

T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Paenibacillus dendritiformis İZOLATLARINDA
BAKTERİYOFAJ/BAKTERİYOSİN VARLIĞININ VE KONAK
GENİŞLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

MERVE KARALI

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. ŞENGÜL ALPAY KARAOĞLU

TEZ JÜRİLERİ

PROF. DR. İLKNUR TOSUN

DR. ÖĞR. ÜYESİ YEŞİM AKTÜRK DİZMAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

RİZE-2019

Her Hakkı Saklıdır

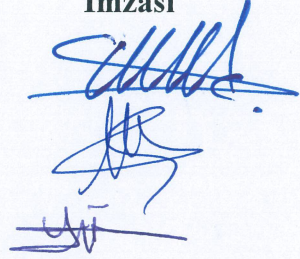
T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Paenibacillus dendritiformis İZOLATLARINDA
BAKTERİYOFAJ/BAKTERİYOSİN VARLIĞININ VE KONAK GENİŞLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI

Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU danışmanlığında Merve KARALI tarafından hazırlanan bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla oluşturulan jüri tarafından 19/07/2019 tarihinde Biyoloji Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS** tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	Unvanı Adı Soyadı
Başkan	: Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU
Üye	: Prof. Dr. İlknur TOSUN
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Yeşim AKTÜRK DİZMAN

İmzası




Doç. Dr. Ferhat KALAYCI
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

ÖNSÖZ

Amerikan Yavru Çürüklüğü etkeni *P. larvae* suşlarının izolasyon çalışması sırasında izole edilen *Paenibacillus dendritiformis* suşları kullanılarak, bakteriyofaj/ bakteriyosin varlığının araştırılması ve konak genişliğinin belirlenmesinin amaçlandığı bu çalışma, Recep Tayip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı'nda "Yüksek Lisans Tezi" olarak hazırlanmıştır.

Yaptığım çalışmanın her aşamasında destek, bilgi ve birikimlerini benden esirgemeyen çok değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her aşamasında, verdiğim kararlarda desteklerini her zaman arkamda hissettiğim maddi ve manevi olarak yanımda olan, bugünlere gelmemde en büyük paya sahip canım aileme ve gülücükleriyle, neşesiyle beni motive eden yeğenlerim Ediz Burak ve Eliz Şura'ya sonsuz teşekkürler.

Merve KARALI

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Tarafımdan hazırlanan “*Paenibacillus dendritiformis* İzolatlarında Bakteriyofaj/ Bakteriyosin Varlığının ve Konak Genişliğinin Araştırılması” başlıklı bu tezin, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesindeki hususlara uygun olarak hazırladığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal işlemi kabul ettiğimi beyan ederim. 19/07/2019


Merve KARALI

Uyarı: Bu tezde kullanılan özgün ve/veya başka kaynaklardan sunulan içeriğin kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

***Paenibacillus dendritiformis* İZOLATLARINDA BAKTERİYOFAJ/BAKTERİYOSİN VARLIĞININ VE KONAK GENİŞLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Merve KARALI

**Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi
Danışmanı: Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU**

Paenibacillus dendritiformis sporlu basiller grubunda yer alan, taze kültürleri Gram pozitif boyanan, vejetatif hücreleri düz, kenarları birbirine paralel, ucu yuvarlak veya künt biten, çoğunlukla subterminal şişkin spor içeren basillerdir. Kontamine ortamlarla temas eden arıların mikrobiyotasından izole edilen türler arasında yer almaktadır. Çalışmamızda da Amerikan Yavru Çürüklüğü etkeni *P. larvae* suşlarının izolasyon çalışması 17 adet *P. dendritiformis* izole ve identifiye edildi. *P. dendritiformis*'in bakteriyofaj/bakteriyosin/antimikrobiyal aktivite varlığın ve konak genişliğinin belirlenmesi amaçlandı. *Paenibacillus* cinsine ait yaklaşık 139 adet tür bilinmekte ve bunların içinde biyokontrol, böcek öldürücü (entomopatojen) ve antimikrobiyal etkinliği olan türlerin varlığı bilinmekte olup *P. dendritiformis*'in benzer özelliğinin varlığı araştırıldı. Çalışmamızda biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle tanımlanmış toplam 17 *P. dendritiformis* suşunun Mitomisin C ile faj indüksiyonu yapıldı. İndüklenen suşlardan elde edilen lizatlar arı florasından izole edilen saprofit (*P. dendritiformis* ve *Bacillus sp.*) ve patojen (*P. larvae*) türlerinden oluşan toplam 60 farklı izolata karşı çapraz damlatma metodu ile test edildi. Test edilen *P. dendritiformis* suşlarının 13'ünde bakteriyofaj varlığı belirlendi. Belirlenen fajların en az bir en fazla beş farklı test edilen konağı enfekte edebildiği gözlemlendi. Bakteriyofaj PB22f'nin elektron mikroskobu ile yapılan incelemesinde uzun kuyruklu kasılamayan B tipi faj olduğu belirlendi. *P. dendritiformis* suşlarının faj varlığı, konak genişliği ya da bakteriyosin/antimikrobiyal aktivite içeriğinin belirlenmesi, özellikle arı hastalıklarının tedavisinde potansiyel biyokontrol ajanı olarak kullanılabilirliğinin ortaya konması açısından önemli olduğu düşünülmektedir.

2019, 49 sayfa

Anahtar Kelimeler: Bakteriyofaj, Bakteriyosin, *Paenibacillus dendritiformis*.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF BACTERIOPHAGE / BACTERIOCIN PRESENCE AND HOST WIDTH IN *Paenibacillus dendritiformis* ISOLATES

Merve KARALI

Recep Tayyip Erdoğan University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology
Master Thesis
Supervisor: Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU

Paenibacillus dendritiformis is a bacillus in the spores of the spores, freshly culture Gram positive stained, vegetative cells are flat, the edges are parallel to each other, the ends are round or blunt ends, mostly containing subterminal bulging spores. They are among the species isolated from the microbiota of bees that come into contact with contaminated environments. In our study, isolation of *P. larvae* strains caused by American foulbrood was isolated and identified in 17 *P. dendritiformis* strains. The aim of this study was to determine the presence of bacteriophage / bacteriocin / antimicrobial activity and host width of *P. dendritiformis*. Approximately 139 species of the genus *Paenibacillus* are known and the presence of species with biocontrol, insecticidal (antemicrobial) and antimicrobial activity is known and the similarity of *P. dendritiformis* was investigated. In our study, phage induction was performed with Mitomycin C of 17 *P. dendritiformis* strains identified by biochemical and molecular methods. The lysates from the induced strains were tested by cross dropping method against a total of 60 different isolates of saprophyte (*P. dendritiformis* and *Bacillus sp.*) And pathogen (*P. larvae*) strains isolated from bee flora. Bacteriophage was detected in 13 of *P. dendritiformis* strains tested. It was observed that the identified phages could infect at least one up to five different tested hosts. Bacteriophage PB22f was examined by electron microscopy and it was found that B type phage was not long tailed. The presence of phage, host width or bacteriocin / antimicrobial activity content of *P. dendritiformis* strains is thought to be important in terms of demonstrating their usefulness as a potential biocontrol agent in the treatment of bee diseases.

2019, 49 pages

Keywords: Bacteriophage, Bacteriocin, *Paenibacillus dendritiformis*.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	I
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	II
ÖZET	III
ABSTRACT	IV
İÇİNDEKİLER	V
SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	IX
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş.....	1
1.1.1. <i>Paenibacillus</i> 'un Genel Özellikleri	2
1.1.2. Bakteriyofajlar	7
1.2. Literatür.....	17
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	20
2.1. Materyal	20
2.1.1. Kullanılan Araç, Gereç ve Sarf Malzemeler	20
2.1.2. Çalışmada Kullanılan Bakteri Türleri	20
2.1.3. Kullanılan Besiyerleri	21
2.1.4. Kullanılan Solüsyonlar.....	22
2.2. Metod	23
2.2.1. <i>Paenibacillus dendritiformis</i> 'in Canlandırılması.....	23
2.2.2. Bakteriyofaj İndüksiyonu.....	23
2.2.3. Litik Faj Enfeksiyonunun Yapılması	24
2.2.4. Fajların Çoğaltılması, Saflaştırılması ve Stoklanması	25
2.2.5. Bakteriyofaj Stoklarının Hazırlanması ve Yoğunlaştırılması	26
2.2.6. Fajların Morfolojik Karakterizasyonu	27
3. BULGULAR.....	28
4. TARTIŞMA ve SONUÇLAR	37
5. ÖNERİLER.....	41

KAYNAKLAR.....	42
ÖZGEÇMİŞ	49



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	Sporlu basillerin gram boyama görünümüleri.....	2
Şekil 2.	<i>P. dendritiformis</i> koloni tipleri.....	6
Şekil 3.	Kuyruklu bakteriyofajın 2 ve 3 boyutlu yapısı.....	8
Şekil 4.	Bakteriyofaj familyaları.....	10
Şekil 5.	Fajın bakterideki litik ve lizojenik döngüsü	11
Şekil 6.	MYPGP agar besiyerinde <i>P. dendritiformis</i> ’in az hareketli, krem (PB22f ve PB13.2) ve güçlü hareketli, turuncu (PB30a) renkli koloni morfolojisi görünümü.....	29
Şekil 7.	<i>P. dendritiformis</i> ’in (PB22f) Gram boyama görüntüsü ($\geq 100X$)	29
Şekil 8.	<i>P. dendritiformis</i> suşlarının filogenetik yakınlığı	31
Şekil 9.	<i>P. dentriiformis</i> suşlarının Mitomisin C ile indüklendikten sonra konak hücrenin lizisinden görünümüleri.....	32
Şekil 10.	Çapraz enfeksiyon sonucunda MYPGP plaklarında damlatılan lizatlarındaki faj plaklarının görünümü	34
Şekil 11.	<i>P. dendritiformis</i> (PB22f) suşundan izole edilen kasılamaz uzun kuyruklu Φ PB22f’in TEM görüntüsü.....	36

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1.	<i>Paenibacillus</i> 'un genel türleri	4
Tablo 2.	Biyokontrol,antimikrobiyal ve entomopatojen özelliğine sahip bazı <i>Paenibacillus</i> türleri	5
Tablo 3.	Bradley'e göre tiplendirme.....	9
Tablo 4.	Kullanılan <i>P. dendritiformis</i> 'lerin izole edildiği yerler, örnek türleri ve numaraları	21
Tablo 5.	Bakteriyofaj/bakteriyosin varlığı araştırılan <i>P. dendritiformis</i> suşları ve numaraları	28
Tablo 6.	Çalışmada izole edilen izolatların morfolojik ve biyokimyasal özellikleri	30
Tablo 7.	<i>Paenibacillus dendritiformis</i> suşlarının mid-log süresi ve liz saati	32
Tablo 8.	Bakteriyofaj/bakteriyosin/antimikrobiyal aktivite gözlenen <i>P. dendritiformis</i> suşları ve konakları	33
Tablo 9.	Bakteriyofaj belirlenen <i>P. dendritiformis</i> suşlarına ait bakteriyofajların konak spektrumları.....	35

SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

°C	Santigrat Derece
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
AYÇ	Amerikan Yavru Çürüklüğü
P	Paenibacillus
RNA	Ribonükleik asit
Mit-C	Mitomisin C
Cm	Santimetre
CO ₂	Karbondioksit
dH ₂ O	Distile Su
Mo _i	Multiplicity of Infection
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EtOH	Etil Alkol
G	Gram
Kg	Kilogram
Ml	Mililitre
Mm	Milimetre
Rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
Sn	Saniye
Vb	Ve benzeri
vd.	Ve diğerleri
Dk	Dakika
NaCl	Sodyum Klorür
OD	Optik Dansite
PEG	Polietilen Glikol
SM	Suspension Medium
TE	Tris EDTA
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu
Φ	Bakteriyofaj
UV	Ultraviyole

mRNA	Mesajcı RNA
EM	Elektron Mikroskobu
MYPGP	Mueller-Hinton Broth, Maya Özü, Sodyum Pirüvat, Glukoz
KOH	Potasyum Hidroksit
NaOH	Sodyum Hidroksit



1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Bakteriyofajlar veya fajlar bakterileri enfekte eden virüslerdir, litik bakteriyofajlar bakteriyel metabolizmaya hasar verir ve bakterinin lizisine neden olurlar (Abhilash vd., 2008). Yeryüzünde 10^{32} kadar faj olduğu ancak bugüne kadar bunlardan yaklaşık 6000 kadarının karakterize edildiği bildirilmiştir (Ackermann, 2011). Bu veriler çalışmaların çok yetersiz olduğunu ve milyonlarca fajın izole edilerek tanımlanmayı beklediğini göstermektedir.

Bakteriyofajların antimikrobiyal ajan olarak kullanımı, 1928'de Alexander Fleming'in bakterilerin çoğalmasını engelleyen penisilini bulmasıyla Batı dünyası için önemini yitirmiş ve patojen bakterilere karşı antibiyotik çağı başlamıştır (Nobrega vd., 2015). Patojen bakterilerin antibiyotiklere karşı direnç kazanması ve bu durum karşısında yeni geliştirilen antibiyotiklerin de yetersiz kalması, bilim insanlarını patojen bakterilere karşı yeni yöntemler geliştirmeye yönlendirmektedir (Tsonos vd., 2014). Son zamanlarda faj terapisi olarak bilinen tedavi yöntemi yaygınlaşmaktadır. Buna paralel olarak da faj çalışmaları ile ilgili araştırmalar artmaktadır (Sulakvelidze vd., 2001).

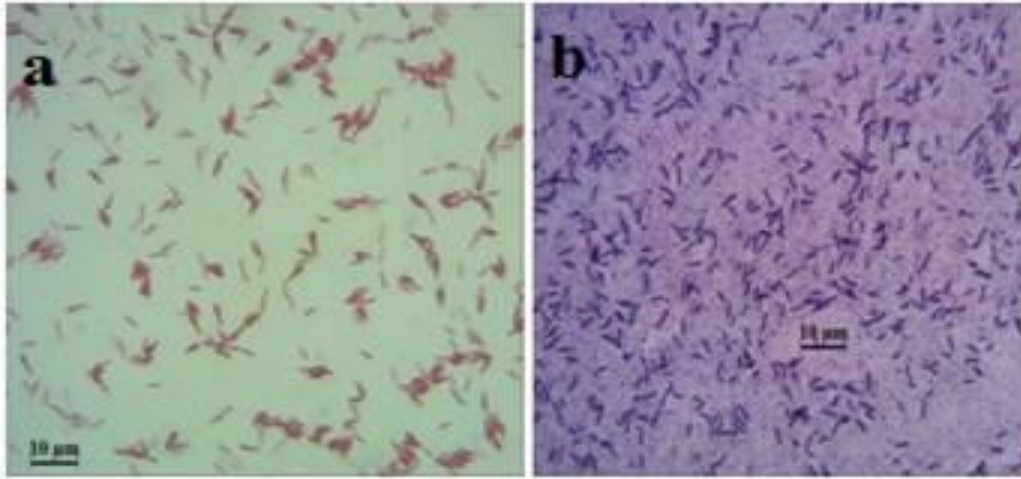
Bu çalışmada Amerikan Yavru Çürüklüğü şüpheli arı ve arı ürünlerinden izole edilen toplam 17 *Paenibacillus dendritiformis* türünün bakteriyofaj taşıyıcılığı, bakteriyosin veya antimikrobiyal aktivite içeriğinin araştırılması, belirlenen bakteriyofajların da konak genişliğinin belirlenmesi hedeflendi.

1.1.1. *Paenibacillus*'un Genel Özellikleri

Paenibacillus 'un taksonomideki sınıflandırılması aşağıda yer almaktadır;

Alem	: Bacteria
Şube	: Firmicutes
Sınıf	: Bacilli
Takım	: Bacillales
Aile	: Paenibacillaceae
Cins	: <i>Paenibacillus</i>

Paenibacillaceae ailesi, endospor oluşturan bakteriler içerisinde yer almakta olup, endosporları silindirik, oval, yuvarlak veya böbrek şeklinde olabilmektedir. Gram pozitif, fakültatif anaerob, sporları türlere göre çeşitli konumda bulunabilir (santral, terminal veya subterminal) (Şekil 1). *Bacillus* cinsi içinde yer almasına rağmen daha sonra bu gruptan ayrılmıştır (Ash vd., 1993).



Şekil 1. Sporlu basillerin gram boyama görünüşleri.
a) Terminal sporlar, b) Subterminal sporlar

Paenibacillus türleri (spor ve sporangium) morfoloji tiplerine göre üç gruba ayrılmıştır. Sporangium sporlar elipsoidal veya silindirik olup düzgündür. Merkezde bazen terminalde bulunup gram pozitif boyanırlar. Sporangium gram boyanma özelliği değişken olup şişmiştir, sporlar elipsoidal olup merkezi veya terminaldir. Sporangium

şışmış olup, sporlar yuvarlak, subterminal veya terminal, gram boyama ise değişken özelliktedir (Pınarbaş, 2017).

Bacillus ve *Paenibacillus*'u diğer cinslerden ayıran en temel karakteristik özellik ise basit kültür ortamında (Nutrient katı veya sıvı besiyeri) gelişim gösterememesidir. *Paenibacillus* türlerinin kültürü, içeriğinde Mueller-Hinton, Maya Özü, K_2HPO_4 , Sodyum Pirüvat, Glukoz gibi içerikçe zenginleştirilmiş olan MYPGP besiyerlerinde yapılmaktadır (Pınarbaş, 2017).

