamHI*, *HindIII*, *PstI*, *XbaI*, *ScaI* enzimleri ile (Amarillas vd., 2018), *S. Typhimurium* fajları ise *EcoRV*, *XbaI*, *ScaI* restriksiyon enzimleri ile kesime alınmıştır. Restriksiyon karışımı; aşağıda belirtilen bileşenler, son hacim 20 µL olacak şekilde steril PCR tüplerinde birleştirilip 37°C’de 3 saat inkübasyona bırakılmıştır (Santos vd., 2010; Akter vd., 2019). Bu süre sonunda kesim karışımları 60 V’da %0,8 jel elektroforezinde yürütülmüştür.

Çizelge 3.5. Restriksiyon karışımının hazırlanmasında kullanılan bileşenler ve oranları.

Bileşen	Miktar
Restriksiyon enzimi	1 µL
Restriksiyon enzimine özgü tampon	2 µL
Faj DNA’sı	Değişken
Deiyonize su	Değişken
Toplam Hacim	20 µL

3.2.10 Bakteriyofajların Morfolojik Tanımlaması

RFLP analizi sonuçlarına göre birbirinden farklı olduğu tespit edilen 3 adet *E. coli* O157:H7 ve 4 adet *Salmonella* Typhimurium fajının morfolojik yapısı Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) ile görüntülenmiştir. İlk olarak seçilen fajlar 10 mL hacimde zenginleştirilmiş ve ardından 4°C’de 17500 rpm’de 90 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası oluşan faj peletleri, 200 µL SM tampon ile yıkanıp birleştirilmiştir. Ardından analiz için hazırlanan yüksek konsantrasyondaki faj süspansiyonu, formvar karbon kaplı bakır ızgara (grid) üzerine damlatılmış ve 15 dakika boyunca ızgara üzerine tutunmaları için beklenmiştir. Bu işlem sonunda fajlar, karanlıkta 10 dakika boyunca %2 fosfotungstik asit ile negatif olarak boyanmış ve daha sonra TEM kullanılarak faj

morfolojilerinin tespit edileceği elektron mikrograflar elde edilmiştir. Görüntüleme işlemi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Merkezi Laboratuvarı'nda bulunan TEM mikroskobu ile hizmet alımı yoluyla gerçekleştirilmiştir (Kazimierczak vd., 2019).

3.2.11 Bakteriyofajların Tek Aşamalı Gelişme Eğrisi

Tek aşamalı gelişme eğrisi analizinde ilk olarak, 18 saatlik aktif bakteri kültürü %1 oranında 10 mL TSB besiyerine inoküle edilip, 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır ve bu süre boyunca belirli aralıklarla spektrofotometrede okuma yapılmıştır. Ardında absorbans değeri 0.5'e ulaşan logaritmik fazdaki bakteri (10^8 KOB/mL) ve faj MOI değeri 0.01 olacak şekilde eşit oranda karıştırılmış ve adsorbsiyon işlemi için 37°C'de 15 dk beklenmiştir. İnkübasyon süresinin ardından adsorbe olmayan fajları uzaklaştırmak için 8000 rpm'de 15 dakika santrifüj işlemi yapılmış ve süpernatant dökülmüştür. Elde edilen faj-bakteri peletleri, 10 mL TSB besiyerinde çözöldükten 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin başladığı andan itibaren 30 dk' ya kadar her 5 dk'da bir ve 30. dk'dan 90. dk'ya kadar her 20 dk'da bir 10 µL örnek alınmıştır. Alınan örneklerin FTS'de 10^{-8} 'e kadar seri dilüsyonları hazırlanıp, çift tabaka agar yöntemi ile faj titreleri belirlenmiştir (Ding vd., 2020).

3.2.12 Optimum MOI Değerinin Belirlenmesi

Logaritmik fazdaki konakçı bakteri ve faj farklı MOI (0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1000) değerlerinde olacak şekilde steril santrifüj tüplerinde birleştirilmiş ve 37°C'de 30 dk., 1, 3, 6, 9 ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda her bir örnek grubu steril FTS ile 1:9 oranında 10^{-8} 'e kadar seyreltilip, TSB ve XLD agara yayma kültür yöntemi kullanılarak ekim yapılmış ve petriler 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin ardından petrilerde gelişen koloniler sayılıp mikroorganizma yükü belirlenmiş ve bakteri sayısındaki düşüşün en iyi olduğu MOI değeri optimum MOI değeri olarak belirlenmiştir (Kropinski 2009; Manohar vd., 2019).

3.2.13 Model Gıda Ortamında Faj Etkinliğinin Belirlenmesi

Faj etkinliğinin ortaya konması için UHT hindistan cevizi sütü model gıda olarak belirlenmiştir. Bu deneme için konakçı skalası geniş, RFLP analizine göre birbirinden farklı ve buna göre replikasyon parametreleri belirlenmiş faj terapiye en

uygun fajlar seçilmiştir. İlk olarak hindistan cevizi sütü steril falcon tüplerine 10'ar mL dağıtılmıştır. Bir önceki aşamada belirlenen optimum MOI değerini sağlayacak şekilde logaritmik fazdaki konakçı bakteri ile faj miksi içinde hindistan cevizi sütü bulunan tüplere eklenmiştir. Negatif kontrol grubu için ise süte sadece log fazındaki konakçı bakteri, pozitif kontrol grubu için ise süte sadece faj miksi (belirlenen MOI değerindeki kadar) eklenip, hazırlanan tüm örnekler 37°C'de 1, 3, 6, 9 ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin ardından her bir örnek grubu steril FTS ile 1:9 oranında 10^{-8} 'e kadar seyretilip, 100 µL örnek alınarak TSB ve selektif agara yayma kültür yöntemi ile ekim yapılmıştır. Örnekler 37°C'de 18-24 saat inkübe edilmiş ve bu sürenin ardından gelişen koloni sayıları ile mikroorganizma yükü belirlenmiştir (Tang vd.,2019).

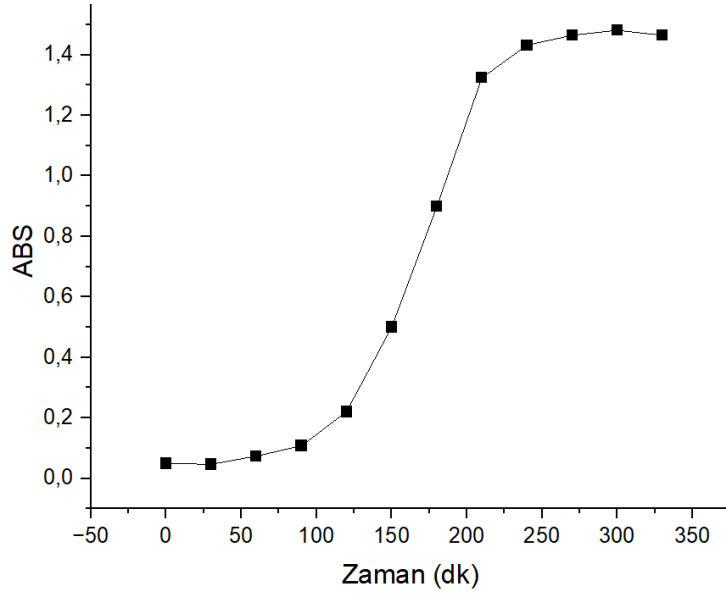
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Bakterilerin Mikrobiyal Gelişme Kinetiği

Fajların tek aşamalı gelişme eğrisi, adsorbsiyon oranı, optimum MOI, gerçek örnek denemesi değerlerinin bulunmasında ortamdaki faj ve bakteri sayısının belirlenmesi ve bu sayılara göre MOI değerinin bilinmesi gerekmektedir. Bu nedenle konak suşların gelişme eğrisi çıkarılmıştır. Gelişme eğrisinin belirlenmesinde 18 saatlik aktif kültür %1 oranında TSB besiyerine aşılanmış, her 30 dakikada bir spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda okuma yapılmış ve TSB agar besiyerine yayma yöntemi kullanılarak ekim yapılmıştır. Elde edilen değerlerle (Çizelge 4.1, Çizelge 4.2) konakçı suşların gelişme eğrileri oluşturulmuş (Şekil 4.1, Şekil 4.2.) ve konakçı suşun log fazı belirlenmiştir.

Çizelge 4.1. S. Typhimurium gelişme eğrisi analizinde elde edilen absorbens değerleri ve mikroorganizma sayıları.

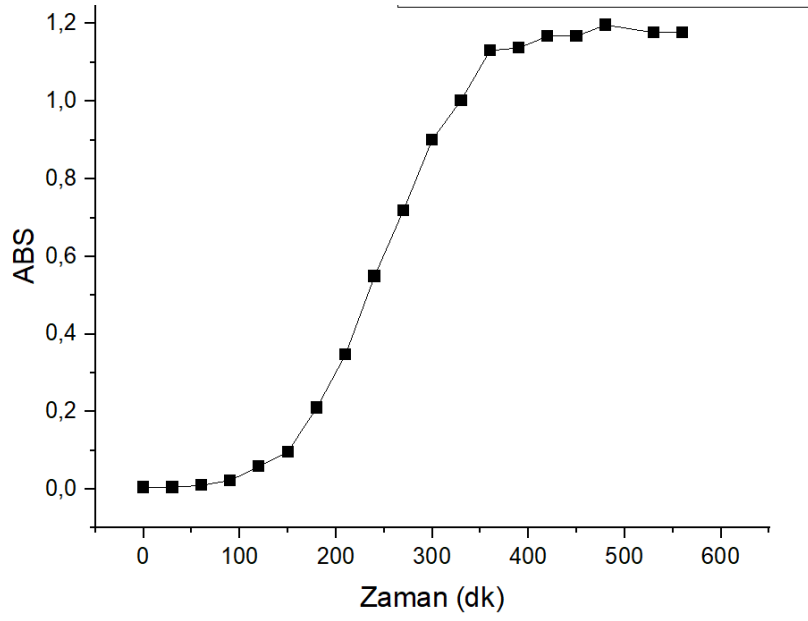
Süre (dk)	Absorbans Değeri	Mikroorganizma Sayısı (KOB/mL)
0	0.050	9×10^6
30	0.047	8×10^6
60	0.074	1×10^7
90	0.109	2×10^7
120	0.221	1×10^8
150	0.501	1×10^8
180	0.899	4×10^8
210	1.324	7×10^8
240	1.432	1×10^9
270	1.465	8×10^8
300	1.481	9×10^8
330	1.465	5×10^8



Şekil 4.1. *S. Typhimurium*'un gelişme eğrisi.

Çizelge 4.2. *E. coli* O157:H7 gelişme eğrisi analizinde elde edilen absorbans değerleri ve mikroorganizma sayıları.

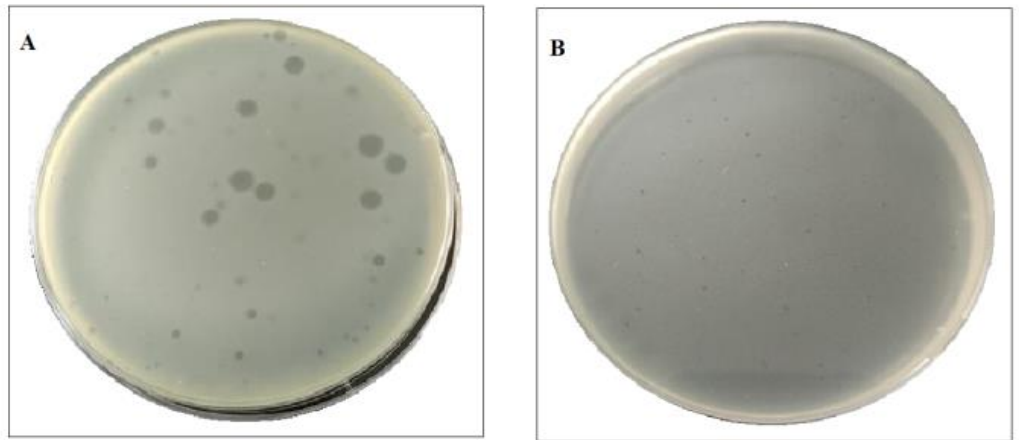
Süre (dk)	Absorbans Değeri	Mikroorganizma Yüğü (KOB/mL)
0	0.005	5×10^6
30	0.005	5×10^6
60	0.010	1×10^7
90	0.023	2×10^7
120	0.059	7×10^7
150	0.097	4×10^7
180	0.210	3×10^8
210	0.348	2×10^8
240	0.549	6×10^8
270	0.719	2×10^9
300	0.901	1×10^9
330	1.003	1×10^8
360	1.131	1×10^9
390	1.138	1×10^9
420	1.168	2×10^9
450	1.168	2×10^9
480	1.197	1×10^9
530	1.177	1×10^9
560	1.177	1×10^9



Şekil 4.2. *E. coli* O157:H7'nin gelişme eğrisi.

4.2 Bakteriyofajların İzolasyonu ve Saflaştırılması

Bakteriyofaj izolasyonu için çift tabaka agar yöntemi kullanılmıştır. İzolasyon için Bolu ilinin çeşitli köylerinden 24 adet süt örneği toplanmıştır. Toplanan süt örneklerinin 5 adedinden *S. Typhimurium* ve *E. coli* O157:H7'ye etkili toplamda 13 adet faj izole edilmiştir. *S. Typhimurium* ve *E. coli* O157:H7 suşları ile izole edilen fajlardan ikisine ait plaklar, Şekil 4.3'te gösterilmiştir. Ayrıca fajların hangi konakçı bakteri ile izole edildiği, izolasyon kaynakları ve kodları Çizelge 3.1'de verilmiştir.



Şekil 4.3. *S. Typhimurium* suşundan izole edilmiş fajlar. A: Ssüt12.2.2; B: Ssüt16.1.1

4.3 Bakteriyofajların Konakçı Skalasının Belirlenmesi

4.3.1 *E. coli* O157:H7 fajlarının konakçı spektrumları

Homolog konakçısı *E. coli* O157:H7 olan beş farklı *E. coli* O157:57 fajının (E12.1.1, E12.2.1, E12.2.2, E13.2.1, E13.3.2) farklı bakterileri lize etme özellikleri spot test ile araştırılmıştır (Çizelge 4.3). Fajların konakçı aralığını değerlendirmek için *E. coli* O157:H7 ATCC 4388, *E. faecalis*, *S. Enteritidis* (Ankara), STT (Ankara), *S. aureus* ATCC 25923, *Salmonella* NETC 12694, *P. aeruginosa* SS9027, *B. cereus*, *L. monocytogenes* 3, 4, 10, 12, 15, 18, 26 olmak üzere 15 farklı suş kullanılmıştır. Kültür koleksiyonumuzda bulunan *E. coli* O157:H7 ile izole edilen bu 5 fajdan sadece E12.2.1 ve E13.2.1 fajları, *E. coli* O157:H7 ATCC 4388 suşuna karşı çok yüksek litik aktivite göstermiştir. Bu suşun diğer fajlara karşı ise dirençli olduğu görülmüştür.

Bu fajlardan E12.2.1 ve E13.3.2'nin STT Ankara suşunu; E13.2.1 ve E13.3.2 fajlarının da *S. Enteritidis* Ankara suşunu rahatlıkla lize edebildiği görülmüş diğer *Salmonella* suşunun (NETC 12694) ise bu 5 faja dirençli olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmada *E. coli* O157:H7 fajlarının diğer suşlara karşı direnç gösterip göstermediği de test edilmiştir. Fajların karşılaştırıldığı cins ve türlerden E12.2.1 fajının *E. faecalis* suşuna, E13.3.2 fajının *B. cereus* suşuna, E12.1.1, E12.2.1, E13.3.2 fajlarının *L. monocytogenes* (15) suşuna ve E12.2.2, E13.3.2 fajlarının *L. monocytogenes* (26) suşuna karşı litik aktivite gösterdiği fakat Çizelge 4.3'te görüldüğü gibi diğer fajların diğer suşlara karşı litik aktivitelerinin olmadığı tespit edilmiştir. Her fajın, farklı suşlarda sergiledikleri litik aktivite derecesinde farklılık göstermiştir. Buna göre fajlar, *Salmonella* ve *E. coli*, *B. cereus* türlerinde berrak plak oluşumu gösterirken, *L. monocytogenes* türlerinde bulanık plak oluşumu göstermiştir.

Çizelge 4.3. *E. coli* O157:H7 fajlarının konakçı skalası.

Bakteriler	Bakteriyofajlar				
	E12.1.1	E12.2.1	E12.2.2	E13.2.1	E13.3.2
<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 4388	-	+++	-	+++	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	+++	-	-	-
<i>S. Enteritidis</i> (Ankara)	-	-	-	+	+
STT Ankara	-	+++	-	-	+++
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> NETC 12694	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> SS9027	-	-	-	-	-
<i>B. cereus</i>	-	-	-	-	++
<i>L. monocytogenes</i> (3)	-	-	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i> (4)	-	-	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i> (10)	-	-	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i> (12)	-	-	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i> (15)	+	+	-	-	+
<i>L. monocytogenes</i> (18)	-	-	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i> (26)	-	-	+	-	+
+++ : Berrak plak ++ : Berrak plak, koloni oluşumu + : Bulanık plak - : Plak oluşumu yok					

Necel vd. (2020) yaptıkları çalışmada *E. coli* O157:H7 vB_Eco4M7 fajının diğer *E. coli* suşlarına karşı litik aktivite gösterdiği fakat *Salmonella* serotipleri, *Bacillus* spp., *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *S. aureus* bakterilerine karşı litik aktivite göstermediğini gözlemlemişlerdir.

