

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



PSEUDOMONAS AERUGINOSA FAJLARININ İZOLASYONU
VE TANIMLANMASI

GIDA MÜHENDİSLİĞİ DOKTORA TEZİ

ŞEYMA BETÜL ENCU

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. İbrahim ÇAKIR

BOLU, ARALIK 2024

KABUL VE ONAY SAYFASI

Şeyma Betül ENCU tarafından hazırlanan “**PSEUDOMONAS AERUGİNOSA FAJLARININ İZOLASYONU VE TANIMLANMASI**” adlı tez çalışması jürimiz tarafından Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı Doktora Programında Doktora Tezi olarak oy birliğiyle kabul edilmiştir. 30/12/2024

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman

Prof. Dr. İbrahim ÇAKIR

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

Üye

Prof. Dr. Esra ACAR SOYKUT

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

Üye

Prof. Dr. Seda KARASU YALÇIN

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

Üye

Prof. Dr. Hakan KULEAŞAN

Süleyman Demirel Üniversitesi

Üye

Prof. Dr. Serap COŞANSU AKDEMİR

Sakarya Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. İbrahim KÜRTÜL

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

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

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

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

.....

ŞEYMA BETÜL ENCU

ÖZET

**PSEUDOMONAS AERUGINOSA FAJLARININ İZOLASYONU VE
TANIMLANMASI
DOKTORA TEZİ
ŞEYMA BETÜL ENCU
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI
GIDA MÜHENDİSLİĞİ DOKTORA PROGRAMI
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. İBRAHİM ÇAKIR)**

**BOLU, ARALIK - 2024
XII + 117 sayfa**

Pseudomonas aeruginosa, yüksek antibakteriyel direnci, ortam koşullarına hızlı uyum sağlayabilmesi ve biyofilm üretimi ile ön plana çıkan fırsatçı bir patojendir. Bakteriyofajlar, bakteri hücrelerini enfekte ederek onların inhibe olmasını sağlayan virüslerdir. Bu çalışmada *P. aeruginosa*'ya etkili fajların izolasyonu ve karakterizasyonu amaçlanmıştır. Çalışma kapsamında 8 farklı *P. aeruginosa* suşu ve 15 fajın izolasyonu ve saflaştırılması sağlanmıştır. Fajların latent dönemleri 5-30 dk. arasında; patlama büyüklükleri ise 10 ile 200 POB/hücre arasında bulunmuştur. Bu fajların adsorpsiyon hızları ise $4,6 \times 10^{-7}$ ile $1,62 \times 10^{-8}$ mL/dk arasında bulunmuştur. Adsorpsiyon oranları ise en düşük %87 ve en yüksek %100 olarak bulunmuştur. Fajların konakçı skalası ve EOP değerleri belirlenmiştir. Fajlar çalışmada kullanılan farklı cinsteki bakterileri enfekte etmezken farklı bir tür olan *P. brassicacearum*'a da litik etki göstermiştir. Yine tez kapsamında fajların farklı sıcaklık, pH ve NaCl içeren ortamlarda yüksek stabilite gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca fajların farklı oranlarda antibiyofilm etkinliği tespit edilmiştir. Fajların DNA'ları izole edilmiş ve *Sma*I, *Nde*I, *Eco*RI, *Eco*RV, *Xho*I restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. RFLP analizinin sonucuna göre 8 farklı faj seçilmiştir. Bu fajların TEM mikrogramlarına göre podovirüs olduğu, kafa çaplarının 42,6 nm ile 69,6 nm; kuyruk uzunluklarının ise 10 nm ile 41,6 nm arasında olduğu bulunmuştur. Bu fajlardan oluşturulan karışım ile su, yağsız süt ve marul örneklerinde *P. aeruginosa*'ya karşı denemeler yapılmıştır. Faj karışımı MOI 100 değerinde su ve yağsız sütteki bakterileri tamamen inhibe etmiştir. Marul örneğinde ise inhibisyon elde edilememiştir. Çalışmada *P. aeruginosa* suşları 48 saat boyunca faj karışımına tabi tutulmuş ve süre sonunda suşların streptomisine, siproflaksasine, tetrasikline ve penisiline karşı farklı düzeylerde duyarlılık kazandığı tespit edilmiştir.

ANAHTAR KELİMELELER: *Pseudomonas aeruginosa*, Bakteriyofaj, Faj terapi, Antibiyofilm

ABSTRACT

**ISOLATION AND IDENTIFICATION OF PSEUDOMONAS
AERUGINOSA PHAGE
PHD THESIS
ŞEYMA BETÜL ENCU
BOLU ABANT İZZET BAYSAL UNIVERSITY
INSTITUTE OF GRADUATE STUDIES
DEPARTMENT OF FOOD ENGINEERING
(SUPERVISOR:Prof. Dr. İBRAHİM ÇAKIR)**

**BOLU, DECEMBER 2024
XII + 117 pages**

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen that stands out with its high antibacterial resistance, rapid adaptation to environmental conditions, and biofilm production. Bacteriophages are viruses that infect bacterial cells and inhibit them. This study aimed to isolate and characterize phages effective against *P. aeruginosa*. Within the scope of the study, isolation and purification of 8 different *P. aeruginosa* strains and 15 phages were provided. The latent periods of the phages were found to be between 5 min and 30 min; and their burst sizes were found to be between 10 and 200 POB/cell. The adsorption rates of these phages were found to be between 4.6×10^{-7} and 1.62×10^{-8} mL/min. The adsorption rates were found to be the lowest 87% and the highest 100%. The host scale and EOP values of the phages were determined. While the phages did not infect different types of bacteria used in the study, they also showed lytic effects on a different species, *P. brassicacearum*. Again, within the scope of the thesis, it was determined that the phages showed high stability in different temperature, pH and NaCl containing environments. In addition, different rates of antibiofilm activity of the phages were determined. DNAs of the phages were isolated and cut with *Sma*I, *Nde*I, *Eco*RI, *Eco*RV, *Xho*I restriction enzymes. According to the results of RFLP analysis, 8 different phages were selected. According to TEM micrographs, these phages were found to be podovirus, their head diameters were between 42.6 nm and 69.6 nm, and their tail lengths were between 10 nm and 41.6 nm. The mixture formed from these phages was tested against *P. aeruginosa* in water, skim milk and lettuce samples. The phage mixture completely inhibited the bacteria in water and skim milk at MOI 100. Inhibition was not obtained in the lettuce sample. In the study, *P. aeruginosa* strains were exposed to the phage mixture for 48 hours and at the end of the period, it was determined that the strains gained different levels of sensitivity to streptomycin, ciprofloxacin, tetracycline and penicillin.

KEYWORDS: *Pseudomonas aeruginosa*, Bacteriophage, Phage Therapy, Antibiofilm

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
TABLO LİSTESİ	ix
FOTOĞRAF LİSTESİ	x
KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ	xi
TEŞEKKÜR	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
1.1.1 Patojenite ve Virülans Faktörler	5
1.1.2 Biyofilm Oluşumu	7
1.1.3 Antimikrobiyal Direnç.....	8
1.2 Bakteriyofajlar	9
1.2.1 Fajların Yapısı	10
1.2.2 Fajların Yaşam Döngüleri	11
1.2.3 Fajların Sınıflandırılması.....	13
1.2.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Fajları	15
1.3 Fajların Gıdalarda Kullanımı	19
1.3.1 Biyokoruma	19
1.3.2 Sanitasyon ve Antibiyofilm Ajanı	23
2. MATERYAL ve YÖNTEM.....	26
2.1 Materyal	26
2.1.1 Bakteriler	26
2.1.2 Antibiyotik Duyarlılık Testi	26
2.1.3 İzolasyon Örnekleri	26
2.2 Yöntem	27
2.2.1 Bakteri İzolasyonu.....	27
2.2.2 Bakteriyofaj İzolasyonu.....	30
2.2.3 Fajların Zenginleştirilmesi, Titre Belirleme ve Saflaştırma	30
2.2.4 Fajların Gelişme Eğrilerinin Belirlenmesi.....	31
2.2.5 Fajların Adsorpsiyon Grafiklerinin Belirlenmesi	31
2.2.6 Fajların Konakçı Skalasının Belirlenmesi	32
2.2.7 Fajların Farklı Koşullarda Stabilitesinin Belirlenmesi	32
2.2.8 Fajların Antibiyofilm Özelliklerinin Belirlenmesi	33

2.2.9 Fajların DNA İzolasyonu	34
2.2.10 Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) Analizi ...	34
2.2.11 Fajların Morfolojik Karakterizasyonu.....	35
2.2.12 Plak Etkinliğinin (EOP) Belirlenmesi	35
2.2.13 Fajların Litik Etkisinin Belirlenmesi.....	35
2.2.14 Gıda Denemesi	36
2.2.15 Antibiyotik Duyarlılık Testi.....	37
3. BULGULAR	38
3.1 <i>P. aeruginosa</i> İzolasyonu	38
3.2 Bakteriyofaj İzolasyonu.....	39
3.3 Fajların Zenginleştirilmesi, Titresinin Belirlenmesi ve Saflaştırılması	40
3.4 Fajların Replikasyon Parametreleri	42
3.4.1 Fajların Gelişme Eğrileri	42
3.4.2 Fajların Adsorpsiyon Süreleri ve Oranları.....	45
3.5 Fajların Konakçı Skalasının Belirlenmesi	48
3.6 Fajların Farklı Koşullarda Stabilitesinin Belirlenmesi	50
3.6.1 Sıcaklık Stabilitesi	50
3.6.2 pH Stabilitesi	51
3.6.3 Farklı NaCl Konsantrasyonu	54
3.7 Fajların Antibiyofilm Özelliklerinin Belirlenmesi	56
3.8 Fajların DNA İzolasyonu.....	59
3.9 Fajların RFLP Analizi.....	59
3.10 Fajların Morfolojik Karakterizasyonu	64
3.11 Plak Etkinliğinin (EOP) Belirlenmesi.....	66
3.12 Fajların Litik Etkisinin Belirlenmesi	67
3.13 Gıda Uygulaması	70
3.14 Antibiyotik Duyarlılık Testi.....	71
4. TARTIŞMA	74
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	94
KAYNAKLAR	99
EKLER.....	114

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1. T4 fajının temel yapısı	11
Şekil 1.2. Litik döngü	12
Şekil 1.3. Lizogenik döngü	13
Şekil 1.4. Morfolojiye dayalı <i>Caudovirales</i> faj aileleri (eski sınıflandırma)....	14
Şekil 1.5. <i>Caudoviricetes</i> sınıfına ait farklı faj örnekleri.....	16
Şekil 1.6. PhiKZ (a) ve PhiKZ benzeri fajın (b) iç gövde yapıları	17
Şekil 1.7. <i>Inoviridae</i> şematik gösterimi	17
Şekil 1.8. <i>Cystoviridae</i> şematik gösterimi	18
Şekil 3.1. Fajların gelişme eğrileri	44
Şekil 3.2. Fajlara ait adsorpsiyon grafikleri	47
Şekil 3.3. Sıcaklık değişimine bağlı faj titreleri.....	51
Şekil 3.4. pH değişimine bağlı faj titreleri	52
Şekil 3.5. pH değişimine bağlı faj titreleri	54
Şekil 3.6. NaCl konsantrasyonuna bağlı faj titreleri	55
Şekil 3.7. MOI:1 değerinde <i>P. aeruginosa</i> C10'a fajların litik etkisi.....	67
Şekil 3.8. MOI:10 değerinde <i>P. aeruginosa</i> 'ya fajların litik etkisi	68
Şekil 3.9. MOI:100 değerinde <i>P. aeruginosa</i> 'ya fajların litik etkisi	69
Şekil 3.10. Faj karışımının bakteri karışımına etkisi	70
Şekil 3.11. İnkübasyon sonunda örneklerde bulunan bakteri yükü	71

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1. Bakteri izolasyonunda kullanılan örnekler.....	26
Tablo 2.2. Faj izolasyonunda kullanılan örnekler	27
Tablo 2.3. Enzim kesime giren bileşenler	35
Tablo 2.4. Örnek gruplarında bulunan faj ve bakteri miktarları.....	36
Tablo 3.1. İzole edilen <i>P. aeruginosa</i> suşları	39
Tablo 3.2. İzole edilen <i>Pseudomonas</i> spp.	39
Tablo 3.3. Tez kapsamında kullanılan fajlar	41
Tablo 3.4. Fajların replikasyon parametreleri	44
Tablo 3.5. Fajların adsorpsiyon hızı ve oranı	47
Tablo 3.6. Fajların <i>P. aeruginosa</i> suşlarına karşı litik aktiviteleri	48
Tablo 3.7. Fajların farklı tür ve cinslere karşı litik aktiviteleri	49
Tablo 3.8. Fajların farklı sıcaklıklardaki titresini	50
Tablo 3.9. Farklı asidik koşullarda faj titreleri	52
Tablo 3.10. Farklı bazik koşullarda faj titreleri	53
Tablo 3.11. Biyofilm oluşumunun inhibisyonu.....	56
Tablo 3.12. Oluşan biyofilmin giderilmesi	57
Tablo 3.13. Biyofilm oluşumunun engellenmesi	58
Tablo 3.14. Enzim kesimine göre faj grupları	63
Tablo 3.15. Enzim kesimlerine göre yaklaşık genom büyüklükleri.....	64
Tablo 3.16. Fajların morfolojik özellikleri	66
Tablo 3.17. Fajların heterolog konakçılara ait plak etkinliği	66
Tablo 3.18. Suşların antibiyotik duyarlılıkları	72

FOTOĞRAF LİSTESİ

Sayfa

Fotoğraf 3.1. Biyokimyasal testler.....	38
Fotoğraf 3.2. Damlatma yapılan Petriler.....	40
Fotoğraf 3.3. Titre belirleme	41
Fotoğraf 3.4. Farklı plak morfolojisine sahip fajlar	41
Fotoğraf 3.5. Fajların <i>P. aeruginosa</i> C10 üzerindeki litik zonları.....	49
Fotoğraf 3.6. Biyofilm oluşumunu belirlemek için boyanan kuyucuklar	58
Fotoğraf 3.7. Jele yüklenen DNA'lar.....	59
Fotoğraf 3.8. Faj DNA'larının <i>SmaI</i> enzimi ile elde edilen jel görüntüsü.....	60
Fotoğraf 3.9. Faj DNA'larının <i>XhoI</i> enzimi ile elde edilen jel görüntüsü	61
Fotoğraf 3.10. Faj DNA'larının <i>EcoRI</i> enzimi ile elde edilen jel görüntüsü...	61
Fotoğraf 3.11. Faj DNA'larının <i>EcoRV</i> enzimi ile elde edilen jel görüntüsü .	62
Fotoğraf 3.12. Faj DNA'larının <i>NdeI</i> enzimi ile elde edilen jel görüntüsü	63
Fotoğraf 3.13. Fajlara ait TEM mikrografları	65

KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ

AmpC	: β -laktamaz
BAVS	: Bakteriyel ve Arkaeal Alt Komite
CRISPR-Cas	: Düzenli Aralıklarla Bölünmüş Palindromik Tekrar Kümeleri- Cas9 ilişkili protein
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
dsDNA	: Çift Zincirli Deoksiribo Nükleik Asit
EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit
EOP	: Plak Etkinliği
EPS	: Ekzopolisakkarit
ICTV	: Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi
KF	: Kistik Fibröz
KOB	: Koloni Oluşturan Birim
LasA	: Elastaz A
LasB	: Elastaz B
LecB	: Lektin B
LPS	: Lipopolisakkarit
MALDI	: Matris Destekli Lazer Desorpsiyon/İyonlaştırma Kütle Spektrometresi
mL	: Mililitre
MOI	: Enfeksiyon Çokluğu
NaCl	: Sodyum Klorür
NCBI	: Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
ORF	: Açık Okuma Çerçevesi
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
POB	: Plak Oluşturan Birim
QS	: Quorum Sensing
RFLP	: Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi
RNA	: Ribonükleik Asit
SM	: Salin Magnezyum
ssDNA	: Tek Zincirli Deoksiribo Nükleik Asit
ssRNA	: Tek Zincirli Ribo Nükleik Asit
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
Psl	: Polisakkarit Sentez Lokusu
Pel	: Pellikül Lokusu

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve doktora sürecimde danışmanlığımı yapan, bu uzun yolda yanımda olup maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, çokça derdimi dinleyen kıymetli danışmanım Prof. Dr. İbrahim ÇAKIR'a ve beni çalışmayı çok sevdiğim fajlarla tanıştıran, tezimle ve benimle sıkça ilgilenen Prof. Dr. Esra ACAR SOYKUT Hocama,

Tez sürecim boyunca değerli görüş ve katkılarıyla bana destek olan tez izleme komitesi üyeleri Prof. Dr. Hakan KULEAŞAN ve Prof. Dr. Seda KARASU YALÇIN hocalarıma ve tez savunma jürisinde yer alan değerli hocam Prof. Dr. Serap COŞANSU AKDEMİR'e,

Her zaman beni düşündüklerini bildiğim değerli hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Kübra ERYAŞAR ÖRER ve Dr. Öğr. Üyesi Derya ATALAY'a,

Bolu'daki aile bireylerim olan birlikte ağlayıp birlikte güldüğüm, birbirimizin her saçma kararını desteklediğimiz şanslı insan Gıda Yük. Müh. Aslı YILDIRIM'a; uzun mesajlarımın sahibi, ablasının kuzusu Gıda Yük. Müh. Özlem ŞAHİN'e, zor günlerimde yanımda olan, birlikte yol aldığımız güzel insan Dr. Merve ERTEM'e, ve BAİBÜ' nün bana katmış olduğu her biriyle farklı anılarım ve güzel anılarım olan değerli dostlarım Dr. Özge KAVAS'a, Dr. Ayşenur ARSLAN'a, Arş. Gör. Çiğdem YÜKSEL DEMİRCİ'ye, Gıda Yük. Müh. Yeşim AKTEPE'ye, Gıda Yük. Müh. Selin TONGA'ya, Gıda Yük. Müh. Başak IŞIK'a, Dr. Sevim ÖZTÜRK ORUÇ'a

Deneyisel çalışmalarım sırasında laboratuvar imkanlarından faydalandığım ve hizmet alımı yapmış olduğumuz Bilimsel Endüstriyel ve Teknolojik Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne (BETUM)

Ne söylesem yetersiz olacak olan, iyi ki benim ailem dediğim en büyük destekçilerim Annem ve Babama, canlarım Ablam ve Abime, hayatımın neşe kaynağı olan Yeğenlerime ve hayatı paylaştığım canım Eşime teşekkürü borç bilirim.

Doktora sürecimde beni “YÖK 100/2000 Doktora Bursu” kapsamında destekleyen Yükseköğretim Kurulu'na ve “2250-Lisansüstü Bursları Performans Programı” kapsamında ve birçok projede destekleyen TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

1. GİRİŞ

Gıda güvenliğini tehlikeye atan mikrobiyal kontaminasyon, insan yaşamını ve sağılığını ciddi şekilde etkileyen bir unsurdur. Bakteriler gıda kaynaklı hastalıkların en yaygın nedenidir. Gıda patojenlerinin başında ise *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Staphylococcus aureus* türleri gelmektedir (Bintsis, 2017). Gıdalarda bozulmaya neden olan ve insan sağılığını tehdit eden bakteriler, ultraviyole, kurutma ve yaygın olarak kullanılan kimyasal dezenfektanlar gibi geleneksel bakterisidal yöntemlere karşı direnç gösterebilmektedir. Bozulmalara neden olan bakterilerden *Pseudomonas* spp., güçlü bir şekilde protein ve lipid hidrolizi yeteneğine sahiptir. Bu özellikleri nedeniyle de gıdaların hızlı bir şekilde bozulmasına neden olup gıdaların israf olmasına yol açmaktadırlar (Huang vd., 2024a). Metabolik çok yönlülük ve farklı stres koşullarıyla (fiziksel, kimyasal ve antibakteriyel bileşikler) başa çıkma yetenekleri, *Pseudomonas* üyelerinin dikkat çekici özelliklerindendir. *Pseudomonas*, hayvanlarda ve insanlarda kolonize olabilen, çoğu zaman su yoluyla bulaşan fırsatçı patojen olarak kabul edilen türleri içermektedir. Fırsatçı patojenler açısından, *P. aeruginosa* türü bu cinsten en çok çalışılan türdür. Bu türün üyeleri sağılıklı veya bağışıklık sistemi zayıf kişilerde ciddi enfeksiyonlara neden olabilmektedir (Vaz-Moreira vd., 2012).

Pseudomonas aeruginosa, Gram negatif, hareketli, aerobik ve çubuk şeklinde bir bakteridir (Chegini vd., 2020). Bu bakteri sahip olduğu gen dizisi ile değişen çevre koşullarına oldukça kolay uyum sağlamaktadır (Zameer vd., 2016). Çok sayıda virülans faktörü, yüksek antibiyotik direnci, biyofilm oluşturma yeteneği bu bakterinin önemli özelliklerindendir (Qin vd., 2022). *P. aeruginosa*, her ne kadar fırsatçı patojenlerin başında gelse de gıda güvenliği açısından yeterince çalışılmamış bir mikroorganizmadır. Gelişme için gerekli minimum düzeyde besin ihtiyacı, hızlı adaptasyon özellikleri ile gıda işletmelerinde kolayca yayılabilmekte ve gıda güvenliği açısından problem yaratabilmektedir. Bu durum *P. aeruginosa*'nın antibiyotikler veya dezenfektanlarla kontrol edilmesi oldukça zor bir bakteri olmasından kaynaklanmaktadır (Lambert, 2002). Su, süt ürünleri, et ve bitkisel gıdalarda; lavabolar, su kapları gibi nemli ortamlarda; hastane, okul kantinleri gibi toplu mekânlardan izole edildiği önceki çalışmalarla bildirilmiştir (Xu vd., 2019; Li vd., 2023a).

Gerek ülkemizde gerekse dünyada gıda kaynaklı zehirlenmelere/hastalıklara karşı birçok önlem alınmasına rağmen tamamen önüne geçebilmek mümkün olmamıştır. Bugün hala en önemli sağlık problemlerinin başında gıda kaynaklı hastalıklar gelmektedir. Bu durumun başlıca sebebi bilinçsizce antibiyotik kullanımına bağlı olarak bakterilerin kazanmış olduğu antibiyotik direncidir. Dolayısıyla tüm dünya antibiyotiğe alternatif yöntemler aramaktadır. Ayrıca günümüzde tüketicilerin bilinçlenmesi ile daha az işlem görmüş, katkı maddesi içermeyen doğal içerikli ürünlerin talebinde ciddi bir artış vardır. Bu nedenle klasik gıda işleme ve muhafaza yöntemlerinin dışında, oluşan bu talebe yönelik yeni yöntemler araştırılmaktadır. Araştırılan bu yöntemleri genellikle doğal içerikli, biyolojik materyallerin kullanıldığı yöntemler oluşturmaktadır (Ghanbari vd., 2013). Mikrobiyal kalitenin korunmasında bakteriyofajların kullanımı araştırılan yeni yöntemler arasında yerini almaktadır (García vd., 2010). Tüketicilerin tercihleri, çiğ gıdaların tüketimindeki artış, beslenme alışkanlıklarındaki değişim vb. nedenler ve *Pseudomonas* suşlarının antibiyotik ve antimikrobiyallere karşı gösterdiği yüksek direnç ve bulaşı durumunda ise sahip olduğu potansiyel tehlikeler göz önünde bulundurulduğunda fajların kullanım olanaklarının araştırılması kaçınılmaz olmaktadır. Nitekim fajların başarılı bir şekilde insan, hayvan ve bitki hastalıklarında tedavisinde kullanıldıkları bilinmektedir. Gıdalarda da bazı patojenlerin inhibisyonu amacıyla oluşturulmuş ticari preparatlar bulunmaktadır (Au vd., 2021).

Bakteriyofajlar, bakteri hücrelerini enfekte ederek onların parçalanmasını sağlayan virüslerdir (Anany vd., 2017). Bakteriyofajların hedef konakçıları prokaryot hücreler olduğundan insanlara karşı zararlı bir etki oluşturmamaktadır. Bununla birlikte gıdalarda kullanımı sırasında gıdanın organoleptik özelliklerine zarar vermemeleri de fajların gıdalarda kullanımını cazip hale getirmektedir (Melo vd., 2020). Dolayısıyla daha önce de bahsedildiği gibi *P. aeruginosa*'nın olumsuz çevre koşullarına karşı oldukça hızlı adaptasyonu ve antimikrobiyallere karşı kazandığı bağışıklık dikkate alındığında, bu bakterinin eliminasyonunda yeni yöntemlerin araştırılması tercihten öte bir zorunluluk haline gelmektedir. Litik fajların bakteri hücrelerini etkili bir şekilde parçalaması ve bu esnada gıdanın besinsel ve organoleptik özelliklerine olumsuz etkisinin bulunmaması, fajların biyokoruma amacıyla gıdalarda kullanımı ve kontaminasyon riskini azaltması/yok edebilecek olması yönünden umut vaat etmektedir. Tüm bu bilgiler ışığında bu tez

kapsamında *P. aeruginosa*'ya etkili litik fajların izolasyonu ve karakterizasyonu hedeflenmiştir. Ayrıca bu fajların farklı gıdalarda etkinliği denenerek literatürde yetersiz sayıda bulunan çalışmalara katkı sağlanmıştır. Bununla birlikte fajların replikasyon parametreleri ve farklı koşullardaki stabilitesi incelenmiştir. Fajların DNA izolasyonu yapılmış ve RFLP (restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi) tekniği ile fajların ayrımı sağlanmıştır. Farklı bulunan fajlar ile bir kokteyl hazırlanmış ve bu kokteyl ile konakçı bakterilerin antibiyotik direnci üzerindeki etkisi incelenmiştir. Ayrıca elde edilen fajların antibiyofilm özelliğinin belirlenmesi de bu tezin hedefleri arasında olmuştur.

1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa, *Pseudomonadaceae* ailesine ait genellikle toprak ve sudan özellikle de atık sularla kontamine olan bitki ve hayvan dokularından izole edilebilen bir bakteridir (Römling vd., 1994; Lalucat vd., 2020). Gram negatif ve aerobik olan bu bakteri, fermantatif olmayıp glikozu oksidatif yolla parçalayıp asit oluşturma yeteneğine sahiptir. Hareket etmeye yardımcı olan kamçı bulundurur, basil şeklindedir. Aynı zamanda oksidaz ve katalaz pozitif olup laktoz ve sakkarozu kullanamamaktadır (King ve Phillips, 1978).

Optimum gelişme sıcaklığı 37°C olan *P. aeruginosa*, 4°C ile 42°C arasında canlılığını sürdürebilmektedir. Oksijen mevcut olmadığında nitrat, nitrit veya azot oksit dahil olmak üzere alternatif harici elektron alıcılarını kullanabilmektedir. Nitrat veya nitrit yokluğunda arjinin, substrat düzeyinde fosforilasyon ile katabolize edilebilmekte ve anaerobik büyüme için bir enerji kaynağı olarak hizmet edebilmektedir (Filiatrault vd., 2006; LaBauve ve Wargo, 2012).

P. aeruginosa'nın tipik suşlarında suda ve kloroformda çözünen mavi-yeşil renkli pigment olan piyosiyanin üretimi görülmektedir (Haynes, 1951). Piyosiyanin, azot içeren heterosiklik bir bileşik olan fenazin türevi ikincil bir metabolittir. Ayrıca çok sayıda farklı mikroorganizma grubu üzerinde antimikrobiyal etkiye sahiptir. *P. aeruginosa* için hem bir virülans faktörü hem de bir QS (Quorum Sensing) sinyal molekülü olarak kabul edilir. *P. aeruginosa* tarafından salgılanan diğer pigmentler arasında pyoverdin (sarı, yeşil ve floresan), pyomelanin (açık kahverengi) ve pyorubrin (kırmızı-kahverengi) pigmentleri de bulunmaktadır. King A besiyerinde mavi ve kırmızı-kahverengi pigment üretimine bağlı bu renkteki kolonilerin *P. aeruginosa* 'ya ait olabileceği

belirtilmiştir. Bilinmeyen bir koloninin *P. aeruginosa*' ya ait olduğunun en belirgin işaretlerinden biri de organizma tarafından 2-aminoasetofenon üretiminden elde edilen karakteristik meyvemsi, üzüm benzeri koku olduğu söylenmektedir (King ve Phillips, 1978; Jayaseelan vd., 2014).

Hastane ortamlarında çok yaygın görülen patojenlerden biri olan *P. aeruginosa*, sağlık hizmeti kaynaklı enfeksiyonların %50'sinden fazlasına neden olmaktadır (Tuon vd., 2022). Özellikle kritik hastalar ve bağışıklık sistemi baskılanmış bireyler için gerçek bir endişe kaynağıdır. Yüksek mortaliteye yol açan en büyük sorun, ilaca dirençli suşların ortaya çıkmasından kaynaklanmaktadır. Bu bakteri hemen hemen tüm antibiyotik sınıflarını kapsayan, antibiyotik direnciyle ilişkili çok sayıda faktör geliştirebilen bir patojendir (Bassetti vd., 2018).

Antibiyotiklerin yaygın ve uygunsuz kullanımı, insan enfeksiyonlarında daha sık görülen ve morbiditeye önemli ölçüde katkıda bulunan çoklu ilaca dirençli bakteriyel patojenlerin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Hatta bazı bakterilerin 'son çare ilaçlar' denilen antibiyotiklere dahi direnç gösterdiği bilinmektedir. *P. aeruginosa* yaygın olarak bu duruma örnek gösterilebilen bir bakteridir (Chan vd., 2016). Dünya Sağlık Örgütü'nün yayınlamış olduğu bir rapora göre de *P. aeruginosa*, etkili olabilecek yeni antibiyotiklerin bulunmasını gerektiren en kritik 3 bakteriden biridir (WHO, 2017). Yine Dünya Sağlık Örgütü'nün Mayıs 2024'te güncellenmiş olduğu raporda antimikrobiyal dirençli bakteriler listesinde *P. aeruginosa* yer almaktadır (WHO, 2024). Ortaya çıkan çoklu ilaca dirençli bakterilerle mücadele etmek için yeni terapötik yaklaşımların kullanılması ve yeni stratejilerin geliştirilmesi gerekmektedir. Bu nedenle bakteriyofajların terapötik bir ajan olarak kullanılması, son zamanlarda en umut verici yaklaşımlardan biri haline gelmektedir. Kimyasal yapıya sahip antibiyotiklerin aksine fajlar, konakçı hücrelere özgüllük ve antibakteriyel özellik gösteren biyolojik kimliklere sahiptir (Naknaen vd., 2023).

P. aeruginosa'nın klinik mikrobiyolojide ön planda olduğu bilinmektedir. Ancak bakterinin toprak ve su olan habitatı düşünüldüğünde gıdalara bulaşma riski çok yüksektir ve bu bakteri gıda mikrobiyolojisi açısından yeterince tanınmamaktadır. *P. aeruginosa* hücre dışı enzim salgılama kapasitesi nedeniyle, özellikle yüksek su içeriği ve besin açısından zengin gıdalar olan meyve ve sebzelerde, et yüzeylerinde ve düşük asitli süt ürünlerinde yaygın olarak bozulmaya neden olan bir bakteridir. Yüksek adaptasyon kapasitesi ve düşük sıcaklıklarda

büyüme yetenekleri nedeniyle *P. aeruginosa* dünya çapında yaygındır ve dolayısıyla gıda enfeksiyonunun yaygın bir etkenidir (Zameer vd., 2016; Li vd., 2023a).

