

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



**GIDALARDA FAJ TERAPİ YÖNTEMİ İLE *LACTOCOCCUS*
GARVIEAE İNHİBİSYONUNDA KULLANILABİLECEK
FAJLARIN İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ASLI YILDIRIM

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. İbrahim ÇAKIR

İKİNCİ TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Esra ACAR SOYKUT

BOLU, TEMMUZ - 2023

KABUL VE ONAY SAYFASI

Aslı YILDIRIM tarafından hazırlanan “GIDALARDA FAJ TERAPİ YÖNTEMİ İLE *LACTOCOCCUS GARVIEAE* İNHİBİSYONUNDA KULLANILABİLECEK FAJLARIN İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU” adlı tez çalışması jürimiz tarafından Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir. 27/07/2023

Jüri Üyeleri

İmza

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

.....

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

.....

Üye
Doç. Dr. Pınar ŞANLIBABA
Ankara Üniversitesi

.....

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 27/07/2023 tarihinde Turnitin adlı intihal tespit programından enstitü müdürlüğünce belirlenen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan benzerlik raporuna göre, tezin benzerlik oranı % 19 olarak tespit edilmiştir.

.....

ASLI YILDIRIM



Fatma ve Özkan YILDIRIM'a...

ÖZET

GIDALARDA FAJ TERAPİ YÖNTEMİ İLE *LACTOCOCCUS GARVIEAE* İNHİBİSYONUNDA KULLANILABİLECEK FAJLARIN İZOLASYONU

VE KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ASLI YILDIRIM

BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: Prof. Dr. İbrahim ÇAKIR)

(İKİNCİ DANIŞMAN: Doç. Dr. Esra ACAR SOYKUT)

BOLU, TEMMUZ - 2023

XV + 63

Lactococcus garvieae, insan, hayvan ve balıklarda çeşitli bulaşıcı hastalıklara neden olan bir balık patojenidir. Özellikle su ürünleri yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara neden olan bu bakteri tatlı su, deniz suyu, toprak ve bitki yüzeyleri gibi ortamlarda bulunmaktadır. Gıdalarda patojenlerin inhibisyonun sağlanması için çeşitli yöntemler (ısıl işlem, kimyasallar gibi) kullanılsa da bu yöntemlerin dezavantajları mevcuttur. Bu yöntemlerin aksine, son yıllarda patojenlerin ortadan kaldırılması için umut verici antimikrobiyal ajanlar olarak görülen bakteriyofajların birçok avantajı vardır. Bu çalışmada, *L. garvieae*'e özgü litik bakteriyofajlardan oluşan bir faj kokteylinin su örneği üzerindeki etkinliği değerlendirilmiştir. Bu amaçla, Bolu ilinin farklı bölgelerinden toplanan 24 adet çiğ inek sütü ve 1 adet kanalizasyon suyu örneğinden *L. garvieae* etkili 29 adet faj izole edilmiştir. İzole edilen bu fajlar saflaştırılıp titreleri 10^8 PFU/mL'ye ulaştıktan sonra DNA'ları izole edilmiş ve RFLP profilleri belirlenmiştir. Restriksiyon profillerine göre 3 gruba ayrılan fajlardan titresi en yüksek olan 12S4-2, 15S3-2 ve 15S21-2 fajları seçilerek karakterize edilmiştir. Bu fajların karakterizasyonu için enfeksiyon çoklukları, adsorpsiyon hızları, konakçı aralıkları, latent dönemleri ve patlama boyutları belirlenmiştir. Karakterize edilen 12S4-2, 15S3-2 ve 15S21-2 fajlarından bir faj kokteyli hazırlanmış ve su örneğinde *L. garvieae* üzerindeki etkinliği belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, faj kokteylinin MOI (Multiplicity of Infection): 0,1 ve MOI: 10 değerlerinde *L. garvieae* suşlarını tamamen ortadan kaldırdığını göstermiştir. Bu sonuç, faj kokteylinin *L. garvieae*'nin su örneğindeki varlığını etkin bir şekilde azalttığını ve potansiyel olarak patojenin kontrolünde kullanılabileceğini göstermektedir.

ANAHTAR KELİMELER: Bakteriyofaj, *Lactococcus garvieae*, Balık Patojeni

ABSTRACT

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF PHAGES THAT CAN BE USED IN INHIBITION OF *LACTOCOCCUS GARVIEAE* BY PHAGE THERAPY METHOD IN FOODS

MSC THESIS

ASLI YILDIRIM

BOLU ABANT IZZET BAYSAL UNIVERSITY

INSTITUTE OF GRADUATE STUDIES

DEPARTMENT OF FOOD FOOD ENGINEERING

(SUPERVISOR: Prof. Dr. İbrahim ÇAKIR)

(CO-SUPERVISOR: Assoc. Prof. Esra ACAR SOYKUT)

BOLU, JULY 2023

XV + 63

Lactococcus garvieae is a fish pathogen that can cause various infectious diseases in humans, animals, and fish. It is particularly problematic in aquaculture, leading to significant economic losses. This bacterium can be found in environments such as freshwater, seawater, soil, and plant surfaces. While various methods, such as heat treatment and chemicals, are used to inhibit pathogens in food, these methods have their drawbacks. In contrast, bacteriophages, which have been considered as promising antimicrobial agents for the elimination of pathogens in recent years, offer several advantages. This study evaluated the effectiveness of a phage cocktail composed of lytic bacteriophages specific to *L. garvieae* on a water sample. For this purpose, 29 phages effective against *L. garvieae* were isolated from 24 raw milk samples collected from different regions of Bolu province, as well as 1 sewage water sample. After isolating and purifying these phages, their titers reached 10^8 PFU/mL, and their DNA was isolated and RFLP profiles were determined. Based on the restriction profiles, the phages were divided into three groups, and the phages with the highest titers, namely 12S4-2, 15S3-2, and 15S21-2, were selected and characterized. The characterization of these phages involved determining their infection multiplicities, adsorption rates, host ranges, latent periods, and burst sizes. A phage cocktail was prepared using the characterized phages 12S4-2, 15S3-2, and 15S21-2, and its effectiveness on *L. garvieae* in the water sample was observed. The results showed that the phage cocktail completely eliminated *L. garvieae* strains at MOI (Multiplicity of Infection) values of 0.1 and 10. This results indicate that the phage cocktail effectively reduced the presence of *L. garvieae* in the water sample and could potentially be used for controlling the pathogen.

KEYWORDS: Bacteriophage, *Lactococcus garvieae*, Fish Pathogen

İÇİNDEKİLER

Sayfa

KABUL VE ONAY.....	iii
ETİK BEYAN.....	iv
ÖZET.....	vi
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
TABLO LİSTESİ	xi
GRAFİK LİSTESİ	xii
KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ	xiii
TEŞEKKÜR	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1 <i>Lactococcus garvieae</i>	5
2.2 Bakteriyofajlar	7
2.2.1 Litik Fajlar	9
2.2.2 Lizojenik Fajlar	10
2.2.3 <i>Lactococcus garvieae</i> Bakteriyofajları	13
3. MATERYAL VE YÖNTEM	18
3.1 Materyal	18
3.1.1 Bakteri Suşları ve Faj İzolasyonunda Kullanılan Örnekler	18
3.1.2 Besiyerleri ve Kimyasallar	19
3.2 Yöntem	19
3.2.1 Bakteri Suşlarının Aktifleştirilmesi ve Muhafaza Koşulları	19
3.2.2 <i>Lactococcus garvieae</i> Etkili Fajların İzole Edilmesi, Zenginleştirilmesi ve Titrelelerinin Belirlenmesi	20
3.2.3 Fajların Konakçı Aralıklarının Belirlenmesi	22
3.2.4 <i>Lactococcus garvieae</i> 'ya Etkili Fajların DNA Ekstraksiyonu	23
3.2.5 Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi ile İzole Edilen Fajların Sınıflandırılması	23
3.2.6 Konakçı Suşların Gelişme Eğrilerinin Çıkarılması	24
3.2.7 Enfeksiyon Çokluğu (Multiplicity of Infection (MOI)) Belirleme ..	24
3.2.8 Fajların Tek Aşamalı Gelişme Eğrilerinin Çıkarılması	25
3.2.9 Fajların Adsorpsiyon Hızlarının Belirlenmesi	27
3.2.10 <i>L. garvieae</i> 'ya Etkili Faj Karışımının Model Gıda Uygulaması ..	27
4. BULGULAR	29
4.1 Fajların İzolasyonu, Saflaştırılması ve Titrelelerinin Belirlenmesi	29
4.2 İzole Edilen Fajların Konakçı Aralığının Belirlenmesi	32
4.3 <i>Lactococcus garvieae</i> 'ya Etkili Fajların DNA Ekstraksiyonu	35

4.4 İzole Edilen Bakteriyofaj DNA'larının Restriksiyon Profillerinin Belirlenmesi.....	35
4.5 Konakçı Suşların Gelişme Eğrisi Sonuçları	37
4.6 Enfeksiyon Çokluğu	39
4.7 Fajların Tek Aşamalı Gelişme Eğrisi	42
4.8 Fajların Adsorpsiyon Hızlarının Belirlenmesi.....	44
4.9 <i>L. garvieae</i> 'ya Etkili Faj Karışımının Model Gıda Uygulaması	46
5. TARTIŞMA	48
5.1 <i>Lactococcus garvieae</i> 'ya Etkili Fajların İzolasyonu	48
5.2 İzole Edilen Fajların Konakçı Aralığının Belirlenmesi.....	48
5.3 Faj DNA'larının Restriksiyon Profilleri	50
5.4 Konakçı Suşların Gelişme Eğrisi	51
5.5 Fajların Tek Aşamalı Gelişme Eğrisi	51
5.6 Faj Adsorpsiyon Oranları	52
5.7 <i>L. garvieae</i> 'ya Etkili Faj Karışımının Su Örneğine Etkisi	53
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	55
7. KAYNAKLAR.....	57

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1. T4 bakteriyofajının yapısı.....	8
Şekil 2.2. Fajların litik ve lizojenik yaşam döngüleri.	11
Şekil 2.3. WWP-1'in plakları ve elektron mikrografı.	15
Şekil 3.1. Süt örneklerinin kaba filtre kağıtlarından süzülmesi.	21
Şekil 3.2. 12S4-2 fajına ait DNA molekülü.	23
Şekil 3.3. Bir Fajın Tek Aşamalı Gelişme Eğrisi.....	26
Şekil 3.4. <i>L. garvieae</i> ile enfekte edilmiş su örnekleri.....	28
Şekil 4.1. İzole edilen bazı fajların litik aktivitesi.	30
Şekil 4.2. Titresi yükseltilen 12S19 fajının farklı dilüsyonlarda litik aktivitesi (Faj titresi).	31
Şekil 4.3. 15S3-2 fajının tek plak izolasyonu (5. Dilüsyon).	31
Şekil 4.4. 3, 12 ve 15 konakçı suşlara etkili bazı fajların jel görüntüleri.....	35
Şekil 4.5. Faj DNA'larının <i>EcoRI</i> enzimi ile kesimi jel görüntüsü. M: Marker; 1:12S1-2; 2: 12S3-1; 3: 12S4-2; 4: 12S5-1; 5: 12S19-1; 6: 12S19-2; 7: 15S3-2; 8: 15S4-2; 9: 15S18-2; 10:15S21-1.....	36

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1. Bazı FDA onaylı GRAS dereceli faj preparatları.	11
Tablo 2.2. Bazı gıda kaynaklı patojenlere etkili bakteriyofaj çalışmaları.	12
Tablo 3.1. Tez aşamasında kullanılan bakteri kültürleri.	18
Tablo 3.2. Faj izolasyonu için kullanılan çiğ süt örneklerinin kodları ve temin edildiği yerler.	19
Tablo 3.3. Reaksiyon karışımına giren bileşen hacimleri.	24
Tablo 3.4. MOI değerleri ve karışım hacimleri.	25
Tablo 3.5. Gıda denemesi için hazırlanan karışım hacimleri.	28
Tablo 4.1. İzole edilen fajlar ve kodları.	29
Tablo 4.2. Saflaştırılan fajların kodları.	32
Tablo 4.3. İzole edilen fajların farklı konakçılar üzerindeki litik aktivitesi.	33
Tablo 5.1. <i>L. garvieae</i> etkili fajların genom büyüklükleri.	50
Tablo 5.2. Fajların bazı özellikleri	52

GRAFİK LİSTESİ

Sayfa

Grafik 4.1. <i>L. garvieae</i> 12 suşunun gelişme eğrisi.....	38
Grafik 4.2 <i>L. garvieae</i> 15 suşunun gelişme eğrisi.....	38
Grafik 4.3. Farklı MOI değerlerinde fajların etkileri.	39
Grafik 4.4. 12S4-2 fajının tek aşamalı gelişme eğrisi.....	43
Grafik 4.5. 15S3-2 fajının tek aşamalı gelişme eğrisi.....	43
Grafik 4.6. 15S21-1 fajının tek aşamalı gelişme eğrisi.....	44
Grafik 4.7. 12S4-2 fajının adsorpsiyon eğrisi.	45
Grafik 4.8. 15S3-2 fajının adsorpsiyon eğrisi.	45
Grafik 4.9. 15S21-1 fajının adsorpsiyon eğrisi.	46
Grafik 4.10. MOI: 0,1 ve MOI: 10'da faj karışımlarının, <i>L. garvieae</i> ile enfekte edilmiş su örneğine etkisi.	47

KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ

°C	: Santigrat Derece
a/h	: Ağırlık/Hacim
B.A.İ.B.Ü	: Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi
BAVS	: Bakteriyel ve Arkeal Alt Komite
BETUM	: Bilimsel Endüstriyel ve Teknolojik Uygulama ve Araştırma Merkezi
BHI	: Brain Heart Infusion
bç	: Baz Çifti
CaCl₂	: Kalsiyum Klorür
CFU	: Koloni Oluşturan Birim
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
dsDNA	: Çift Sarmallı DNA
dsRNA	: Çift Sarmallı RNA
dv/dk	: Devir/Dakika
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
EFSA	: Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
EtBr	: Etidyum Bromür
FDA	: Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
FTS	: Fizyolojik Tuzlu Su
GRAS	: Genel Olarak Güvenli Olarak Kabul Edilir
H₂S	: Hidrojen Sülfür
ICTV	: Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi
İYE	: İdrar Yolu Enfeksiyonu
LOG	: Logaritmik
LPS	: Lipopolisakarit
MgCl₂	: Magmezyum Klorür
mL	: Mililitre
mM	: Milimol
MOI	: Enfeksiyon Çokluğu
MRSA	: Man, Rogosa ve Sharpe Agar
NaCl	: Sodyum Klorür
OD	: Optik Yoğunluk

PFU	: Plak Oluşturan Birim
RFLP	: Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi
RNA	: Ribonükleik Asit
RPM	: Dakikadaki Devir Sayısı
ssDNA	: Tek Sarmallı DNA
ssRNA	: Tek Sarmallı RNA
TAE	: Tris-acetate-EDTA
TSA	: Tryptic Soy Agar
UV	: Ultraviyole
V/cm	: Volt/Santimetre
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
YA	: Yumuşak Agar
µL	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, kıymetli bilgi ve tecrübelerini paylaşarak bu yolda bana ışık olan, onlarla çalıştığım için çok şanslı hissettiğim değerli danışmanlarım sayın Prof. Dr. İbrahim ÇAKIR ve sayın Doç. Dr. Esra ACAR SOYKUT'a,

Minnetimi gerçekten nasıl belirteceğimi bilemediğim, sadece çalışmam konusunda değil hayatım her alanında bana yol gösteren, yorulduğumda ayağa kaldıran, güldüğümde yanımda olan, birlikte birçok mutluluğu paylaştığım sevgili dostum Yük. Gıda Müh. Şeyma Betül ENCU'ya,

Akademik hayata girmemde büyük etkisi olan, hayata çok farklı pencelerden bakmamı sağlayan, desteklerini her zaman üzerimde hissettiğim, öz ablam ve abim yerine koyduğum Öğr. Gör. Dr. Nursel SÖYLEMEZ MİLLİ ve Dr. Öğr. Üyesi Mehmet MİLLİ'ye,

Eşsiz arkadaşlıkları ve yardımlarıyla yanımda olan, sevgili çalışma arkadaşlarım Ayşenur ARSLAN, Başak IŞIK, Merve ERTEM, Özge KAVAS, Özlem ŞAHİN, Selin AKBAŞ ve Yeşim AKTEPE'ye,

Çok geç tanıştığım ama hayatımda çok büyük bir yer kaplayan, beraber ağlayıp beraber güldüğüm, ne yaparsam yapayım yanımda olan manevi kız kardeşlerim Kader SÖYLEMEZ ve Kardelen SÖYLEMEZ'e,

Evlatları olmaktan gurur duyduğum, attığım her adımda sorgulamadan yanımda olarak ayakları yere sağlam basan bir kadın olmamı sağlayan, hala yanlarında küçük bir kız çocuğu gibi hissettiğim annem ve babam Fatma YILDIRIM ve Özkan YILDIRIM'a; bu hayatta ne olursa olsun yanımda duracağını bildiğim kız kardeşim Ayşenur YILDIRIM'a tüm kalbimle teşekkür ederim.

Aslı YILDIRIM

1. GİRİŞ

Gıda, insan yaşamının en temel gereksinimlerinden biridir. İnsanın sağlıklı ve kaliteli bir yaşam sürmesi için tükettiği gıdanın güvenilir olması gerekmektedir. Dolayısıyla gıda güvenliği de bir insan hakkı olarak görülmektedir. Gıda güvenliği, birey ve toplum sağlığını iyileştirmekte, uygulandığı ve geliştirildiği bölgenin ekonomik büyümesini artırmaktadır. Gıda, topraktan tabağa kadar olan tedarik zincirinde mikrobiyal, kimyasal veya çevresel bazı kontaminasyonlara maruz kalabilmektedir (Fung et al., 2018). Dünya çapında, gıda kaynaklı hastalıklardan en fazla patojenik bakteri ve virüsler sorumludur (Dünya Sağlık Örgütü (WHO), 2020). *Salmonella*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 ve *Shigella* gibi gıda kaynaklı patojenlerin neden olduğu gıda kaynaklı hastalıklar, gıda güvenliğinde ciddi bir halk sağlığı sorununa yol açmaktadır (Zhao et al., 2018). Ayrıca, ulusal ekonomiler için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. Bu konuda dünya genelinde artan kanunsal düzenlemelere ve iyileştirilmiş hijyen yönetim sistemlerine rağmen, gıdaların mikrobiyal kontaminasyonu, hala ciddi sağlık problemlerine neden olmaktadır. Bu nedenle, patojenlerin incelenmesi ve izlenmesi, gıda ürünlerinin güvenliğinin sağlanması ve böylece hastalık oluşumunun azaltılması büyük önem taşımaktadır (Zhang et al., 2020).

Su ürünleri yetiştiriciliği dünyada en hızlı büyüyen gıda üretim sektörlerinden biridir ve bakteriyel hastalıklar su ürünleri yetiştiriciliğinde yüksek ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Aşılama, su ürünleri yetiştiriciliğinde bakteriyel hastalıkların oluşumunun azaltılmasına katkıda bulursa da hala aşılama yoluyla başarılı bir şekilde kontrol edilemeyen birçok patojen vardır (Dubey vd., 2022). Balıklarda patojenik etkiye sahip mikroorganizmalardan biri de *Lactococcus garvieae*'dir (Baños vd., 2019; Kuebutornye vd., 2020). Bu patojen, insanlarda, hayvanlarda ve balıklarda ölümcül hemorajik sepsis ve meningoensefalite neden olduğu bilinen Gram pozitif, α -hemolitik, zincir oluşturan bir koktur. *L. garvieae*, Akdeniz bölgesi, Japonya, Avrupa, Güneydoğu Asya ülkeleri ve Kuzey Amerika'da su ürünleri yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara neden olan, tatlı sudan denize kadar geniş bir yaşam alanına sahip bir balık patojenidir (Shahi ve Mallik, 2020a). Günümüzde, *L. garvieae* gibi bakterilerin neden olduğu

hastalıkların tedavisi için yaygın olarak antibiyotikler kullanılmaktadır. Fakat bu durum antibiyotiğe dirençli bakterilerin hızla ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bu nedenle mikroorganizmaların sebep olduğu, insan sağlığını tehdit eden sorunları ortadan kaldırılmak ve daha güvenli gıda üretmek için yeni antimikrobiyallere ihtiyaç duyulmaktadır (Chegini vd., 2020). Antibiyotiklere dirençli bakterilerin tedavisinde, bakteriyofajlar dediğimiz virüsler, potansiyel antimikrobiyaller olarak görülmektedir. Bu nedenle, bakteriyofajlar üzerine yapılan araştırmaların önemi giderek artmaktadır.

Bakteriyofajlar veya fajlar, bakterileri enfekte eden virüslerdir (Kakasis ve Panitsa, 2019; Ye vd., 2019). Isıl işlem, yüksek basınç, ışınlama, antibiyotikler ve kimyasal koruyucular gibi çeşitli gıda koruma yöntemleri göz önüne alındığında, bakteriyofaj uygulamasının birçok avantajı vardır. Bunların başında, kendilerine özgüllük sağlayan bir konakçı aralığına sahip olmaları gelmektedir (Duc vd., 2018; Ramos-Vivas vd., 2021). Bu özellikleri sayesinde, gıda ve gastrointestinal sistem gibi karmaşık mikrobiyal ortamlarda yararlı flora zarar görmemektedir (Coffey vd., 2010). Ayrıca kullanımları gıdanın organoleptik özelliklerini değiştirmemekte, kullanımları ile antibiyotik ve dezenfektanlarda olduğu gibi çevreye olumsuz bir etkileri olmamaktadır. Seçici aktivitelerinin yanı sıra, gıda endüstrisinde hem Gram negatif hem de Gram pozitif patojenlerin oluşturduğu biyofilmleri ortadan kaldırmak veya zayıflatmak için kullanımları başarılı bir şekilde sonuçlanmaktadır (Ramos-Vivas vd., 2021). Ayrıca fajların, antibiyotiklere göre, bakteriyel konakçılarına karşı direnç geliştirme riski düşüktür (Huang vd., 2022). Bu özelliklerinin yanı sıra, gıda kaynaklı patojenleri kontrol etmek için gıda koruyucu maddeleri olarak kullanımları nedeniyle Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından Genel Olarak Güvenli Olarak Kabul Edilir (GRAS) statüsüne sahiptirler. Bu avantajlarından dolayı, günümüzde gıdalardan patojenleri uzaklaştırmak için bakteriyofajların kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır. Örneğin birçok ülke *Listeria monocytogenes*'i inhibe etmek için ListShield™ ve Listex™ P100 gibi ticari fajları kullanmaktadır (Pietracha ve Misiewicz, 2016).

Bu tez çalışmasında, bir balık patojeni olan *L. garvieae*'ye özgü litik bakteriyofajlardan oluşan bir faj kokteylinin su örneği ortamında *L. garvieae*'yi inaktive etme etkinliği değerlendirilmiştir. Bu amaçla, çeşitli süt örneklerinden *L. garvieae*'yi inhibe eden litik fajlar izole edilmiş ve karakterizasyonu

gerçekleştirilmiştir. İzole edilen fajlar RFLP profillerine göre gruplandırıldıktan sonra, birbirinden farklılık gösteren fajlardan oluşan bir karışım hazırlanmış ve bu karışımın su örneğinde *Lactococcus garvieae*'nin biyokontrolü için etkinliği tespit edilmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

Güvenli gıda kaynakları, sağlıklı ve kaliteli beslenmeyi beraberinde getirmekte, ulusal ekonomileri, ticareti ve turizmi desteklemekte ve sürdürülebilir kalkınmanın temelini oluşturmaktadır (WHO, 2022). Dünya Sağlık Örgütü, küresel olarak yaklaşık 600 milyon insanın yılda 420.000'e kadar ölümle sonuçlanan, gıda kaynaklı ciddi hastalıklar yaşadığını tahmin etmektedir. Bunun doğrudan sağlık hizmetleri maliyetleri ve dolaylı üretkenlik maliyetleri kaybı nedeniyle finansal etkisinin 110 milyar doları aştığı tahmin edilmektedir (WHO, 2020). Dolayısıyla, gıda sürdürülebilirliği ve güvenliği, dünya çapında gıda üreticilerinin dikkatli olmasını gerektiren iki önemli konudur. Gelişmiş ülkelerde tüketiciler, doğal yollarla üretilen gıdaları tüketmeye doğru kayma, güvenli, doğal, kimyasal koruyucu içermeyen ve tüketici taleplerini karşılamak için kabul edilebilir kalitede gıdaların üretilmesi konusunda önemli bir baskı oluşturmaktadır (Endersen ve Coffey, 2020).