Park ve Park (2021) izole ettikleri BECP10 fajını 10 adet *E. coli* O157:H7, 26 adet farklı *E. coli*, Gram negatif, Gram pozitif bakteri ile karşılaştırmış ve ilgili fajın sadece *E. coli* O157:H7 suşlarına etkili olduğunu diğer 26 adet bakteriyi lize edemediğini tespit etmiştir.

Sultan-Alolama vd. (2022) kuş dışkılarından *E. coli* O157:H7 UAE_MI_01 fajını izole etmişlerdir. İzole edilen bu fajın konakçı spektrumunun belirlenmesinde 31 farklı bakteri suşu kullanılmıştır. Faj UAE_MI_01'in farklı *E. coli* O157:H7 suşuna karşı yüksek litik aktivite gösterdiği fakat diğer *E. coli* suşlarına ve bakterilere (*P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *Salmonella* spp. vb.) litik aktivite göstermediği gözlemlenmiştir.

Fan vd. (2020) yaptıkları çalışmada hastane kanalizasyonundan izole ettikleri *E. coli* O157:H7 FEC14'ün litik aktivitesini 26 adet *E. coli* suşu, *S. Typhimurium*, *Shigella dysenteriae* bakterilerini kullanarak incelemişlerdir. Bakterilerden sadece 15 adet *E. coli* suşunun FEC14 fajına duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Diğer bakterilerin ise bu faja karşı dirençli olduğu görülmüştür.

Diğer bir çalışmada Zhou vd. (2022), vB_EcoM_SQ17 fajının konakçı aralığının belirlenmesi için farklı *E. coli* türleri ve *Salmonella* serotipleri kullanmışlardır. Çalışma sonucunda faj Vb_EcoM_SQ17'nin *E. coli* türlerini yüksek oranda enfekte etme yeteneğine sahip olduğu fakat *Salmonella* serotiplerini enfekte edemediği tespit edilmiştir.

Tez çalışması incelendiğinde ise izole edilen *E. coli* O157:H7 fajlarından yalnızca iki tanesinin (E12.2.1 ve E13.2.1) *E. coli* O157:H7 suşuna karşı litik aktivite gösterdiği ve *E. coli* O157:H7 E12.2.1, E13.3.2 fajlarının ise STT Ankara suşuna karşı litik aktivite gösterdiği görülmektedir. Yapılan tez çalışması kapsamında da izole edilen *E. coli* O157:H7 fajları *P. aeruginosa* ve *S. aureus* suşlarına karşı litik aktivite göstermemiştir. Yapılan çalışmalara bakıldığında *E. coli* O157:H7 fajlarının Gram pozitif bakterilere karşı litik aktivite göstermediği görülmektedir fakat tez çalışmasında izole edilen *E. coli* O157:H7 E13.3.2 fajının *B. cereus* suşuna, *E. coli* O157:H7 E12.2.1 fajının *E. faecalis* suşuna karşı litik aktivite gösterdiği görülmektedir. Sonuç olarak tez çalışması kapsamında Gram negatif bir bakteriden izole edilen fajın Gram pozitif bir bakteri üzerinde litik aktivite gösterdiği görülmektedir.

4.3.2 *S. Typhimurium* fajlarının konakçı spektrumları

Tez çalışması kapsamında homolog konakçısı *S. Typhimurium* olan sekiz fajın (Ssüt10.1.1, Ssüt10.2.4, Ssüt12.1.2, Ssüt12.2.2, Ssüt16.1.1, Ssüt19.1.1, Ssüt19.2.2, Ssüt20.2.1) 15 farklı suş üzerinde litik aktivitesi olup olmadığı test edilmiştir (Çizelge 4.4). Yapılan çalışma kapsamında izole edilen tüm *S. Typhimurium* fajlarının üç farklı *Salmonella* serotipine karşı litik aktivite gösterdiği görülmüştür. İzole edilen *S. Typhimurium* fajlarından Ssüt16.1.1 fajının *E. coli* O157:H7 suşuna, Ssüt10.1.1, Ssüt10.2.4, Ssüt16.1.1, Ssüt20.2.1 fajlarının *P. aeruginosa* SS9027 suşuna ve Ssüt12.2.2 fajının *B. cereus* suşuna karşı litik aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir. Ayrıca çalışma kapsamında fajlarının

hiçbirisinin *E. faecalis*, *E. coli* O157:H7, *S. aureus*, *L. monocytogenes* bakterilerini lize edemediği görülmüştür. Her fajın, farklı suşlarda sergiledikleri litik aktivite derecesinde farklılık görülmüştür. Buna göre fajlar, *Salmonella* serovarlarında ve *B. cereus* bakterisi suşlarında berrak plak oluşumu gösterirken, *P. aeruginosa* türlerinde bulanık plak oluşumu göstermiştir.

İslam vd. (2020) yaptıkları çalışmada spot testi kullanarak *Salmonella* LPST153 fajının 62 farklı suşa karşı etkili olup olmadığını incelemiştir. Çalışma sonucunda *Salmonella* fajının farklı *Salmonella* serotiplerine karşı yüksek litik aktivite oluşturduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışmada ayrıca konakçı aralığının belirlenmesinde 5 farklı *E. coli* suşu ve *P. aeruginosa* ATCC 7853 suşu kullanılmıştır. Fakat bu bakterilerin ilgili faja dirençli olduğu belirlenmiştir. Bizim yaptığımız tez çalışmasında ise *S. Typhimurium* Ssüt16.1.1 fajının *E. coli* O157:H7 ATCC 4388 suşuna, *S. Typhimurium* Ssüt10.1.1, Ssüt10.2.4, Ssüt16.1.1, Ssüt20.2.1 fajının ise *P. aeruginosa* SS9027 suşuna karşı litik atktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

Bai vd. (2019), çevresel örneklerden izole ettikleri üç *S. Typhimurium* fajının konakçı aralığını belirlemek için farklı *Salmonella* serotipleri, *E. coli* suşları, farklı Gram pozitif ve Gram negatif bakterileri kullanmıştır. Analiz sonucunda üç fajın da farklı *Salmonella* serotiplerine ve içlerinden sadece birinin *E. coli* O157:H7 suşlarına karşı yüksek litik aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir. Çalışma kapsamında kullanılan Gram pozitif bakteriler kapsamında ise *B. cereus* ATCC 14579 suşu kullanılmış ve üç *S. Typhimurium* fajınında direnç gösterdiği tespit edilmiştir. Tez çalışması kapsamında da konakçı aralığının belirlenmesinde *B. cereus* suşu kullanılmış ve *S. Typhimurium* Ssüt12.2.2 fajının yüksek litik aktivite ve berrak plak oluşumu gösterdiği belirlenmiştir. Gram negatif bakteriye özgü bir fajın Gram pozitif bakteriler üzerinde de yüksek litik aktivite gösterdiği sonucunun literatürde yer alan çalışmalarla da uyumlu olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.4. *S. Typhimurium* fajlarının konakçı skalası.

Bakteriler	Bakteriyofajlar							
	Ssüt10.1.1	Ssüt10.2.4	Ssüt12.1.2	Ssüt12.2.2	Ssüt16.1.1	Ssüt19.1.1	Ssüt19.2.2	Ssüt20.2.1
<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 4388	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. Enteritidis</i> (Ankara)	++	++	++	++	++	++	++	++
STT (Ankara)	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> NETC 12694	+++	+	+++	+++	+++	+	+++	++
<i>P. aeruginosa</i> SS9027	+	+	-	-	+	-	-	+
<i>B. cereus</i>	-	-	-	++	-	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i> (3)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i> (4)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i> (10)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i> (12)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i> (15)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i> (18)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i> (26)	-	-	-	-	-	-	-	-
+++ : Berrak plak ++ : Berrak plak, koloni oluşumu + : Bulanık plak - : Plak oluşumu yok								

Mahmoud vd. (2018), yaptıkları çalışmada Mısır'daki piliçlerden Salmacey1, Salmacey2, Salmacey3 isminde üç adet faj izole edilmiştir. İzole edilen fajların konakçı aralıklarının belirlenmesinde 15 farklı suş kullanılmış ve fajların *Salmonella* serotiplerine karşı yüksek litik aktivite gösterdiği fakat *B. cereus* ve *S. auerus* suşuna karşı litik aktivite göstermediği tespit edilmiştir.

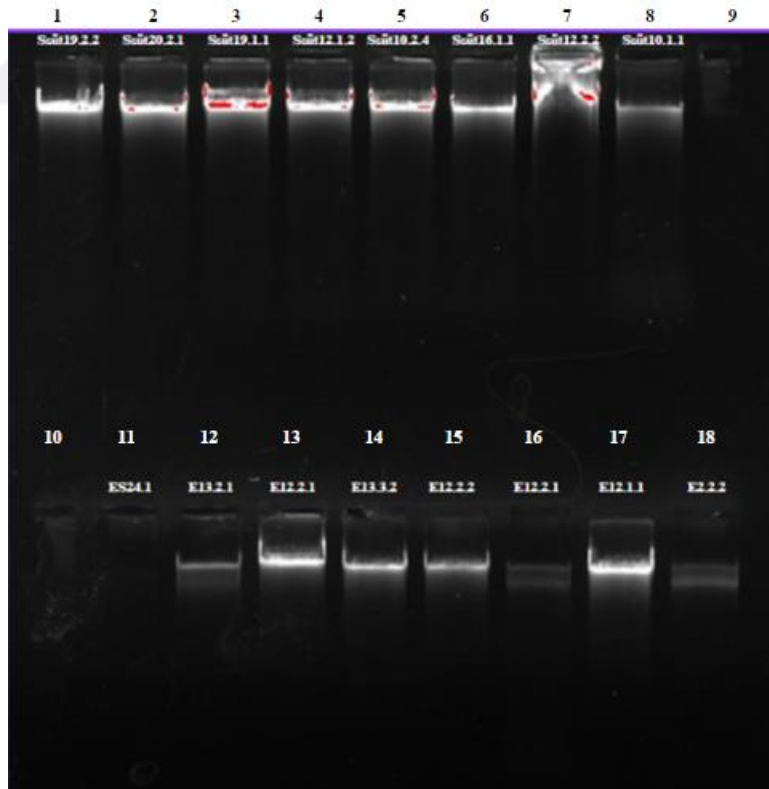
Sadakuzzaman vd. (2018), BP 1370 ve BP 1369 fajları, Güney Kore'deki Gwacheon atık su arıtma tesisinden izole etmişlerdir. Araştırma sonuçlarına göre *S. Enteritidis* suşları BP 1370 fajına, *S. Typhimurium* suşlarının ise BP 1369 fajına duyarlı olduğu; ancak *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus*

cereus ve *Staphylococcus aureus* suşlarının ise bu fajlara dirençli olduğu tespit edilmiştir.

Newase vd. (2018) Hindistan'daki nehirde izole ettikleri *Salmonella* PM10 fajının konakçı aralığını belirlemek için farklı *Salmonella* serotipleri, *E. coli* ve *Shigella* suşlarını kullanmışlardır. Çalışma sonucunda PM10 fajının *S. Typhimurium* ve *S. Enteritidis*'e karşı litik aktivite gösterdiği; ancak diğer *Salmonella* serotiplerine, *E. coli* ve *Shigella* suşlarına karşı litik aktivite göstermediği gözlemlenmiştir.

4.4 Bakteriyofajların DNA İzolasyonu

Faj genomları, Thermo Scientific™ GeneJET Viral DNA/RNA Purification Kit prosedürü kullanılarak izole edilmiş ve agaroz jel elektroforezi yürütülmüştür. İzole edilen genomlara ait görüntü Şekil 4.4'te verilmiştir. Elde edilen görüntülerden yararlanılarak DNA'ların konsantrasyonları karşılaştırılmış ve kesim enzimleri ile reaksiyona girecek DNA miktarları belirlenmiştir.



Şekil 4.4. *S. Typhimurium* ve *E. coli* O157:H7 suşlarına etkili bazı fajların jel görüntüleri.

Şekilde yer alan kuyucuklar soldan sağa doğru sırasıyla:

1. Ssüt19.2.2	2. Ssüt20.2.1	3. Ssüt19.1.1	4. Ssüt12.1.2	5. Ssüt10.2.4	6. Ssüt16.1.1
7. Ssüt12.2.2	8. Ssüt10.1.1	9. Boş	10. Boş	11. ES24.1	12. E13.2.1
13. E12.2.1	14. E13.3.2	15. E12.2.2	16. E12.2.1	17. E12.1.1	18. E2.2.2

4.5 Bakteriyofaj Genomlarının RFLP Analizi Sonuçları

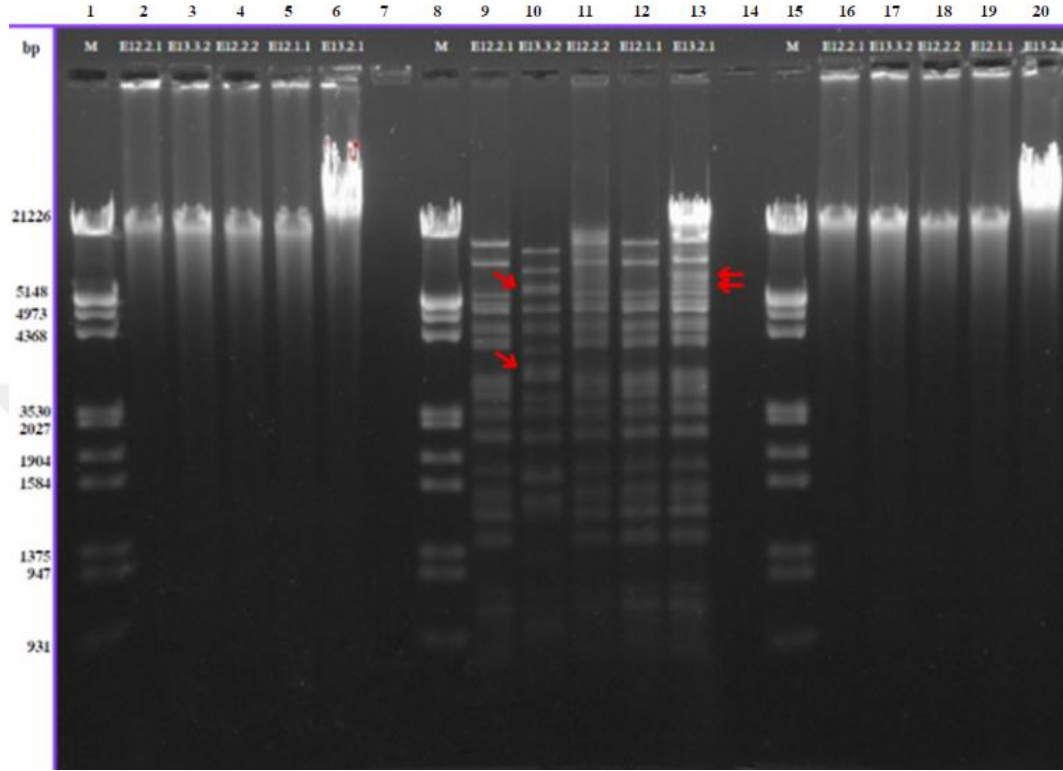
İzolasyonları gerçekleştirilen fajların birbirlerinden farklı ya da benzer olduklarını ortaya koymak için RFLP analizi gerçekleştirilmiştir. Bunun sebebi gıda denemelerinde kullanılacak fajları gruplandırmak ve en uygun olanları seçebilmektir. RFLP analizi sayesinde restriksiyon enzimleri ile kesim sonucu oluşan fragmentlerin boyut değişkenliğini değerlendirilerek farklı DNA örneklerinin karşılaştırılması mümkün olmaktadır (Di Felice vd., 2019). Bu tez çalışması kapsamında toplam 13 adet faj genomu, 8 farklı restriksiyon enzimi ile kesime alınmış ve fajların birbirinden farklılıkları ortaya konulmuştur.

4.5.1 *E. coli* O157:H7 Faj Genomlarının RFLP Profili

İzole edilen 5 adet *E. coli* O157:H7 faj DNA'sının restriksiyon profillerinin çıkarılması amacıyla *EcoRI*, *EcoRV*, *BamHI*, *HindIII*, *PstI*, *XbaI*, *ScaI* enzimleri kullanılmıştır. Enzim üreticisinin direktifleri doğrultusunda kesim karışımı hazırlanmış, inkübasyon sonunda oluşması muhtemel fragmentler agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir (Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7).

E. coli O157:H7 faj genomlarının *EcoRI*, *EcoRV* ve *BamHI* enzimleri ile kesim sonucu elde edilen jel görüntüsü Şekil 4.5'te görülmektedir. Şekilde *E. coli* O157:H7 genomlarında soldan sağa doğru 1. marker (Grup 1) ve 3. markerdan (Grup 3) sonra gelen kuyucuklarda sırasıyla *EcoRI* ve *BamHI* enzimlerinin faj genomunda kesim bölgelerinin olmadığı görülmektedir. *EcoRV* enzimi ile yapılan kesimde (2. markerdan sonra gelen kuyucuklar; Grup 2) ise 9.-13. Kuyucuklarda görülen fragment profilleri elde edilmiştir (Çizelge 4.5). *EcoRV* enzimi ile kesimde oluşan fragmentler incelendiğinde 9, 11 ve 12. Kuyucuklarda bulunan sırasıyla E12.2.1, E12.2.2 ve E12.1.1 fajlarının benzer profil gösterdiği ve diğerlerinden farklı olduğu tespit edilmiştir. *EcoRV* kesimine göre 10. Kuyucukta bulunan E13.3.2 fajının yaklaşık 7780, 3308 ve 2658 bp'lık genom büyüklüğüne sahip sırasıyla 3, 6 ve 7. bandının diğer kuyucuklarda bulunan fajlarda olmadığı

tespit edilmiştir. Aynı şekilde 13. Kuyucukta bulunan E13.2.1 fajının fragment profiline bakıldığında yaklaşık olarak 7484 ve 5769 bp büyüklüğündeki 4. ve 5. bantların da diğer faj genomlarında bulunmadığı görülmektedir (Çizelge 4.6).