Yapılan çalışmalara bakıldığında da *P. aeruginosa*'nın tüketime hazır salatalardan (Franzetti ve Scarpellini, 2007), et ve karkas yüzeylerinden (Poursina vd., 2023), süpermarket ve yerel marketlerde satışa sunulan marul, havuç gibi çiğ sebzelerden (Allydice-Francis ve Brown, 2012), çiğ süt (Swetha vd., 2017) ve pastörize sütlerden (Samet-Bali vd., 2013) kasaplarda kullanılan bıçaklar ve tezgahlardan (Alimi vd., 2022) izole edildiği görülmektedir. Bununla birlikte lavabolar, su kapları gibi nemli ortamlarda; hastane, okul kantinleri gibi toplu mekânlardan izole edildiği önceki çalışmalarla bildirilmiştir. Aynı zamanda içme suyu, musluk suyu, şişelenmiş su ve kanalizasyon suyundan izole edilebilen en tehlikeli bakteridir. Musluk suları için kontaminasyon göstergesidir (Xu vd., 2019). Bekletilen içme suyunun *P. aeruginosa* tarafından kirlenmesi sıklıkla bildirilmektedir. Kaynak suyunun, su enjeksiyon tanklarının, boru hatlarının, su üretim sürecindeki filtrasyonun, ters ozmoz tesislerinin vb. eksik dezenfeksiyonu veya çapraz kontaminasyonu şişelenmiş suyun kirlenmesine neden olan olası nedenlerdir. İçme suyunun *P. aeruginosa* tarafından kirlenmesi sonucu bu su içildiğinde en basit etkileri arasında kusma ve ishal görülebilmektedir (Li vd., 2023a).

Fiziksel ve kimyasal yöntemlerle eliminasyona karşı kendini koruma yöntemi olarak biyofilm oluşturmaları bu bakteriyi gıda kaynaklı hastalıklar ve bozulma için önemli bir endişe kaynağı haline getirmektedir (Su vd., 2024). Karıştırma tankları, fiçiler ve borular gibi gıda endüstrisi ekipmanları *P. aeruginosa*'nın etkili bir biçimde kolonize olduğu yüzeylerdir (Thi vd., 2020). Ayrıca işletmelerde metal yüzeylerde oluşturdıkları biyofilmler çapraz kontaminasyona neden olabilmekte, bu nedenle gıda ile temas eden yüzeylerin dezenfekte edilmesi gerekmektedir (Zameer vd., 2016).

1.1.1 Patojenite ve Virülans Faktörler

P. aeruginosa inanılmaz derecede karmaşık, birbirine bağlı birçok sistem tarafından kontrol edilen, hücreyle ilişkili ve hücre dışı çok sayıda virülans faktöre sahiptir. Dış zarda bulunan lipopolisakkaritler ve dış zar proteinleri, kamçı ve pili, ekzotoksin A gibi çeşitli toksinler ve hidrolitik enzimler salgılayan salgı sistemleri,

fosfolipaz C, DNaz, piosiyenin, ramnolipit, aljinat, sideroforlar ve QS sistemi *P. aeruginosa*'ya ait virölans faktörlerdir. Buna ek olarak QS genlerinin, *P. aeruginosa* genomunun yaklaşık % 10'unu düzenlediği düşünülmektedir (Diggle ve Whiteley, 2020; Jurado-Martin vd., 2021).

Ekzotoksin A, en önemli virölans faktörlerden biridir. Protein biyosentezinin inhibisyonuna yol açar. Ekzotoksin A güçlü bir sitotoksindir ve insan altı primatlar da dahil olmak üzere çeşitli hayvanlar için öldürücüdür (Pollack, 1983).

Ramnolipitler yüzey aktif maddelerdir. *P. aeruginosa*'da ramnolipit sentezinin biyofilm oluşumunda, sürü hareketinde ve antibiyotik direncin oluşumunda rol oynadığı bildirilmiştir (Soberón-Chávez vd., 2021). Fosfolipaz C (hem hemolitik hem de hemolitik olmayan) akciğer yüzey aktif madde proteinlerini hidrolize etmektedir. Bu hemolitik enzimler, eritrositlerin lizisine neden olan ve plazma zarının işlevini bozan sitolitik toksik proteinlerdir (Hassanein, 2014).

Elastaz A ve B (LasA, LasB) gibi çeşitli proteolitik enzimler de yine virölans faktörlerdendir. Bu enzimler konak elastinini parçalama yeteneğine sahiptir. Özellikle, "psödolizin" olarak da adlandırılan LecB, epitel sıkı bağlantılarını bozma yeteneğine sahip en bol bulunan proteaz olarak kabul edilmektedir (Badillo-Larios vd., 2024).

Ekzopolisakkaritler, bakteri tarafından salgılanan ve kurutma, oksitleyici maddeler ve konak savunması gibi zorlu hayatta kalma ortamlarına karşı bakteriyel toleransı arttırmak için salgılanan ekstraselüler makromoleküllerdir. Bu makromoleküller *P. aeruginosa* için biyofilm oluşumu için önemlidir ve hastalarda bakteriyel kalıcılığa katkıda bulunan adhezinler olarak da işlev görebilmektedirler. Aljinat, Psl ve Pel *P. aeruginosa* tarafından salgılanan üç ekzopolisakkarittir. Aljinat genellikle kistik fibröz hastalarından izole edilen suşlar tarafından salgılanırken, Psl ve Pel esas olarak çevreden elde edilen suşlar tarafından üretildiği tespit edilmektedir (Liao vd., 2022).

Diğer bir virölans faktör olan piosiyenin, reaktif oksijen türlerinin üretimine ve doku hasarına neden olmaktadır. *P. aeruginosa* tarafından üretilen DNaz ise besin kaynağı olarak kullanılacak hücre dışı DNA'nın ayrışması için çok önemlidir. Yine bu patojen tarafından üretilen hemolizin, farklı hücre tiplerini parçalayarak enfeksiyonların yayılmasını kolaylaştırmaktadır (Edward vd., 2023).

Lipopolisakkarit (LPS) dış yapıyı korumak ve konak hücrelerini zehirlemek için önemli bir yüzey yapısal bileşenidir. LPS'deki lipid A'nın endotoksisitesi, doku hasarını, bağlanmayı ve konak reseptörleri tarafından tanınmayı sağlamakta ayrıca antibiyotik toleransı ve biyofilm oluşumu ile ilişkili olabilmektedir (Qin vd., 2022).

Yüzme, seğirme ve sürü hareketliliği için önemli olan pili ve flagella, enfeksiyonda da rol oynamaktadır. Yüzeyle pili aracılı bağlanmanın biyofilm oluşumunda önemli bir ilk adım olduğu düşünülmektedir. Flagellanın da konakçı epitel dokuları tarafından üretilen ve KF (kistik fibröz) balgamında yaygın olarak müsin *P. aeruginosa* yapışmasına aracılık etmede önemli olduğu gösterilmiştir (Diggle ve Whiteley, 2020).

Ayrıca bakterilerin bağışıklık sistemi olarak bilinen CRISPR-Cas sistemi, faj direnci gibi çeşitli alternatif işlevlerde önemli bir role sahiptir. *P. aeruginosa*'da bulunan QS, CRISPR-Cas mekanizmasını aktive eder ve bu nedenle QS inhibitörleri, anti-CRISPR-Cas adaptasyonları (yani uygulanan faja karşı direncin kazanılması) olarak kullanılabilir. CRISPR-Cas savunma mekanizmalarının QS inhibitörlerinin yardımıyla inhibisyonu, *P. aeruginosa*'nın faj tedavisi kullanılarak öldürülmeye daha duyarlı olmasına yol açabilmektedir (Azam ve Khan, 2019).

1.1.2 Biyofilm Oluşumu

Biyofilm, hücre dışı polimerik maddelerin (EPS) bir araya gelmesiyle oluşan bir matrisin içinde yer alan karmaşık bir bakteri topluluğudur. Biyofilm oluşumu, sıcaklık dalgalanması ve besin mevcudiyeti gibi yaşam koşullarındaki beklenmedik değişiklikler sırasında türlerin hayatta kalması için takip ettiği temel stratejilerden biridir. Böylece biyofilm içindeki bakteriler, konakçı bağışıklık tepkilerinden kaçabilmekte ve antimikrobiyal tedaviye planktonik hücrelere göre 1000 kata kadar daha fazla direnebilmektedir (Thi vd., 2020). Ayrıca biyofilm oluşumunun da karmaşık bir şekilde QS ile bağlantılı olduğu bilinmektedir (Edward vd., 2023).

P. aeruginosa en iyi bilinen biyofilm oluşturunca bakterilerdendir. Bu yönüyle biyofilm çalışmalarında model görevi görmektedir. Hücre dışı matris, polisakkaritler, lipitler, proteinler ve nükleik asitler (hücre dışı DNA veya eDNA ve RNA) ve hücrelerin ilk yapışmasına yardımcı olan ve biyofilme yapı sağlayan biyoyüzey aktif maddeler içermektedir. Aljinat, Psl ve Pel, biyofilm matrisindeki ana bileşenlerden sorumlu üç ekzopolisakkarittir. Aljinat üretimi, antibiyotiklere ve

insan bağışıklık savunma mekanizmalarına duyarlılığı azaltmaktadır. Biyofilm ekzopolisakkarit matrisi, antimikrobiyallerin difüzyonunu önleyen ve antibiyotikleri hareketsiz hale getiren difüzif bir bariyer görevi görür. Gram-negatif bakteriyel biyofilmler, antibiyotiklere karşı diğer biyofilmlere kıyasla daha fazla direnç göstermektedir. Bunun sebebi, Gram negatif bakterilerin hücre duvarlarında bulunan LPS yapısının, antibiyotiklerin hücrelere nüfuz etmesini engellemesinden kaynaklanmaktadır (Azam ve Khan, 2019; Tuon vd., 2022).

Langsrud vd., (2016) düzenli sanitasyon yapılan 3 farklı somon işleme tesisinden Gram negatif ağırlıklı bakteri izolasyonu yapmıştır. Araştırmacılar, bu tesislerdeki konveyör bantlarından izole edilen tüm cinsleri temsil edecek şekilde 14 bakteri suşundan oluşan bir kokteyl (*Listeria*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Brochothrix*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Rhodococcus* ve *Chryseobacterium*) hazırlamışlar ve model ortamda biyofilm oluşumunu incelemişlerdir. İki gün sonra çelik yüzeylerde (12°C) yaklaşık 10^9 KOB.cm⁻²'lik stabil biyofilm oluştuğu ve bu biyofilm popülasyonunda baskın olarak *Pseudomonas* spp.'nin yer aldığını tespit edilmiştir.

1.1.3 Antimikrobiyal Direnç

P. aeruginosa antibiyotikler ve/veya dezenfektanlarla kontrol edilmesi oldukça zor bir mikroorganizmadır. Antibiyotiklerin uygunsuz kullanımı antimikrobiyal direncin artışında en önemli sebeplerinden olmakla birlikte, *P. aeruginosa* birçok antibiyotik grubuna doğal olarak dirençli olduğu bilinmektedir (Lambert, 2002).

Antibiyotik direnci içsel, edinilmiş veya adaptif olabilmektedir. İçsel direnç mikroorganizmanın kromozomunda kodlanmıştır. İçsel direnç, dış zarın geçirgenliğinin azalması, aktif pompa sistemi ile antibiyotiğin dışarı atılması ve kromozomal β -laktamaz (AmpC) enziminin varlığına bağlıdır. AmpC, periplazmada bulunmaktadır ve etkili bir şekilde penisilinler gibi birçok beta-laktam grubu antibiyotiği hidrolize edebilmektedir. Adaptif direnç ise çeşitli stres koşullarında ortaya çıkar. Bu koşullar gen ifadesinde değişikliğe neden olarak direnç sağlayabilecek genlerin regülasyonuna neden olur. Adaptif direnç mekanizmaları kalıcı değildir ve stres faktörünün ortadan kaldırılmasıyla etkisiz hale gelir. Edinilmiş direnç, diğer organizmalardan direnç genlerinin kazanılması

veya avantajlı mutasyonların seçilmesinin bir sonucu olarak ortaya çıkar (Gellatly ve Hancock, 2013; Langendonk vd., 2021).

1.2 Bakteriyofajlar

Bakteriyofajlar, çoğalmak için bakteri hücresine ihtiyaç duyan zorunlu bakteri virüsleridir. Bu virüsler oldukça yüksek konakçı spesifikliği gösterirler ve bu özellik genellikle bir türe ait suşlarla sınırlıdır (Monk vd., 2010). Fajların dünyadaki en çeşitli ve en bol bulunan varlıklar olduğu ve sayılarının da yaklaşık 10^{31-32} olduğu tahmin edilmektedir. Fajlar toprak, dışkı, derin sular, vücut ve lağım suları gibi pek çok yerde bulunmaktadır. Genellikle konakçı hücreleri ile aynı ortamdan izole etmek mümkündür (Lin vd., 2017).

Bakteriyofajlar, 1880 yıllarında Avrupa ve Amerika laboratuvarlarında ciddi bakteriyolojik çalışmaların başlamasından sonra neredeyse 40 yıl boyunca tanımlanmamıştır. Fajların keşfine dair ilk rapor Ernest Hanbury Hankin tarafından 1896 yılında verilmiştir. Bu rapor Hindistan'da nehir sularının, özellikle *Vibrio cholera* ve birçok patojen bakteriye karşı antimikrobiyal etkisinin varlığına yönelik olmuştur. Bu keşiften sonra da benzer etkilerin görüldüğü çalışmalar rapor edilse de fajların, 1915'te İngiliz mikrobiyolog Frederick Twort tarafından ve ondan bağımsız olarak 1917'de Fransız-Kanadalı mikrobiyolog Felix d'Hérelle tarafından keşfedildiği kabul edilmektedir. D'Hérelle keşfinden sonra bakteriyofajların terapötik ajanlar olarak işlev görme yeteneklerini ve doğasını sistematik olarak araştırmıştır (Carlton, 1999; Kutter ve Sulakvelidze, 2004).

D'Hérelle ilk çalışmalarını *Shiga dysentery* inhibisyonuna yönelik yapmıştır. Dizanteri hastalarından günlük dışkı örnekleri alarak örnekleri filtrelemiş ve filtratı taze *Shiga* kültürlerine eklemiştir. Deneylerde bulanık *Shiga* kültürünün bir süre sonra berraklaştığını gözlemlemiştir. Bu virüse "*Bacteriophagum intestinale*" adını vermiştir. Bu "bakteriyofaj" adı artık bu tür fenomenler için, litik süreci ilk başlatan materyalin kaynağı veya etki ettiği belirli organizma ne olursa olsun genel olarak kullanılmaya başlanmıştır (Kuttner, 1923; Bruynoghe, 1927).

Erken dönem faj araştırmalarının çoğu, bakteriyel enfeksiyonların tedavisi için faj terapisinin geliştirilmesine odaklanmış ve şirketler faj preparatları pazarlamaya başlamıştır. Ancak, fajların biyolojik bir tehlike olabileceği endişesi ve ortaya çıkan antibiyotiğin başarısı, faj terapisine olan ilginin azalmasına neden

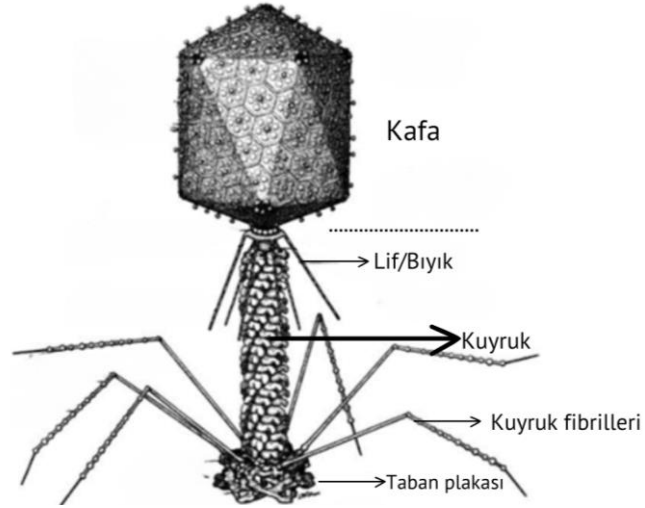
olmuştur. Faj çalışmaları ancak eski Sovyetler Birliği ve diğer Doğu Avrupa ülkelerinde devam etmiştir. Temel faj biyolojisi 1940'ların başında fajların elektron mikroskobu ile görüntülenmesiyle kanıtlanmıştır. Bundan sonra gıda güvenliği ve tarım için, faj teknolojileri daha hızlı benimsenmiştir (Salmond ve Fineran, 2015).

1.2.1 Fajların Yapısı

Fajların büyüklükleri oldukça farklılık gösterse de genellikle 24 ila 200 nm arasında değişmektedir. Fajlar en basit haliyle kafa (kapsit), genetik materyal ve kuyruk kısmından oluşmaktadır. Bir protein kılıf olan kapsit tarafından korunan faj genomu, viral enfeksiyon için koşullar sağlandığında kapsitten hedef hücrenin sitoplazmasına salınmaktadır. Genel olarak, kapsitin boyutu da genom boyutuna bağlı olarak değişmektedir (Hatfull ve Hendrix, 2011; Naureen vd., 2020).

Fajlar morfoloji ve genetik materyal açısından farklılık göstermektedir. Fajların yaklaşık %85'inin çift sarmallı DNA'ya (dsDNA) sahip olduğu tahmin edilmektedir (Nami vd., 2021). Faj türüne bağlı olarak genomik materyalleri, tek sarmallı RNA (ssRNA), çift sarmallı (dsRNA) RNA veya tek sarmallı DNA (ssDNA) olarak görülebilmektedir. Genomları depolayan kapsitler ise genellikle ikosahedral (20 yüzlü) yapıdadır. Ancak helezon gibi farklı şekiller de görülebilmektedir. Örneğin *Tectiviridae* ve *Corticoviridae* ailelerinde bulunan fajlarda, bir iç lipit zarı görülürken, *Cystoviridae* fajlarında dış zar tabakası bulunmaktadır (Sanz-Gaitero vd., 2021). Genom büyüklükleri ise 4 kb ila 600 kb arasında değişmektedir (Brüssow ve Hendrix, 2002).

Escherichia coli'ye etkili faj olan T4 fajı, fajların morfolojisini tanımlamada bir model görevi görmektedir (Şekil 1.1). Bu faj 200 nm uzunluğunda ve 80-100 nm genişliğinde olan büyük fajlar arasındadır. Kasılabilen bir kuyruğa sahip olan bu faj 20 yüzü olan ikosahedral bir kafa yapısına sahiptir (Sharma vd., 2017). Bu fajın tüm genomu ise 2003 yılında dizilenmiştir (Miller vd., 2003). İkosahedral kafa 172 kbç dsDNA'yı kapsüllemektedir (Yap ve Rossmann, 2014).



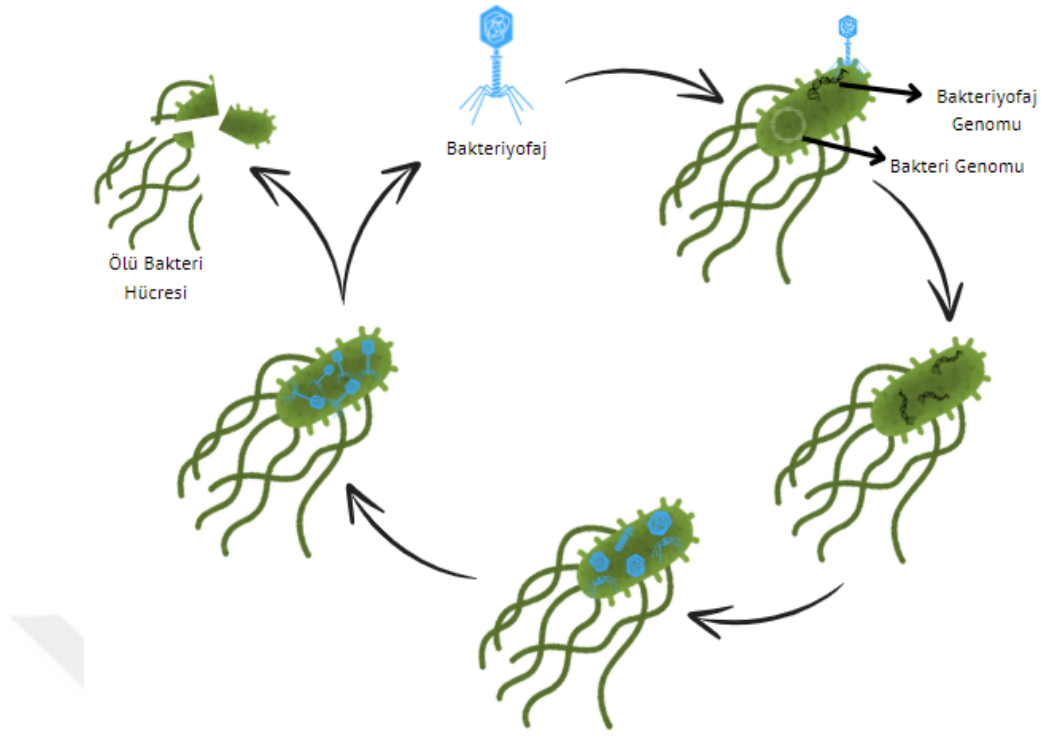
Şekil 1.1. T4 fajının temel yapısı

(Leiman vd., 2003'ten uyarlanmıştır)

1.2.2 Fajların Yaşam Döngüleri

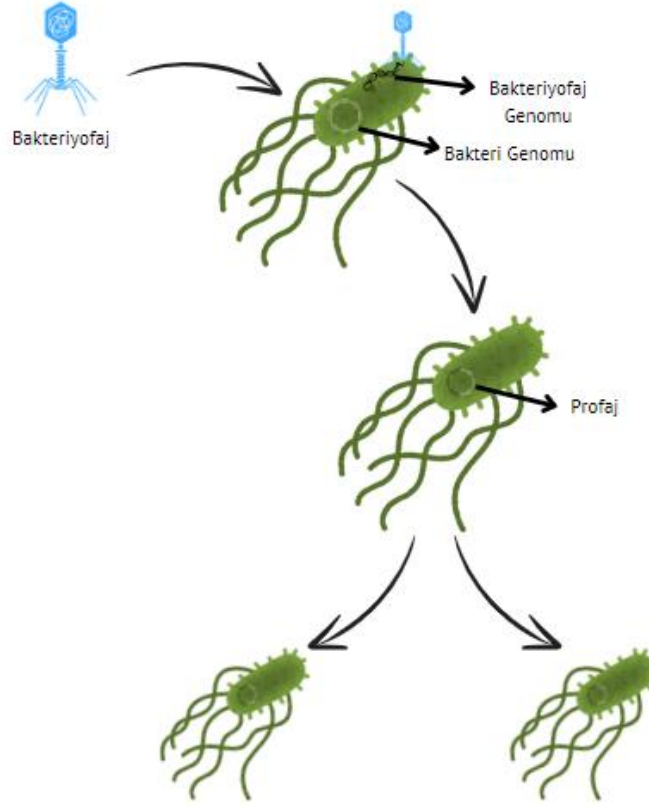
Fajların konakçı hücreyi kullanarak çoğalmasını sağlayan ilk adım fajın konakçıya bağlanmasıdır. Fajlar konakçısını hücre yüzeyinde bulunan reseptörlerle tanıyarak bağlanmaktadır (Lin vd., 2017). Bu bağlanma iki aşamalıdır. Genellikle ilk bağlanma tersine çevrilebilmektedir. Ancak bundan sonraki bağlanma geri dönüşümsüzdür ve faja ait genetik materyalin konakçıya aktarılmasıyla sonuçlanmaktadır. Bu aktarım kuyruğun kasılmasıyla veya bakteriyel hücre zarlarının bozulmasına neden olan bazı özel enzimlerin varlığı olmak üzere iki yolla sağlanmaktadır. Genetik materyal konakçıya aktarıldıktan sonra replikasyon için iki seçenek vardır. Bu seçenekler litik ve lizogenik döngü olarak adlandırılmaktadır (Karthik vd., 2014).

Litik döngüde (Şekil 1.2) genetik materyal bakteriye aktarılmış ve faj bileşenlerini oluşturmak üzere bakteri hücresi ele geçirilmiştir. Hücre içerisinde faja ait kapsit, kuyruk, kuyruk fibrilleri gibi parçaların üretimi sağlanmaktadır. Viral genom kapsit içerisinde paketlenir ve ardından kuyruğun montajı yapılır. Ardından bakterinin hücre duvarı, faj enzimleri tarafından zayıflatılır, bu da hücre membranı ve duvarının yırtılmasına yol açarak olgun fajların, enfekte olmuş bakteri hücresinden salınımını sağlamaktadır (Guttman vd., 2005).



Şekil 1.2. Litik döngü

Ilıman veya lizogenik fajlar ya litik döngüye girerler ya da nükleik asitlerini konakçı genomuna entegre etmektedir. Konakçı genomuna entegre olan faj DNA'sına profaj denir. Nükleik asidin integrasyonu ile profaj yapısı hücrenin her bölünmesinde yavru bakterilere transfer edilir. Bu profajı barındıran bakterilere ise lizojenik bakteri adı verilir (Şekil 1.3). Bazı kimyasallara maruz kalma, UV gibi etkenler bu lizogenik döngünün sona ermesine yol açabilmekte ve litik döngü devreye girmektedir. Bu sürece indüksiyon denir (Karthik vd., 2014). Profaj konak hücrede fenotipik değişimlere neden olabilmektedir. Hatta profaj virülans gen taşıyorsa bunun bakteri patojenitesinin artmasına neden olabileceği bilinmektedir (Chen vd., 2020).



Şekil 1.3. Lizogenik döngü

Litik ve lizogenik döngü dışında nadir görülen ancak önemli olan başka bir yaşam döngüsü ise pseudo-lizogeni olarak adlandırılan bir döngüdür. Pseudo-lizogenik döngüde faj nükleik asidi, konakçıyı enfekte ettikten sonra ne istikrarlı uzun vadeli bir bağlantı (lizogeni) oluşturur ne de litik tepkiyi tetikler. Bunun yerine faj nükleik asidi konakçı hücrenin içinde inaktif bir formda kalır. Bu durumun besin yokluğunda oluştuğu düşünülmektedir. Faj, besin sınırlı olduğunda ve bakteriyel konaklar eksik olduğunda açlıktan ve çevreden yok olmaktan kaçınmak için bu tür bir etkileşim geliştirmektedir (Naureen vd., 2020).

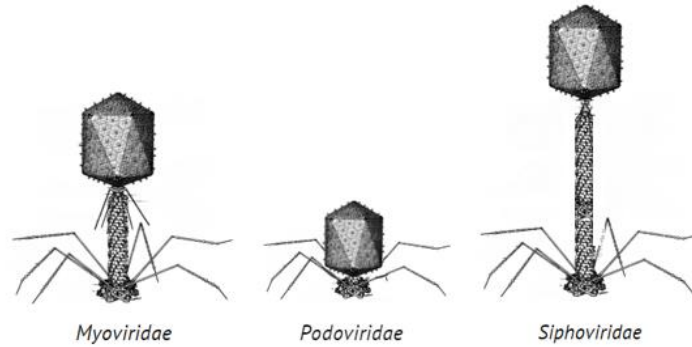
1.2.3 Fajların Sınıflandırılması

Virüslerin sınıflandırılması, ilk başta bireysel çabalarla sınırlıyken, Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi'nin (ICTV) kurulmasıyla dünya çapında koordineli bir girişim haline gelmiştir. ICTV, her Uluslararası Viroloji Kongresi'nden sonra prensip olarak verileri ve önerileri toplayıp periyodik olarak bir rapor yayınlamaktadır. Bu rapor, virüs ailelerini ve cinslerini açıklamakta mevcut taksonların güncellemelerini ve yeni grupların detaylarını içermektedir (Ackermann ve Berthiaume, 2023). ICTV içerisinde yer alan Bakteriyel ve Arkaeal

Alt Komite (BAVS) fajların sınıflandırılmasına odaklanmış durumdadır (Chibani vd., 2019). Bu komite fajları, genomun moleküler bileşimi (ss/ds, DNA veya RNA), morfolojisi, kapsit yapısı ve konakçı aralığı dahil olmak pek çok özelliğe göre sınıflandırmaktadır (Zhu vd., 2022).

Tarihsel olarak fajlar, PCR, dizileme veya bugün bildiğimiz birçok moleküler yöntemin varlığından önceki zamanda morfolojilerine göre sınıflandırılmıştır. Kuyruklu fajlar için resmi taksonomi, fajları A (kasılabilen kuyruk), B (uzun, kasılmayan kuyruk), C (kısa kasılmayan kuyruk) olmak üzere üç morfotipe sınıflandıran David Bradley'in öncü sınıflandırma çalışmasından türetilmiştir. Bu sistem daha sonra Ackermann ve Eisenstark tarafından geliştirilmiştir (Bradley, 1967; Turner vd., 2021).

Literatürde yer alan pek çok çalışmada bakteriyofajların yaklaşık %96'sının, üç aileyi içeren *Caudovirales* takımına ait olduğu görülmektedir (Zrelavs vd., 2020). Bu takım içerisinde yer alan kasılabilen kuyruğu olan fajlar *Myoviridae*, kısa kuyruğu olan fajlar *Podoviridae* ve kasılmayan uzun kuyruklu fajlar ise *Siphoviridae* ailelerine dahil edilmektedir (Giri, 2021). Ancak bu sınıflandırma açıklandığı şekilde yalnızca morfolojiye dayalı bir sınıflama olarak karşımıza çıkmaktadır (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. Morfolojiye dayalı *Caudovirales* faj aileleri (eski sınıflandırma)

Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI) tarafından desteklenen veri tabanına göre *Caudoviricetes* sınıfında tanımlanan fajların sayısı 2015'te 1359'dan 2022'de 4483'e çıkmıştır. Virüs keşfine yönelik kapsamlı dizileme çabaları nedeniyle ICTV, yeni tanımlanan fajların tam sayısını yakalayamamaktadır. Bu nedenle ICTV yakın zamanda faj sınıflandırma sistemini (Ağustos, 2022) güncellemiştir. Morfolojiye dayalı olan *Siphoviridae*, *Podoviridae* ve *Myoviridae*

gibi birkaç büyük aile kaldırılmış ve nükleotit bazlı genomik benzerlikler kullanarak fajlar yeniden sınıflandırılmıştır. Günümüzde sürekli olarak yeni fajların keşfi ve türler arası benzerlikler sınıflandırmada bazı zorlukların olmasına neden olmaktadır (Zu vd., 2022; Guan vd., 2023).

Aynı zamanda "podovirüs", "miyovirüs" veya "sifovirüs" gibi morfolojik (taksonomik olmayan) tanımlayıcı terimlerin ayırt edici özellikleri yansıtmak ve tarihsel referanslarını korumak için kullanımına izin verilmiştir; ancak 2022'den bu yana herhangi bir resmi taksonomik anlam ifade etmemektedirler (Turner vd., 2023).