Paenibacillus türlerinin MYPGP'de ekilmiş olan taze kültürleri gram boyama sonucu pozitif boyanır. Gram boyama sonucu mikroskopta görünen vejetatif formları düz, kenarları birbirine paralel, ucu yuvarlak veya künt biten 0.5-1.2 μm eninde 2-10 μm boyunda basiller olup, tek tek veya uzun zincirler şeklinde görülmektedir (Pınarbaş, 2017).

Fizyolojik büyüme karakterlerinin sınırları geniş olmakla beraber, mezofilik olarak büyüeyebilen cinsleri daha fazladır. Çoğunlukla yapılan katalaz testi pozitif sonuç verir (Pınarbaş, 2017).

Bu bakterilerden literatürde şimdiye kadar yaklaşık 139 tür (Tablo 1) tanımlanmıştır (URL-1; URL-2).

Bu bakterilerin bazıları gruplandırıldığında biyokontrol, patojen veya böcek öldürücü (entomopatojen) ile antimikrobiyal etkinliğe sahip türlerine rastlanabilmektedir (Tablo 2).

Tablo 1. *Paenibacillus* 'un genel türleri (URL-1; URL-2).

Tür adları (N:139)			
<i>P. aestuarii</i>	<i>P. elgii</i>	<i>P. macquariensis</i>	<i>P. septentrionalis</i>
<i>P. agarixedens</i>	<i>P. edaphicus</i>	<i>P. macerans</i>	<i>P. siamensis</i>
<i>P. alvei</i>	<i>P. ehimensis</i>	<i>P. massiliensis</i>	<i>P. sputi</i>
<i>P. agaridevorans</i>	<i>P. favisporus</i>	<i>P. mendelii</i>	<i>P. soli</i>
<i>P. amyloliticus</i>	<i>P. filicis</i>	<i>P. montaniterrae</i>	<i>P. sediminis</i>
<i>P. anaericanus</i>	<i>P. frigoriesistens</i>	<i>P. mucilaginosus</i>	<i>P. sepulcri</i>
<i>P. antarcticus</i>	<i>P. forsythiae</i>	<i>P. motobuensis</i>	<i>P. sacheonensis</i>
<i>P. apiarius</i>	<i>P. fonticol</i>	<i>P. nanensis</i>	<i>P. sabinae</i>
<i>P. assamensis</i>	<i>P. glucanolyticus</i>	<i>P. naphthalenovorans</i>	<i>P. sonchi</i>
<i>P. azoreducens</i>	<i>P. graminis</i>	<i>P. nematophilus</i>	<i>P. sophorae</i>
<i>P. algorifonticola</i>	<i>P. granivorans</i>	<i>P. odorifer</i>	<i>P. stellifer</i>
<i>P. azotofixans</i>	<i>P. ginsengarvi</i>	<i>P. oceanisediminis</i>	<i>P. terrae</i>
<i>P. barcinonensis</i>	<i>P. gansuensis</i>	<i>P. pabuli</i>	<i>P. timonensis</i>
<i>P. barengoltzii</i>	<i>P. glycanilyticus</i>	<i>P. panacisoli</i>	<i>P. thailandensis</i>
<i>P. borealis</i>	<i>P. glabratella</i>	<i>P. pasadenensis</i>	<i>P. thiaminolyticus</i>
<i>P. brasiliensis</i>	<i>P. glacialis</i>	<i>P. pectinilyticus</i>	<i>P. turicensis</i>
<i>P. castaneae</i>	<i>P. ginsengi</i>	<i>P. peoriae</i>	<i>P. tarimensis</i>
<i>P. cellulositrophicus</i>	<i>P. harenae</i>	<i>P. phyllosphaerae</i>	<i>P. tianmuensis</i>
<i>P. chibensis</i>	<i>P. hodogayensis</i>	<i>P. polymyxa</i>	<i>P. terrigena</i>
<i>P. chinjuensis</i>	<i>P. hunanensis</i>	<i>P. popilliae</i>	<i>P. taichungensis</i>
<i>P. chondroitinus</i>	<i>P. hordei</i>	<i>P. prosopidis</i>	<i>P. thermophilus</i>
<i>P. cineris</i>	<i>P. humicus</i>	<i>P. provencensis</i>	<i>P. telluris</i>
<i>P. contaminans</i>	<i>P. jamilae</i>	<i>P. pinihumi</i>	<i>P. taiwanensis</i>
<i>P. cookii</i>	<i>P. jilunlii</i>	<i>P. pini</i>	<i>P. typhae</i>
<i>P. chartarius</i>	<i>P. illinoisensis</i>	<i>P. pueri</i>	<i>P. tundrae</i>
<i>P. chungangensis</i>	<i>P. konsidensis</i>	<i>P. pocheonensis</i>	<i>P. urinalis</i>
<i>P. campinasensis</i>	<i>P. koreensis</i>	<i>P. purispatii</i>	<i>P. uliginis</i>
<i>P. cellulosityticus</i>	<i>P. kribbensis</i>	<i>P. phoenicis</i>	<i>P. validus</i>
<i>P. catalpae</i>	<i>P. koleovorans</i>	<i>P. prosopid</i>	<i>P. vortex</i>
<i>P. chitinolyticus</i>	<i>P. kobensis</i>	<i>P. puldeungensis</i>	<i>P. zanthoxyli</i>
<i>P. camelliae</i>	<i>P. lactis</i>	<i>P. residui</i>	<i>P. xylanisolvans</i>
<i>P. curdlanolyticus</i>	<i>P. larvae</i>	<i>P. riograndensis</i>	<i>P. xinjiangensis</i>
<i>P. daejeonensis</i>	<i>P. larvaesubsp.pulvificiens</i>	<i>P. rigui</i>	<i>P. xylanexedens</i>
<i>P. dendritiformis</i>	<i>P. lautus</i>	<i>P. rhizosphaerae</i>	<i>P. wynnii</i>
<i>P. durus</i>	<i>P. lentimorbus</i>	<i>P. sanguinis</i>	

Tablo 2. Biyokontrol, antimikrobiyal ve entomopatojen özelliğine sahip bazı *Paenibacillus* türleri (URL-1; URL-2).

Biyokontrol	Antimikrobiyal	Entomopatojen
<i>P. alvei</i>	<i>P. curdlanolyticus</i>	<i>P. lentimorbus</i>
<i>P. macerans</i>	<i>P. ehimensis</i>	<i>P. popilliae</i>
<i>P. ehimensis</i>	<i>P. humicus</i>	<i>P. larvae</i>
<i>P. kobensis</i>	<i>P. polymyxa</i>	<i>P. alvei</i>
<i>P. peoriae</i>	<i>P. alvei</i>	<i>P. nematophilus</i>
<i>P. polymyxa</i>	<i>P. elgii</i>	<i>P. polymyxa</i>
<i>P. dendritiformis</i>	<i>P. glycanilyticus</i>	<i>P. apiarius</i>
<i>P. brasiliensis</i>	<i>P. kobensis</i>	
<i>P. elgii</i>	<i>P. thiaminolyticus</i>	
<i>P. lentimorbus</i>		
<i>P. thiaminolyticus</i>		

1.1.1.1. *Paenibacillus dendritiformis*'in İzolasyonu ve Tanımlanması

Taksonomide şu şekilde yer almaktadır;

Alem	: Bakteri
Şube	: Firmicutes
Sınıf	: Bacilli
Takım	: Bacillales
Aile	: Paenibacillaceae
Cins	: <i>Paenibacillus</i>
Tür	: <i>Paenibacillus dendritiformis</i> (Tcherpakov vd., 1999)

Toprakta yaşayan, spor oluşturan bir mikroorganizmadır. Endosporlar elipsoidal, yuvarlak veya silindirik sporlar şeklinde gözlemlenir (Sirota vd., 2012).

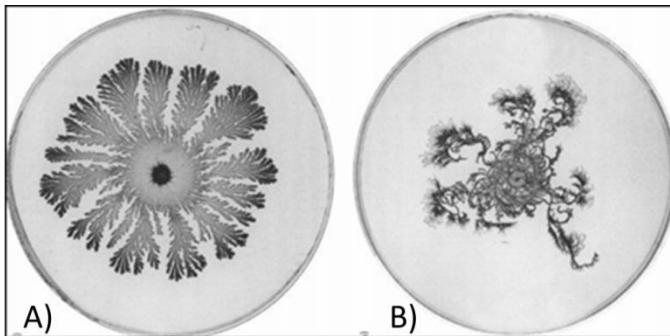
Bakterilerin mikroskopideki morfolojik özellikleri gram pozitif, hareketli (peritriş flagella tarafından), çubuk şeklinde basillerdir (URL-3). Fakültatif anaerobiktir. Bu cinse ait bakterilerin klinik örneklerden, toprak rizosferinden, böcek

larvaları gibi çeşitli ortamlardan izole edildiği bildirilmiştir (Lal ve Tabacchioni, 2009; McSpadden, 2004; Ouyang vd.,2008).

1.1.1.2. İzole edilen *Paenibacillus dendritiformis*'in Kültürel Özellikleri

Katı besiyerinde (MYPGP), kültürel karakterizasyonu; küçük, 1-2 mm çapında krem, açık sarı, R-tipi koloniler oluştururlar. Suşların çoğunluğu peritriş kirpikli olup petriye yayılmıştır. Bazı suşları MYPGP besiyerinde turuncu koloni oluşturur (Pınarbaş, 2017). Sıvı ortamda (MYPGPB) ise sadece dipte ya da sadece yüzeyde üreme veya her tarafta homojen üreyebilir.

Pepton içeren agar plakları üzerindeki kiral (C) morfoloji ve dallanma (T) morfoloji oluştururlar (Şekil 2). Bakteri bu morfolojiler arasında geçiş yapabilme kabiliyetiyle kendini gösterir. T morfoloji: Pepton agar plakları üzerinde dallı, uçları bölünen, ince koloni morfolojisine (kompleks simetrik uç bölme) sahiptirler, bakterileri 0.5-1.0 x 2.0-3.0 µm boyutundadırlar (Sirota vd., 2012). C morfoloji: Belirgin kıvrılma düzenlerine sahip, ince dallar sergileyen kiral morfolojisine sahiptirler, bakterileri 1.0-1.5 x 4.0-6.0 µm boyutlarındadır (Sirota vd., 2012; Tcherpakov vd.,1999).



Şekil 2. *P. dendritiformis* koloni tipleri. A) T-tipi , B) C-tipi

1.1.1.3. *Paenibacillus dendritiformis*'in Biyokimyasal Özellikleri

Mikroorganizmalarda biyokimyasal özelliklerin belirlenmesi, türlerin geleneksel tanımlanmasında yaygın kullanılan bir methodur. Bakterinin optimum büyüme koşulları; 37°C sıcaklık, pH 5.0 ve % 2-5'lik NaCl ortamıdır (URL-3).

Biyokimyasal testlerde pozitif sonuç verenler; katalaz, oksidaz, üre hidrolizi, nişastanın hidrolizi, kazein hidrolizi, indol üretimi, asit üretimi, selobiyoz, D-glikoz, manoz, sükroz ve trehaloz kullanımıdır. Negatif sonuç veren testler ise; sitrat kullanımı, nitrat indirgenmesi, dihidroksiaseton üretimi, tirosinin bozunması, Tween80'in hidrolizi, Voges-Proskauer'da asit üretimi: L-arabinoz, D-fruktoz, laktoz, D-mannitol ve D-ksiloz kullanımıdır. Patojenite özellikleri ise belirsizdir (URL-3).

1.1.2. Bakteriyofajlar

Bakteriyofajlar, yalnızca konak bakteri hücresinde üreyebilen, bakteri hücresi içinde veya ortamda serbest olarak bulunabilen, ışık mikroskobu ile görülemeyip ancak geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile görüntülenebilen bakteri virüsleridir (Bradley, 1967). İlk olarak, 1915 yılında İngiltere'de Twort tarafından yapılan çalışmada, bakteri geçemeyen filtrelerden geçebilen, konak dışında otonom olarak çoğalamayan, 60°C sıcaklıkta bir saat ısıtıldığında inaktive olan mikroorganizmaları yok edebilen bir etkenin varlığını keşfetmiştir (Joklik vd., 1992). “Bakteri yiyen” anlamına gelen bakteriyofaj terimi, ilk olarak Fransa'da, 1917'de D'Herelle tarafından kullanılarak kısaca faj veya bakteri virüsü olarak adlandırıldı (Akan, 1994). 1930'larda ise, Burnet ve Shlesinger yaptıkları çalışmalarla bakteriyofajlarla ilgili bilgileri ileri boyutlara taşımışlardır (Joklik vd., 1992). Bakteriyofaj biyolojisi üzerine ilk çalışmalar 1940-1950 yılları arasında Delbrück, Luria, Hershey ve diğer bilim adamları grupları tarafından yapılmış ve *Escherichia coli*'de belirlenen benzer özellikteki bakteriyofajlar, T1-T7 şeklinde numaralandırılmıştır (Conrat vd., 1988).

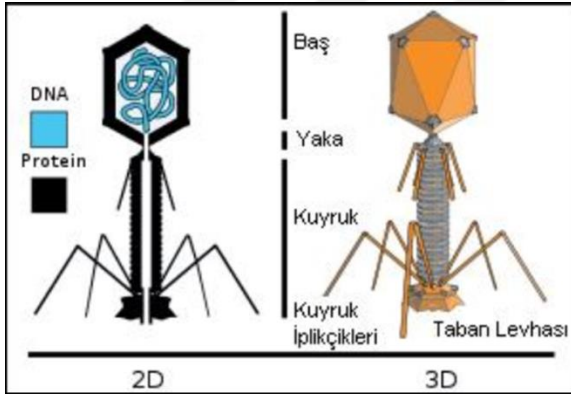
1.1.2.1. Fajların Yapısı

Kuyruklu fajlar yapısında baş, kuyruk kısmı, kuyruk fibrilleri ve tutunma levhası gibi yapısal elemanları ihtiva eder. Baş kısmı, nükleik asit ve onun etrafını çevreleyen kapsid olarak isimlendirilen protein bir kılıfla çevrilir. Kapsid yapısı, polipeptit tekrarlarından ve kapsomer adı verilen protein alt birimlerinden oluşur. Kapsomerlerin sayısı, şekli, büyüklüğü ve diziliş düzenlerindeki farklılık bakteriyofajın tipine bağlıdır. Kuyruk yapısı bakteriyofaj tiplerine göre farklılıklar gösterir (Kılıç vd., 1996).

Bakteriyofajların ebatları ve şekilleri farklıdır. 1959 yılından beri 5100 faj, elektron mikroskop ile araştırılmış, çoğunun büyüklüğü 24-200 nm arasında olduğu bildirilmiştir. Fajların birçoğu zarfsız olduğu halde, zarflı yapıdaki fajlara da rastlanmaktadır (Karasartova, 2009).

Bakteriyofajların içerisindeki nükleik asit, çift zincirli DNA, tek zincirli DNA, çift zincirli RNA veya tek zincirli RNA şeklinde görülmektedir. Kuyruk ile ilgili oluşumlar ise, protein yapıdan oluşur. Ancak bunlar kapsid proteinlerinden farklı olarak antijenik yapılarında farklı özelliklere sahiptirler (Akman, 1977).

Fajlar kuyruklu, polihedral, filamentöz ve pleomorfik yapıda görülebilmektedir. Bunların %96'sının kuyruklu yapıda olduğu, %4'ünün ise filamentöz, polihedral ve pleomorfik yapıda olduğu görülmüştür (Karasartova, 2009). Şekil 3'te kuyruklu bir bakteriyofajın 2 ve 3 boyutlu görüntüsü verilmiştir (URL-4).



Şekil 3. Kuyruklu bakteriyofajın 2 ve 3 boyutlu yapısı (URL-4).

Bakteriyofajların ilk fiziksel ve kimyasal araştırmaları 1960'lı yıllarında başlamıştır. Bu araştırmalarda, T bakteriyofajlarından fayda sağlanmış ve çok yakın benzerlik gösterenler T2, T4, T6 ve T-Even bakteriyofajları olarak adlandırılmıştır. Ayrıca, lizojenik özelliğe sahip lambda bakteriyofajının bulunması ile çalışmalar daha da hız kazanmıştır (Conrat vd., 1988).

Faj sınıflandırmasının öncülerinden biri olan Avustralya'lı virolog Macfarlane Burnet 1937 yılında fajların farklı büyüklükte ve fizikokimyasal ajanlara karşı direnç farklılıklarına sahip olduklarını göstermiştir. Faj taksonomi çalışmalarının uluslararası

yürütülmesini sağlamak için “Provisional Committee on Nomenclature of Viruses” 1965 yılında kuruldu ve daha sonra ismi “International Committee on Taxonomy of Viruses” (ICTV) olarak değiştirildi. Faj sınıflandırmasında Bradley (1967) tarafından yapılan çalışmalar ICTV komitesi tarafından kabul edildi. Bradley fajları A’dan F’ye, altı temel morfolojik tip olarak sınıflandırdı (Tablo 3) ve her tipin nükleik asit içeriklerini belirledi (Fauquet vd., 2005). Morfotip A ile B'nin diğer morfotiplere göre daha sık bulunduğu belirtilmiştir (Joklik vd., 1984).

Bu sınıflandırmada, T-even bakteriyofajları; grup A, T1 ile T5 bakteriyofajları; grup B, T3 ile T7 bakteriyofajları; grup C, kuyuksuz bakteriyofajlar baş büyüklüğüne göre grup D ile grup E ve iplikli bakteriyofajlar ise grup F içinde araştırılmıştır (Joklik vd., 1984).

Tablo 3. Bradley’e göre tiplendirme (Bradley,1967).