Şekil 4.5. *E. coli* O157:H7 fajlarının *Eco*RI (2-6. kuyucuklar), *Eco*RV (9-13. kuyucuklar) ve *Bam*HI (16-20. kuyucuklar) enzimi ile kesimi.

Şekilde yer alan kuyucuklar soldan sağa doğru sırasıyla:

1. Marker	2. E12.2.1	3. E13.3.2	4. E12.2.2	5. E12.1.1
6. E13.2.1	7. Boş	8. Marker	9. E12.2.1	10. E13.3.2
11. E12.2.2	12. E12.1.1	13. E13.2.1	14. Boş	15. Marker
16. E12.2.1	17. E13.3.2	18. E12.2.2	19. E12.1.1	20. E13.2.1

Çizelge 4.5. *Eco*RV restriksiyon enzim kesimi sonucuna göre oluşan farklı faj grupları.

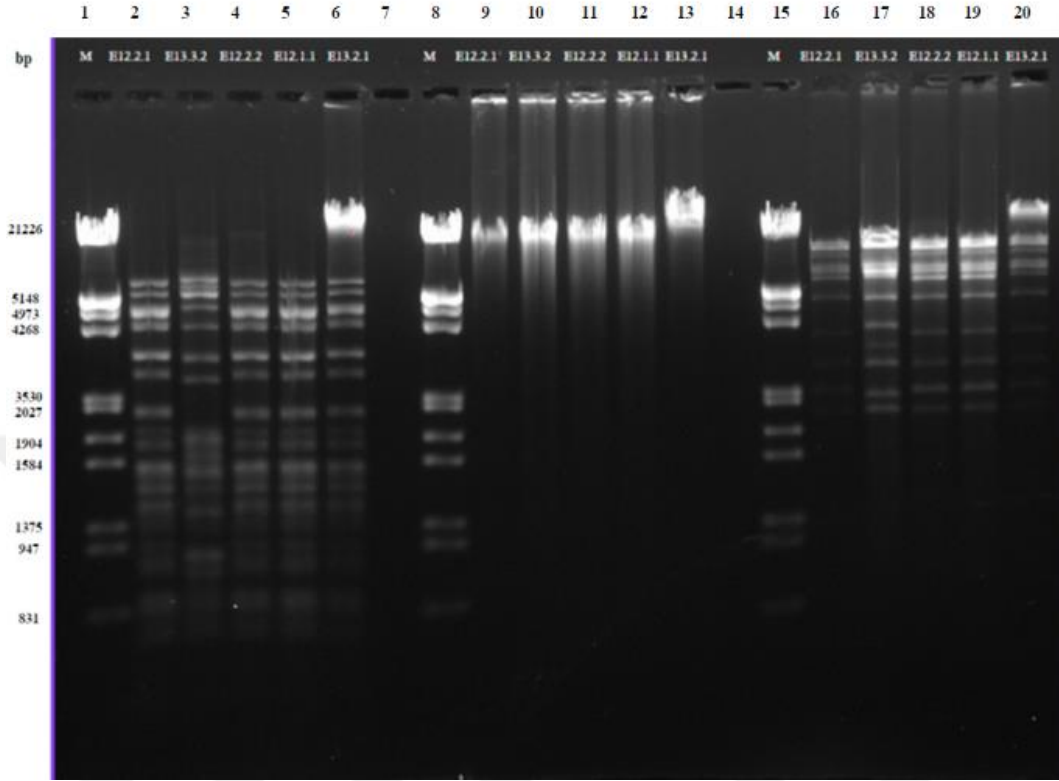
Grup	Grupta Yer Alan Fajlar	Yaklaşık Genom Büyüklüğü (bp)
1	E12.2.1- E12.2.2-E12.1.1	65464
2	E13.3.2	59178
3	E13.2.1	76282

Çizelge 4.6. *E. coli* O157:H7 fajlarının *EcoRV* enzim kesimine göre oluşan fragment büyüklükleri

Kesim Sonucu Oluşan Faj Fragmentlerinin Büyüklükleri (bp)					
Marker	E12.2.1	E13.3.2	E12.2.2	E12.1.1	E13.2.1
21226	17282	15141	18476	18068	19761
5148	11944	10751	12463	12463	13009
4973	6933	7780	7341	7341	10103
4268	5569	5668	5873	5873	7484
3530	4408	4408	4625	4551	5769
2027	3633	3308	3685	3685	4700
1904	2509	2658	2463	2509	3903
1584	2050	2217	2074	2087	2581
1375	1860	2074	1883	1891	2114
947	1706	1852	1714	1718	1907
831	1647	1686	1653	1661	1730
	1616	1635	1619	1622	1624
	1593		1595	1596	1597
	1570				
Toplam DNA Büyüklüğü	64320	59178	65464	65065	76282

E. coli O157:H7 faj genomlarının *HindIII*, *PstI* ve *XbaI* enzimleri ile kesim sonuçları Şekil 4.6'da görülmektedir. Kesim sonucunda oluşan fragment profilleri incelendiğinde *PstI* enziminin *E. coli* O157:H7 faj genomlarında kesim bölgesinin olmadığı görülmektedir. *HindIII* enzimi ile kesim sonucunda oluşan fragment profilleri incelendiğinde 3. kuyucukta bulunan E13.3.2 fajındaki yaklaşık 7706 bp genom büyüklüğündeki 2. bandın diğer dört fajda olmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.7). Yine *HindIII* enzimi ile kesim sonucunda 2, 4 ve 5. kuyucuklardaki sırasıyla E12.2.1, E13.3.2 ve E12.1.1 fajlarının 2658 bp'lik genom büyüklüğüne sahip 7. bandının 3. kuyucukta bulunan E13.3.2 fajında olmadığı tespit edilmiştir ve son olarak 6. kuyucukta bulunan E13.2.1 fajının 19299 bp'lik 1. bandının ise diğer faj genomlarına göre farklılık gösterdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.8). *E. coli* O157:H7 faj genomlarının *XbaI* enzimi ile kesiminde ise 17. kuyucukta bulunan E13.3.2 fajının 3000 bp'lik 6. bandının diğer faj profillerine göre farklılık gösterdiği gözlemlenmiştir. Aynı şekilde *XbaI* enzimi sonucu oluşan fragment profillerine

bakıldığında (Çizelge 4.9) 20. kuyucukta bulunan E13.2.1 fajının 19166 bp'lik 1. bandının da diğer dört fajda olmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.10).



Şekil 4.6. *E. coli* O157:H7 fajlarının *Hind*III (2-6. kuyucuklar), *Pst*I (9-13. Kuyucuklar) ve *Xba*I (16-20. kuyucuklar) enzimi ile kesimi.

Şekilde yer alan kuyucuklar soldan sağa doğru sırasıyla:

1. Marker	2. E12.2.1	3. E13.3.2	4. E12.2.2	5. E12.1.1
6. E13.2.1	7. Boş	8. Marker	9. E12.2.1	10. E13.3.2
11. E12.2.2	12. E12.1.1	13. E13.2.1	14. Boş	15. Marker
16. E12.2.1	17. E13.3.2	18. E12.2.2	19. E12.1.1	20. E13.2.1

Çizelge 4.7. *Hind*III restriksiyon enzim kesimi sonucuna göre oluşan farklı faj grupları.

Grup	Grupta Yer Alan Fajlar	Yaklaşık Genom Büyüklüğü (bp)
1	E12.2.1- E12.1.2-E12.1.1	44553
2	E13.3.2	49324
3	E13.2.1	60142

Çizelge 4.8. *E. coli* O157:H7 fajlarının *Hind*III enzim kesimine göre oluşan fragment büyüklükleri

Kesim Sonucu Oluşan Faj Fragmentlerinin Büyüklükleri (bp)					
Marker	E12.2.1	E13.3.2	E12.2.2	E12.1.1	E13.2.1
21226	8129	8580	8129	7914	19299
5148	6762	7706	6762	6762	8351
4973	5160	6762	5160	5041	6939
4268	4217	5541	4217	4217	5283
3530	2995	4217	2995	2946	4403
2027	2535	2946	2501	2501	3045
1904	1959	2405	1959	1959	2535
1584	1802	1753	1802	1802	1975
1375	1728	1621	1728	1728	1802
947	1636	1851	1636	1636	1736
831	1581	1451	1581	1581	1636
	1550	1505	1553	1553	1585
	1510	1497	1511	1510	1553
	1501	1489	1501	1501	
	1488		1488	1489	
Toplam DNA Büyüklüğü	44553	49324	44523	44140	60142

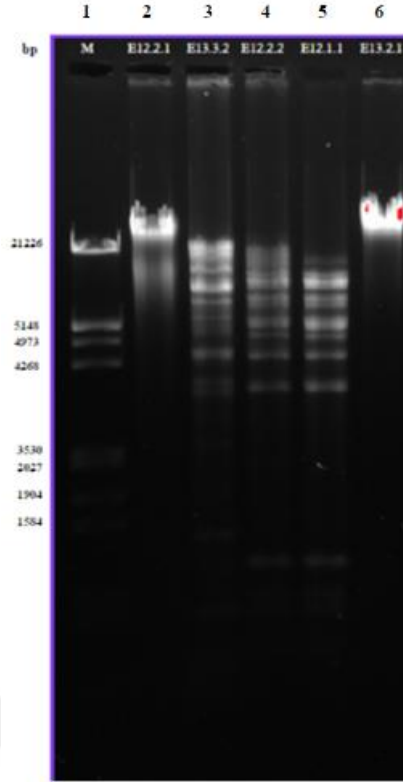
Çizelge 4.9. *Xba*I restriksiyon enzim kesimi sonucuna göre farklı faj grupları.

Grup	Grupta Yer Alan Fajlar	Yaklaşık Genom Büyüklüğü (bp)
1	E12.2.1- E12.1.2-E12.1.1	47014
2	E13.3.2	60714
3	E13.2.1	70240

Çizelge 4.10. *E. coli* O157:H7 fajlarının *Xba*I enzim kesimine göre oluşan fragment büyüklükleri.

Kesim Sonucu Oluşan Faj Fragmentlerinin Büyüklükleri (bp)					
Marker	E12.2.1	E13.3.2	E12.2.2	E12.1.1	E13.2.1
21226	13908	17961	14354	14817	19166
5148	9341	14817	6922	9341	15792
4973	8072	9069	8072	8072	9914
4268	5805	5656	5805	5959	8806
3530	3417	3785	3485	3556	6285
2027	2521	3000	2521	2558	3630
1904	2087	2521	2087	2107	2595
1584	1863	2029	1889	1902	2150
1375		1876			1902
947					
831					
Toplam DNA Büyüklüğü	47014	60714	45135	48312	70240

E. coli O157:H7 faj genomlarının *Sca*I enzimi ile kesime alınması sonucunda elde edilen jel fotoğrafı Şekil 4.7’de verilmiştir. Şekilden de anlaşılacağı üzere E12.2.1 ve E13.2.1 faj genomları üzerinde *Sca*I enziminin kesim bölgesi bulunmamaktadır. Diğer kuyucuklara bakıldığında 3. kuyucukta bulunan E13.3.2 fajının 4214 bp’lik 6. bandına diğer faj profillerinde rastlanmamıştır (Çizelge 4.11 ve Çizelge 4.12).



Şekil 4.7. *E. coli* O157:H7 fajlarının *ScaI* (2-6. kuyucuklar) enzimi ile kesimi.

Şekilde yer alan kuyucuklar soldan sağa doğru sırasıyla:

1. Marker	2. E12.2.1	3. E13.3.2
4. E12.2.2	5. E12.1.1	6. E13.2.1

Çizelge 4.11. *ScaI* restriksiyon enzim kesimi sonucuna göre farklı faj grupları.

Grup	Grupta Yer Alan Fajlar	Yaklaşık Genom Büyüklüğü (bp)
1	E13.3.2	69752
2	E12.2.2- E12.1.1	61123

Çizelge 4.12. *E. coli* O157:H7 fajlarının *ScaI* enzim kesimine göre oluşan fragment büyüklükleri.

Kesim Sonucu Oluşan Faj Fragmentlerinin Büyüklükleri (bp)					
Marker	E12.2.1	E13.3.2	E12.2.2	E12.1.1	E13.2.1
21226		20612	17583	17129	
5148		15439	12297	11996	
4973		10881	9009	9009	
4268		8606	6367	6240	
3530		6772	5250	5250	
2027		4214	4150	4150	
1904		3228	3092	3092	
1584			2036	2221	
1375				2036	
947					
831					
Toplam DNA Büyüklüğü	Kesim yok	69752	59784	61123	Kesim yok

Ateba ve Akindolire (2019) yaptıkları çalışmada *E. coli* O157:H7'ye karşı geniş litik spektrum gösteren V3, V7 ve V8 fajları izole edilmiştir. İzole edilen fajlar *HindIII*, *EcoRV*, *SspI*, *NdeI* enzimleri ile kesilmiştir. Kesim profilleri incelendiğinde izole edilen fajların *HindIII* ve *EcoRV* enzimlerinde kesim bölgesi olmadığı gözlemlenmiştir. Tez çalışması kapsamında *HindIII* enzimi ile kesimde fragment oluşmazken, *EcoRV* enzimi ile kesim sonucunda fragment oluşumu gözlemlenmiştir ve enzim kesimi sonucunda *E. coli* O157:H7 fajları üç gruba ayrılmıştır.

Shaufi ve Sico (2023) yaptıkları çalışmada *E. coli* O157:H7 suşuna özgü 4 faj *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII* enzimleri ile kesime alınmıştır. Kesim profilleri incelendiğinde faj genomları üzerinde *BamHI* ve *HindIII* enzimlerinin kesim bölgesi bulunmamaktadır. *EcoRI* enzimi ile kesim sonucunda oluşan fragment profilleri incelendiğinde C1 fajında yaklaşık 15.000 ve 8.000 bp büyüklüğünde iki bandın, C2 fajında ise yaklaşık olarak 15.000, 10.000, 3.500, 1.300 ve 1.200 bp büyüklüğünde 5 adet bant gözlemlenmiştir. Bu çalışma kapsamında ise *EcoRI* ve *BamHI* enzimleri ile RFLP analizinde kesim bölgesine rastlanmazken *HindIII* enzimi ile kesim sonucunda birden çok kesim bölgesi gözlemlenmiştir.

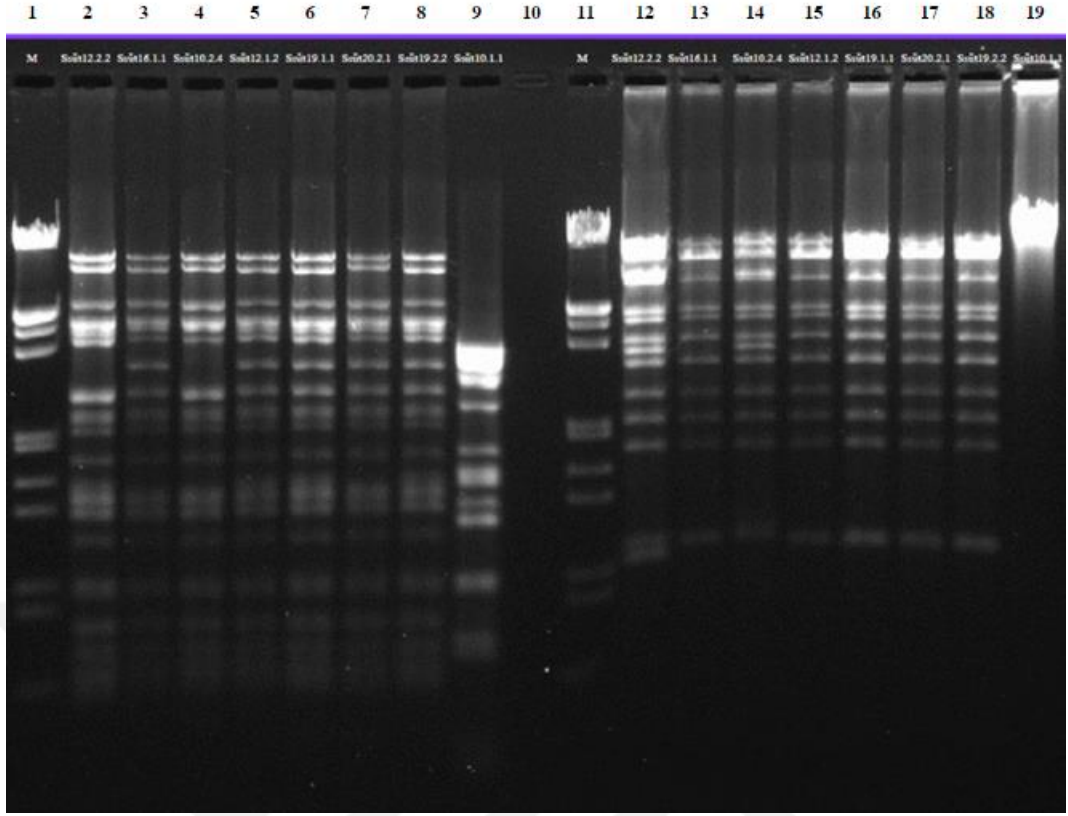
Hallewell vd. (2016) yaptıkları çalışmada 3 *E. coli* O157:H7 fajı farklı restriksiyon enzimleri ile kesime alınmıştır. Yapılan enzim kesimi sonucunda ALS20 ve ALC35 fajlarının *HindIII* enzimi ile kesimi sonucunda bant profillerinin

oluştugu gözlemlenmiştir. ALC54 fajının ise *EcoRI*, *PstI*, *XbaI*, *KpnI*, *SacI* enzimlerinde kesim bölgesi olmadığı fakat *EcoRV* enzimi ile kesim sonucunda birden çok kesim bölgesine rastlanmıştır. Aynı şekilde bu çalışmamızda da *E. coli* O157:H7 fajlarının *HindIII* ve *EcoRV* enzimi ile kesiminde de fragment profilleri gözlemlenmiş ve *E. coli* O157:H7 fajları üç farklı gruba ayrılmıştır fakat *EcoRI*, *PstI* ve *XbaI* enzimleri ile yapılan kesim sonucunda kesim bölgesine rastlanmamıştır.