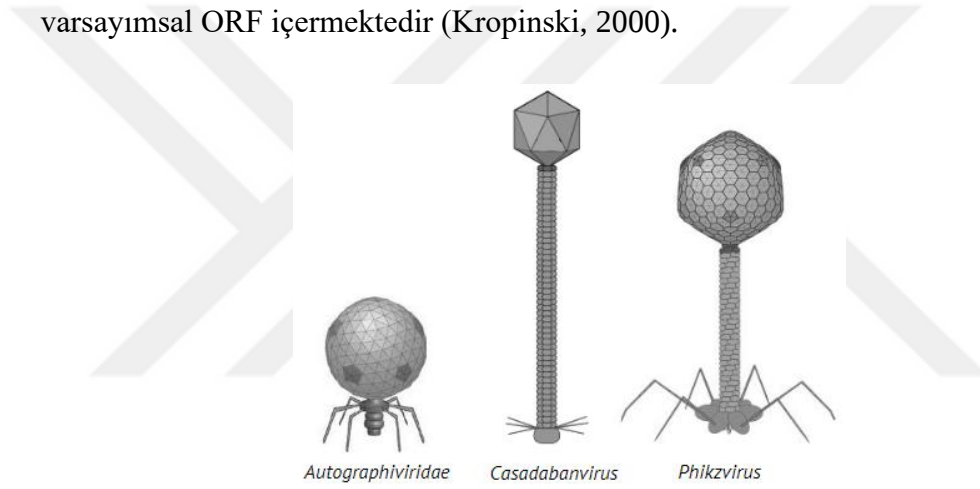
1.2.4 *Pseudomonas aeruginosa* Fajları

Bakteri inhibisyonunda fajların kullanımı, antibiyotik tedavisine alternatif, güvenli, etkili ve tamamen doğal bir seçenek durumundadır. Antibiyotik dirençli suşların yaygınlığındaki keskin artış faj tedavisine olan ilgiyi yeniden canlandırmıştır. *Pseudomonas* cinsini hedef alan bakteriyofajlar ilk olarak yirminci yüzyılın ortalarında keşfedilmiştir. Bu mikroorganizmanın hastane enfeksiyonlarındaki büyük rolü ve yüksek antibiyotik direnci nedeniyle, *P. aeruginosa*'yı inhibe etmek için bakteriyofajların kullanılması büyük ilgi görmüştür (Don ve Van Den Ende, 1950; Chegini vd., 2020).

Fajlar boyut, karmaşıklık, genetik yapı ve morfoloji açısından farklılık göstermektedir. *P. aeruginosa*'ya etkili fajlar da morfolojik ve genetik açıdan çeşitlidir. Çoğu *Pseudomonas* fajı kuyrukludur. Çift sarmallı DNA (dsDNA) genomlarına ve miyovirüs, podovirüs veya sifovirüs morfolojisine sahiptir (Şekil 1.5). Bu nedenle *Caudoviricetes* sınıfının üyeleridir (Alipour-Khezri vd., 2024).

García-Cruz vd. (2024) izole ettikleri ϕ DCL-PA6 fajının miyovirüs morfolojisi gösteren *Caudoviricetes* sınıfında *Pbunavirus* olduğunu tespit etmiştir. Fajın genom büyüklüğü 64 kbç uzunluğunda bulunmuştur. Farlow vd. (2020) izole ettikleri 10 litik *P. aeruginosa* fajının genom büyüklüklerini 43,299 ile 88,728 bç arasında bulmuştur. Fajların ve G+C içerikleri %52,1 ila % 62,2 arasında bulunmuş ve 68 ila 168 kodlama dizisi içermektedir. Costa vd., (2024) atık sulardan 27 adet *P. aeruginosa* fajı izole etmiştir. Bu fajlar dsDNA içeren *Caudoviricetes* sınıfında podofaj morfolojisi gösteren *Autographiviridae*, *Bruynoghevirus*, *Schitoviridae*, *Zobellviridae*; sifofaj morfolojisi gösteren *Samunavirus*, *Casadabanvirus*, *Mesyanzhinovviridae*, *Detrevirus* ve yine *Caudoviricetes* sınıfına ait miyofaj

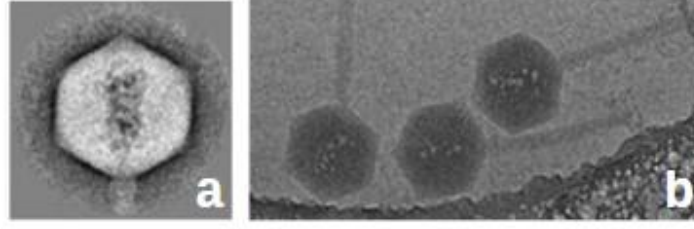
morfolojisine ait *Pbunavirus* ve *Phikzvirus* olarak tanımlanmıştır. Yine *Pbunavirus* cinsi genomları ile homoloji gösteren faj vB_PaeM_LS1 genomu, %55,7 G+C içeriğine sahip 66,095 bç doğrusal çift sarmallı DNA'dan oluşmaktadır. Toplam 92 öngörülen açık okuma çerçevesi (ORF) ve 0 tRNA geni mevcuttur. Öngörülen ORF'ler arasında, yalnızca 36'sının belirli işlevlere sahip olduğu ve öngörülen proteinlerin yaklaşık %60'ının işlevi bilinmediği bildirilmiştir (Yuan vd. 2019). Whiteley ve Whiteley, (2024)'de izole ettikleri litik *Pseudomonas* fajının kapsit boyutunu $59,3 \pm 3,6$ nm çapında ve kuyruk uzunluğu $120,2 \pm 4,4$ nm uzunluğunda bulmuştur. Faj genomunun 57,462 bç uzunluğunda, %57'lik bir GC içeriğine sahip, *Queovirinae* alt familyasında ve *Nipunavirus* cinsine ait olduğu tespit edilmiştir. Lizogenik faj D3 çift sarmallı DNA genomuna sahip 56,426 bç uzunluğunda ve 90 varsayımsal ORF içermektedir (Kropinski, 2000).



Şekil 1.5. Caudoviricetes sınıfına ait farklı faj örnekleri

Faj genomlarının 200 kbç' den büyük olması durumunda bu fajın "dev veya jumbo" olarak kabul edilmesi önerilmiştir. PhiKZ fajı, dev olarak sınıflandırılan ilk bakteriyofajdır ve *P. aeruginosa* üzerinde etkilidir. Bu fajın, baş çapı 120 nm, kuyruk uzunluğu ise 180 nm ve büyük bir dsDNA olan genomunun boyutu 280.334 bç'dir (Mesyanzhinov vd., 2002). Faj enfeksiyonundan sonra DNA paketlenmesi sırasında başın tüm iç boşluğunun DNA ile dolduğu düşünülmektedir. Bu durumda, kapsitin iç boyutunun paketlenmiş genomun toplam hacmiyle orantılı olduğu varsayılmaktadır. Ancak, phiKZ kapsiti genom paketlenmesinde benzersiz ek bir yapısal özelliğe sahiptir. Faj başının merkezinde, düşük elektron yoğunluklu "iç gövde" adı verilen bir silindir bulunur. Bu silindir, iç gövdenin etrafına makara benzeri bir şekilde paketlenmiş lifli bir malzeme ile çevrilidir. İç gövdenin kendisi yay benzeri bir görünüme sahiptir (Şekil 1.6). Bu yapılar, faj parçacıklarının

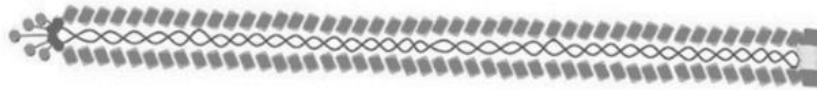
bakterilere adsorpsiyonundan sonra kaybolur. PhiKZ fajı, iç gövde yapısının görselleştirildiği ilk bakteriyofajdır (Krylov vd., 1984; Sokolova vd., 2014).



Şekil 1.6. PhiKZ (a) ve PhiKZ benzeri fajın (b) iç gövde yapıları

P. aeruginosa'ya etkili fajlar genetik materyal olarak dsDNA dışında, ssDNA (faj Pf3 gibi) ve dsRNA (faj phi8 gibi) genomlarını da içerebilmektedir (Luiten vd., 1985; Hoogstraten vd., 2000; Ruokoranta vd., 2006).

Inoviridae ailesinin üyeleri olan filamentli fajlar (Pf) zarfsız ve 5,5-10,6 kb'lık süper sarmal, dairesel, ssDNA genomuna sahip virüslerdir (Şekil 1.7). İnovirüsler yapısal olarak sarmal simetriye göre iki sınıfa ayrılabilir: Sınıf I İnovirüsler oldukça simetriktir ve *Escherichia coli*'yi enfekte eden Fd ve M13 gibi türleri içerir. Sınıf II İnovirüsler bükülmüş, sarmal bir simetriye sahiptir ve Pf fajlarını içerir. İnovirüsler, Gram-negatif bakterilerin piluslarına tutunur ve oluşturulan yeni fajlar, konakçıyı öldürmeden hücrelerden ekstrüzyonla salınırlar. Faj DNA'sı kromozom dışında kalabilir veya bakteri genomuna entegre olabilir. Pfl ve Pf3 fajları ICTV tarafından tür olarak tanınma kriterlerini karşılayan *P. aeruginosa* filamentli fajlarıdır (Secor vd., 2020; Knezevic vd., 2021; Gavric ve Knezevic, 2022).



Şekil 1.7. *Inoviridae* şematik gösterimi

DsRNA fajlarının keşfi, üç segmentli dsRNA genomuna sahip lipid içeren bir bakteriyofaj olan phi6'nın tanımlanması 1973 yılına dayanır. Faj phi6, ABD, Nebraska'da *Pseudomonas* bulaşmış fasulye samanından izole edilmiştir. Fajın konakçısı *P. syringae* pv. *phaseolicola*'dır (Vidaver vd., 1973). Phi6, bilinen diğer tüm bakteriyofajlardan iki temel açıdan farklıdır: polihedral bir kapsidi ve segmentli bir dsRNA genomunu çevreleyen bir lipid zarfa sahip ilk tanımlanan

fajdır. Bu zarflı virüsler *Cystoviridae* ailesinde yer alır. *Cystoviridae* fajları küresel (Şekil 1.8) ve yaklaşık 85 nm çapındadır. Bu ailede yer alan fajlar toplamda 12,7–15,0 kbç uzunluğunda, doğrusal, üç segmentli çift sarmallı RNA içerir. Tüm segmentler birkaç viral proteini kodlar. Konakçı aralıkları çoğunlukla Gram negatif bakteriler ve özellikle *Pseudomonas* türleridir (Poranen vd., 2017). ICTV yakın zamanda virüslerin taksonomik sınıflandırması için ek sıralamalar tanıtmıştır. Virüsleri konak özgüllüğüne, morfolojik özelliklere veya örneğin hastalık semptomlarına göre gruplandırmak yerine gerçek filogenetik ilişkileri yansıtan sınıflandırmayı baz almaktadır. Polimeraz geni (RdRp veya ters transkriptaz kodlayan) de RNA virüslerinin filogenetik analizlerinde ve sınıflandırılmasında kullanılacak bir ayırt edici gen olarak seçilmiştir (Mäntynen vd., 2023).



Şekil 1.8. *Cystoviridae* şematik gösterimi

GenBank Genom veri tabanında 2016 yılına kadar 6 adet çift sarmallı RNA (dsRNA) bakteriyofajının (phi6, phi8, phi12, phi13, phi2954 ve phiNN) ve 12 tek sarmallı RNA (ssRNA) bakteriyofajının genom dizileri yer almıştır. Yang vd., 2016 yılında hastane kanalizasyonundan *P. aeruginosa*'ya etkili ilk üç segmentli dsRNA genomuna sahip faj phiYY'yi izole etmiştir. Bu faj kuyuksuz, küresel ve yaklaşık 50 nm çapındadır. Bu keşfin ardından phiYY'nin *P. aeruginosa* enfeksiyonlarına karşı antimikrobiyal potansiyeli araştırılmıştır ve phiYY'nin antibiyotik dirençli *P. aeruginosa*'nın neden olduğu kronik akciğer enfeksiyonunun tedavisinde ilk insan uygulaması olarak bildirilmiştir. PhiYY, şiddetli pulmoner *P. aeruginosa* enfeksiyonu, tip I solunum yetmezliği olan 40 yaşında bir hastada son çare olarak uygulanmıştır. Faj hastadan izole edilen piyomelanin üreten *P. aeruginosa* suşuna etkili olmuştur. Uygulama dsRNA fajının kronik akciğer enfeksiyonunun

tedavisinde uygulanmasını temsil etse de dsRNA fajının güvenliği ve etkinliği için daha fazla değerlendirme gerektirmektedir (Li vd., 2023b).

1.3 Fajların Gıdalarda Kullanımı

1.3.1 Biyokoruma

Gıda sanitasyon teknikleri ve patojen gözetimindeki birçok ilerlemeye rağmen, gıda kaynaklı hastalıklar dünya çapında hastaneye yatış ve ölümün önemli bir nedeni olmaya devam etmektedir. Pastörizasyon, yüksek basınçlı işleme, ısınlama veya kimyasal dezenfektanlar gibi geleneksel yöntemler, gıdalardaki mikrobiyal popülasyonu çeşitli derecelerde azaltmakta ancak birtakım problemleri de beraberinde getirmektedir. Yüksek yatırım maliyeti, kimyasal antimikrobiyallerin aşındırıcı doğaları nedeniyle işleme ekipmanına olası hasar, gıdaların organoleptik nitelikleri ve besin değeri üzerindeki kayıplar ve bu dekontaminasyon stratejilerinin, gıdalarda doğal olarak bulunan birçok yararlı bakteriyi de ayırım gözetmeksizin öldürmesi bu problemlere örnek verilebilir. Bu eksikliklerden birkaçını ele alan umut verici bir teknik, patojenik bakterileri özel olarak hedeflemek ve onları gıdalardan uzaklaştırmak için çevreden izole edilen litik bakteriyofajları kullanan yeşil ve doğal bir yöntem olan bakteriyofaj biyokontrolüdür (Moye vd., 2018).

Faj biyokontrolü, gıdalarda patojen bakterileri, normal ve genellikle yararlı mikroflorayı olumsuz yönde etkilemeden inhibe etmek için litik fajların kullanılmasıdır. Bu teknoloji yalnızca patojenik bakterileri etkili bir şekilde inaktif hale getirmekle kalmaz ve gıda raf ömrünün uzamasını sağlar. Aynı zamanda tehlikeli kalıntıların olmaması, fajın uygun konakçı varlığında kendini çoğaltma özelliği, düşük maliyet avantajlarına da sahiptir. Bu nedenle ticari faj ürünleri birçok ülkede kullanılmaya başlanmıştır (Ge vd., 2022; Costa vd., 2023).

Gıda güvenliği uygulamaları için ilk faj ürünü olan ve *Listeria monocytogenes*'i hedef alan ListShield™, 2006 yılında hazır tüketime uygun et ve kümes hayvanı ürünlerine doğrudan uygulanmak üzere Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onay almıştır (Vikram vd., 2022). Günümüzde firmalar farklı patojenleri hedef alan pek çok faj ürününü satışa sunmaktadır. Phageguard, AgriPhage, Eliava, FagoFarma, Iskraphage gibi 20'yi aşkın firmanın faj terapi, hayvan sağlığı, gıda güvenliği gibi farklı alanlarda faj preparatı bulunmaktadır (Phage Products, 2024).

Gıdada kullanılmak üzere tasarlanan fajlar yüksek litik etkiye sahip olmalıdır. Konakçı aralıkları hedef mikroorganizmanın epidemiyolojik olarak önemli tüm suşlarını kapsamalıdır. Ayrıca latent süreleri kısa olmalıdır. Seçilen fajlar amaçlanan kullanım ortamında stabil olmalıdır. Tüm bunlara ek olarak fajların geniş bir konakçı aralığı da olmalıdır, ancak bu sınırlama faj kokteylleri kullanılarak hafifletilebilir (Kazi ve Annapure, 2016).

Bu bölümde son yıllarda gıdalarda yapılan bakteriyofaj çalışmalarına örnekler verilmiştir:

Abdelaziz vd. (2024) faj vB_BceS-M2 ve yaygın olarak kullanılan bir antimikrobiyal peptit olan nisin, gıdalardaki *B. cereus*'a karşı antimikrobiyal etkinliği artırmaya yönelik çalışma yapmışlardır. Nisinin fajla sinerjik etki gösterdiğini, potansiyel olarak besiyerinde faj dirençli bakterilerin gelişmesinin engellendiği gösterilmiştir. Çalışmada tam yağlı ve yağsız süt, haşlanmış pirinç, peynir ve dondurulmuş köfteler dahil olmak üzere çeşitli sıvı ve katı gıda matrislerinde hem 4°C'de hem de 25°C'de uygulamalar gerçekleştirilmiştir. Kombinasyonun düşük sıcaklıkta farklı gıdalarda oldukça etkili olduğu görülmüştür. Yine benzer bir çalışmada DZ1 adlı *B. cereus* fajının pirinç unu ve süt örneklerinde etkinliği belirlenmiştir. Pirinç unu örneğinde 25°C'de 6 saat inkübasyondan sonra, bakteri sayısı 3,44 log KOB/mL azaltılmış ve 12 saat sonrasında *B. cereus* sayısı tespit limitlerinin altına düşmüştür. Süt örneklerinde ise 25 °C' de 6 saat sonunda faj uygulanan grupta *B. cereus* sayısının 4,21 log KOB/mL azaldığı ve sonraki saatlerde ise *B. cereus* tespit edilemediği bildirilmiştir (Huang vd., 2024b).

Peng-Fei vd., (2024) tavuk etinde ve domuz etinde faj kullanarak *E. coli* O157:H7 ve *Salmonella* inhibisyonunu hedeflemişlerdir. Kontrol gruplarında 4°C'de 10 saatlik depolama sırasında, bakteri sayısı stabil kalmıştır. Tavuk örneklerinde *Salmonella* sayısı MOI (Multiple of Infection):1000 değerinde 2 saatin sonunda tespit limitlerinin altında indirgenmiştir. Aynı şekilde *E. coli* O157:H7 sayısı da 2 saatin sonunda tespit limitlerinin altında bulunmuştur. Domuz örneklerinde ise MOI 100 değerinde *Salmonella* sayısı 3,90 log KOB/cm²'den 1,88 log KOB /cm²'ye ve *E. coli* O157:H7 sayısı 3,89 log KOB /cm²'den 1,67 log KOB/cm²'ye indirgenmiştir. *Salmonella* inhibisyonunun hedeflendiği başka bir çalışmada ise tüketime hazır olarak satılan kavun ve ananas dilimlerinde faj karışımının etkinliği incelenmiştir. Çalışmada hazırlanan kokteyl ile kavunda *S.*

Typhimurium sayısında MOI 1000 ve 10000 değerlerinde 2 log KOB/g azalış; ananas örneklerinde ise MOI 10 ve 100 değerlerinde 1 log KOB/g azalış sağlandığı tespit edilmiştir (Encu vd, 2024).

Bir başka çalışmada ise tarçın yağı ve bakteriyofajın birlikte ve ayrı ayrı *Listeria monocytogenes* üzerine etkisi incelenmiştir. Çalışmada faj vB_LmoS-PLM9 ve tarçın yağlarının birlikte kullanımının, tekli işlemlerden daha yüksek verimlilik gösterdiği bildirilmiştir. MOI 100 değerinde faj ve % 0,125 oranında tarçın yağı kullanılan süt örneklerinde *L. monocytogenes*'in tespit limitleri altında kaldığı görülmüştür (Maung vd., 2024).

Lambuk vd., (2024) dana eti, çikolatalı süt ve marulda *Staphylococcus aureus*'un inhibisyonunu hedeflemişler ve faj mSA4 ile sırasıyla 2,8 log KOB /cm², 2,1 log KOB /mL ve 3,2 log KOB /cm² indirgeme elde etmişlerdir.

Bogun vd. (2024) ise tavuk ürünleri üretim sürecinde gıda zinciri boyunca *Campylobacter* yükünün azaltılmasına yönelik saha çalışmaları yapmıştır. Bu çalışmada faj ve diğer antimikrobiyal ajanlar tek başına ve kombine halinde içme suyu ve yem katkı maddesi olarak kullanılmıştır. Sodyum propiyonat, potasyum sorbat ve sodyum diasetattan oluşan organik asit karışımının içme suyu yoluyla uygulanması, dışkı örneklerinde ve kesim anında kör bağırsak örneklerinde 4,9 log KOB/mL gibi önemli azalma sağlamıştır. *Fletchervirus* fajı NCTC 12673 ve *Firehammervirus* fajı vB_CcM-LmqSCPL1/1'den oluşan faj karışımının uygulanması ise dozlamadan 1 gün sonra dışkı örneklerinde *Campylobacter* yükünde 1,1 log KOB/mL azalış sağlamıştır. Sadece yem yoluyla kurkumin uygulanması küçük ve tutarsız azalmalara yol açmıştır. Test edilen tüm önlem uygulamalarının kombinasyonu olan grupta 1,1 log KOB/mL'ye kadar azalmalar gözlemlenmiştir. Saha denemelerinin sonuçlarına göre, birincil üretimde hem tek başına hem de kombine azaltma önlemlerinin etlik piliçlerde *Campylobacter* yükünü azaltabildiğini, ancak hiçbir uygulamada sinerji gözlemlenmediği belirtilmiştir.

Bitki patojenlerine karşı mücadelede geleneksel antimikrobiyal ajanların, bakır bazlı bakterisitlerin ve antibiyotiklerin kullanımı, bitkilerde biyoakümülyasyon ve mikrobiyal direnç gibi çeşitli sorunlara neden olmaktadır. Bitki patojeni olan *Pseudomonas syringae*'nin çay bitkisinde inhibisyonun amaçlandığı bir çalışmada bitkiler faj vB_PsS_LDT32 ile muamele edilmiştir. Yapılan incelemede bitkilerde *Pseudomonas syringae* sayısının 4 gün sonra 1 log/0,5 g azalış gösterdiği tespit

edilmiştir (Liu vd., 2024a). Vu vd., (2024) sebzelerde yumuşak çürümeye neden olan *Pectobacterium* türlerine karşı iki fajdan (phiPccP-2 ve phiPccP-3) oluşan bir faj kokteyli hazırlamıştır. Bu faj kokteyli, in vitro denemelerde tek faj uygulamalarına kıyasla faj dirençli bakterilerin ortaya çıkmasını engellemiştir. Çin lahanası yapraklarında yapılan denemede de faj kokteyli uygulaması, olgunlaşmış yapraklarda yumuşak çürüme semptomunun gelişmesini etkili bir şekilde engellemiştir. Ayrıca çalışmada ek olarak üç fajdan (phiPccP-1, phiPccP-2 ve phiPccP-3) oluşan bir faj kokteyli Çin lahanası fidelerine uygulanmış ve kokteyl *Pectobacterium* suşlarının karışımına karşı üstün biyokontrol etkinliği göstermiştir. Sonuç olarak, faj kokteyllerinin geliştirilmesinin tek faj uygulamalarına kıyasla mahsullerde *Pectobacterium* suşlarının neden olduğu yumuşak çürüme hastalığının biyokontrolünde daha etkili bir yaklaşım olduğu belirtilmiştir.

Kabuklu deniz ürünleri ile yapılan bir uygulamada ise hedef bakteri olarak *Vibrio parahaemolyticus*'un inhibisyonu hedeflenmiştir. Çalışmada yapay olarak kontamine edilen örneklerin faj VP41s3 ile muamelesi sağlanmış ve 24 saat sonunda örneklerde 2,11 log KOB/mL birimlik bir inhibisyon elde edilmiştir (Liu vd., 2024b). Deniz çiftlik balıklarında ve omurgasızlarda hastalık salgınlarına neden olan *Vibrio alginolyticus*'a karşı yeşil biyokontrol yöntemlerinin geliştirilmesini hedefleyen bir çalışmada deniz suyundan izole edilen faj VaPW kullanılmıştır. VaPW'nin *V. alginolyticus* enfeksiyonuna karşı in vivo koruma etkisini tahmin etmek için karideslerle bir sağkalım testi gerçekleştirilmiştir. Farklı MOI' lerde fajla tedavi edilen gruplardaki *V. alginolyticus* ile enfekte karideslerin sağkalım oranları 7 gün boyunca takip edilmiştir. MOI 0,01'den ve çok daha düşük olan MOI 0,0001'deki faj gruplarında sağkalım oranında hafif bir iyileşme (%55) görülürken MOI 0,01 ve 1 'lerdeki fajla tedavi edilen gruplar çok daha yüksek (%65 ve %70) sağkalım oranları göstermiştir (Wang vd., 2024).

Bakteriyofajların gıda koruyucu olarak kullanılmasının etkinliği, gıda matrisi, yüzey alanı, temas süresi, bakteri yükü, bakteriyofaj dozajı ve diğer bileşiklerin varlığı gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Bakteriyofajların gıdayı korumada başarılı bir şekilde uygulanması, optimum sonuçlara ulaşmak için dikkatlice değerlendirilmesi gereken bu temel değişkenlerden etkilenir (Chaudhary vd., 2024).

Literatürde yapılan çalışmalara bakıldığında *P. aeruginosa*'nın gıdalarda fajlar ile eliminasyonuna yönelik çalışmaların yetersiz olduğu görülmektedir.

Kauppinen vd. (2021) sularda *P. aeruginosa*'nın fajlar ile biyokontrolünü amaçlamışlardır. Bu amaçla atık sulardan izole ettikleri fajlar ile (*Pseudomonas* fajı vB_PaeM_V523 ve *Pseudomonas* fajı vB_PaeM_V524) yaptıkları denemede 6 saat içerisinde *P. aeruginosa* inhibisyonu gözlemlenmiştir. Denemelerde en fazla azalış faj kokteyl ile yapılan analizde bulunmuştur ($>3,4$ log). Yine benzer olarak Grami vd. (2021) izole ettikleri PA25 fajının *P. aeruginosa* inhibisyonunda etkisini incelemişler ve 3 ila 5 log arasında inhibisyon sağladığını tespit etmişlerdir. Bu çalışmada faj ile muamele edilen atık su örneklerindeki *P. aeruginosa* suşlarının streptomisin, gentamisin ve rifampisin antibiyotiklerine karşı direncinin azaldığı da belirlenmiştir. Sharma vd. (2021) atık sulardan izole ettikleri *Pseudomonas* phage DRL-P1'nin litik aktivitesini ve farklı koşullardaki etkinliğini incelemişlerdir. Fajın 4°C ila 40°C sıcaklık aralığına ve pH 5,0 ila 10,0 koşullarında stabilitesinin bozulmadığı rapor edilmiştir. Kirlenmiş yüzeyler için yapay olarak kirletilmiş lam modeli oluşturularak fajın %90 dekontaminasyon potansiyeli olduğu rapor edilmiştir. Zhang vd. (2022) faj endolizin enzimleri ile yaptıkları çalışmada şişelenmiş su, süt, tavuk ve somon üzerinde bu enzimlerin *P. aeruginosa*'ya karşı etkinliği değerlendirilmiştir. Çalışmada EDTA ile veya yalnız olarak etkinliğine bakılan enzimlerin su (2,2 log) tavuk (0,6 log) ve somonda (1,1 log) indirgeme sağlayabildiği kaydedilmiştir. Süt ile yapılan denemede canlı sayımlarda önemli bir azalma olmamıştır. Yılmaz (2024) *P. aeruginosa*'ya etkili vB_Pae-K10 ve vB_Pae-K13 fajlarının 4 ve 37°C'de litik aktivitesinin olduğunu, yapılan deneylerde 4°C'de tavuk etinde *P. aeruginosa*'ya karşı çok kuvvetli enfektif etki gösterdiğini ve dolayısıyla tavuk etinde biyokoruyucu olarak kullanma potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir.

1.3.2 Sanitasyon ve Antibiyofilm Ajanı

Fajlar gıdalarda patojen inhibisyonun yanı sıra endüstride sanitasyon ve antibiyofilm ajanı olarak kullanılabilir. Son yıllarda bakterilerin oluşturmuş olduğu biyofilmleri faj preparatları ile önlemeye yönelik çalışmalar artmış durumdadır. Fajların, kapsül polisakkaritlerini veya biyofilm matrisinin ekzopolisakkaritlerini parçalamak için kullanılan depolimerazlar ürettiği bilinmektedir. Bu enzimler fajların biyofilm boyunca nüfuz etmesini ve hücre yüzeyindeki reseptörlere erişimini sağlamaktadır. Peptidoglikanı parçalayan ve bakteri hücrelerinin içeriden lize olmasına neden olan faj enzimleri olan

endolizinlerin de biyofilmleri parçaladığı tespit edilmiştir. Bu özelliklere dayanarak fajların, enzimlerinin veya fajların antibiyotiklerle birlikte kullanımı biyofilm kontrolü için umut verici stratejiler olarak kabul edilmektedir (Meneses vd., 2023).

Bakterilerin gıda işleme yüzeylerine tutunması, bu yüzeylerin patojenik bakterilerin rezervuarı olarak hizmet edebilmesini beraberinde getireceğinden insan sağlığı için büyük bir tehdittir. Yuan vd. (2019) faj vB_PaeM_LS1'nin *P. aeruginosa* biyofilmlerine karşı kapasitesini lam üzerinde incelemiştir. Biyofilmler 4.,8.,12. ve 24. saatlerde gözlemlenmiştir. Biyofilm azalımı en iyi 8 saat muamele edilen preparatta meydana gelmiştir. Canlı hücre sayımlarında da 4 saat boyunca fajla muamele edilen biyofilm hücrelerinin yaklaşık %93,5 oranında, bakteriyofaj eklenmesinden 8 saat sonra alınan örneklerde ise en etkili biyofilm azalması %99,7 oranında gözlenmiştir. Zhang vd. (2022) faj endolizin enzimleri ile yaptıkları çalışmada polistiren reçine ve paslanmaz çelik yüzeylerde *P. aeruginosa* biyofilmlerine karşı güçlü bir etki gözlemlendiğini belirtmiştir. Canlı biyofilm hücrelerinde 37°C'de 2 saatlik işlemten sonra %99,9'dan fazla azalma olduğu görülmüştür. Yapılan çalışmalar fajların veya fajlar ile oluşturulan kokteyllerin özellikle *P. aeruginosa* biyofilmlerine karşı göstermiş olduğu yüksek inhibisyon etkisi gıda endüstrisinde faj tabanlı dezenfektanların kullanılabilirliğini göstermektedir. Direkt fajlar ile veya farklı antimikrobiyal materyaller ile yapılan gıda denemelerinin azlığı ise bu konuda yeni çalışmaların yapılması gerektiğini göstermektedir.

Diğer patojenlere etkili fajlarla ilgili antibiyofilm çalışmaları da mevcuttur. *E. coli* de gıdanın çapraz kontaminasyonuna ve yüzey kontaminasyonuna neden olan kolayca biyofilm oluşturan bir bakteridir. Brás vd., (2024) faj phT4A'ü, 25°C'de plastik ve paslanmaz çelik yüzeylerdeki *E. coli* biyofilmini önlemek ve azaltmak için kullanmıştır. Faj phT4A'nın inaktivasyon etkinliğinin yüzeye bağlı olduğu ve plastik yüzeylerde daha yüksek inaktivasyon gösterdiği belirtilmiştir. Plastik ve paslanmaz çelik üzerinde sırasıyla 6 saatlik inkübasyondan sonra *E. coli* biyofilminde maksimum 5,5 ve 4,0 log KOB/cm² azalma gözlemlenmiştir. Biyofilm önleme deneylerinde ise faj 12 saat sonra 3,2 log KOB/cm² biyofilm oluşumunu önlemiştir. Bu çalışmada faj tedavisi sırasında faj dirençli bakterilerin ortaya çıktığı gözlemlenmiş olsa da faj dirençli bakterilerin faj duyarlı bakterilere kıyasla daha düşük bir biyofilm oluşturma kapasitesi olduğu ve genel olarak fajların patojenik bakterilere karşı yüzey dezenfektanı olarak uygulanabilir olabileceğini

belirtilmiştir. Benzer olarak Abou Zeid vd. (2021) 4 faj içeren bir faj kokteyli ile MDR (Multidrug-resistant) *E. coli*'nin büyümesini 8 saatte in vitro olarak tamamen engellemiş ve 24 saatlik biyofilm gelişimini önemli ölçüde ortadan kaldırmıştır. Bu çalışma, bu dört yeni fajın, biyofilm üreten MDR *E. coli*'ye karşı antimikrobiyal ajan olarak daha da ileri düzeyde karakterize edilebileceğini öne sürmektedir.