Gıda kaynaklı patojenler ile kontamine olan yiyecek veya içecekler, genellikle gıda kaynaklı enfeksiyon ve gıda kaynaklı zehirlenme olarak sınıflandırılan gıda kaynaklı hastalıklara neden olmaktadır (Anvar vd., 2021). Çevrede bulunan bakteri, virüs, parazit ve küfler, gıda maddelerine kolaylıkla bulaşmakta ve tüketicilerde hastalıklara neden olmaktadır (Saravanan vd., 2021). Son otuz yılda, kontamine taze ürünlerden kaynaklanan gıda kaynaklı hastalıkların ortaya çıkışında, marul ve lahana gibi düşük yapraklı sebzeler, sarımsak ve soğan gibi kök ürünleri, domates, biber, karpuz ve kavun gibi toprakta yetişen sebze ve meyveler sorumlu olmaktadır (Banach ve Van Der Fels-Klerx, 2020). Taze ürünlerin yanı sıra, balık ve deniz ürünleri, ciğer ezmesi, tavuk ürünleri, et ve et ürünleri, dondurma, çiğ süt, pirinç yemekleri, makarna, fıstık, un, soğuk sandviçler ve meyve suları da gıda kaynaklı salgınlara neden olmaktadır (Bintsis, 2017).

Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) gibi, gıda güvenliğinden sorumlu kuruluşlar tarafından gıda kaynaklı salgınlardan başlıca *Escherichia coli*, *Salmonella sp.*, *Listeria sp.*, *Cyclospora sp.*, *Clostridium sp.*, *Campylobacter sp.*, *Vibrio sp.*, *Shigella sp.*, *Pseudomonas sp.*, ve *Acinetobacter sp.* 'in sorumlu olduğunu bildirilmiştir (Saravanan vd., 2021). Günümüzde bu patojenlerin

inhibasyonunun sağlanması için ısıtım işlem, yüksek basınç, kimyasal koruyucular, antibiyotikler, ultraviyole (UV) ışınlar gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Fakat bu yöntemlerin bazı dezavantajları mevcuttur (Duc vd., 2018; Ramos-Vivas vd., 2021). Örneğin ısıtım işlem, yüksek basınç ve ışın uygulamaları gıdaların tadını ve besin değerlerini azaltabilmektedir. Ayrıca bazı patojenler, yüksek sıcaklık, tuz ve şeker konsantrasyonlarına dayanıklı olabilmektedir. Kimyasal koruyucuların kullanımı ise, bazı insanlarda alerjik reaksiyonlara neden olmakta ve insan sağlığına zarar vermektedir. Tüm bunların yanı sıra bu uygulamalar donanımlı ekipmanlar gerektirdiği için yüksek maliyetli uygulamalardır (Amit vd., 2017; Naveena ve Nagaraju, 2020).

Gıda patojenlerinin neden olduğu enfeksiyonların önüne geçmek için kullanılan diğer bir yöntem ise antibiyotiklerdir. Ülkemizde antibiyotiklerin kullanımına, hayvan sağlığını korumak ve tedavi etmek amacıyla izin verilmektedir. Fakat büyümeyi teşvik edici olarak antibiyotik kullanımı yasaktır. Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliğine göre, antibiyotik kalıntılarının, gıdalarda belirlenen limitlerin üzerinde bulunmaması gerekmektedir (Kodeks, 2016). Antibiyotiklerin kullanımı dirençli bakterilerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Önemli bir halk sağlığı sorunu haline gelen bu durum gıda üreticileri üzerinde bir baskı oluşturmakta ve yüksek maliyetli tedavi ile düşük iyileşme oranlarına yol açmaktadır (Liao vd., 2020; Pérez-Rodríguez ve Mercanoglu Taban, 2019).

Su ürünleri yetiştiriciliğinde önemli bir balık patojeni olan *L. garvieae*, ekonomik kayıplara neden olmakta ve insanlar için önemli bir gıda kaynağı olan deniz ürünlerine zarar vermektedir. Bu bakterinin neden olduğu enfeksiyonlarının tedavisinde de eritromisin, oksitetrasiklin, amoksisilin ve doksisilin gibi antibiyotikler kullanılmaktadır. Fakat, *L. garvieae*'nin de, inhibisyonunda antibiyotik kullanımına bağlı olarak, antibiyotiklere karşı direnç gösterdiği tespit edilmiştir (Baños vd., 2019; Vendrell vd., 2006).

2.1 *Lactococcus garvieae*

Lactococcus garvieae, doğal olarak pek çok farklı habitat ve materyalde bulunabilen Gram pozitif bir bakteridir. Bu bakteri çiğ inek sütü, keçi peyniri, balık, sığır eti, kümes hayvanları, tatlı su, deniz suyu, toprak ve bitki yüzeyleri gibi çeşitli ortamlardan izole edilmektedir (Malek vd., 2019). İlk olarak sığır mastitisine neden

olan bir ajan olarak izole edilen *L. garvieae* (Garvie vd., 1981), daha önce *Streptococcus garvieae* olarak tanımlanmış ve daha sonra *Lactococcus* cinsi içinde yer almıştır (Collins vd., 1983; Schleifer vd., 1985).

L. garvieae genellikle kanlı agarda α -hemoliz aktivitesi gösteren, fakültatif anaerobik ve hareketsiz bir koktur. Man, Rogosa ve Sharpe (MRS) Agar, Tryptic Soy Agar (TSA) veya Brain Heart Infusion (BHI) Agar gibi çeşitli genel besiyerlerinde iyi gelişmektedir. Optimum gelişme sıcaklığı 37°C olmasına rağmen 10°C ile 42°C arasında da gelişebilen ve hatta bazı suşlarının da 45°C'de zayıf ve yavaş gelişebildiği gözlemlenmiştir (Gibello vd., 2016). Ayrıca, %0-6,5 sodyum klorür (NaCl) içeren ortamlarda pH 4,5-9,6 aralığında gelişme özelliği gösterdiği saptanmıştır (Kurtoglu ve Korun, 2018). Enterokok üyelerinin çoğunda gözlemlendiği gibi, şekerleri fermente etme, çeşitli şekerlerden asit üretme yeteneğine sahip olan bu bakteri kazein veya jelatini kullanamamaktadır. Voges-Proskauer reaksiyonu pozitif, katalaz ve oksidaz negatif olan bakteri, indol veya H₂S üretememektedir (Vanamala vd., 2022). *L. garvieae*'nin bu özellikleri, farklı habitatlarda hayatta kalabilmesini ve çeşitli uygulamalarda kullanılabilmesini sağlamaktadır. Bu kapsamda, *L. garvieae*, ester grupları ile çok çeşitli substratların hidrolizini katalize eden ve gıda işleme, tarım, deterjanlar ve optik olarak aktif ilaçların sentezi için biyoteknoloji alanında faydalı olan esterazları üretirken (Do vd., 2023), su ürünleri için patojenik etki göstermekte ve bu nedenle su ürünleri endüstrisinde sorunlara neden olmaktadır (Vendrell vd., 2006).

L. garvieae hem tatlı su hem de deniz ortamlarında kültüre alınmış balıklarda hiperakut hemorajik sepsisemik enfeksiyonlara ve kitlesel ölümlere neden olan Lactococcosis'in ana sebebidir (Rao vd., 2022; Shahi ve Mallik, 2020b). Lactococcosis, önemli bir balık hastalığıdır. İlk kez 1950'lerin sonunda gökkuşağı alabalığında ilk vakaların teşhis edildiği Japonya'da tanımlanmıştır. Şu anda, hastalık dünyanın birçok yerinde mevcut olup, su ürünleri yetiştiriciliğinde deniz balıklarını ve tatlı su balıklarını etkilemektedir (Radosavljević vd., 2020). Bu yüzden, *L. garvieae* su ürünleri yetiştiriciliğinde önemli bir patojendir. Özellikle 15°C'nin üzerindeki su sıcaklıklarında, alabalık balıklarında yaygın olmasının yanı sıra dev tatlı su karidesi (*Macrobrachium rosenbergii*), kırmızı dudaklı kefal (*Chelon haematocheilus*) ve tilapia (*Oreochromis niloticus*) gibi farklı balık türlerini enfekte ettiği rapor edilmiştir (Ortega vd., 2020; Rao vd., 2022). Küresel

su ürünleri yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara neden olan bu bakteri, farklı ülkelerde çiğ deniz ürünlerinin tüketilmesiyle de insan enfeksiyonlarına neden olmaktadır (Littman vd., 2022; Malek vd., 2019). Artan sayıda insan klinik enfeksiyonu nedeniyle, *L. garvieae*'de bir insan patojeni olarak kabul görmektedir. Bildirilen vakaların çoğu, yaşlı ve bağışıklığı baskılanmış hastalarda enfektif endokardit ile birlikte bakteriyemi ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca esas olarak idrar yolu enfeksiyonuna neden olduğu gözlemlenmiştir (Colagrossi vd., 2022).

Yukarda da bahsedildiği gibi *L. garvieae*'nin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde çeşitli antibiyotikler kullanılmaktadır. Fakat *L. garvieae* kullanılan bu mevcut antibiyotiklere karşı direnç göstermektedir. Günümüzde kullanılan mevcut yöntemlerin eksikliklerinden ve bazı dezavantajlarından dolayı mikroorganizmaların sebep olduğu, insan sağlığını tehdit eden sorunları ortadan kaldırılmak ve daha güvenli gıda üretmek için düşük maliyetli, gıdanın yapısına, çevre ve insan sağlığına zarar vermeyen antimikrobiyal ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır (Chagini vd., 2020). Bakteriyofajlar, gıda sektöründe patojenlerin ortadan kaldırılması için umut verici antimikrobiyal ajanlar olarak görülmektedir.

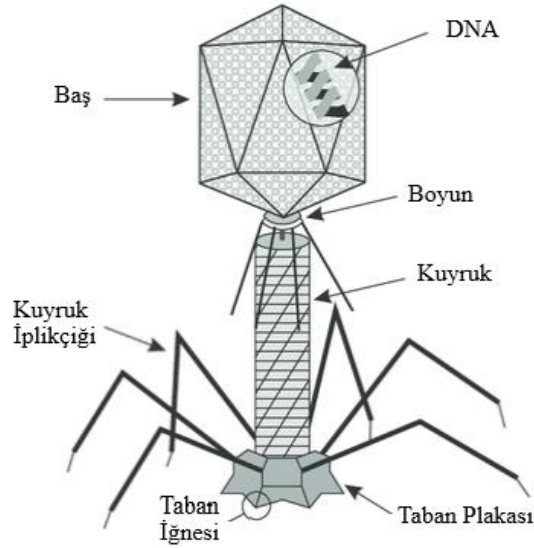
2.2 Bakteriyofajlar

Bakterilere özgü virüsler (bakteriyofajlar, fajlar veya bakteriyel virüsler), 1915 yılında İngiliz bakteriyolog Frederick William Twort (Twort, 1915) ve 1917 yılında Fransız-Kanadalı bilim adamı Felix d'Herelle tarafından bağımsız olarak keşfedilmiştir. Twort, bakterileri enfekte eden ajanların varlığını göstermiş, ancak bu ajanların virüs olup olmadığını anlayamamıştır. d'Hérelle ise ishal hastalığına sebep olan Shigella bakterileri üzerine çalışırken agar kültürlerinde küçük, berrak alanlar gözlemlemiş; bunlara önce 'taches', sonra 'taches vierges' ve daha sonra da 'plaques' adını vermiştir. Sonrasında bu ajanların bakterileri enfekte ederek çoğaldığını ve öldürdüğünü gözlemlemiştir. d'Hérelle, bu ajanlara "bakteriyofaj" adını vermiş ve virüslerin bakterileri nasıl enfekte ettiğini ve öldürdüğünü ilk kez tanımlayan kişi olarak kabul edilmiştir (Chanishvili, 2012; Summers, 2012).

Virüsler, bilinen tüm hücre türleri üzerinde zorunlu hücre içi parazitler olan her yerde bulunan mikroorganizmalardır. Boyutları ~ 20 ila 400 nm arasında değişen, Dünya üzerindeki en küçük yaşam formlarıdır (Nair vd., 2022). Bakteriyofajlar, bakterileri enfekte eden virüslerdir (Kakasis & Panitsa, 2019; Ye

vd., 2019). Tatlı su (Shahin vd., 2021), deniz suyu (Liu vd., 2019), toprak (J. Park vd., 2022) ve atık su (Tawakol vd., 2019) gibi çeşitli çevresel kaynaklardan izole edilebilen fajlar, bakteri konaklarını içeren nerdeyse her ortamda bulunmaktadır ve gezegende en bol bulunan organizmalar oldukları varsayılmaktadır (Evrans vd., 2022; Nikolich ve Filippov, 2020).

Bakteriyofajlar, boyut, morfoloji ve genomik organizasyon açısından son derece çeşitlidirler. Bununla birlikte, genel yapı olarak, çoğu çift sarmallı DNA (dsDNA) genomlarına sahipken, küçük bir kısmı tek sarmallı DNA (ssDNA), çift sarmallı RNA (dsRNA) veya tek sarmallı RNA (ssRNA) genomlarına sahiptir. Genetik materyalin çevresinde de onu kaplayan protein zar ve kuyruk bulunmaktadır. Bu kuyruk fajın bakteriye tutunup genetik materyalini aktarmasına yardımcı olmaktadır (Hatfull ve Hendrix, 2008; Ye vd., 2019). Şekil 2.1’de, *Escherichia coli* etkili T4 fajının genel yapısı verilmiştir (Tokarz-Deptuła vd., 2011).



Şekil 2.1. T4 bakteriyofajının yapısı.

Virüslerin taksonomik sınıflandırması ve virüs taksonlarının adlandırılması, Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi (ICTV) ve fajlara odaklanan ICTV içindeki Bakteriyel ve Arkeal Alt Komite (BAVS) tarafından sürdürülmektedir (Simmonds vd., 2017). Sistem, virüs genomunun moleküler bileşimi (ss/ds, DNA, ya da RNA), virüs kapsidinin yapısı ve zarflı olup olmadığı, konakçı aralığı,

patojenite ve sekans benzerliği dahil olmak üzere çeşitli faj özelliklerinin değerlendirilmesine dayanmaktadır (Chibani vd., 2019).

BAVS tarafından, 2022 yılında bakteriyel virüslerin taksonomisinde önemli değişiklikler gerçekleştirilmiştir. Bu değişikliklerle beraber *Podoviridae*, *Siphoviridae* ve *Myoviridae* aileleri ile *Caudovirales* takımı taksonomiden kaldırılmış ve türler için binom bir isimlendirme sistemi oluşturulmuştur. Çekirdek gen kümelerine ve filogenetik analizlere dayalı olarak dört takıma atanan, 14 aile içeren virüsler *Caudoviricetes* sınıfı içerisinde yer almaktadır. Bu dört takımdan üçü, arkeleri enfekte eden virüsleri kapsarken *Crassvirales* takımı bakterileri enfekte eden virüsleri kapsamaktadır. Aile veya takım sıralamasında henüz sınıflandırılmamış olan 37 alt aile ve 631 cinse ek olarak, 33 familya daha kurulmuş ancak henüz bir takıma atanmamıştır (Chrisman vd., 2022).

Crassvirales takımı, genom boyutları 83 ila 106 kbp arasında değişen dsDNA kuyruklu bakteriyofajları içermektedir. Bu takımının üyeleri özellikle memeli bağırsak mikrobiyomlarında yaygındır ve Bacteroidota filumunun (memeli bağırsağında *Bacteroidales* takımı) bakterilerinden izole edilmiş veya bu bakterileri enfekte ettiği tahmin edilmektedir. *Crassvirales* takımının mevcut genom tabanlı taksonomisi 4 aile, 11 alt aile, 42 cins ve 73 tür içerir (Smith vd., 2023).

Bu sınıflandırma sisteminin yanı sıra, fajlar yaşam döngülerine göre iki gruba ayrılmaktadır:

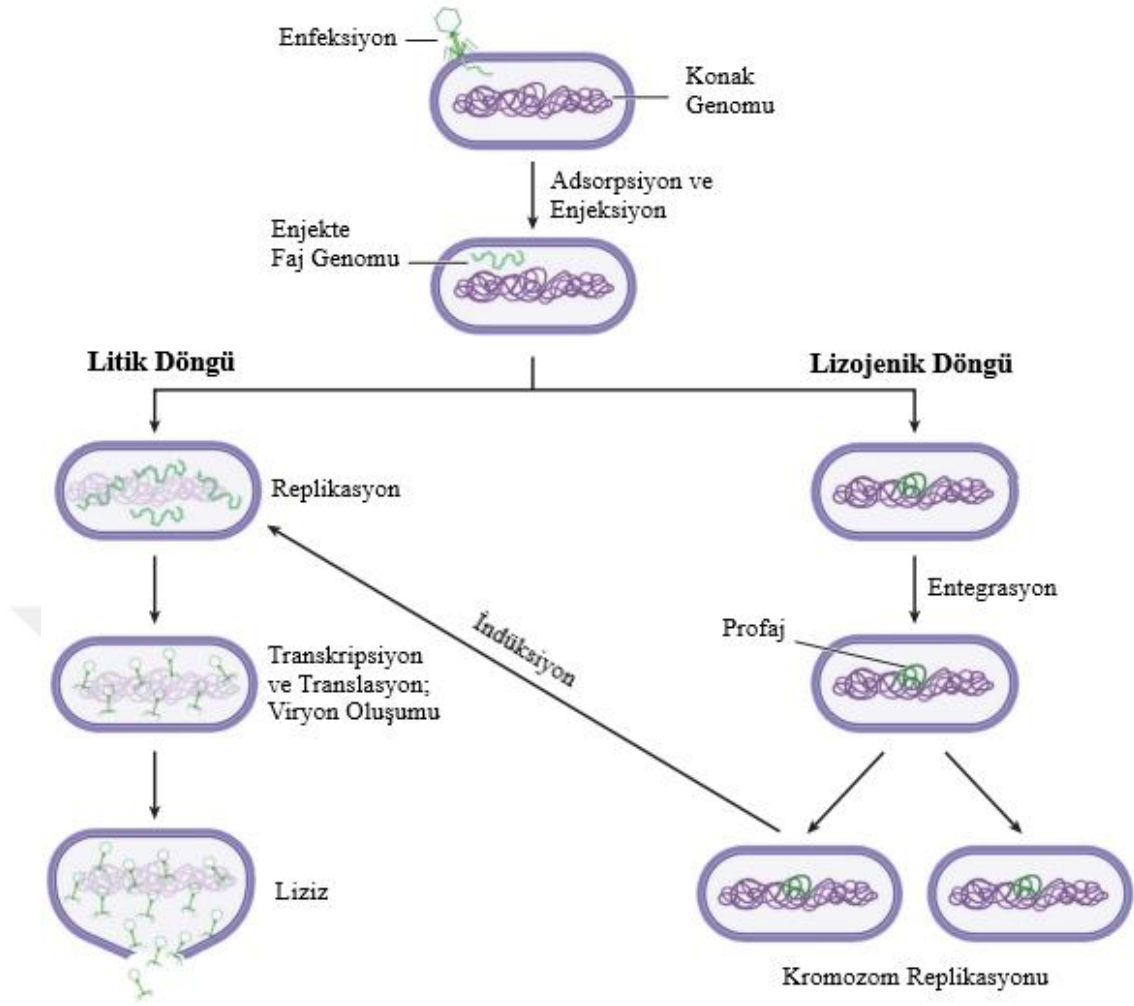
2.2.1 Litik Fajlar

Litik yaşam döngüsü boyunca çoğalan bakteriyofajlara litik bakteriyofajlar denir. Enfeksiyonda ilk aşama, fajların lipopolisakarit (LPS), dış zar proteinleri, flagella veya fimbria gibi konakçı hücre yüzey reseptörüne adsorpsiyonudur. Bu geri dönüşümlü adsorpsiyon işlemi, fajların kuyruk lifleri veya kuyruk sivri uçları tarafından kolaylaştırılır. Bu liflerden bazıları enzimatik aktiviteye sahiptir ve bakteri hücre duvarındaki polisakkaritleri depolimerize edebilir. (Kaiser, 2019). Faj nükleik asidinin enjeksiyonu, kuyruk tüpünün konakçı hücre periplazmasına girmesiyle başlar. Penetrasyon sırasında virüs, çeşitli lizinler ve karbonhidrat depolimerazları kullanır. Faj DNA iletimi için bir transmembran kanalı, kuyruk lifi konak sitoplazmik membran ile birleştikten sonra oluşur. Faj DNA daha sonra bu kanal yoluyla konakçı sitoplazmaya enjekte edilir (Giri, 2021). Bakteriyofaj

genomu tarafından kodlanan enzimler, bakterinin makromoleküler (protein, RNA, DNA) sentezini durdurur. Bakteriyofaj, genomunu kopyalar ve bakteriyofaj enzimlerini ve bakteriyofaj yapısal bileşenlerini sentezlemek için bakterinin metabolik mekanizmasını kullanır (Kaiser, 2019). Yeni faj DNA'sının oluşumu, orta genlerin transkripsiyonu ile gerçekleşir ve geç genlerin kodlanması ile faja özgül şekil oluşumunu (morphogenesis) takip eder. Bu aşamada faj partikülünün kapsid, kuyruk, kuyruk fibrilleri gibi parçalarının üretimi gerçekleşmektedir. Prokapsid protein kılıf içerisinde, faj DNA'sı paketlenmekte ve faj parçaları genomların etrafında birleştirilmektedir (Acar Soykut, 2007). Son aşamada ise, genellikle bakteriyofaj kodlu bir lizozim bakteriyel peptidoglikanı parçalayarak ozmotik lizise neden olur ve bakteriyofajların salınmasını sağlamaktadır (Kaiser, 2019).

2.2.2 Lizojenik Fajlar

Lizojenik bir yaşam döngüsü yapabilen bakteriyofajlara temperent bakteriyofajlar denir. Temperent bir bakteriyofaj bir bakteriyi enfekte ettiğinde, ya litik yaşam döngüsü yoluyla çoğalabilir ve konakçı bakterinin parçalanmasına neden olabilir ya da DNA'sını bakterinin DNA'sına dahil edebilir ve bulaşıcı olmayan bir profaj haline gelebilir (Kaiser, 2019). İkinci durumda, döngü bakteriyofajın konakçı bakteriye adsorbe olması ve litik yaşam döngüsünde olduğu gibi genomunu enjekte etmesiyle başlar. Ancak bakteriyofaj litik döngüdeki gibi konakçı hücreyi susturmaz. Bunun yerine, bakteriyofaj DNA'sı konakçı bakterinin DNA'sına girer ve entegre olur. Bu aşamada virüse profaj denir (Giri, 2021; Hyman ve Abedon, 2010). Bakteriyofaj replikasyonunu kontrol eden bakteriyofaj genlerinin ekspresyonu, bir represör protein tarafından bloke edilir ve faj DNA'sı, bakterinin DNA'sının bir parçası olarak replike olur, böylece her yeni bakteri artık profajı içerir. Bakteriyi enfekte eden virüslerin sayısı ve bakterinin fizyolojik durumu, temperent bakteriyofajın litik döngüye girip girmediğini veya bir profaj haline gelip gelmediğini belirlemektedir. Bir profaj içeren her milyonda bir ila her milyarda bir bakteride, spontan indüksiyon meydana gelir. Bakteriyofaj genleri aktive edilir ve litik yaşam döngüsü tarafından yeni bakteriyofajlar üretilmektedir (Aydoğan ve Hadımlı, 2016; Kaiser, 2019). Şekil 2.2'de fajların litik ve lizojenik yaşam döngüleri genel haliyle verilmiştir (Brady vd., 2021).



Şekil 2.2. Fajların litik ve lizojenik yaşam döngüleri.

Son yıllarda, antibiyotik direncinin artmasıyla, bakteriyofajların kullanımı gıda muhafazası ve güvenliği için umut verici bir araç olarak görülmektedir. Doğada yaygın olarak bulunabilmeleri ve insan ve hayvanlara zararsız olmalarına ek olarak, hedef bakterilerini enfekte etme ve öldürme konusundaki doğal özgüllükleri, bakteriyofajları çiftlikten sofraya gıda üretim sürecinin her aşamasında önemli adaylar yapmaktadır (Endersen ve Coffey, 2020). 2006 yılında ListexTMP100 faj preparatı FDA tarafından GRAS statüsüne alınmış ve böylece fajların kullanımı birçok ülkede yaygınlaşmıştır. Günümüzde kullanılan GRAS dereceli bazı bakteriyofaj preparatları Tablo 2.1'de gösterilmiştir (Wang ve Zhao, 2022).