4.5.2 *S. Typhimurium* Faj Genomlarının RFLP Profili

Bu çalışma kapsamında izolasyonları gerçekleştirilen 8 adet *S. Typhimurium* fajını genomu *EcoRV*, *XbaI* ve *ScaI* restriksiyon enzimleri ile kesilerek jel elektroforezinde görüntülenmiş ve elde edilen kesim profillerine göre sınıflandırılmıştır (Şekil 4.8, Şekil 4.9).

S. Typhimurium faj genomlarının *EcoRV* ve *XbaI* enzimleri ile kesimleri sonucunda Şekil 4.8’de verilen görüntü elde edilmiştir. *EcoRV* enzimi ile kesim sonucunda 3 (Ssüt16.1.1), 5 (Ssüt12.1.2), 6 (Ssüt19.1.1), 7 (Ssüt20.2.1) ve 8. (Ssüt19.2.2) kuyucuklarda oluşan 3302 bp büyüklüğündeki 6. banda diğer üç fajda rastlanmamıştır (Çizelge 4.13). Aynı şekilde 9. kuyucuktaki Ssüt10.1.1 fajındaki 3882, 2996 ve 2391 bp büyüklüğündeki sırasıyla 1, 2 ve 3. bandın diğer fajlardan farklı olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.14). Şekil 4.8’e bakıldığında 19. kuyucukta bulunan Ssüt10.1.1 faj genomu üzerinde *XbaI* enziminin kesim bölgesi bulunmamaktadır (Çizelge 4.15). Kesim sonucunda oluşan fragment profillerine bakıldığında 12 (Ssüt12.2.2) ve 14. (Ssüt10.2.4) kuyucuklardaki 3201 bp büyüklüğündeki 7. Bandın diğer fajların fragment profillerinde rastlanmadığı gözlemlenmiştir (Çizelge 4.16).



Şekil 4.8. *S. Typhimurium* fajlarının *EcoRV* (2-9. Kuyucuklar) ve *XbaI* (12-19. kuyucuklar) enzimi ile kesimi.

Şekilde yer alan kuyucuklar soldan sağa doğru sırasıyla:

1. Marker	2. Süt12.2.2	3. Ssüt16.1.1	4. Ssüt10.2.4
5. Ssüt12.1.2	6. Ssüt19.1.1	7. Ssüt20.2.1	8. Ssüt19.2.2
9. Ssüt 10.1.1	10. Boş	11. Marker	12. Süt12.2.2
13. Ssüt16.1.1	14. Ssüt10.2.4	15. Ssüt12.1.2	16. Ssüt19.1.1
17. Ssüt20.2.1	18. Ssüt19.2.2	19. Ssüt 10.1.1	

Çizelge 4.13. *EcoRV* restriksiyon enzim kesimi sonucuna göre farklı faj grupları.

Grup	Grupta Yer Alan Fajlar	Yaklaşık Genom Büyüklüğü (bp)
1	Ssüt10.2.4- Ssüt12.2.2	58602
2	Ssüt16.1.1- Ssüt12.1.2- Ssüt19.1.1- Ssüt20.2.1- Ssüt19.2.2	61203
3	Ssüt10.1.1	19377

Çizelge 4.14. *S. Typhimurium* fajlarının *EcoRV* enzim kesimine göre oluşan fragment büyüklükleri.

Kesim Sonucu Oluşan Faj Fragmentlerinin Büyüklükleri (bp)								
Marker	Ssüt 12.2.2	Ssüt 16.1.1	Ssüt 10.2.4	Ssüt 12.1.2	Süt 19.1.1	Ssüt 20.2.1	Süt 19.2.2	Süt 10.1.1
21226	14516	14904	14516	14904	14516	14516	14904	3882
5148	12413	12098	12413	12098	11791	12739	12098	2996
4973	7059	7224	6898	7394	7224	7224	7394	2391
4268	5412	5648	5412	5648	5528	5528	5528	1927
3530	4421	4597	4507	4597	4507	4597	4597	1775
2027	2558	3387	2621	3387	3387	3443	3387	1676
1904	2250	2687	2317	2687	2687	2722	2722	1634
1584	2098	2294	1872	2366	2341	2366	2366	1560
1375	1852	1862	1690	2133	2151	1893	2170	1536
947	1686	1690	1655	1893	1893	1717	1904	
831	1655	1655	1603	1701	1706	1613	1717	
564	1601	1599	1558	1663	1663	1650	1668	
	1557	1558	1540	1606	1603	1541	1616	
	1539			1556	1560		1561	
				1541	1541		1542	
Toplam DNA Büyüklüğü	60617	61203	58602	65174	64098	61549	65174	19377

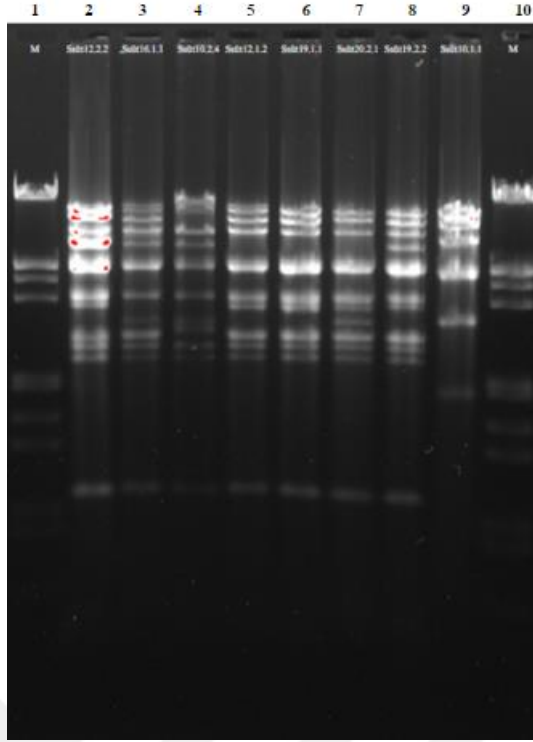
Çizelge 4.15. *XbaI* restriksiyon enzim kesimi sonucuna göre farklı faj grupları.

Grup	Grupta Yer Alan Fajlar	Yaklaşık Genom Büyüklüğü (bp)
1	Ssüt10.2.4- Ssüt12.2.2	76407
2	Ssüt16.1.1- Ssüt12.1.2- Ssüt19.1.1- Ssüt20.2.1- Ssüt19.2.2	51639
3	Ssüt10.1.1	Kesim yok

Çizelge 4.16. *S. Typhimurium* fajlarının *XbaI* enzim kesimine göre oluşan fragment büyüklükleri.

Kesim Sonucu Oluşan Faj Fragmentlerinin Büyüklükleri (bp)								
Marker	Ssüt 12.2.2	Ssüt 16.1.1	Ssüt 10.2.4	Ssüt 12.1.2	Süt 19.1.1	Ssüt 20.2.1	Süt 19.2.2	Süt 10.1.1
21226	18246	14060	18791	18246	19936	15322	18246	
5148	10639	9810	15322	14888	10078	9810	9810	
4973	5805	6225	10639	10078	6225	6225	6080	
4268	5191	5547	6225	6374	5547	5547	5425	
3530	4065	4223	5547	5674	4307	4307	4223	
2027	3584	3302	4307	4307	3302	3302	3250	
1904	3201	2536	3777	3355	2563	2536	2536	
1584	2509	2212	3302	2563	2212	2212	2196	
1375	2180	1984	2536	2229	2003	1993	1984	
947	1975	1740	2212	2003	1741	1740	1736	
831	1730		2003	1741				
564			1746					
Toplam DNA Büyüklüğü	59125	51639	76407	71458	57914	52994	55486	Kesim yok

S. Typhimurium faj genomlarının *ScaI* enzimi ile kesimi sonucunda Şekil 4.9’da verilen görüntü elde edilmiştir. Kesim profilleri incelendiğinde Ssüt12.2.2, Ssüt12.1.2, Ssüt19.1.1 ve Ssüt19.2.2 fajlarının 2865 bp’lik 7. bandına diğer kesim profillerinde rastlanmamıştır (Çizelge 4.17). Diğer kuyucuklar incelendiğinde ise 3., 4., ve 7. kuyucuklarda bulunan sırasıyla Ssüt16.1.1, Ssüt10.2.4, Ssüt20.2.1 fajlarının yaklaşık 3980 bp’lik 8. bandı diğer faj profillerinde gözlemlenmemiştir (Çizelge 4.18). Son olarak 9. kuyucukta bulunan Ssüt10.1.1 fajının 2364 bp’lik 5. bandı farklılık göstermektedir.



Şekil 4.9. *S. Typhimurium* fajlarının *ScaI* enzimi ile kesimi.

Şekilde yer alan kuyucuklar soldan sağa doğru sırasıyla:

1. Marker	2. Ssüt12.2.2	3. Ssüt16.1.1	4. Ssüt10.2.4	5. Süt12.1.2
6. Süt19.1.1	7. Ssüt20.2.1	8. Ssüt19.2.2	9. Süt10.1.1	10. Marker

Çizelge 4.17. *ScaI* restriksiyon enzim kesimi sonucuna göre farklı faj grupları.

Grup	Grupta Yer Alan Fajlar	Yaklaşık Genom Büyüklüğü (bp)
1	Ssüt12.2.2- Ssüt12.1.2- Ssüt19.1.1- Ssüt19.2.2	56559
2	Ssüt16.1.1- Ssüt20.2.1	61225
3	Ssüt10.1.1	32691

Çizelge 4.18. *S. Typhimurium* fajlarının *ScaI* enzim kesimine göre oluşan fragment büyüklükleri.

Kesim Sonucu Oluşan Faj Fragmentlerinin Büyüklükleri (bp)								
Marker	Ssüt 12.2.2	Ssüt 16.1.1	Ssüt 10.2.4	Ssüt 12.1.2	Süt 19.1.1	Ssüt 20.2.1	Süt 19.2.2	Süt 10.1.1
21226	13985	15088	18558	14709	13985	13985	13638	13302
5148	10195	12352	10195	12352	11764	12352	11482	8686
4973	8686	10195	7955	9960	9731	9731	9510	5174
4268	7858	8129	5762	5554	5554	5455	7460	3165
3530	5762	5762	3980	3825	3825	3825	5359	2364
2027	3926	3980	3165	2886	2886	3165	3825	
1904	2865	2908	2733	2750	2612	2865	2824	
1584	2612	2750	2185	2626	2184	2599	2586	
1375	2185	2186		2186		2182	2181	
947								
831								
Toplam DNA Büyüklüğü	57984	63350	54533	56848	52541	56159	58865	32691

Huang vd. (2018) *Salmonella*'ya etkili fajların RFLP analizi için *EcoRI*, *EcoRV* ve *HindIII* enzimini kullanmışlardır. Yapılan RFLP analizi sonucunda Faj *LPST10*'un DNA'sı *EcoRI* ve çalışmamızdaki gibi *EcoRV* ile kesilebilirken, *HindIII* tarafından kesilememiştir.

López-Cuevas vd. (2011) ise çalışmalarında *HindIII* ve *EcoRV* enzimleri ile yaptıkları kesimde *HindIII* enziminin sınırlı fragment oluşturduğunu ancak *EcoRV*'in, dört faj üzerinde birkaç DNA fragmenti oluşturduğunu belirtilmiştir. Bizim yaptığımız çalışmada da ilgili enzim ile kesim sonucunda fragment oluşumu ile karşılaşılmıştır. Bu durum aynı konakçıya etkili bu fajların birbirinden farklı olduğunu göstermiş ve *Salmonella* fajları üç farklı gruba ayrılmıştır.

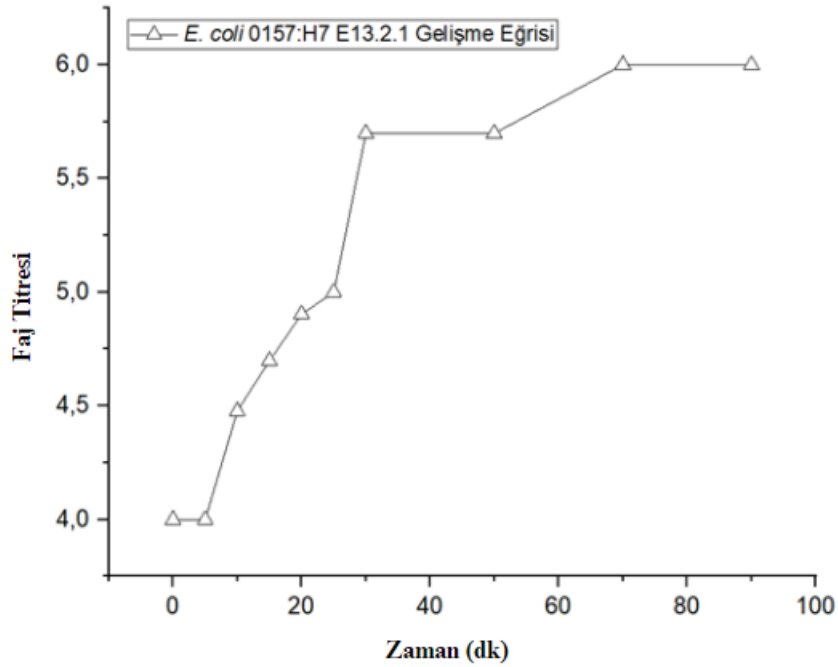
4.6 Latent Dönem Süresinin ve Patlama Büyüklüğünün Belirlenmesi (Tek aşamalı gelişme eğrisi)

Fajların patlama büyüklükleri, latent dönemlerinin belirlenmesi, adsorpsiyon oranlarının belirlenmesi faj enfeksiyonun önemli parametreleridir. Fajların tek aşamalı gelişme eğrileri çıkarılarak bu parametrelere ait sahip oldukları

değerler tespit edilebilmektedir. Verilen gelişme eğrilerine göre fajların patlama büyüklükleri ve latent dönemleri hesaplanmıştır.

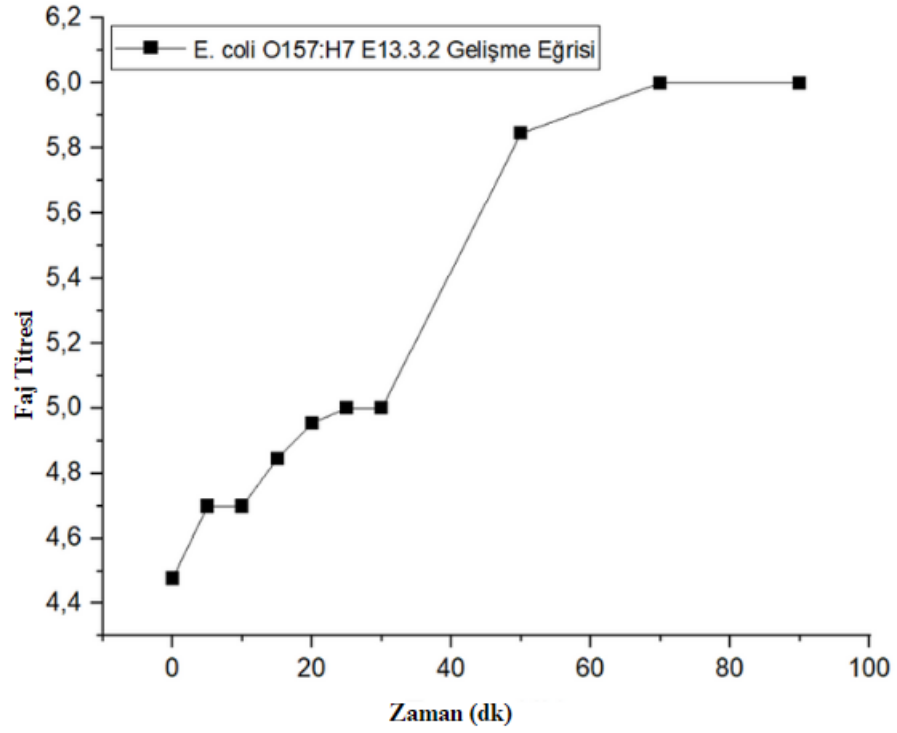
4.6.1 *E. coli* O157:H7 fajlarının gelişme eğrisi

Gelişme eğrisinden elde edilen sonuçlara göre *E. coli* O157:H7 E13.2.1 fajının latent süresi 5 dk, patlama büyüklüğü 20 POB/Enfekte hücre bulunmuştur (Şekil 4.10).