Cha vd. (2019) bir faj endolizini olan LysCSA13'ün polistiren, cam ve paslanmaz çelik dahil olmak üzere çeşitli yüzeylerde stafilocok biyofilmlerini gidermede yüksek bir etkinliği gözlemlemiş ve biyofilm kütlesinde yaklaşık %80-90'lık bir azalma görmüştür. Ayrıca, 300 nM LysCSA13, paslanmaz çelik ve cam üzerinde oluşan stafilokokal yerleşik hücreleri, kontrole kıyasla 1-3 log birim oranında etkili bir şekilde ortadan kaldırmıştır. Taramalı elektron mikroskobu analizi ile biyofilm matrisine gömülü hücrelerin etkili deformasyonu ve ortadan kaldırılması görüntülenmiştir. Araştırmacılar, LysCSA13'ün temas yüzeyi matrisinden bağımsız olarak stafilokokal planktonik hücreleri ve biyofilmleri etkili bir şekilde kontrol edebileceğini ve LysCSA13'ün çeşitli gıda işleme ortamlarında umut vadeden bir biyokontrol ajanı olarak olası kullanımını önermiştir.

Antibiyofilm ajanları olarak bireysel aktivitelerinin yanı sıra, lizin ve depolimerazın bir kombinasyonu ile biyofilmlerin etkili bir şekilde uzaklaştırılması sağlanabilir. Olsen vd. (2018) endolizin LysK ve poli-N-asetilglukozamin depolimeraz DA7'nin statik ve dinamik modellerde stafilocok biyofilmlerine karşı etkinliğini araştırmıştır. Hem LysK hem de DA7, sırasıyla düşük mikromolar ve nanomolar konsantrasyonlarda polistiren ve cam yüzeylerden statik ve dinamik biyofilmleri uzaklaştırmıştır. Enzimler birleştirildiklerinde sinerjik olarak hareket etmiş ve dinamik modelde bireysel enzim tedavisine göre canlı hücre sayısını önemli ölçüde azaltmıştır. Genel olarak, sonuçlar LysK ve DA7'nin tek başlarına ve kombinasyon halinde güçlü anti-biyofilm ajanları olduğunu göstermiştir.

Ancak, fajlar tarafından bir biyofilmin tamamen yok edilmesinin zor olduğunun farkında olmak önemlidir: matrisin ve diğer salgılanan moleküllerin varlığı faj difüzyonunu bozabilmekte ve fajlar için bir tuzak gibi davranabilmektedir. Ayrıca tedavi sırasında çoğalabilen faj dirençli fenotiplerin varlığı ve biyofilm topluluklarının yüksek çeşitliliği konakçı spesifik olan fajların, biyofilm tedavisini tamamlamasına engel olabilmektedir (Meneses vd., 2023).

2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1 Materyal

2.1.1 Bakteriler

Fajların izolasyonunda Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Mikrobiyoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan *P. aeruginosa* NCTC 12924 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 standart suşları kullanılmıştır. Yine laboratuvar kültür koleksiyonunda bulunan *P. putida* DSM 6125, *E. coli* O157:H7 ATCC 43888, *S. Enteritidis* NCTC 12694, *B. cereus* ATCC 10876 suşları ve yerel izolatlar olan *Proteus vulgaris*, *Lelliottia amnigena*, *Morganella morganii* fajların konakçı skalasının belirlenmesi için yararlanılmıştır.

2.1.2 Antibiyotik Duyarlılık Testi

Bakterilerin antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi amacıyla siprofloksasin (CIP5), tetrasiklin (TE30), streptomisin (S300), gentamisin (CN10), penisilin (P10) antibiyotik diskleri (Liofilchem, İtalya) kullanılmıştır.

2.1.3 İzolasyon Örnekleri

Tez çalışması kapsamında bakterilerin ve fajların izolasyonunun sağlanması amacıyla çeşitli örnekler toplanmıştır. Bakteri izolasyonu için toplanılan izolasyon materyalleri Tablo 2.1’de verilmiştir.

Tablo 2.1. Bakteri izolasyonunda kullanılan örnekler

Örnek Çeşidi	Örnek Sayısı
Çiğ Süt	24
Çeşme Suyu	6
Beyaz Et ve Kırmızı Et	3
Sebze ve Meyve	Mandalina-1 Marul-3 Karnabahar-1 Havuç-1 Biber-1 Roka-1 Salatalık-1 <u>Toplam:9</u>
Tüketime Hazır Salata	1
Çevresel Örnekler (Su, toprak vb.)	4

Toplanan örnekler Bölüm 2.2.1’de verildiği şekilde analize alınmıştır. Faj izolasyonu için toplanılan izolasyon materyalleri ise Tablo 2.2’de verilmiştir.

Tablo 2.2. Faj izolasyonunda kullanılan örnekler

Atık su, çevre suları, dere vb.	1. Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi atık suyu×2 2. Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Gököy Kampüsü, Kanalizasyon suyu 3. Yedigöller, Sazlıgöl 4. Bolu, Gököy Köyü, Gököy Barajı 5. Bolu, Doğancı Köyü, Mudurnu Çayı 6. Bolu, Doğancı Köyü, Çevre suları 7. Bolu, Kümes altlık suyu
Çiğ inek sütü örnekleri	1. Bolu, Doğancı Köyü×3 2. Bolu, Karaköy Köyü×3 3. Bolu, Civrili Köyü ×4 4. Bolu, Kürkçüler Köyü×4 5. Bolu, Sultanbey Köyü 6. Bolu, Ağacılar Köyü 7. Bolu, Sultanbey Köyü×3 8. Bolu, Sandallar Köyü 9. Bolu, Kasaplar Köyü 10. Bolu, Hamidiye Köyü 11. Bolu, Örencik Köyü 12. Bolu, Çamyayla Köyü
Toprak örneği	1. Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Gököy Kampüsü×2 2. Bolu, Doğancı Köyü 3. Bolu, Gököy Köyü

2.2 Yöntem

2.2.1 Bakteri İzolasyonu

Bakteri izolasyonu için laboratuvara getirilen örneklerin %0,85’lik FTS ile seri dilüsyonları hazırlanmış ve Cetrimide Agarda yayma kültür yöntemine göre ekimleri gerçekleştirilmiştir. Ekim yapılan Petri kutuları 24-48 saat 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucu Petri kutularında oluşan sarı-yeşil koloniler seçilmiş ve sürme yöntemi ile seçilen kolonilerin saflaştırılması sağlanmıştır. Saflaştırılan şüpheli kolonilerin biyokimyasal testleri yapılmıştır. Biyokimyasal testleri yapılan şüpheli *P. aeruginosa* suşlarının tanıları BAİBÜ, Bilimsel Endüstriyel ve Teknolojik Uygulama ve Araştırma Merkezi (BETUM)’nde bulunan MALDI TOF-MS ile hizmet alımı şeklinde sağlanmıştır.

2.2.1.1Biyokimyasal Testler

2.2.1.1.1 42 °C’de Gelişme Testi

Ardışık pasaj yapılan kültürlerde 42°C’de gelişme *P. aeruginosa* için karakteristik bir özelliktir. Saflaştırılan kültürler Nutrient Broth besiyerine inoküle edilmiş ve 24 saat boyunca 42°C’de inkübe edilmiştir. Gelişme olan tüpler pozitif olarak değerlendirilmiştir (Al-Saffar ve Jarallah, 2019).

2.2.1.1.2 Gram Boyama

Saflaştırma işleminden sonra seçilen izolatların 18-24 saatlik aktif kültürleri, Gram boyama işlemine tabi tutulmuştur. Gram boyama adımları şu şekilde yapılmıştır:

1. Aktif kültürlerden steril bir öze ile bir koloni alınmış ve bir lam üzerine aktarılmıştır. Koloni 1 damla saf su ile yayılmış ve kurumaya bırakılmıştır. Lam bek alevinden 2-3 kez geçirilerek fiksasyon yapılmıştır.
2. Preparata kristal viyoleto damlatılarak 1 dakika beklenilmiştir. Preparat saf su ile durulanmıştır.
3. Lügol-iyot çözeltisi damlatılarak 1 dk. beklenilmiştir. Ardından preparat yıkanmıştır.
4. Daha sonra %95’lik etil alkol damlatılarak 10-15 sn. beklenilmiştir. Preparat saf su ile durulanmıştır.
5. Safranin damlatılmış ve 10-30 sn. beklenilmiştir. Preparat yıkanmış ve kurumaya bırakılmıştır.

Kuruyan preparatın üzerine immersiyon yağı damlatılmıştır. Koloniler immersiyon objektifinde (x100’lük objektif) incelenmiştir. Mavi-mor renkteki koloniler Gram pozitif, pembe renkli koloniler ise Gram negatif olarak değerlendirilmiştir (Temiz, 2016).

2.2.1.1.3 Katalaz Testi

Saflaştırılan koloniler TSA (Tryptic Soy Agar/CASO) besiyerine ekilmiş ve 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası Petri kutusunda bulunan koloniler üzerine %3’lük H₂O₂ çözeltisinden 2-3 damla damlatılmıştır. Gaz kabarcıklarının oluşumu, pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Temiz, 2016).

2.2.1.1.4 Oksidaz Testi

Oksidaz testi aerob bakterilerde bulunan oksidaz enziminin varlığını belirlemek için yapılmaktadır (Halkman, 2019). Oksidaz testi için hazır ticari olarak satılan Bactident Oxidase kullanılmıştır. Bu amaçla tek kullanımlık plastik öze ile katı besiyerinden bir koloni alınmış ve reaktif damlatılarak 60 sn. içindeki mavi-menekşe renk pozitif olarak değerlendirilmiştir.

2.2.1.1.5 Asetamit Testi

Asetamit Broth besiyeri bileşiminde yer alan asetamit, tek karbon kaynağıdır. *Pseudomonas aeruginosa* ve *Pseudomonas fluorescens* ayırımında kullanılmaktadır (Halkman, 2019). Asetamit Broth besiyerine ekim yapılmış ve 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası gelişme görülen tüpler pozitif olarak değerlendirilmiştir.

2.2.1.1.6 UV Işıma Testi

Cetrimide Agarda *P. aeruginosa* kültürlerinin UV ışığa maruz bırakıldığında floresans ışıma verdiği bilinmektedir. Saflaştırılan kültürler Cetrimide Agara sürme kültür yöntemi ile ekilmiş ve 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası koloniler UV ışık altında incelenmiştir. Işıma veren kültürler pozitif olarak değerlendirilmiştir (Bhuiya vd., 2018).

2.2.1.1.7 Sitrat Testi

Sitrat testi bakterilerin sitrat bulunan besiyeri ortamında sitratı tek karbon kaynağı olarak kullanıp kullanmadığını belirlemek amacıyla yapılmaktadır. Bu amaçla Simmon sitrat besiyeri kullanılmıştır. Bakteri kültürü, iğne uçlu öze ile tüp içerisinde bulunan yatık agarlı Simmon sitrat besiyeri yüzeyine ekilmiştir. Tüp, 37°C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. Besiyerinin renginin orijinal yeşil renginden maviye dönmesi pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Temiz, 2016).

2.2.1.1.8 MacConkey Testi

MacConkey Agar üzerinde gelişen pembe renkli koloniler laktozu fermente etme yeteneğine sahiptir. *P. aeruginosa* laktozu fermente edememektedir. Dolayısıyla laktoz fermentasyonu olmadığında pH'da bir değişiklik olmayacağından pembe renge dönüşmeyen koloniler *P. aeruginosa* olarak değerlendirilmiştir (Al-Saffar ve Jarallah, 2019).

2.2.2 Bakteriyofaj İzolasyonu

Faj izolasyonu için Knezevic vd.'nin (2009) kullandığı yöntem modifiye edilmiştir. Laboratuvara getirilen sıvı örnekler öncelikli olarak kaba filtre kâğıdı kullanılarak süzölmüştür. Katı örnekler ise bir miktar %0,85'lik FTS ile sulandırılarak süzölmeleri sağlanmıştır. Elde edilen filtratlar 6000 rpm'de 15 dk. santrifüj edilmiştir. Süpernatant steril şişelere alınmış, %10 kloroform ile karıştırılmış ve 4°C'de depolanmıştır.

Süpernatantlarda faj varlığının belirlenmesi için çift tabaka agar yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla öncelikli olarak konakçı bakterilerin aktiveştirilmesi sağlanmıştır. Aktif ve logaritmik fazda bulunan 50 µL konakçı hücre yumuşak agar (%0,5 agar içeren) TSA içerisine aktararak karıştırılmıştır. Bu karışım içerisinde önceden dökölmüş ince tabaka CASO Agar bulunan Petri kutularına yayılmıştır. Petri kutularına dökölen agar katılaştıktan sonra işaretli bölgelere elde edilen süpernatantlardan 10'ar µL damlatılmış ve Petri kutuları, 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucu Petri kutularındaki işaretli bölgelerde bulunan litik zonların veya plakların varlığı incelenmiştir.

2.2.3 Fajların Zenginleştirilmesi, Titre Belirleme ve Saflaştırma

Damlatma işlemi sonucunda plak veya zon görölen süpernatant örnekleri olası faj solösyonları olarak zenginleştirme işlemine tabi tutulmuştur. Zenginleştirme işlemi Eppendorf tüpünün içerisinde gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla steril boş Eppendorf tüpü içerisine 10 µL konakçı bakteriden eklendikten sonra 100 µL faj solösyonu eklenmiştir. Oda sıcaklığında 10-15 dakika bakteri ve faj, adsorpsiyonun sağlanması için bekletilmiş ve daha sonrasında Eppendorf tüpü üzerine 1 mL TSB (Tryptic Soy Broth) eklenip 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda hücre artıklarının uzaklaştırılması amacı ile 12.500 rpm'de 15 dakika santrifüj işlemi yapılmıştır. Elde edilen süpernatant steril bir Eppendorf tüpüne alındıktan sonra %10 kloroform ile karıştırılmıştır. Bu işlemler yaklaşık 10⁸ POB/mL faj titresi elde edilene kadar pasajlar yapılarak tekrarlanmıştır (Sillankorva vd., 2010).

Titre belirleme işlemi için son tarihli zenginleştirmeden seri dilösyonlar hazırlanılmış ve çift tabaka agar yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla, log fazdaki bakteriden 70 µL alınarak 3 mL yumuşak agar üzerine eklenerek karıştırılmıştır. Bu karışım önceden hazırlanmış ince tabaka agar üzerine yayılmıştır. Agar

katılaştıktan sonra Petri kutusu üzerinde işaretli bölgelere faj dilüsyonlarından 10'ar µL damlatılmış ve 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda Petri kutularındaki faj plakları sayılmış ve faj titresi aşağıda verilen formül (2.1) ile hesaplanmıştır.

$$\text{Faj titresi (POB/mL)} = \text{Plak sayısı} \times \text{Dilüsyon Faktörü} \times 10^2 \quad (2.1)$$

Zenginleştirmeler sonucu yaklaşık 10^7 - 10^8 POB/mL titreye ulaşan fajların tek plak izolasyonu yapılmıştır. Tek plak izolasyonu için faj solüsyonunun dilüsyonları hazırlanmıştır. Her bir dilüsyon bir Petri kutusuna yayılacak şekilde gerekli dilüsyonlardan 100 µL alınarak 70 µL konakçı bakteri ile yumuşak agara ilave edilmiş, karıştırıldıktan sonra ince tabaka agar üzerine yayılmıştır. İnkübasyona bırakılan Petri kutularında oluşan plak morfolojileri incelenerek farklı olan plaklar seçilmiştir. Bu plaklar steril enjektör iğnesi ile kesilmiş ve steril temiz bir Eppendorf tüpüne alınmıştır. Üzerine yaklaşık 100 µL besiyeri ilave edilerek agar içerisindeki fajların besiyerine geçmesi sağlanmıştır. Ardından konakçı bakteriden 10 µL ilave edilerek klasik zenginleştirme prosedürüne devam edilmiştir (Acar Soykut, 2007).

2.2.4 Fajların Gelişme Eğrilerinin Belirlenmesi

Logaritmik fazda bulunan konakçı bakteriden 900 µl alınarak ve üzerine titresi 10^7 POB/mL olan fajdan 100 µL eklenmiştir. Fajlar 37°C'de 10-15 dakika inkübe edilerek süre sonunda adsorbe olmayan fajları uzaklaştırmak için 6000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Peletler, 10 mL TSB besiyerinde çözüldükten sonra 10^{-7} 'ye kadar dilüsyonları hazırlanarak inkübasyona bırakılmıştır. Sıfırıncı dakika dahil ilk 30 dakika boyunca her 5 dakikada bir, daha sonra 20 dk. aralıklarla faj bakteri karışımından 10 µL alınmış ve dilüsyonları yapılarak çift tabaka agar yöntemi ile faj titresi belirlenmiştir. Faj titrelerinin sabit kaldığı süre ile latent dönem belirlenmiştir. Artarak sabit kalan faj sayısının latent dönemdeki faj sayısına oranlanmasıyla faj patlama büyüklükleri bulunmuştur (Acar Soykut, 2007).

2.2.5 Fajların Adsorpsiyon Grafiklerinin Belirlenmesi

Fajların adsorpsiyon grafiklerinin belirlenmesi için Kropinski (2009)'nin kullandığı yöntem kullanılmıştır. Log fazındaki kültürler, 10^7 KOB/mL olacak

şekilde seyreltilmiştir. Konakçı kültür ve faj MOI 0,1 olacak şekilde aşağıdaki denklik (2.2) ile hesaplanmış ve karıştırılmış, 10 dakika boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sırasında 1 dakikalık aralıklarla 50 µL karışımdan alınarak buz aküsü içerisinde bekleyen 950 µL CASO içerisine eklenmiştir. Seri dilüsyonlar yapılarak süpernatanttaki konakçıya absorbe olmamış fajların titreleri belirlenmiştir. Aşağıdaki eşitlikler (2.3 ve 2.4) kullanılarak fajların adsorpsiyon hız sabiti (k) ve adsorpsiyon oranı belirlenmiştir.

$$MOI \text{ (Multiciple of Infection)} = \text{Faj titresi (POB)} / \text{Bakteri sayısı (KOB)} \quad (2.2)$$

$$k = [(2.3 / (B \times t))] \times [\log (P_0 / P)] \quad (2.3)$$

$$\text{Adsorpsiyon oranı: } [(P_0 - P) / P_0] \times 100 \quad (2.4)$$

Eşitlikte verilen k, adsorpsiyon hız sabitini; B, bakteri konsantrasyonunu; P₀, başlangıç faj titresini; P, son faj titresini; t, faj titresi P₀'dan P'ye düşünceye kadar geçen zamanı temsil etmektedir.

2.2.6 Fajların Konakçı Skalasının Belirlenmesi

Daha önce izole edilmiş ve tanımlanmış olan Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan patojen bakterilerin ve bu çalışma kapsamında izole edilmiş suşların fajlara karşı duyarlı olup olmadıklarını incelenmiştir. Bu amaçla test edilecek logaritmik fazdaki bakteri, 3,5 mL yumuşak agar ile karıştırılarak önceden dökülmüş olan agarlı besiyeri üzerine yayılmıştır. Agarın katılaşmasından sonra titresini yaklaşık 10⁸ POB/mL olan fajlar, 10'ar µL olacak şekilde agar üzerinde belirlenmiş bölgelere damlatılmıştır. Ardından Petri kutuları, 37 °C'de 18-24 saat inkübasyon bırakılmış ve süre sonunda faj plaklarının oluşup oluşmadığı kontrol edilmiştir (Acar Soykut, 2007).

2.2.7 Fajların Farklı Koşullarda Stabilitesinin Belirlenmesi

Fajların farklı sıcaklıklardaki (50-60-70-80°C) stabilitesinin belirlenmesi amacıyla 1 mL yaklaşık 10⁸ POB/mL faj solüsyonu belirtilen sıcaklıkta 1 saat bekletilmiştir. Ardından fajların titresini çift tabaka agar yöntemi ile tespit edilmiştir. Farklı NaCl konsantrasyonlarında (%2-4-6-8-10-15-20-25-30) fajların stabilitesinin belirlenmesi amacıyla farklı tuz içeriğine sahip SM tampon (Salin

magnezyum, pH 7.5: 5.8 g/L NaCl, 2g/L MgSO₄.7H₂O, 50mL/L 1 M Tris-Cl (pH 7.5), 5 mL %2 jelatin çözeltisi, 1L distile su) hazırlanmış ve fajlar 25 °C'de 1 saat boyunca bekletilerek süre sonundaki faj titreleri çift tabaka agar yöntemi ile belirlenmiştir. Yine benzer olarak fajların farklı pH (2-3-4-5-8-9-10-11-12) değerlerinde 1 saat tutulması ve süre sonunda faj titrelerinin belirlenmesi ile farklı pH'larda aktif kalıp kalmadıkları kontrol edilmiştir (Elgawish, 2023).

2.2.8 Fajların Antibiyofilm Özelliklerinin Belirlenmesi

Fajların *P. aeruginosa* biyofilmlerine karşı etkinliği 96 kuyucuklu polistiren plakada incelenmiştir. Biyofilm çalışmaları 3 farklı deney modeli oluşturularak gerçekleştirilmiştir. Öncelikle faj ve bakteri belirlenen MOI değerlerinde (MOI 1, 10, 100 ve 1000) toplam hacim 200 µL olacak şekilde eşit hacimde aktarılmış ve 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda kuyucuklar PBS (pH 7,4) ile üç kez yıkanmıştır. Plaka oda sıcaklığında 30-40 dakika kurutulmuştur. Daha sonra 15 dakika boyunca %0,1 kristal viyole ile boyanmış ve ardından saf su ile yıkanmıştır. Biyofilme tutunan kristal viyole %95 etanol içinde çözündürülerek, OD'leri mikro plaka okuyucuda (Allsheng AMR-100T, Çin Halk Cumhuriyeti) 570 nm'de okunmuştur. Biyofilm inhibisyonu aşağıda verilen eşitlik (2.5) ile hesaplanmıştır.

$$\text{Biyofilm inhibisyonu (\%)} = \frac{[(\text{Kontrolün Optik Yoğunluğu} - \text{Örneğin Optik Yoğunluğu}) / \text{Kontrolün Optik Yoğunluğu}] \times 100}{(2.5)}$$

Diğer deney setinde ise 200 µL faj solüsyonu 96 kuyucuklu plakaya tutunması için 24 saat bekletilmiş ardından kuyucuklar tutunmayan fajların uzaklaştırılması için PBS (pH 7,4) ile yıkanmıştır. Kuyucuklara daha önce konulan faj ile eşit hacimde bakteri kültürü inoküle edilmiş ve fajların biyofilm oluşumunu engellemesi/önlemesi tespit edilmiştir.

Son olarak oluşan biyofilmin fajlar ile giderilmesi tespit edilmiştir. Bu deneyde ise kuyucuklara 200 µL, 10⁵ KOB/mL bakteri kültürü inoküle edilmiş ve 24 saat boyunca biyofilm oluşturması sağlanmıştır. Süre sonunda kuyucuklar yıkanmış ve kuyucuklara farklı MOI (1,10,100 ve 1000) değerine göre 200 µL faj (10⁵, 10⁶, 10⁷ ve 10⁸ POB/mL) inoküle edilmiştir. Plaka tekrar 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kuyucuklardaki biyofilm miktarı tespit edilerek oluşmuş biyofilmin ne kadar giderildiği % olarak tespit verilmiştir (Hosseini-doust vd., 2013).

2.2.9 Fajların DNA İzolasyonu

Fajların DNA izolasyonu için 10^8 - 10^9 POB/mL titrede olan faj lizatları 17500 rpm'de (dv/dk) 90 dk. santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Çökmüş olan faj peleti 200 µL SM tamponu ile süspanse edilmiştir. Bu süspansiyona son derişimleri 1 µg/mL olacak şekilde DNaz ve RNaz eklenmiştir. Ardından 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Sonrasında faj DNA'ları, GeneJET Viral DNA and RNA Prufication Kit (Thermo Fisher Scientific, Cleveland, OH, ABD) kullanılarak kit protokolüne göre izole edilmiştir. İzole edilen DNA'dan 3 µL alınmış ve bir parafilm üzerinde 1-2 µL Loading Dye ile pipetleme yapılarak karıştırılmıştır. DNA-Loading Dye karışımı % 1 agaroz ve son konsantrasyonu 1 µL/mL olacak şekilde etidyum bromür içeren, 1X TAE (Tris-asetat-EDTA) tamponu içerisindeki agaroz jele yüklenmiştir. DNA'lar 60 V/cm'lik bir dielektrik kuvvette yaklaşık 30 dakika yürütülmüştür (Yıldırım, 2023). Yürütme işlemi sonunda bantların parlaklığı incelenmiştir. DNA'ların saflıkları 260 ve 280 nm'de ABS (absorbans) değerlerinin birbirine oranlanmasıyla tespit edilmiştir.

2.2.10 Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) Analizi

Faj DNA'ları jel elektroforez ile görüntüledikten sonra bant parlaklığına bakılarak enzim kesimine girecek olan yaklaşık DNA miktarına karar verilmiştir. Analiz için literatürde yer alan *SmaI* (Kwiatek vd., 2015), *NdeI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *XhoI* (Thermo Scientific, Fast Digest) enzimleri kullanılmıştır (Han vd., 2014). Enzimler firmanın belirtmiş olduğu talimatlara göre hazırlanmış ve kullanılmıştır. Fragment büyüklüklerinin kıyaslanması amacıyla da Lambda DNA/*EcoRI*+*HindIII* Marker (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılmıştır.

Analiz için DNA, tampon, saf su ve enzim son hacim 20 µL olacak şekilde (Tablo 2.3) buz içerisinde tutulan PCR tüplerinde karıştırılmış ve kesime hazır hale getirilmiştir. Daha sonra bu reaksiyon karışımları firma talimatlarına uygun olarak 37°C'de 10 dk. su banyosunda bekletilmiştir. Süre sonunda karışımlar DNA izolasyonu bölümünde anlatıldığı gibi agaroz jele yüklenmiş ve jel elektroforez ile yürütülmüştür. Yürütme sonunda jel BAİBÜ, Bilimsel Endüstriyel ve Teknolojik Uygulama ve Araştırma Merkezi (BETUM)'nde bulunan jel görüntüleme sistemi (Imaging System, Biorad ChemiDoc™MP) ile görüntülenmiştir. Bakteriyofajların

yaklaşık genom büyüklüklerini belirlemek için GelJv.2.0 ve Image Lab yazılımları kullanılmıştır.

Tablo 2.3. Enzim kesime giren bileşenler

Bileşen	Miktar
Steril deiyonize su	Değişken
Kesim tamponu	2 µL
DNA örneği	Değişken
Restriksiyon enzimi	1 µL
Toplam hacim	20 µL

2.2.11 Fajların Morfolojik Karakterizasyonu

İzole edilen fajların morfolojik karakterizasyonu transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ile yapılmıştır. Bu amaçla fajlar 4°C'de 20000 rpm'de 2 saat boyunca santrifüj ile çöktürülmüştür. Daha sonra faj peletleri 0,1 M amonyum asetat (pH 7,0) ile yıkanmış, ardından %2 uranil asetat ile negatif boyanmıştır. Faj-boya karışımları daha sonra karbon formvar kaplı ızgaraya (gridlere) damlatılmıştır. Fazla boya 15 dakika kadar beklendikten sonra uzaklaştırılmıştır. Hazırlanmış olan örneklerden elektron mikrograflarının eldesi ODTÜ Merkezi Laboratuvar'dan hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir (Sillankorva vd., 2008). TEM analizinden sonra fajların kapsid şekli, kapsid boyutları, kuyruk uzunluğu vb. gibi özellikleri belirlenmiştir.

2.2.12 Plak Etkinliğinin (EOP) Belirlenmesi

Fajların EOP değerleri Abdelghafar vd.'nin (2023b) belirtmiş olduğu yöntemle göre yapılmıştır. EOP değeri, hedef bakteri tarafından elde edilen toplam plak sayısının, homolog konak bakteri tarafından elde edilen toplam plak sayısına bölünmesiyle elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar yüksek, orta, düşük üretim veya verimsiz şeklinde değerlendirilmiştir.

2.2.13 Fajların Litik Etkisinin Belirlenmesi

Fajların litik aktivitelerini belirlemek amacıyla farklı MOI değerlerinde fajların bakterileri indirgemesi incelenmiştir. Bakteri miktarı 10³ KOB/mL ve MOI değerleri 1, 10, 100 olacak şekilde fajlar ve bakteriler 96 kuyucuklu plakada karıştırılmıştır. Plakalar, mikro plaka okuyucu cihazında 20 dakika aralıklarla okuma yapacak şekilde 24 saat çalkalanarak 37°C'de inkübe edilmiştir

(Abdelghafar vd. 2023b). Süre sonunda zamana karşı bakteri yoğunluğu OD₆₀₀ değerleri ile verilerek, farklı MOI'lerde fajların bakteriler üzerindeki litik etkisi grafik olarak gösterilmiştir.

2.2.14 Gıda Denemesi

Gıda denemesinde örnek olarak içme suyu, yağsız süt ve marul örnekleri kullanılmıştır. Deneylerde fajların farklı oranlardaki etkinliğinin tespiti için MOI 1, 10 ve 100 değerlerinde çalışılmıştır. Gıda denemesi için kullanılan karışımlardaki bakteri ve faj miktarları Tablo 2.4'te verilmiştir.

Tablo 2.4. Örnek gruplarında bulunan faj ve bakteri miktarları

Örnekler	MOI değerleri	Bakteri karışımı miktarı (KOB/mL)	Faj karışımı miktarı (POB/mL)
İçme Suyu	Kontrol	1.10 ³	-
	MOI 1	1.10 ³	1.10 ³
	MOI 10	1.10 ³	1.10 ⁴
	MOI 100	1.10 ³	1.10 ⁵
Yağsız Süt	Kontrol	1.10 ³	-
	MOI 1	1.10 ³	1.10 ³
	MOI 10	1.10 ³	1.10 ⁴
	MOI 100	1.10 ³	1.10 ⁵
Marul	Kontrol	1.10 ³	-
	MOI 1	1.10 ³	1.10 ³
	MOI 10	1.10 ³	1.10 ⁴
	MOI 100	1.10 ³	1.10 ⁵

Gıda denemesi için öncelikli olarak örneklerin dezenfekte edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla içme suyu otoklav ile sterilize edilmiştir. Süt denemeleri için UHT yağsız inek sütü kullanılmış ve yerel marketlerden temin edilmiştir. Marul denemesi için yine yerel marketlerden marul temin edilmiştir. Taze marul yıkandıktan sonra 3 x 3 cm'lik kare parçalara kesilmiştir. Bu parçalar %75'lik etanol ile dezenfekte edilmiş ve steril saf su ile yıkanmış ardından biyogüvenlik kabiniinde kurutulmuştur (Zhou vd., 2022). Daha sonra 8 mL süt ve su örnekleri için verilen son konsantrasyonları Tablo 2.4'te verilen değerler olacak şekilde 1mL faj kokteyli ve 1 mL bakteri karışımı eklenmiştir. Marul yapraklarına ise 100 µL faj ve 100 µL bakteri karışımı otomatik pipet ile damlatma yapılarak uygulanmıştır. Kontrol gruplarına ise faj kokteyli yerine belirtilen miktarlarda FTS konulmuştur. Ardından kontrol ve diğer örnek grupları 37°C'de 18-24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası örneklerdeki bakteri sayısı Cetrimide ve CASO Agara ekim yapılarak belirlenmiştir.