Tablo 2.1. Bazı FDA onaylı GRAS dereceli faj preparatları.

Onay Yılı	Firma Adı	Faj Preparatı	Konak Bakteri
-----------	-----------	---------------	---------------

2006	EBI Food Safety	Listex™ P100	<i>Listeria</i>
2013	Intralytix Inc.	SalmoFresh™	<i>Salmonella</i>
2013	Micreos B.V.	Salmonalex™	<i>Salmonella</i>
2014	Intralytix Inc.	ListShield™	<i>Listeria</i>
2017	Intralytix Inc.	ShigaShield™	<i>Shigella</i>

Buna ilave olarak çok sayıda çalışma, gıdadaki patojenik bakterileri kontrol etmek için bakteriyofaj kullanımının uygulanabilir ve verimli olduğunu göstermiştir (Tablo 2.2).

Tablo 2.2. Bazı gıda kaynaklı patojenlere etkili bakteriyofaj çalışmaları.

Gıda Kaynaklı Patojen	Bakteriyofaj	Kaynak
<i>Salmonella</i>	vB_SalP_LDW16	(Cao vd., 2022)
	vB_SalP_TR2	(Shang vd., 2021)
	vB_SalS-LPSTLL	(Guo vd., 2021)
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	PS5	(Duc vd., 2020)
	T1, T4, T5 ve rV5	(Niu vd., 2021)
	EP75 ve EP335	(Witte vd., 2022)
<i>Listeria monocytogenes</i>	LMPC01, LMPC02 ve LMPC03	(Byun vd., 2022)
	vB_LmoH_P61	(Stone vd., 2020)
	P100	(Zhou and Ramasamy, 2019)
<i>Lactococcus garvieae</i>	WWP-1	(Ghasemi, Bouzari, and Emtiazi, 2014a)
	WP-2	(Ghasemi vd., 2014b)
	WP-1, WWP-2 ve SP-2	(Ghasemi vd., 2014c)
	PLgT-1	(Hoai ve Yoshida, 2016)

<i>Pseudomonas fluorescens</i>	UFJF_PfDIW6 ve UFJF_PfSW6	(Nascimento vd., 2022)
--------------------------------	------------------------------	------------------------

Cao vd. (2022) yaptıkları çalışmada, hayvancılıkta alternatif veya tamamlayıcı bir antibiyotik tedavisi olarak kullanılabilecek, tavuk salmonellozunu önlemek ve tedavi etmek için potansiyel olarak kullanılabilen, geniş bir konakçı aralığına sahip litik bir faj izole etmişlerdir. Fajı izolasyonunu bir tavuk çiftliğinden alınan lağım suyu ve tavuk dışkılarından gerçekleştirilmiştir. İzole edilen vB_SalP_LDW16 kodlu fajın, 25 *Salmonella* suşundan 22'sini lize ettiği ve salmonelloz tedavisinde potansiyel bir antimikrobiyal olabileceğini gözlemlemişlerdir (Cao vd., 2022). Byun vd. (2022), sırasıyla kanalizasyon, nehir ve topraktan izole ettikleri 3 litik fajdan bir karışım hazırlayarak kereviz ve enoki mantarında *Listeria monocytogenes*'e karşı biyokontrol ajanı olarak etkinliğini değerlendirmişlerdir. LMPC01, LMPC02 ve LMPC03 olarak adlandırılan bu üç fajın (MOI:10), 7 gün boyunca 4°C'de saklanan *L. monocytogenes* kontamine (5,0 log CFU/g) kereviz ve enoki mantarını 2,2 ve 1,8 log CFU/g azalttığı gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar ışığında, Cao vd., faj kokteylinin, taze kesilmiş kereviz ve enoki mantarında *L. monocytogenes*'i azaltmak ve inhibe etmek için potansiyel olarak umut verici bir biyokontrol adayı olduğunu vurgulamışlardır (Byun vd., 2022). Diğer bir çalışmada ise çiğ sütlerde sorun yaratan psikrotrof bir bakteri olan *Pseudomonas fluorescens*'a etkili fajlar izole edilmiştir. Çalışmada izolasyon kaynağı olarak süt endüstrisi atık suyu, evsel atık su, dere, nehir ve göl suyu kullanılmıştır. Hazırlanan faj karışımının, 4°C'de saklanan çiğ sütte *P. fluorescens*'ı 3 log CFU/mL azalttığı gözlemlenmiştir. Çalışma sonucunda, izole edilen fajların *P. fluorescens*'ın gelişmesini engelleyerek, soğutulmuş depolama sırasında çiğ sütün proteolitik bozulmasını geciktirme konusunda büyük bir potansiyele sahip olduğunu belirtmişlerdir (Nascimento vd., 2022).

2.2.3 *Lactococcus garvieae* Bakteriyofajları

Literatürde bugüne kadar *Lactococcus garvieae* fajları ile yapılan çalışma sayısının 13 adet olduğu görülmektedir. Bu çalışmalar özet olarak aşağıda verilmiştir.

Park vd. (1997) çalışmalarında, hastalıklı sarıkuyruk balığından izole ettikleri PLgY fajınının *L. garvieae* suşları ve diğer balık patojenleri üzerine

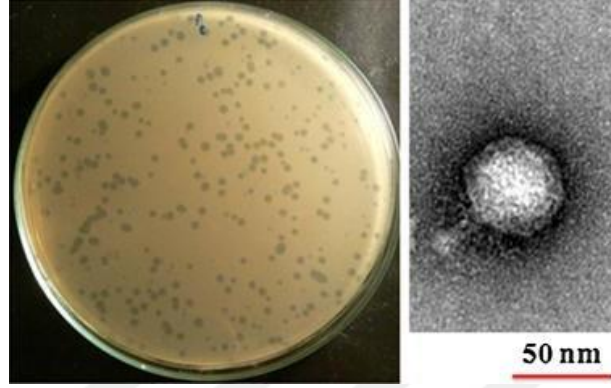
etkilerini incelemişlerdir. İncelenen 26 *L. garvieae* suşundan 24'nün faja duyarlı olduğunu, ancak 2 *L. garvieae* suşu ve diğer balık patojeni olan 22 bakteri suşunun faja duyarlı olmadığını gözlemlemişlerdir.

Yine Park vd. (1998), *L. garvieae*'ya etkili 6 bakteriyofajı deniz suyu ve çiftlik suyu örneklerinden izole etmiştir. Bu fajların morfolojik özellikleri elektron mikroskobu ile analiz edilmiştir. Ayrıca fajların 111 *L. garvieae* suşuna etkileri kontrol edilmiştir. Sonuçlara göre 83 suşun PLgY16'ya; 89 suşun PLgY30'a; 79 suşun PLgY886'ya; 101 suşun PLgW1'e, 2 suşun PLgW2'ye; 96 suşun PLgW3'e ve 97 suşun PLgW4'e duyarlı olduğu gözlemlenmiştir.

Nakai vd. (1999) çalışmalarında, sarıkuyruk balığından izole ettikleri PLgY-16 fajının enfekte sarıkuyruk balıkları üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Bunun için ortalama 50 g olan 20 sarıkuyruk balığına, 10^7 CFU/mL dozunda *L. garvieae* suşu enjekte etmişler ve enjeksiyondan 1 saat sonra 10^7 PFU/mL PLgY-16 fajını enfekte etmişlerdir. Kontrol olarak, faj süspansiyonu yerine TSB besiyeri kullanmışlardır. Faj enjekte edilmiş sarıkuyruğun 24 saat sonunda hayatta kalma oranının (%90), faj enjeksiyonu yapılmamış kontrol balıklarından (%45) çok daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Nakai vd., 1999).

Ghasemi vd. (2014a), *L. garvieae*'ya etkili faj WWP-1 atık sudan izole etmişler ve ardından, biyokimyasal ve moleküler tanımlamalarını gerçekleştirmişlerdir. Transmisyon elektron mikroskobu, izole edilmiş fajın, *Podoviridae* familyasının üyelerine benzeyen bir ikosahedral baş ve kasılmayan kısa bir kuyruğa sahip olduğunu ortaya koymuştur. Dahası, WWP-1 fajının 15 ila 30°C arasındaki sıcaklıklarda optimal antibakteriyel aktiviteyi temsil ettiğini ve gökkuşağı alabalığı yetiştirme sıcaklığında çok etkili olabileceğini savunmuşlardır. Restriksiyon profili analizi sonucunda ise, *NdeI*'nin WWP-1 genomunu kesebildiği fakat *EcoRI*, *EcoRV* ve *BamHI*'in ise kesemediğini gözlemlenmiştir. Son olarak WWP-1'in *L. garvieae* ile doğal olarak enfekte olmuş gökkuşağı alabalığı üzerindeki terapötik etkisinin belirlenebilmesi için faj preparatı (10^8 PFU/g) balık yemlerine emdirilmiştir. Çalışma sonunda fajla muamele edilmiş balıkların ölüm oranının, fajsız yemle beslenen kontrol balıklarının ölüm oranından önemli ölçüde daha düşük olduğu saptamıştır. Kontrol grubundaki balıkların tamamı 8 gün sonra ölümler; faj emdirilmiş yem alan balıkların, faj tedavisinden 2 hafta sonra, %30'dan

fazlasının hayatta kaldığı gözlemlenmiştir. Ayrıca ölü balıklardan farklı olarak hayatta kalanların iç organlarında *L. garvieae* tespit edilmemiştir. Bu sonuçlar ışığında Ghasemi vd. (2014a), gökkuşağı alabalığı yetiştiriciliğinde *L. garvieae* suşlarının neden olduğu hastalığı kontrol etmek için fajların kullanımının umut verici olduğunu savunmuşlardır.



Şekil 2.3. WWP-1'in plakları ve elektron mikrografı.

Başka bir çalışmada, farklı ortamlardan WP-1, WWP-2 ve SP-2 olarak adlandırılan üç *L. garvieae* fajı izole edilerek morfolojik özellikleri, restriksiyon profilleri ve yapısal protein profilleri incelenmiştir. Ayrıca, geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile morfolojik sınıflandırmaları da yapılmıştır. Farklı fajların nükleik asitlerinin restriksiyon analizinde ise, *Hind*III ve *Ase*I enzimlerinin benzer DNA fragman modelleri ürettiği gözlemlenmiştir. Bu çalışmada, SDS-PAGE analizi sonuçları, izole edilmiş fajların benzer yapısal proteinlere sahip olduğunu göstermiş, ancak kısmi dizi analizi yapılan fajların, önceden tanımlanmış diğer fajlarla önemli bir benzerlik göstermediği rapor edilmiştir (Ghasemi vd., 2014b).

Ghasemi vd. (2014c) ise çalışmalarında, *L. garvieae*'ya etkili bir fajın (faj WP-2) tam dizi analizini gerçekleştirmişlerdir. Biyoinformatik analiz, faj WP-2'nin, 18.899 bp'lik küçük bir dsDNA'ya sahip olması nedeniyle Pikovirinae alt familyasında Ahjdlikevirüsün yeni bir üyesi olarak sınıflandırılabilceğini ortaya koymuştur. Faj nükleotit dizisi ve tahmin edilen protein ürünlerinin, diğer fajların tam genomu ve proteomu ile çok sınırlı homoloji gösterdiği tespit edilmiştir.

Buna benzer bir çalışma da Eraclio vd. (2015) tarafından gerçekleştirilmiştir. Siphoviridae familyasına ait olan ve *L. garvieae* suşlarını enfekte edebilen faj GE1 topraktan izole edilmiştir. İzole edilen fajın morfolojisi

elektron mikroskobu ile analiz edilmiştir. Fajın gelişme eğrisi çıkarılarak patlama boyutu ve latent dönemi belirlenmiştir. Ayrıca, konak aralığı, test edilen fajın 73 *L. garvieae* suşundan 71'ine etkili olduğu ve fajın, 24.847 bp'lık bir dsDNA genomuna sahip olduğu tespit edilmiştir.

Hoai vd. (2016a), Japonya'daki birkaç deniz balığı türünden izole edilen PLgT-1 profajı karakterize edilmiş ve TEM görüntü analizlerinde ise PLgT-1'in morfolojisinin Siphoviridae virüs ailesi ile tutarlı olduğunu ortaya çıkarmışlardır. Hoai vd. (2016b) ise daha önceki çalışmada izole ettikleri faj PLgT-1'in tam genom analizini gerçekleştirmişler ve ayrıca bu fajın yalnızca bir indüksiyon maddesi (Mitomisin C) tarafından indüklenmediğini, aynı zamanda besin açısından zengin bir ortamda veya doğal deniz suyunda hücre bölünmesi sırasında sıklıkla salınabileceğini göstermişlerdir.

Eraclio vd., 2017 tarafından yapılan diğer bir çalışmada, *L. garvieae*'nin bir süt izolatından indüklenmiş bir profajının (PLg-TB25) morfolojik karakterizasyonu ve genom analizi gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonuçları bu fajın, Siphoviridae familyasına ait olduğunu göstermiş ve morfolojisinin diğer laktokok fajlarıyla benzerlik gösterdiği belirtilmiştir.

Hoai (2016) tarafından yapılan başka bir çalışmada, *L. garvieae*'nin neden olduğu enfeksiyonları tedavi etmek için potansiyeli olan üç lizogenik fajın (PLgW-1, PLgY-16 ve PLgY-30) etkinliği ve etkisi araştırılmıştır. Fajların morfolojisi, konakçı aralığı ve etkinliği incelenmiştir. Elektron mikroskopisi ile yapılan morfolojik analiz, bu 3 fajın tümünün Siphoviridae familyasına ait olduğunu ve morfolojide hafif farklılıklar olduğunu ortaya koymuştur. Bu fajların genellikle *L. garvieae*'yi etkili bir şekilde lize ettiği gözlemlenmiştir. Çalışma sonucunda, deniz balıklarında hastalığa neden olan farklı *L. garvieae* genotiplerini kontrol etmek için bu fajların kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Hoai vd. (2019), bir önceki çalışmalarında karakterize ettikleri PLgW-1, PLgY-16 ve PLgY-30 fajlarının tam genom dizisini çıkarmışlardır. Çalışma sonucunda *L. garvieae*'ya etkili lizogenik faj genomlarının yüksek bir homoloji gösterdiğini ve neredeyse tüm proteinlerin korunduğunu ortaya koymuşlardır. Genom düzeyinde, ne PLgY-30 ne de PLgY-16 için benzerlik tespit edilirken,

PLgW-1'in yalnızca NCBI veritabanındaki diğer dizilerle çok sınırlı bir homoloji (%1) paylaştığı belirtmişlerdir.

Son olarak, Akmal vd. (2022) çalışmalarında, Japonya'nın Miyazaki Eyaletinden toplanan deniz suyu örneklerinden *L. garvieae* serotip II suşlarına özgü yeni bir litik sifofaj olan PLG-II'yi izole etmişlerdir. Tam dizi analizi gerçekleştirilen PLG-II genomunun, ortalama %37,74 GC içeriğine sahip olduğunu ve 32.271 bp uzunluğunda dsDNA molekülüne sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, karşılaştırmalı genomik analiz sonuçlarına dayanarak, faj PLG-II'nin Uwajimavirus cinsinde yeni bir türü temsil edebileceğini öne sürmüşlerdir.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Bakteri Suşları ve Faj İzolasyonunda Kullanılan Örnekler

Bu tez kapsamında, fajların izolasyonu için kullanılan bakteri suşları (Tablo 3.1), Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi (BAİBÜ), Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Gıda Mikrobiyolojisi Laboratuvarı Kültür Koleksiyonundan (GMLKK) temin edilmiştir.

Tablo 3.1. Tez aşamasında kullanılan bakteri kültürleri.

Bakteri Kültürleri	Kültürlerin Temin Edildiği Yerler ve Kodları
<i>Lactococcus garvieae</i> 3	BAİBÜ GMLKK
<i>Lactococcus garvieae</i> 4	BAİBÜ GMLKK
<i>Lactococcus garvieae</i> 10	BAİBÜ GMLKK
<i>Lactococcus garvieae</i> 12	BAİBÜ GMLKK
<i>Lactococcus garvieae</i> 15	BAİBÜ GMLKK
<i>Lactococcus garvieae</i> 18	BAİBÜ GMLKK
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 7644
<i>Listeria innocua</i>	ATCC 33090
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> A	NCTC 12924
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> C	BAİBÜ GMLKK
<i>Rhodococcus equi</i>	ATCC 6939
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 10876
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 51559
<i>Pseudomonas putida</i>	DSM 6125
<i>Salmonella</i> Typhimurium	ATCC 13076
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	KUEN 1461
<i>Micrococcus luteus</i>	Ankara Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Gıda Mikrobiyolojisi Kültür Koleksiyonu

Faj izolasyonu için Bolu İli merkezine bağlı köylerde bulunan farklı süt üreticilerinden 24 adet çiğ süt örneği temin edilmiştir. Çiğ süt örneklerine verilen kodlar ve temin edildiği yerler Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.2. Faj izolasyonu için kullanılan çiğ süt örneklerinin kodları ve temin edildiği yerler.

Örnek Kodu	Temin Edildiği Yer
1, 9, 10	Karaköy Mahallesi
2, 17, 18	Ağaçcılar Mahallesi
3, 7, 22	Civril Mahallesi
4, 5, 8	Kürkçüler Mahallesi
6	Merkez Mahallesi
11, 12, 13	Doğancı Mahallesi
14, 15, 16	Sultanbey Mahallesi
19, 20	Sandallar Mahallesi
21, 23, 24	Kasaplar Mahallesi

3.1.2 Besiyerleri ve Kimyasallar

Tez kapsamında çalışılan bakterilerin aktifleştirilmesinde; bu bakterilere özgül fajların izolasyonu ve zenginleştirilmesinde Brain Heart Infusion Broth (BHI; Merck Millipore Corporation, Darmstadt, Almanya); fajların litik aktivitelerinin belirlenmesi, saflaştırılması, titrelerinin ve konak aralığının belirlenmesinde BHI Yumuşak Agar (%0,5 agar) ve BHI Agar (%1,5 agar; Merck Millipore Corporation, Darmstadt, Almanya) kullanılmıştır. Yine, bakteriyofaj titrelerinin yükseltilmesi ve belirlenmesi sırasında kalsiyum klorür (CaCl_2 ; Sigma-Aldrich, Almanya) ve magmezyum klorür (MgCl_2 ; Sigma-Aldrich, Almanya) sıvı ve katı ortamlara eklenmiştir. Ayrıca bakteri ve faj stoklarının muhafazası için gliserol (Merck Millipore Corporation, Darmstadt, Almanya) kullanılmıştır.

İzole edilen faj DNA'larının jel elektroforezinde yürütülmesi için agaroz (Merck Millipore Corporation, Darmstadt, Almanya) ve tris-acetate-EDTA (TAE; Thermo Scientific, 50X TAE Buffer) tampon, etidyum bromür (EtBr; Thermo Scientific, 0,625 mg/mL) ve DNA-yükleme tamponu (6X DNA loading dye; Thermo Scientific) kullanılmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Bakteri Suşlarının Aktifleştirilmesi ve Muhafaza Koşulları

Lactococcus garvieae suşları, -18°C'de %30 (a/h) gliserol karışımı içinde muhafaza edilmiştir. Her suş, Brain Heart Infusion (BHI) broth içinde, 37°C'de 24 saat inkübe edilerek aktifleştirilmiştir.

Faj izolasyonu, saflaştırılması, titrelerinin ve konakçı aralığının belirlenmesi aşamalarında log fazındaki aktif kültürler kullanılmıştır. Bunun için 18-24 saatlik, aktif bakteri kültürü uygun sıvı besiyerine inoküle edilmiş ve gelişme eğrisinin logaritmik fazında (OD₆₀₀: 0,5-0,6; ortalama 3 saatlik inkübasyondan sonra) aktif kültür elde edilmiştir.

3.2.2 *Lactococcus garvieae* Etkili Fajların İzole Edilmesi, Zenginleştirilmesi ve Titrelerinin Belirlenmesi

3.2.2.1 Fajların İzole Edilemesi

Faj izolasyonu için, 100 mL çiğ süt örneğine %10'luk laktik asitten 6 mL eklenerek kazeinin çökmesi için bir süre beklenmiş ve daha sonra kaba filtre kağıdından süzümüştür (Şekil 3.1). Elde edilen süzüntü, 12.500 rpm (dv/dk)'de, 15 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatanta, % 10 kloroform ilave edilerek bakterilerden arındırılmıştır (Acar Soykut, 2007). Süpernatantlarda faj olup olmadığını kontrol etmek için spot testi gerçekleştirilmiştir. Bunun için aktif konak hücre kültürü, 10'ar mM CaCl₂ ve MgCl₂; yumuşak agar (YA; 3 g BHI, 0,5 g agar, 100 mL saf su) ile karıştırılmış ve önceden Petri kutularına dökülmüş olan agar üzerine homojen bir şekilde yayılmıştır. Agar katılaştıktan sonra, üzerinde belirli bölgelere, elde edilen süpernatantlardan 10'ar µL damlatılmış ve 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda plak oluşumunun (liziz) görüldüğü bölgelerde faj varlığı saptanan örnekten 5 mL alındıktan sonra steril bir falkon içerisine alınmış daha sonra içerisine 10'ar mM CaCl₂ ve MgCl₂ ve 1 mL konakçı kültürü eklendikten sonra 15 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. 15 dakika sonunda faj bakteri karışımının üzerine 5 mL, 2X BHI broth (0,06 g/mL) besiyeri eklenmiş ve 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 7500 rpm'de 15 dakika santrifüj sonucu elde edilen süpernatant steril bir falkona aktarılmış ve üzerine %10 kloroform ilave edilip hafifçe vorteksenerek + 4°C'de muhafaza edilmiştir (Byun vd., 2022).



Şekil 3.1. Süt örneklerinin kaba filtre kağıtlarından süzülmesi.

3.2.2.2 Fajların Zenginleştirilmesi

İzolasyonu gerçekleştirilen fajlar titrelerinin yükseltilmesi için daha küçük hacimlerde zenginleştirilmeye devam edilmiştir. Faj ve bakteri adsorpsiyonunun daha iyi sağlanabilmesi için 10'ar mM CaCl_2 ve MgCl_2 , 1,5 mL'lik ependorf tüpüne eklenmiştir. Daha sonra bu tüpe 10 μL log fazındaki *Lactococcus garvieae* ve 100 μL faj örneği eklenmiş, adsorpsiyonun gerçekleşmesi için oda sıcaklığında 10-15 dakika bekletilmiştir. Bu süre sonunda faj bakteri karışımının üzerine 1 mL BHI broth besiyeri eklenmiş ve 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra, hücre artıklarının uzaklaştırılması amacıyla 12500 rpm'de 15 dakika santrifüj sonucu elde edilen süpernatant steril bir ependorfa aktarılmış ve üzerine %10 kloroform ilave edilip hafifçe vortekslenerek + 4°C'de muhafaza edilmiştir (Acar Soykut, 2007; Lee vd., 2017).

3.2.2.3 Faj Titrelerinin Belirlenmesi

Zenginleştirmeler sonucu titreleri yükseltilecek fajların, titrelerinin belirlenmesi için çift plaka agar yöntemi kullanılmıştır. Bunun için logaritmik fazda olan, 100 μL *Lactococcus garvieae* konakçı kültürü, 10'ar mM CaCl_2 ve MgCl_2 , 3 mL yumuşak agar ile karıştırılarak ve önceden hazırlanmış agarlı besiyeri üzerine yayılmıştır. Agar katılaştıktan sonra Petri kutusunda işaretlenmiş noktalara, fizyolojik tuzlu su (FTS) çözeltisi ile 10^{-6} 'ya kadar seyreltilmiş faj dilüsyonlarından 10'ar μL damlatılmış ve 37°C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon

sonunda işaretli noktalardaki faj plakları sayılmış ve faj titresi ilgili bölgedeki oluşan plak sayısına göre hesaplanmıştır (Acar Soykut, 2007; Lee vd., 2017; Shang vd., 2021).