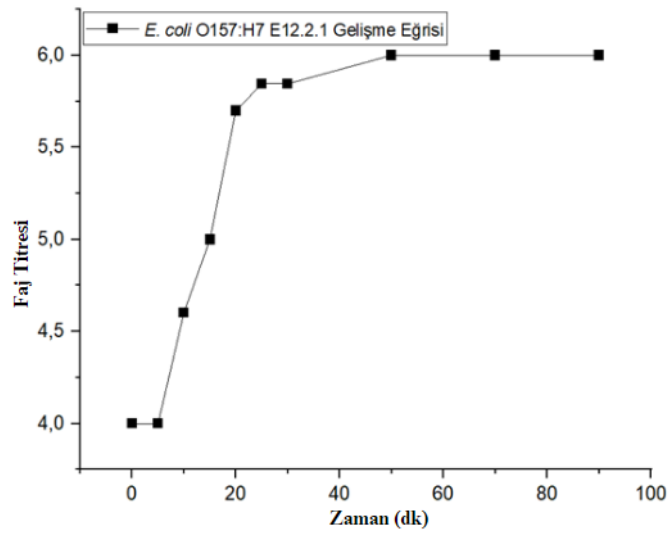
Şekil 4.10. *E. coli* O157:H7 E13.2.1 fajının gelişme eğrisi

Gelişme eğrisinden elde edilen sonuçlara göre *E. coli* O157:H7 E13.3.2 fajının latent süresi 10 dakika, patlama büyüklüğü 20 POB/Enfekte hücre bulunmuştur (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. *E. coli* O157:H7 E13.3.2 fajının gelişme eğrisi

Gelişme eğrisinden elde edilen sonuçlara göre *E. coli* O157:H7 E12.2.1 fajının latent süresi 10 dakika, patlama büyüklüğü 25 POB/Enfekte hücre bulunmuştur (Şekil 4.12).

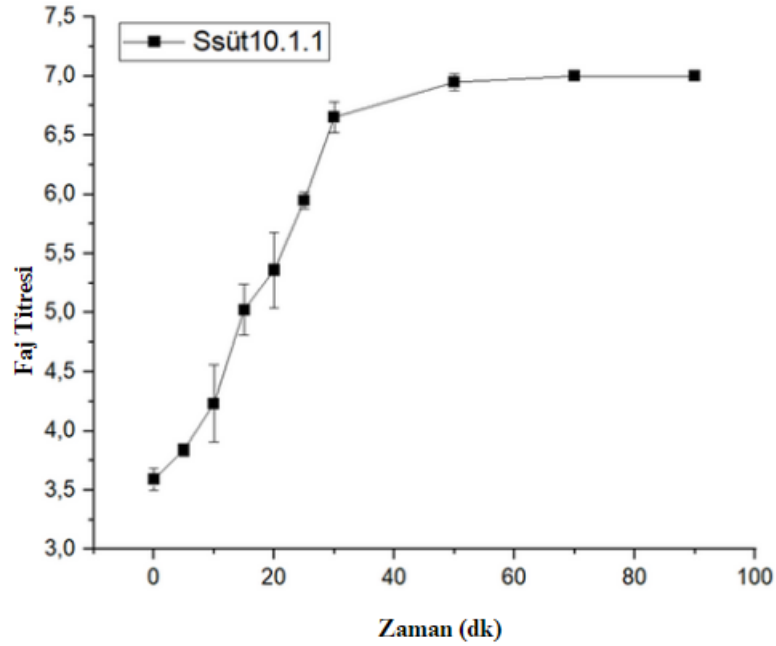


Şekil 4.12. *E. coli* O157:H7 E12.2.1 fajının gelişme eğrisi

Peng ve Yuan (2018) yaptıkları çalışmada patojenik *E. coli* suşunu inhibe eden bir faj izole etmişlerdir. Fajın özelliklerinin belirlenmesin bir aşaması olarak ise fajın gelişme eğrisi çıkarılmıştır bu analiz sonucunda Vb_EcoS_HSE2 fajının latent süresi 30 dk patlama büyüklüğü ise 10^{11} PFU/Hücre olarak bulunmuştur.

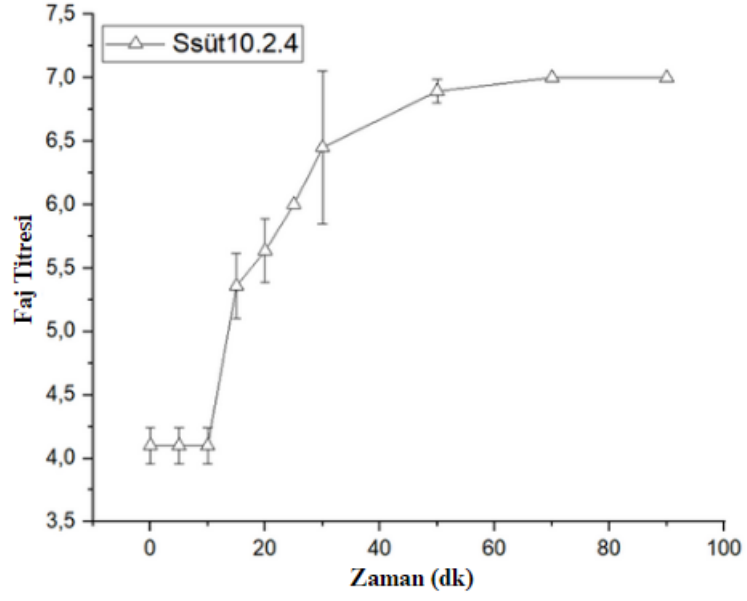
4.6.2 S. Typhimurium fajlarının gelişme eğrisi

Gelişme eğrisinden çıkan sonuçlara göre *S. Typhimurium* Ssüt10.1.1 fajının latent dönemi 10 dakika patlama büyüklüğü 180 POB/enfekte hücre olarak bulunmuştur (Şekil 4.13).



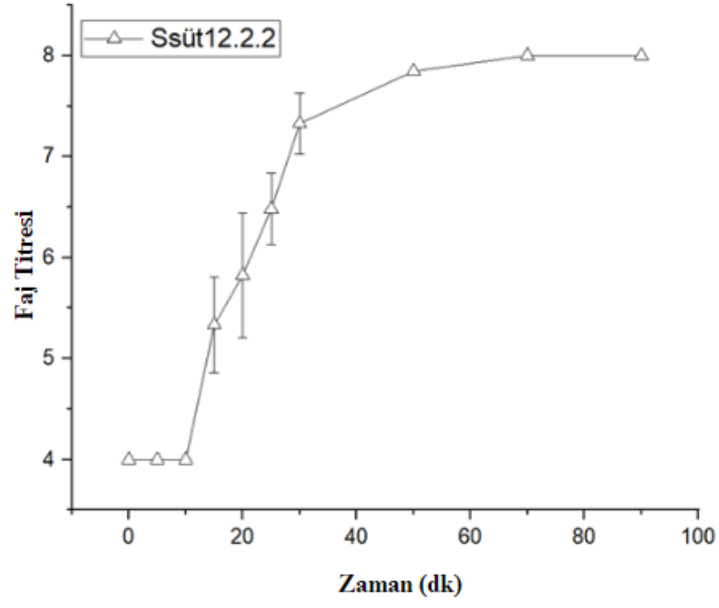
Şekil 4.13. *S. Typhimurium* Ssüt10.1.1 fajının gelişme eğrisi.

Gelişme eğrisinden çıkan sonuçlara göre *S. Typhimurium* Ssüt10.2.4 fajının latent dönemi 15 dk, patlama büyüklüğü ise 37.5 POB/enfekte hücre olarak bulunmuştur (Şekil 4.14).



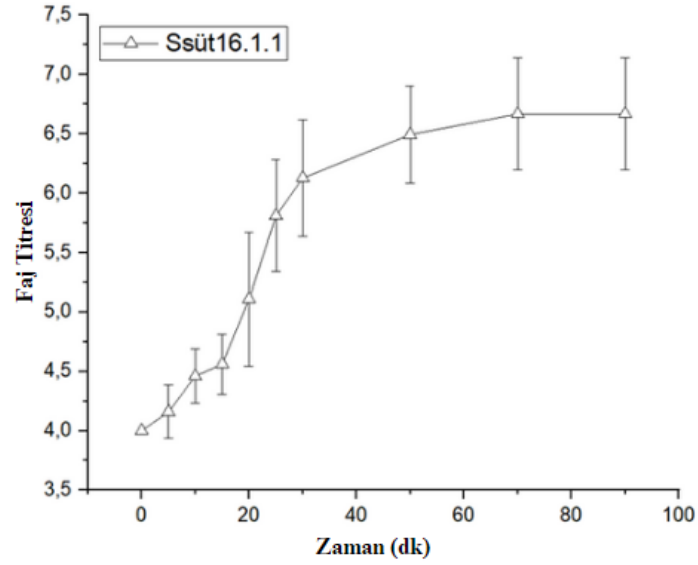
Şekil 4.14. S. Typhimurium Ssüt10.2.4 fajının gelişme eğrisi.

Gelişme eğrisinden elde edilen sonuçlara göre S. Typhimurium Ssüt12.2.2 fajının latent dönem süresi 15 dakika, patlama büyüklüğü ise 175 POB/enfekte hücre olarak bulunmuştur (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. S. Typhimurium Ssüt12.2.2 fajının gelişme eğrisi.

Gelişme eğrisinden elde edilen sonuçlara göre S. Typhimurium Ssüt16.1.1 fajının latent süresi 20 dakika, patlama büyüklüğü 25 POB/Enfekte hücre bulunmuştur (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. S. Typhimurium Ssüt16.1.1 fajının gelişme eğrisi

Shang vd. (2021) yaptıkları çalışmada topraktan izole edilen *Salmonella* Vb_SalP_TR2 fajını karakterize etmişlerdir. Tek aşamalı gelişme eğrisi analizi sonucunda ise fajının latent süresi 15 dk, patlama büyüklüğü 211 PFU/hücre bulunmuştur. Yapılan farklı bir çalışmada ise Laure ve Ahn (2021) *Salmonella* fajı PBST32'nin özelliklerini belirlemek için fajın gelişme eğrisi, adsorbiyon oranı ve litik aktivitesini belirlemişlerdir. Tek aşamalı gelişme eğrisi analizi sonucunda ise fajın latent süresi 20 dk, patlama büyüklüğü ise 90 PFU/Hücre olarak belirlenmiştir.

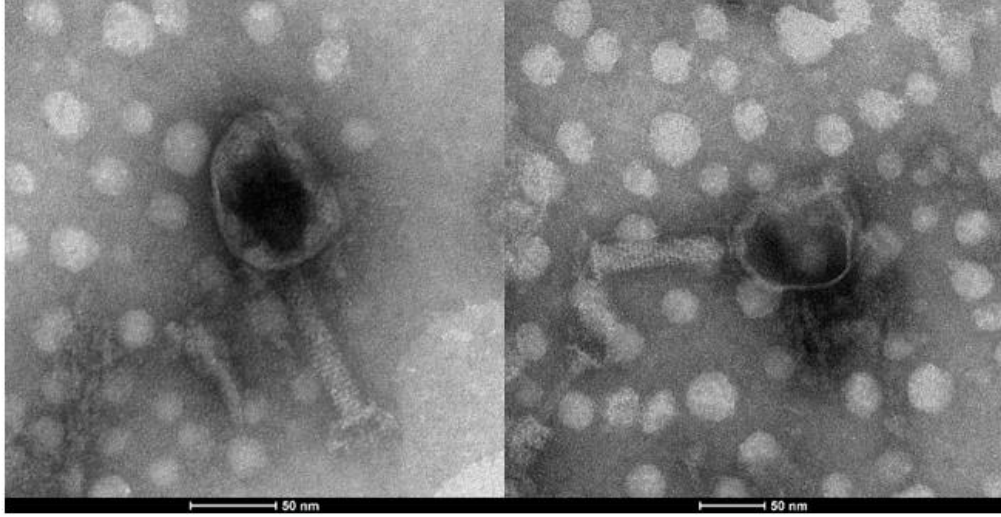
4.7 Fajların TEM Görüntüleri

İzole edilen fajların morfolojik yapıları ve TEM görüntüleri Şekil 4.17, Şekil 4.18, Şekil 4.19, Şekil 4.20, Şekil 4.21, Şekil 4.22 ve Şekil 4.23'te; faj yapılarının boyutları ise Çizelge 19'da verilmiştir.

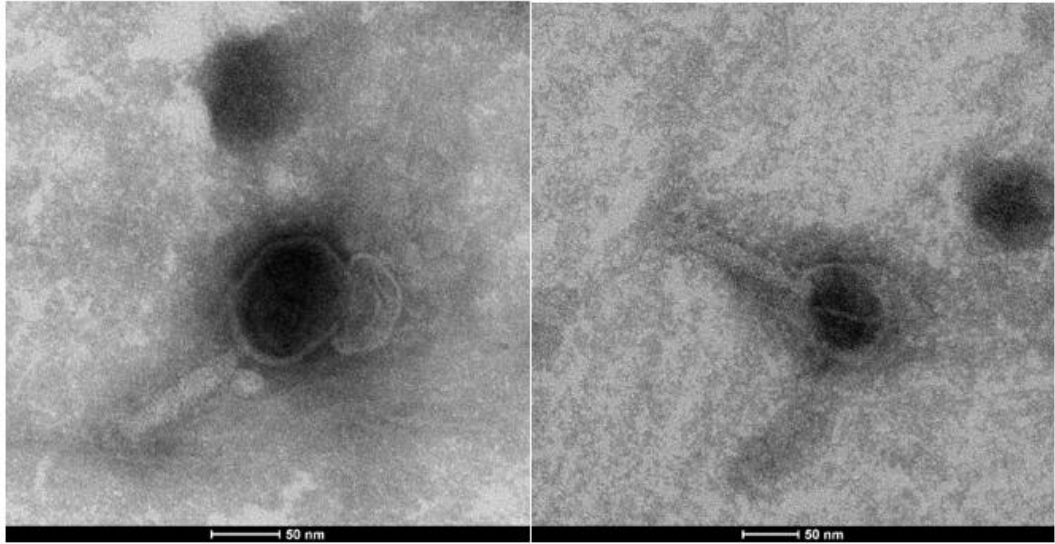
ICTV ciddi bir değişiklik yaparak *Caudovirales* sınıfını kaldırmış ve bunun yerine ikosahedral kapsidli ve çift sarmallı genomuna sahip tüm kuyruklu bakteriyal ve arkeal virüsleri gruplandırmak için *Caudoviricetes* sınıfını oluşturmuştur. *Caudoviricetes* sınıfı artık dört takıma atanan 14 aileyi içermektedir. Bu takımlardan üçü, arkeleri enfekte eden virüsleri kapsamaktadır. Fakat “podovirüs”, “miyovirüs” ve “sifovirüs” gibi tanımlayıcıların bilim tarihi için önemi bilindiği için bu terimlerin, bakteriyofajların ayırt edici özelliklerini betimlemek için kullanımına yer verilmiş fakat bu terimler taksonomik olarak bir anlam ifade etmemektedir. Fakat yeni faj sınıflamasına göre sınıflandırma yapılabilmesi için fajların sekans analizlerinin yapılması gerekmektedir. Bu tez kapsamında fajların sekans analizleri yapılmadığı için taksonomik olarak sınıflandırılmamış fakat morfolojik özelliklerine bakılarak özellikleri ortaya koyulmuştur (Turner vd., 2022).

TEM sonuçlarına bakıldığında *E. coli* O157H7 ve *S. Typhimurium*'a ait tüm bakteriyofaj örneklerinin ikosahedral bir baş ve kısa/uzun kasılabilir/değil bir kuyruğa sahip olduğu görülmektedir (Şekil 4.17, Şekil 4.18, Şekil 4.19, Şekil 4.20, Şekil 4.21, Şekil 4.22 ve Şekil 4.23). Ölçüm sonuçlarına göre E13.2.1 fajının kafa çapı 59 nm kuyruk uzunluğu 91 nm, E13.2.1 fajının kafa çapı 70 nm, kuyruk uzunluğu 80 nm, E13.3.2 fajının kafa çapı 87.5 nm, kuyruk uzunluğu 104 nm, Ssüt10.1.1 fajının kafa çapı 100 nm, kuyruk uzunluğu 108 nm, Ssüt10.2.4 fajının

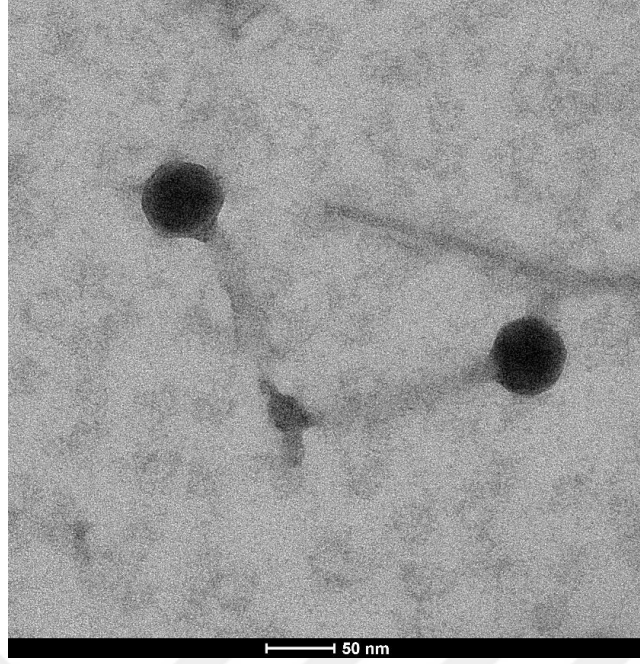
kafa çapı 83 nm, kuyruk uzunluğu 125 nm, Ssüt12.2.2 fajının kafa çapı 53 nm, kuyruk uzunluğu 100 nm, Ssüt16.1.1 fajının kafa çapı 40 nm, kuyruk uzunluğu 100 nm olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.19)