2.2.15 Antibiyotik Duyarlılık Testi

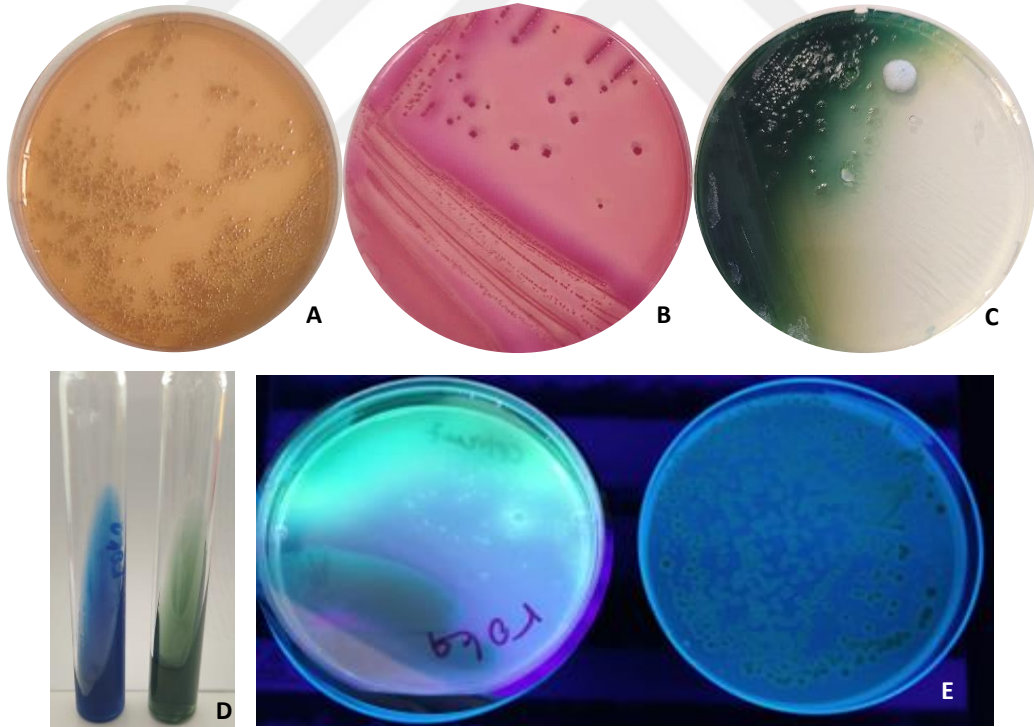
Konakçı bakterilerin faj uygulaması ile antibiyotik duyarlılığında bir değişim olup olmadığı test edilmiştir. Bu amaçla Grami vd.'nin (2021) kullandığı yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Faj uygulamasından önce bakterilerin antibiyotik duyarlılıkları Monica (2002)'ye göre belirlenmiştir. *P. aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılıkların ölçümü için steril eküvyonlar, sıvı besiyerinde geliştirilmiş olan 18-24 saatlik aktif kültürlerle aseptik koşullarda daldırılmış ve ardından TSA yüzeyine tüm agar yüzeyini kapayacak şekilde yayılmıştır. Daha sonra antibiyotik diskleri bu agar üzerine uygun şekilde yerleştirilmiştir. Petri kutuları düz bir şekilde inkübatöre konularak 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucu disklerin etrafında oluşan zonlar ölçülmüştür.

Fajların bakteriler üzerindeki etkisinin belirlenmesi için aktif konakçı bakterinin 1 mL'lik kültürü 8000 rpm'de 15 dk santrifüj edilerek pelet haline getirilmiş ve 90 mL TSB besiyerinde süspanse edilmiştir. Aynı zamanda bu besiyerine 1 mL, 10^5 POB faj karışımı eklenmiştir. Bu karışımlar 37°C'de 48 saat inkübe edilmiş ve inkübasyon sonrası bakterilerin antibiyotik duyarlılıkları yeniden ölçülmüştür.

3. BULGULAR

3.1 *P. aeruginosa* İzolasyonu

Bakteri izolasyonu için farklı örnekler steril koşullarda toplanarak laboratuvara getirilmiş ve gerekli dilüsyonlar hazırlanmıştır. Dilüsyonlardan Cetrimide Agara yayma kültür yöntemi ile ekimleri yapılmıştır. Petri kutuları 37°C’de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda Petri kutularında yeşil pigment üreten, UV ışıma veren kolonilerin seçimi yapılmıştır. Bu suşlardan Nutrient Broth besiyerine ekim yapılmış ve 42°C’de gelişimleri incelenmiştir. Bu sıcaklıkta gelişebilen suşlar Asetamit Nutrient Broth besiyerine ekilmiş ve bu besiyerinde gelişebilen suşların Bölüm 2.2.1.1’de verilen diğer biyokimyasal testleri yapılmıştır. Oksidaz, katalaz ve sitrat pozitif ve MacConkey Agar besiyerinde pembe olmayan koloni oluşturanlar şüpheli *P. aeruginosa* suşları olarak değerlendirilmiştir (Fotoğraf 3.1). Bu testlerin sonuçlarına göre şüpheli kolonilerin tanıları MALDI-TOF MS ile yapılmıştır (EK 1).



Fotoğraf 3.1. Biyokimyasal testler

A: MacConkey Agarda negatif sonuç veren muhtemel *P. aeruginosa* kolonileri B: MacConkey Agarda pembe renk oluşturan muhtemel *P. aeruginosa* olmayan koloniler C: Katalaz testi sonucunda oluşan kabarcıklar D: Simon sitrat testi, soldaki pozitif sağdaki negatif sonuç E: UV ışıma testi, soldaki pozitif sonuç

Biyokimyasal testler ve MALDI-TOF MS ile tanı sonucunda 24 çiğ süt, 10 atık su, toprak vb. çevresel örneklerden, 3 et örneğinden, 1 tüketime hazır salata ve 9 meyve sebze örneğinden (bkz. Tablo 2.1) 8 adet *P. aeruginosa* suşunun izolasyonu sağlanmıştır. İzolasyonu yapılan suşların kodları ve izolasyon kaynakları Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1. İzole edilen *P. aeruginosa* suşları

İzolat Kodu	Tanımlama Sonucu	İzolasyon Materyali
C10	<i>P. aeruginosa</i>	Çiğ Süt
SLT	<i>P. aeruginosa</i>	Tüketime Hazır Salata
R1	<i>P. aeruginosa</i>	Roka
Mr1	<i>P. aeruginosa</i>	Marul
Mr2	<i>P. aeruginosa</i>	Marul
A1	<i>P. aeruginosa</i>	Çevresel Atık Su
BX	<i>P. aeruginosa</i>	Biber
BK	<i>P. aeruginosa</i>	Biber

İzole edilen 8 izolat ve laboratuvar kültür koleksiyonunda *P. aeruginosa* NCTC 12924 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 standart suşları, fajların izolasyonu ve konakçı skalasının belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır. Bununla birlikte çalışmalar sırasında izole edilen farklı *Pseudomonas* türleri de laboratuvar kültür koleksiyonuna dahil edilmek üzere MALDI-TOF MS ile tanımlanmış ve stoklanmıştır. İzolatlar (Tablo 3.2) bu tez kapsamında konakçı skalasının belirlenmesi çalışmalarında kullanılmıştır.

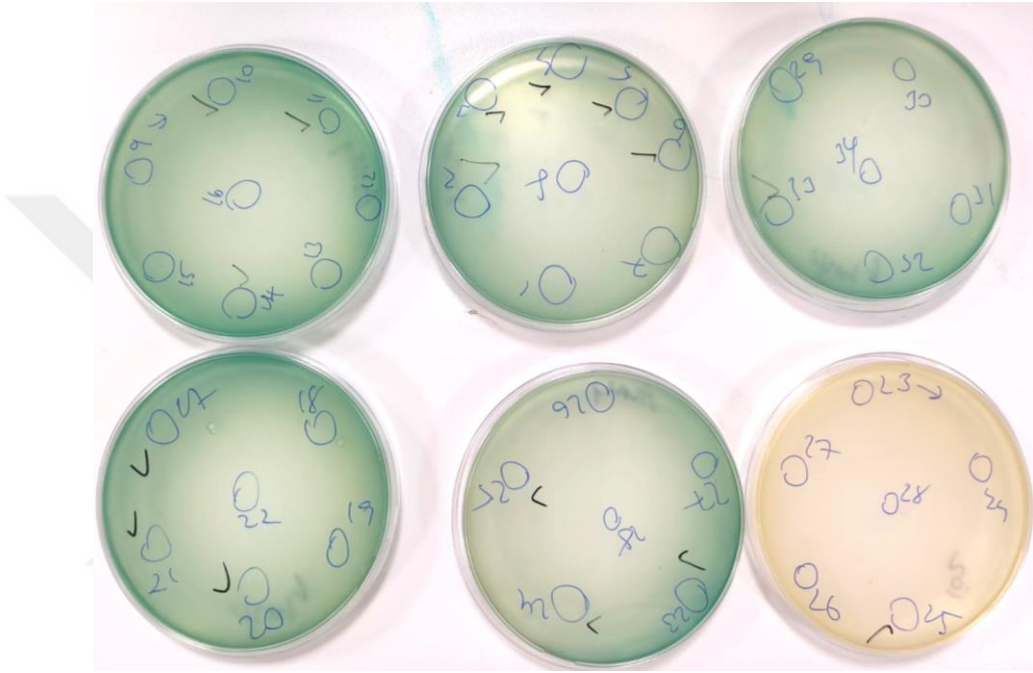
Tablo 3.2. İzole edilen *Pseudomonas* spp.

İzolat Kodu	Tanımlama Sonucu	İzolasyon Materyali
MÇS2	<i>P. brassicacearum</i>	Çiğ Süt
HVC-1	<i>P. monteilii</i>	Havuç
Vit.K	<i>P. alcaligenes</i>	Çeşme Suyu
C11-3	<i>P. tolaasii</i>	Çiğ Süt
MND-4	<i>P. plecoglossicida</i>	Mandalina
SLT-S	<i>P. fulva</i>	Tüketime Hazır Salata

3.2 Bakteriyofaj İzolasyonu

Bakteriyofajlar genellikle konakçı hücrelerinin bulunduğu ortamdan izole edilmektedirler. Bu amaçla çiğ süt, atık su, toprak gibi materyaller toplanılmış ve

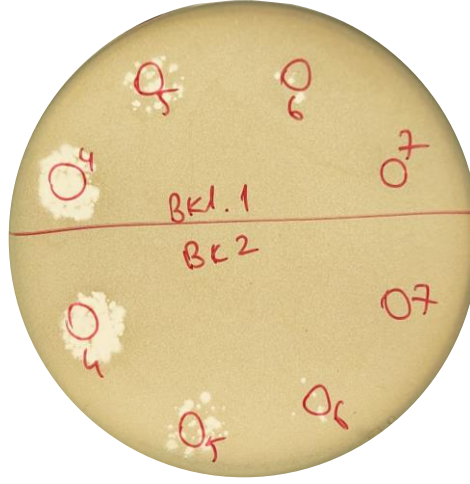
bu materyallerden fajların izolasyonu sağlanmıştır. Konakçı olarak laboratuvar kültür koleksiyonunda bulunan *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 12924, *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşları kullanılmıştır. Toplanan örnekler Bölüm 2.2.2’de anlatıldığı şekilde konakçı bakteri üzerine damlatılmıştır. Litik plak/zon varlığı saptanan örneklerin (Fotoğraf 3.2) zenginleştirmeleri yapılmıştır. Sonuç olarak 4 farklı toprak, 8 farklı su ve 24 farklı süt örneğinden toplamda 28 farklı faj izolasyonu sağlanmıştır.



Fotoğraf 3.2. Damlatma yapılan Petriler

3.3 Fajların Zenginleştirilmesi, Titresinin Belirlenmesi ve Saflaştırılması

İzole edilen fajlar titrelerinin yükseltilmesi için zenginleştirme işlemine tabi tutulmuştur. Zenginleştirme işlemleri sırasında düzenli aralıklarla fajların titresi takip edilmiştir (Fotoğraf 3.3). Zenginleştirme işlemine faj titresi 10^{7-8} POB/mL düzeyine erişene kadar devam edilmiştir. Bu aşamada titresi hızlı yükselmeyen, litik etkisi zayıf bulunan fajların eliminasyonu gerçekleştirilmiştir.



Fotoğraf 3.3. Titre belirleme

Titresi yaklaşık 10^7 - 10^8 POB/mL düzeyine ulaşan fajların tek plak saflaştırılması yapılmıştır. Farklı plak morfolojisine sahip fajlar (Fotoğraf 3.4) enjektör iğnesi yardımı ile agar üzerinden alınmış ve yeniden zenginleştirme işlemine tabi tutulmuştur. Fajların saflaştırılması olan bu işlem en az üç kez tekrar edilmiş ve fajların saflaştırıldığından emin olunmuştur.



Fotoğraf 3.4. Farklı plak morfolojisine sahip fajlar

Zenginleştirme ve saflaştırma işlemleri sırasında yapılan elemeler sonucu 28 adet fajdan saflaştırılmış 15 adet faj seçilmiş ve tez kapsamındaki analizler bu 15 faj ile gerçekleştirilmiştir. Çalışma sırasında kullanılan bu 15 fajın, kodları ve izolasyon kaynakları Tablo 3.3'te verilmiştir.

Tablo 3.3. Tez kapsamında kullanılan fajlar

Faj Kodları	İzolasyon Materyalleri
S9-1	Çiğ Süt
S9-2	Çiğ Süt
S11-1	Çiğ Süt

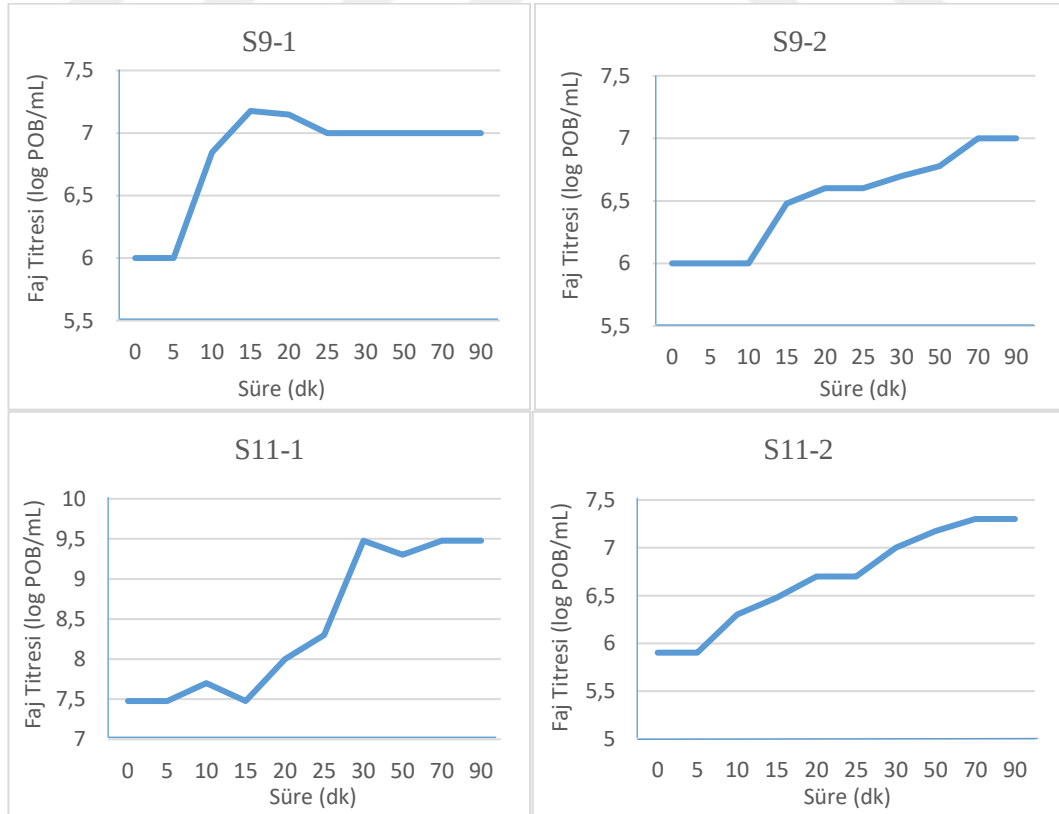
Tablo 3.3 (devam) Tez kapsamında kullanılan fajlar

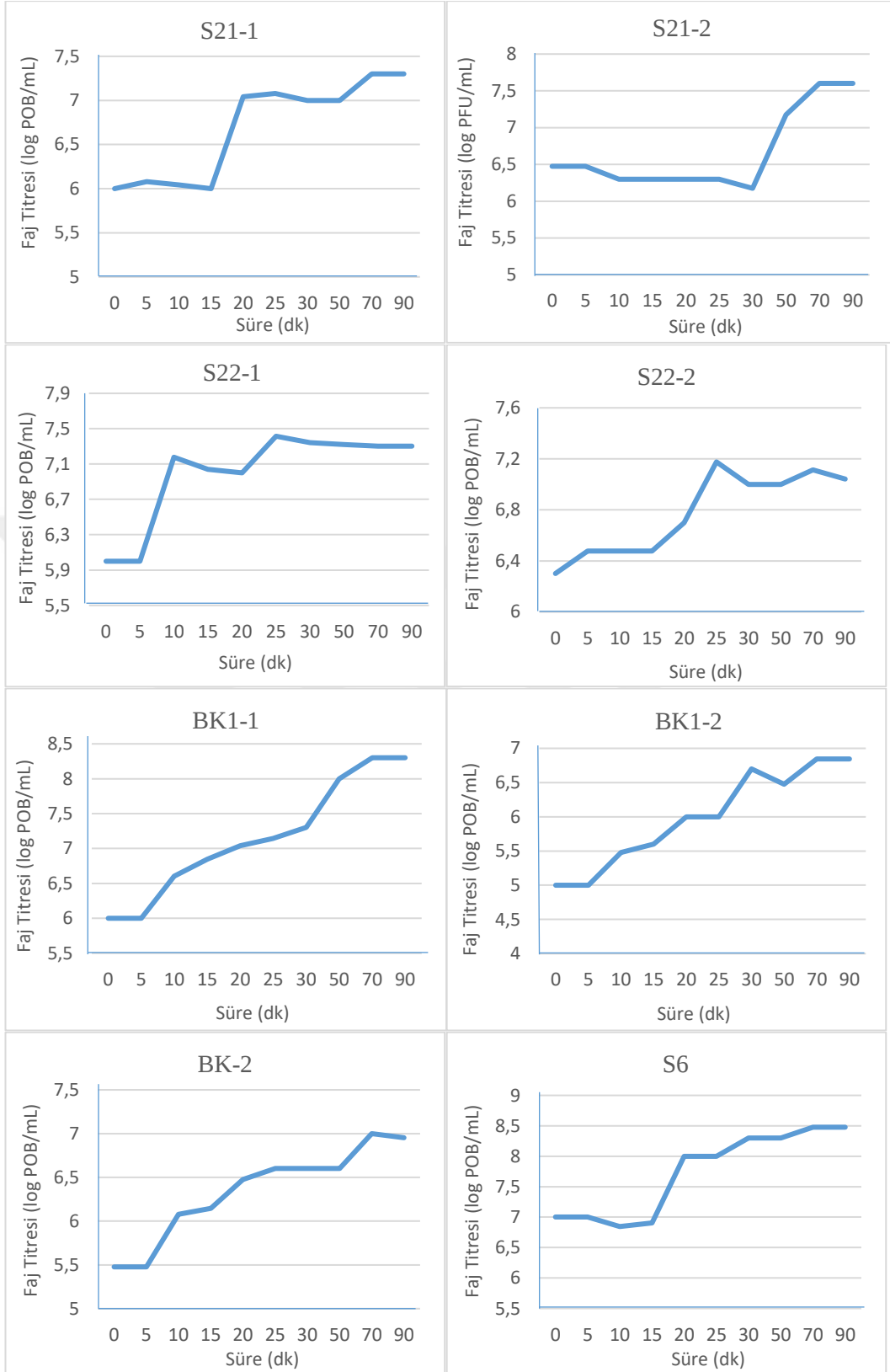
S11-2	Çiğ Süt
S21-1	Çiğ Süt
S21-2	Çiğ Süt
S22-1	Çiğ Süt
S22-2	Çiğ Süt
BK1-1	Kanalizasyon suyu
BK1-2	Kanalizasyon suyu
BK2	Kanalizasyon suyu
S6	Çiğ Süt
S16	Çiğ Süt
H1	Çiğ Süt
D1	Toprak

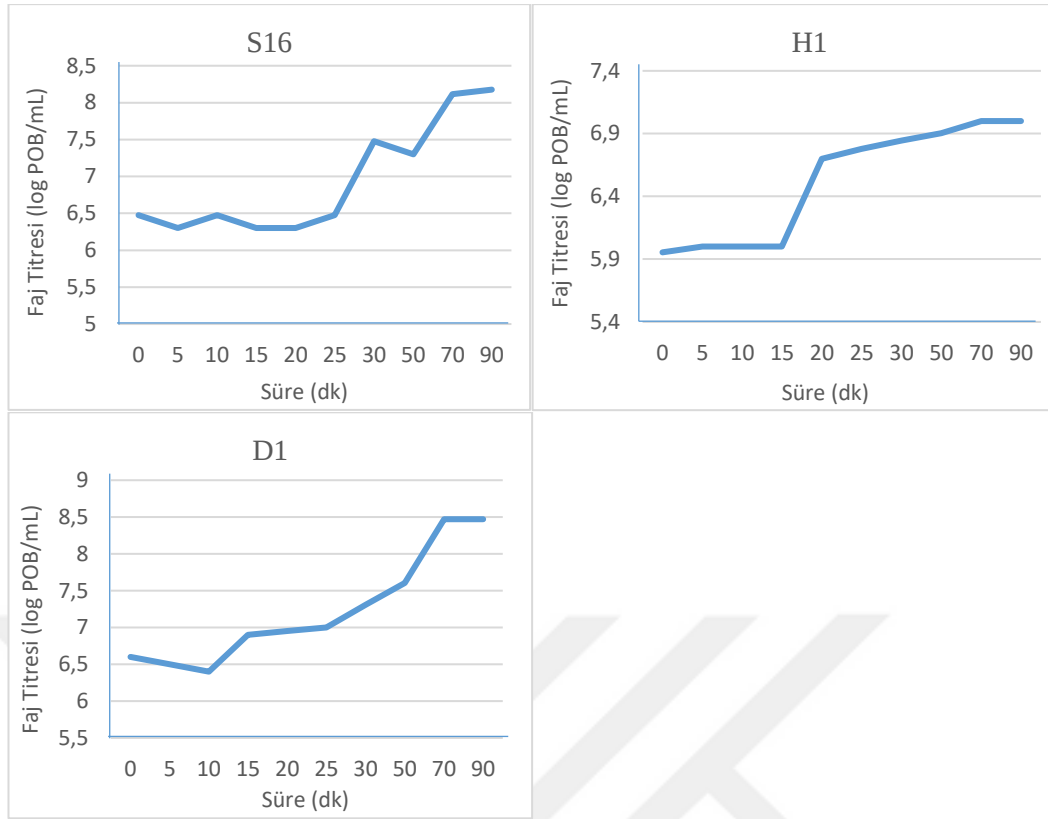
3.4 Fajların Replikasyon Parametreleri

3.4.1 Fajların Gelişme Eğrileri

Fajların tek aşamalı gelişme eğrileri 1939'da tanımlanmıştır ve günümüzde hala fajların replikasyon parametrelerinin belirlenmesi için kullanılmaktadır (Ellis ve Delbruck, 1939). Gelişme eğrileri ile fajların patlama büyüklüğü, artış dönem süresi ve latent dönem süreleri belirlenmektedir. Çalışılan fajlara ait gelişme eğrileri aşağıda verilmiştir (Şekil 3.1).







Şekil 3.1. Fajların gelişme eğrileri

Bu eğrilere göre fajların patlama büyüklükleri ve latent süreleri hesaplanarak Tablo 3.4'te verilmiştir.

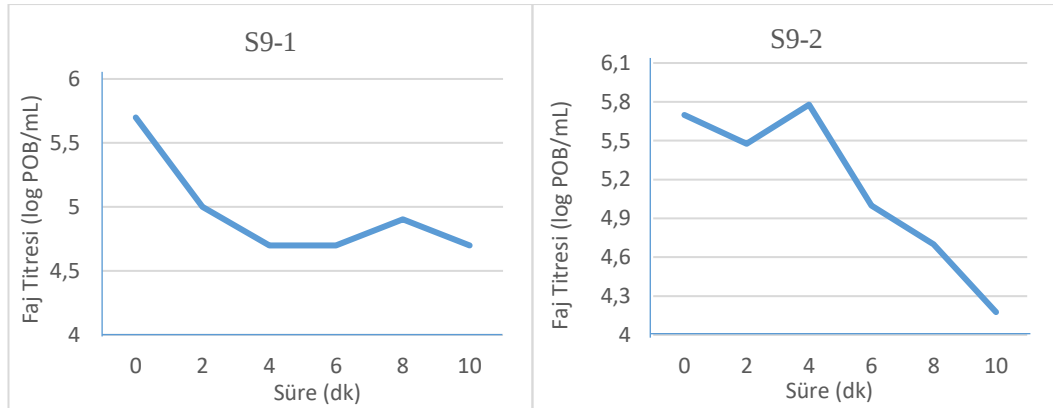
Tablo 3.4. Fajların replikasyon parametreleri

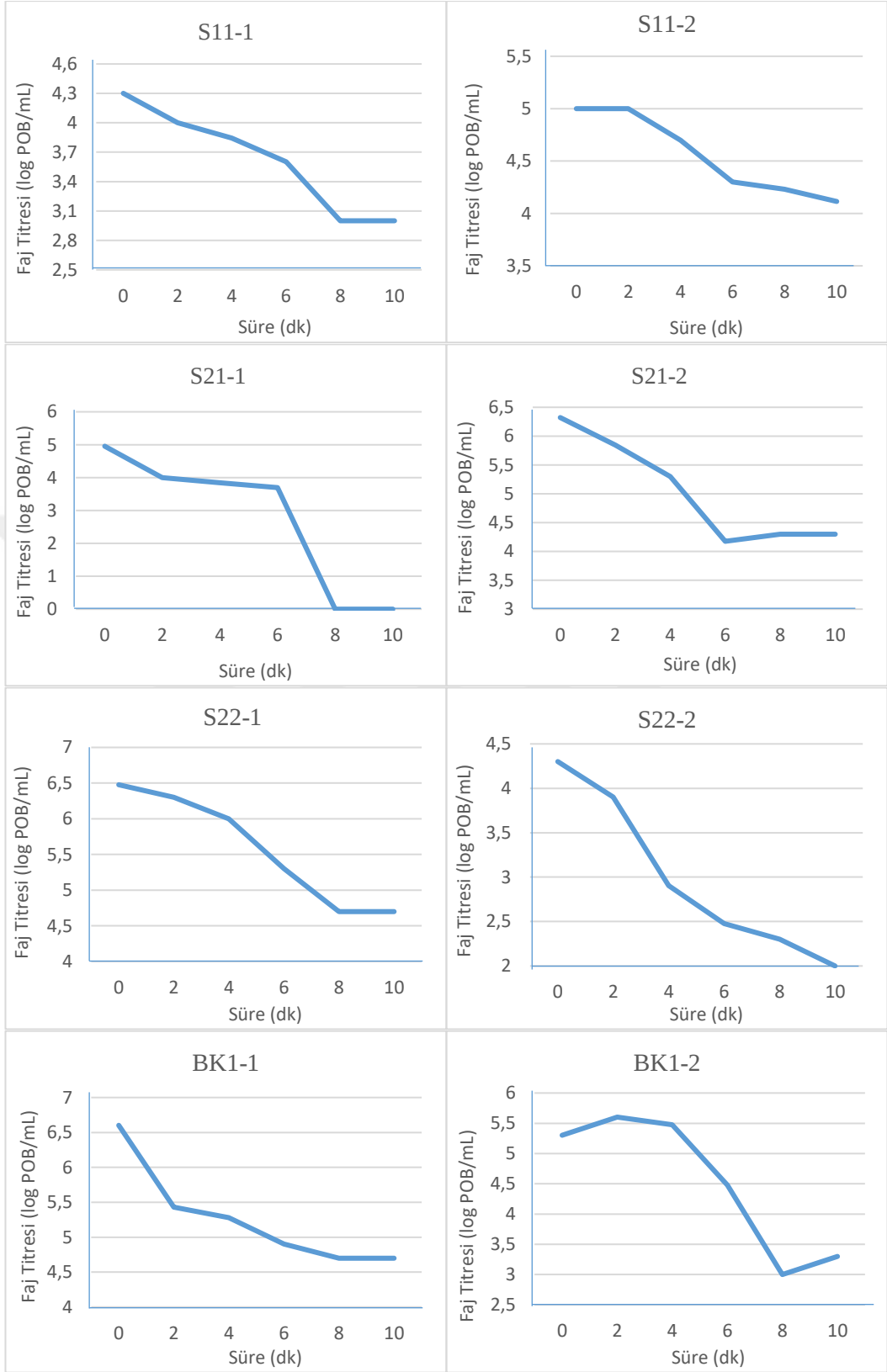
Faj Kodları	Latent Dönem (dk)	Patlama Büyüklüğü (POB/hücre)
S9-1	5	10
S9-2	10	10
S11-1	15	100
S11-2	5	25
S21-1	15	20
S21-2	30	26
S22-1	5	20
S22-2	15	40
BK1-1	5	200
BK1-2	5	23
BK-2	5	33
H1	15	10
D1	10	100
S6	15	37
S16	25	46

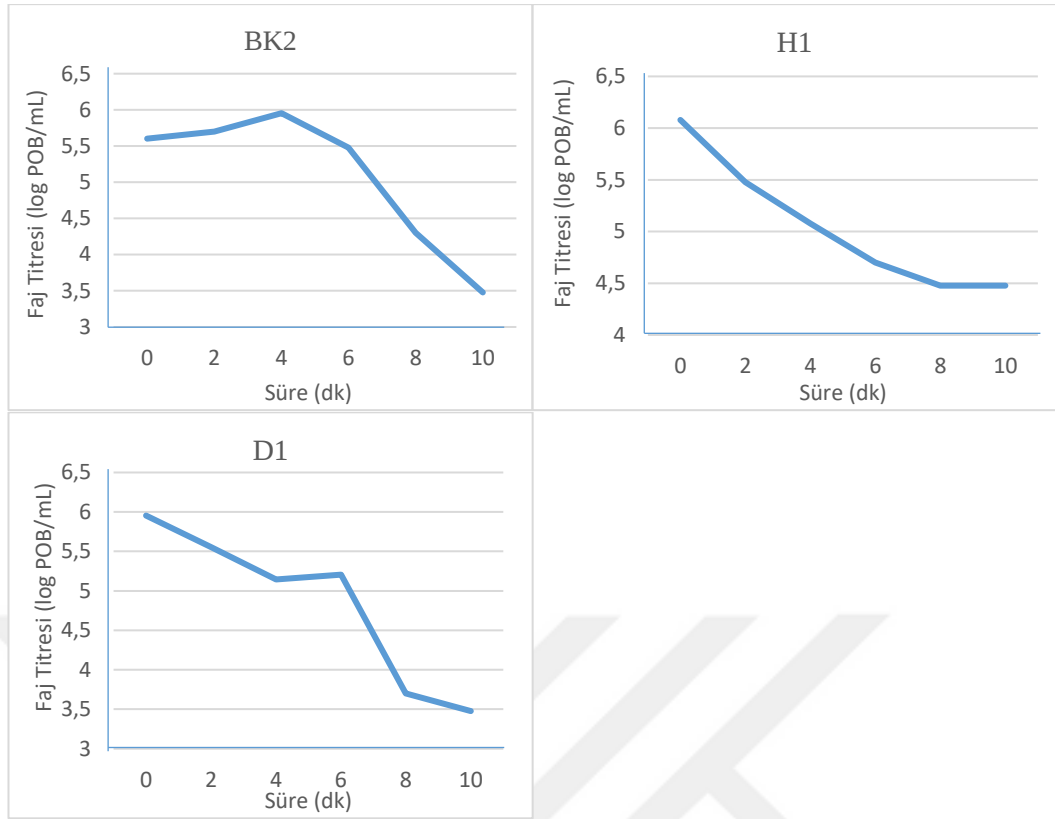
Fajların latent dönemleri fajın bir bakteriyi enfekte ettikten sonra yeni fajların konakçı hücre içerisinde montajlanıp salınmasına kadar geçen süreyi ifade etmektedir (Heineman ve Bull, 2007). Fajların latent dönem süreleri en az 5 dk. (S9-1, S11-2, S22-1, BK1-1, BK1-2, BK2) ve en fazla 30 dk. (S21-2) olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar fajların latent dönemlerinin kısa olduğunu göstermektedir. Patlama büyüklüğü ise bir fajın bir bakteriyi enfekte ettikten sonra ortama yayılan yeni faj sayısını ifade etmektedir. Bu sayıyı hesaplamak için artış dönemi sonunda elde edilen ortalama faj titresi, latent dönem süresince sabit kalan faj titresine oranlanmıştır. Buna göre fajların patlama büyüklükleri 10 (S9-1, S9-2, H1) ile 200 POB/hücre (BK1-1) arasında bulunmuştur.