Tip	Fajın morfolojik özelliği	Nükleik asit	Örnek
A	Polihedral baş, kasılabilen kuyruklu	dsDNA, lineer	T2, T4, T6
B	Polihedral baş, uzun ve kasılamayan kuyruklu	dsDNA, lineer	T1, T5, λ
C	Polihedral baş, kısa ve kasılamayan kuyruklu	dsDNA, lineer	T3, T7, P22
D	İkozahedral baş, kuyuksuz, büyük kapsomerli	ssDNA, sirküler	Φ X174, S13
E	İkozahedral baş, kuyuksuz, küçük kapsomerli	ssRNA, lineer	F2R17 Fr, MS2
F	Başsız , iplikli filamantöz	ssRNA, lineer	FE, fd, M13

Ackermann (1987)’in sınıflandırmasında ise bakteriyofaj büyüklükleri, şekilleri, kuyruk yapıları, zarf içerikleri yönünden ve EM'deki görüntüleri ele alınarak bir dizi familyalar (Şekil 4) belirlenmiştir.

Zarfsız				Zarflı	
dsDNA				dsDNA	
Myoviridae Isometric head (P2)	Myoviridae Elongated head (T2)	Siphoviridae (λ)	Podoviridae (T7)	Corticoviridae (PM2)	Tectiviridae (PRD1)
ssDNA			ssRNA		dsRNA
Inoviridae (MV-L1 type)	Microviridae (φX174)	Inoviridae (fd type)	Leviviride (MS2)	Cystoviridae (φ6)	Cystoviridae (φ6)
					100 nm

Şekil 4. Bakteriyofaj familyaları (Ackermann, 1987).

Myoviridae ailesinde bulunan fajların % 25'inin kasılabilen kuyruklu, kılıflı fajlar olduğu bulunmuştur. Podoviridae familyasında bulunan fajların ise % 14'ünün kısa kuyruklu, kılıfsız fajlar; Siphoviridae familyasında yer alan fajların % 60'ının uzun kuyruklu, kılıfsız fajları ihtiva ettiği belirlenmiştir (Ackermann, 1992).

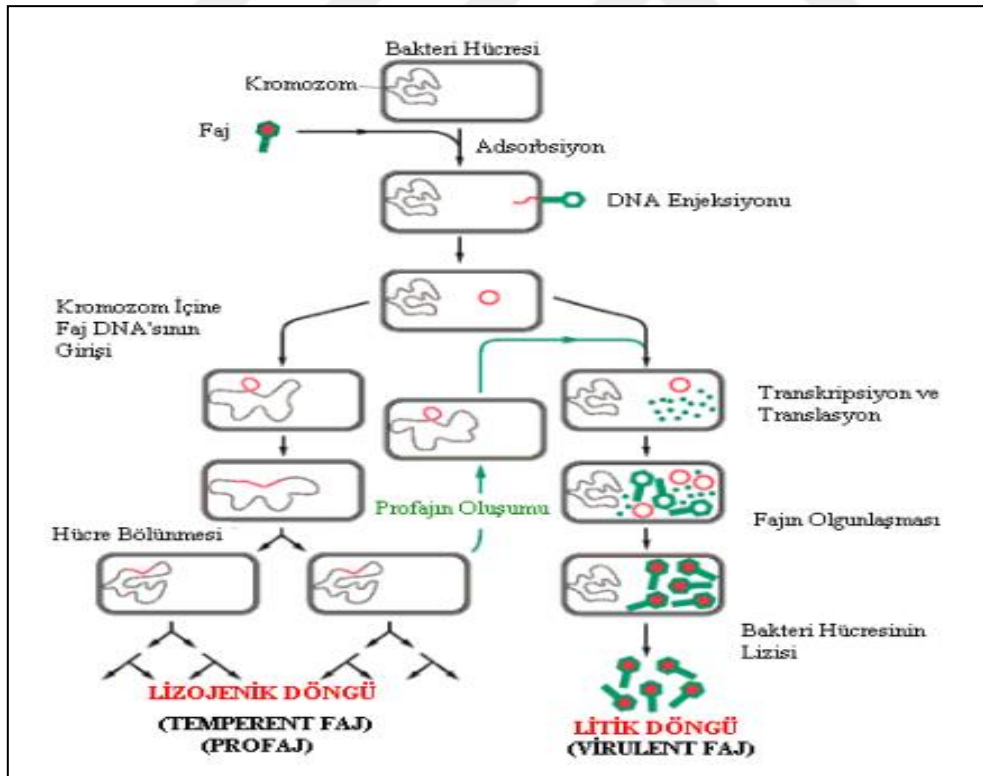
1.1.2.2. Bakteriyofaj İle Bakteri İlişkisi

Bakteri ile bu bakteriyi infekte eden bakteriyofaj arasındaki ilişki kendine has özellik göstermektedir (Törümküney, 1996). Ancak bazı tür bakteriyofajlar birbirine akraba olan bakterilerle de ilişki kurabilir veya belirli bir bakteri türü birden fazla bakteriyofaj için konak durumunda olabilir (Dodd ve Gasson, 1994).

Bakteriyofajlar konak bakterilerde litik ve lizojenik olmak iki farklı tip yaşam şekli gösterirler (Şekil 5). Litik döngüde, bakteriyofaj DNA'sı konak hücre içinde kendini replike ederek yeni progen virüsler oluşturur ve hücreyi parçalar ve böylece yeni litik fajlar ortamda serbest kalır. Konak hücre parçalanması durumuna lizis, hücrenin parçalanmasına sebep olan bakteriyofaja, litik bakteriyofaj ya da virulent bakteriyofaj ismi verilir (Klaenhammer ve Fitzgerald, 1994; Davis vd., 1980; Lewin, 1994).

Lizojenik döngüde, bakteriyofaj DNA'sı konak bakteri DNA'sına entegre olur ve progen virion oluşmaz. Bakterinin bölünüp çoğalması ile bakteriyofaj nükleik asidi bununla birlikte paralel olarak çoğalır. Bakteriyofajın konak hücreye entegre olmasına lizojeni, bakteri hücrelerine lizojenik bakteri, bakteriyofaja ılımlı bakteriyofaj yada profaj ismi verilir. Profaj DNA'ya hasar veren ajanlara (UV, antibiyotik, mitomisin C) maruz kaldığında litik döngü yeniden başlar (Klaenhammer ve Fitzgerald, 1994; Davis vd., 1980).

Profajlar, bulundukları bakteriye göre bazı yeni özellikler kazandırır. Fajlar profaj halindeyken, bakterilerde oluşturdukları karakter değişikliklerine ise lizojenik konversiyon adı verilir. Lizojenik konversiyon bazı bakterilere virulans özelliği kazandırır. Örneğin: *Corynebacterium diphterae*'ye difteri ekzotoksini; *Vibrio cholerae*'ye kolera toksini; *Clostridium botulinum*'a nörotoksin, *Staphylococcus aureus*'a eksfoliatin gibi (Brüssow vd., 2004).



Şekil 5. Fajın bakterideki litik ve lizojenik döngüsü (URL-5).

Litik ve lizojenik döngü siklusu farklı aşamalardan oluşur (URL-5).

1.1.2.3. Litik Döngü

Litik yaşam döngüsü; adsorbsiyon, bakteriyofaj genetik materyalinin bakteri hücrelerine entegre olması, faj genetik materyelinin bakteri hücresi içinde çoğalması, yeni fajların bakteri hücresi içinde olgunlaşması ve bakteriyofajın salınması evrelerinden oluşur (Akan, 1994; Joklik vd., 1984; Davis vd., 1980; Lewin 1994; Ustaçelebi, 1992).

Adsorbsiyon: Bakteri yüzeyinin antijenik yapısına ve sözü edilen faja özgü reseptörlerin varlığına bağlı olarak bakteriyofajların, bakteri hücre duvarına yapışması olayıdır (Törümküney, 1996). Tüm bakteriyofajlar adsorbsiyon için özel yapılar içerir ve bakteriyofajın konak bakterilere olan karakteristliğini bu kademe belirler. Birçok bakteri türünde bakteriyofajın tutunması için gerekli reseptörler hücre duvarında yer alır. Kuyruklu bakteriyofajlarda yapışma bölgesi olarak kompleks kuyruk fiberleri yada dikenleri, ikozahedral kuyuksuz bakteriyofajlarda birçok yapışma proteinleri, filamentöz bakteriyofajlarda bakteriyofajın uç kısımları ve RNA bakteriyofajlarında ise basit protein molekülü bulunmaktadır. Konak bakteri hücreleri üzerindeki bakteriyofaj reseptörleri, sıklıkla kompleks yapıda polisakkarit, lipid veya F pilileri olup güçlü antijenik özelliklere sahip bakteriyofajlardır. Ayrıca bakteriyofaj adsorbsiyonu için ortamda bazı metal iyonlarının varlığına ihtiyaç vardır. Bunlar, T4 bakteriyofajı için kalsiyum (Ca) ve lambda bakteriyofajı için magnezyum (Mg) iyonlarıdır. Yüksek ve düşük pH değerlerinin adsorbsiyona inhibitör etkileri bulunmaktadır (Akan, 1994; Joklik vd., 1984; Davis vd., 1980; Lewin, 1994; Ustaçelebi, 1992).

Bakteriyofaj genetik materyalinin bakteri hücresi içine girmesi: Bakteriyofaj kuyruk kısmında yer alan lizozim enzimi yardımı ile hücre duvarının delinmesi ve faj tarafından genetik materyalin bakteri hücresi içine enjekte olmasıdır (Törümküney, 1996). Bakteriyofaj DNA enjeksiyonu, bazı bakteriyofajlarda ilk olarak DNA'nın kısa bir kolunun girmesi sonra geri kalan kısmının girmesi şeklinde meydana gelir. Bazı bakteriyofajlarda ise direkt bakteriyofaj DNA'sının tümü bir bütün olarak sitoplazmaya girmektedir (Akan, 1994; Joklik vd., 1984; Davis vd., 1980; Lewin, 1994; Ustaçelebi,

1992).

Faj genetik materyelinin bakteri hücresi içinde çoğalması: Bakteriyofaj DNA replikasyonu başlar ve birçok yeni profaj oluşturulur (Akan, 1994; Joklik vd., 1984; Davis vd., 1980; Lewin, 1994; Ustaçelebi, 1992).

Yeni fajların bakteri hücresi içinde olgunlaşması: Genetik materyalde yer alan bilgiler doğrultusunda, yeni faj partiküllerinin meydana getirilmesidir (Törümküney, 1996). Konak bakteri hücresi içerisinde yeterli bakteriyofaj DNA'sı oluşturulduktan sonra geç mRNA sentezlenerek bakteriyofajın kılıfını ve kuyruğunu oluşturacak olan yapısal ve katalitik proteinler sentezlenilir. Yapısal proteinlerin bir alt sınıfı olan olgunlaşma proteinleri yardımı ile bakteriyofaj DNA'sı, bakteriyofaj kılıfı içine girmekte olup progen virion oluşturulmaktadır (Akan, 1994; Joklik vd., 1984; Davis vd., 1980; Lewin, 1994; Ustaçelebi, 1992).

Yeni sentez edilen bakteriyofajların salınımı: Bakteri hücresinin parçalanması ile ortama progen fajlar salınmaktadır. Hücre dışı ilk bakteriyofaj partikülünün görüldüğü bu olaya patlama (burst) ve bir hücreden salınan bakteriyofaj partikül sayısına patlama sayısı yada büyüklüğü (burst size) adı verilir. İn vitro ortamda, hücre dışı bakteriyofaj sayısının arttığı periyoda yükselme periyodu, bakteriyofajın salındığı süspansiyona lizat denir. Burst, filamentöz bakteriyofajlarda gözlenmez ve bu bakteriyofajlar hücreyi parçalamaksızın hücre duvarı porlarından dışarı çıkar. Burst sayısı her bakteriyofaj türünde farklıdır (Freifelder, 1987). İn vitro olarak yükselme periyodu sıvı besiyerinde, bulanık bakteri kültürlerinin berraklaşması ile, katı besiyerinde ise üst agardaki konak bakteri kültürlerinin enfeksiyon bölgesinde plak adı verilen liz olmuş alanların oluşmasıyla belirlenir (Lewin, 1994).

Bakteriyofajların yaşam evrelerinin üremesinin saptanmasında önemli klasik yöntemlerden biri üreme eğrisinin saptanmasıdır. Bakteriyofaj üremesinin izlenmesi ve progeni virüs sentezi için bir basamaklı üreme (one step growth curve) deneyleri yapılır ve konak bakterinin enfeksiyonu için belirli sayılarda bakteriyofaj (10-300) kullanılır. Pratik olarak kültürde bulunan her hücrenin aynı anda enfekte olabilmesi için enfeksiyon sıklığının (multiplicity of infection: moi) yani hücre başına düşen

enfektif bakteriyofaj partikül sayısının ayarlanması gerekir. Enfeksiyon sıklığı (moi) enfektif bakteriyofaj sayısının hücre sayısına bölünmesi ile belirlenmektedir. Lizat içindeki enfektif bakteriyofaj sayısı (pfu/ml), plak oluşturma metodunda sayılarak tespit edilebilmektedir (Lewin, 1994; Yokokura vd., 1974).

1.1.2.4. Lizojenik Döngü

Lizojenik bakteriyofajlar, nükleik asitlerini bakteri hücrelerine enjekte ederek konak hücreyi enfekte etmelerine rağmen nükleik asitlerinin replikasyonu başlanmamaktadır. Bakteriyofaj DNA'sı bakteri kromozomuna entegre olmakta ve yavru bakterilere genetik olarak aktarılmaktadır. Lizojenik yaşam, bazı bakteriyofajlarda alternatif yaşam siklusu olarak bulunur (Conrat vd., 1988; Pelczar, 1993).

1.1.2.5. Fajların Genel Kullanım Alanları

İnsan ve hayvanlarda tedaviye yönelik kullanımları dışında farklı uygulamaları da bulunmaktadır. Gıda ve tarımda biyolojik kontrol maddesi olarak: Bakteriyofajlar, işlenmiş ürünlerdeki ve taze sebze meyvelerdeki dekontaminasyonları azaltmak, ayrıca ekipmanlarda ve temas yüzeylerinde dezenfeksiyonu sağlamak, bozulabilir gıda ürünlerinin raf ömrünü uzatmak amacıyla doğal koruyucu olarak kullanılabilir. Biyoteknoloji: Çalışmalar, modern biyoteknolojide fajların kullanılabileceğinin önemini göstermiştir. Fajlar, gen terapisinde, aşı ve proteinlerin nakil aracı olarak, patojenik bakterilerin tespitinde, protein, peptit ya da antikor kütüphanelerinin taranmasında araç olarak kullanılır. Moleküler biyoloji: Günümüzde immün tekniklerle gen teknolojisinin değerlendirildiği faj gösterim teknolojisi, yeni kuşak rekombinant antikorların geliştirilmesinde kullanılmaktadır. Bakterilerin identifikasyonu: Fajlar, gıda kaynaklı ve klinik bakteriyel patojenlerin direkt tespit ve identifikasyonunda araç olarak kullanılmaktadır. Su ürünleri: Su ürünleri hastalıklarına karşı alternatif tedavide kullanıma potansiyeli taşımaktadır, ancak az sayıda çalışma yapılmıştır (Aydoğan ve Hadımlı, 2016).

1.1.2.6. Fajların Moleküler Biyolojisi ve Tıpta Kullanımı

Bakteriyofajların biyoteknoloji, araştırma ve tedavi amaçlı kullanım alanları mevcuttur. Son yıllarda fajların modern biyoteknoloji alanında daha verimli çalışmalara kaynak sağladığı anlaşılmıştır. Rekombinant DNA teknolojisi, biyoteknoloji ile enfeksiyon hastalıklarında tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Bunun yanında fajlar çoklu antibiyotik direncine sahip bakterilere karşı antibiyotikler yerine alternatif tedavi ajanı (faj terapi) olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, fajlar patojen bakterilerin tiplendirilmesinde (faj tiplendirme), DNA ve protein aşıları için taşıyıcı vektör olarak ve birçok protein ve antikor üretiminde kullanılmaktadır. Bu nedenle yeni fajların izolasyonu ve karakterizasyonu önem kazanmıştır (Haq vd., 2012).

Yirminci yüzyılın başında daha antibiyotikler keşfedilmeden önce fajlar bakteriyel enfeksiyonlara karşı kullanılmaktaydı. d'Hérelle (1919), kolera, veba ve şarbon hastalıklarına sebep olan bakterilerden fajları izole ederek ilk faj terapisini dizanteri bakterisi üzerine uyguladı (Wittebole vd., 2013). Antibiyotiklerin keşfinden sonra faj terapisti ile ilgili çalışmalar azaldı (Hermoso, 2007).

Günümüzde Gürcistan'ın Eliava Enstitüsü faj çalışmaları ve faj terapisti uygulamalarına önderlik eden önemli bir merkezdir (Haq vd., 2012). Dünya Sağlık Örgütü ve birçok ülkenin Sağlık Bakanlığına göre antibiyotik direnci son 20 yılda önemli bir sorun haline gelmiştir. Bu yüzden günümüzde antibakteriyel ajanların alternatifi olma yolunda faj terapisti tekrar önem kazanmıştır (Hermoso, 2007).