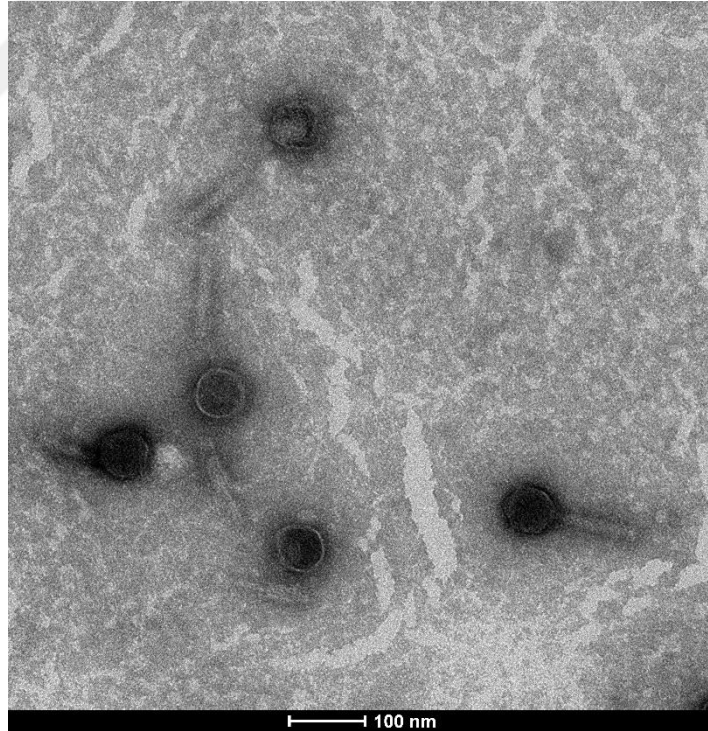
Şekil 4.17. *E. coli* O157:H7 E13.2.1. fajlarının TEM görüntüleri



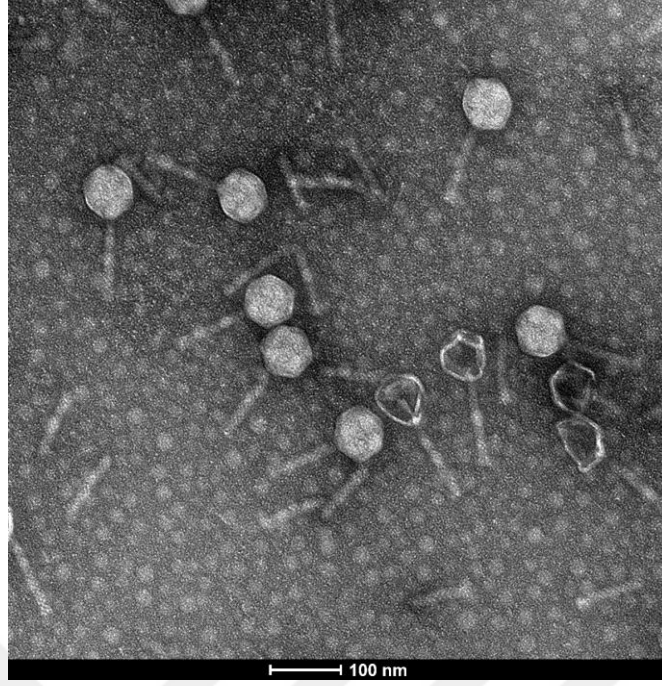
Şekil 4.18. *E. coli* O157:H7 E13.3.2 fajlarının TEM görüntüleri



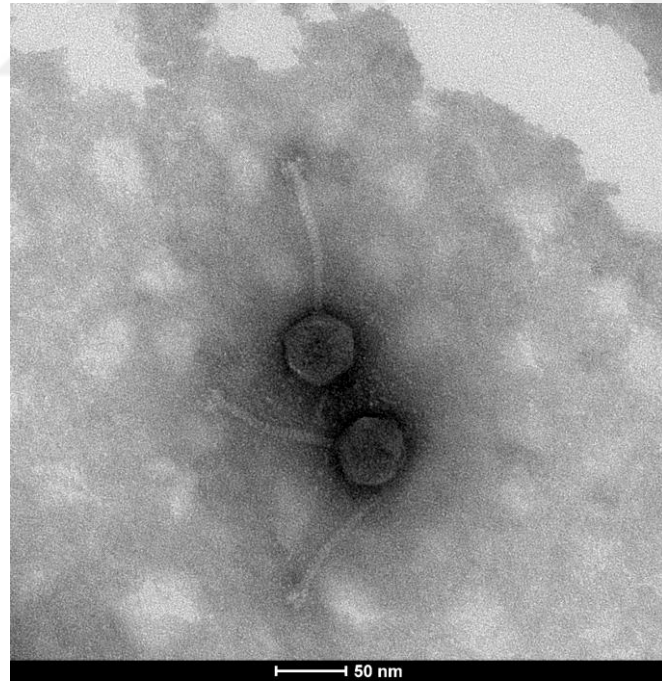
Şekil 4.19. *E. coli* O157:H7 E12.2.1 fajının TEM görüntüsü



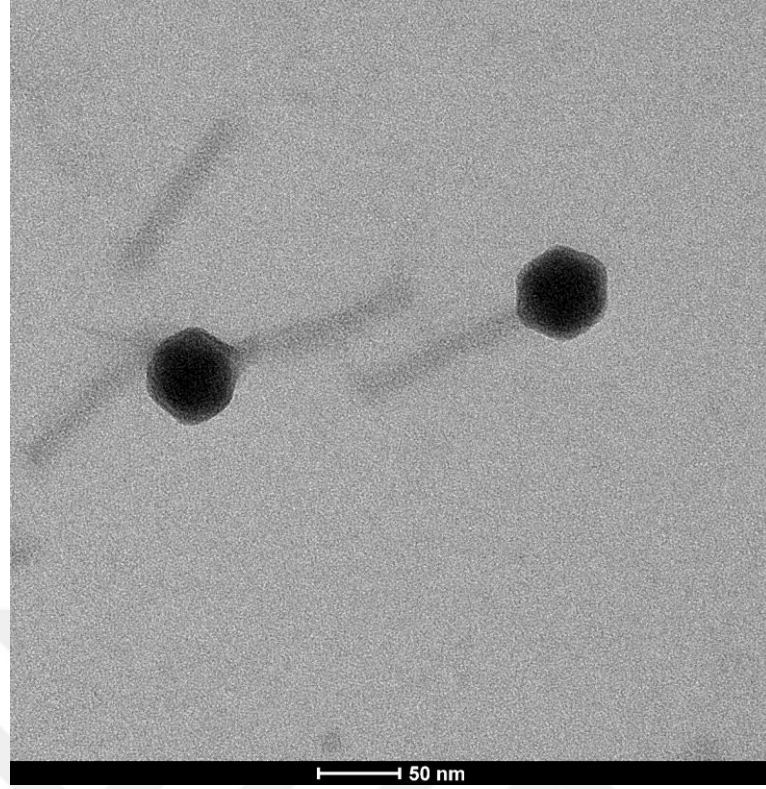
Şekil 4.20. *S. Typhimurim* Ssüt10.1.1 fajının TEM görüntüsü



Şekil 4.21. *S. Typhimurium* Ssüt10.2.4 fajının TEM görüntüsü



Şekil 4.22. *S. Typhimurium* Ssüt12.2.2 fajının TEM görüntüsü



Şekil 4.23. *S. Typhimurium* Ssüt16.1.1 fajının TEM görüntüsü

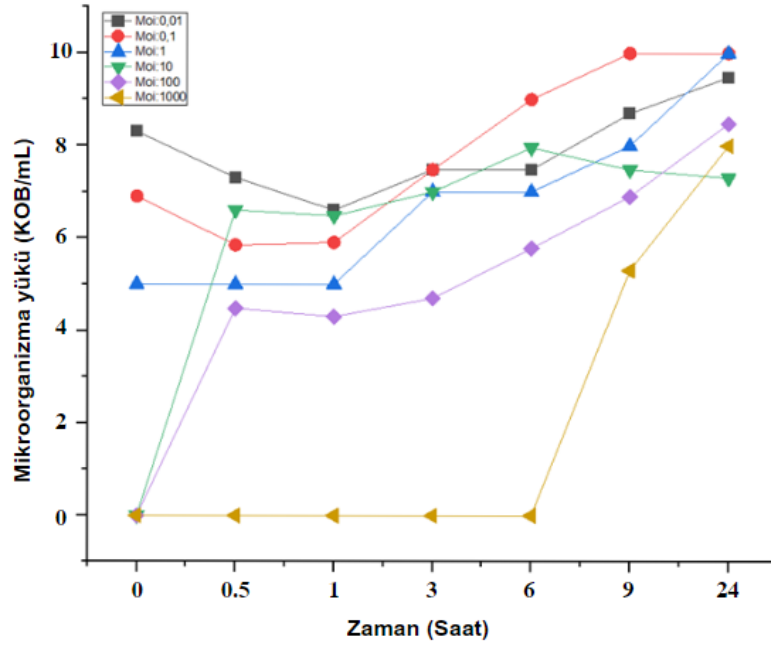
Çizelge 4.19. Fajların morfolojik özellikleri

Fajlar	Morfoloji	Kafa çapı (nm)	Kuyruk uzunluğu (nm)
E12.2.1	<i>Siphoviridae</i>	59	95
E13.2.1	<i>Myoviridae</i>	70	80
E13.3.2	<i>Myoviridae</i>	87.5	104
Ssüt10.1.1	<i>Myoviridae</i>	100	108
Ssüt10.2.4	<i>Myoviridae</i>	83	125
Ssüt12.2.2	<i>Siphoviridae</i>	53	100
Ssüt16.1.1	<i>Siphoviridae</i>	40	100

Zhou vd. (2022) *E. coli* O157:H7'nin biyokontrolü için kanalizasyon örneklerinden izole ettikleri üç fajın fenotip karakterizasyonu sonucunda ayırt edici olarak *Myoviridae* olduğunu tespit etmişlerdir. Başka bir çalışmada Askora vd. (2015), bir dizi enteraerorjik ve enteropatojenik *E. coli* suşuna karşı etkili bir litik bakteriyofaj tanımlamıştır. İzole edilen fajı øZE1 olarak adlandırmışlardır. Fajın *Siphoviridae* familyasına ait olduğu elektron mikroskopuyla doğrulanmış ve dört *E. coli* suşuna etkili olduğu tespit edilmiştir.

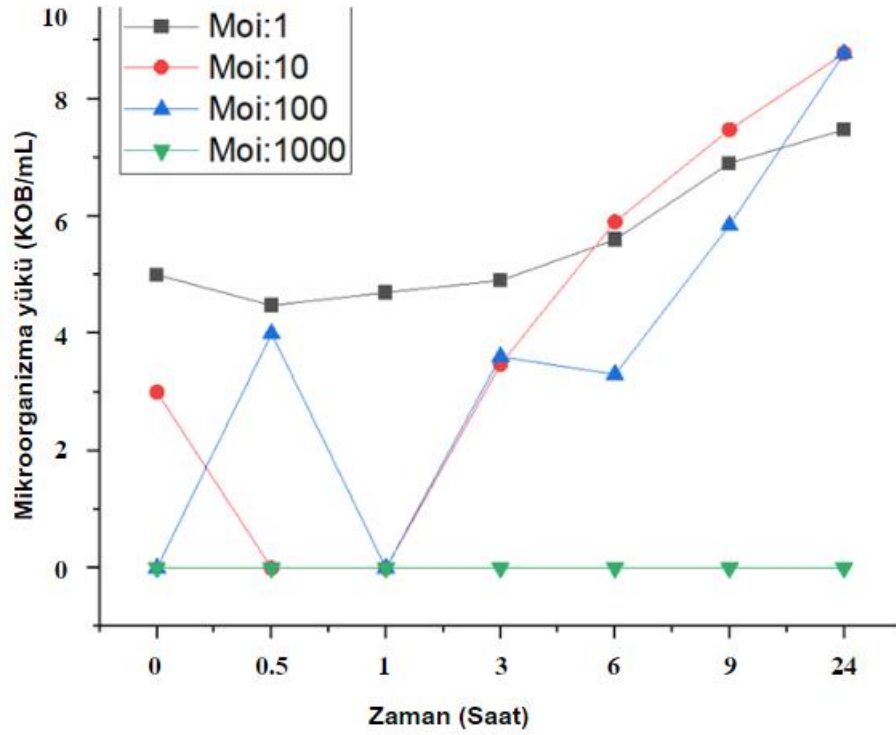
Başka bir çalışmada ise Hussein vd. (2018) kanalizasyon suyundan izole ettikleri 6 *Salmonella* fajının *Myoviridae* familyasından olduğunu göstermiştir.

4.8 Optimum MOI Değeri Sonuçları



Şekil 4.24. MOI 0,01, MOI 0,1, MOI 1, MOI 10, MOI 100, MOI 1000 değerlerinde uygulanan *S. Typhimurium* faj kokteylinin *S. Typhimurium* üzerinde 24 saatlik süreçteki etkisi.

En ideal MOI değeri, 37°C’de 24 saatlik inkübasyonun ardından faj kokteylinin bakteri sayısını düşürme oranına göre belirlenmiş ve 30 dk., 1, 3, 6, 9 ve 24 saatlik uygulaması sonucunda, MOI 1000 değerindeki fajların güçlü bir etki gösterdiği saptanmıştır. Bu sebeple hindistan cevizi sütünde *S. Typhimurium* miktarını azaltmak için faj bazlı biyokontrol uygulamasında MOI 1000 değerinin denenmesine karar verilmiştir (Şekil 4.24).



Şekil 4.25. MOI 1, MOI 10, MOI 100, MOI 1000 değerlerinde uygulanan *E. coli* O157:H7 faj kokteylinin *E. coli* O157:H7 üzerinde 24 saatlik süreçteki etkisi.

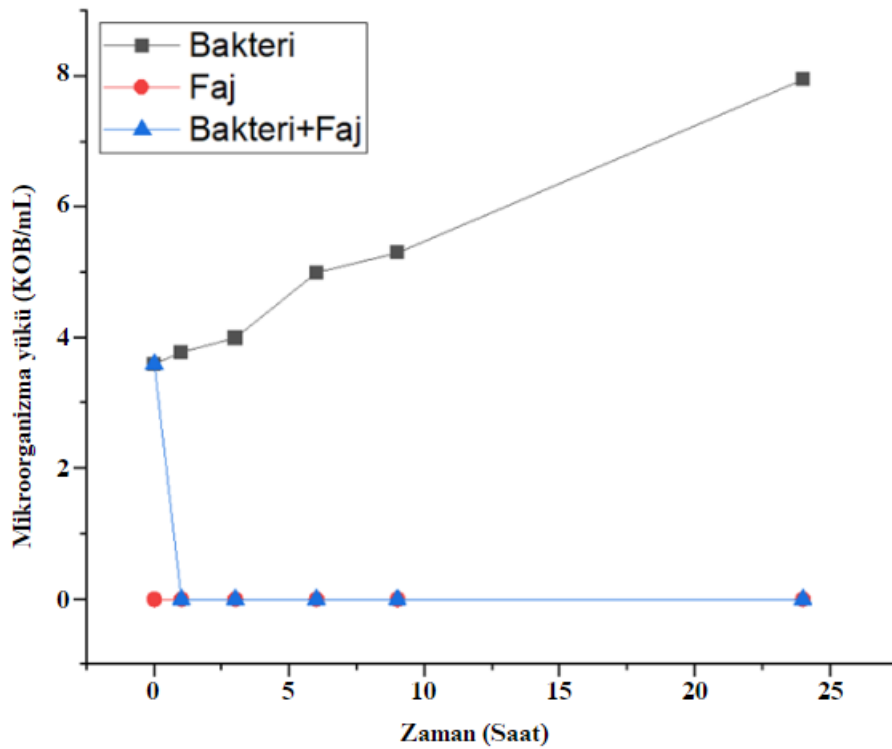
En ideal MOI değeri 37°C’de 24 saatlik inkübasyonun ardından, faj kokteylinin bakteri sayısını düşürme oranına göre belirlenmiş ve 30 dk., 1, 3, 6, 9 ve 24 saatlik uygulaması sonucunda, MOI 1000 değerindeki fajların güçlü bir etki gösterdiği saptanmıştır. Bu sebeple hindistan cevizi sütünde *E. coli* O157:H7 miktarını azaltmak için faj bazlı biyokontrol uygulamasında MOI 1000 değerinin denenmesine karar verilmiştir (Şekil 4.25).

4.9 Model Gıda Ortamında Faj Deneme Sonuçları

Model gıda olarak seçilen hindistan cevizi sütü ortamına ilave edilen faj miksinin etkinliğinin belirlenmesi amacıyla öncelikle 10 mL süte hazırlanan bakteri karışımından ilave edilmiş, ardından daha önceki aşamada belirlenen optimum MOI değeri sağlanacak şekilde faj kokteyli ilave edilmiştir. Kontrol grubunda ise hindistan cevizi sütüne yalnızca bakteri ve yalnızca faj eklenmiştir. Örneklerin oda sıcaklığında inkübasyonu süresince 0. ve 30. dk. ile 1, 3, 6, 9 ve 24. saatlerinde

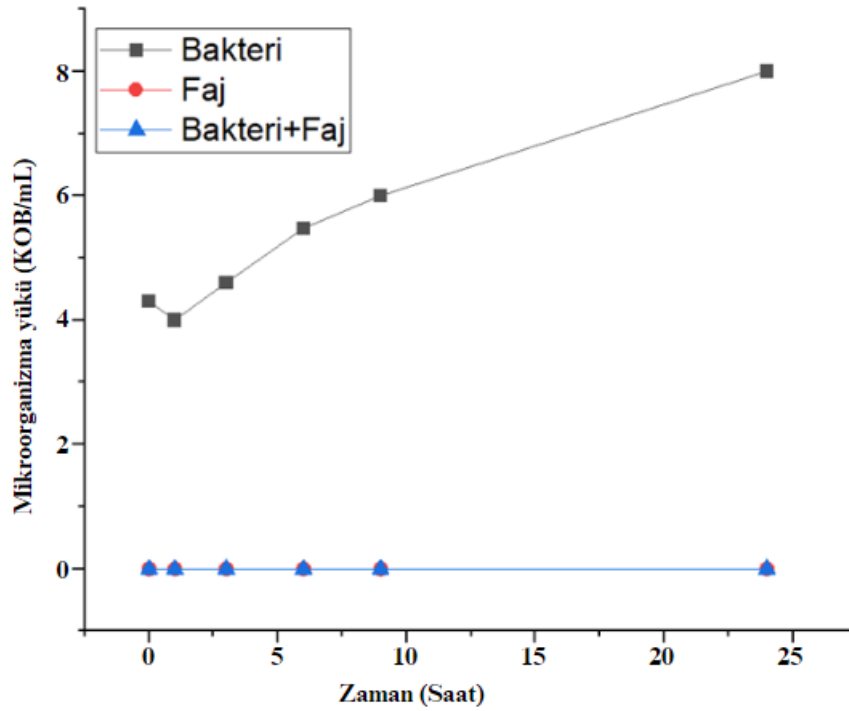
alınan örneklerde canlı bakteri sayıları uygun selektif besiyerlerine ekim yapılarak kontrol edilmiştir. Model gıda deneme sonuçları Şekil 4.26 ve Şekil 4.27’de verilmiştir.