3.4.2 Fajların Adsorpsiyon Süreleri ve Oranları

Fajların yaşam döngülerinin ilk aşaması olan adsorpsiyon aşaması, konakçı hücrenin faj tarafından tanınıp hücre yüzeyine tutunduğu önemli bir aşamadır. Faj enfeksiyonunun özgülüğü bu aşama ile tanımlanmaktadır. Fajlar, diğer virüsler gibi zorunlu hücre içi parazitler olduğundan, bakteri hücrelerine başarılı bir şekilde nüfuz etmek, yaşam döngülerinin devamı için olmazsa olmaz bir koşuldur (Rakhuba vd., 2010). Fajlara ait adsorpsiyon grafikleri aşağıda verilmiştir (Şekil 3.2).







Şekil 3.2. Fajlara ait adsorpsiyon grafikleri

Fajların 10 dakikalık süreç içerisinde belli aralıklarla faj titreleri ölçülerek adsorpsiyonu takip edilmiştir. Adsorpsiyon eğrilerine göre Bölüm 2.2.5'te yer alan formüller ile fajların adsorpsiyon hızları ve oranları bulunmuştur (Tablo 3.5).

Tablo 3.5. Fajların adsorpsiyon hızı ve oranı

Faj Kodları	Adsorpsiyon Hızı (mL/dk)	Adsorpsiyon Oranı (%)
S9-1	$5,75 \times 10^{-8}$	90
S9-2	$3,50 \times 10^{-8}$	97
S11-1	$3,74 \times 10^{-8}$	95
S11-2	$2,03 \times 10^{-8}$	87
S21-1	$1,62 \times 10^{-8}$	100
S21-2	$3,12 \times 10^{-7}$	99,9
S22-1	$2,81 \times 10^{-7}$	98,3
S22-2	$4,6 \times 10^{-7}$	99,5
BK1-1	$2,84 \times 10^{-8}$	98,75
BK1-2	$1,76 \times 10^{-7}$	99,25
BK2	$4,88 \times 10^{-8}$	99,25
H1	$4,6 \times 10^{-8}$	97,5
D1	$5,69 \times 10^{-8}$	99,6
S6	$4,08 \times 10^{-8}$	98,3
S16	$3,21 \times 10^{-8}$	96

Fajların adsorpsiyon hızları $4,6 \times 10^{-7}$ (S22-2) ile $1,62 \times 10^{-8}$ (S21-1) mL/dk arasında bulunmuştur. Adsorpsiyon oranları ise en düşük %87 (S11-2) ve en yüksek %100 (S21-1) olarak bulunmuştur.

3.5 Fajların Konakçı Skalasının Belirlenmesi

Çalışmanın konusunu oluşturan fajlar, tez kapsamında izole edilen *Pseudomonas* spp. suşları ve laboratuvar kültür koleksiyonunda bulunan diğer tür (Tablo 3.6) ve cins (Tablo 3.7) bakteriler katı besiyerinde karşılaştırılmıştır. Böylece fajların farklı cins, tür ve suş bazında etkinliği belirlenmiştir. Fajlar oluşturdıkları plak yapılarına göre düşük veya yüksek etkili olarak derecelendirilmiştir.

Tablo 3.6. Fajların *P. aeruginosa* suşlarına karşı litik aktiviteleri

Faj Kodları	Konakçı Bakteriler									
	<i>P. aeruginosa</i> NCTC12924	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>P. aeruginosa</i> C10	<i>P. aeruginosa</i> Mr1	<i>P. aeruginosa</i> Mr2	<i>P. aeruginosa</i> A1	<i>P. aeruginosa</i> SLT	<i>P. aeruginosa</i> R1	<i>P. aeruginosa</i> BX	<i>P. aeruginosa</i> BK
S9-1	+	-	++	-	++	+	-	-	+	-
S9-2	+	-	++	-	++	+	-	+	+	-
S11-1	+	-	++	+	++	-	-	+	+	-
S11-2	+	-	++	+	++	++	-	++	+	-
S21-1	+	-	++	-	++	++	-	-	+	-
S21-2	+	-	++	-	++	-	-	+	+	-
S22-1	+	-	++	-	++	-	-	++	+	-
S22-2	+	-	++	-	++	++	-	+	+	-
BK1-1	+	-	++	-	++	+	-	-	+	-
BK1-2	+	-	++	-	++	+	-	+	+	-
BK2	+	-	++	+	++	+	-	+	+	-
H1	+	-	++	+	++	++	-	+	+	-
D1	+	-	++	+	++	++	-	+	+	-
S6	+	-	++	++	++	++	-	+	+	-
S16	+	-	++	+	++	++	-	+	+	-

-: Litik etki yok, +: düşük litik etki, ++: yüksek litik etki

Fajlar, izole edilen yerel 8 adet *P. aeruginosa* suşundan 6'sına farklı düzeylerde etkili olmuştur. Piyomelanin üreten *P. aeruginosa* BK suşuna ve *P. aeruginosa* SLT suşuna karşı etkin bir litik plak gözlemlenmemiştir. Buna karşın özellikle *P. aeruginosa* C10 ve *P. aeruginosa* Mr2 kodlu suşlara tüm fajlar yüksek litik aktivite göstermiştir (Fotoğraf 3.5). Fajların *P. aeruginosa* C10'a yüksek litik

etki göstermesi nedeniyle bu suş, sonraki zenginleştirme vb. analizlerde homolog konakçı olarak kullanılmıştır.



Fotoğraf 3.5. Fajların *P. aeruginosa* C10 üzerindeki litik zonları

Bu çalışma kapsamında fajların farklı tür ve cins konakçı bakteriler üzerindeki litik etkisi de incelenmiştir. Konakçı skalasının belirlenmesinde kullanılan konakçı bakteriler ve fajların litik etkisi Tablo 3.7’de verilmiştir.

Tablo 3.7. Fajların farklı tür ve cinslere karşı litik aktiviteleri

	Konakçı Bakteriler												
Faj Kodları	<i>P. brassicacearum</i> MÇS2	<i>P. montelii</i>	<i>P. alcaligenes</i>	<i>P. tolaasii</i>	<i>P. plecoglossicida</i>	<i>P. fulva</i>	<i>P. putida</i> DSM 6125	<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43888	<i>S. Enteritidis</i> NCTC 12694	<i>B. cereus</i> ATCC 10876	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Lelliottia amnigena</i>	<i>Morganella morganii</i>
S9-1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S9-2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S11-1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S11-2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S21-1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S21-2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S22-1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S22-2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BK1-1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BK1-2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BK2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S6	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S16	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

-: Litik etki yok, +: düşük litik etki, ++: yüksek litik etki

Fajlar farklı cinsteki bakterilere karşı litik etki göstermemiştir. Bununla birlikte fajlar yüksek konakçı özgülüğü sağlayarak çalışmada kullanılan diğer 6 farklı *Pseudomonas* türüne de litik etki göstermemiştir. Ancak *Pseudomonas*'ın bir türü olan yerel bir izolat *P. brassicacearum* MÇS2'e karşı tüm fajlar litik etki göstermiştir.

3.6 Fajların Farklı Koşullarda Stabilitesinin Belirlenmesi

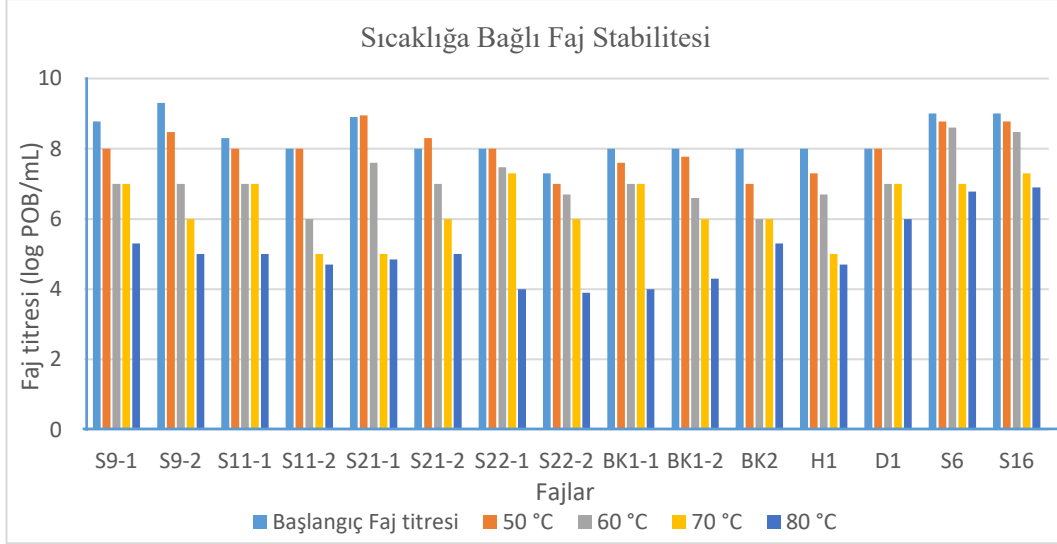
3.6.1 Sıcaklık Stabilitesi

Fajların yüksek sıcaklıklardaki stabilitesini belirlemek amacıyla 50-60-70 ve 80°C'de 1 saat bekletildikten sonra titrelerine bakılmıştır. Süre sonunda ilgili sıcaklıklarda belirlenen titreler Tablo 3.8 ve Şekil 3.3'te verilmiştir.

Tablo 3.8. Fajların farklı sıcaklıklardaki titresi

Faj Kodları	İlk Faj Titresi (log)	50°C' de faj titresi (log)	60°C' de faj titresi (log)	70°C' de faj titresi (log)	80°C' de faj titresi (log)
S9-1	8,7	8	7	7	5,3
S9-2	9,3	8,4	7	6	5
S11-1	8,3	8	7	7	5
S11-2	8	8	6	5	4,7
S21-1	8,9	8,5	7,6	5	4,8
S21-2	8	8,3	7	6	5
S22-1	8	8	7,4	7,3	4
S22-2	7,3	7	6,7	6	3,9
BK1-1	8	7,6	7	7	4
BK1-2	8	7,7	6,6	6	4,3
BK-2	8	7	6	6	5,3
H1	8	7,3	6,7	5	4,7
D1	8	8	7	7	6
S6	9	8,7	8,6	7	6,7
S16	9	8,7	8,4	7,3	6,9

Faj titreleri 50°C'de en fazla 1 log birimlik (BK2) azalma göstermiştir. BK2 kodlu faj 60°C'de de 2 log ile en fazla azalma gösteren faj olmuştur. Bununla birlikte S11-2 kodlu faj da aynı şekilde 60°C'de 2 log birimlik azalma göstermiştir. S21-1 kodlu faj ise 70°C'de 3,9 log ile en fazla azalma gösteren faj olurken; 70 °C'de en az etkilenen faj 0,7 log azalma ile S22-1 kodlu faj olmuştur. D1, S6 ve BK1-1 fajları ise 70°C'de başlangıç titresine göre sadece 1 log azalma göstermiştir. S9-2 fajı ise 80°C'de 4,3 log azalma göstererek sıcaklık değişiminden en fazla etkilenen faj olmuştur.



Şekil 3.3. Sıcaklık değişimine bağlı faj titreleri

Şekil 3.3'te de görüldüğü gibi faj titreleri artan sıcaklık ile bir azalma göstermiştir. Titrelerdeki azalmaya rağmen tüm fajlar 80°C'de varlığını sürdürmeyi devam ettirmiştir. Fajlar sıcaklık değişimlerinden en fazla 4,3 log azalma (S9-2) göstererek etkilenmiştir. Artan sıcaklıktan en az etkilenen D1, S16, S6 fajları ise 80°C'de dahi başlangıç titrelerine göre sırasıyla 2; 2,1 ve 2,3 log POB/mL azalma göstermiştir.

3.6.2 pH Stabilitesi

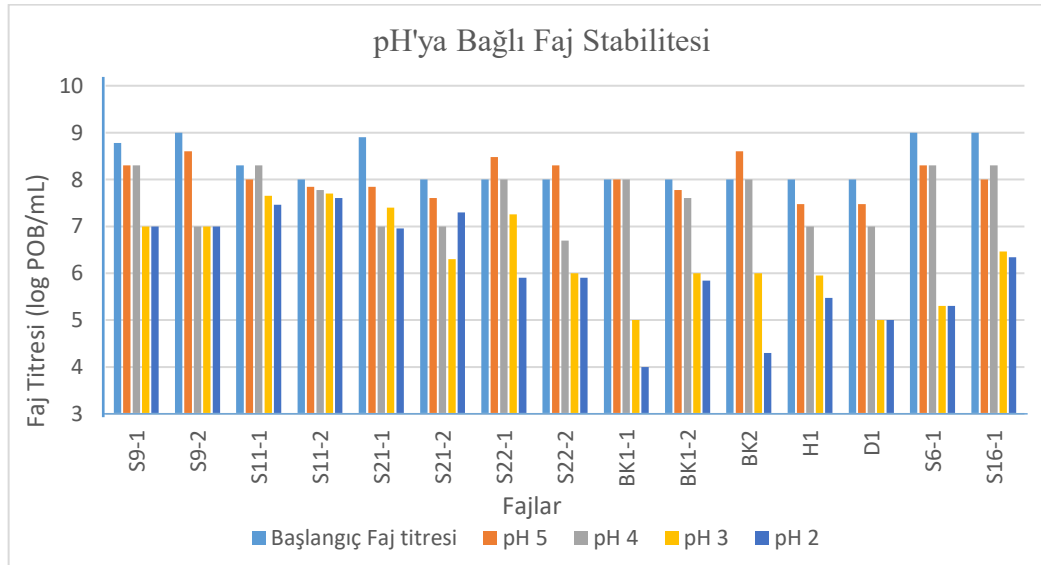
Çevresel koşulların (iyonik güç, pH, sıcaklık gibi) virüslerin kararlılığını etkilediği bilinmektedir. Virüsler ve virüs benzeri parçacıklar genellikle büyük yüzey yükleri taşımaktadırlar. Bu da yüzey yük yoğunluğunu önemli bir sistem parametresi haline getirmektedir. Ancak deneylerde, genellikle bir kapsit veya bir nanopartikülün üzerindeki yük doğrudan değiştirilmemektedir, bunun yerine çözeltinin pH'ı değiştirilmektedir; bu da virüsün protein kabuğunun yükünü ve kararlılığını etkilemektedir (Nap vd., 2014).

Fajların farklı pH koşullarına direncini tespit etmek amacıyla asidik ve bazik pH değerlerine sahip SM tamponda 1 saat bekletildikten sonra titreleri belirlenmiştir. Asidik koşullardaki faj titreleri Tablo 3.9 ve Şekil 3.4 ile bazik koşullardaki faj titreleri ise Tablo 3.10 ve Şekil 3.5 ile verilmiştir.

Tablo 3.9. Farklı asidik koşullarda faj titreleri

Faj Kodları	İlk Faj Titresi (log)	pH 5' te faj titresi (log)	pH 4' te faj titresi (log)	pH 3' te faj titresi (log)	pH 2' de faj titresi (log)
S9-1	8,7	8,3	8,3	7	7
S9-2	9	8,6	7	7	7
S11-1	8,3	8	8,3	7,6	7,4
S11-2	8	7,8	7,7	7,7	7,6
S21-1	8,9	7,8	7	7,4	6,9
S21-2	8	7,6	7	6,3	7,3
S22-1	8	8,4	8	7,2	5,9
S22-2	8	8,3	6,6	6	5,9
BK1-1	8	8	8	5	4
BK1-2	8	7,8	7,6	6	5,8
BK2	8	8,6	8	6	4,3
H1	8	7,4	7	5,9	5,4
D1	8	7,4	7	5	5
S6	9	8,3	8,3	5,3	5,3
S16	9	8	8,3	6,4	6,3

Fajların titreleri ortam asitliğinin artması ile azalma göstermiştir. BK1-1 kodlu faj pH 5'te ortam asitliğinden etkilenmemiştir. Ortam pH'ı 4 olduğunda en fazla etkilenen faj S21-1 (1,9 log) kodlu faj olmuştur. Bunu 1,4 log azalma ile S22-2 kodlu faj izlemiştir. S6 kodlu faj ise pH 3'te titresi en fazla azalan (3,7 log); BK1-1 ise pH 2'de titresi en fazla azalan (4 log) faj olmuştur.

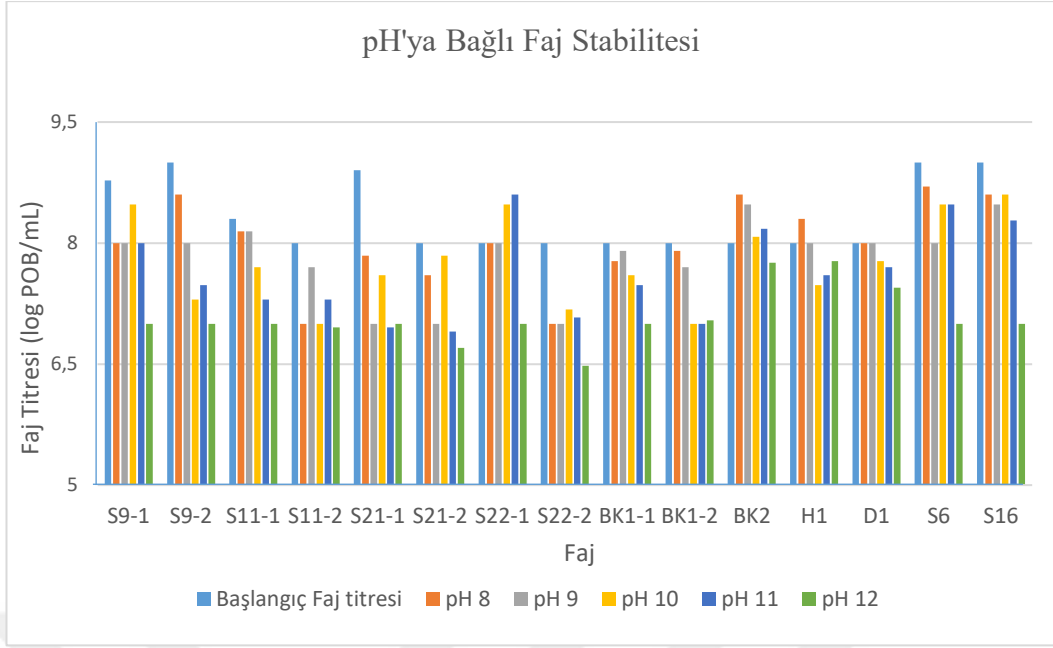
**Şekil 3.4.** pH değişimine bağlı faj titreleri

Şekil 3.4'te görüldüğü üzere faj titrelerinde en fazla azalma 4 log POB/mL ile BK1-1 kodlu fajda meydana gelmiştir. Yine BK2 kodlu fajda asidik koşullardan benzer şekilde etkilenmiştir. Bununla birlikte asidik koşullara en dirençli faj S11-2 fajı olmuştur. Bu faj titresinde pH 2 olan ortamda dahi yalnızca 0,4 log POB/mL azalma görülmüştür. S11-1 kodlu fajda benzer şekilde pH 2 olan ortamda yalnızca 0,84 log POB/mL azalma göstermiştir.

Tablo 3.10. Farklı bazik koşullarda faj titreleri

	İlk Faj Titresi (log)	pH 8' de faj titresi (log)	pH 9' da faj titresi (log)	pH 10' da faj titresi (log)	pH 11' de faj titresi (log)	pH 12' de faj titresi (log)
S9-1	8,7	8	8	8,4	8	7
S9-2	8,3	8,3	8	7,3	7,4	7
S11-1	8,3	8,1	8	7,6	7,3	7
S11-2	8	7	7,6	7	7,3	6,9
S21-1	8,9	7,8	7	7,6	6,9	7
S21-2	8	7,6	7	7,8	6,9	6,7
S22-1	8	8	8	8	8	7
S22-2	8	7	7	7,1	7	6,4
BK1-1	8	7,7	7,9	7,6	7,4	7
BK1-2	8	8	7,6	7	7	7
BK2	8	8	8,4	8	8,1	7,7
H1	8	8	8	7,4	7,6	7,7
D1	8	8	8	7,7	7,6	7,4
S6	9	8,6	8	8,4	8,4	7
S16	9	8,6	8,4	8,6	8,2	7

Çoğu faj orta düzeyde bir pH'ta (yaklaşık 5 ila 9) sağlam ve bulaşıcı kalır (Sae-Ueng vd., 2024). Fajlardan S21-2 kodlu faj pH 8'de en fazla etkilenen faj olmuş ve titresinde 1,6 log POB/mL azalma göstermiştir. Fajların 6 tanesi (S9-2, S22-1, BK1-2, BK2, H1, D1) pH 8'de titresinde değişim göstermemiştir. S21-1, pH 9 ve pH 10 ortamından en fazla etkilenen faj olmuştur. Bu ortamlarda titresindeki azalma sırasıyla 1,9 log ve 1,3 log POB/mL olmuştur. S21-1 ise pH 12 ortamında 1,1 log azalma göstererek en fazla etkilenen faj olmuştur.

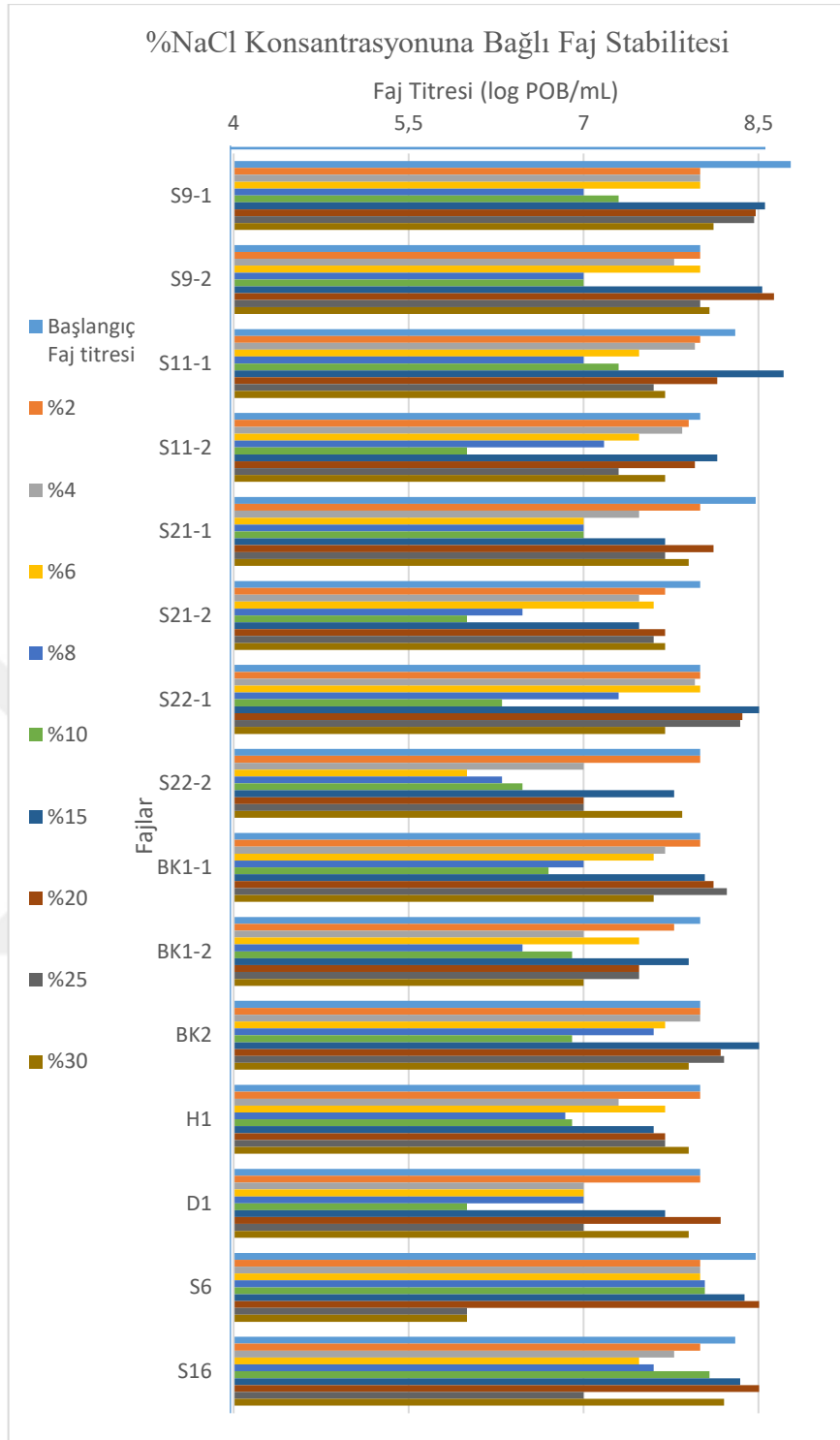


Şekil 3.5. pH değişimine bağlı faj titreleri

Şekil 3.5’te görüldüğü üzere faj titrelerinde en fazla azalma pH 12’de 2 log POB/mL ile S6 ve S16 kodlu fajda meydana gelmiştir. Bununla birlikte bazik koşullarda H1, BK2, D1 kodlu fajlar stabilitelerini en iyi koruyan fajlar olmuştur. Çalışma kapsamında bazik koşullarda yapılan deneylerde de fajların pH 12 de 1 saat boyunca varlığını koruduğu görülmektedir.

3.6.3 Farklı NaCl Konsantrasyonu

Virüslerin hayatta kalabilmeleri, konakçı hücrel mekanizmalarını kontrol altına alma ve konakçılar arasında hareket ederken maruz kaldıkları pH, sıcaklık, ozmotik basınç, tuz konsantrasyonu ve mekanik kuvvetler gibi fiziksel koşullara dayanma yeteneklerine bağlıdır (Silva vd., 2014; Evilevitch vd., 2011). Bu çalışma kapsamında değişen NaCl konsantrasyonlarında elde edilen faj titreleri Şekil 3.6’da verilmiştir.



Şekil 3.6. NaCl konsantrasyonuna bağlı faj titreleri

NaCl içermeyen ortamdaki faj titrelerinin %8-%10 NaCl içeren konsantrasyonlara çıkıldıkça azaldığı görülmüştür. Bu azalma en fazla 2 log POB/mL (S9-2, S11-2, S21-2 ve D1 fajlarında) olmuştur. Ancak %15 ve diğer artan NaCl konsantrasyonlarında fajların aynı şekilde etkilenmediği görülmektedir. Faj titreleri %15 NaCl içeren ortamda en fazla 1,21 log POB/mL (S21-1) azalma

gösterirken diğer faj titreleri aynı konsantrasyonda en fazla 0,7 log POB/mL azalma göstermiştir. Yine faj titreleri %20 NaCl içeren ortamda en fazla 1,79 log POB/mL (S21-1) azalış göstermiştir. Diğer konsantrasyonlara bakıldığında ise %25 NaCl içeren ortamda faj titrelerinde görülen en fazla azalış 3 log POB/mL ile S6 fajında görülmüştür. Bunu 2 log POB/mL ile D1 ve S16 kodlu fajlar takip etmektedir. Diğer fajlar ise titrelerinde en fazla 1,39 log POB/mL azalma göstermiştir. Artan %30 NaCl konsantrasyonunda ise yine en fazla 3 log POB/mL azalma ile S6 fajı etkilenmiştir. Diğer fajlar ise bu konsantrasyonda en fazla 1 log POB/mL düzeyinde etkilenmiştir.

3.7 Fajların Antibiyofilm Özelliklerinin Belirlenmesi

Bakteriyel biyofilm, bakteri topluluğuna biyotik ve abiyotik streslerle başa çıkma yeteneği kazandıran karmaşık bir ortam oluşturur. Fajlar özellikle antibiyotiklere göre daha iyi bir antibiyofilm ajanı olarak anılmakta ve bu konuda çalışmalar yapılmaktadır (Abedon, 2015).

Bu tez kapsamında fajların antibiyofilm etkisi 3 farklı deney ile gözlemlenmiştir. Faj ve konakçı bakterinin eş zamanlı olarak polistiren yüzeye inoküle edildiği ve bu yüzeyde 24 saat sonunda elde edilen biyofilm inhibisyon oranı % olarak Tablo 3.11’de verilmiştir.

Tablo 3.11. Biyofilm oluşumunun inhibisyonu

Biyofilm inhibisyonu (%)				
Fajlar	MOI:1	MOI:10	MOI:100	MOI:1000
S9-1	6	5	47	39
S9-2	25	-	72	44
S11-1	9	42	47	71
S11-2	1	16	69	54
S21-1	13	39	66	54
S21-2	-	16	41	65
S22-1	-	19	53	52
S22-2	1	4	7	44
BK1-1	20	11	34	23
BK1-2	-	11	72	34
BK2	-	0,2	56	72
S6	-	7	45	55
S16	3	10	62	59
H1	-	12	44	51
D1	-	22	68	63

Tablo 3.11’ de görüldüğü üzere farklı MOI değerlerinde faj uygulaması biyofilm inhibisyonuna farklı etki etmiştir. Faj ve bakterinin eşit oranlarda inoküle edildiği MOI:1 değerinde en yüksek inhibisyon oranı %25 (S9-2) iken, MOI:10 değerinde artan faj oranıyla birlikte inhibisyon oranlarının arttığı (en yüksek %42) görülmektedir. MOI:100 ve 1000 değerinde ise en yüksek inhibisyon oranlarının %72 (S9-2, BK1-2 ve BK2) olduğu görülmektedir.

Biyofilm çalışmaları kapsamında yapılan diğer deneyde konakçı bakteriler tarafından oluşturulan 24 saatlik olgun biyofilm tabakasının fajlar ile giderilmesi incelenmiştir. Farklı MOI değerinde elde edilen sonuçlar Tablo 3.12’de verilmiştir.

Tablo 3.12. Oluşan biyofilmin giderilmesi

Oluşmuş biyofilmin giderilmesi (%)				
Fajlar	MOI:1	MOI:10	MOI:100	MOI:1000
S9-1	-	-	-	-
S9-2	-	-	15	-
S11-1	-	-	-	5
S11-2	-	-	-	-
S21-1	-	-	-	9
S21-2	-	-	5	7
S22-1	-	-	-	29
S22-2	-	-	-	-
BK1-1	-	-	10	-
BK1-2	-	-	19	-
BK2	-	-	11	-
S6	-	-	-	-
S16	-	-	-	-
H1	-	-	1	-
D1	-	-	-	-

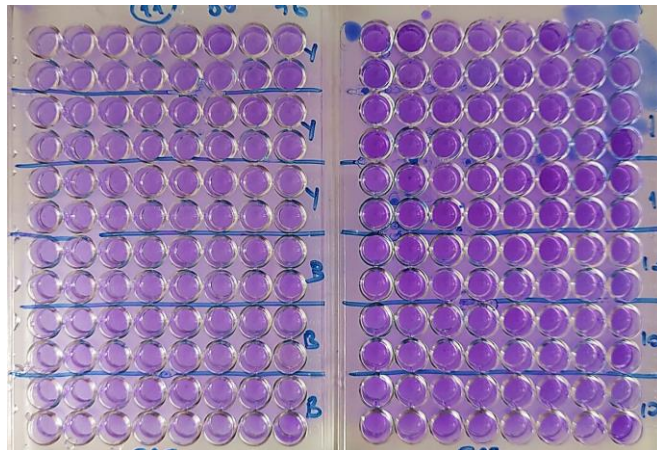
Fajlar daha önceden oluşan biyofilm tabakasının giderilmesinde MOI:1 ve 10 değerlerinde etkili olmamıştır. Ancak faj oranının artması ile 9 faj biyofilm giderimde farklı oranlarda etkili olmuştur. En yüksek oran ise S22-1 fajı ile %29 (MOI:1000) oranında sağlanmıştır.