3.2.2.4 Fajların Saflaştırılması

Titreleri 10^8 PFU/mL'ye ulaşan fajlar tek plak izolasyonu ile saflaştırılmıştır. Bunun için çift plaka agar yöntemi kullanılmıştır. Faj örneği fizyolojik tuzlu su (FTS) çözeltisi ile 10^{-6} 'ya kadar seyreltilmiş ve uygun faj dilüsyonları analiz için kullanılmıştır. Logaritmik fazda olan *Lactococcus garvieae* konakçı kültürü, CaCl_2 , MgCl_2 ve 100 μL faj dilüsyonu (10^{-5} - 10^{-6}), 3 mL yumuşak agar ile karıştırılmış ve hafifçe vortekslelendikten sonra, önceden hazırlanmış agarlı besiyeri üzerine yayılmıştır. Bir gece 37°C 'de inkübasyon sonunda birbirinden morfolojik olarak farklı olan plaklar seçilmiş ve her biri steril şırınga iğnesi yardımıyla 1,5 μL 'lik steril mikrosantrifüj tüplerine alınmıştır. Tüplere alınan plakların üzerine 100 μL BHI besiyeri ilave edilmiş ve fajların besiyerine geçmesi için yaklaşık 30 dakika beklenmiştir. Daha sonra, tüplere logaritmik fazdaki konakçı kültürden 10 μL eklenmiş ve adsorpsiyonun sağlanması için oda sıcaklığında 10-15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda BHI besiyeri ile 1 mL'ye tamamlanan karışım 37°C 'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda hücre artıklarının uzaklaştırılması amacıyla 12.500 rpm'de 15 dakika santrifüj işlemi uygulanmış ve elde edilen süpernatant yeni bir steril mikrosantrifüj tüpüne alınmış ve üzerine %10 kloroform ilave edilip hafifçe vortekslenerek $+4^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir. Saflaştırılan fajlar titreleri yükselene kadar zenginleştirmeye devam edilmiştir (Acar Soykut vd., 2019; Evran vd., 2022). Titreleri 10^8 PFU/mL ulaşan fajlar, 0,22 μm porlu filtrelerden geçirilmiş, %30 gliserol eklenerek -18°C 'de muhafaza edilmiştir.

3.2.3 Fajların Konakçı Aralıklarının Belirlenmesi

Fajların konakçı aralığının belirlenmesinde BAİBÜ Gıda Mühendisliği Gıda Mikrobiyolojisi Laboratuvarı Kültür Koleksiyonunda bulunan suşlar kullanılmıştır. Titresi 10^8 PFU/mL'ye ulaşan fajların, spot testi ile konakçı aralıkları belirlenmiştir. Daha önceden BHI agar dökülen petri kapları 6 eşit parçaya bölünmüş ve tüm bölümler faj ve bakteri kodları ile etiketlenmiştir. Daha sonra, 100 μL konakçı bakteri kültürü, 3 mL yumuşak agar ile karıştırılarak önceden hazırlanmış BHI agarların üzerine yayılmıştır. Agarın katılaşması için 15-20 dakika

beklendikten sonra petri kutusunda işaretlenmiş noktalara, 10'ar µL faj örnekleri damlatılmış 30-37°C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda işaretli noktalardaki faj plaklarının oluşup oluşmadığı kontrol edilmiştir.

3.2.4 *Lactococcus garvieae*'ya Etkili Fajların DNA Ekstraksiyonu

DNA izolasyonu için, yüksek titreye sahip faj süspansiyonları 17.500 rpm (dv/dk) de 90 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Elde edilen faj peletlerinden, DNA'larının izolasyonu için Viral DNA/RNA izolasyon kiti (Thermo Scientific, GeneJET Viral DNA and RNA Purification Kit) kullanılmıştır. DNA izolasyonu, Viral DNA/RNA izolasyon kitinin protokolüne göre yapılmıştır. İzole edilen genomik DNA'ların saflıkları 260 ve 280 nm'de verdikleri absorbans değerlerinin birbirine oranlanmasıyla tespit edilmiştir. Ayrıca DNA'lar, agaroz jele yüklenmiş kontaminasyon olup olmadığı belirlenmiş, kesime girecek DNA miktarına karar verilmiştir. Jel, 1X TAE tamponu içinde son konsantrasyonu %0.8 agaroz olacak şekilde hazırlanmıştır. Agaroz çözeltisi mikrodalga fırında kaynatılarak homojen hale getirilmiş, jel tankına dökmeye yakın 1 µL/mL etidyum bromür eklenmiş ve jel katılaşmaya bırakılmıştır. Polimerleşen jel, elektroforezin içerisine yerleştirildikten sonra üzerini geçecek kadar 1X TAE tampon eklenmiştir. Daha sonra kuyucuklara 5 µL faj DNA-yükleme boyası karışımı yüklenmiş ve 60 V/cm'lik bir dielektrik kuvvette da yaklaşık 45 dakika yürütülmüştür (Sumrall vd., 2019). Yürütülen DNA'ların görüntülenmesi için BAİBÜ, Bilimsel Endüstriyel ve Teknolojik Uygulama ve Araştırma Merkezi (BETUM)'nde bulunan jel görüntüleme sistemi (Imaging System, Biorad ChemiDoc™ MP) kullanılmıştır.



Şekil 3.2. 12S4-2 fajına ait DNA molekülü.

3.2.5 Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi ile İzole Edilen Fajların Sınıflandırılması

İzole edilen faj DNA'ları, aralarındaki farklılıkları belirlemek için endonükleaz enzimleri ile kesilmiş, daha sonra büyüklüklerine göre sınıflandırılmıştır. Titreleti 10⁸ PFU/mL'ye ulaşan ve DNA izolasyonu

gerçekleştirilen 14 faj, restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesim için seçilmiştir. Analiz, imalatçı firmanın talimatlarına uyularak *EcoRI* (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD) enzimi ile Tango Buffer (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD) varlığında gerçekleştirilmiştir (Thi vd., 2019). Her bir reaksiyon hacmi 20 µl olacak şekilde ayarlanmıştır (Tablo 3.3). Kısaca, daha önceden belirlenen DNA konsantrasyonlarına göre sırasıyla steril çift distile su, tampon, DNA ve enzim, reaksiyon tüpüne eklenmiş, daha sonra 37°C’de 3 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda, karışıma yaklaşık 1 µL yükleme boyası eklenmiş ve karışım %0.8’lik agaroz jele yüklenmiştir. Fragment büyüklüklerinin kıyaslanması amacıyla Lambda DNA/ *EcoRI*+*HindIII* marker (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, ABD) kullanılmıştır. Agaroz jele yüklenen DNA fragmentleri 60 V/cm’lik bir dielektrik kuvvette yaklaşık 90 dakika yürütülmüş ve daha sonra jel görüntüleme sistemi ile görüntülenmiştir.

Tablo 3.3. Reaksiyon karışımına giren bileşen hacimleri.

DNA	Değişken (4-8 µL)
Enzim	1 µL
Tampon	2 µL
Çift distile su	Değişken (9-13 µL)

3.2.6 Konakçı Suşların Gelişme Eğrilerinin Çıkarılması

Fajların, tek aşamalı gelişme eğrilerinin çıkarılması ve konakçılarına adsorbe olma oranlarının belirlenmesi amacıyla *Lactococcus garvieae* suşlarının gelişme eğrileri çıkarılmıştır. Bunun için 18-24 saatlik aktif kültürden BHI besiyerine %1’lik inokülasyon yapılmıştır. İnokülasyon gerçekleştikten sonra 30 dakikalık aralıklarla 600 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılmış diğer yandan da *L. garvieae* suşlarından, BHI agara yayma kültür yöntemi ile ekim yapılmıştır (Hall vd., 2014).

3.2.7 Enfeksiyon Çokluğu (Multiplicity of Infection (MOI)) Belirleme

İzole edilen fajların konakçıları ile etkileşimlerini, yani konakçı hücrelerine tutunan ortalama faj sayısını belirlemek için Enfeksiyon Çokluğu (MOI) analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analiz bir Microplate Reader (AMR-100T, ALLSHENG) ile farklı MOI değerlerinde gerçekleştirilmiştir. Bunun için, log fazındaki 12 ve 15

kodlu bakteri suşlarından hazırlanan karışım ve farklı titrelerdeki faj karışımı (12S4-2, 15S3-2 ve 15S21-1) karıştırılmıştır (Tablo 3.4). Gerekli dilüsyonları gerçekleştirilen 100 µL bakteri karışımı ve 100 µL faj karışımı Microplate Reader kuyucuklarında karıştırılmış ve 20 dakika aralıklarla okuma yapacak şekilde 24 saat çalkalanarak 37°C'de inkübe edilmiştir.

Tablo 3.4. MOI değerleri ve karışım hacimleri.

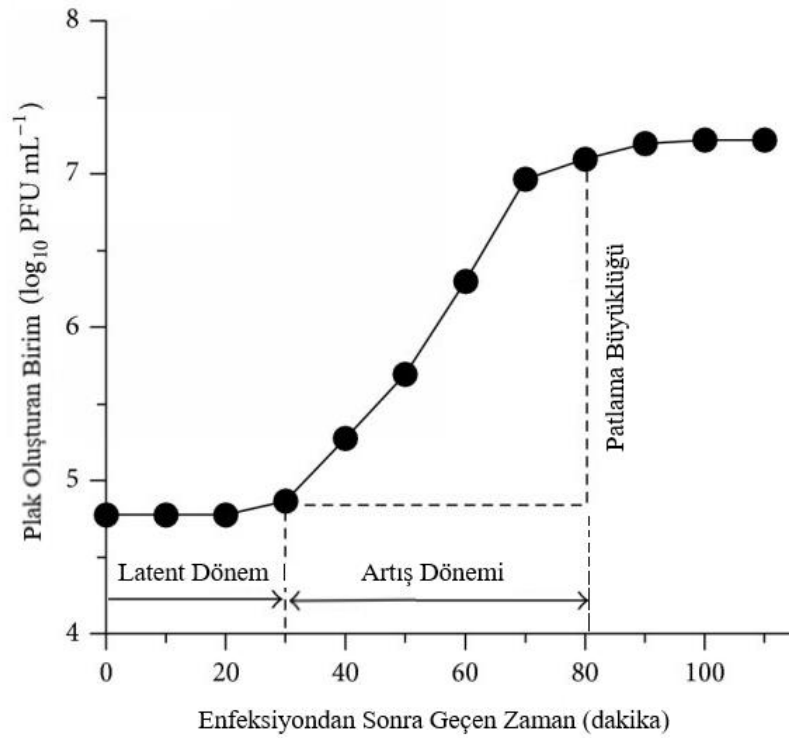
MOI Değerleri ve Kontroller	Karışım Hacimleri
10 ⁵	100 µL 10 ⁷ PFU/mL Faj + 100 µL 10 ² CFU/mL Bakteri
10 ⁴	100 µL 10 ⁷ PFU/mL Faj + 100 µL 10 ³ CFU/mL Bakteri
10 ³	100 µL 10 ⁷ PFU/mL Faj + 100 µL 10 ⁴ CFU/mL Bakteri
10 ²	100 µL 10 ⁵ PFU/mL Faj + 100 µL 10 ³ CFU/mL Bakteri
10	100 µL 10 ⁴ PFU/mL Faj + 100 µL 10 ³ CFU/mL Bakteri
Besiyeri	200 µL BHI
Bakteri A (10 ² CFU/mL)	100 µL BHI + 100 µL 10 ² CFU/mL Bakteri
Bakteri B (10 ³ CFU/mL)	100 µL BHI + 100 µL 10 ³ CFU/mL Bakteri
Bakteri C (10 ⁴ CFU/mL)	100µL BHI + 100 µL 10 ⁴ CFU/mL Bakteri

3.2.8 Fajların Tek Aşamalı Gelişme Eğrilerinin Çıkarılması

Latent dönem, belirli gelişme koşulları altında, bir bakterinin faj adsorpsiyonu ile yeni fajların salımı arasında kalan zamandır. Bir fajın latent dönem süresi, hücre içindeki fajların serbest kalmasının saptanması veya bakteriyel inhibisyonunun saptanması ile gerçekleştirilebilir. Minimum latent dönem aynı zamanda sabit bir dönem olarak da tanımlanabilir çünkü plak oluşturan birimler (PFU), bakteri parçalanması başlayana kadar sayıca kayda değer bir değişiklik göstermez. Bu sabit dönemi, fajların sayılarındaki "artış" takip eder (Hyman &

Abedon, 2009). Artış döneminin sonunda faj sayısı maksimum düzeye ulaşır ve sabit kalır. Serbest fajların ulaştığı en yüksek sayının latent dönemdeki faj sayısına bölünmesiyle de patlama büyüklüğü elde edilmektedir (Eşitlik 3.1) (Tunail, 2009). Bir fajın tek aşamalı gelişme eğrisi o fajın latent dönemi, artış dönemi ve patlama boyutu hakkında bilgi verir. Böylece faj izolatlarının enfeksiyon potansiyelleri belirlenebilir. Şekil 3.3'te bir fajın gelişme eğrisi gösterilmektedir.

$$\text{Patlama Büyüklüğü} = \frac{\text{En yüksek faj titresi } \left(\frac{\text{PFU}}{\text{mL}}\right)}{\text{Latent dönemdeki faj titresi } \left(\frac{\text{PFU}}{\text{mL}}\right)} \quad (\text{Eşitlik 3.1})$$



Şekil 3.3. Bir Fajın Tek Aşamalı Gelişme Eğrisi

Yüksek titreye sahip ve enzim kesimde birbirinden farklı çıkan fajların, tek aşamalı gelişme eğrisi Song vd. nin (2021) kullandığı yöntemde tarif edildiği gibi belirlenmiştir. Bunun için, log-fazında (OD₆₀₀ = 0,5-0,6) bulunan 500 µL *L. garvieae* ve önceden hazırlanan 500 µL faj solüsyonu (10⁵ PFU/mL) MOI:1 olacak şekilde karıştırılmış ve 37°C'de 15 dakika inkübe edilerek bakterilerin fajları adsorbe etmesi sağlanmıştır. 15 dakikalık bir adsorpsiyondan sonra, faj-bakteri karışımı, 15 dakika boyunca 12.000 x g'de santrifüjlenmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pelet 1 mL BHI ile yeniden süspanse edilmiştir ve 37°C'de

inkübasyona bırakılmıştır. Faj enfeksiyonundan 120 dakika sonrasına kadar belirli aralıklarla örnek alınmış ve süpernatandaki faj titresi, çift tabaka agar yöntemi ile belirlenmiştir.

3.2.9 Fajların Adsorpsiyon Hızlarının Belirlenmesi

Fajların adsorpsiyon hızlarının belirlenmesi için Kropinski (2009)'nin kullandığı yöntem yöntemden yararlanılmıştır. Kısaca, log fazındaki *L. garvieae*, BHI ile 10⁶ CFU/mL olacak şekilde seyreltilmiştir. Seyreltilmiş 500 µL konakçı kulture MOI:0,1 olacak şekilde 500 µL faj eklenmiş, hafifçe karıştırılmış ve 10 dakika boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. Bu sırada 1 dakikalık aralıklarla 50 µL örnek alınarak hemen buz aküsü içerisinde bekleyen 900 µl BHI içerisine eklenmiştir. Seri dilüsyondan sonra süpernatandaki konakçıya adsorbe olmamış fajların titreleri belirlenmiştir. Elde edilen titre değerleri yardımıyla ve Eşitlik 3.2 kullanılarak fajların adsorpsiyon hız sabiti değerleri belirlenmiştir. Eşitlikte verilen k, adsorpsiyon hız sabiti; B, bakteri konsantrasyonu; P₀, başlangıç faj titresini; P, son faj titresini; t, faj titresi P₀'dan P'ye düşüncüye kadar geçen zamanı temsil etmektedir.

$$k = \left(\frac{2,3}{B * t} \right) * \log \left(\frac{P_0}{P} \right) \quad \text{Eşitlik 3.2}$$

Ayrıca fajların yüzde adsorpsiyon oranları eşitlik 3.3'te belirtildiği gibi hesaplanmıştır.

$$\text{Adsorpsiyon Oranı: } \frac{P_0 - P}{P_0} * 100 \quad \text{Eşitlik 3.3}$$

3.2.10 *L. garvieae*'ya Etkili Faj Karışımının Model Gıda Uygulaması

Karakterize edilen 12S4-2, 15S3-2 ve 15S21-1 fajlarının antibakteriyel etkilerini doğrulamak için, bir faj karışımı hazırlanmış ve su örneğinde denenmiştir (Şekil 3.4). İlk olarak log-fazında bulunan 12 ve 15 kodlu *L. garvieae* suşlarından (10⁸ CFU/mL) 1'er mL alınarak bakteri karışımı hazırlanmış ve daha sonra da RFLP sonuçlarına göre birbirinden farklı çıkan üç fajdan (10⁸ PFU/mL) 750'şer µL alınarak faj karışımı hazırlanmıştır. Gerekli dilüsyonlar gerçekleştirildikten sonra, steril tüpler içerisinde MOI: 10 ve MOI: 0,1 olacak şekilde faj, bakteri ve su karışımları hazırlanmıştır (Tablo 3.5). Kontrol gruplarına faj karışımı yerine BHI

broth besiyeri koyulmuştur. Daha sonra karışımlar 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonunda yayma kültür yöntemiyle BHI agara ekim yapıldıktan sonra petriler 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda bakteri sayıları belirlenmiş ve fajların etkinliği ortaya konulmuştur.

Tablo 3.5. Gıda denemesi için hazırlanan karışım hacimleri.

MOI: 10 (faj/bakteri: 10³/10²)	Kontrol (MOI: 10)	MOI: 0,1 (faj/bakteri: 10³/10⁴)	Kontrol (MOI: 0,1)
500 µL <i>L. garvieae</i> Karışımı (10 ² CFU/mL)	500 µL <i>L. garvieae</i> Karışımı (10 ² CFU/mL)	500 µL <i>L. garvieae</i> Karışımı (10 ⁴ CFU/mL)	500 µL <i>L. garvieae</i> Karışımı (10 ⁴ CFU/mL)
500 µL Faj Karışımı (10 ³ PFU/mL)	500 µL BHI	500 µL Faj Karışımı (10 ³ PFU/mL)	500 µL BHI
4 mL Steril Su	4 mL Steril Su	4 mL Steril Su	4 mL Steril Su



Şekil 3.4. *L. garvieae* ile enfekte edilmiş su örnekleri.

4. BULGULAR

4.1 Fajların İzolasyonu, Saflaştırılması ve Titrelerinin Belirlenmesi

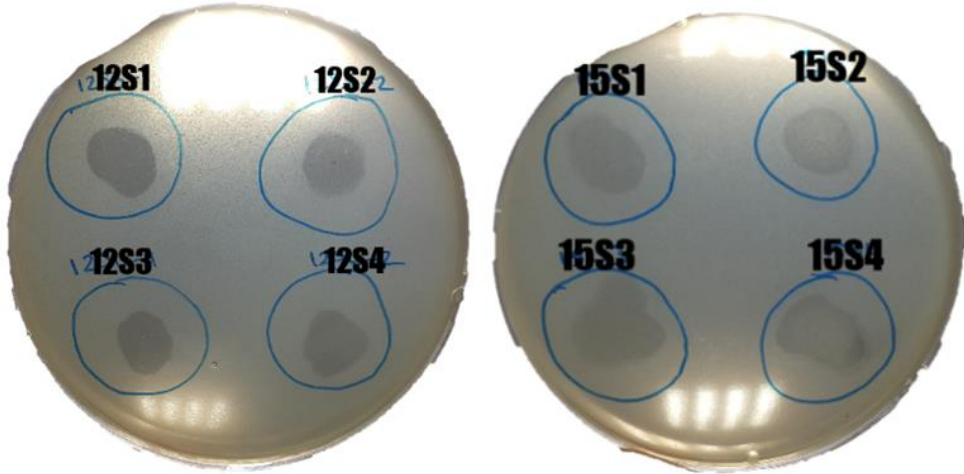
Bolu ilinin farklı bölgelerden toplanan 24 adet çiğ süt ve 1 adet kanalizasyon suyu örneğinden *Lactococcus garvieae*'ya etkili 29 adet faj izole edilmiştir. Bu fajlardan 28 adedi çiğ süt örneklerinden ve 1 adedi kanalizasyon suyundan izole edilmiştir. İzole edilen fajlar Tablo 4.1'de verildiği gibi konakçı bakteri ve konakçı kaynaklarına göre kodlanmıştır. Fajlar, 0,22 µm porlu filtrelerden geçirildikten sonra %15 gliserol eklenerek -18°C'de muhafaza edilmiştir.

Tablo 4.1. İzole edilen fajlar ve kodları.

Konakçı Bakteri Suşu ve Kodu	İzolasyon Kaynağı	Faj Kodu
3 (<i>Lactococcus garvieae</i>)	15	3S15
3 (<i>L. garvieae</i>)	17	3S17
3 (<i>L. garvieae</i>)	22	3S22
3 (<i>L. garvieae</i>)	23	3S23
4 (<i>L. garvieae</i>)	Kanalizasyon Suyu	4SU
4 (<i>L. garvieae</i>)	23	4S23
10 (<i>L. garvieae</i>)	16	10S16
10 (<i>L. garvieae</i>)	19	10S19
12 (<i>L. garvieae</i>)	1	12S1
12 (<i>L. garvieae</i>)	2	12S2
12 (<i>L. garvieae</i>)	3	12S3
12 (<i>L. garvieae</i>)	4	12S4
12 (<i>L. garvieae</i>)	5	12S5
12 (<i>L. garvieae</i>)	17	12S17
12 (<i>L. garvieae</i>)	19	12S19
12 (<i>L. garvieae</i>)	21	12S21
12 (<i>L. garvieae</i>)	22	12S22
12 (<i>L. garvieae</i>)	23	12S23
12 (<i>L. garvieae</i>)	24	12S24
15 (<i>L. garvieae</i>)	1	15S1

15 (<i>L. garvieae</i>)	2	15S2
15 (<i>L. garvieae</i>)	3	15S3
15 (<i>L. garvieae</i>)	4	15S4
15 (<i>L. garvieae</i>)	5	15S5
15 (<i>L. garvieae</i>)	17	15S17
15 (<i>L. garvieae</i>)	21	15S21
18 (<i>L. garvieae</i>)	19	18S19
18 (<i>L. garvieae</i>)	20	18S20

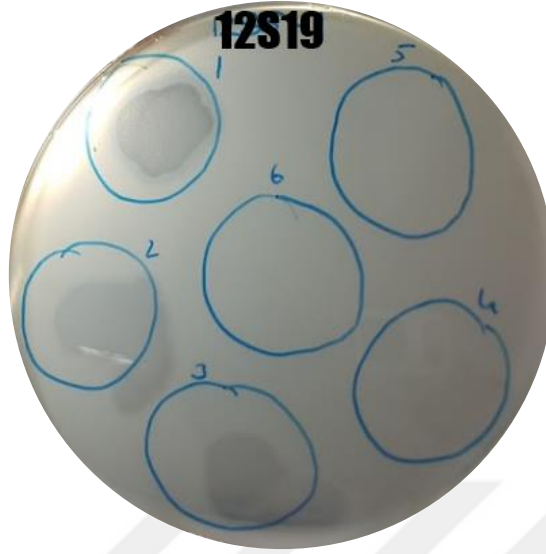
İzole edilen fajlar Bölüm 3.2.2.2’de tarif edildiği gibi zenginleştirilmiştir. Bu amaçla, 18-24 saatlik inkübasyondan sonra, bakteri üremesinin bir işareti olan, bulanıklık gözlemlenen faj-bakteri karışımlarının bakteri miktarı sabit tutularak zenginleştirmeye devam edilmiştir. Fajların etkili olduğunun bir göstergesi olan berraklık gözlemlenen faj-bakteri karışımlarının bakteri miktarları ise 10 µL konakçı bakteri eklenerek devam edilmiştir. Zenginleştirmeler sırasında, belirli aralıklarla faj litik aktiviteleri kontrol edilmiştir. Buna göre 12 ve 15 kodlu bakteri suşlarına etkili fajların plaklarının diğer fajların plaklarına göre daha büyük ve etkili olduğu (Şekil 4.1); 3, 4, 10 ve 18 fajlarının plaklarının ise daha küçük ve zorlukla görüldüğü tespit edilmiştir.



Şekil 4.1. İzole edilen bazı fajların litik aktivitesi.

Zenginleştirmeleri gerçekleştirilen fajların belirli aralıklarla Bölüm 3.2.2.3’te anlatıldığı şekilde titreleri kontrol edilmiştir. Buna göre 12 ve 15 kodlu suşlara etkili fajların titreleri hızla artarken 3, 4, 10 ve 18 kodlu suşlara etkili fajların

titreleri çok yavaş yükselmiştir. Şekil 4.2’de 12S19 fajının farklı dilüsyonlarda litik aktivitesi (Faj titresi) gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Titresi yükseltelen 12S19 fajının farklı dilüsyonlarda litik aktivitesi (Faj titresi).

Titresi 10^7 - 10^8 PFU/mL’ye ulaşan fajlar Bölüm 3.2.2.4’te anlatıldığı tek plak izolasyonu ile saflaştırılmıştır (Şekil 4.3). Tek plak alınırken birbirinden morfoloji olarak farklı olan plaklar seçilmiştir. Saflaştırılan fajlar tekrar zenginleştirmeye alınmış ve faj titreleri yükselene kadar zenginleştirmeye devam edilmiştir.