Model gıda denemesinde Ssüt10.1.1, Ssüt10.2.4, Ssüt12.2.2 ve Ssüt16.1.1 fajlarından eşit oranda karıştırılıp oluşturulan faj kokteylinin hindistan cevizi sütü üzerinde etkisine bakıldığında faj karışımının 0. dakikadan itibaren ortamdaki *S. Typhimurium*’un mikroorganizma yükünde azaltıcı etki gösterdiği gözlemlenmiştir. Faj karışımının bakteri üzerinde etkisine bakıldığında yaklaşık olarak 4 log düşüş olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.26. *S. Typhimurium*’um model gıda ortamında fajlarla engellenmesi.

Model gıda denemesinde E13.2.1, E13.3.2 ve E12.2.1 fajlarından eşit oranda karıştırılıp oluşturulan faj kokteylinin hindistan cevizi sütü üzerinde etkisine bakıldığında faj karışımının 1. saatten itibaren ortamdaki *E. coli* O157:H7’nin mikroorganizma yükünde düşüş gözlemlenmiştir. Faj karışımının bakteri üzerinde etkisine bakıldığında yaklaşık olarak 4 log düşüş olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.27. *E. coli* O157:H7'nin model gıda ortamında fajlarla engellenmesi.

Phongtang vd. (2019) yılında yaptıkları çalışmada *S. Typhimurium* P22 fajının sütte koruyucu etkisi araştırılmıştır. Yapılan model denemesi sonucunda faj P22'nin sütlerin erken depolanması aşamasında 4. saat ve 3. günde *S. Typhimurium*'u 3 log azalttığı tespit edilmiştir.

El DougDoug vd. (2020) yaptıkları çalışmada, enfekte kan hücrelerinden izole edilen *Salmonella* vb_StyM,EN-1, vb_StyM,EN-2, vb_StyS,EN-3 ve vb_StyP,EN-4 fajlarından bir faj kokteyli oluşturarak içme suyu ve süt ortamında 4°C'de ve 25°C'de oda sıcaklığında *S. Typhimurium* gelişimi üzerine etkisini incelemişlerdir. Araştırmacılar elde ettikleri bulgulara göre faj kokteylinin 4°C'de ve oda sıcaklığında 24. saat sonunda bakteriyel yükün tamamen yok edildiğini; ayrıca faj kokteylinin 25°C'de yağsız sütte 5 log, yağlı sütte ise 1 log düşüş sağladığını belirlemişlerdir.

Waturangi vd. (2021) yaptıkları çalışmada enteropatojenik *E. coli*'yi enfekte eden litik bakteriyofajları karakterize edip marul, süt, tofu, tavuk eti ve karides üzerinde inhibisyon denemesi yapmışlardır. Gerçek örnek denemesinde MOI 0,01 değerinde BL EPEC fajı kullanılmış ve fajın marul ve süt örneğinde 0,24 log düşüş

sağladığı fakat tavuk eti, marul ve karides üzerinde bakteriyel yükü azaltmadığı görülmüştür. Literatürde yar alan bu çalışmalar ve bizim model gıda denemelerinden elde ettiğimiz sonuçlar dikkate alındığında, bakteriyofajların gıda patojenlerini engellemesi konusunda gıda matriksinin ve ortam koşullarının inhibisyon düzeyleri üzerinde önemli etkisinin olduğunu açıkça göstermektedir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında çiğ süt örneklerinden, gıda kaynaklı patojen olan *E. coli* O157:H7 ve *S. Typhimurium*'a özgü litik bakteriyofajlar izole edilmiş ve bu fajların karakterizasyonu sağlanmıştır. Çalışma sonunda:

1. Bolu ilinin farklı bölgelerinden toplanan 24 adet çiğ süt örneğinden 11 adeti *S. Typhimurium*'a ve 7 adeti *E. coli* O157:H7'ye etkili toplamda 18 adet faj izole edilmiştir.
2. Bu fajlardan, zenginleştirmeler sonucunda yüksek titreye sahip olan 8 adet *S. Typhimurium* ve 5 adet *E. coli* O157:H7 olmak üzere toplamda 13 adet faj seçilmiş ve restriksiyon profilleri belirlenmiştir.
3. Restriksiyon profillerinin belirlenmesinde *E. coli* O157:H7 fajları *EcoRI*, *EcoRV*, *BamHI*, *HindIII*, *PstI*, *XbaI*, *ScaI*; *S. Typhimurium* fajları ise *EcoRV*, *XbaI* ve *ScaI* enzimleri ile kesildiklerinde, diğer enzimlere göre daha uygun bant profilleri elde edilmiştir.
4. Restriksiyon profilleri belirlenen bakteriyofajlar, oluşturdukları fragmentlerin büyüklüklerine göre 3 gruba ayrılmış ve bu 3 gruptan titresi 10^8 PFU/mL olan 3 farklı *E. coli* O157:H7 ve 4 farklı *S. Typhimurium* fajı seçilerek gelişme eğrileri, latent dönem ve patlama büyüklükleri belirlenmiştir.
5. *E. coli* O157:H7 ve *S. Typhimurium* fajlarının optimum MOI değeri 1000 olarak belirlenmiştir.
6. Model gıda denemelerindeki sonuçlara göre MOI:1000 değerinde hindistan cevizi sütü ortamda *E. coli* O157:H7 ve *S. Typhimurium* patojenlerinin tamamen inhibe edildiği tespit edilmiştir.
7. Çalışmanın sonuçları, E13.2.1, E13.3.2, E12.2.1 fajlarının *E. coli* O157:H7; Ssüt10.1.1, Ssüt10.2.4, Ssüt12.2.2 ve Ssüt16.1.1 fajlarının ise *S. Typhimurium* suşlarına spesifik olduğunu göstermiştir.

Gıda üretim prosesleri başta olmak üzere tüm gıda zincirine gıda güvenliğinin sağlanması amacıyla faj terapi uygulamalarının önemli bir potansiyele sahip olduğu ve öneminin her geçen gün daha iyi anlaşıldığı görülmektedir. Bununla birlikte bu konuda halen yapılması gereken çalışmalar olduğu da açıkça görülmektedir. Bu çalışmalardan en önemlisi ulusal bir bakteriyofaj koleksiyonunun oluşturulmasıdır. Bu amaçla güncel faj tanımlama ve yeni sınıflandırma yöntemleri

uygulanarak izole edilen fajların tüm genom dizilimlerinin çıkarılarak sınıflandırılması, potansiyel kullanım amaçlı seçilen faj genomlarının toksik genlerin varlığı açısından değerlendirilmesi, sıcaklık ve pH faktörlerinden etkilenme durumlarının araştırılması gerekmektedir. Bu çalışmalar sonucunda elde edilecek potansiyeli yüksek fajların *E. coli* O157:H7 ve *S. Typhimurium* suşlarına karşı faj terapi amaçlı kullanılabilecek bir ürün geliştirilmesi mümkün olabilecektir.



6. KAYNAKLAR

(Bu tez çalışmasında APA atıf sistemi kullanılmıştır.)

- Abedon, S. T., Kuhl, S. J., Blasdel, B. G., & Kutter, E. M. (2011). Phage treatment of human infections. *Bacteriophage*, 1(2), 66-85.
- Acar Soykut, E. Y., & Tunail, N. T. D. (2007). *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus bulgaricus* Virulent Fajlarnın Replikasyon Parametreleri, Kapsid Protein Profilleri ve Restriksiyon Endonükleaz Analizleri Esas Alınarak Tanımlanmaları ve Sınıflandırılmaları (Doctoral dissertation, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı).
- Akter, M., Brown, N., Clokie, M., Yeasmin, M., Tareq, T. M., Baddam, R., ... & Talukder, K. A. (2019). Prevalence of *Shigella boydii* in Bangladesh: Isolation and characterization of a rare phage MK-13 that can robustly identify *Shigellosis* caused by *Shigella boydii* type 1. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2461.
- Amarillas, L., Lightbourn-Rojas, L., Angulo-Gaxiola, A. K., Basilio Heredia, J., González-Robles, A., & León-Félix, J. (2018). The antibacterial effect of chitosan-based edible coating incorporated with a lytic bacteriophage against *Escherichia coli* O157: H7 on the surface of tomatoes. *Journal of Food Safety*, 38(6), e12571.
- Anvar, A. A., Ahari, H., & Ataee, M. (2021). Antimicrobial properties of food nanopackaging: A new focus on foodborne pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 12, 690706.
- Askora, A., Merwad, A., Gharieb, R. M., & Maysa, A. (2015). A lytic bacteriophage as a biocontrol for some enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains of zoonotic risk in Egypt. *Rev Med Vet*, 3, 76-83.
- Assefa, A., & Bihon, A. (2018). A systematic review and meta-analysis of prevalence of *Escherichia coli* in foods of animal origin in Ethiopia. *Heliyon*, 4(8).
- Ateba, C. N., & Akindolire, M. A. (2019). Isolation and characterisation of bacteriophages with lytic activity against virulent *Escherichia coli* O157: H7: Potential bio-control agents.
- Ayalew Assefa, A. A., & Amare Bihon, A. B. (2018). A systematic review and meta-analysis of prevalence of *Escherichia coli* in foods of animal origin in Ethiopia.
- Bai, J., Jeon, B., & Ryu, S. (2019). Effective inhibition of *Salmonella* Typhimurium in fresh produce by a phage cocktail targeting multiple host receptors. *Food Microbiology*, 77, 52-60.
- Bao, H., Zhang, H., & Wang, R. (2011). Isolation and characterization of bacteriophages of *Salmonella enterica* serovar Pullorum. *Poultry Science*, 90(10), 2370-2377.
- Bigwood, T., Hudson, J. A., Billington, C., Carey-Smith, G. V., & Heinemann, J. A. (2008). Phage inactivation of foodborne pathogens on cooked and raw meat. *Food Microbiology*, 25(2), 400-406.
- Boyd, E. F. (2012). Bacteriophage-encoded bacterial virulence factors and phage-pathogenicity island interactions. *Advances in virus research*, 82, 91-118.
- Boyd, E. F., & Brüssow, H. (2002). Common themes among bacteriophage-encoded virulence factors and diversity among the bacteriophages involved. *Trends in Microbiology*, 10(11), 521-529.
- Bradley, D. E. (1967). Ultrastructure of bacteriophage and bacteriocins. *Bacteriological reviews*, 31(4), 230.
- Bruynoghe, R. A. J. M., & Maisin, J. (1921). Essais de thérapeutique au moyen du bacteriophage. *CR Soc Biol*, 85, 1120-1121.

- Chen, L., Fan, J., Yan, T., Liu, Q., Yuan, S., Zhang, H., ... & Ma, Y. (2019). Isolation and characterization of specific phages to prepare a cocktail preventing *Vibrio* sp. Va-F3 infections in shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Frontiers in Microbiology*, 10, 2337.
- de Assis, D. C. S., da Silva, T. M. L., Brito, R. F., da Silva, L. C. G., Lima, W. G., & Brito, J. C. M. (2021). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in bovine meat and meat products over the last 15 years in Brazil: A systematic review and meta-analysis. *Meat Science*, 173, 108394.
- d'Herelle, M. F. (1961). Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *Acta Kravsi*.
- Di Felice, F., Micheli, G., & Camilloni, G. (2019). Restriction enzymes and their use in molecular biology: An overview. *Journal of Biosciences*, 44(2), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s12038-019-9856-8>
- Diao, M., Qi, D., Xu, M., Lu, Z., Lv, F., Bie, X., ... & Zhao, H. (2018). Antibacterial activity and mechanism of monolauryl-galactosylglycerol against *Bacillus cereus*. *Food Control*, 85, 339-344.
- Ding, T., Sun, H., Pan, Q., Zhao, F., Zhang, Z., & Ren, H. (2020). Isolation and characterization of *Vibrio parahaemolyticus* bacteriophage vB_VpaS_PG07. *Virus research*, 286, 198080.
- Dos Santos, A. M., Ferrari, R. G., & Conte-Junior, C. A. (2019). Virulence factors in *Salmonella* Typhimurium: the sagacity of a bacterium. *Current Microbiology*, 76, 762-773.
- Doss, J., Culbertson, K., Hahn, D., Camacho, J., & Barekzi, N. (2017). A review of phage therapy against bacterial pathogens of aquatic and terrestrial organisms. *Viruses*, 9(3), 50.
- El-DougDoug, N., Hassan, M., Elashkar, E., Ahmed, A. I., & Hazaa, M. (2020). Control of antibiotic-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi in water and milk using phage cocktail. *Egyptian Journal of Botany*, 60(1), 185-197.
- Endersen, L., & Coffey, A. (2020). The use of bacteriophages for food safety. *Current Opinion in Food Science*, 36, 1-8.
- Esmael, A., Azab, E., Gobouri, A. A., Nasr-Eldin, M. A., Moustafa, M. M., Mohamed, S. A., ... & Abdelatty, A. M. (2021). Isolation and characterization of two lytic bacteriophages infecting a multi-drug resistant *Salmonella* Typhimurium and their efficacy to combat salmonellosis in ready-to-use foods. *Microorganisms*, 9(2), 423.
- Fan, C., Tie, D., Sun, Y., Jiang, J., Huang, H., Gong, Y., & Zhao, C. (2021). Characterization and genomic analysis of *Escherichia coli* O157: H7 bacteriophage FEC14, a new member of genus Kuttervirus. *Current Microbiology*, 78, 159-166.
- Foddai, A. C., & Grant, I. R. (2020). Methods for detection of viable foodborne pathogens: Current state-of-art and future prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104, 4281-4288.
- Fulgione, A., Cimafronte, M., Della Ventura, B., Iannaccone, M., Ambrosino, C., Capuano, F., ... & Capparelli, R. (2018). QCM-based immunosensor for rapid detection of *Salmonella* Typhimurium in food. *Scientific Reports*, 8(1), 16137.
- García, R., Latz, S., Romero, J., Higuera, G., García, K., & Bastías, R. (2019). Bacteriophage production models: An overview. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1187.
- Ge, H., Wang, Y., & Zhao, X. (2022). Research on the drug resistance mechanism of foodborne pathogens. *Microbial Pathogenesis*, 162, 105306.
- Gordillo Altamirano, F. L., & Barr, J. J. (2019). Phage therapy in the postantibiotic era. *Clinical microbiology reviews*, 32(2), 10-1128.
- Guttman, B., Raya, R., & Kutter, E. (2005). Basic phage biology. *Bacteriophages: Biology and*

- Halkman, A. Kadir (2019). Gıda Mikrobiyolojisi. Ankara
- Hankin, E. (1896). L'action bactericide des eaux de la Jumna et du Gange sur le vibron du cholera. Ann Inst Pasteur, 10, 511.
- Hanlon, G. W. (2007). Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. International journal of antimicrobial agents, 30(2), 118-128.
- Heredia, N., & García, S. (2018). Animals as sources of food-borne pathogens: A review. Animal Nutrition, 4(3), 250-255.
- Herrero-Fresno, A., & Olsen, J. E. (2018). *Salmonella* Typhimurium metabolism affects virulence in the host—A mini-review. Food Microbiology, 71, 98-110.
- Howard-Varona, C., Hargreaves, K. R., Abedon, S. T., & Sullivan, M. B. (2017). Lysogeny in nature: mechanisms, impact and ecology of temperate phages. The ISME Journal, 11(7), 1511-1520.
- Huang, C., Shi, J., Ma, W., Li, Z., Wang, J., Li, J., & Wang, X. (2018). Isolation, characterization, and application of a novel specific *Salmonella* bacteriophage in different food matrices. Food research international, 111, 631-641.
- Hussein, Y. S., El-Dougdoug, K. A., & Othman, B. A. (2018). APPLICATION OF *SALMONELLA* PHAGE COCKTAIL TO CONTROL *SALMONELLA* TYPHIMURIUM IN VITRO. Arab Universities Journal of Agricultural Sciences, 26(2), 679-688.
- Islam, M. S., Hu, Y., Mizan, M. F. R., Yan, T., Nime, I., & Zhou, Y. Characterization of *Salmonella* phage LPST153 that effectively targets most prevalent *Salmonella* serovars. Microorganisms. 2020; 8 (7): 1089.
- Iwasaki, T., Yamashita, E., Nakagawa, A., Enomoto, A., Tomihara, M., & Takeda, S. (2018). Three-dimensional structures of bacteriophage neck subunits are shared in Podoviridae, Siphoviridae and Myoviridae. Genes to Cells, 23(7), 528-536.
- Jajere, S. M. (2019). A review of *Salmonella* enterica with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance. Veterinary World, 12(4), 504.
- James, C. E., Stanley, K. N., Allison, H. E., Flint, H. J., Stewart, C. S., Sharp, R. J., ... & McCarthy, A. J. (2001). Lytic and lysogenic infection of diverse *Escherichia coli* and *Shigella* strains with a verocytotoxigenic bacteriophage. Applied and Environmental Microbiology, 67(9), 4335-4337.
- Karaynir, A. (2021). Çevresel örneklerden *Escherichia coli* DH10B Suşuna Karşı Litik Bakteriyofaj İzolasyonu ve Klinik *Escherichia coli* Suşlarına Karşı Etkinliklerinin Belirlenmesi (Master's thesis).
- Kazimierczak, J., Wójcik, E. A., Witaszewska, J., Guziński, A., Górecka, E., Stańczyk, M., ... & Dastyk, J. (2019). Complete genome sequences of *Aeromonas* and *Pseudomonas* phages as a supportive tool for development of antibacterial treatment in aquaculture. Virology journal, 16(1), 1-12.
- Kong, L., Ding, Y., Wu, Q., Wang, J., Zhang, J., Li, H., ... & Wang, Q. (2019). Genome sequencing and characterization of three *Bacillus cereus*-specific phages, DK1, DK2, and DK3. Archives of Virology, 164, 1927-1929.
- Kropinski, A. M. (2009). Measurement of the rate of attachment of bacteriophage to cells. Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions, 151-155.
- Kumar, R. N., Bhima, B., Kumar, P. U., & Ghosh, S. (2020). Bio-control of *Salmonella* spp. in