Yine biyofilm çalışmaları kapsamında faj tutundurulan polistiren bir yüzeyde biyofilm oluşumunun engellenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla fajların polistiren yüzeye tutunması sağlanmış ve bu yüzeye konakçı bakteri inoküle edilmiştir. Ardından kuyucuklar yıkanmış ve konakçı bakterinin bu yüzeyde film oluşturma yeteneği kristal viyole ile takip edilmiştir (Fotoğraf 3.6). Farklı oranlarda faj bulunan bu yüzeylerde biyofilm oluşumunun ne kadar engellendiği tespit edilmiş ve sonuçlar Tablo 3.13’te verilmiştir.

Tablo 3.13. Biyofilm oluşumunun engellenmesi

Biyofilm oluşumunun engellenmesi (%)				
Fajlar	MOI:1	MOI:10	MOI:100	MOI:1000
S9-1	30	48	32	40
S9-2	11	45	30	45
S11-1	43	50	21	31
S11-2	45	52	25	33
S21-1	41	46	13	33
S21-2	-	32	18	39
S22-1	41	62	17	32
S22-2	11	46	18	34
BK1-1	3	36	26	36
BK1-2	50	60	29	31
BK2	30	48	35	42
S6	43	44	31	42
S16	28	61	30	42
H1	36	54	25	46
D1	57,5	64	22	37

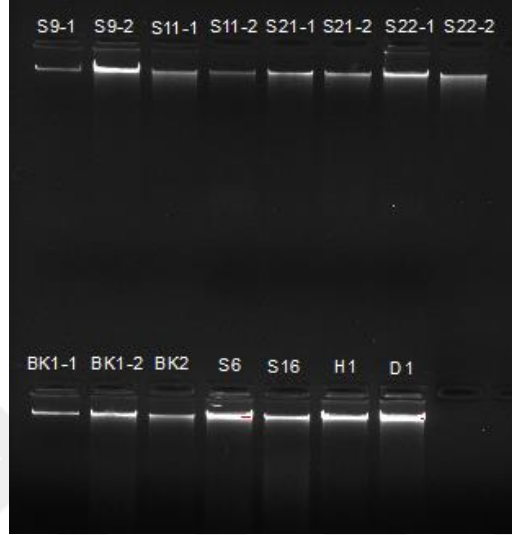
Faj bulunan bir yüzeyde bakterilerin biyofilm oluşumunun belirli düzeyde engellendiği görülmektedir. Fajlardan yalnızca S21-2 kodlu faj sadece MOI:1 değerinde etkili olmamış ancak artan MOI değerlerinde ise etkili olmuştur. S21-2 en yüksek MOI 1000’de %39 oranında biyofilm oluşumunu engellemiştir. Çalışmada elde edilen en yüksek değer ise %64 (D1) ile MOI:10’da tespit edilmiştir. Ayrıca tüm fajların en etkili olduğu MOI değeri MOI:10 olarak tespit edilmiştir.



Fotoğraf 3.6. Biyofilm oluşumunu belirlemek için boyanan kuyucuklar

3.8 Fajların DNA İzolasyonu

Fajların DNA izolasyonu Bölüm 2.2.9’da belirtildiği şekilde yapılmıştır. İzole edilen DNA’lar jel elektroforeze yüklenmiştir. Böylelikle DNA’ların saflık durumu ve yoğunluğu kontrol edilmiştir. DNA’lara ait jel görüntüsü Fotoğraf 3.7’de verilmiştir.

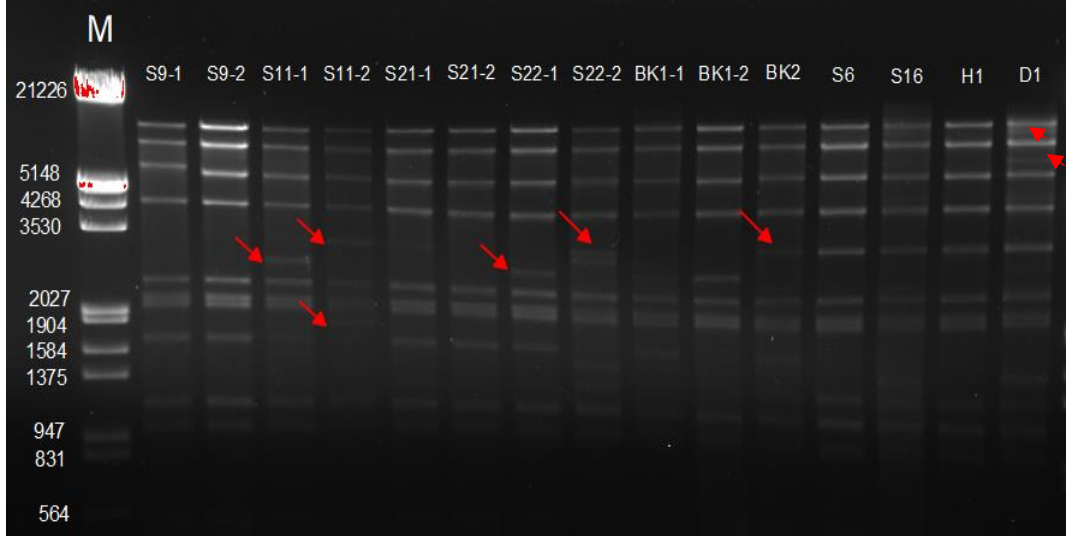


Fotoğraf 3.7. Jele yüklenen DNA’lar

Jel üzerindeki bant parlaklığı her bir DNA’nın enzim kesimine hangi miktarda gireceğine karar vermede yardımcı olmuştur.

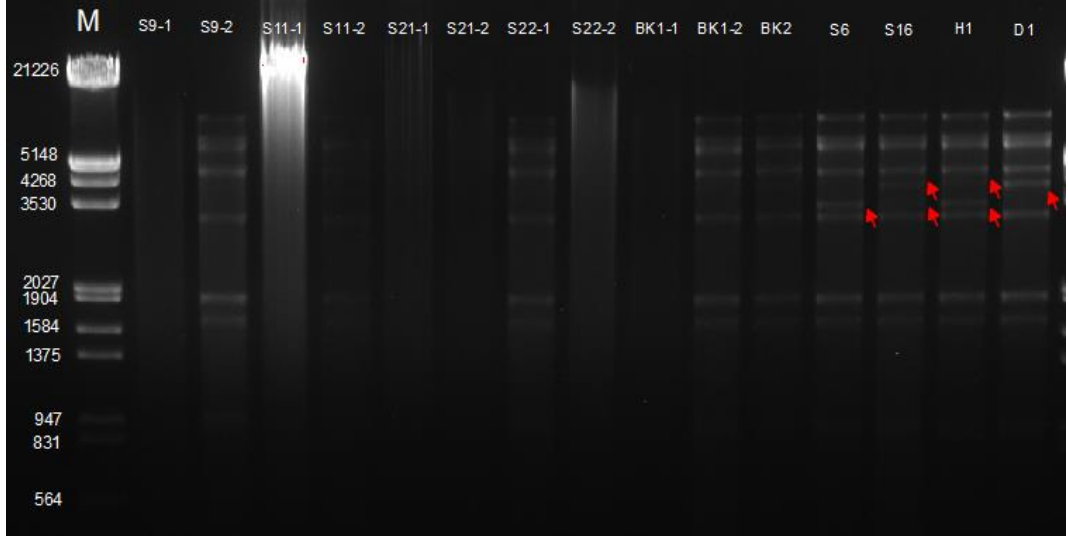
3.9 Fajların RFLP Analizi

İzole edilen DNA’lar belirlenen miktarlarda RFLP analizinde kullanılmıştır. Kesimi gerçekleşen DNA’lar %1’lik agaroz jele yüklenmiş ve yürütülmüştür. Tüm enzim kesimlerinde ilk kuyucuklara marker (M) yüklenmiş olup diğer kuyucuklarda ise faj DNA’ları yer almıştır. Kesimlere ait jel görüntüleri Fotoğraf 3.8, Fotoğraf 3.9, Fotoğraf 3.10, Fotoğraf 3.11 ve Fotoğraf 3.12’de verilmiştir.



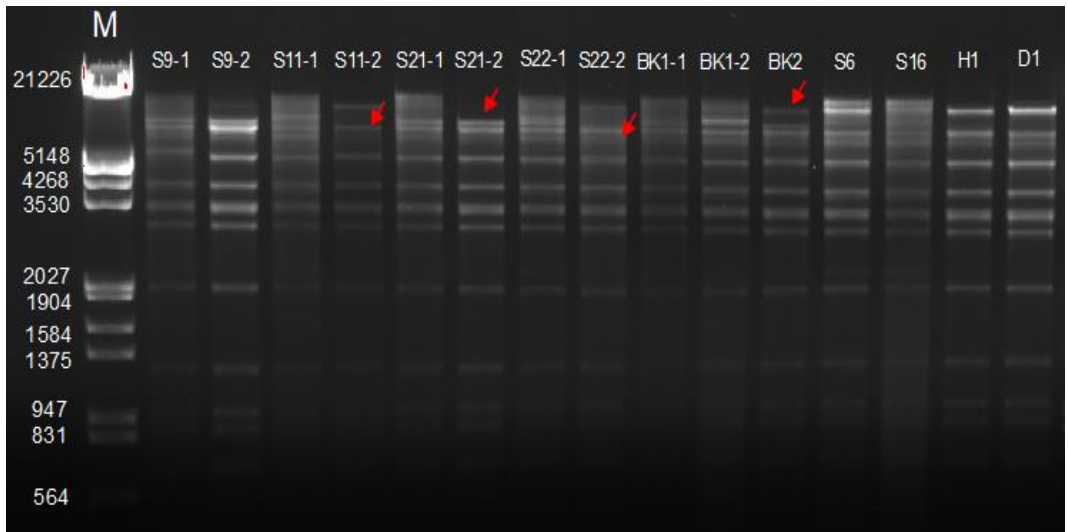
Fotoğraf 3.8. Faj DNA'larının *Sma*I enzimi ile elde edilen jel görüntüsü

DNA'lar, *Sma*I enzimi ile reaksiyona tabi tutulmuş ve kesim sonucu oluşan bant profilleri Fotoğraf 3.8'de verilmiştir. Bu şekle göre tüm DNA'ların ilk 4 bant boyutunun benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Kuyucuklardaki farklı fragmentler çoğunlukla 4268 bp ve 2027 bp büyüklüğü arasında görülmektedir. Bantlardaki farklılıklar jel görüntüsü üzerinde kırmızı oklar ile işaretlenmiştir. Buna göre S22-2'nin işaretli bölgede çift bant bulundurduğu ve bu kesim profili ile diğer faj DNA'larından farklılık gösterdiği görülmektedir. Yine aynı bölgede yer alan bantlara bakıldığında S9-1, S9-2, S21-1 ve S21-2 benzer kesim profili göstermiştir. S11-1 ise S22-1, BK1-1 ve BK1-2 ile benzer bant profili göstermektedir. S11-2'nin yaklaşık 3530 bp'lik bandı diğer profiller ile benzerlik gösterse de yaklaşık 1904bp'lik bandı diğer DNA bant profillerinde görülmemektedir. Diğer fajlar ise (BK2, S6, S16, H1, D1) benzer bant profiline sahip bulunmuştur.



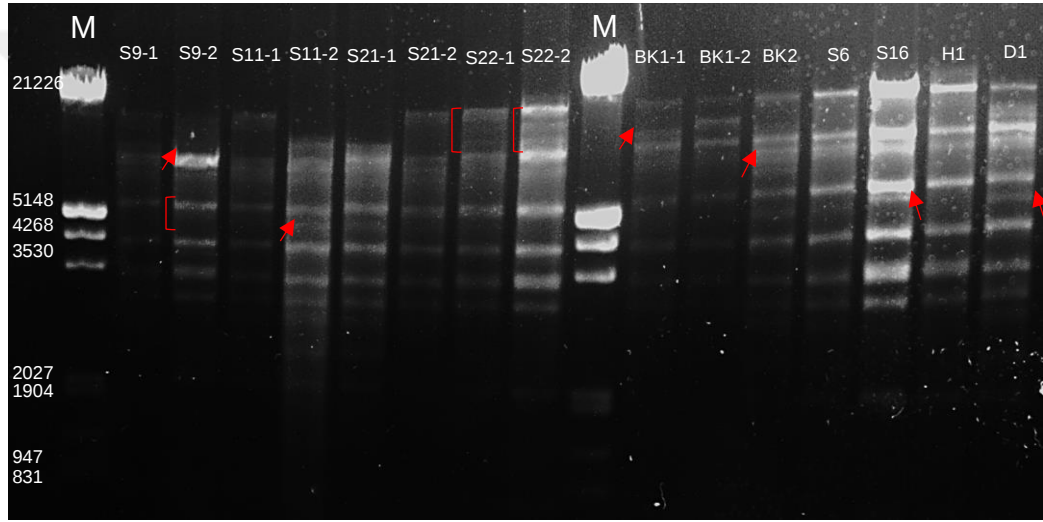
Fotoğraf 3.9. Faj DNA'larının *XhoI* enzimi ile elde edilen jel görüntüsü

XhoI enzimi ile DNA'ların hepsi kesilememiştir. S21-2 ve BK1-1'in bant parlaklıklarına bakılarak DNA'nın kesim için yetersiz olduğu düşünülmektedir. Kesimi yapılamayan S9-1, S11-1, S21-1, S21-2, S22-2 ve BK1-1 faj DNA'larının aynı grupta olabileceği düşünülmüştür. Kesimi gerçekleşen DNA'lara bakılacak olursa S9-2, S11-2, S22-1, BK1-2 ve BK2 benzer kesim profillerine sahiptir. Diğer kuyucuklardaki bant büyüklüklerine göre S16 ve H1, 4268 ve 3530 bp'lik aralıkta çift bant bulundurmakta ve benzer profil sergilemektedir. S6 yaklaşık 3530 bp boyutunda iki bant bulundururken; D1 ise yaklaşık 4268 bp'lik iki bant bulundurmaktadır.



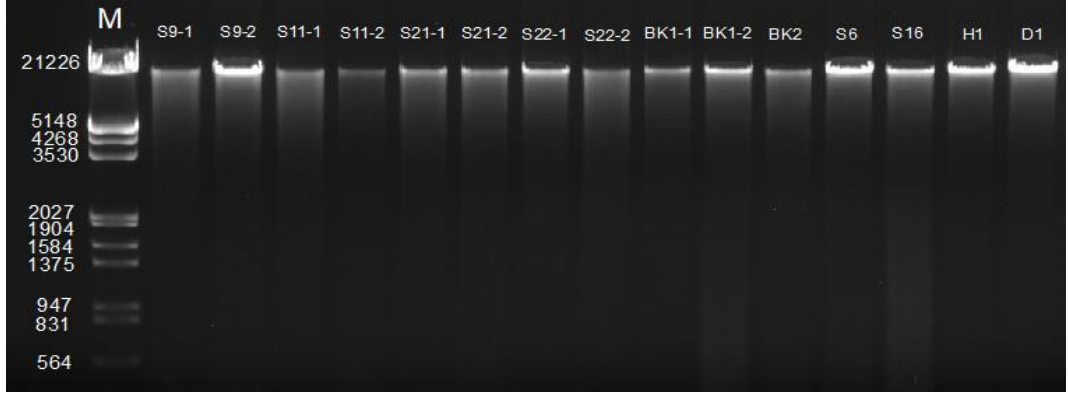
Fotoğraf 3.10. Faj DNA'larının *EcoRI* enzimi ile elde edilen jel görüntüsü

EcoRI enzimi ile yapılan kesimde DNA fragmentlerinin benzer profil gösterdiği görülmektedir. Yalnızca ilk bantların büyüklükleri değişiklik göstermektedir. Buna göre S11-2 fajı kırmızı ok gösterilen bölgede tek bir bant bulundurmaktadır, dolayısıyla diğer faj DNA'larının kesim profillerinden farklıdır. S21-2'in ilk bantlarının diğer faj DNA'larına göre daha aşağıda başladığı görülmektedir. S9-1'de benzer bir profile sahiptir. S9-1'in ilk bantları daha büyük gibi gözükse de bunun DNA kirliliğinden olduğu düşünülmektedir. Son kuyucuklarda yer alan S6 ve S16 ile H1 ve D1'in bant profilleri benzerdir. S22-2 ise S11-2'ye benzer bant profili sergilese de işaretli bölgenin ve ilk bandın net olmamasından dolayı farklı olduğu düşünülmüştür.



Fotoğraf 3.11. Faj DNA'larının *EcoRV* enzimi ile elde edilen jel görüntüsü

EcoRV enzimi ile yapılan kesime bakıldığında ise S9-1, S11-1 ve S21-2 benzer kesim profili göstermektedir. S9-2 ise 5148 ve 4268 bp'lık bölgede diğer profillere göre daha az bant içermektedir. Bununla birlikte ilk bandında (kırmızı ok ile gösterilen) diğer faj DNA fragmentlerinin ilk bantlarından daha küçük olduğu düşünülmektedir. S11-2 ve S21-1'de yine benzer profil göstermektedir. Yine S22-2 işaretli bölgede iki bant içermektedir. S22-1 ise aynı bölgede 1 bant bulundurmaktadır. Bu nedenle BK1-2 ile benzer profil sergilemektedir. Diğer fajlar ise işaretli olan bantlar sebebi ile diğer fajlardan farklı bulunmuştur.



Fotoğraf 3.12. Faj DNA'larının *NdeI* enzimi ile elde edilen jel görüntüsü

Fotoğraf 3.12'de görüldüğü üzere *NdeI* enziminin hiçbir DNA üzerinde tanıma sekansının olmadığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak *NdeI* enzimi hariç diğer restriksiyon enzimleri ile reaksiyon sonucunda oluşan DNA kesim profiline göre fajlar Tablo 3.14'te verildiği şekilde gruplandırılmıştır.

Tablo 3.14. Enzim kesimine göre faj grupları

Enzim	Faj Grupları
<i>SmaI</i>	- Grup) S9-1, S9-2, S21-1, S21-2 - Grup) S11-2 - Grup) S22-1, BK1-1 - Grup) S22-2 - Grup) S11-1, BK1-2 - Grup) BK2, S6, S16, H1 - Grup) D1
<i>XhoI</i>	- Grup) S9-1, S11-1, S11-2, S21-1, S21-2, S22-2, BK1-1 - Grup) S9-2, S22-1, BK1-2 - Grup) S6, H1 - Grup) S16, D1
<i>EcoRI</i>	- Grup) S9-1, S21-2 - Grup) S9-2 - Grup) S11-2 - Grup) S11-1, S22-1, BK1-2 - Grup) S22-2 - Grup) BK2 - Grup) S21-1, BK1-1, S6, S16 - Grup) H1, D1
<i>EcoRV</i>	- Grup) S9-1, S11-1, S21-2, H1 - Grup) S9-2 - Grup) S11-2, S21-1 - Grup) S22-2 - Grup) S22-1, BK1-2 - Grup) BK1-1 - Grup) S6 - Grup) BK2 - Grup) S16 - Grup) D1

Farklı enzim kesimleri ile birbirinden farklı olduğu tespit edilen fajlar (S9-2, S11-2, S22-2, BK1-1, BK2, S16, D1, S6) diğer analizlerde tek tek veya karışım halinde kullanılmıştır.

Enzim kesim profillerine göre fajların yaklaşık bant büyüklükleri GelJv.2.0 ve Image Lab yazılımları ile hesaplanmıştır. Tablo 3.15'te belirtilen bant büyüklüklerine göre fajların yaklaşık genom büyüklükleri verilmiştir.

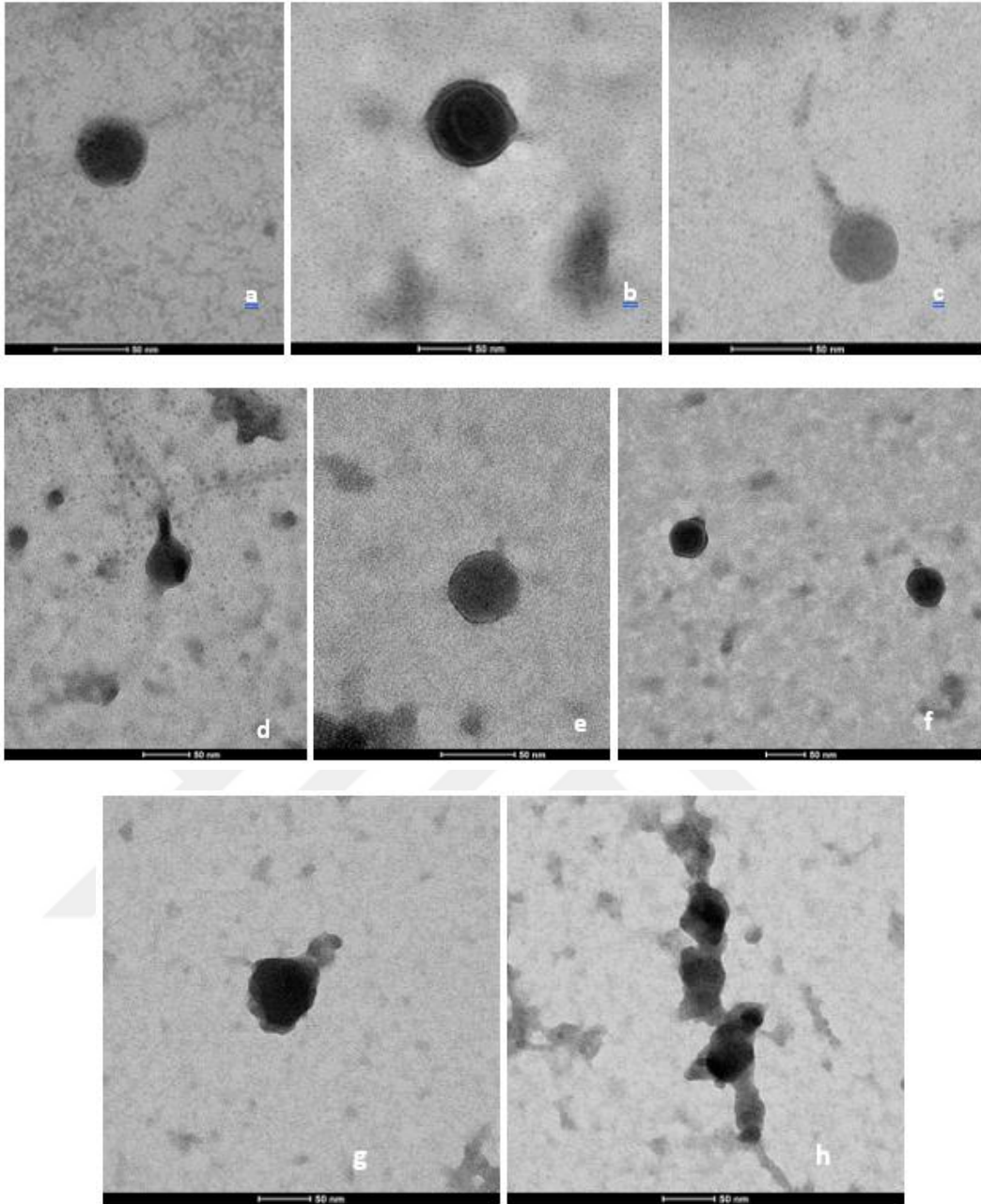
Tablo 3.15. Enzim kesimlerine göre yaklaşık genom büyüklükleri

Faj Kodları	Genom Büyüklüğü (bç)			
	<i>SmaI</i>	<i>XhoI</i>	<i>EcoRI</i>	<i>EcoRV</i>
S9-1	44.764	-	46.807	46.958
S9-2	43.817	37.772	60.424	27.845
S11-1	44.046	-	71.656	46.958
S11-2	45.333	-	49.339	43.622
S21-1	40.920	-	88.059	43.622
S21-2	40.843	-	44.322	46.958
S22-1	45.230	29.741	69.957	49.832
S22-2	47.472	-	47.677	75.622
BK1-1	43.349	-	73.368	49.258
BK1-2	41.863	37.192	66.843	49.832
BK2	44.593	38.198	53.615	51.633
S6	44.157	41.067	69.528	48.644
S16	59.352	41.839	66.991	55.797
H1	43.174	41.825	53.145	46.958
D1	66.663	42.802	53.374	45.486

Faj genom büyüklükleri *SmaI* enzim kesimine göre 40.843 bç (S21-2) ile 66.663 bç (D1) arasında bulunmuştur. *XhoI* enzim kesimine göre ise 29.741 bç (S22-1) ile 42.802 bç (D1) arasında bulunmuştur. *EcoRI* enzim kesimine göre en küçük genom boyutu yaklaşık 44.322 bç (S21-2) ve en büyük genom boyutu yaklaşık 88.059 bç (S21-1) bulunmuştur. *EcoRV* enzim kesimine göre en küçük genom boyutu yaklaşık 27.845 bç (S9-2) ve en büyük genom boyutu yaklaşık 75.622 bç (S22-2) olarak bulunmuştur.

3.10 Fajların Morfolojik Karakterizasyonu

RFLP analizine göre seçilen 8 fajın (S9-2, S11-2, S22-2, BK1-1, BK2, S16, D1, S6) elektron mikroskop görüntüleri alınmıştır. Fajlara ait elde edilen görüntüler Fotoğraf 3.13'te verilmiştir.



Fotoğraf 3.13. Fajlara ait TEM mikrografları

a)S11-2, b) S22-2, c) BK1-1, d) BK2 e) D1, f) S6, g) S16, h) S9-2

Morfolojik tanımlama fajlar için önemli bir sınıflandırma kriteridir. Önceki zamanlarda fajların sınıflandırılması büyük oranda morfolojik karakterizasyona bağlı bulunmaktaydı. Ancak faj sınıflandırma sistemi güncellenmiş ve morfolojiye dayalı olan *Siphoviridae*, *Podoviridae* ve *Myoviridae* gibi birkaç büyük aile kaldırılmıştır (Zu vd., 2022). Ancak "podovirüs", "miyovirüs" veya "sifovirüs" gibi morfolojik (taksonomik olmayan) tanımlayıcı terimlerin kullanımına izin

verilmiştir (Turner vd., 2023). Bu bilgiye ve fajların TEM mikrograflarına göre morfolojik özellikleri Tablo 3.16’da verilmiştir.

Tablo 3.16. Fajların morfolojik özellikleri

Faj Kodu	Morfoloji	Kafa çapı (nm)	Kuyruk Uzunluğu (nm)
S11-2	Podovirüs	48,85 ± 1,15	29,54
S22-2	Podovirüs	60	25
BK1-1	Podovirüs	42,6 ± 1,075	41,6
BK2	Podovirüs	45 ± 0,5	27,7
D1	Podovirüs	47,4 ± 1,1	10
S6	Podovirüs	48,43 ± 5	15,62
S16	Podovirüs	69,6 ± 6	36,3

TEM mikrograflarına bakıldığında fajların kısa kuyruklu olduğu görülmektedir. Bununla birlikte fajlara ait ölçülen kafa çaplarının 42,6 nm ile 69,6 nm arasında değiştiği görülmektedir. Kuyruk uzunlukları ise 10 nm ile 41,6 nm arasında bulunmuştur. Faj S9-2’nin net bir mikrografı elde edilememiştir. Bu nedenle morfolojik özellikleri belirlenememiştir.

3.11 Plak Etkinliğinin (EOP) Belirlenmesi

Fajların RFLP analizine göre seçilen 8 fajın ve litik aktivite gösterdikleri 6 *P. aeruginosa* suşuna (bkz. Tablo 3.6) karşı bu fajların plak etkinliği (EOP) belirlenmiştir (Tablo 3.17).

Tablo 3.17. Fajların heterolog konakçılarına ait plak etkinliği

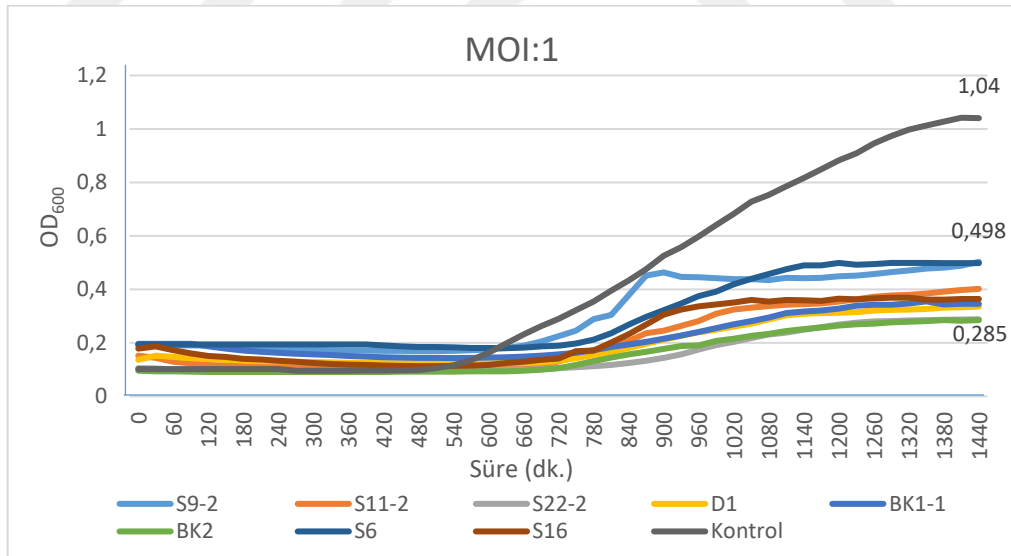
Faj Kodları	Konakçı Bakteri Kodları					
	NCTC12924	Mr1	Mr2	A1	R1	BX
S9-2	0,001	0,0025	0,001	0,002	0,001	0,01
S11-2	0,008	0,75	0,125	0,187	0,13	0,625
S22-2	0,002	0,012	0,002	0,01	0,06	0,02
BK1-1	0,08	0,02	0,08	0,08	0,04	0,032
BK2	0,005	0,002	0,002	0,08	0,44	0,01
S6	0,002	0,057	0,008	0,012	0,01	0,004
S16	0,001	0,034	0,04	0,09	0,004	0,04
D1	0,005	0,11	0,005	0,005	0,01	0,005

EOP değerleri, hedef bakteri tarafından elde edilen toplam plak sayısının, homolog konak bakteri tarafından elde edilen toplam plak sayısına bölünmesiyle elde edilmektedir. Elde edilen EOP oranı $\geq 0,5$ ise yüksek üretim; $0,5 > \text{EOP oranı} \geq$

0,1 ise orta üretim; $0,1 > EOP > 0,001$ ise düşük üretim ve $EOP \leq 0,001$ ise verimsiz şeklinde değerlendirilmiştir (Abdelghafar vd., 2023b). Verilen eşitliğe ve Tablo 3.17’de bulunan değerlere göre *P. aeruginosa* Mr1 ve *P. aeruginosa* BX, S11-2 fajının yüksek verimlilikle çoğalmasını sağlayan konakçılardır. Yine S11-2 fajı *P. aeruginosa* Mr2, *P. aeruginosa* A1, *P. aeruginosa* R1 konakçıları üzerinde orta düzeyde etkinlik göstermiştir. Bununla beraber BK2 ve D1 fajları da sırasıyla *P. aeruginosa* R1 ve *P. aeruginosa* Mr1 konakçıları üzerinde orta düzeyde etkinlik göstermiştir. Diğer fajlar ise bakteriler üzerinde düşük düzeyde etkinlik göstermiştir.