Faj terapisinde litik döngüye sahip olan fajlar tercih edilir. Faj bakteriyi enfekte eder ve bakteriyi parçalayarak hem bakteri ölümüne neden olur hem de enfeksiyon bölgesinde çoğalarak diğer bakterileri enfekte ederek enfeksiyon kaynağı olan konağı yok eder. Fajlar konaklarına özgüdür ve sadece konak spektrumundaki türleri enfekte ederler. Bu sayede etki spektrumu dışındaki bakterilere karşı zararsız olduğundan antibiyotiklerde görülen normal flora üzerine olumsuz etkiler bu tedavi yönteminde görülmez. Ayrıca, antibiyotik kullanımına bağlı gelişen sekonder enfeksiyon gelişimi de önlenmiş olur. Fajlar enfeksiyon bölgesinde yani bakterilerin bulunduğu bölgede çoğalır ve enfeksiyona neden olan bakteriler ile eş zamanlı üreyerek döngüsüne devam

ederler. Böylece sistemik yan etki görülme olasılığı çok düşüktür. Dahası, konak bakterileri mevcut olduğunda kendiliğinden yayılırlar ve konak bakteri türleri için çok özeldirler (Nilsson, 2014; Viertel vd., 2014).

Faj terapisi uzunca bir süre unutulmuş olmasına rağmen bugün özellikle dirençli suşlarla mücadelede tekrar önem kazanmıştır. Bu yeniden hatırlanma sürecinde faj terapisinin tarihinden ders alıp, konuyla ilgili bilgi birikiminden ve genom teknolojilerinden faydalanarak, öncelikle terapi potansiyeli olabilecek doğru litik fajların seçilmesi, iyi tanımlanması ve biyolojisinin iyi anlaşılması gereklidir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda herhangi bir yan etki bildirilmemiş olsa da terapinin etkinliğini kanıtlayacak, deney tasarımı iyi yapılmış daha fazla klinik çalışmaya ihtiyaç vardır (Gündoğdu ve Ulu Kılıç, 2018).

Ayrıca faj terapisi aşağıdaki nedenlerden dolayı zorlayıcı bir alternatif olarak görülmektedir (Abedon vd., 2011; Johnson vd., 2008). İlk olarak, bakterisidal ajanlar olarak keşfedilmiş ve 1900'lerin başlarından beri insan enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmıştır. İkincisi, fajlar enfeksiyon bölgesinde otomatik olarak dozlanır ve ihmal edilebilir doğal toksisite gösterir (Loc Carrillo ve Abedon, 2011). Üçüncüsü, konak spesifitesi nedeniyle fajlar, normal floranın diğer metodlara göre en az rahatsızlığına neden olur. Dördüncüsü, bakterileri antibiyotiklerinkinden farklı mekanizmalarla yok ettiği için çapraz direnç veya çoklu direnç gözlenmez (Sulakvelidze vd., 2001). Beşinci olarak, fajlar çevreden izole edildiğinden, sürdürülebilir direnç yüklerine neden olan antibiyotik ilaçlara kıyasla sadece çevresel etkileri olmayan, doğal ürünler olarak kabul edilebilirler (Loc Carrillo ve Abedon, 2011).

İlk bakışta, faj tedavisi, otodozan bir biyolojik zararlıların kontrol yöntemini temsil ettiği için antibiyotiklere ideal bir alternatif olarak görünmektedir (Abedon vd., 2011; Loc Carrillo ve Abedon, 2011). Yaklaşık bir asırdır terapötik fajlarla ilgili deneyimlere dayanarak ve doğal ekosistemlerdeki bolluğundan dolayı güvenilir kabul edilmektedir (Abedon vd., 2011). Bununla birlikte, ilgili tedavi edici fajların etkililiğini belirlemek ve güvenliğini doğrulamak için titiz araştırmalara ihtiyaç vardır (Pirnay vd., 2015). Dikkat edilmesi gereken kritik hususlar şunlardır. Fajlar, toksik olmayan bakterileri, lizojenik dönüşümle toksik suşlara veya antibiyotiklere karşı dirençli hale

dönüştürebilir (Henein, 2013; Brüssow vd., 2004). Ayrıca, terapötik başarı için ve direnci önlemek için, seçilen fajın hedeflenen bakterilere karşı yeterince antagonistik olması da önemlidir (Beims vd., 2015).

1.2. Literatür

Yapılan çalışmalarda *P. dendritiformis*'in yürütülen genom analizine dayanarak, potansiyel bir biyokontrol ajan olarak seçilmesine olanak sağlamıştır. Lapidot vd. (2015) tarafından *P. dendritiformis*'in hastalıkların biyokontrolünde kullanılması araştırılmıştır.

Yapılan bir çalışmada *P. dendritiformis*'in *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* tarafından enfekte edilmiş olan patates bitkilerinde hastalık etkinliğine olan etkisi incelenmiştir. Bakterilerin neden olduğu çürüklük, mahsul verimini ve kalitesini büyük ölçüde azaltmaktadır. Bu nedenle bu patojenik bakteriler dünya çapında büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Czajkowski vd., 2011). *P. dendritiformis*'in, *Pectobacterium carotovorum* için uygulanan sera deneylerinde hastalık etkinliğini önemli ölçüde azalttığını ve alandaki enfekte olan bitkilerin yumru verimini önemli ölçüde arttırdığını göstermiştir. Ayrıca *P. dendritiformis*'in bitki köklerindeki diğer bakterilerle rekabet ederek çok iyi şekilde kolonize olduğu bildirildi (Verma vd., 2014; Campos Herrera vd., 2011). Sonuç olarak bu çalışma *P. dendritiformis*'in, genom analizine dayanan etkili, biyolojik kontrol ajanı olma potansiyeli taşıdığını göstermektedir (Lapidot vd., 2015).

Tcherpakov vd. (1999)'un 1999 yılında yapmış oldukları çalışmada morfortip olarak bu türün desen oluşturuıcı izolatların tanımlanması ve fenotipik karakterizasyonları üzerine çalışılmıştır. Çalışmada kullanılan desen oluşturuıcı izolat olarak, T168T (T morfortip) ve C168 (C morfortip) olarak adlandırılmıştır. T'den C'ye morfortip geçiş genellikle % 1.2'ye kadar agar içeren ince agar plakalarda gözlenirken, C'den T'ye ters geçişler en az % 1.5 agar içeren agar plakalarında gözlenmiştir. Bu tür geçişler genellikle 30°C'de yaklaşık 48 saatlik bir süre gerektirmektedir (Tcherpakov vd., 1999).

Doğal habitatlarda bakterilerin büyümesi için mevcut besin maddeleri değişiklik gösterir, ancak başarılı kolonizasyon aşırı kalabalıklaşmaya ve strese yol açabilir. Avraham vd. (2011)'ın yaptıkları çalışmada *P. dendritiformis* bakterilerinin rakip kardeş kolonilerinin iki farklı vejetatif fenotipi olarak hareketli çubuk ve hareketsiz koklar arasında geçiş yaparak aşırı kalabalıklaşma sırasında popülasyonunun hayatta kalmasını göstermişlerdir.

Çubuk şekilli bakteriler yaklaşan kardeş kolonilerinin hücrelerini öldüren toksik bir Slf proteini üretir. Bununla birlikte, slf proteininin öldürücü dozunun altındaki konsantrasyonda, hücre duvarı antibiyotiklerine direnç de dahil olmak üzere, farklı metabolik ve direnç profillerine sahip olan Slf ' ye dirençli koklara geçiş yapmak için hareketli çubukların bazılarını indükler. Bakterinin sporlarından farklı olarak, koklar çoğalır. Koklar, kalabalık azaldığında ve besinler sınırlayıcı olmadığında popülasyonun yayılmasını sağlayan hareketli çubuklara geri dönmeyi sağlayan bir sinyal verir. Böylece *P. dendritiformis* bakterileri, değişen çevresel koşullara adapte olabilmektedirler (Avraham vd., 2011).

Avraham vd. (2009)'ın yaptıkları bir çalışma *Paenibacillus dendritiformis* kolonisinin büyümesini, yüzey aktif madde üzerine bağlı olduğunu bildirmişlerdir. Agar plakları üzerinde büyüme koşulları sağlanarak ve çeşitli ölçümler yapılarak koloni büyümesinin büyük ölçüde bağımsız olduğunu gösterdiler. Aynı zamanda koloninin büyümesi, yüzey aktif maddenin mevcut olan kuvvetinden de etkilenmektedir (Avraham vd., 2009).

Yoong vd. (2006) yapılan çalışmalarda geleneksel antibiyotiklerle tedavi edilemeyen dirençli *Bacillus anthracis* türlerine karşı, bakteriyofaja ait olan PlyPH gibi hücre duvarını parçalayan endolizin enzimlerini, alternatif tedavi şekli olarak önermiştir. PlyPH endolizini, *Bacillus anthracis* suşunu liz ederken diğer *Bacillus* sp. suşlarını (*Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus pumilus*) ise etkilemeyerek yüksek spesifiteye sahip olduğunu göstermiştir.

Endersen vd. (2013) tarafından yapılan çalışmada, ahır ortamları, kümes, gübre ve toprak ortamından izole ettikleri altı adet *Mycobacterium* LE1-LE6

bakteriyofajlarının sütte *M. smegmatis* MC2155 bakterisine karşı kullanım potansiyelini araştırmışlardır. *M. smegmatis* MC2155 bakterisi 1x10³ kob/mL olacak şekilde rekonstitüye süt içerisine (% 10 kuru maddeli) inoküle edilmiştir. Bakteri ile enfekte edilen rekonstitüye süt içerisine farklı kaynaklardan izole edilen altı bakteriyofaj 1x10⁹ pob/mL düzeyinde olacak şekilde ve tek tek veya kokteyl halinde ilave edilerek 4 gün boyunca 37°C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda rekonstitüye süt içerisindeki bakteri sayısının kontrol örneklerinde yaklaşık 6.0 log arttığı belirlenirken, bakteriyofaj karışımı eklenen örneklerde ise 4. gün sonunda *M. smegmatis* MC2155 bakterisine rastlanılmamıştır (Endersen vd., 2013).

Ugorcakova vd. (2015) *Paenibacillus polymyxa* CCM 7400’den elde edilen ılıman fajın endolizin bir yapıya sahip olduğunu bildirdi. Bu endolizin proteini paenibacilli, basil, corynebacteria ve *Escherichia coli*’nin hücre duvarı substratları üzerinde test edildiğinde, *Paenibacillus larvae* CCM5680 izolatına karşı antibakteriyel ve litik aktiviteye sahip olduğu belirlendi (Ugorcakova vd., 2015).

Ticari piyasada satılmak üzere, gıdalarda *Escherichia coli* O157 ve *Salmonella enterica* sayısının azaltılmasında kullanılması için Intralytix şirketi tarafından *L. monocytogenes*, sırasıyla “ListShield, EcoShield ve SalmFresh” bakteriyofaj ürünleri; Micros şirketi tarafından “Listex P100” ürünü ve *Streptococcus* türlerine karşı etkili New Horizons Diagnostic tarafından diş ve ağız sağlığında kullanılmak üzere bakteriyofaj karışımını içeren sakız ve diş macunu üretilmiştir (Cooper, 2016). Avustralya ve Yeni Zelanda Gıda Standartları (FSANZ-Food Standards Australia New Zealand) ve İsviçre 2012 yılında ListexTM’in peynir ve diğer gıdalarda kullanımına onay verilmiştir (Ly-Chatain, 2014).

Yapılan literatür taramasında *P. dendritiformis* ile ilgili faj çalışmalarına rastlanılmamıştır. Bu çalışma bu açıdan özgün değer taşımaktadır.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Araç, Gereç ve Sarf Malzemeler

Örneklerin incelenmesi için kullanılan laboratuvar gereçleri; soğutmalı santrifüj (Sigma,2-16PK), pH metre (HannaHI3220), çalkalayıcı (GFL-3005), ısıtıcı blok (NoshengMS100), inkübatör (Memmert600), distile su cihazı (GFL-2108), güvenlik kabini (Nüve-MN-20), ışık mikroskobu (Nikon-E100), koloni mikroskobu, pastör fırını (Nüve-FN-500), otoklav (Nüve-OT-40L), hassas terazi (Denver-PL-214), vorteks (Heidolph-Reax top), etüv, buzdolabı, araştırma mikroskobu (Olympos Bx51 ve BSPROP 200, görüntü işleme ve analiz sistemi ile birlikte), magnetik karıştırıcı ve bar, çeşitli cam malzeme (mavi kapaklı şişeler, vida kapaklı (5, 10 ve 20 mL'lik) tüpler, erlenmayer, beher, lam, lamel, mezür, pastör pipeti, baget) ve plastik malzemeler (5-10'luk plastik pipetler, pipet (beyaz, sarı ve mavi) uçları, pipet kutuları, petri (6, 12 mm çaplı) kapları, falkom (15 ve 50 mL'lik) tüpleri, ependorf (0,5, 1,5 ve 2,0 mL'lik) tüpleri, piset), bek alevi, mikropipet seti, pens, öze, eküvyon çubukları, filtre kâğıdı, sporlar, raglar, 0.22 µm steril şırınga filtreleri ve Formwar Karbon/bakır kaplı grid 200 Mesh (FCF200-Cu) kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan besiyerleri ve kimyasal maddeler; yeast ekstrakt powder, meat ekstrat, malt ekstrat agar, NaOH, glukoz (Merck), agar, pepton (FLUKA), sodyum asetat, % 96'lık etil alkol (Kimetsan), K₂HPO₄, üranil asetat (ACS reagent Cat.21447), Polietilen glikol (PEG8000) (83271Sigma), Jelatin (Sigma G1393), Mitomisin C ve gliserol kullanıldı.

2.1.2. Çalışmada Kullanılan Bakteri Türleri

Bu çalışma 2017-2019 yılları arasında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde gerçekleştirildi.

Çalışmada 2013-2016 yılları arasında yapılan tez ve proje çalışmalarından (Baş, 2015 ve Pınarbaş, 2017) hastalık belirtisi taşıyan bal, larva ve ölü arı örneklerinden izole edilen, geleneksel ve moleküler metodlarla (16S rRNA) tanımlanan (Tablo 4) *Paenibacillus dendritiformis* suşları kullanıldı.

Tablo 4. Kullanılan *P. dendritiformis*'lerin izole edildiği yerler, örnek türleri ve numaraları (N:17) (Baş, 2015 ve Pınarbaş, 2017).

Sayı	Alındığı Bölge	Örnek Türü	İzolat No
1	Güneysu TİM	Larva	PB3.3b
2	Rize	Larva	PB11
3	Gümüşhane	Larva	PB13.2
4	Rize	Larva	PB14a
5	Rize	Larva	PB17
6	Rize	Larva	PB18a
7	Rize	Larva	PB19a
8	Rize	Larva	PB20
9	Rize	Bal	PB22b1
10	Rize	Bal	PB22f
11	Rize	Bal	PB23b
12	Rize	Bal	PB23c
13	Rize	Bal	PB26a
14	Samsun	Bal	PB26c
15	Rize	Larva	PB30a
16	Rize	Larva	PB31a
17	Rize	Larva	PB32a

Güneysu TİM: Rize Gıda Tarım ve Hayvancılık İl Müdürlüğü

2.1.3. Kullanılan Besiyerleri

MYPGP Agar ve Sıvı Besiyerleri

Mueller-Hinton Broth	10 g
Maya Özütü	15g
K ₂ HPO ₄	3 g
Glukoz	2 g
Sodyum piruvat	1 g
Agar	14 g
dH ₂ O	1000 ml, pH; 6,8-7,2

Yukarıda verilen maddeler belirtilen oranlarda hassas terazi yardımı ile tartılarak 1000 ml distile suda çözüldü. 1,1 atm basıçta, 121°C’de 20 dakika otoklav edildi. Bakterilerin büyütülmesinde MYPGP sıvı besiyeri olarak kullanıldı. Katı besiyeri için %1.4, yumuşak agar için ise %0,7 agar ilave edildi. Otoklavlanan besiyeri 90 mm’lik steril petrilere 25 ml olacak şekilde döküldü. Besiyerleri buzdolabında +4°C’de bekletildi (Dingman ve Stahly, 1983; Vallat vd., 2012; de Graaf vd., 2013).

Hazırlanan her iki besiyeride genel üretim ve faj izolasyon besiyeri olarak kullanıldı.

2.1.4. Kullanılan Solüsyonlar

Üranil Asetat Hazırlanışı

Bakteriyofajın morfolojik karakterinin belirlenmesi için TEM mikroskobu kullanıldı. TEM mikroskobu hizmet alımı olarak kullanıldı. Bakteriyofaj örneklerinin gözlenebilmesi için üranil asetat ve grid kullanıldı.

Ticari olarak temin edilen üranil asetatın % 2’lik stok solüsyonu steril distile suda hazırlandı. Üranil asetat, toksik ve radyoaktif bir maddedir ancak suda çözünen formu radyoaktif değildir. Çözülmesi yavaş ve dikkatli bir şekilde çalkalamadan yapıldı. KOH veya NaOH kullanılarak pH 4,0-4,5 civarında ayarlandı. Alüminyum folyo ile kapatılmış ışık almayan vida kapaklı şişede stoklandı ve +4°C’de (maksimum 2 yıl) saklandı.

SM Buffer Hazırlanışı

NaCl	100 mM
MgSO ₄ 7H ₂ O	8 mM
Tris-HCl (PH:7,5)	50 mM
Jelatin	% 0.002

Bakteriyofajların TEM görüntüsünün alınması için kullanıldı. Yukarıda verilen maddeler belirtilen oranlarda karıştırılarak hazırlandı ve otoklavda steril edildikten sonra oda ısında kullanılacağı süreye kadar bekletildi.