- carrot salad and raw chicken skin using lytic bacteriophages. *LWT*, 122, 109039.
- Kunisaki, H., & Tanji, Y. (2010). Intercrossing of phage genomes in a phage cocktail and stable coexistence with *Escherichia coli* O157: H7 in anaerobic continuous culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85, 1533-1540.
- Laure, N. N., & Ahn, J. (2021). Development of phage-based assay to differentiate ciprofloxacin resistant and sensitive *Salmonella* Typhimurium. *Food Science and Biotechnology*, 30, 315-320.
- Lee, K. S., Jeong, Y. J., & Lee, M. S. (2021). *Escherichia coli* Shiga toxins and gut microbiota interactions. *Toxins*, 13(6), 416.
- Litt, P. K., & Jaroni, D. (2017). Isolation and physiomorphological characterization of *Escherichia coli* O157: H7-infecting bacteriophages recovered from beef cattle operations. *International Journal of Microbiology*, 2017.
- López-Cuevas, O., Castro-del Campo, N., León-Félix, J., González-Robles, A., & Chaidez, C. (2011). Characterization of bacteriophages with a lytic effect on various *Salmonella* serotypes and *Escherichia coli* O157: H7. *Canadian Journal of Microbiology*, 57(12), 1042-1051.
- López-Cuevas, O., Castro-del Campo, N., León-Félix, J., González-Robles, A., & Chaidez, C. (2011). Characterization of bacteriophages with a lytic effect on various *Salmonella* serotypes and *Escherichia coli* O157: H7. *Canadian Journal of Microbiology*, 57(12), 1042-1051.
- Luque, A., & Silveira, C. B. (2020). Quantification of lysogeny caused by phage coinfections in microbial communities from biophysical principles. *MSystems*, 5(5), 10-1128.
- Ma, Y., Ding, S., Fei, Y., Liu, G., Jang, H., & Fang, J. (2019). Antimicrobial activity of anthocyanins and catechins against foodborne pathogens *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Food Control*, 106, 106712.
- Mahmoud, M., Askora, A., Barakat, A. B., Rabie, O. E. F., & Hassan, S. E. (2018). Isolation and characterization of polyvalent bacteriophages infecting multi drug resistant *Salmonella* serovars isolated from broilers in Egypt. *International Journal of Food Microbiology*, 266, 8-13.
- Manohar, P., Tamhankar, A. J., Lundborg, C. S., & Nachimuthu, R. (2019). Therapeutic characterization and efficacy of bacteriophage cocktails infecting *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Enterobacter* species. *Frontiers in Microbiology*, 10, 574.
- Martínez, B., García, P., & Rodríguez, A. (2019). Swapping the roles of bacteriocins and bacteriophages in food biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 56, 1-6.
- Modi, R., Hirvi, Y., Hill, A., & Griffiths, M. W. (2001). 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(7), 927-933.
- Moreno Switt, A. I., Orsi, R. H., den Bakker, H. C., Vongkamjan, K., Altier, C., & Wiedmann, M. (2013). Genomic characterization provides new insight into *Salmonella* phage diversity. *BMC genomics*, 14(1), 1-15.
- Moye, Z. D., Woolston, J., & Sulakvelidze, A. (2018). Bacteriophage applications for food production and processing. *Viruses*, 10(4), 205.
- Müller, E. E., Taylor, M. B., Grabow, W. O. K., & Ehlers, M. M. (2002). Isolation and characterization of *Escherichia coli* O157: H7 and shiga toxin-converting bacteriophages from strains of human, bovine and porcine origin. *Water Science and Technology: Water Supply*, 2(3), 29-38.

- Muniesa, M., Recktenwald, J., Bielaszewska, M., Karch, H., & Schmidt, H. (2000). Characterization of a *Shiga* toxin 2e-converting bacteriophage from an *Escherichia coli* strain of human origin. *Infection and Immunity*, 68(9), 4850-4855.
- Necel, A., Bloch, S., Nejman-Faleńczyk, B., Grabski, M., Topka, G., Dydecka, A., ... & Węgrzyn, A. (2020). Characterization of a bacteriophage, vB_Eco4M-7, that effectively infects many *Escherichia coli* O157 strains. *Scientific Reports*, 10(1), 3743.
- Newase, S., Kapadnis, B. P., & Shashidhar, R. (2019). Isolation and genome sequence characterization of bacteriophage vB_SalM_PM10, a Cba120virus, concurrently infecting *Salmonella* Enterica serovars typhimurium, typhi, and enteritidis. *Current Microbiology*, 76, 86-94.
- Nikolich, M. P., & Filippov, A. A. (2020). Bacteriophage therapy: Developments and directions. *Antibiotics*, 9(3), 135.
- Niu, Y. D., Stanford, K., Kropinski, A. M., Ackermann, H. W., Johnson, R. P., She, Y. M., ... & McAllister, T. A. (2012). Genomic, proteomic and physiological characterization of a T5-like bacteriophage for control of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157: H7. *PLoS one*, 7(4), e34585.
- Niveditha, A., Pandiselvam, R., Prasath, V. A., Singh, S. K., Gul, K., & Kothakota, A. (2021). Application of cold plasma and ozone technology for decontamination of *Escherichia coli* in foods-a review. *Food Control*, 130, 108338.
- O'flynn, G., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Coffey, A. (2004). Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for biocontrol of *Escherichia coli* O157: H7. *Applied and environmental microbiology*, 70(6), 3417-3424.
- Osawa, R. O., Iyoda, S., Nakayama, S. I., Wada, A., Yamai, S., & Watanabe, H. (2000). Genotypic variations of Shiga toxin-converting phages from enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 isolates. *Journal of Medical Microbiology*, 49(6), 565-574.
- Park, D. W., & Park, J. H. (2021). Characterization and food application of the novel lytic phage BECP10: Specifically recognizes the o-polysaccharide of *Escherichia coli* O157: H7. *Viruses*, 13(8), 1469.
- Peng, Q., & Yuan, Y. (2018). Characterization of a newly isolated phage infecting pathogenic *Escherichia coli* and analysis of its mosaic structural genes. *Scientific Reports*, 8(1), 8086.
- Phongtang, W., Choi, G. P., Chukeatirote, E., & Ahn, J. (2019). Bacteriophage control of *Salmonella* Typhimurium in milk. *Food Science and Biotechnology*, 28, 297-301.
- Pinto, G., Almeida, C., & Azeredo, J. (2020). Bacteriophages to control *Shiga* toxin-producing *E. coli*-safety and regulatory challenges. *Critical Reviews in Biotechnology*, 40(8), 1081-1097.
- Ptashne, M. (2006). Lambda's switch: lessons from a module swap. *Current Biology*, 16(12), R459-R462.
- Rani, A., Ravindran, V. B., Surapaneni, A., Mantri, N., & Ball, A. S. (2021). Trends in point-of-care diagnosis for *Escherichia coli* O157: H7 in food and water. *International Journal of Food Microbiology*, 349, 109233.
- Riley, L. W. (2020). Extraintestinal foodborne pathogens. *Annual review of food science and technology*, 11, 275-294.
- Sabri, M., Benkirane, R., Habbadi, K., Sadik, S., Ou-Zine, M., Diouri, M., & Achbani, E. H. (2021). Phages as a potential biocontrol of phytopathogens. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 54(17-18), 1277-1291.
- Sadekuzzaman, M., Mizan, M. F. R., Yang, S., Kim, H. S., & Ha, S. D. (2018). Application of

- bacteriophages for the inactivation of *Salmonella* spp. in biofilms. *Food Science and Technology International*, 24(5), 424-433.
- Safavieh, M., Qasaimeh, M. A., Vakil, A., Juncker, D., & Gervais, T. (2015). Two-aperture microfluidic probes as flow dipoles: Theory and applications. *Scientific Reports*, 5(1), 11943.
- Sağlam, A. G., Şahin, M., Çelik, E., Çelebi, Ö., Akça, D., & Otlı, S. (2017). The role of staphylococci in subclinical mastitis of cows and lytic phage isolation against to *Staphylococcus aureus*. *Veterinary World*, 10(12), 1481.
- Santos, S. B., Fernandes, E., Carvalho, C. M., Sillankorva, S., Krylov, V. N., Pleteneva, E. A., ... & Azeredo, J. (2010). Selection and characterization of a multivalent *Salmonella* phage and its production in a nonpathogenic *Escherichia coli* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(21), 7338-7342.
- Sattar, S., Ullah, I., Khanum, S., Bailie, M., Shamsi, B., Ahmed, I., ... & Altermann, E. (2022). Genome analysis and therapeutic evaluation of a novel lytic bacteriophage of *Salmonella* Typhimurium: Suggestive of a new genus in the subfamily Vequintavirinae. *Viruses*, 14(2), 241.
- Schirone, M., Visciano, P., Tofalo, R., & Suzzi, G. (2019). Foodborne pathogens: Hygiene and safety. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1974.
- Şener, G. (2021). Bakteri inaktivasyonunda farklı aktivasyon metotları ile elde edilen sülfat radikallerinin verimliliği.
- Shang, Y., Sun, Q., Chen, H., Wu, Q., Chen, M., Yang, S., ... & Zhang, J. (2021). Isolation and characterization of a novel *Salmonella* phage vB_SalP_TR2. *Frontiers in Microbiology*, 12, 664810.
- Sharma, M., Ryu, J. H., & Beuchat, L. R. (2005). Inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 in biofilm on stainless steel by treatment with an alkaline cleaner and a bacteriophage. *Journal of Applied Microbiology*, 99(3), 449-459.
- Sharma, S., Chatterjee, S., Datta, S., Prasad, R., Dubey, D., Prasad, R. K., & Vairale, M. G. (2017). Bacteriophages and its applications: an overview. *Folia Microbiologica*, 62, 17-55.
- Shauffia, M. A. M., & Sieoa, C. C. *Escherichia coli* phages isolated from broiler chickens showed ideal characteristics in gut modulation.
- Shebs-Maurine, E. L., Giotto, F. M., Laidler, S. T., & de Mello, A. S. (2021). Effects of bacteriophages and peroxyacetic acid applications on beef contaminated with *Salmonella* during different grinding stages. *Meat Science*, 173, 108407.
- Sillankorva, S., Pleteneva, E., Shaburova, O., Santos, S., Carvalho, C., Azeredo, J., & Krylov, V. (2010). *Salmonella* Enteritidis bacteriophage candidates for phage therapy of poultry. *Journal of Applied Microbiology*, 108(4), 1175-1186.
- Silveira, L. O., do Rosário, D. K. A., Giori, A. C. G., Oliveira, S. B. S., da Silva Mutz, Y., Marques, C. S., ... & Bernardes, P. C. (2018). Combination of peracetic acid and ultrasound reduces *Salmonella* Typhimurium on fresh lettuce (*Lactuca sativa* L. var. *crispa*). *Journal of food science and technology*, 55, 1535-1540.
- Sklar, I. B., & Joerger, R. D. (2001). Attempts to utilize bacteriophage to combat *Salmonella* Enterica serovar enteritidis infection in chickens. *Journal of Food Safety*, 21(1), 15-29.
- Sultan-Alolama, M. I., Amin, A., El-Tarabily, K. A., & Vijayan, R. (2022). Characterization and genomic analysis of *Escherichia coli* O157: H7 phage UAE_MI-01 isolated from birds. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(23), 14846.
- Tamerat, N., Muktar, Y., & Shiferaw, D. (2016). Application of molecular diagnostic techniques for

- the detection of *E. coli* O157: H7: a review. *J Vet Sci Technol*, 7(362), 1-9.
- Tang, F., Zhang, P., Zhang, Q., Xue, F., Ren, J., Sun, J., ... & Dai, J. (2019). Isolation and characterization of a broad-spectrum phage of multiple drug resistant *Salmonella* and its therapeutic utility in mice. *Microbial Pathogenesis*, 126, 193-198.
- Tayyarcı, E. K. 2017. "Gıda Kaynaklı Patojen Bakterilerin Biyokontrolünde Faj Terapi Ve Fitoterapinin Birlikte Kullanımı". Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Thung, T. Y., Lee, E., Mahyudin, N. A., Anuradha, K., Mazlan, N., Kuan, C. H., Pui, C. F., Ghazali, F. M., Mahmud Ab Rashid, N. K., Rollon, W. D., Tan, C. W., & Radu, S. (2019). Evaluation of a lytic bacteriophage for bio-control of *Salmonella* Typhimurium in different food matrices. *LWT*, 105, 211–214. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2019.02.033>
- Tokarz-Deptuła, B., Śliwa-Dominiak, J., Adamiak, M., Deptuła, T., Nowak, M., & Deptuła, W. (2011). Application of bacteriophages - Selected data. *Central-European Journal of Immunology*, 36(2), 87–91.
- Turner, D., Shkoporov, A. N., Lood, C., Millard, A. D., Dutilh, B. E., Alfenas-Zerbini, P., ... & Adriaenssens, E. M. (2023). Abolishment of morphology-based taxa and change to binomial species names: 2022 taxonomy update of the ICTV bacterial viruses subcommittee. *Archives of Virology*, 168(2), 74.
- Twort, F. W. (1961). An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *Acta Kravsi*.
- Umesha, S., & Manukumar, H. M. (2018). Advanced molecular diagnostic techniques for detection of food-borne pathogens: Current applications and future challenges. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(1), 84-104.
- Wagner, P. L., & Waldor, M. K. (2002). Bacteriophage control of bacterial virulence. *Infection and immunity*, 70(8), 3985-3993.
- Walker, N., Li, S., Strauss, H., & Pokharel, S. (2021). *Salmonella* Typhimurium DT 104 response to Lytic bacteriophage and Lactobionic acid on raw chicken breast. *Food Microbiology*, 100, 103862.
- Wang, C., Nie, T., Lin, F., Connerton, I. F., Lu, Z., Zhou, S., & Hang, H. (2019). Resistance mechanisms adopted by a *Salmonella* Typhimurium mutant against bacteriophage. *Virus Research*, 273, 197759.
- Waturangi, D. E., Kasriady, C. P., Guntama, G., Sahulata, A. M., Lestari, D., & Magdalena, S. (2021). Application of bacteriophage as food preservative to control enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). *BMC Research Notes*, 14(1), 1-6.
- Yang, Q., Ding, Y., Nie, R., Yao, L., Wang, X., Zhou, M., ... & Wang, X. (2020). Characterization of a novel T7-like *Salmonella* Typhimurium (ATCC13311) bacteriophage LPST144 and its endolysin. *Lwt*, 123, 109034.
- Ye, M., Sun, M., Huang, D., Zhang, Z., Zhang, H., Zhang, S., ... & Jiao, W. (2019). A review of bacteriophage therapy for pathogenic bacteria inactivation in the soil environment. *Environment international*, 129, 488-496.
- Yu, H., Guo, W., Lu, X., Xu, H., Yang, Q., Tan, J., & Zhang, W. (2021). Reduced graphene oxide nanocomposite based electrochemical biosensors for monitoring foodborne pathogenic bacteria: A review. *Food Control*, 127, 108117.
- Zhou, Y., Wan, Q., Bao, H., Guo, Y., Zhu, S., Zhang, H., ... & Wang, R. (2022). Application of a novel lytic phage vB_EcoM_SQ17 for the biocontrol of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 and Enterotoxigenic *E. coli* in food matrices. *Frontiers in Microbiology*, 13, 929005.

- Zhu, L., Hou, Y., Huang, X., Wang, S., Xie, R., Yang, J., ... & Wu, B. (2022). Isolation of Three Coliphages and the Evaluation of Their Phage Cocktail for Biocontrol of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157 in Milk. *Current Microbiology*, 79(7), 216.
- Zorlugenç, B. (2009). Çeşitli gıda maddelerinden *Flavobacterium aurantiacum* ile aflatoxin B1 miktarının azaltılması üzerine bir araştırma.
- Zuppi, M., Hendrickson, H. L., O'Sullivan, J. M., & Vatanen, T. (2022). Phages in the gut ecosystem. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 822562.