Şekil 4.3. 15S3-2 fajının tek plak izolasyonu (5. Dilüsyon).

Tek plak izolasyonu ile saflaştırılan fajlar Tablo 4.2’de belirtildiği gibi isimlendirilmiştir.

Tablo 4.2. Saflaştırılan fajların kodları.

Sıra	Faj	Sıra	Faj	Sıra	Faj
1	12S1-1	10	12S5-2	19	15S3-1
2	12S1-2	11	12S19-1	20	15S3-2
3	12S2-1	12	12S19-2	21	15S4-1
4	12S2-2	13	12S22-1	22	15S4-2
5	12S3-1	14	12S22-2	23	15S17-1
6	12S3-2	15	12S23-1	24	15S17-2
7	12S4-1	16	12S23-2	25	15S18-1
8	12S4-2	17	12S24-1	26	15S18-2
9	12S5-1	18	12S24-2		

4.2 İzole Edilen Fajların Konakçı Aralığının Belirlenmesi

Spot testi ile farklı konakçılar üzerinde litik aktivitesi belirlenen fajların sonuçları Tablo 4.3'te verilmiştir. Konakçı profilleri belirlenen bakteriyofajlar, oluşturdukları litik etkiye göre şu şekilde sınıflandırılmışlandırılmıştır:

1. **Grup:** 3S15
2. **Grup:** 3S17
3. **Grup:** 3S22 ve 3S23
4. **Grup:** 12S1-2
5. **Grup:** 12S4-2
6. **Grup:** 12S3-1, 12S5-1, 12S19-1 ve 12S19-2
7. **Grup:** 15S3-2
8. **Grup:** 15SS4-2 ve 15S18-2
9. **Grup:** 15S21-1

Tablo 4.3. İzole edilen fajların farklı konakçılar üzerindeki litik aktivitesi.

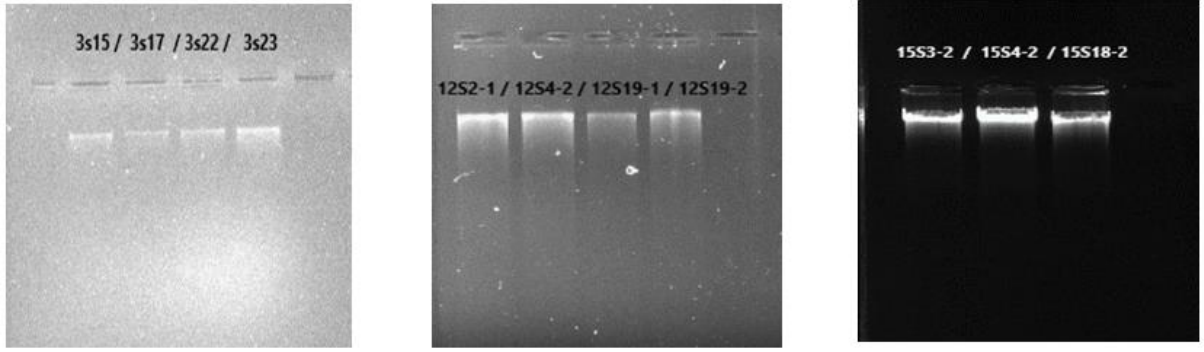
Konakçı Bakteri	Faj													
	3S15	3S17	3S22	3S23	12S1-2	12S3-1	12S4-2	12S5-1	12S19-1	12S19-2	15S3-2	15S4-2	1518-2	15S21-1
<i>L. garvieae</i> 3	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+
<i>L. garvieae</i> 4	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>L. garvieae</i> 10	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
<i>L. garvieae</i> 12	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>L. garvieae</i> 15	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+
<i>L. garvieae</i> 18	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>L. monocytogenes</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. innocua</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. luteus</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> NCTC 12924	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tablo 4.3. Devam.

	Faj													
Konakçı Bakteri	3S15	3S17	3S22	3S23	12S1-2	12S3-1	12S4-2	12S5-1	12S19-1	12S19-2	15S3-2	15S4-2	1518-2	15S21-1
<i>R. equi</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
<i>P. putida</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. Typhimurium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> O157:H7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

4.3 *Lactococcus garvieae*'ya Etkili Fajların DNA Ekstraksiyonu

Titresi 10^7 - 10^8 PFU/mL'ye ulaşan ve saflaştırılan fajlar DNA izolasyonu için Bölüm 3.2.4'te bahseldiği gibi yüksek hızda santrifüj edilmiştir. DNA izolasyonu gerçekleştirildikten sonra jel elektroforezinde yürütülen faj DNA'ların konsantrasyonları karşılaştırılmış ve yüksek konsantrasyona sahip fajlarla çalışmaya devam edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 3, 12 ve 15 konakçı suşlarına ait fajlar daha iyi sonuç vermiştir. Kalan diğer konakçılara ait fajlar (4, 10 ve 18) ise zenginleştirilmeye devam edilmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. 3, 12 ve 15 konakçı suşlarına etkili bazı fajların jel görüntüleri.

4.4 İzole Edilen Bakteriyofaj DNA'larının Restriksiyon Profillerinin Belirlenmesi

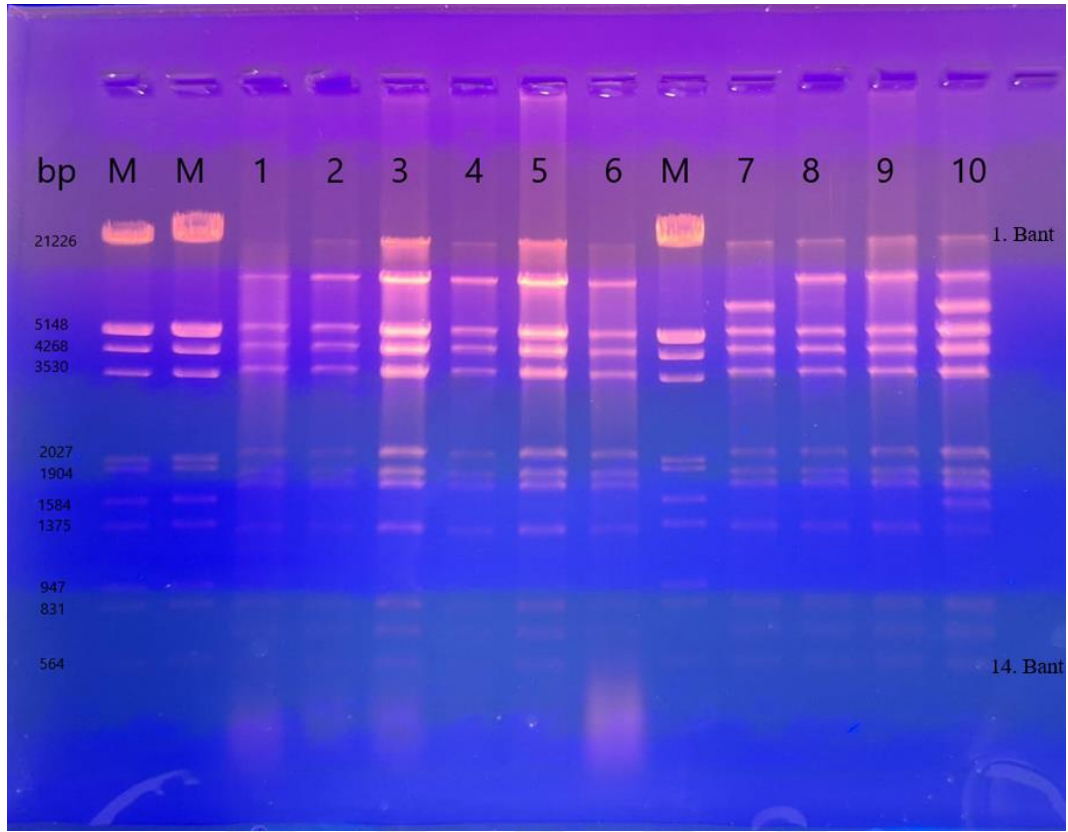
Konsantrasyonları belirlenen 10 faj DNA'sı restriksiyon profillerinin belirlenmesi amacıyla *EcoRI* enzimi ile kesilmiş ve jel elektroforezinde görüntülenip kesim profillerine göre tanımlanmışlardır (Şekil 4.5). Bu fajların genom büyüklükleri Tablo 4.5'te verilmiştir.

Restriksiyon profilleri belirlenen bakteriyofajlar, oluşturdukları fragmentlere göre sınıflandırılmış ve GelJv.2.0 programıyla fragment büyüklükleri hesaplanmıştır. Bu sınıflandırma şu şekilde yapılmıştır;

1. Grup: Kuyucuk 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 ve 9

2. Grup: Kuyucuk 7

3. Grup: Kuyucuk 10



Şekil 4.5. Faj DNA'larının *EcoRI* enzimi ile kesimi jel görüntüsü. M: Marker; 1:12S1-2; 2: 12S3-1; 3: 12S4-2; 4: 12S5-1; 5: 12S19-1; 6: 12S19-2; 7: 15S3-2; 8: 15S4-2; 9: 15S18-2; 10:15S21-1.

Tablo 4.4. Restriksiyon enzimi kesimi sonucunda elde edilen faj DNA fragmentlerinin büyüklükleri.

	Marker	12S1-2	12S3-1	12S4-2	12S5-1	12S19-1	12S19-2	15S3-2	15S4-2	15S18-2	15S21-1
1. Bant	21226	17911	20864	20547	19928	19928	19035	20235	20864	21187	21847
2. Bant	5148	12134	11956	11441	11441	10950	10792	7883	11610	11956	12314
3. Bant	4268	5923	5923	5474	5619	5334	5334	5546	5546	5619	7774
4. Bant	3530	4640	4640	4362	4471	4310	4258	4416	4416	4416	5693
5. Bant	2027	3492	3492	3377	3415	3304	3268	3377	3415	3377	4416
6. Bant	1904	1693	1693	1683	1663	1693	1673	1683	1683	1693	3377
7. Bant	1584	1528	1528	1513	1492	1499	1499	1528	1520	1520	1683
8. Bant	1375	1453	1466	1435	1429	1429	1429	1447	1447	1447	1513
9. Bant	947	1252	1249	1249	1237	1240	1243	1255	1252	1249	1435
10. Bant	831	1197	1121	1121	1133	1119	1128	1123	1125	1121	1334
11. Bant	561	1121	1104	1102		1101	1104	1104	1103	1104	1240
12. Bant		1104	1088	1089		1088		1089	1092	1090	1121
13. Bant											1102
14. Bant											1087

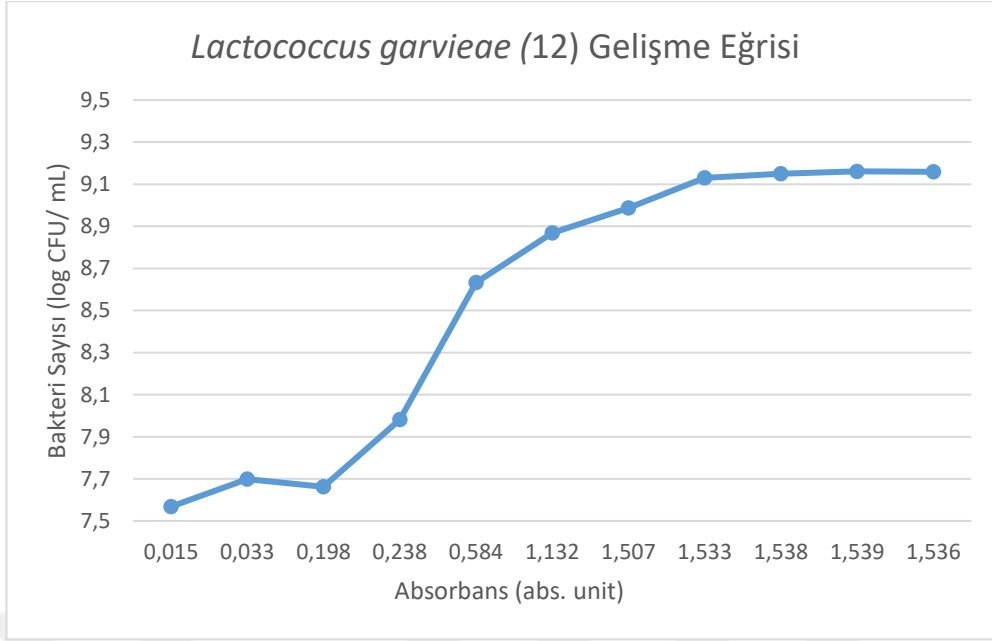
Tablo 4.5. Restriksiyon enzim kesimi sonucunda hesaplanan fajların genom büyüklükleri.

Kuyucuk	Faj	Genom Büyüklüğü (bp)
1	12S1-2	53448
2	12S3-1	56124
3	12S4-2	54393
4	12S5-1	51828
5	12S19-1	52995
6	12S19-2	50763
7	15S3-2	50686
8	15S4-2	55073
9	15S18-2	55779
10	15S21-1	65936

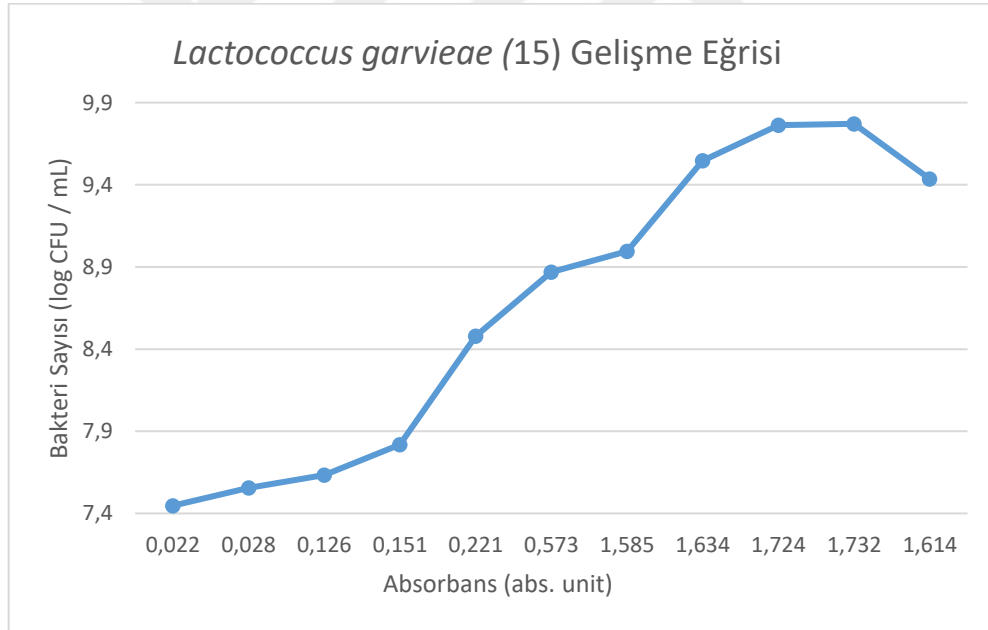
RFLP analizi sonucunda birbirinden farklı çıkan 12S4-2, 15S3-2 ve 15S21-1 kodlu fajlar seçilmiş ve bu fajların diğer özellikleri de belirlenmiştir.

4.5 Konakçı Suşların Gelişme Eğrisi Sonuçları

Absorbans değerleri 30 dakikalık aralıklarla, 600 nm dalga boyunda takip edilen ve aynı zamanda BHI agarda bakteri sayısı belirlenen *L. garvieae* 12 ve 15 suşlarının gelişme eğrileri sırasıyla Grafik 4.1 ve Grafik 4.2’de gösterildiği gibidir.



Grafik 4.1. *L. garvieae* 12 suşunun gelişme eğrisi

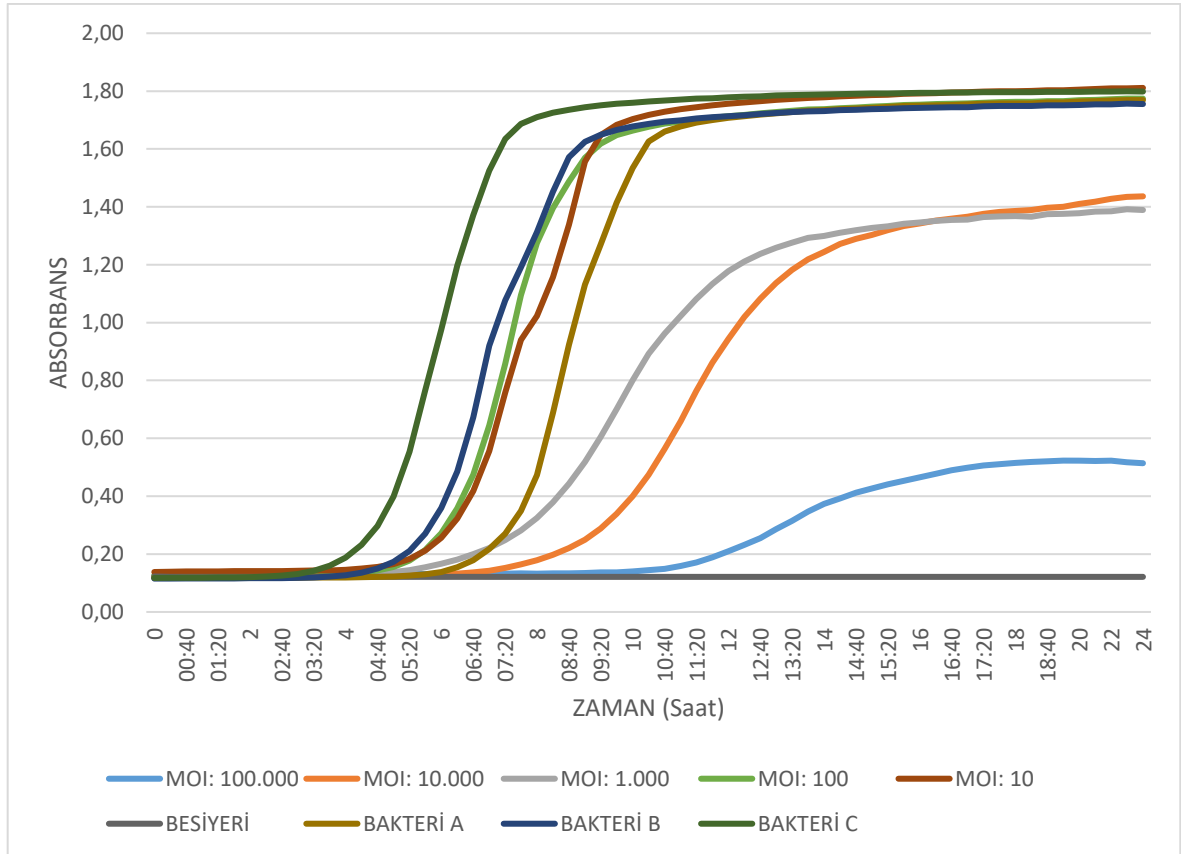


Grafik 4.2 *L. garvieae* 15 suşunun gelişme eğrisi

İnokülasyondan hemen sonra, 12 kodlu *L. garvieae* suşu 0,015 absorbans değeri ile başlarken 15 kodlu *L. garvieae* suşu 0,022 absorbans değeri ile başlamıştır. 12 kodlu suş 120 dakika sonra 0,584 absorbans değerine ve $4,3 \times 10^8$ CFU/mL bakteri sayısına ulaşmıştır. 15 kodlu suş ise 150 dakika sonra 0,573 absorbans değerine ve $3,01 \times 10^8$ CFU/mL bakteri sayısına ulaşmıştır.

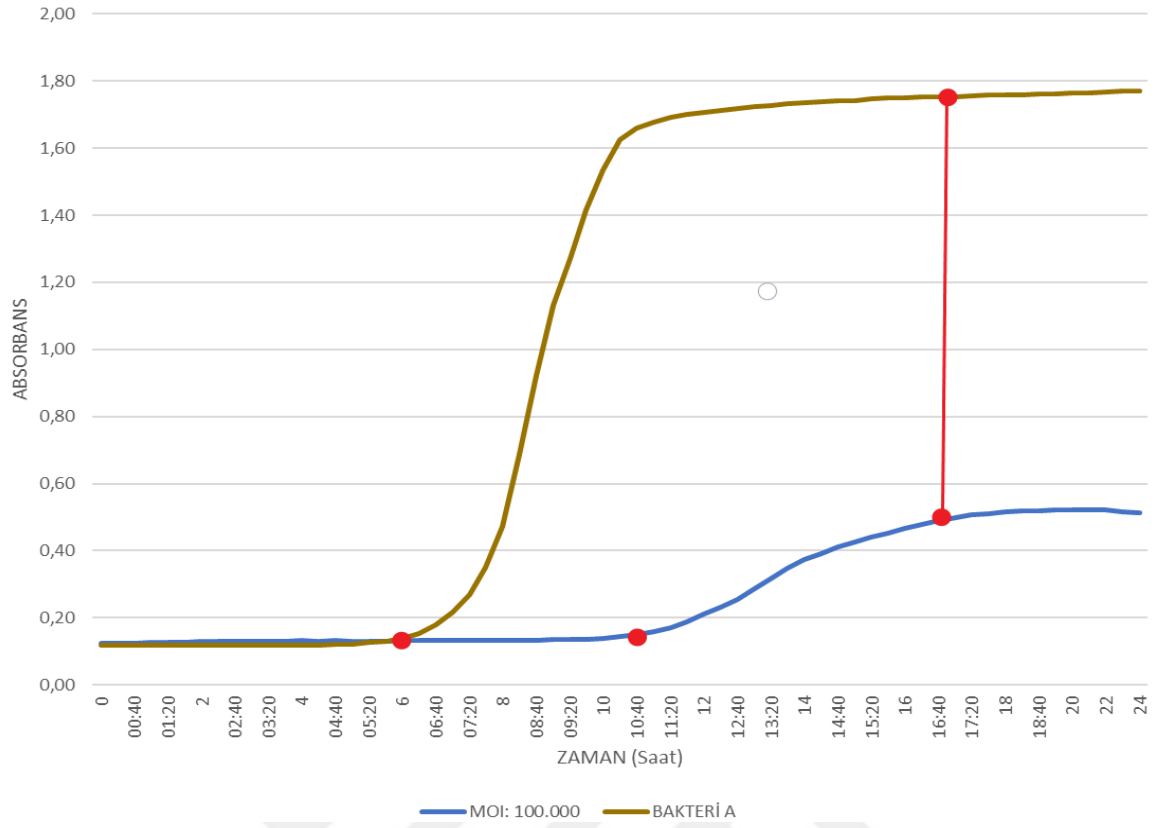
4.6 Enfeksiyon Çokluğu

Hazırlanan faj karışımlarının (12S4-2, 15S3-2 ve 15S21-1) farklı MOI değerlerinde (10^0 , 10^2 , 10^3 , 10^4 ve 10^5) *Lactococcus garvieae* suşlarına etkisi gözlemlenmiştir. Analiz Microplate Reader ile gerçekleştirilmiştir. MOI denemeleri bakteri sabit ve faj sabit olacak şekilde 2 farklı şekilde gerçekleştirilmiştir. Denenen tüm MOI değerlerinin sonuçları Grafik 4.3'te verilmiştir.



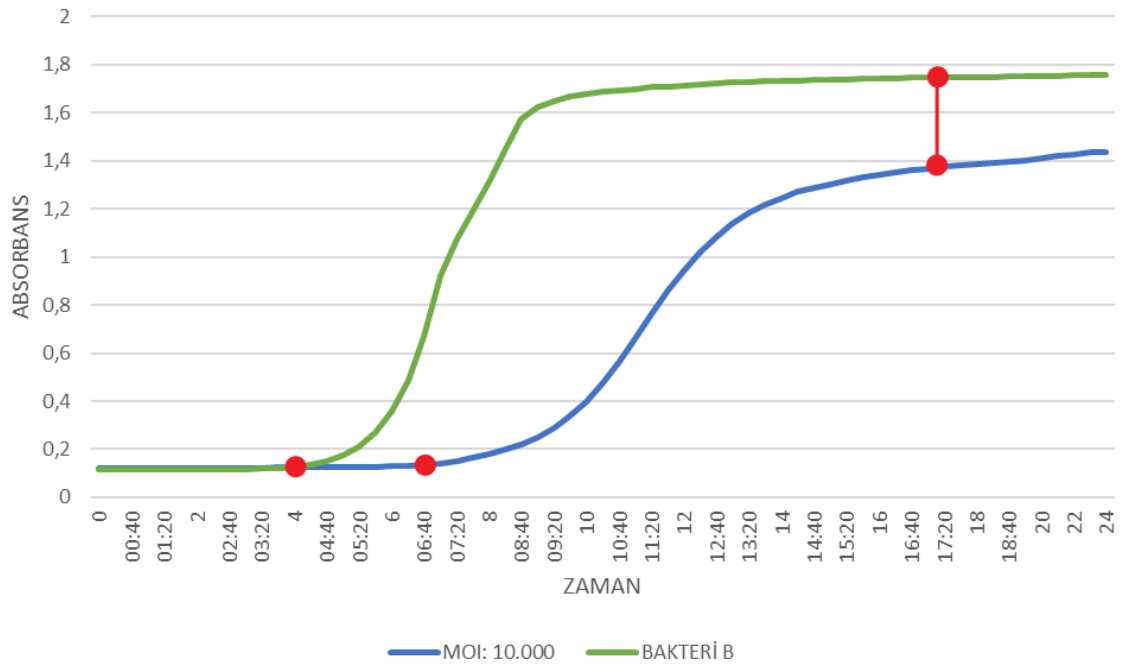
Grafik 4.3. Farklı MOI değerlerinde fajların etkileri.