PEG Hazırlanışı

TEM için faj yoğunlaştırma amacıyla PEG kullanıldı. 2M NaCl ve % 20 PEG olacak şekilde bakteriyofaj lizatına eklendi. Yavaşça çözünmesi sağlanarak sıvı lizat içerisinde iyice çözünmesi sağlandı. Bir gece +4°C buz içerisinde bekletildi. Bakteriyofajlar 10000 rpm'de 15 dakika santrifüj ile çöktürüldü. Çökelti (pellet) en fazla 3-4 ml SM buffer ile çözüldükten sonra grid hazırlamada kullanıldı. Stok faj lizatı +4°C'de ve -80°C'de stoklandı.

2.2. Metod

2.2.1. *Paenibacillus dendritiformis*'in Canlandırılması

Paenibacillus dendritiformis'in canlandırılmasında MYPGP agar kullanıldı. Derin dondurucuda % 20 gliserol ve MYPGP sıvı besiyeri ile stoklanmış kültürden 100 mikrolitre alınarak MYPGP agar besiyerine tek koloni düşürme tekniğiyle ekimleri yapıldı. Ekimler 36°C'de mumlu mikroaerofilik (kavanoz içinde) ortamda 48-72 saat inkübe edildi. Krem veya turuncu, besiyerine yayılan koloniler *P. dendritiformis* olarak belirlendi. Taze üreyen kültürden öze yardımıyla 3 ml MYPGP sıvı besiyerine pasaj yapıldı ve 120 rpm'de 36°C'de bir gece çalkalamalı inkübatörde inkübe edildi.

2.2.2. Bakteriyofaj İndüksiyonu

Paenibacillus dendritiformis suşlarının litik bakteriyofaj içeriklerinin belirlenmesi için mitomisin C ile indüklenerek test edildi (Bradley, 1967; Kılıç vd., 1996). MYPGP sıvı besiyerinde 18-20 saatlik taze kültüründen sub-kültürler yapılarak bir gecelik taze kültürleri elde edildi. Yaklaşık 2-6 saat ($OD_{600nm}=0,2$) inkübasyondan sonra son konsantrasyon 0,2 µg/ml olacak şekilde Mit-C ilave edildi

ve yaklaşık 24-48 saat 120 rpm'de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona tabi tutuldu (Alpay, 1999).

Mit-C ile indüklenmiş kültürler inkübasyon süresince gözlemlenerek bulanık kültürlerin profaj indüksiyonu ve *P. dendritiformis*'in tüp dibinde liz olması sonucu berraklaşması veya toz bulutu gibi çökmesiyle faj indüksiyonu gözlemlendi. Liz gözlenen tüm kültürlerden 1 ml ependorf tüplerine alınarak 13000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. 0.45 µm steril tek kullanımlık filtreler vasıtasıyla süzöldü. Süpernatant başka bir ependorf tüplerine aktararak bir damla kloroform ilave edildi. Bu şekilde elde edilen süpernatant (lizat) kullanılacağı süreye kadar 4°C'de saklandı (Kılıç vd., 1996; Trevors vd., 1983).

Bakteriyofajın otoindüksiyonunun varlığı (kendi kendine indüklenebilirlik) Mit-C'siz kültür ile test edildi. *P. dendritiformis*'in 24-48 saatlik sıvı kültürlerinin kendiliğinden faj indüksiyonu (otoindüksiyon) olup olmadığının belirlenmesi için 1 ml ependorf tüplerine alınarak 13000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. 0.45 µm steril tek kullanımlık filtreler vasıtasıyla süzölerek drop yapmak için stoklandı.

2.2.3. Litik Faj Enfeksiyonunun Yapılması

Lizatlarda bakteriyofaj belirlenmesi için damla (drop assay) yöntemi kullanıldı. Bu amaçla MYPGP katı ve yumuşak (% 0.7) agar kullanıldı. Konak kültür hazırlanması için bir gecelik taze kültür hazırlandı. Taze kültürden 100 µL alınarak 3 ml sıvı besiyerine pasaj yapıldı ve erken logaritmik faza ulaşana kadar 120 rpm'de 36°C'de üremeye bırakıldı. Konak bakteri için (OD_{600nm}= 0.4) olana kadar yada McFarland 0,5 bulanıklılığa geldiğinde kültürden 100-200 µL alındı. Önceden hazırlanmış ve 50°C'ye soğutulmuş yarı-katı (% 0.7) MYPGP agar besiyerinden 4 ml steril vida kapaklı tüplere alınarak 50°C'ye ayarlanmış su banyosunda bekletildi. Kültür yoğunluğuna göre alınan 100-200 µL konak *P. dendritiformis* suşları ayrı ayrı her biri 4 ml 48-50°C'ye ayarlı su banyosundaki yumuşak agar tüplerine ilave edildi ve hızlıca vorteksle homojen karışımları sağlandı. Karıştırıldıktan sonra önceden hazırlanmış ve suş numarası yazılmış MYPGP agar plaklarının yüzeyine yayıldı ve donması beklendi (Dingman ve Stahly, 1983). Agarın donmasını takiben yüzeyine

önceden hazırlanan indüklenmiş lizatların her birinden 5 µL agar yüzeyine damlatılarak kuruması beklendi. Kültürler 36°C'de 24-48 saat % 5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Lizat damlatılan alanlarda konak bakterinin üremediği bir inhibisyon zonunun oluşması bakteriyofaj/ bakteriyosin/ antimikrobiyal aktivite varlığı olarak belirlendi (Trevors vd., 1983). Tek plak oluşturan lizatlar bakteriyofaj pozitif olarak değerlendirildi. Damlatma yapılan bölgede bulanık, berrak, diffüz, halka, yüzük veya nokta nokta şeklinde inhibisyon zonlarını oluşturan lizatlar kaydedilerek bakteriyofaj/ bakteriyosin/ antimikrobiyal aktivite içeriği yönünden araştırma amacıyla diğer testlere tabi tutuldu (Alpay, 1999).

2.2.4. Fajların Çoğaltılması, Saflaştırılması ve Stoklanması

Bakteriyofaj zenginleştirilmesi, Hurst ve Reynolds (2002) tarafından tarif edildiği gibi standart teknikler kullanılarak gerçekleştirildi. Saf faj elde edilmesi için, gözlenen litik plaklar öze ile petriden ayrıştırıldı ve faj tampon solüsyonu [SM buffer; 100 mM NaCl, 8 mM MgSO₄.7H₂O, 50 mM Tris-Cl (1M, pH 7.5), % 0.002 jelatin] içine aktarıldı. Bu amaçla tam plak enfeksiyonu yapıldı. Böylece sıvı kültürde üretilen konak bakteriler, logaritmik fazın başında iken (OD_{600nm}= 0.4) 100 µL alınarak ve 50°C'ye soğutulmuş yumuşak agara (% 0.7) ilave edilerek petri yüzeyine döküldü. Agar katılaştıktan sonra 200 µL faj lizatından alınarak yumuşak agar yüzeyine belirli aralıklarla damlatıldı. Ardından 36 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Bu şekilde konaklar enfekte edilerek faj plaklarının daha yoğun oluşması sağlandı. Agar yüzeyinde faj plakları gözlenen agar plaklara 3 mL SM buffer ilave edilerek orbital çalkalayıcıda 120 rpm'de 2 saat çalkalanarak fajların yumuşak agardan ayrılmaları sağlandı. Agar yüzeyindeki sıvı ve yumuşak agar steril bir drigalski spatülü ile kazınarak 50 mL'lik falkon tüplere aktarıldı. Tüpler 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra supernatant kısmı önce 0.45 µm'lik sonra 0.22 µm'lik filtreden geçirildi. Zenginleştirilen faj lizatlarının bir kısmı 4°C'de saklandı. Saflaştırılan faj lizatları % 50 gliserol ile karıştırılarak ve her birinden ikişer tüp alınarak -80°C'de stoklandı (Kılıç vd., 1996; Alpay, 1999).

2.2.5. Bakteriyofaj Stoklarının Hazırlanması ve Yoğunlaştırılması

Bakteriyofaj varlığı belirlenen konaklar, Mit-C ile indüklenerek yüksek hacimde (150-200 ml) lizatı hazırlandı (Kılıç vd., 1996; Alpay, 1999). Bakteriyofaj belirlenen *Paenibacillus* sp. suşlarının bir gecelik kültüründen 1 ml alınarak 100 ml MYPGP sıvı besiyerine (pH 6,8-7,4) inokule edilerek sub-kültürleri yapıldı. Kültürler erken mid log safhasına ulaştığında Mit-C ile indüklenerek 8-10 saat takip edildi. Kültürlerin inkübasyon süresince hücrelerin bakteriyofaj indüksiyonu sonucu liz olmaları izlendi. Bol miktarda bakteriyofaj üretmek amacıyla indükleme yöntemine ilave olarak bazı bakteriyofajlar için damlatma yöntemi kullanıldı. Bu amaçla duyarlı konağın 100 ml MYPGP sıvı besiyerindeki erken mid log fazdaki kültürü bir bakteriyofaj/10 duyarlı bakteri hücresi (moi: multiblicity of infection= 0.1) olacak şekilde bakteriyofaj ile enfekte edildi ve 8-10 saat inkübasyona tabi tutuldu.

Mit-C indüksiyonu ile elde edilen bakteriyofaj lizatlarına 2 damla kloroform ilave edilerek indüklenmeleri durduruldu. Kültürler 50 ml kapasiteli santrifüj tüplerine aktarılacak 4 °C’de 10000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilerek, süpernatant kısım temiz bir şişeye aktarıldı. 10 mM MgSO₄ ve 0.1 µg/ml DNase ve RNase ilave edilerek bakteri DNA ve RNA’sının parçalanması için 37°C’de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Süpernatant içindeki protein ve hücre DNA’sını çöktürmek amacıyla son konsantrasyonu 2M olacak şekilde NaCl ilave edilerek ve yavaşça alt üst edilerek karıştırıldı. Buz üzerinde 1 saat bekletildikten sonra tekrar (10000 rpm, 10 dakika) santrifüj edildi. Süpernatant temiz bir şişeye aktarılacak ve bakteriyofaj partiküllerinin çökmesi için son konsantrasyon % 20 olacak şekilde polietilen glikol (PEG 8000) ilave edildi. Yavaşça alt üst edilerek karıştırıldıktan sonra buz üzerinde en az 1 saat bekletildi. Bakteriyofaj partikülleri 15000 rpm’de 15 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Pellet korunarak süpernatant kısım uzaklaştırıldı ve santrifüj tüpleri ters tutularak sıvının iyice akması sağlandı. Santrifüj ile çöktürülen bakteriyofaj partikülleri 2 ml süspansiyon tamponu (SM buffer; 100 Mm NaCl, 8 mM MgSO₄.7H₂O, 50 mM Tris-Cl (1M, pH 7.5), % 0.002 jelatin) içinde bir gece 4°C’de bekletilerek çözünmesi sağlandı. Yoğunlaştırılan faj (PEG) solusyonundan grid (SM Buffer ve Üranil Asetat kullanılarak) hazırlanarak TEM görüntüleri alındı.

2.2.6. Fajların Morfolojik Karakterizasyonu

Damlatma yöntemi ile oluşturulan faj plağı 30 µL SM tamponda çözüldü. Hazırlanan süspansiyondan 5 µL alınarak karbon kaplı formvar film gridine damlatıldı, iki dakika bekletildikten sonra filtre kağıdı ile toplandı. Sonra iki defa 5 µL enjeksiyon suyu ile 1 dakika yıkandı ve ekstra su filtre kağıdı ile toplandı. Son olarak 10 µL, % 2'lik üranil asetat (pH 4-4.5) ile 10 dakika boyanıp kurutuldu. Fazla suyu kenarından alındı ve ters dönmeden filtre kağıdı üstünde kurumaya bırakıldı. Hazırlanan gridler TEM görüntü alınana kadar karanlık ortamda oda ısısında bekletildi.

Hazırlanan preparat 60000-80000 büyütmede, Bayburt Üniversitesi, Merkez Araştırma Laboratuvarında bulunan Taramalı Elektron Mikroskopunda (TEM) görüntülendi ve fotoğraflandı (Clokier vd., 2009). Fajların yapısal ölçüleri baş şekli, uzunluğu ve genişliği, kuyruk uzunluğu ve genişliği ve muhtemel familyaları belirlendi.

3. BULGULAR

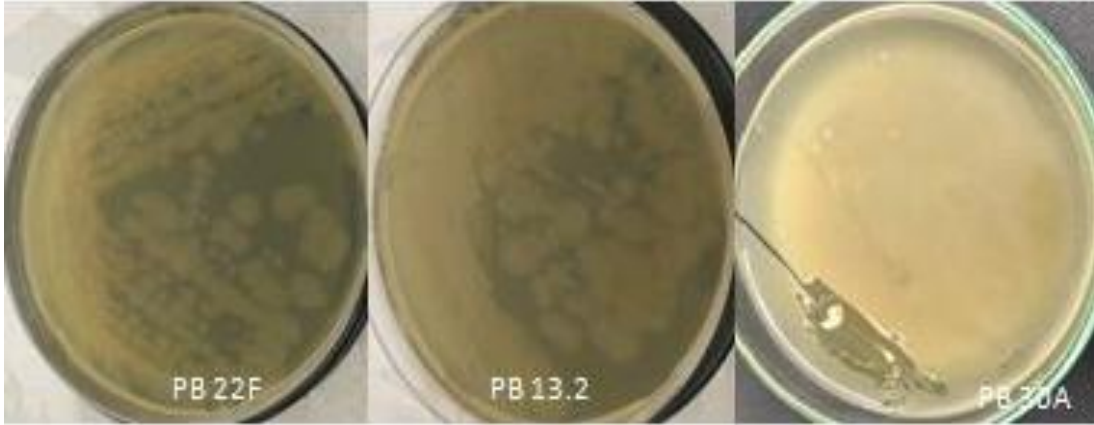
Bu çalışma, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Amerikan Yavru Çürüklüğü şüpheli arı ve ürünleri Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü Arı Hastalıkları Laboratuvarı'ndan temin edilmiş olup, örnekler izole ve identifiye edilerek -20°C ve -80°C'de stoklanmış *P. dendritiformis* izolatları materyal olarak kullanılmıştır (Tablo 4).

Toplam 17 adet *P. dendritiformis* izolatlarının koloni morfolojileri makroskobik olarak incelendiğinde birbirlerine benzer olduğu bazı suşların biraz daha turuncu renkte olduğu gözlenmiştir (Tablo 5/Şekil 6, Şekil 7).

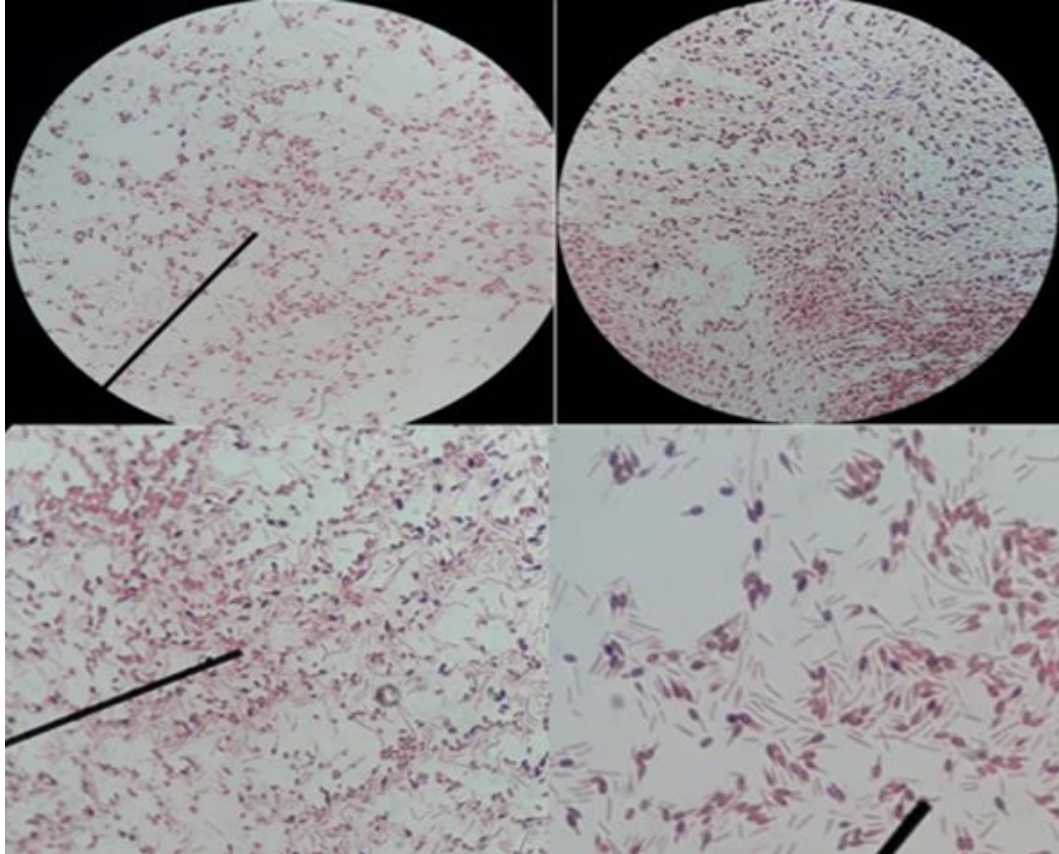
Kültürlerin koloni rengi, tipi, büyüklüğü ve mikroskobik morfolojisi, gram özelliği, bakteri morfolojisi, spor içeriği ve de konumu incelendi. Hareketli, peritriş kirpikli bakteri olduğundan dolayı petri kaplarında 24 saat içinde tüm yüzeye yayılan bir koloni oluşturmaktadırlar. Nutrient agarda hareket daha kısıtlı olduğu gözlenmektedir. Mikroskobik morfolojisi incelendiğinde hepsinde bol sporlu, spor şişkin ve hücre yapısını bozan genelde subterminal konumlu ve gram pozitif bakteri olmasına rağmen hücre bütünlüğü spor oluşumundan dolayı çabuk bozulması nedeniyle gram negatif boyanan tekli basiller şeklinde gözlenmektedir.