Elde edilen sonuçlara göre en etkili MOI değerinin 10^5 olduğu görülmüştür. Bu değerde bakteri gelişiminin 4 saat 40 dakika geciktiği ve yaklaşık 2 log azaldığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.6).



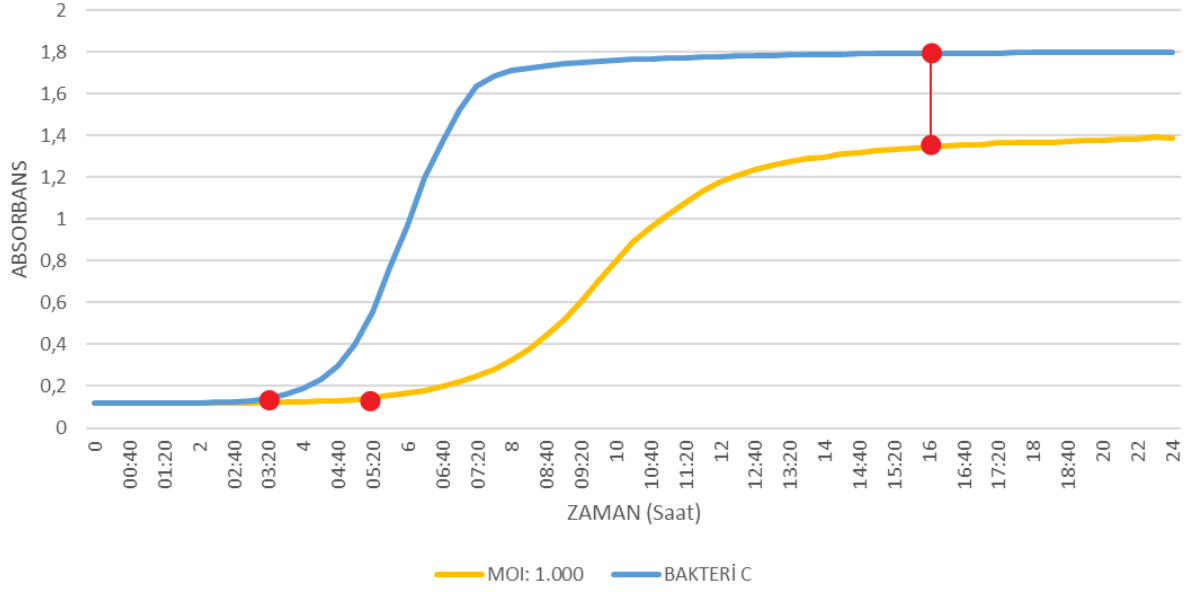
Şekil 4.6. MOI:10⁵'te fajın bakteri gelişimine etkisi.

MOI: 10⁴'te ise faj karışımı bakterilerin gelişimini 2 saat 40 dakika geciktirmiştir ve yaklaşık 1 log'luk düşüş sağlamıştır (Şekil 4.7).



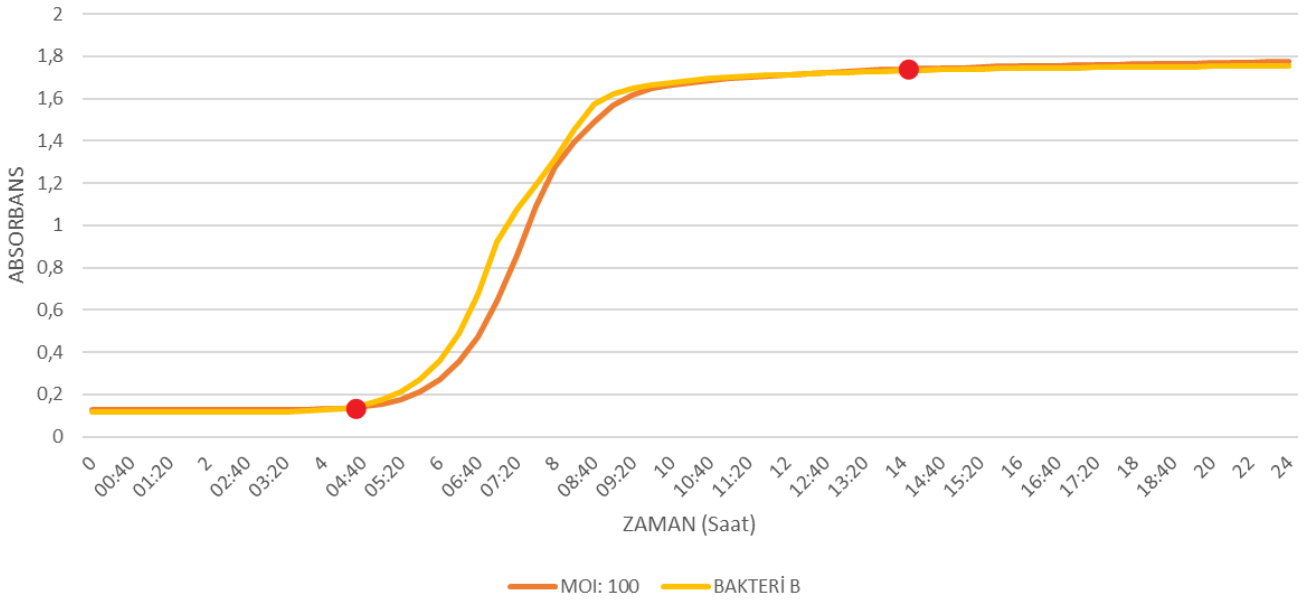
Şekil 4.7. MOI:10⁴'te fajın bakteri gelişimine etkisi.

MOI: 10^3 'te faj karışımı bakterilerin gelişimini 2 saat 20 dakika geciktirmiştir ve yaklaşık 1 log'luk düşüş sağlamıştır (Şekil 4.8).



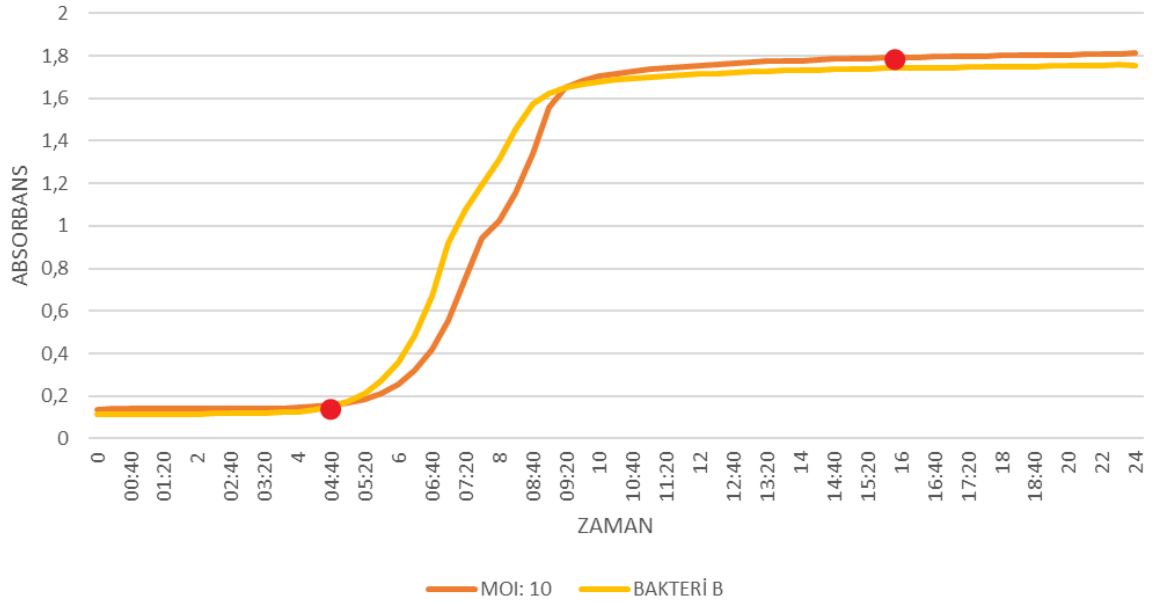
Şekil 4.8. MOI: 10^3 'te fajın bakteri gelişimine etkisi.

MOI: 10^2 'te faj karışımının bakteri gelişimini geciktirmediği ve bakteri sayısında herhangi bir değişiklik oluşturmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. MOI: 10^2 'de fajın bakteri gelişimine etkisi.

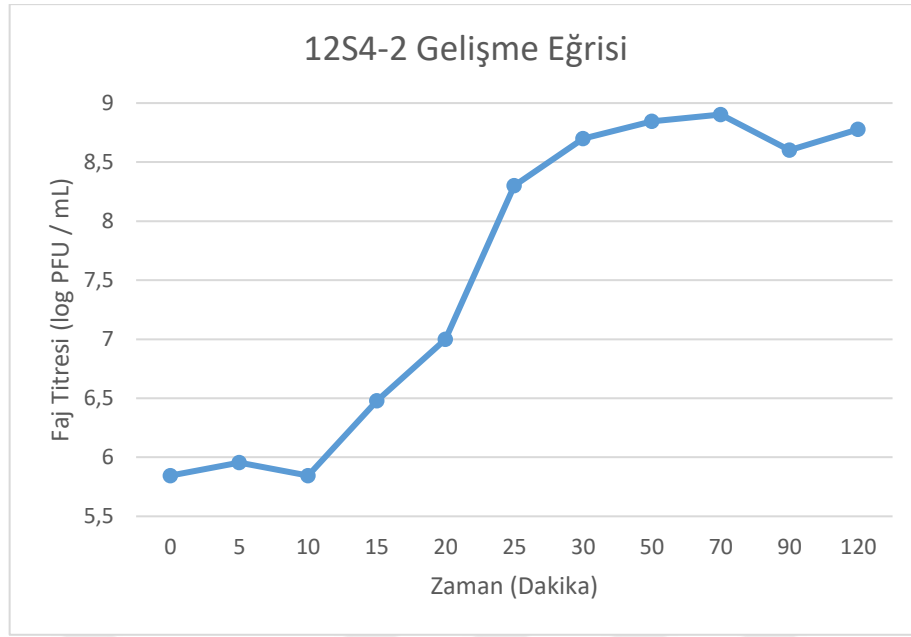
Aynı şekilde MOI: 10^1 'de faj karışımının bakteri gelişimini geciktirmediği ve bakteri sayısında herhangi bir değişiklik oluşturmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.10).



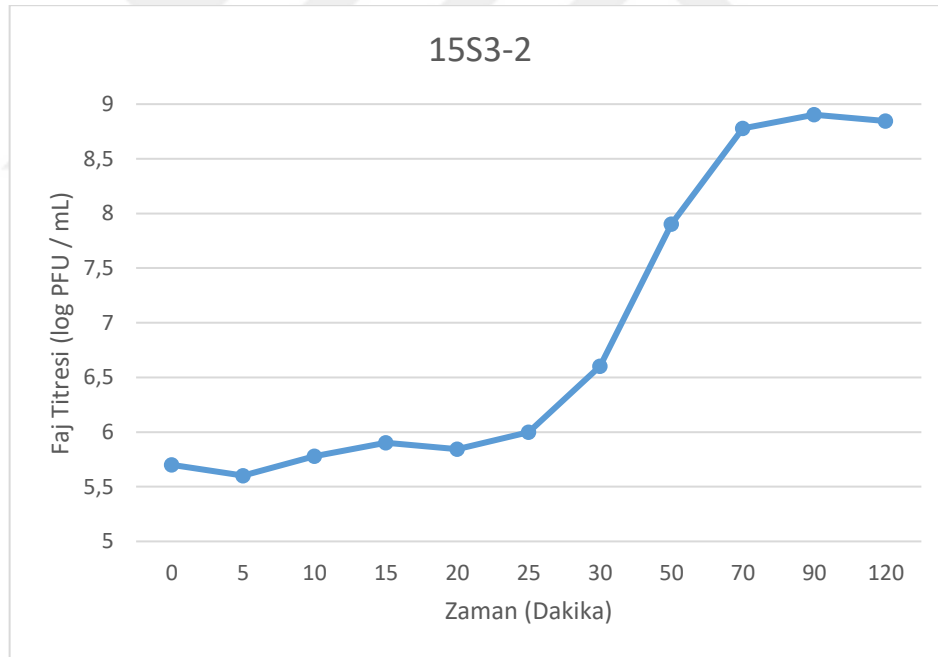
Şekil 4.10. MOI:10'da fajın bakteri gelişimine etkisi.

4.7 Fajların Tek Aşamalı Gelişme Eğrisi

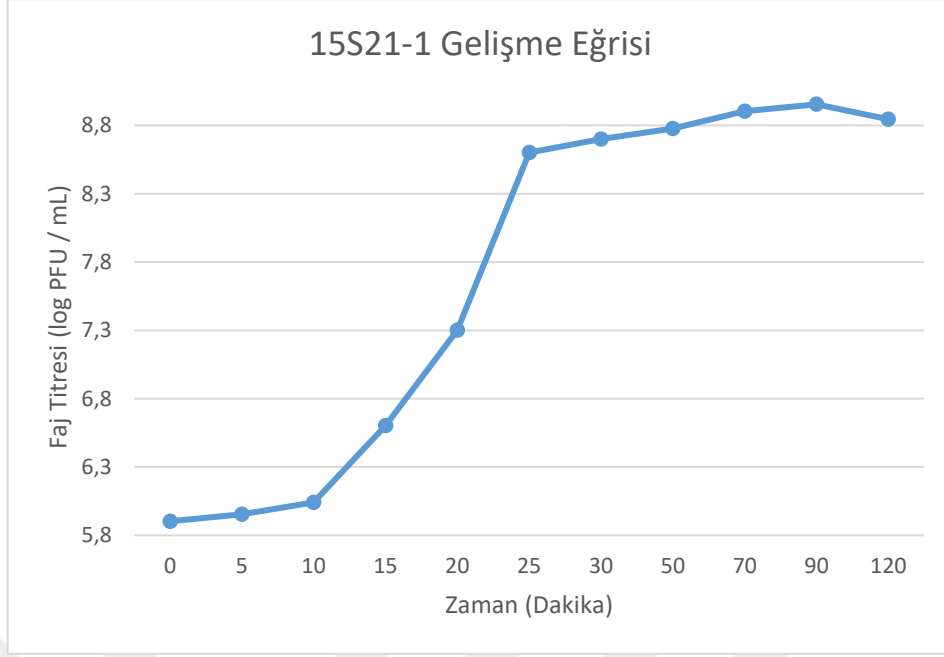
Bölüm 3.2.8'de anlatıldığı gibi faj enfeksiyonundan 120 dakika sonrasına kadar belirli aralıklarla süpernatandaki faj titresi belirlenerek tek aşamalı gelişme eğrileri çıkartılan 12S4-2, 15S3-2 ve 15S21-1 fajlarının latent dönemleri, artış dönemleri ve patlama boyutları birbirlerinden farklılık göstermiştir. Fajların patlama boyutları Eşitlik 3.1'de verilen şekilde hesaplanmıştır. Faj 12S4-2, latent dönemi 10 dakika, artış dönemi 20 dakika ve patlama boyutu 714 olarak hesaplanmıştır (Grafik 4.4). 15S3-2'nin latent dönemi 25 dakika, artış dönemi 45 dakika ve patlama boyutu 600 olarak bulunmuştur (Grafik 4.5). Son olarak, 15S21-1'in latent dönemi 10 dakika, artış dönemi 15 dakika patlama boyutu 363 olarak bulunmuştur (Grafik 4.6) (Suarez vd. 2002).



Grafik 4.4. 12S4-2 fajının tek aşamalı gelişme eğrisi.



Grafik 4.5. 15S3-2 fajının tek aşamalı gelişme eğrisi.



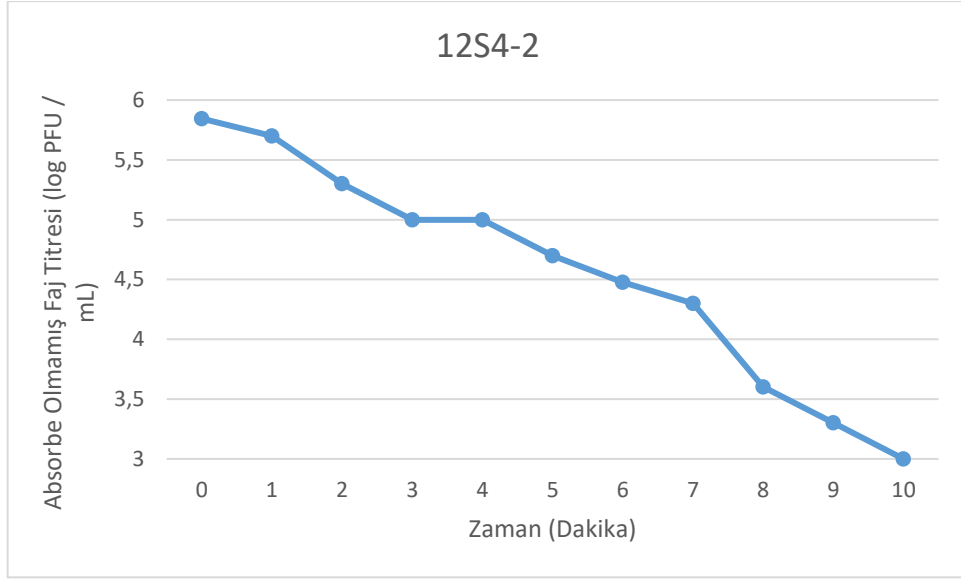
Grafik 4.6. 15S21-1 fajının tek aşamalı gelişme eğrisi.

4.8 Fajların Adsorpsiyon Hızlarının Belirlenmesi

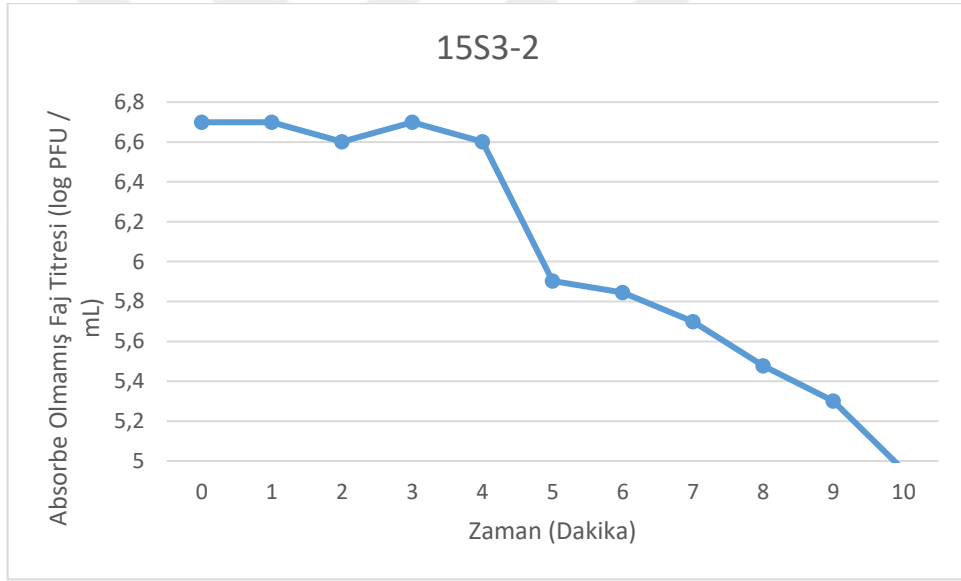
Faj adsorpsiyon hızı, fajların bakteri hücrelerine bağlanma oranını ifade etmektedir. Seçilen fajların adsorpsiyon eğrileri Bölüm 3.2.9’da anlatıldığı gibi belirlenmiş ve adsorpsiyon hızları Eşitlik 3.2’den yararlanılarak hesaplanmıştır (Tablo 4.6). Tabloda görüldüğü gibi üç fajın da adsorbsiyon oranı %98’in üzerinde çıkmıştır. Aşağıdaki grafiklerde enfeksiyondan sonra ortamda bulunan faj titrelerinin hesaplanmasıyla çizilmiş faj absorpsiyon eğrileri verilmiştir (Grafik 4.7, 4.8 ve 4.9).

Tablo 4.6. Fajların adsorpsiyon hızları.

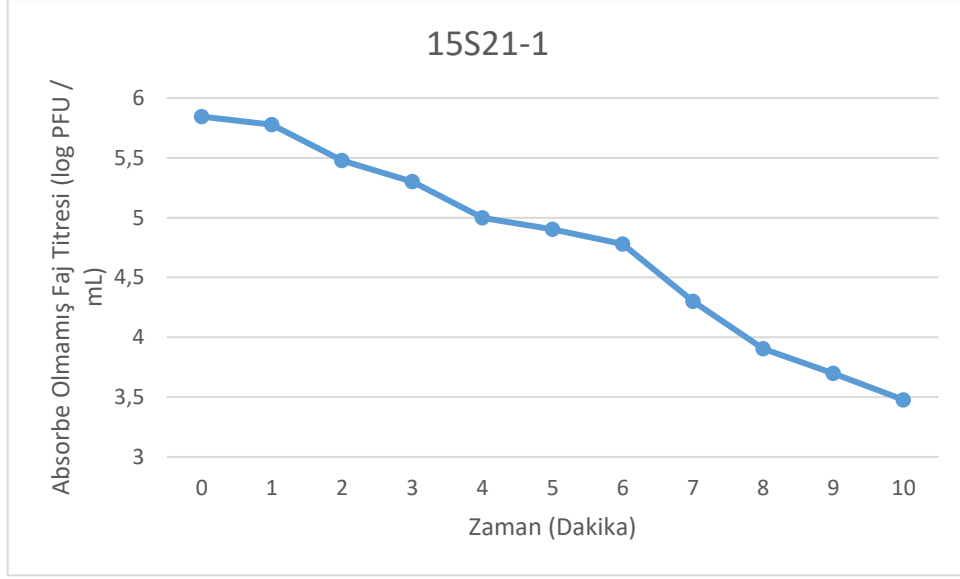
Faj	Adsorpsiyon Hız Sabiti (mL/dk)	Fajların Adsorpsiyon Oranları (%)
12S4-2	$4,6 \times 10^{-7}$	99,8
15S3-2	$1,05 \times 10^{-8}$	98,2
15S21-1	$3,5 \times 10^{-7}$	99,5



Grafik 4.7. 12S4-2 fajının adsorpsiyon eğrisi.



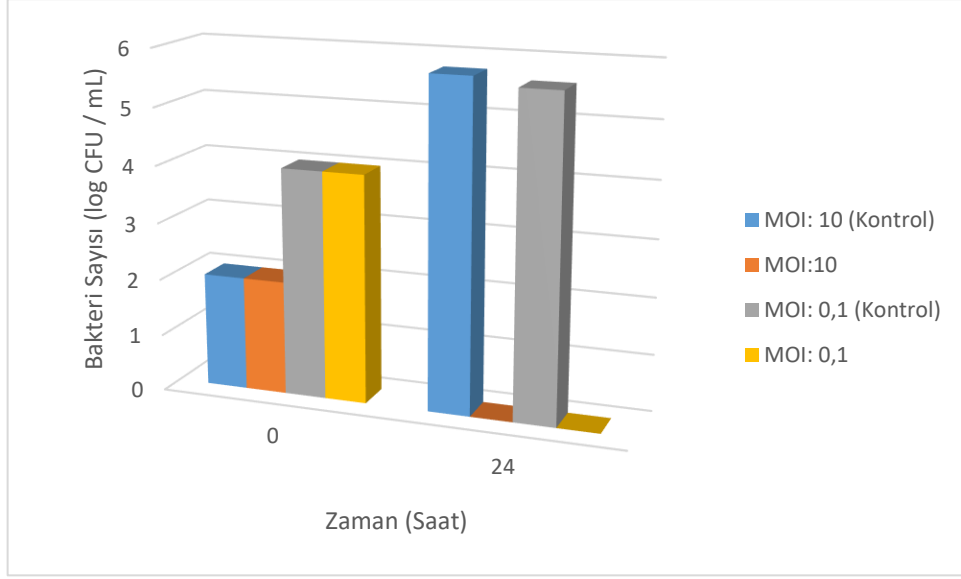
Grafik 4.8. 15S3-2 fajının adsorpsiyon eğrisi.



Grafik 4.9. 15S21-1 fajının adsorpsiyon eğrisi.

4.9 *L. garvieae*'ya Etkili Faj Karışımının Model Gıda Uygulaması

L. garvieae suşları (10^8 CFU/mL) ile enfekte edilen su örneğine farklı MOI değerlerinde faj karışımları eklenmiş ve 24 saat boyunca 37°C 'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda bakteri miktarı sayılmış ve fajların su örneği üzerinde *L. garvieae* suşlarına etkisi gözlemlenmiştir. Grafik 4.10'da da görüldüğü gibi MOI:0,1'e ait kontrol grubunda, yani faj içermeyen su örneğinde bakteri sayısında 1,60206 log'luk bir artış gözlemlenmiştir. Fakat, MOI: 0,1 de faj karışımı eklenen su örneğinde başlangıçta 10^4 CFU/mL bakteri varken 24 saat sonunda bütün bakteriler, fajlar tarafından inhibe edilmiştir. MOI:10' a ait kontrol grubunda, bakteri sayısında 3,748188 log'luk bir artış gözlemlenirken, MOI: 10 olacak şekilde faj karışımı eklenen su örneğinde başlangıçta 10^2 CFU/mL olan bakteri sayısı 24 saat sonunda sıfırlanmıştır. Genel olarak baktığımızda MOI: 0,1'de 4 log'luk bir azalış gözlemlenirken, MOI: 10'da 2 log'luk bir azalış gözlemlenmiştir. Fakat her iki MOI değerinde de faj karışımı, *L. garvieae* suşlarını tamamen ortadan kaldırmıştır.



Grafik 4.10. MOI: 0,1 ve MOI: 10'da faj karışımlarının, *L. garvieae* ile enfekte edilmiş su örneğine etkisi.

5. TARTIŞMA

5.1 *Lactococcus garvieae*'ya Etkili Fajların İzolasyonu

Bakteriyofajlar, yeryüzünde en bol bulunan canlılardır ve her ekosistemde mikrobiyal dengenin düzenlenmesinde kilit rol oynamaktadırlar (Kutter ve Sulakvelidze, 2004). Bu mikroorganizmalar konakçılarının bulunduğu; tatlı su, deniz suyu, toprak, hava ve atık su gibi bir çok çevresel kaynaktan rahatlıkla izole edilebilmektedirler (Nair vd., 2022). *Lactococcus garvieae*'nin yaz aylarında su sıcaklığının 16°C'nin üzerine çıkmasıyla hem deniz suyunda hem de tatlı sularda arttığı bilinmektedir (Vendrell vd., 2006). Dolayısıyla *L. garvieae*'ya etkili fajlar da tatlı sulardan, deniz sularından ve balıklardan izole edilebilmektedir. Nitekim *L. garvieae* fajlarının balıklar (özellikle Sarıkuyruk), deniz suyu, toprak ve atık sulardan izole edildiği yapılan çalışmalar ile rapor edilmiştir. Park vd. (1998) yaptıkları çalışmada, çift tabaka agar yöntemi ile sarıkuyruk (*Seriola quinqueradiata*) balığından 14 faj izole etmişlerdir. Nakai vd. (1999), 6 adet *L. garvieae* etkili fajı deniz suyu ve balık çiftliği sularından izole etmiştir. Eraclio vd. (2015) ise topraktan *L. garvieae* etkili faj izole ettiklerini bildirmişlerdir. Hoai ve Yoshida (2016), Japonya'da bulunan deniz balıklarından *L. garvieae*'ya etkili 10 faj izole etmişler ve bunların lizojenik olma durumlarını incelemişlerdir. Fakat literatüre bakıldığında çiğ süttten izole edilen bir *L. garvieae* fajına rastlanılmamıştır. Bu tez kapsamında, Bolu ilinin farklı bölgelerinden temin edilen 24 adet çiğ inek sütü ve 1 adet kanalizasyon suyu örneğinden *L. garvieae*'ya etkili 29 adet faj izole edilmiştir.

5.2 İzole Edilen Fajların Konakçı Aralığının Belirlenmesi

Bölüm 4.2'de de görüldüğü üzere 3S15 fajı kendi konakçısı dışında 4 ve 10 kodlu *L. garvieae* suşlarını da etkilemiştir. 3S17 ise kendi konakçısını ve 4 kodlu *L. garvieae* suşunu etkilediği görülürken; 3S22 ve 3S23 fajlarının sadece kendi konakçısını inhibe ettiği belirlenmiştir.

12S1-2 kodlu faj sadece kendi konakçısını etkilerken; 12S3-1, 12S5-1, 12S19-1 ve 12S19-2 fajları kendi konakçısı haricinde 4 kodlu *L. garvieae* suşunada etki göstermiştir. 12S4-2 kodlu fajın ise 3, 4 ,10 ,12 ,15 ve 18 kodlu *L. garvieae* suşlarını, ayrıca *M. luteus* ve *E. faecalis* suşlarını inhibe ettiği gözlemlenmiştir.

15S3-2 fajının 3, 4, 10 ve 15 kodlu *L. garvieae* suşlarını ve *E. faecalis* suşunu; 15S4-2 fajının 4, 12 ve 15 kodlu *L. garvieae* suşlarını; 15S18-2 fajının ise 12 ve 15 kodlu *L. garvieae* suşları üzerinde etkili olduğu görülmüştür. 1521-1 fajının ise 3, 12, 15 ve 18 kodlu *L. garvieae* suşlarını inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Genel olarak bakıldığında izole edilen 12S4-2, 15S3-2 ve 15S21-1 fajlarının *L. garvieae* suşları üzerinde etkili olduğu görülmüştür. Bilindiği üzere *L. garvieae* Gram pozitif bir bakteridir. 12S4-2 fajı konakçı aralığının belirlenmesi analizinde kullanılan bir başka Gram pozitif bakteri olan *Micrococcus luteus* ve *Enterococcus faecalis* suşlarına karşı da litik etki göstermiştir.

Benzer olarak Eraclio vd. (2015) çalışmalarında topraktan izole ettikleri *L. garvieae* fajının konakçı aralığının test edilen 73 *L. garvieae* suşundan yalnız 2 tanesi ile sınırlı olduğunu ancak fajların Gram pozitif *L. lactis*'e de etkili olduğu belirtilmiştir. Bizim yaştığımız bu tez çalışmasında ise izole edilen 12S4-2 ve 15S3-2 fajlarının, *L. garvieae* suşları haricinde Gram pozitif *E. faecalis*'e de etkili olduğu gözlemlenmiştir.

Ghasemi vd. (2014a), çalışmamızda da kullandığımız spot testi yöntemi ile konakçı aralığını belirlemişlerdir. Araştırmacılar bu çalışmada atık sudan izole edilen WWP-1 fajının, çalışmada kullanılan 3 farklı *L. garvieae* suşu üzerine etkili olduğunu ancak, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığını rapor etmişlerdir. Bu çalışmada izole edilen fajların çoğu mevcut *L. garvieae* suşlarının birçoğunu inhibe edebilmiştir.

Başka bir çalışmada ise Sarıkuyruk balığından izole edilen PLgY fajının, 24 farklı *L. garvieae* suşunu inhibe ettiği rapor edilmiştir (Park vd., 1997). Bu tez kapsamında izole edilen 12S4-2 fajının test edilen tüm *L. garvieae* suşları üzerinde etkili olduğu görülmüştür.

Park vd. (1998), yaptıkları çalışmada deniz suyu ve çiftlik sularından PLgY16, PLgY30, PLgY886, PLgW1, PLgW2, PLgW3 ve PLgW4 fajlarını izole etmişler. 111 *L. garvieae* suşunun bu fajlara duyarlılıklarını test etmişlerdir. Analiz sonucunda, 83 suşun PLgY16'ya; 89 suşun PLgY30'a; 79 suşun PLgY886'ya; 101

suşun PLgW1'e, 2 suşun PLgW2'ye; 96 suşun PLgW3'e ve 97 suşun PLgW4'e duyarlı olduğu gözlemlenmiştir.

5.3 Faj DNA'larının Restriksiyon Profilleri

Tez kapsamında, izole edilen faj DNA'larının izolasyonu Viral DNA/RNA izolasyon kiti ile gerçekleştirilmiştir.

İzole edilen 10 faj DNA'sı restriksiyon profillerinin belirlenmesi amacıyla *EcoRI* enzimi ile kesilmiş ve jel elektroforezinde görüntülenip kesim profillerine göre sınıflandırılmışlardır. RFLP spesifik restriksiyon fragmanlarının boyut değişkenliğini değerlendirerek farklı DNA örneklerinin karşılaştırılmasını sağlamaktadır (Di Felice vd., 2019).

Literatüre bakıldığında *L. garvieae* suşlarına etkili fajların genom büyüklüklerinin belirlendiği ve dizi analizlerinin yapıldığı sınırlı sayıda çalışma görülmektedir (Tablo 5.1). Bu çalışmalarda yer alan fajların genom büyüklüklerinin 18,000-40,000-bp arasında değiştiği görülmektedir. Bu tez kapsamında izole edilen fajların genom büyüklüklerinin ise 50,000-65,000 bç arasında değiştiği gözlemlenmiştir (Tablo 4.4). Bu sonuca dayanarak izole edilen fajların literatürde bulunan fajlardan farklı olduğu düşünülmektedir. Ancak Şekil 4.5'te verilen fragment büyüklüklerinden ilk sırada yer alan yaklaşık 20.000 bazlık fragment kesimin tamamlanmamış olabileceği ihtimaline dayanarak dikkate alınmayacak olursa o zaman bulunan DNA büyüklüklerinin 30.000-45.000 bç arasında değiştiği görülmektedir. RFLP analizinin tez çalışması kapsamında fajların farklılığını ortaya koymak için yeterli olduğu görülmektedir. Bununla birlikte bu çalışmanın devamında ve daha sonra yapılması planlanan araştırmalar kapsamında DNA dizi analizi ile gerçek genom büyüklüklerinin tam olarak belirlenebileceği düşünülmektedir.

Tablo 5.1. *L. garvieae* etkili fajların genom büyüklükleri.

Faj Adı	Aile	Büyüklük (bç)	Erişim Numarası	Kaynak
WP-2	Picovirinae	18,899	KJ528544.1	(Ghasemi, 2014c)
GE1	Siphoviridae	24,847	NC_029118.1	(Eraclio vd., 2015)

PLgT-1	Siphoviridae	40,273	KU892558.1	(Hoai vd., 2016)
TB25	Siphoviridae	38,122	KX833905.1	(Eraclio vd., 2017)
PLgY-16	Siphoviridae	29,342	KY926698	(Hoai vd., 2019)
PLgY-30	Siphoviridae	29,284	KY926699	(Hoai vd., 2019)
PLgW-1	Siphoviridae	30,189	KY888143	(Hoai vd., 2019)
PLG-II	-	32,271	MZ368140.1	(Akmal vd., 2022)
12S4-2	-	54,393	-	Bu çalışmada
15S3-2	-	50,686	-	Bu çalışmada
15S21-1	-	65,936	-	Bu çalışmada

5.4 Konakçı Suşların Gelişme Eğrisi

Fajların bakterilere tutunduktan sonra litik veya lizogenik döngüyü takip etmeleri genetik faktörlerin etkili olduğu bir karar sürecidir. Bu karar sürecinde bakterilerin logaritmik fazda olmaları litik döngünün seçilmesinde bir etken olarak görülmektedir (Tunail, 2009). Bu nedenle bu çalışmada litik fajların etkinliğinin belirlenmesi için konakçı bakterilerin gelişme eğrileri çıkarılmış ve analizler logaritmik fazda olan bakteriler ile gerçekleştirilmiştir.

Bölüm 4.5'te anlatıldığı üzere 12 kodlu *L. garvieae* suşunun 0,584 absorbans değerinde; 15 kodlu *L. garvieae* suşunun ise 0,573 absorbans değerinde log fazına ulaştığı gözlemlenmiştir.

Xie vd. (2023), Çin'de klinik mastitisli ineklerden izole ettikleri *L. garvieae*'nin bazı özelliklerini analiz etmiştir (Xie vd., 2023). İzole edilen suşun enfeksiyondan 4 saat sonra, çalışmamızda kullanılan suşlara benzer olarak yaklaşık 0,550 absorbans değerinde log fazına ulaştığı rapor edilmiştir.

5.5 Fajların Tek Aşamalı Gelişme Eğrisi

Tablo 5.2'de de açıkça görüldüğü gibi izole edilen bakteriyofajlar latent dönem, artış dönemi ve patlama büyüklüğü açısından farklı özellikler sergilemiştir. Literatüre bakıldığında *L. garvieae* fajlarıyla alakalı çalışmanın çok az olduğu belirlenmiştir. Özellikle bu bakteriye etkili fajların patlama büyüklükleri ve latent

dönemleriyle ilgili çalışma sayısının sadece bir olduğu görülmüştür. Nitekim Hoai vd. (2018) *L. garvieae*'ya etkili 3 litik fajla yaptıkları çalışmada fajların morfolojisini, konak aralığını ve etkinliğini ayrıntılı olarak araştıramadıklarını çalışmalarının özet kısmında özellikle belirtmişlerdir. Sonuç olarak *L. garvieae*'ya etkili çok az faj izole edilmiş ve bu fajlarında özelliklerinin ayrıntılı bir şekilde incelenmediği görülmüştür. Bu tez ile *L. garvieae* suşlarına etkili fajların özellikleri ortaya çıkarılmıştır.

Tablo 5.2. Fajların bazı özellikleri

Faj	12S4-2	15S3-2	15S21-1
Latent Dönem (dk)	10	25	10
Artış Dönemi (dk)	20	45	15
Patlama Boyutu	714	600	363

Eraclio vd. (2015), topraktan izole ettikleri GE1 kodlu *L. garvieae* fajının patlama büyüklüğünü 139 ve latent süresinin ise 31 dakika olduğunu belirtmişlerdir. Faj GE1'in patlama büyüklüğünün çalışmamızda izole edilen fajlardan daha düşük olduğu, latent süresinin ise 15S3-2 ile benzerlik gösterdiği görülmektedir.

5.6 Faj Adsorpsiyon Oranları

Analiz sonuçlara göre izole edilen 3 fajın *L. garvieae* ile 10 dakika inkübasyonundan sonra %98,2-99,8 oranında maksimum adsorpsiyon sağladığı gözlemlenmiştir. Ayrıca Tablo 4.4'te verilen sonuçlara 12S4-2 ve 15S21-1'in adsorpsiyon hızları birbirine yakınlık gösterirken 15S3-2'nin bu iki fajdan daha yavaş adsorbe olduğu gözlemlenmiştir.

Ghasemi vd. (2014a) yaptıkları çalışmada ise izole ettikleri *L. garvieae* fajının 15 dakika %95 adsorpsiyon oranı sağladığını gözlemlenmiştir. Bu tez çalışması kapsamında izole ettiğimiz 12S4-2, 15S3-2 ve 15S21-1 fajlarının, Ghasemi vd. (2014a)'nin izole ettiği WWP-1 fajına göre daha kısa sürede ve daha iyi bir adsorpsiyon sağladığı tespit edilmiştir.

5.7 *L. garvieae*'ya Etkili Faj Karışımının Su Örneğine Etkisi

L. garvieae tatlı ve tuzlu sularda yaşayan ve bu sularda yaşayan balıklarda hiperakut hemorajik septisemik enfeksiyonlara ve kitlesel ölümlere neden olan bir patojendir. Kitlesel balık ölümleri hem ekolojik açıdan hem de endüstriyel olarak kayıplara ve ekonomik sorunlara neden olmaktadır (Radosavljević vd., 2020).

Günümüzde patojenlerle mücadelede bir çok yöntem kullanılmaktadır. Fakat bu yöntemlerin gıdaların tadını ve besin değerlerini değiştirmek, insan sağlığına ve çevreye zarar vermek gibi dezavantajları bulunmaktadır. (Amit vd., 2017; Naveena ve Nagaraju, 2020). Ayrıca antibiyotik kullanımı da patojenlerin direnç kazanmasına neden olmaktadır (Liao vd., 2020).

Bu nedenle çalışma kapsamında izole edilen fajların suda litik etki göstermesi en azından endüstriyel boyutlarda balık üretiminde bu patojen ile mücadele de etkili bir yöntem olabileceğini göstermektedir.

İzole edilen 12S4-2, 15S3-2 ve 15S21-1 fajlarından oluşan faj karışımının MOI:0,1 ve MOI:10 değerlerinde enfekte edilen su örneğinde *L. garvieae* suşlarını tamamen ortadan kaldırdığı gözlemlenmiştir. Bu sonuç balıklarda fajların *L. garvieae*'nin neden olduğu hastalıklarla mücadelede umut vadetmektedir. Fajların biyolojik antimikrobiyaller olarak balık üretiminde kullanımı balık hastalıklarının önüne geçerek gıda kayıplarına ve ekonomik kayıplara engel olacak, en önemlisi de insan sağlığının korunmasına katkı sağlayacaktır.

Park vd. (1998) yaptıkları bir çalışmada *L. garvieae* fajlarının deniz suyundaki stabilitelelerini incelemişlerdir. Bu amaçla faj PLgY16 hem otoklavlanmış hem de otoklavlanmamış deniz suyuna inoküle edilmiştir. Faj PLgY16'nın otoklavlanmış deniz suyunda 14 gün boyunca stabilitesini koruduğu görülmüştür. Bu deniz suyunun tuz oranından faj PLgY16'nın etkilenmediğini göstermektedir. Ancak otoklavlanmamış deniz suyunda 7 gün içerisinde ilk başta artış gösteren faj titresinin giderek azaldığı görülmüştür. Bu sonuç fajların kullanılmak istenen asıl ortamda doğal yapı bozulmadan etkinliğinin ve stabilitesinin incelenmesi gerektiğini göstermektedir. Ayrıca litik etkisi yüksek fajın veya faj kokteylinin belirli periyotlarla balık yetiştirilen ortama inoküle edilmesinin de basit bir çözüm

yöntemi olabileceği düşünülmektedir. Bu ve benzeri önerilerin deneysel bir olarak incelenmesi ve bu konuda daha kapsamlı araştırmalar yapılması gerekmektedir.

Nakai vd. (1999), ortalama 50 g olan yirmi sarıkuyruk balığına, 10^7 CFU balık dozunda *L. garvieae* suşu enjekte etmişler ve enjeksiyondan 1 saat sonra 10^7 PFU/mL PLgY-l6 fajı enfekte etmişlerdir. Kontrol olarak, faj süspansiyonu yerine Tripto-soya Broth kullanmışlardır. 24 saat sonunda faj enjekte edilmiş sarıkuyruğun hayatta kalma oranının (%90), faj enjeksiyonu yapılmamış kontrol balıklarından (%45) çok daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir.

Ghasemi vd. (2014a), çalışmalarında izole ettikleri WWP-1 fajının, *L. garvieae* ile doğal olarak enfekte olmuş gökkuşağı alabalığı üzerindeki terapötik etkisini araştırmışlar. Bunun için klinik laktokokkoz belirtileri sergileyen gökkuşağı alabalıklarını seçmişlerdir. Bir grup alabalığa faj emdirilmiş yem (10^8 PFU/g) verilmiş; ikinci hastalıklı balık grubuna fajsız yem verilmiş ve bu grup kontrol olarak kullanılmıştır. Balıkların ölüm oranları 2 hafta boyunca günlük olarak kaydedilmiştir. Çalışma sonucunda, kontrol grubundaki balıkların tamamı 8 gün sonra ölerken; faj tedavisinden 2 hafta sonra, faj emdirilmiş yem alan balıkların %30'dan fazlasının hayatta kaldığı bildirilmiştir (Ghasemi, 2014a).

Sonuç olarak tüm çalışmaların umut vadeden ortak sonuçları olduğu görülmektedir. Yapılan diğer çalışmalara bakıldığında fajların enjeksiyonu farklı yöntemler ile sağlanmıştır. Ancak her çalışmada sonuç olarak fajlar, balıkların *L. garvieae* enfeksiyonu ile mücadelede hayatta kalma oranını yükseltmiştir. Bu sonuçlar *L. garvieae*'ya etkili fajların, alabalık tesisleri vb. endüstriyel üretimlerde veya farklı ekosistemlerde kullanılabilirliğini ortaya koymaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, çiğ inek sütü örneklerinden, bir balık patojeni olan *L. garvieae*'ya özgü litik bakteriyofajlar izole edilmiş ve bu fajların karakterizasyonu sağlanmıştır. Çalışma sonunda:

1. Bolu ilinin farklı bölgelerinden toplanan 24 adet çiğ süt ve 1 adet kanalizasyon suyu örneğinden *L. garvieae*'ya etkili 29 adet faj izole edilmiştir.
2. Bu fajlardan, zenginleştirmeler sonucunda yüksek titreye sahip olan 10'u seçilmiş ve restriksiyon profillerinin belirlenmesi amacıyla *EcoRI* enzimi ile kesilmiştir.
3. Restriksiyon profilleri belirlenen bakteriyofajlar, oluşturdukları fragmentlerin büyüklüklerine göre 3 gruba ayrılmış ve bu 3 gruptan titresi 10^8 PFU/mL olan 3 farklı bakteriyofaj seçilerek gelişme eğrileri ve adsorpsiyon hızları belirlenmiştir.
4. 12S4-2 kodlu fajın, 6 adet *L. garvieae* suşuna, ayrıca *Micrococcus luteus* ve *Enterococcus faecalis* suşlarına etkili olduğu gözlemlenmiştir. 15S3-2 fajının ise 4 adet *L. garvieae* suşuna ve *Enterococcus faecalis* suşuna etkili olduğu gözlemlenmiştir. Son olarak 1521-1 fajında 4 adet *L. garvieae* suşunda litik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.
5. Gelişme eğrileri çıkarılan bu 3 fajın latent dönemleri, yükseliş dönemleri ve patlama boyutları da RFLP de olduğu gibi birbirinden farklılık göstermiştir.
6. Bu üç fajın adsorpsiyon oranları da belirlemiş ve bu oranlar birbirine yakın sonuçlar vermiştir.
7. Bu 3 fajın optimum MOI değeri 10^5 olarak belirlenmiştir.
8. Son olarak, bu fajlardan oluşan karışımın su örneğinde, MOI: 0,1 ve MOI:10 değerlerinde *L. garvieae* suşlarını tamamen ortadan kaldırdığı gözlemlenmiştir.

Bölüm 2.2.3'te de belirtildiği gibi *L. garvieae*'ya etkili fajlarla yapılan çalışma sayısı sadece 13 adettir. Ayrıca bu çalışmaların çoğunda gelişme eğrisi, adsorpsiyon oranı ve enfeksiyon çokluğu gibi fajların karakterize edilmesinde önemli olan analizler eksiklik göstermektedir. Bu çalışma ile *L. garvieae* bu eksiklik giderilerek yeni çalışmaların önü açılacaktır.

Çalışmanın sonuçları, 12S4-2, 15S3-2 ve 15S21-1 fajlarının *L. garvieae* suşlarına spesifik olduğunu göstermiştir. Bu çalışma, balık yetiştirme sektöründe prevalansı yüksek olan *L. garvieae* suşlarının belirlenerek, pilot üretim ile enfekte balıklarda deneme yapılması gerektiği sonucunu göstermiştir. Tüm bu çalışmalar sonucunda bakteriyofaj koleksiyonları oluşturulabilecektir. Daha sonrasında izole edilen bakteriyofajların tanımlanması için elektron mikroskopunda görüntüsünün alınarak familyasının belirlenmesi, genom diziliminin çıkarılarak sınıflandırılması ve olası toksik genlerin varlığı açısından değerlendirilmesi, sıcaklık ve pH faktörlerinden etkilenme durumlarının araştırılması gerekmektedir. Bu analizlerinden olumlu sonuçlar alınması durumunda *L. garvieae* suşlarına karşı kullanılabilecek bir ürün çıkarılabilmesi mümkün olabilecektir.

7. KAYNAKLAR

(Bu tez çalışmasında APA 7 atıf sistemi kullanılmıştır.)