Tablo 5. Bakteriyofaj/bakteriyosin varlığı araştırılan *P. dendritiformis* suşları ve numaraları (N=17).

Sayı	İzolat No	Tür ismi	Sayı	İzolat No	Tür ismi
1	PB3.3b	<i>P. dendritiformis</i>	10	PB22f	<i>P. dendritiformis</i>
2	PB11	<i>P. dendritiformis</i>	11	PB23b	<i>P. dendritiformis</i>
3	PB13.2	<i>P. dendritiformis</i>	12	PB23c	<i>P. dendritiformis</i>
4	PB14a	<i>P. dendritiformis</i>	13	PB26a	<i>P. dendritiformis</i>
5	PB17	<i>P. dendritiformis</i>	14	PB26c	<i>P. dendritiformis</i>
6	PB18a	<i>P. dendritiformis</i>	15	PB30a	<i>P. dendritiformis</i>
7	PB19a	<i>P. dendritiformis</i>	16	PB31a	<i>P. dendritiformis</i>
8	PB20	<i>P. dendritiformis</i>	17	PB32a	<i>P. dendritiformis</i>
9	PB22b1	<i>P. dendritiformis</i>			



Şekil 6. MYPGP agar besiyerinde *P. dendritiformis*'in az hareketli, krem (PB22f ve PB13.2) ve güçlü hareketli, turuncu (PB30a) renkli koloni morfolojisi görünümü.



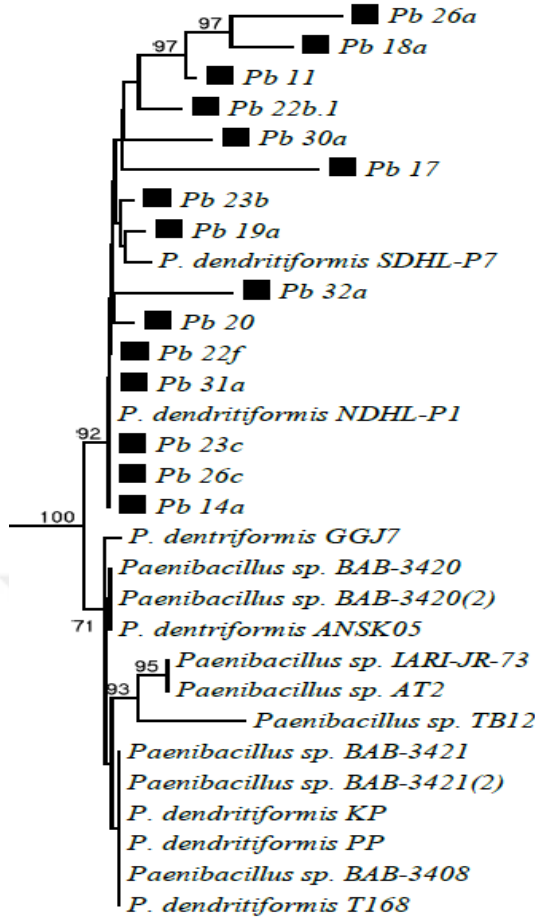
Şekil 7. *P. dendritiformis*'in (PB22f) Gram boyama görüntüsü($\geq 100X$)

Amerikan Yavru Çürüklüğü şüphesi örneklerden izole edilen toplam 17 adet *P. dendritiformis* izolatının hem biyokimyasal hem de filogenetik incelemesi yapılmış, ne biyokimyasal özellik açısından ne de filogenetik benzerlik açısından incelendiğinde birbirine birebir benzer olmadıkları gözlenmiştir (Tablo 6/Şekil 8).

Tablo 6. Çalışmada izole edilen izolatların morfolojik ve biyokimyasal özellikleri (N:17).

İzolat No	Morfolojik Özellikler					Biyokimyasal Özellikler														
	Gram Özelliği	Hücre Şekli	Koloni Tipi	Koloni Rengi	Spor Konumu	O	Ka	St	L	Ü	İ	J	V	D	N	Gl	Ma	La	Tr	Ks
PB 3.3b	+	Basil	R	K	Subterminal	+	+	-	NT	NT	NT	NT	+	NT	+	+	+	+	+	-
PB11	+	Basil	S	K	Terminal	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-
PB 13.2	+	Basil	R	Ş	Subterminal			+	NT	-	-	+	+	NT	+	-	-	-	+	-
PB14a	+	Basil	S	Ş	Terminal	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
PB17	+	Basil	R	K	Subterminal	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
PB18a	+	Basil	M	Ş	Subterminal	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
PB19a	+	Basil	M	Ş	Subterminal	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-
PB 20	+	Basil	R	K	Subterminal	+	+	+	NT	-	-	+	-	NT	-	+	-	-	+	-
PB22b1	+	Basil	R	Ş	Subterminal	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-
PB22f	+	Basil	M	K	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-
PB23b	+	Basil	R	T	Subterminal	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
PB23c	+	Basil	S	Ş	Subterminal	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-
PB26a	+	Basil	S	T	Subterminal	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
PB26c	+	Basil	R	Ş	Santral	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
PB30a	+	Basil	R	T	Subterminal	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
PB31a	+	Basil	S	T	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
PB32a	+	Basil	S	T	Terminal	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-

S: S-tipi, M: M-tipi, R: R-tipi, K: Krem, T: Turuncu, Ş: Şeffaf, B: Beyaz, O: Oksidaz, Ka: Katalaz, St: Sitrat, L: Lesitinaz, Ü: Üreaz, İ: İndol, J: Jelatinaz, V: Voges-Proskauer, D: Dihidroksiaseton, N: Nitrat, Gl: Glukoz, Ma: Maltoz, La:Laktoz, Tr: Trehaloz, Ks: Ksiloz, +:Pozitif, -: Negatif., *:zayıf pozitiflik, NT: Test edilmedi



Şekil 8. *P. dendritiformis* suşlarının filogenetik yakınlığı (Pınarbaş, 2017).

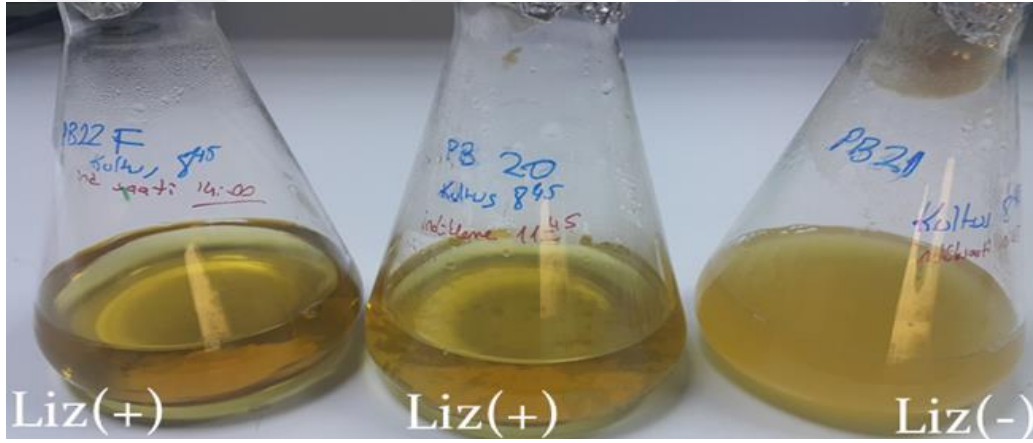
Geleneksel ve moleküler tanısı yapılmış *P. dendritiformis* suşlarının bakteriyofaj içeriklerinin incelenmesi Mit-C ile indüklenerek yapıldı. Suşların MYPGP sıvı besiyerinde ve 120 rpm çalkalamalı inkübatörde üreme hızları belirlendi. Yapılan kültür takiplerinde PB13.2, PB22f, PB14a ve PB20 izolatlarının hızlı büyüme fazına ulaştığı ve 3-6 saat içinde faj indüksiyonları tamamlanarak kültürün tamamen liz oldukları gözlemlendi (Tablo 7).

Suşların bazılarının (PB11, PB22b1, PB30a, PB31a) ise üreme hızları iyi olmasına rağmen faj indüksiyonunun ancak 12-15 saatte tam liz olduğu belirlendi. Geri kalan suşlarda ise faj/bakteriyosin varlığı belirlendi ancak tam olarak lizis gözlenmedi (Tablo 7).

Tablo 7. *Paenibacillus dendritiformis* suşlarının mid-log süresi ve liz saati (N:17).

Sayı	İzolat No	Midlog süresi (dk)	Liz saati	Sayı	İzolat No	Midlog süresi (dk)	Liz saati
1	PB3.3b	385	18	10	PB22f	150	3*
2	PB11	135	15	11	PB23b	385	18
3	PB13.2	135	3*	12	PB23c	385	18
4	PB14a	100	4,5*	13	PB26a	385	18
5	PB17	385	18	14	PB26c	385	18
6	PB18a	385	18	15	PB30a	135	12
7	PB19a	385	18	16	PB31a	135	12
8	PB20	250	6*	17	PB32a	385	18
9	PB22b1	135	12				

*Hızlı liz olanlar



Şekil 9. *P. dendritiformis* suşlarının Mitomisin C ile indüklendikten sonra konak hücrenin lizisinden görünüşleri.

İndüklenen suşlar liz olsa da olmasa da en geç 18 saat sonra inkübasyonu durduruldu ve lizat eldesi için tüm suşlar çöktürüldü. Süpernatant faj stok kültür olarak kullanıldı. Lizatların tümünün (17) hem kendi *P. dendritiformis* suşlarına, hem de farklı *Paenibacillus* suşlarına (*P. larvae* ve *Paenibacillus* sp.) karşı çapraz enfeksiyonu yapıldı. Toplam 60 konak kullanıldı ve 22 farklı konağa karşı inhibisyon zonu (antimikrobiyal etkili / bakteriyosin) oluşturduğu belirlendi ve oluşan inhibisyon zonları cetvel yardımıyla ölçüldü. Lizatların bir kısmında sadece faj varlığı belirlenirken bazılarında hem bakteriyofaj hem de antimikrobiyal etkinlik gözlemlendi (Tablo 8).

Tablo 8. Bakteriyofaj/bakteriyosin/antimikrobiyal aktivite gözlenen *P. dendritiformis* suşları ve konakları.

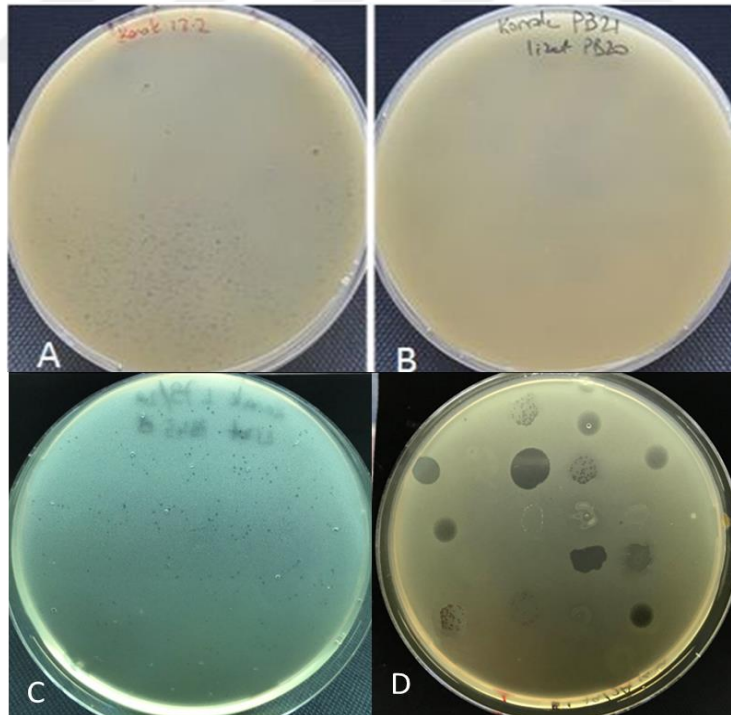
Bakteriyofaj, bakteriyosin ya da antimikrobiyal aktivite var olan lizatlar (N=17)

Faj plağı veyainhibisyon gözlenen konak	PB 3.3b	PB 11	PB 13.2	PB 14a	PB 17	PB 18a	PB 19a	PB 20	PB 22b1	PB 22f	PB 23b	PB 23c	PB 26a	PB 26c	PB 30a	PB 31a	PB 32a
PB3.1A (Pl)	-	-	-	-	-	-	-	-	+ ^t	-	-	-	-	-	-	-	-
PB5A (Pl)	-	+ ϕ	-	-	-	-	-	-	-	+ ϕ	-	-	-	-	-	-	-
PB 5B (Pl)	-	+++ ϕ	-	-	-	-	-	-	-	+ ϕ	-	-	-	-	-	-	-
PB 6B (Pl)	-	-	+ ϕ	+ ϕ	-	-	-	+ ϕ	-	+ ϕ	-	+ ϕ	-	3+ ϕ	-	-	-
SV 27B (Pl)	-	+ ϕ	-	-	-	-	-	-	-	+++ ϕ 3+ ^t	-	-	-	-	+ ϕ	+++ ϕ	-
PB 32A(Pd)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++ ^b	-	-	-	-	-	-	-
SV 21 (Pl)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+ ϕ	-	-	-	-	-	-	-
SV 28 (Pl)	+++ ϕ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++ ^t	-	-	-	-
SV 30B (Pl)	-	++ ^b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PB 3.2A(Pl)	-	-	-	-	-	++ ^b	-	-	-	++ ^b	-	-	-	+++ ϕ	++ ^b /+ ϕ	-	++ ^b
PB 19B (Pl)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++ ^b	+++ ϕ	-	-	-	-	-
PB 3.2B (Pl)	-	-	-	-	-	-	-	-	+++ ^t	-	-	-	-	-	-	-	-
PB 13.2(Pd)	-	-	-	-	-	-	-	+ ϕ	-	+++ ^t	-	-	-	-	-	-	+++ ^t
PB 11(Pd)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++ ^t	-	-	-	-	-	-	-
LMG 16252	-	++ ^b	-	++ ^b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
*PB 17(Pd)	-	-	-	-	3+ ϕ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PB 18B (<i>Bacillus sp.</i>)	-	-	+++ ϕ	3+ ϕ	-	+++ ϕ	-	3+ ϕ	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PB31B (Pl)	3+ ϕ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PB13.1B (Pl)	-	-	+++ ϕ	3+ ϕ	-	-	-	3+ ϕ	+++ ϕ	-	-	-	-	-	-	-	-
PB27B (Pl)	-	-	+++ ϕ	-	-	+++ ϕ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PB16.2B (Pl)	-	-	-	-	-	3+ ϕ	-	-	3+ ^t	-	-	-	-	-	-	-	-
PB14D (Pl)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++ ^t	-	-	-

*3.gün kendiliğinden indüklendi, -; Faj plağı /bakteriyosin yok, +; <5 mm faj plağı/bakteriyosin, ++; 6-10 mm faj plak/bakteriyosin, +++; ≥11mm faj plak/bakteriyosin, ϕ ; bakteriyofaj, b; bulanık zon, t; tam açılma zonu, LMG16252; *P. larvae* Eric III tipi

Suşların bazılarında oluşan inhibisyon zonunun kesin hatlı ve tam açılma şeklinde olması, bekleme esnasında genişlememesi ve faj plağı gözlenmemesi nedeniyle bakteriyosin ya da antimikrobiyal aktivite içerdğı şeklinde yorumlandı (Tablo 8). Faj içermeyen PB23b ve PB26a'nın bir suşa ve PB32a'nın iki ayrı suşa karşı antimikrobiyal yada bakteriyosinogenik aktivite içerdğı belirlendi. Suşların 7'sinde faj ile birlikte en az bir suşa karşı antimikrobiyal yada bakteriyosinogenik aktivite içerdğı belirlendi. Suşlardan yalnızca PB19a'da ise ne herhangi bir faj içeriğine konak olduğu ne de antimikrobiyal etkinlik/ faj içeriğı belirlendi. Çapraz damlatma sonucu elde edilen faj plaklarının görünümleri şekil 10'da verilmiştir.

P. dendritiformis konak olarak kullanıldığında yayılan koloni oluşturduğundan geniş açılma zonları gözlenmedi şekil 10(A-B-C). Dolayısıyla iyi bir konak olmadıkları düşünölmektedir. *Paenibacillus larvae* ve diğer hareketsiz suşların ise *P. dendritiformis* bakteriyofajlarına karşı iyi bir konak olabilecekleri belirlendi şekil 10 (D).



şekil 10. Çapraz enfeksiyon sonucunda MYPGP plaklarında damlatılan lizatlarındaki faj plaklarının görünümlü. A,B,C: Konak suşların tümü *P. dendritiformis*, D; Konak suş *P. larvae*, Lizat *P. dendritiformis* suşuna ait.

Bakteriyofaj içeren lizatların konak spektrumları incelendi (Tablo 9).

Tablo 9. Bakteriyofaj belirlenen *P. dendritiformis* suşlarına ait bakteriyofajların konak spektrumları.

	<i>P. dendritiformis</i> Lizatları	<i>P. dendritiformis</i> ve diğer konakları
1	PB3.3b	PB31B (<i>P. larvae</i>), SV28 (<i>P. larvae</i>)
2	PB11	PB5A (<i>P. larvae</i>), PB5B (<i>P. larvae</i>), SV 27B (<i>P. larvae</i>)
3	PB13.2	PB 6B (<i>P. larvae</i>), PB18B (<i>Bacillus</i> sp.) PB13.1B (<i>P. larvae</i>), PB27B (<i>P. larvae</i>)
4	PB14a	PB 6B (<i>P. larvae</i>), PB18B (<i>Bacillus</i> sp.), PB13.1B (<i>P. larvae</i>)
5	PB 17	PB17 (<i>P. dendritiformis</i>) (3.günde otoindüksiyon)
6	PB18a	PB18B (<i>Bacillus</i> sp.), PB27B (<i>P. larvae</i>), PB16.2B (<i>P. larvae</i>)
7	PB19a	-
8	PB20	PB 6B (<i>P. larvae</i>), PB13.2(<i>P. dendritiformis</i>) PB18B (<i>Bacillus</i> sp.), PB13.1B (<i>P. larvae</i>)
9	PB22f	PB5A (<i>P. larvae</i>), PB5B (<i>P. larvae</i>), PB 6B (<i>P. larvae</i>) SV 21(<i>P. larvae</i>), SV27B (<i>P. larvae</i>)
10	PB22b1	PB13.1B (<i>P. larvae</i>)
11	PB23b	-
12	PB23c	PB 6B (<i>P. larvae</i>), PB19B (<i>P. larvae</i>)
13	PB26a	-
14	PB26c	PB 6B (<i>P. larvae</i>), PB3.2A (<i>P. larvae</i>)
15	PB30a	SV 27B (<i>P. larvae</i>), PB 3.2A (<i>P. larvae</i>)
16	PB31a	SV 27B (<i>P. larvae</i>)
17	PB32a	-

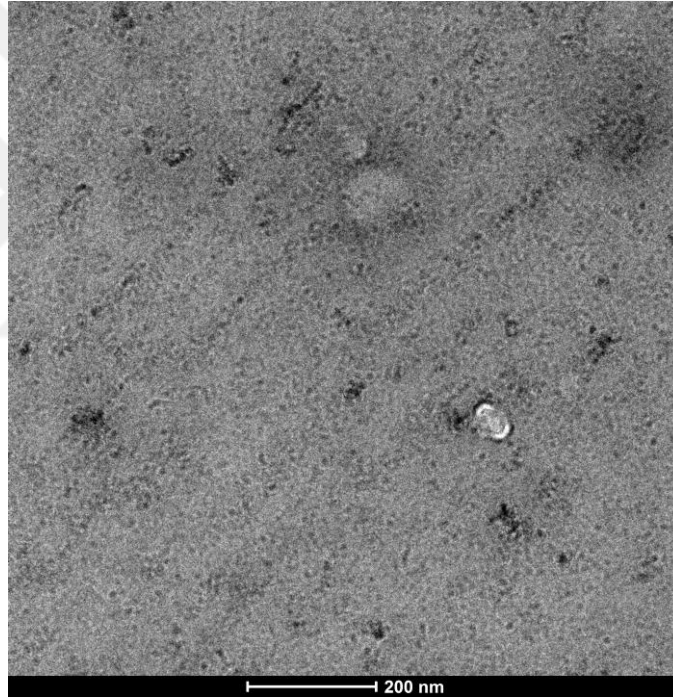
Toplam 17 *P. dendritiformis* suşlarına ait indüklenmiş lizatların 4 tanesi hariç diğerlerinin bakteriyofaj içerdiği ya da indüklenebilir bakteriyofaj taşıdığı ve de bu fajların test edilen konaklardan en az birini enfekte edebildiği belirlendi.

İndüklenme sonunda faj tespit edilemeyen dört adet *P. dendritiformis* (PB19a, PB23b, PB26a ve PB32a) suşlarının, bakteriyofaj taşımadığı yada test edilen konaklardan hiçbirini enfekte etmediği için gözlenmediği düşünülmektedir (Tablo 9). Lizat indüksiyonunda da 18 saat gibi bir süre sonunda indüksiyon sonlandırılmış olup

tam açılma gözlenmemiş suşlar arasında yer almaktadır. Bu durumun konağın faj taşımamış olabileceği yada uygun bir konak bulamadığı için fajın enfeksiyon yapıp gözlenmemiş olabileceği sonucuna varılmıştır.

PB17 diğerlerinden farklı olarak güçlü bir şekilde kendini enfekte ettiği gibi başka hiçbir faj ya da bakteriyosinden etkilenmediği de gözlenmiştir (Tablo 9).

Morfolojik karakterizasyon için yapılan TEM incelemede PB22f nolu konağa ait Φ PB22f'in kasılamaz, uzun kuyruklu, iri kapsomerli ve B tipi faj olduğu gözlemlendi (Şekil 11).



Şekil 11. *P. dendritiformis* (PB22f) suşundan izole edilen kasılamaz uzun kuyruklu Φ PB22f'in TEM görüntüsü.

4. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Çalışmamızda AYÇ şüpheli petek, bal, larva ve temel petek örneklerinden bal arıları için hem patojenik, hemde simbiyotikolan birçok gram pozitif bakteri izole edilmiştir. İzole edilen bakterilerden *P. dendritiformis* arılarda patojen olduğu bildirilmemiş ancak arı hastalıklı örneklerden bolca izole edilen bir tür olarak bilinmektedir. Son yıllarda patojen bakterilere karşı bakteriyofajların kullanıldığı ve “faj terapisi” olarak adlandırılan tedavi yöntemi hızla gelişmektedir (Beke vd., 2016). *P. dendritiformis*’in içerdiği bakteriyofajların, AYÇ etkeni olan *P. larvae* suşlarını enfekte eden faj içermesi, AYÇ tedavisinde “faj terapisi” açısından potansiyel bir kaynak olacağı düşünülmektedir.

Çalışmamızda izole edilen toplam 17 *P. dendritiformis* suşu hem geleneksel hem de moleküler olarak tanımlanmış, her birine *P. dendritiformis* denmesine, koloni ve bakteri morfolojileri benzer olmasına rağmen filogenetik analizleri ile biyokimyasal test sonuçlarının birebir benzer olmadığı gözlenmiştir (Tablo 5, Tablo 6/Şekil 6, Şekil 7, Şekil 8). Özellikle *P. dendritiformis* olarak tanımlanan PB11 ve PB22f’in 16S rRNA gen analizine göre % 98 örtüşme ve % 99 benzerlik taşımasına rağmen morfolojik karakterleri (sırasıyla S ve M tipi) ile biyokimyasal özellikleri karşılaştırıldığında (oksidaz aktivitesi, jelatin hidrolizi, Voges-Proskaver ve dihidrogenaz testleri) farklı olduğu gözlenmiştir (Pınarbaş, 2017). Faj çalışmasında da her iki konağın faj içerdiği ancak konak genişlikleri birbirinden farklı olduğunun belirlenmesi önemli bulunmuştur (Tablo 8). Bu durum aynı tür olmasına rağmen farklı suşlar olduğunu ve farklı biyotipik özellikler içerebileceklerini göstermektedir. Dolayısıyla geçmişte suş tanımlanmasında faj karakterizasyonu kullanılmakta olup günümüzde de suş biyotiplendirilmesinde fajların büyük katkısı gerçeğini doğrulamış olduğu düşünülmektedir.

Her bir fajın litik özelliklerini test etmek için damlatma testi kullanılır, çalışmamızda da suşlar Mit-C ile indüklenip çapraz enfeksiyon şeklinde damlatma yöntemi kullanıldı. Bu her bir fajın konakçı aralığının belirlenmesine ve fajlar arasındaki litik yetenek modellerinin karşılaştırılmasına izin verir. *Paenibacillus* kaynaklı lizojenik bakteriyofajı indüklemek için, Dingman vd. (1984) önerdiği yöntem

MYPGP sıvı besiyerinde modifiye edilerek kullanıldı (Hurst ve Reynolds, 2002; Alpay, 1999). Suşların indüklenme süreleri ve tam liz olma özelliği faj terapi için kullanılacak model organizma seçimi açısından önemlidir. Çalışmamızda test edilen 17 *P. dendritiformis* suşlarından özellikle hızlı üreyen ve hızlı liz olan suşlar (sırasıyla PB13.2, PB22f, PB14a, PB20, PB22b1, PB30a, PB31a ve PB11) büyük önem taşımaktadır. Bu suşlar kitlesel faj üretimi ve faj karakterizasyonu için ilk tercih edilecek potansiyel fajlardır (Tablo7/Şekil 9).

Örneklerden PB17 suşuna ait lizatın faj içerdiği, ancak bu faj için uygun bir konak bulunamadığı gözlemlendi (Tablo 9). Buna karşın petri plaklarında kendi kendine indüklenemediği (otoindüksiyon) ve de damlatma yönteminde damlatılan alanda geniş faj plakları oluşturması ilginç olarak bulunmuştur. Normal şartlarda bir konak faj içeriyor ise ikinci bir fajın bu konağı enfekte etmediği (faj interferns) bilinmektedir (Bradley, 1967). Ancak PB17 konağının içerdiği fajın mitomisin C ilavesiyle veya konağın muhtemel maruz kaldığı fizyolojik strese bağlı olarak hızlıca indüklendiği, muhtemelen özel ve güçlü bir mekanizmaya sahip olduğu düşünülmektedir. Bu konağın ve içerdiği fajın daha detaylı araştırılması gerekmektedir.

Lizat PB13.2, PB14a, PB18a fajları iki ayrı genusu enfekte edebildiği (*Paenibacillus* ve *Bacillus*) dolayısıyla benzer morfoloji veya özelliklere sahip fajlar içerdiği düşünülmektedir (Tablo 8, Tablo 9). PB20 fajının ise geniş konak aralığına sahip olduğu üç ayrı tür (*P. dendritiformis*, *P. larvae* ve *Bacillus* sp.) bakteriyi enfekte edebildiği belirlendi. Bakteriyofaj PB22f'in spesifik olarak çok sayıda *P. larvae* suşunu enfekte edebildiği dolayısıyla geniş ve spesifik bir konak spektrumu olduğu gözlemlendi. Diğer bakteriyofajlar ise sırasıyla PB11, PB23c ve PB3.3b daha dar ancak spesifik olarak tek bir türü (*P. larvae*) enfekte edebilen fajlar olduğu belirlendi. Bu fajların konak spektrumuna bakıldığında üçünün sadece tek bir türü enfekte etmesine rağmen farklı konakları enfekte ettiği farklı biyotipe sahip suşlar olduğu, faj içeriğinin de farklı olduğu düşünülmektedir (Tablo 9).

P. dendritiformis türüne ait bakteriyofaj olup aynı türün başka bir suşunu enfekte edebilen tek fajın PB17 (kendini) ve PB20 (PB13.2) olduğu, bu fajların hareketli bir suş olan *P. dendritiformis* kültüründe plak oluşturmaları ilginç ve önemli

olduğu, güçlü liz aktivitelerine sahip olduğu düşünölmektedir. Ancak bu konuda daha detaylı çalışmaların yapılması, faj morfolojilerinin aydınlatılarak faj tipinin belirlenmesi ve de moleküler olarak genom analizlerinin yapılması gerekmektedir.

Lapidot vd. (2015) tarafından yapılan çalışmada *P. dendritiformis*'in *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* tarafından enfekte edilmiş olan patates bitkilerinde etkinliği incelenmiş, potansiyel bir biyokontrol ajan olabileceği bildirilmiştir. Çalışmamızda indüklenen *P. dendritiformis* suşlarına ait lizatların 10'unda (PB11, PB14a, PB18a, PB22.b1, PB22f, PB23b, PB26a, PB26c, PB30a ve PB32a) antimikrobiyal etkinlik/ bakteriyosin varlığı belirlendi (Tablo 8). Bu suşların muhtemelen farklı suşlara özellikle bitki patojeni suşlara karşı etkinliğinin var olabileceği, dolayısıyla çalışılması ve biyokontrol ajan olma potansiyellerinin araştırılması gerekmektedir.

Literatürlerde *P. dendritiformis* türü ile yapılan çalışmalar genellikle bakteri koloni morfolojisi özelliğinden kaynaklanan farklılıklar, antimikrobiyal madde üretimleri ve biyokontrol ajan olma potansiyelleri ile ilgili çalışmalardır (Lapidot vd., 2015; Tcherpakov vd., 1999; Avraham vd., 2011; Avraham vd., 2009).

Tcherpakov vd. (1999)'un yapmış oldukları çalışmada morfotip olarak *P. dendritiformis* türünün desen oluşturunca izolatlarn tanımlanması ve fenotipik karakterizasyonları ile ilgili çalışmalardır. Çalışmamızda izole edilen suşların farklı besiyerinde desen oluşturma ya da üreme şekillerinin izlenmesi yapılmamıştır. Ancak ileri çalışmalarda biyotip ayırımında kullanılabilecek bu yönteminde kullanılması yararlı olacağı düşünölmektedir.

Bakteriyofajların başta su olmak üzere gıdaların ve insan gastrointestinal sisteminin doğal florasında yüksek sayıda bulunması ve tüketiminin insanda zararlı etkileri olmaması, bakteriyofajların gıdalarda antibakteriyel ajan olarak kullanılması fikrini doğurmuştur. Bu fikir doğrultusunda yapılan çalışmalar, bakteriyofajların antibakteriyel ajan olarak gıdaların korunmasında kullanılabileceğini ortaya koymuştur (Ergin vd., 2017). Ülkemizde ise bakteriyofajların gıdalarda antibakteriyel ajan olarak kullanımına yönelik sınırlı sayıda çalışma yapılmış olmakla birlikte, konu ile ilgili

herhangi bir yasal düzenleme bulunmamaktadır.

Bakteriyofajlar gıda sektöründe hastalığın önlenmesi, taze meyve ve sebze gibi ham maddelerin dekontaminasyonu; ekipman ve temas yüzeylerinin dezenfeksiyonu, kolay bozulabilir ürünlerde doğal koruyucu olarak kullanım ile raf ömrünün uzatılması amacıyla kullanılmaktadır. Ayrıca bakteriyofajların diğer koruma yöntemleri ile kombine edilerek koruyucu olarak kullanımları üzerinde de çalışmalar bulunmaktadır (Leverent vd., 2003; Abedon, 2009).

Bakteriyofaj tedavisi patojenik bakteriyel infeksiyonların tedavisi için litik bakteriyofajların terapötik kullanımıdır. Bakteriyofaj tedavisi Doğu Avrupa ve Amerika'daki araştırma grupları tarafından klinik kullanım için geliştirilmiştir ve antibiyotiklere bir alternatiftir. Bakteriyofaj tedavisi sadece insan hekimliğinde değil aynı zamanda diş hekimliği, veteriner hekimliği, gıda sektörü ve tarımda potansiyel uygulama alanına sahiptir. Bakteriyofaj tedavisinin ilaçların aksine neredeyse yok denecek kadar az yan etkisi vardır ve karaciğer üzerinde strese neden olmaz. Bakteriyofajlar hedef hücrede kendini replike ettiği için tek, küçük doz uygulama teorik olarak etkilidir. Dolayısıyla bakteriyofaj kokteyli başarı şansını artırmak için uygulanabilir veya klinik örnekler toplanarak uygun bakteriyofajlar identifiye edilerek üretimi sağlanabilir (Abhilash vd., 2008).

Bu çalışma *P. dendritiformis* suşlarında bakteriyofaj taraması yapılan ilk çalışma olup, literatürde benzer bir çalışmaya rastlanılmaması açısından önemli olabileceği düşünülmektedir.

5. ÖNERİLER

Arıların dünyanın en değerli varlıkları olması, arı florasına ait mikroorganizmaların çalışılması ve bu konuda geniş bilgi veri bankası oluşturulması hem ülke hemde arıcılık açısından önemli bir konudur. Çalışmamız arı florasında *P. dendritiformis* varlığı araştırılan ve bakteriyofaj/ bakteriyosin taşıyıcılığı belirlenen ilk çalışmadır. *P. dendritiformis* biyokontrol ajan olarak kullanılabilen bir suş olması açısından da ayrıca bir önem taşımaktadır.

Geleneksel ve moleküler olarak tanımlanmış *P. dendritiformis* suşlarının biyokontrol ajan olma potansiyelleri daha detaylı araştırılmalıdır.

Bakteriyofaj içerikleri belirlenen suşlara ait fajların TEM görüntüleri alınmalı ve fajların morfolojik karakterizasyonları daha detaylı yapılmalıdır.

Güçlü liz aktivitesi olan fajlar kitlesel üretilmeli ve faj genomu izole edilerek, sekans analizi yapılarak fajın moleküler tiplendirilmesi yapılmalıdır.