- Acar Soykut, E. (2007). *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus bulgaricus* virulent fajlarının replikasyon parametreleri, kapsid protein profilleri ve restriksiyon endonükleaz analizleri esas alınarak tanımlanmaları ve sınıflandırılmaları, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Acar Soykut, E., Tayyarcan, E. K., Evran, Ş., Boyacı, İ. H., Çakır, İ., Khaaladi, M., & Fattouch, S. (2019). Microencapsulation of phages to analyze their demeanor in physiological conditions. *Folia Microbiologica*, 64(6), 751–763. <https://doi.org/10.1007/s12223-019-00688-1>
- Akmal, M., Nishiki, I., Zrelavs, N., & Yoshida, T. (2022). Complete genome sequence of a novel lytic bacteriophage, PLG-II, specific for *Lactococcus garvieae* serotype II strains that are pathogenic to fish. *Archives of Virology*, 167(11), 2331–2335. <https://doi.org/10.1007/s00705-022-05568-7>
- Amit, S. K., Uddin, M. M., Rahman, R., Islam, S. M. R., & Khan, M. S. (2017). A review on mechanisms and commercial aspects of food preservation and processing. *Agriculture and Food Security*, 6(1), 1–22. <https://doi.org/10.1186/s40066-017-0130-8>
- Anvar, A. A., Ahari, H., & Ataee, M. (2021). Antimicrobial properties of food nanopackaging: a new focus on foodborne pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 12, 1–13.
- Aydoğan, D. Y., & Hadımlı, H. H. (2016). Bakteriyofaj Tedavisi. *Etlik Veteriner Mikrobiyol Dergisi*, 27(1), 38–47.
- Banach, J. L., & Van Der Fels-Klerx, H. J. (2020). Microbiological reduction strategies of irrigation water for fresh produce. *Journal of Food Protection*, 83(6), 1072–1087. <https://doi.org/10.4315/JFP-19-466>
- Baños, A., Ariza, J. J., Nuñez, C., Gil-martínez, L., García-lópez, J. D., Martínez-bueno, M., & Valdivia, E. (2019). Effects of *Enterococcus faecalis* UGRA10 and the enterocin AS-48 against the fish pathogen *Lactococcus garvieae*. Studies in vitro and in vivo. *Journal Of Food Microbiology*, 69–77. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.08.002>
- Bintsis, T. (2017). Foodborne pathogens. *AIMS Microbiology*, 3(3), 529–563. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2017.3.529>
- Brady, A., Felipe-ruiz, A., Gallego, F., Marina, A., Quiles-puchalt, N., & Penadés, J. R. (2021). Molecular basis of lysis – lysogeny decisions in gram-positive phages. *Annual Review Microbiology*, 75, 564–576.
- Byun, K. H., Han, S. H., Choi, M. W., Park, S. H., & Ha, S. Do. (2022). Isolation, characterization, and application of bacteriophages to reduce and inhibit *Listeria monocytogenes* in celery and enoki mushroom. *Food Control*, 135, 108826. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.108826>
- Cao, S., Yang, W., Zhu, X., Liu, C., Lu, J., Si, Z., Pei, L., Zhang, L., Hu, W., Li, Y., Wang, Z., Pang, Z., Xue, X., & Li, Y. (2022). Isolation and identification of the broad-spectrum high-efficiency phage vB_SalP_LDW16 and its therapeutic application in chickens. *BMC Veterinary Research*, 18(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03490-3>
- Chanishvili, N. (2012). Phage Therapy-History from Twort and d’Herelle Through Soviet Experience to Current Approaches. In *Advances in Virus Research* (1st ed., Vol. 83). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394438-2.00001-3>
- Chegin, Z., Khoshbayan, A., Moghadam, M. T., Farahani, I., Jazireian, P., & Shariati, A. (2020). Bacteriophage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: a review. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 19(45), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12941-020->

- Chibani, C. M., Farr, A., Klama, S., Dietrich, S., & Liesegang, H. (2019). Classifying the unclassified: A phage classification method. *Viruses*, 11(2), 1–15. <https://doi.org/10.3390/v11020195>
- Chrisman, B., He, C., Jung, J. Y., Stockham, N., Paskov, K., Washington, P., & Wall, D. P. (2022). The human “contaminome”: bacterial, viral, and computational contamination in whole genome sequences from 1000 families. *Scientific Reports*, 12(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13269-z>
- Coffey, B., Mills, S., Coffey, A., McAuliffe, O., & Paul Ross, R. (2010). Phage and their lysins as biocontrol agents for food safety applications. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1(1), 449–468. <https://doi.org/10.1146/annurev.food.102308.124046>
- Colagrossi, L., Costabile, V., Scutari, R., Agosta, M., Onori, M., Mancinelli, L., Lucignano, B., Muda, A. O., Baldo, G. Del, Mastronuzzi, A., Locatelli, F., Trua, G., Montanari, M., Alteri, C., Bernaschi, P., Perno, C. F., Onori, M., Mancinelli, L., Lucignano, B., ... Alteri, C. (2022). Evidence of pediatric sepsis caused by a drug resistant *Lactococcus garvieae* contaminated platelet concentrate. *Emerging Microbes & Infections*, 11(1), 1325–1334. <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2071174>
- Collins, M. D., Farrow, J. A. E., Phillips, B. A., & Kandler, O. (1983). *Streptococcus garvieae*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 129, 3427–3431.
- 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>
- Do, H., Yoo, W., Wang, Y., Nam, Y., Shin, S. C., Kim, H. W., Kim, K. K., & Lee, J. H. (2023). Crystal structure and biochemical analysis of acetyltransferase (LgEstI) from *Lactococcus garvieae*. *PLoS ONE*, 18(2 February), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0280988>
- Dubey, S., Diep, D. B., Evensen, Ø., & Munang'andu, H. M. (2022). Garvicin KS, a Broad-spectrum bacteriocin protects zebrafish larvae against *Lactococcus garvieae* infection. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5), 1–12. <https://doi.org/10.3390/ijms23052833>
- Duc, H. M., Son, H. M., Honjoh, K., & Miyamoto, T. (2018). LWT - Food Science and Technology Isolation and application of bacteriophages to reduce *Salmonella* contamination in raw chicken meat. *LWT - Food Science and Technology*, 353–360. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.072>
- Duc, H. M., Son, H. M., Yi, H. P. S., Sato, J., Ngan, P. H., Masuda, Y., Honjoh, K. ichi, & Miyamoto, T. (2020). Isolation, characterization and application of a polyvalent phage capable of controlling *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 in different food matrices. *Food Research International*, 131, 108977. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.108977>
- Dünya Sağlık Örgütü (WHO). (2020). *Food safety*. Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization). <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>
- Endersen, L., & Coffey, A. (2020). The use of bacteriophages for food safety. *Current Opinion in Food Science*, 36, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.10.006>
- Eraclio, G., Fortina, M. G., Labrie, S. J., Tremblay, D. M., & Moineau, S. (2017). Characterization of prophages of *Lactococcus garvieae*. *Scientific Reports*, 7(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02038-y>
- Eraclio, G., Tremblay, D. M., Lacelle-Côté, A., Labrie, S. J., Fortina, M. G., & Moineau, S. (2015). A virulent phage infecting *Lactococcus garvieae*, with homology to *Lactococcus lactis* phages. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(24), 8358–8365. <https://doi.org/10.1128/AEM.02603-15>

- Evran, S., Tayyarcı, E. K., Soykut, E. A., & Boyacı, I. H. (2022). applications of bacteriophage cocktails to Reduce *Salmonella* contamination in poultry farms. *Food and Environmental Virology*, 14(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s12560-021-09501-0>
- Fung, F., Wang, H. S., & Menon, S. (2018). Food safety in the 21st century. *Biomedical Journal*, 41(2), 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2018.03.003>
- Garvie, E. I., Farrow, J. A. E., & Phillips, B. A. (1981). A taxonomic study of some strains of streptococci which grow at 10°C but not at 45°C including *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris*. *Zentralblatt Fur Bakteriologie. Allgemeine Angewandte Und Okologische Microbiologie Abt.1 Orig.C Hyg.*, 2(2), 151–165. [https://doi.org/10.1016/s0721-9571\(81\)80037-3](https://doi.org/10.1016/s0721-9571(81)80037-3)
- Ghasemi, S. M., Bouzari, M., & Emtiazi, G. (2014a). Preliminary characterization of *Lactococcus garvieae* bacteriophage isolated from wastewater as a potential agent for biological control of lactococcosis in aquaculture. *Aquaculture International*, 22(4), 1469–1480. <https://doi.org/10.1007/s10499-014-9760-z>
- Ghasemi, S. M., Bouzari, M., Shaykh Baygloo, N., & Chang, H. I. (2014b). Insights into new bacteriophages of *Lactococcus garvieae* belonging to the family Podoviridae. *Archives of Virology*, 159(11), 2909–2915. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2142-z>
- Ghasemi, S. M., Bouzari, M., Yoon, B. H., & Chang, H. I. (2014c). Comparative genomic analysis of *Lactococcus garvieae* phage WP-2, a new member of Picovirinae subfamily of Podoviridae. *Gene*, 551(2), 222–229. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.08.060>
- Gibello, A., Galán-Sánchez, F., Blanco, M. M., Rodríguez-Iglesias, M., Domínguez, L., & Fernández-Garayzábal, J. F. (2016). The zoonotic potential of *Lactococcus garvieae*: An overview on microbiology, epidemiology, virulence factors and relationship with its presence in foods. *Research in Veterinary Science*, 109, 59–70. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.09.010>
- Giri, N. (2021). Bacteriophage structure, classification, assembly and phage therapy. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 18(2), 239–250. <https://doi.org/10.13005/bbra/2911>
- Guo, Y., Li, J., Islam, M. S., Yan, T., Zhou, Y., Liang, L., Connerton, I. F., Deng, K., & Li, J. (2021). Application of a novel phage vB_SalS-LPSTLL for the biological control of *Salmonella* in foods. *Food Research International*, 147, 110492. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110492>
- Hall, B. G., Acar, H., Nandipati, A., & Barlow, M. (2014). Growth rates made easy. *Molecular Biology and Evolution*, 31(1), 232–238. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst187>
- Hatfull, G. F., & Hendrix, R. W. (2008). Bacteriophages and their Genomes. *Bone*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Hoai, T. D., & Yoshida, T. (2016). Induction and characterization of a lysogenic bacteriophage of *Lactococcus garvieae* isolated from marine fish species. *Journal of Fish Diseases*, 39(7), 799–808. <https://doi.org/10.1111/jfd.12410>
- Hoai, Truong Dinh, Nishiki, I., Fujiwara, A., Yoshida, T., & Nakai, T. (2019). Comparative genomic analysis of three lytic *Lactococcus garvieae* phages, novel phages with genome architecture linking the 936 phage species of *Lactococcus lactis*. *Marine Genomics*, 48(June), 100696. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2019.100696>
- Hoai, Truong Dinh, Nishiki, I., & Yoshida, T. (2016). Properties and genomic analysis of *Lactococcus garvieae* lysogenic bacteriophage PLgT-1, a new member of Siphoviridae, with homology to *Lactococcus lactis* phages. *Virus Research*, 222, 13–23. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.05.021>
- Huang, Y., Wang, W., Zhang, Z., Gu, Y., Huang, A., Wang, J., & Hao, H. (2022). Phage products for fighting antimicrobial resistance. *Microorganisms*, 10(7), 1–22.

- Hyman, P., & Abedon, S. T. (2009). Practical methods for determining phage growth parameters. In A. M. K. Martha R. J. Clokie (Ed.), *Bacteriophages: Methods and Protocols* (Issue pp. 175–202). Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6>
- Hyman, P., & Abedon, S. T. (2010). Chapter 7 - Bacteriophage Host Range and Bacterial Resistance. In *Advances in Applied Microbiology* (1st ed., Vol. 70, Issue 10). Elsevier Inc. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(10\)70007-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(10)70007-1)
- Kaiser, G. (2019). *Microbiology* (Community). LibreTexts.
- Kakasis, A., & Panitsa, G. (2019). Bacteriophage therapy as an alternative treatment for human infections . A comprehensive review. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 53(1), 16–21. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.09.004>
- Kurtoğlu, M., & Korun, J. (2018). Yavru Gökkuşuğu alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*, W.)’ndan *Lactococcus garvieae*’nin izolasyonu ve plazmit profilleri üzerine bir çalışma. *Journal of Advances in VetBio Science and Techniques*, 3(1), 11–22.
- Kutter, E., & Sulakvelidze, A. (2004). *Bacteriophages biology and applications* (E. Kutter & A. Sulakvelidze (eds.); CRC Press). Taylor & Francis Group, LLC.
- Lee, S., Kim, M. G., Lee, H. S., Heo, S., Kwon, M., & Kim, G. B. (2017). Isolation and characterization of listeria phages for control of growth of *Listeria monocytogenes* in milk. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 37(2), 320–328. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2017.37.2.320>
- Liao, X., Ma, Y., Daliri, E. B. M., Koseki, S., Wei, S., Liu, D., Ye, X., Chen, S., & Ding, T. (2020). Interplay of antibiotic resistance and food-associated stress tolerance in foodborne pathogens. *Trends in Food Science and Technology*, 95(November 2019), 97–106. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.11.006>
- Littman, E., Veek, T., Heckman, T. I., Shahin, K., Mukkatira, K., Adkison, M., Welch, T. J., Imai, D. M., Pastenkos, G., Soto, E., & Camus, A. (2022). Isolation and characterization of *Lactococcus garvieae* from rainbow trout , *Onchorhynchus mykiss* , from California , USA. *Transbound Emerging Diseases*, April 2021, 2326–2343. <https://doi.org/10.1111/tbed.14250>
- Liu, Y., Zhao, L., Wang, M., Wang, Q., Zhang, X., Han, Y., Wang, M., Jiang, T., Shao, H., Jiang, Y., & McMinn, A. (2019). Complete genomic sequence of bacteriophage P23: a novel *Vibrio* phage isolated from the Yellow Sea, China. *Virus Genes*, 55(6), 834–842. <https://doi.org/10.1007/s11262-019-01699-3>
- Malek, A., De la Hoz, A., Gomez-Villegas, S. I., Nowbakht, C., & Arias, C. A. (2019). *Lactococcus garvieae*, an unusual pathogen in infective endocarditis: case report and review of the literature. *BMC Infectious Diseases*, 301(19), 1–10. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s12879-019-3912-8>
- Nair, A., Ghugare, G. S., & Khairnar, K. (2022). An Appraisal of Bacteriophage Isolation Techniques from Environment. *Microbial Ecology*, 83(3), 519–535. <https://doi.org/10.1007/s00248-021-01782-z>
- Nakai, T., Sugimoto, R., Park, K., & Matsuoka, S. (1999). Protective effects of bacteriophage on experimental *Lactococcus garvieae* infection in yellowtail. *Diseases of Aquatic Organisms*, 37, 33–41.
- Nascimento, E. C. do, Sabino, M. C., Corguinha, L. da R., Targino, B. N., Lange, C. C., Pinto, C. L. de O., Pinto, P. de F., Vidigal, P. M. P., Sant’Ana, A. S., & Hungaro, H. M. (2022). Lytic bacteriophages UFJF_PfDIW6 and UFJF_PfSW6 prevent *Pseudomonas fluorescens* growth in vitro and the proteolytic-caused spoilage of raw milk during chilled storage. *Food Microbiology*, 101(August 2021), 0–7. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103892>

- Naveena, B., & Nagaraju, M. (2020). Review on principles, effects, advantages and disadvantages of high pressure processing of food. *International Journal of Chemical Studies*, 8(2), 2964–2967. <https://doi.org/10.22271/chemi.2020.v8.i2at.9202>
- Nikolich, M. P., & Filippov, A. A. (2020). Bacteriophage therapy : developments and directions. *Antibiotics*, 9(135), 1–13.
- Niu, Y. D., Liu, H., Du, H., Meng, R., Sayed Mahmoud, E., Wang, G., McAllister, T. A., & Stanford, K. (2021). Efficacy of individual bacteriophages does not predict efficacy of bacteriophage cocktails for control of *Escherichia coli* O157. *Frontiers in Microbiology*, 12, 616712. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.616712>
- Ortega, C., Irgang, R., Avendaño-Herrera, R., Valladares-Carranza, B., & Collarte, C. (2020). First identification and characterization of *Lactococcus garvieae* isolated from Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) cultured in Mexico. *Animals*, 10(1609), 1–15.
- Park, J., Kim, B., Song, S., Lee, Y. W., & Roh, E. (2022). Isolation of nine bacteriophages shown effective against *Erwinia amylovora* in Korea. *Plant Pathology Journal*, 38(3), 248–253. <https://doi.org/10.5423/PPJ.NT.11.2021.0172>
- Park, K. H., Matsuoka, S., Nakai, T., & Muroga, K. (1997). A virulent bacteriophage of *Lactococcus garvieae* (formerly *Enterococcus seriolicida*) isolated from yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 29, 145–149.
- Pérez-Rodríguez, F., & Mercanoglu Taban, B. (2019). A state-of-art review on multi-drug resistant pathogens in foods of animal origin: risk factors and mitigation strategies. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02091>
- Pietracha, D., & Misiewicz, A. (2016). Use of products containing a phage in food industry as a new method for *Listeria monocytogenes* elimination from food (*Listeria monocytogenes* phages in food industry) – a Review. *Czech Journal of Food Sciences*, 34(1), 1-8. <https://doi.org/10.17221/217/2015-CJFS>
- Radosavljević, V., Radanović, O., Zdravković, N., Savić, B., Stanković, M., Maksimović Zorić, J., Veljović, L., & Nešić, K. (2020). First outbreak of Lactococcosis caused by *Lactococcus garvieae* in Serbia. *Archives of Veterinary Medicine*, 13(1), 53–68. <https://doi.org/10.46784/e-avm.v13i1.78>
- Ramos-Vivas, J., Elexpuru-Zabaleta, M., Samano, M. L., Barrera, A. P., Forbes-Hernández, T. Y., Giampieri, F., & Battino, M. (2021). Phages and enzybiotics in food biopreservation. *Molecules*, 26(17), 1–24. <https://doi.org/10.3390/molecules26175138>
- Rao, S., Pham, T. H., Poudyal, S., Cheng, L.-W., Nazareth, S. C., Wang, P.-C., & Chen, S.-C. (2022). First report on genetic characterization , cell- - surface properties and pathogenicity of *Lactococcus garvieae* , emerging pathogen isolated from cage- - cultured cobia (*Rachycentron canadum*). *Transbound Emerg Diseases*, 69, 1197–1211. <https://doi.org/10.1111/tbed.14083>
- Saravanan, A., Kumar, P. S., Hemavathy, R. V., Jeevanantham, S., Kamalesh, R., Sneha, S., & Yaashikaa, P. R. (2021). Methods of detection of food-borne pathogens: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 19(1), 189–207. <https://doi.org/10.1007/s10311-020-01072-z>
- Schleifer, K. H., Kraus, J., Dvorak, C., Kilpper-Bälz, R., Collins, M. D., & Fischer, W. (1985). Transfer of *Streptococcus lactis* and related Streptococci to the Genus *Lactococcus* gen. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 6(2), 183–195. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(85\)80052-7](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(85)80052-7)
- Shahi, N., & Mallik, S. K. (2020a). Emerging bacterial fish pathogen *Lactococcus garvieae* RTCLI04, isolated from Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*): Genomic features and comparative genomics. *Microbial Pathogenesis*, 147, 104368. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104368>

- Shahi, N., & Mallik, S. K. (2020b). Emerging bacterial fish pathogen *Lactococcus garvieae* RTCLI04 , isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Genomic features and comparative genomics. *Microbial Pathogenesis*, 147(June), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104368>
- Shahin, K., Barazandeh, M., Zhang, L., Hedayatkah, A., He, T., Bao, H., Mansoorianfar, M., Pang, M., Wang, H., Wei, R., & Wang, R. (2021). Biodiversity of new lytic bacteriophages infecting *Shigella* spp. in freshwater environment. *Frontiers in Microbiology*, 12.<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.619323>
- Shang, Y., Sun, Q., Chen, H., Wu, Q., Chen, M., Yang, S., Du, M., Zha, F., Ye, Q., & Zhang, J. (2021). Isolation and Characterization of a novel *Salmonella* phage vB_SalP_TR2. *Frontiers in Microbiology*, 12, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.664810>
- Simmonds, P., Adams, M. J., Benk, M., Breitbart, M., Brister, J. R., Carstens, E. B., Davison, A. J., Delwart, E., Gorbalenya, A. E., Harrach, B., Hull, R., King, A. M. Q., Koonin, E. V., Krupovic, M., Kuhn, J. H., Lefkowitz, E. J., Nibert, M. L., Orton, R., Roossinck, M. J., ... Zerbini, F. M. (2017). Virus taxonomy in the age of metagenomics. *Nature Reviews Microbiology*, 15(3), 161–168. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.177>
- Smith, L., Goldobina, E., Govi, B., & Shkoporov, A. N. (2023). Bacteriophages of the order crassvirales: what do we currently know about this keystone component of the human gut virome? *Biomolecules*, 13(4). <https://doi.org/10.3390/biom13040584>
- Suárez, V. B., Quiberoni, A., Binetti, A. G. and Reinheimer, J. A. 2002. Thermophilic lactic acid bacteria phages isolated from Argentinian dairy industries. *J. Food Protection*, 65 (10), 1597-1604.
- Stone, E., Lhomet, A., Neve, H., Grant, I. R., Campbell, K., & McAuliffe, O. (2020). Isolation and Characterization of *Listeria monocytogenes* Phage vB_LmoH_P61, a Phage with biocontrol potential on different food matrices. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4(November), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.521645>
- Summers, W. C. (2012). The strange history of phage therapy. *Bacteriophage*, 2(2), 130–133. <https://doi.org/10.4161/bact.20757>
- Tawakol, M. M., Nabil, N. M., & Samy, A. (2019). Evaluation of bacteriophage efficacy in reducing the impact of single and mixed infections with *Escherichia coli* and infectious bronchitis in chickens. *Infection Ecology and Epidemiology*, 9(1). <https://doi.org/10.1080/20008686.2019.1686822>
- 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.
- Twort, F. W. (1915). An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *The Lancet*, 186(4814), 1241–1243. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)20383-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)20383-3)
- Vanamala, P., Sindhura, P., Sultana, U., Vasavilatha, T., & Gul, M. Z. (2022). Common bacterial pathogens in fish: An overview. In *Bacterial Fish Diseases* (pp. 279–306). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85624-9.00010-5>
- Vendrell, D., Balcázar, J. L., Ruiz-Zarzuela, I., de Blas, I., Gironés, O., & Múzquiz, J. L. (2006). *Lactococcus garvieae* in fish: A review. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 29(4), 177–198. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2006.06.003>
- Wang, Z., & Zhao, X. (2022). The application and research progress of bacteriophages in food safety. *Journal of Applied Microbiology*, 133(4), 2137–2147. <https://doi.org/10.1111/jam.15555>
- WHO. (2022). *WHO global strategy for food safety 2022–2030: towards stronger food safety systems and global cooperation*. World Health Organization.

- Witte, S., Huijboom, L., Klamert, S., van de Straat, L., Hagens, S., Fieseler, L., de Vegt, B. T., & van Mierlo, J. T. (2022). Application of bacteriophages EP75 and EP335 efficiently reduces viable cell counts of *Escherichia coli* O157 on beef and vegetables. *Food Microbiology*, 104, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.103978>
- Xie, X., Pan, Z., Yu, Y., Yu, L., Wu, F., Dong, J., Wang, T., & Li, L. (2023). Prevalence , virulence , and antibiotics gene profiles in *Lactococcus garvieae* isolated from cows with clinical mastitis in china. *Microorganisms*, 11(379), 1–20.
- Ye, M., Sun, M., Huang, D., Zhang, Z., Zhang, H., Zhang, S., Hu, F., Jiang, X., & Jiao, W. (2019). A review of bacteriophage therapy for pathogenic bacteria inactivation in the soil environment. *Environment International*, 129, 488–496. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.05.062>
- Zhang, R., Luo, Z., Belwal, T., Li, L., Lin, X., & Xu, Y. (2020). Nanomaterial-based biosensors for sensing key foodborne pathogens : advances from recent decades. *Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety*, 19, 1465–1487. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12576>
- Zhao, X., Li, M., & Xu, Z. (2018). Detection of foodborne pathogens by surface enhanced raman spectroscopy. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01236>
- Zhou, Y., & Ramasamy, R. P. (2019). Isolation and separation of *Listeria monocytogenes* using bacteriophage P100-modified magnetic particles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 175, 421–427. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.12.007>