AYÇ'nin önlenmesi için farklı konakları enfekte edebilen *P. dendritiformis* fajlarının kullanılmasının, faj terapisi açısından önemli olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abedon, S.T., 2009.** Kinetics of phage-mediated biocontrol of bacteria. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6, 807-815.
- Abedon, S.T., Kuhl, S.J., Blasdel, B.G. and Kutter, E.M., 2011.** Phage treatment of human infections. *Bacteriophage*, 1, 66-85. DOI: 10.4161/bact.1.2.15845.
- Abhilash, M., Vidya, A. and Jagadevi, T., 2008.** Bacteriophage Therapy. A War Against Antibiotic Resistant Bacteria. *The Internet Journal of Alternative Medicine*, 7, 1.
- Ackermann, H.W. and DuBow, M.S., 1987.** Viruses of Prokaryotes. CRC Press, Inc., Boca, Raton, U.S.A.
- Ackermann, H.W., 1992.** Frequency of morphological phage descriptions. *Archives of Virology*, 124, 201.
- Ackermann, H.W., 2011.** Bacteriophage taxonomy in 1987. *Microbiological Sciences*, 4, 214-218.
- Akan, E., 1994.** Genel ve Özel Viroloji. Saray Medikal Yayıncılık, Yayın no: 7816, 3. Baskı, 63-75.
- Akman, M., 1977.** Bakteri Genetiği. Cumhuriyet Üniversitesi Yayını no:1, 179 s.
- Alpay, Ş., 1999.** Vajinal kaynaklı laktobasillerde bakteriyofaj ve bakteriyosinlerin araştırılması. Doktora tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, Türkiye, 124 s., 11-20.
- Ash, C., Priest, F.G. and Collins, M.D., 1993.** Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 64, 253-260.
- Avraham, B., Rachel, S., Smith, H.P., Zhang, E.L., Florin, S., Payne, M. and Harry, L., 2009.** *Paenibacillus dendritiformis* Bacterial Colony Growth Depends On Surfactant But Not On Bacterial Motion Swinney. *Journal of Bacteriology*, 191, 18, 5758-5764.
- Avraham, B.E., Florin, E.L., Carolyn, R., Fisher, H. and Swinney, M., 2011.** Surviving Bacterial Sibling Rivalry. Inducible and Reversible Phenotypic Switching in *Paenibacillus dendritiformis*. Department of Physics, University of Texas at Austin, and Section of Molecular Genetics and Microbiology Austin, Texas, USA.
- Aydoğan, D.Y. ve Hadımlı, H.H., 2016.** Bakteriyofaj Tedavisi. *Etlik Vet Mikrobiyol Dergisi*, 27, 1, 38-47.

- Baş, Y., 2015.** Bal peteklerinden izole edilen sporlu basillerin karakterizasyonu ve antimikrobiyal duyarlılıkları. Yüksek lisans tezi, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü, Rize, Türkiye, 109 s., 49.
- Beims, H., Wittmann, J., Bunk, B., Spröer, C., Rohde, C., Günther, G., Rohde, M., von der Ohe W. and Steinert, M., 2015.** *Paenibacillus larvae* directed bacteriophage HB10c2 and its application in American foulbrood affected honey bee larvae. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 5411–5419. DOI: 10.1128/AEM.00804-15.
- Beke, G., Stano, M. and Klucar, L., 2016.** Modeling the interaction between bacteriophage and their bacterial hosts. *Mathematical Biosciences*, 279, 27–32.
- Bradley, D.E., 1967.** Ultrastructural of bacteriophage and bacteriocin. *Bacteriol. Rev.*, 31, 230–314.
- Brüssow, H., Canchaya, C. and Hardt, W.D., 2004.** Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68, 560–602. DOI: 10.1128/MMBR.68.3.560-602.2004.
- Burnet, F.M. and Freeman, M., 1937.** A Comparative Study Of The Inactivation of A Bacteriophage By Immune Serum And By Bacterial Polysaccharide. *Australian Journal of Experimental Biology And Medical Science* Banner. DOI: 10.1038/ícb.1937.6.
- Campos-Herrera, R., El-Borai, F.E., Stuart, R.J., Graham, J.H. and Duncan, L.W., 2011.** Entomopathogenic nematodes, phoretic *Paenibacillus* spp. and the use of real-time quantitative PCR to explore soil food webs in Florida citrus groves. *Journal of Invertebrate Pathology*, 108, 30–9.
- Clokie, M.R.J., Kropinski, A.M. and Walker, J.M., 2009.** *Bacteriophages Methods and Protocols*, Volume 1: Isolation, Characterization and Interactions. Humana Press, New York, pp. 23–33, 69–113, ISBN 978-1-58829-5.
- Conrat, H.R., Kimbal, P.C. and Levy, J.A. 1988.** Medium and large DNA bacteriophages. In: *Virology*. Second Edition. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, pp. 240–296.
- Cooper, C.J., Khan Mirzaei, K.M. and Nilsson, A.S., 2016.** Adapting Drug Approval Pathways for Bacteriophage Based Therapeutics. 7, 1209. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01209.
- Czajkowski, R., Perombelon, M.C.M., van Veen, J.A. and van der Wolf, J.M., 2011.** Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species. A review. *Plant Pathology*, 60, 999–1013.
- Davis, B.D., Dulbecco, R., Bisen, H.N. and Ginsberg, H.S., 1980.** *Microbiology Including Immunology and Molecular Genetics*. Third Ed. Harper & Row,

Publishers London, pp. 919-940.

- De Graaf, D.C., Alippi, A.M., Antúnez, K., Aronstein, K.A., Budge, G., De Koker, D., De Smet, L., Dingman, D.W., Evans, J.D., Foster, L.J., Fünfhaus, A., Garcia-Gonzalez, E., Gregorc, A., Human, H., Murray, K.D., Nguyen, B.K., Poppinga, L., Spivak, M., vanEngelsdorp, D., Wilkins, S. and Genersch, E., 2013.** Standard methods for American foulbrood research. *Journal of Apicultural Research*, 52, 1, 1-27. DOI: 10.3896/IBRA.1.52.1.11.
- Dingman, D.W. and Stahly, D.P., 1983.** Medium promoting sporulation of *Bacillus larvae* and metabolism of medium components. *Applied and Environmental Microbiology*, 46, 860-869.
- Dingman, D.W., Bakhiet, N., Field, C.C. and Stahly, D.P., 1984.** Isolation of two bacteriophage from *Bacillus larvae*, PBL 1 and PBL 0.5 and partial characterization of PBL 1. *Journal of General Virology*, 65, 1101-1105.
- Dodd, H.M. and Gasson, M.J., 1994.** Bacteriocin of lactic acid bacteria. In: *Genetics and Biotechnology of Lactic Acid Bacteria*. First ed., Gasson, J.M., De Vos, W. (Eds). Chapman - Hall, New York, pp. 211-251.
- Ergin, F., Yıldız, G., Çomak, E.M. ve Küçükçetin, A., 2017.** Bakteriyofajların Antibakteriyel Ajan Olarak Kullanımı. Akdeniz Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Antalya, 172-181. DOI: 10.24323/akademik-gida.333674.
- Endersen, L., Coffey, A., Neve, H., Olivia, M. and Paul, R., 2013.** Isolation and characterisation of six novel mycobacterio phages and investigation of their antimicrobial potential in milk. *International Dairy Journal*, 28, 1, 8-14. DOI: 10.1016/j.idairyj.2012.07.010.
- Freifelder, D., 1987.** *Microbial Genetics*. Chapter 5, Jones and Bartlett Publishers, Inc. Boston, p. 89-110.
- Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U. and Ball, L.A., 2005.** *Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses.. Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, Tokyo, pp.10-30.
- Gündoğdu, A. ve Ulu Kılıç, A., 2018.** Bakteriyofaj Terapisi: Unutulmuş Bir Şifa Kaynağı. *Klinik Dergisi*, 31, 2, 78-87.
- Haq, I.U., Chaudhry, W.N., Akhtar, M.N. and Andleeb, S., 2012.** Bacteriophages and their implications on future biotechnology. A review. *Virology Journal*, 9, 1. DOI: 10.1186/1743-422X-9-9.
- Henein, A., 2013.** What are the limitations on the wider therapeutic use of phage, Bacteriophage. DOI: 10.4161/bact.24872.

- Hermoso, J.A., 2007.** Taking aim on bacterial pathogens :from phage therapy to enzybiotics.com. DOI: 10.461-472.
- Hurst, C.J. and Reynolds, K.A., 2002.** Sampling viruses from soil. Chapter 48: In: Manual of environmental microbiology. Edited by Hurst C.J., Crawford R.L., R. K.G., McInerney M.J., D. S.L., 2nd edition edn. Washington, D.C., USA, American Society for Microbiology, Press, 527-534.
- Joklik, W.K., Willett, H.P. and Amos, D.B., 1984.** The Bacteriophages. In Zinsser Microbiology. Eight Ed. Appleton-Century-Crofts/Norwalk, Connecticut, pp. 957-976.
- Joklik, W.K., Willet, H.P., Amos, D.B. and Wilfert, C.M., 1992.** Zinsser Microbiology. 20. Baskı, Printice Hall International, Inc., New Jersey, 906.
- Johnson, R.P., Gyles, C.L., Huff, W.E., Ojha, S., Huff, G.R., Rath, N.C. and Donoghue, A.M., 2008.** Bacteriophages for prophylaxis and therapy in cattle, poultry and pigs. Animal Health Research Reviews, 9, 201–215. DOI: 10.1017/S1466252308001576.
- Karasartova, D., 2009.** Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen *Staphylococcus Aureus* Suşlarının Faj Tiplerinin ve Özelliklerinin Araştırılması. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye, s., 118, 21-22.
- Klaenhammer, T.R. and Fitzgerald, G.F., 1994.** Bacteriophages and bacteriophage resistance In Genetics and Biotechnology of Lactic Acid Bacteria. Firsted. Gasson J.M., De Vos W., Chapman, Hall (Eds). New York, pp. 106-168.
- Kılıç, A.O., Pavlova, S.I., Ma, W. and Tao, L., 1996.** Analysis of *Lactobacillus* phages and bacteriocins in American dairy products and characterization of a phage isolated from yogurt. Applied and Environmental Microbiology, 62, 2111-2116.
- Lal, S. and Tabacchioni, S., 2009.** Ecology and biotechnological potential of *Paenibacillus polymyxa*: a mini review. Indian Journal of Microbiology, 49, 2–10.
- Lapidota, D., Drora, R., Vered, E., Mishlic, O., Levy, D. and Helmana, Y., 2015.** Disease protection and growth promotion of potatoes (*Solanum tuberosum* L.) by *Paenibacillus dendritiformis*. Plant Pathology, 64, 545–551. DOI: 10.1111/ppa.12285.
- Leverentz, B., Conway, W.S., Camp, M.J., Jan-isiewicz, W.J., Abuladze, T., Yang, M., Saftner, R. and Sulakvelidze, A., 2003.** Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on fresh cut produce by treatment with lytic bacteriophages and a bacteriocin. Applied and Environmental Microbiology, 69, 4519–4526.
- Lewin, B., 1994.** Phage strategies: Lytic cascades and lysogenic repression. Genes V. Firsted. Chapter 17. Oxford University, New York, pp. 495-523.

- Loc Carrillo, C. and Abedon, S.T., 2011.** Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage*, 1, 111–114. DOI: 10.4161/bact.1.2.14590.
- Ly-Chatain, M.H., 2014.** The factors affecting effectiveness of treatment in phages therapy. *Frontiers in Microbiology*, 5, 51. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00051.
- McSpadden Gardener, B.B., 2004.** Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in agricultural systems. *Phytopathology*, 94, 1252–1258.
- Nilsson, A.S., 2014.** Phage therapy constraints and possibilities. *Journal of Medical Sciences*, 119, 192-198.
- Nobrega, F., Costa, A., Kluskens, L. and Azeredo, J., 2015.** Revisiting phage therapy: new applications for old resources. *Trends in Microbiology*, 23, 4, 185-191.
- Ouyang, J., Pei, Z., Lutwick, L., Dalal, S., Yang, L., Cassai, N., Sandhu, K., Hanna, B., Wieczorek, R.L., Bluth, M. and Pincus, M.R., 2008.** Case report: *Paenibacillus thiaminolyticus*: a new cause of human infection, inducing bacteremia in a patient on hemodialysis. *Annals of Clinical Laboratory Science*, 38, 393–400.
- Pelczar, M.J., Chan, E.C.S. and Krieg, N.R., 1993.** Viruses: morfology, classification, replication. In: *Microbiology Concepts and Applications*. McGraw-Hill, London, p. 409-421.
- Pınarbaşı, M., 2017.** Amerikan Yavru Çürüklüğü Şüpheli Arı (*Apis Mellifera*) ve Arı Ürünlerinden İzole Edilen Gram Pozitif Bakterilerin Karakterizasyonu, Antibiyotik Duyarlılıkları ve *Paenibacillus larvae* İzolatlarının Genetik Çeşitliliği. Yüksek Lisans Tezi. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Rize, Türkiye, 101 s., 91, 11-12.
- Pirnay, J.P., Blasdel, B.G., Bretau, L., Buckling, A., Chanishvili, N., Clark, J.R., Corte-Real S., Debarbieux, L., Dublanchet, A., De Vos D., Gabard, J., Garcia, M., Goderdzishvili, M., Górski, A., Hardcastle, J., Huys, I., Kutter, E., Lavigne, R., Merabishvili, M., Olchawa, E., Parikka, K.J., Patey, O., Pouillot, F., Resch, G., Rohde, C., Scheres, J., Skurnik, M., Vanechoutte, M., Van Parys, L., Verbeken, G. and Zizi, M., 2015.** Quality and safety requirements for sustainable therapy products. *Pharmaceutical Research*, 32, 2173–2179. DOI: 10.1007/s11095-014-1617-7.
- Sirota, A., Olender, T., Helman, Y., Brainin, I., Finkelshtein, A., Roth, D., Hagai, E., Leshkowitz, D., Brodsky, L., Galatenko, V., Nikolaev, V., Gutnick, D.L., Lancet, D. and Ben-Jacob, E., 2012.** Genome Sequence of the Pattern-Forming Social Bacterium *Paenibacillus dendritiformis* C454 Chiral Morphotype. *Journal of Bacteriology*, p.2127–2128. DOI:10.1128/JB.00158-12.
- Sulakvelidze, A., Alavidze, Z. and Morris, J.G., 2001.** Bacteriophage therapy.

Antimicrobial Agents Chemother, 45, 649–659. DOI: 10.1128/AAC.45.3.649-659.2001.

Summers, W.C., 1999. Félix d'Herelle and the Origins of Molecular Biology. New Haven, Conn: Yale University Press.

Tcherpakov, M., Ben-Jacob, E. and Gutnick, D.L., 1999. *Paenibacillus dendritiformis* sp. nov., proposal for a new pattern-forming species and its localization within a phylogenetic cluster. International Journal of Systematic Bacteriology, 49, 239-246.

Trevors, K.E., Holley, R.A. and Kempton, A.G., 1983. Isolation and characterization of a *Lactobacillus plantarum* bacteriophage isolated from a meat starter culture. Journal of Applied Bacteriology, 54, 281-288.

Tsonos, J., Vandenheuvel, D., Briers, Y., De Greve, H., Hernalsteens, J.P. and Lavigne, R., 2014. Hurdles in bacteriophage therapy: Deconstructing the parameters. Veterinary Microbiology, 171, 460-469.

Törümküney, D., 1996. Çeşitli Muayene Maddelerinden İzole Edilen *Staphylococcus Aureus* Suşlarında Bakteriyofaj Tip Tayini.Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye, s.,62. 3-12.

Ugorcakova, J., Medzova, L., Solteszova, B. and Bukovska, G., 2015. Characterization of a phiBP endolysin encoded by the *Paenibacillus polymyxa* CCM 7400 phage, FEMS Microbiology Letters. Volume 362, Issue 13, July fnv098. DOI: 10.1093/femsle/fnv098.

Ustaçelebi, Ş., 1992. Genel Viroloji. Hacettepe-Taş Kitapçılık. Sıhhiye, Ankara,s. 89-99.

URL-1, 2017. <http://www.tgw1916.net/Bacillus.html> (20 Ekim2017).

URL-2, 2017. <http://www.bgsc.org/catalogs/Catpart5.pdf> (20 Ekim2017).

URL-3, 2017. <http://www.tgw1916.net/Bacillus/dendritiformis.html> (20 Ekim2017).

URL-4, 2019. <http://contohcontoh.club/contoh-virus-bakteriofage.html> (17 Şubat 2019).

URL-5, 2019. http://www.accessexcellence.org/RC/VL/GG/bact_Lambda.html (17 Şubat 2019).

Vallat, B., Edwards, S. and O'Neill, B., 2012. Manuel of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. World Organisation for Animal Health, 1, 365-380.

Verma, P., Yadav, A.N., Kazy, S.K., Saxena, A.K. and Suman, A., 2014. Evaluating the diversity and phylogeny of plant growth promoting bacteria associated with

wheat (*Triticum aestivum*) growing in central zone of India. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 3, 432–47.

Viertel, T., Ritter, K. and Horz, H., 2014. Viruses versus bacteria novel approaches to phage therapy as a tool against multidrug resistant pathogens. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2326-2336. DOI: 10.1093/jac/dku173.

Yokokura, T., Kodaira, S., Ishiwa, H. and Sakuria, T., 1974. Lysogeny in lactobacilli. Journal of General Microbiology, 84, 277-284.

Yoong, P., Schuch, R., Nelson, D. and Fischetti, V., 2006. PlyPH, a Bacteriolytic Enzyme with a Broad pH Range of Activity and Lytic Action against *Bacillus anthracis*. Journal of Bacteriology, 188, 7, 2711–2714. DOI: 10.1128/JB.188.7.2711-2714.2006.

Wittebole, X., De Roock, S. and Opal, S.M., 2013. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. Virulence, 5, 226-235.

ÖZGEÇMİŞ

Merve KARALI, 01.02.1993 tarihinde Rize’de doğdu. İlkokulu ve ortaokulu Türkiye Odalar ve Borsalar Birliği ilköğretim okulunda, liseyi ise Rize Lisesi’nde tamamladı. 2010 yılında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde eğitimine başladı ve 2014 yılında mezun oldu. 2016 yılında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı’nda başladığı Yüksek Lisans öğrenimini halen devam ettirmektedir.