3.12 Fajların Litik Etkisinin Belirlenmesi

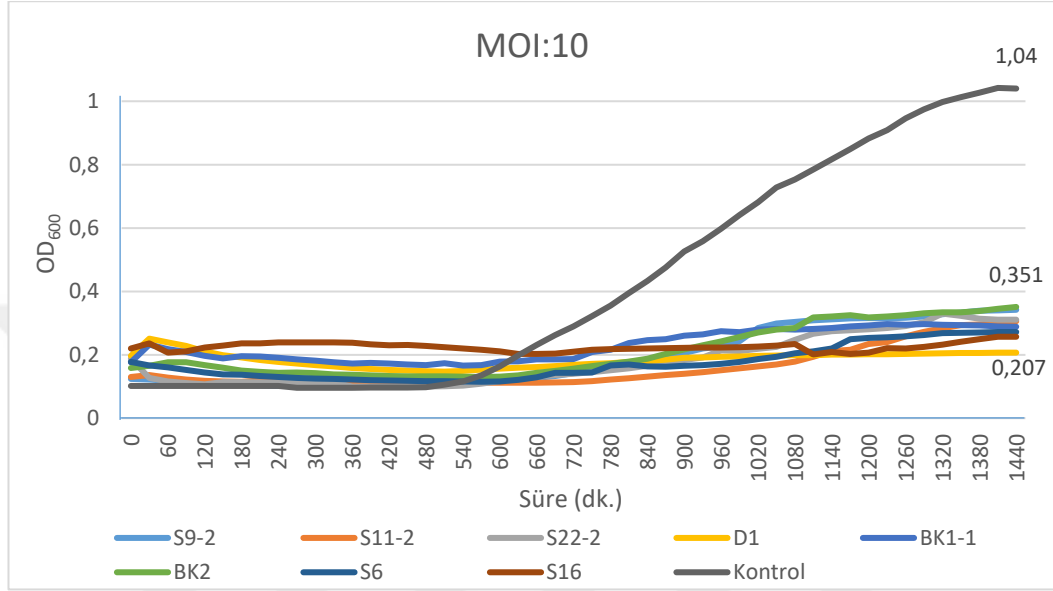
Bu analizde S9-2, S11-2, S22-2, BK1-1, BK2, S16, D1 ve S6 fajlarının konakçı *P. aeruginosa* C10 üzerindeki litik aktivite değeri belirlenmiştir. Bunun için fajlar besiyeri ortamında farklı MOI değerlerinde konakçı hücre ile karıştırılmış ve zamana karşı bakteri yoğunluğundaki değişim izlenmiştir. MOI 1, 10 ve 100 olacak şekilde ortamda faj bulunduğunda konakçı bakteriye ait gelişme eğrileri Şekil 3.7, Şekil 3.8 ve Şekil 3.9’da verilmiştir.



Şekil 3.7. MOI:1 değerinde *P. aeruginosa* C10’a fajların litik etkisi

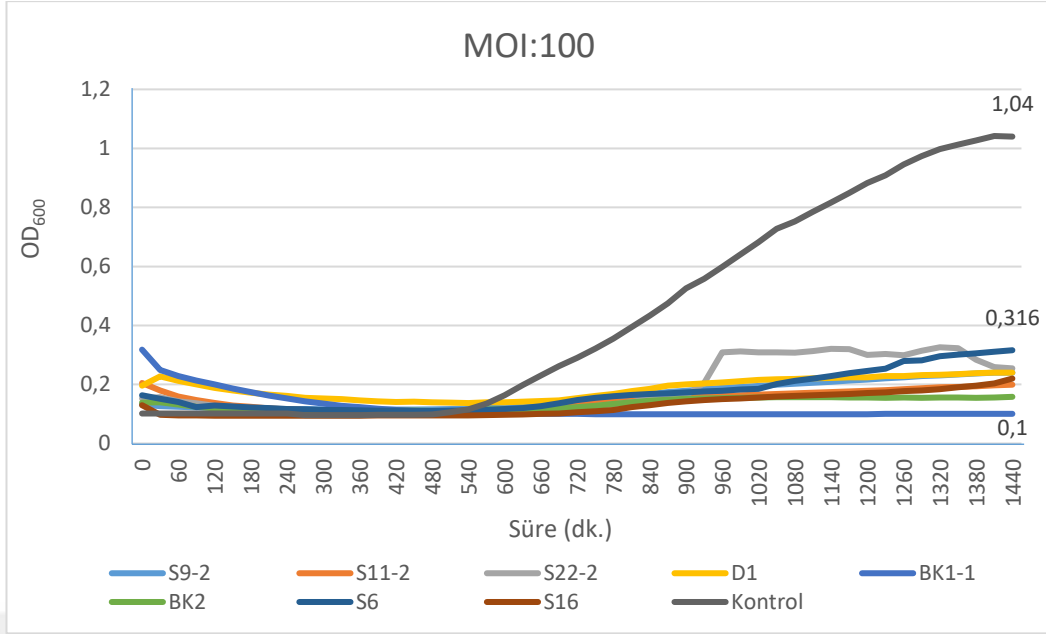
Fajlar, MOI 1 değerini karşılayacak şekilde konakçı bakteri ile karıştırılmış ve mikro plaka okuyucu ile zamana karşı absorbansı okunmuştur. Böylelikle MOI 1 değerinde 8 fajın konakçı bakteri üzerindeki litik etkisi incelenmiştir. Şekil 3.7’de görüldüğü üzere kontrol olan *P. aeruginosa* C10, 540. dakikadan sonra logaritmik

faza geçmiştir. Fajlar 24 saat sonunda konakçı hücrenin tamamen inhibe olmasını sağlayamamıştır. Ancak 24 saat sonundaki fajların olduğu kuyucuklardaki bakteri yoğunlukları kontrole göre daha az bulunmuştur. Bu kuyucuklardaki absorbans değerleri 24 saat sonunda 0,285 ve 0,498 arasında bulunmuştur. Bu da fajların litik etkisinin varlığını göstermektedir.



Şekil 3.8. MOI:10 değerinde *P. aeruginosa*'ya fajların litik etkisi

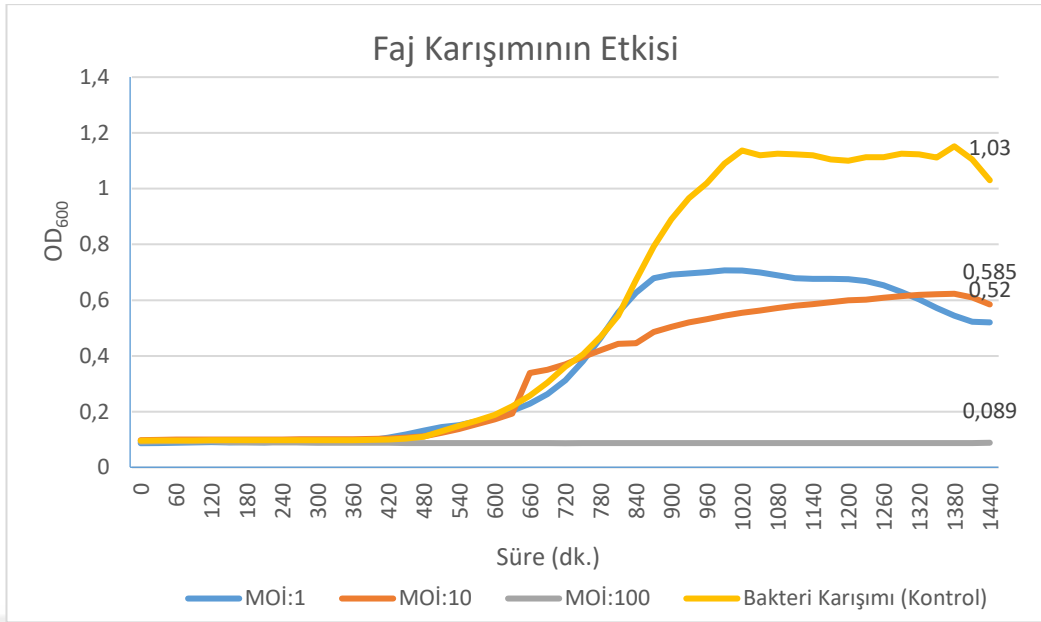
MOI 10 değerinde ise kontrol olan konakçı bakteri 24 saat sonunda en yüksek absorbans değerine sahip olmuştur. Bu da tüm fajların MOI 10 değerinde litik etkisinin varlığını göstermektedir. Faj bulunan kuyucuklardaki absorbans değerleri 0,207 ile 0,351 arasında bulunmuştur. Kontrol absorbansı ise 1,04 olarak bulunmuştur. Fajlardan S16 ve D1, konakçı üzerinde 24 saat sonundaki en yakın başlangıç ve bitiş absorbansı vermiştir. Bu da S16 ve D1 fajlarının MOI:10 değerinde en yüksek litik etkiye sahip olduğunu göstermiştir.



Şekil 3.9. MOI:100 değerinde *P. aeruginosa*'ya fajların litik etkisi

MOI 100 değerinde kontrol örneği olan konakçı bakteri, 24 saat sonunda yine en yüksek absorbans değerine sahip olmuştur. Bu da tüm fajların MOI 100 değerinde litik etkisinin varlığını göstermektedir. Faj bulunan kuyucuklardaki absorbans değerleri 0,1 ile 0,316 arasında bulunmuştur. Bu absorbans değerlerine göre fajların MOI 10 değerinde, MOI 1 değerine göre daha etkili olduğu görülmektedir. BK1-1 fajının bulunduğu kuyucukta konakçı bakteri hiçbir gelişme göstermezken diğer fajlarda konakçıya değişen miktarlarda etkili olmuştur. Bununla birlikte S22-2 fajı ile muamele edilen *P. aeruginosa* C10'un 15. saatten sonra ani artış gösterdiği ve 23. saatten sonra tekrar azalma gösterdiği görülmektedir.

Fajların konakçı bakteri olan *P. aeruginosa* C10 üzerindeki litik etkisi incelendikten sonra RFLP analizi ile seçilen 8 faj (S9-2, S11-2, S22-2, D1, BK1-1, BK2, S6, S16) ile bir faj karışımı hazırlanmıştır. Yine fajların etkili olduğu bakterilerden en az bir fajın etkili olduğu 7 *P. aeruginosa* suşunun (*P. aeruginosa* NCTC12924, *P. aeruginosa* C10, *P. aeruginosa* R1, *P. aeruginosa* Mr1, *P. aeruginosa* Mr2, *P. aeruginosa* A1, *P. aeruginosa* BX) karışımı hazırlanmış ve faj karışımının bakteri karışımı üzerindeki litik etkisi belirlenmiştir (Şekil 3.10).

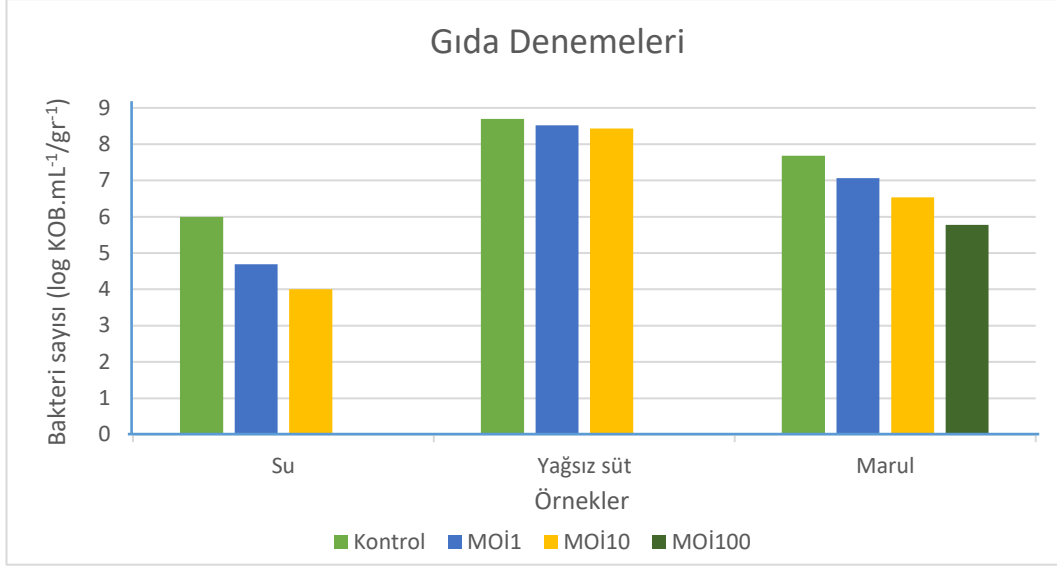


Şekil 3.10. Faj karışımının bakteri karışımına etkisi

Faj karışımı MOI:1 ve MOI:10 değerinde bakteri karışımının logaritmik evrede yoğunluğunun artmasını engellemiştir. Bu MOI'lerde kuyucukların absorbans değerleri 0,52 ve 0,585 olarak bulunmuştur. MOI 100'de ise faj karışımı ile bakteri karışımının tamamen inhibe edilmesi sağlanmıştır (OD_{600} :0,089).

3.13 Gıda Uygulaması

Fajların gıda ortamında etkinliğinin belirlenmesi amacıyla farklı MOI değerlerinde su, yağsız süt ve marul örneklerinde denemeler yapılmıştır. Denemelerde RFLP sonucuna göre farklı olduğu düşünülen 8 fajın (S9-2, S11-2, S22-2, D1, BK1-1, BK2, S6, S16) karışımı hazırlanmış ve kullanılmıştır. Konakçı olarak ise seçilen 8 fajdan en az birinin litik etki göstermiş olduğu 7 *P. aeruginosa* suşunun (*P. aeruginosa* NCTC12924, *P. aeruginosa* C10, *P. aeruginosa* R1, *P. aeruginosa* Mr1, *P. aeruginosa* Mr2, *P. aeruginosa* A1, *P. aeruginosa* BX) karışımı kullanılmıştır. Gıda örnekleri Bölüm 2.2.14'te verildiği şekilde hazırlanmış ve kontrol grupları ile diğer deney grupları 37°C'de 18-24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucu örneklerde belirlenen bakteri sayıları Şekil 3.11'de verilmiştir.



Şekil 3.11. İnkübasyon sonunda örneklerde bulunan bakteri yükü

İçme suyu örneğine bakıldığında kontrol örneklerinde başlangıç yükü 24 saat sonunda bakteri sayısının yaklaşık 6 log KOB/mL olduğu görülmektedir. MOI 1 değerinde örneklerde kontrol örneğine göre bakteri sayısı 1,31 log daha az bulunmuşken; MOI 10'da kontrol örneğine göre 2 log bir azalma elde edilmiştir. Buna rağmen MOI 100 değerinde sudaki bakteriler faj karışımı ile tamamen inhibe edilmiştir. Süt örneklerinde başlangıç bakteri yükü 3 log KOB/mL iken kontrolde 24 saat sonunda bakteri sayısı 8,6 log KOB/mL olmuştur. MOI 1 ve MOI 10 örneklerinde fajlar yüksek etkinlik gösterememişken MOI 100 değerinde yağsız sütteki bakterilerin faj karışımı ile tamamen inhibe edildiği görülmektedir.

Marul örneklerinde artan MOI değeri ile bakteri gelişiminin engellendiği gözlenmektedir. Bakteri yükünün kontrol örneklerinde 7,6 log KOB/g seviyesine yükseldiği görülmektedir. MOI 1, MOI 10 ve MOI 100 örneklerinde ise bakteri sayıları sırasıyla 7,06; 6,53 ve 5,77 log KOB/g olarak bulunmuştur. Marul örneklerinde tam bir inhibisyon elde edilemese de MOI 100 örneğinde kontrol örneğine göre bakteri sayısı artışının yaklaşık 2 log engellendiği görülmektedir.

3.14 Antibiyotik Duyarlılık Testi

RFLP analizine göre farklı olduğu düşünülen 8 fajın kokteyli hazırlanmış ve *P. aeruginosa* suşları ayrı ayrı bu faj karışımı ile muamele edilmiştir. Muamele sonrası bakterilerin önceden bakılmış olan antibiyotik duyarlılıklarına yeniden bakılmış ve elde edilen zon çapları kaydedilmiştir. Bakterilerin faj karışımı ile

muamelesinden önce ve sonra ölçülen zon çapları ve duyarlılık sonuçları Tablo 3.18’de verilmiştir.

Tablo 3.18. Suşların antibiyotik duyarlılıkları

Faj terapi öncesi zon çapları				Faj terapi sonrası zon çapları			
Bakteri Kodları	Antibiyotik	Zon çapı (mm)	Duyarlılık durumu	Bakteri Kodları	Antibiyotik	Zon çapı (mm)	Duyarlılık durumu
C10	TE30	14	R	C10	TE30	14	R
	CN10	14	R		CN10	14	R
	CIP5	24	R		CIP5	34	I
	P10	-	R		P10	-	R
	S300	16	S		S300	30	S
BX	TE30	10	R	BX	TE30	10	R
	CN10	16	S		CN10	16	S
	CIP5	28	I		CIP5	40	I
	P10	-	R		P10	-	R
	S300	-	R		S300	-	R
Mr1	TE30	12	R	Mr1	TE30	12	R
	CN10	22	S		CN10	22	S
	CIP5	30	I		CIP5	40	I
	P10	-	R		P10	-	R
	S300	26	S		S300	26	S
Mr2	TE30	-	R	Mr2	TE30	12	R
	CN10	16	S		CN10	16	S
	CIP5	24	R		CIP5	28	I
	P10	-	R		P10	-	R
	S300	26	S		S300	26	S
NCTC 12924	TE30	20	S	NCTC 12924	TE30	40	S
	CN10	28	S		CN10	28	S
	CIP5	28	I		CIP5	28	I
	P10	28	I		P10	40	I
	S300	32	S		S300	32	S
A1	TE30	8	R	A1	TE30	8	R
	CN10	20	S		CN10	20	S
	CIP5	22	R		CIP5	30	I
	P10	-	R		P10	-	R
	S300	24	S		S300	24	S
R1	TE30	8	R	R1	TE30	8	R
	CN10	24	S		CN10	24	S
	CIP5	30	I		CIP5	30	I
	P10	-	R		P10	-	R
	S300	18	S		S300	24	S

R: dirençli, I: orta derece duyarlı, S: duyarlı

Suşlar 48 saat boyunca faj karışımına tabi tutulmuş ve süre sonunda suşların antibiyotik duyarlılıkları belirlenmiştir. Antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi amacıyla siprofloksasin (CIP5), tetrasiklin (TE30), streptomisin (S300), gentamisin (CN10), penisilin (P10) antibiyotikleri kullanılmıştır. *P. aeruginosa* C10’un süre sonunda streptomisin için göstermiş olduğu zon çapı ve faj uygulaması öncesi 16

mm olan zon çapı 30 mm'ye yükselmiştir. Benzer olarak *P. aeruginosa* R1'in de faj uygulaması sonrası streptomisine karşı inhibisyon çapı 18 mm'den 24 mm'ye çıkmıştır. Diğer suşlardan *P. aeruginosa* BX, Mr1, A1 ve Mr2'nin siproflaksasine karşı zon çapları artmıştır. Suşların antibiyotik diskleri etrafındaki zon yarıçapı sırasıyla 6, 5, 4 ve 2 mm artmıştır. Bununla birlikte *P. aeruginosa* Mr2 ve *P. aeruginosa* NCTC 12924 tetrasikline karşı duyarlılık göstermiş ve uygulama öncesi sırasıyla 0 ve 20 mm olan zon çapları uygulama sonrası 12 ve 40 mm'ye yükselmiştir. *P. aeruginosa* NCTC 12924 uygulama öncesinde penisiline duyarlılık gösteren tek bakteri olmuştur. Uygulama sonrası da penisiline karşı göstermiş olduğu inhibisyon çapı artmış ve 28 mm olan zon çapı 40 mm'ye yükselmiştir. Gentamisine karşı ise hiçbir suş uygulama sonrası duyarlılık kazanmamıştır.

4. TARTIŞMA

Bu tez kapsamında *P. aeruginosa*'ya etkili fajların izolasyonu, karakterizasyonu ve gıdalarda kullanım potansiyelinin araştırılması hedeflenmiştir. Bu hedef doğrultusunda ilk olarak fajların konakçı hücreleri olacak olan *P. aeruginosa* suşlarının izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon için bakterinin habitatı göz önünde bulundurulmuştur. Toplanan örneklerden Cetrimide Agara ekim yapılarak Petri kutuları 37°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda Petri kutularında yeşil pigment üreten, UV ışına veren kolonilerin seçimi yapılmıştır. Bu suşlardan Nutrient Broth besiyerine ekim yapılmış ve 42°C'de gelişimleri incelenmiştir. Bu sıcaklıkta gelişebilen suşlar Asetamit Nutrient Broth besiyerine ekilmiş ve bu besiyerinde gelişebilen suşlardan yine oksidaz, katalaz ve sitrat pozitif ve MacConkey Agar besiyerinde sarımsı renkte, pembe olmayan koloni oluşturanlar şüpheli *P. aeruginosa* suşları olarak değerlendirilmiştir. Bu biyokimyasal testlerin sonuçlarına göre şüpheli kolonilerin tanıları MALDI-TOF MS ile yapılmıştır. Sonuç olarak 1 çiğ süt, 5 sebze, 1 tüketime hazır salata ve 1 atık su örneğinden 8 farklı *P. aeruginosa* suşu izole edilmiştir. Literatüre bakıldığında *P. aeruginosa* hastane enfeksiyonlarının başlıca sebeplerinden biri olduğu için genellikle klinik vakalardan izole edilmektedir (Al-Saffar ve Jarallah, 2019; Phan vd., 2023; Hu vd. 2024; Arumugam vd., 2018). Klinik mikrobiyoloji dışında *P. aeruginosa*'nın özellikle atık sularından izole edildiği görülmektedir (Raja vd., 2006; Miranda vd., 2015; Mahgoub vd., 2020). Atık sular dışında nehir suları (Ghosh vd., 2024; Rojo-Bezares vd., 2024), toprak (Abubakar vd. 2024; Shilpa vd., 2024) ve hayvanlar (Morales-Espinosa vd., 2024; Ramatla vd., 2024) *P. aeruginosa*'nın diğer izolasyon kaynaklarıdır. Bu tez kapsamında izole edilen suşların çoğunluğu sebze örneklerinden elde edilmiştir. Bunun da muhtemelen sulama sularından kaynaklı olduğu düşünülmektedir. İzolasyonlar sırasında *Pseudomonas* spp. olabilecek diğer izolatlarında tanımlaması MALDI-TOF MS ile yapılmıştır. *P. aeruginosa*'dan farklı olarak *P. brassicacearum*, *P. montellii*, *P. alcaligenes*, *P. tolaasii*, *P. plecoglossicida*, *P. fulva* türleri izole edilmiş ve bu bakteriler laboratuvar kültür koleksiyonuna dahil edilerek, konakçı skalası testi için kullanılmıştır.

Faj izolasyonu için ise toplanan örneklerden elde edilen süpernatantlar konakçı hücreler üzerine damlatılmış ve plak/zon varlığı gözlemlenmiştir. Konakçı

bakteri olarak laboratuvar kültür koleksiyonunda bulunan *P. aeruginosa* NCTC12924 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 standart suşları kullanılmıştır. Litik zon ve plak oluşumu gözlenen örnekler zenginleştirme işlemine tabi tutulmuştur. Zenginleştirmeler sırasında titresi çabuk yükselen litik etkisi yüksek olduğu düşünülen fajların seçimi yapılmıştır. Bu fajların plak morfolojilerine göre tek plak saflaştırmaları 3 kez yapılarak fajların saf olduğundan emin olunmuştur. Sonuç olarak 28 adet fajdan saflaştırılmış 15 faj seçilmiş ve tez kapsamındaki analizler için bu 15 faj ile çalışılmıştır. Bu fajların izolasyon materyalleri ise çiğ süt (11), kanalizasyon suyu (3) ve topraktır (1). Literatürde de *P. aeruginosa*'ya etkili fajların kanalizasyon suyu (Piracha vd., 2014; Kwiatak vd., 2015; Jamal vd., 2017; Yang vd., 2024), atık su (Yu vd., 2017; Kauppinen vd., 2021; Santamaría-Corral vd., 2024), nehir suyu (Fei vd., 2023), toprak (El-Wafai vd., 2022) hayvan dışkısı (Li vd., 2022) gibi çeşitli kaynaklardan izole edildiği görülmektedir.

Adsorpsiyon sabiti, latent süre ve patlama büyüklüğü faj popülasyonunun büyüme hızını tanımlayan faj büyüme parametrelerini temsil etmektedir. Araştırmacılar, bakteri büyüme hızının faj büyüme parametrelerini, özellikle latent periyot ve patlama boyutundaki değişiklikleri etkilediğini belirtmişlerdir (Nabergoj vd., 2018). Çalışma kapsamında fajların karakterizasyonunu sağlamak amacıyla izole edilen fajların replikasyon parametreleri belirlenmiştir. Bu amaçla fajların gelişme eğrileri çıkarılmış ve adsorpsiyon grafikleri oluşturulmuştur. Bu verilere göre fajların latent dönemleri, patlama büyüklükleri ve adsorpsiyon oranları hesaplanmıştır. Fajların latent dönemleri en az 5 dk. ve en fazla 30 dk. olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre fajların latent dönemlerinin kısa olduğu görülmektedir. Yüksek patlama büyüklüğü ve nispeten kısa latent dönem, biyolojik kontrol uygulamalarında kullanılacak fajlar için istenen özelliklerdir. Fajların patlama büyüklükleri ise 10 ile 200 POB/hücre arasında bulunmuştur (Tablo 3.4). García-Cruz vd. (2024) izole ettikleri fajın adsorpsiyon süresini 10 dk., patlama büyüklüğünü ise 80 POB/hücre olarak bulmuştur. Abdelghafar vd. (2023a) ise izole ettikleri fajın latent dönemini 15 dk., patlama büyüklüğünü ise 210 POB/hücre olarak bulmuştur. Başka bir çalışmada ise latent dönem 30 dk., patlama büyüklüğü ise 300 POB/hücre bulunmuştur (Teklemariam vd., 2023). Diğer çalışmalarda yine izole edilen fajların patlama büyüklükleri 21 (Hong vd., 2024), 80 (Manohar vd., 2024) 119 (Rafiei ve Bouzari, 2024), 100 (Sharma vd., 2021); latent dönemleri ise 20 dk. (Hong vd., 2024; Rafiei ve Bouzari, 2024), 30 dk. (Sharma vd., 2021) olarak

bulunmuştur. Yine benzer olarak faj vB_PaeM_PS3'ün 10 dakikalık bir latent süresi ve enfekte hücre başına yaklaşık 132 viryon patlama büyüklüğü bulunmuştur (Abdelghafar vd., 2023b). Farklı olarak Kauppinen vd. (2021) izole ettikleri 2 fajın latent dönemlerini 50-55 dk. olarak bulmuştur. Bu fajlar uzun latent dönemine sahip olmasına rağmen patlama büyüklükleri sırasıyla 124 ve 134 POB/hücre olarak bulunmuştur.

Bu çalışmada izole edilen fajların adsorpsiyon hızları $4,6 \times 10^{-7}$ (S22-2) ile $1,62 \times 10^{-8}$ (S21-1) mL/dk arasında bulunmuştur (Tablo 3.5). Adsorpsiyon oranları ise en düşük %87 (S11-2) ve en yüksek %100 (S21-1) olarak bulunmuştur. Kamyab vd. (2024) izole ettikleri fajın %93'ünden fazlasının ilk 5 dakika içinde bağlandığını, adsorpsiyon hız sabitinin ise 10 dakikalık aralıkta $7,4 \times 10^{-10}$ mL/dk olduğunu bulmuştur. Başka bir çalışmada ise fajların yaklaşık %50'si yaklaşık 10 dakika içinde konak yüzeyine tutunurken, %90'ı yaklaşık 25 dakika içinde konak hücrelerine adsorbe olmuştur (Manohar vd., 2024). Yine başka bir faj olan F1Pa'nın adsorpsiyon oranı sabiti 20 dakikada yaklaşık $4,20 \times 10^{-9}$ mL/dakika olarak bulunmuştur (Santamaría-Corral vd., 2024). Kamyab vd. (2023) ise fajların adsorpsiyonunun hızlı olduğunu ve fajların çoğunun (>%76) ilk 5 dakika içinde bağlandığını belirtmiştir. Ayrıca, faj P81'in konakçıya adsorpsiyon oranı sabiti (k değeri) 10 dakikalık zaman için $6,1 \times 10^{-10}$ mL/dakika olarak hesaplanmıştır.

Tez çalışması kapsamında fajların konakçıları olan *P. aeruginosa* NCTC 12924 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşları dışında farklı konakçılara karşı litik etkisi incelenmiştir. Böylelikle fajların konakçı skalası incelenmiştir. Bu amaçla izole edilen 8 yerel *P. aeruginosa* suşu analize alınmış ve fajlar bu konakçılar üzerine damlatılarak litik zon veya plak varlığı incelenmiştir. Fajların *P. aeruginosa* C10'a karşı yüksek litik etki göstermesinden dolayı bu suş sonraki analizlerde zenginleştirme vb. benzeri prosedürler için konakçı bakteri olarak kullanılmıştır. Fajlar, analize alınan konakçı hücrelerden piyomelanin üreten *P. aeruginosa* BK ve piyosiyanin üreten *P. aeruginosa* SLT suşlarına karşı litik etki göstermemiştir. Bu suşlar dışındaki 6 yerel izolata farklı sayılarda fajın etkili olduğu görülmüştür. Yine bu 6 izolattan *P. aeruginosa* C10, *P. aeruginosa* Mr2, *P. aeruginosa* BX'e karşı fajların hepsinin etkili olduğu tespit edilmiştir.

Fajların farklı *Pseudomonas* türlerine karşı litik etkisi de incelenmiş olup fajların *P. brassicacearum* MÇS2'e karşı litik etkisi tespit edilmiştir. Literatürde *P. brassicacearum*'a etkili fajlarla ilgili bir çalışma tespit edilememiştir. Ayrıca bu

çalışmada kullanılan fajların *P. monteilii*, *P. alcaligenes*, *P. tolaasii*, *P. plecoglossicida*, *P. fulva*, *P. putida* DSM 6125, *E. coli* O157:H7 ATCC 43888, *S. Enteritidis* NCTC 12694, *B. cereus* ATCC 10876, yerel izotlar olan *Proteus vulgaris*, *Lelliottia amnigena*, *Morganella morganii* bakterilerine etkili olmadığı tespit edilmiştir (Tablo 3.7).

Garcia-Cruz vd. (2024) φDCL-PA6 fajının etkinliğini iki referans suş ve dokuz antibiyotik dirençli *P. aeruginosa* suşuna karşı incelemiştir. Faj φDCL-PA6, iki referans suşu ve MDR klinik *P. aeruginosa* izolatının yedisini etkili bir şekilde enfekte ederken, 2 suşu enfekte edememiştir. Başka bir çalışmada faj DRL-P1, *Escherichia coli* MTCC 443, *Vibrio cholera* MTCC 3904, *Bacillus megaterium* MTCC 428, *Shigella flexneri* MTCC 1457, *Bacillus subtilis* MTCC 1305, *Salmonella enterica* Typhimurium (MTCC 1251, MTCC 1252), *Streptococcus pyogenes* (MTCC 442) ve *Klebsiella pneumoniae*'ye (MTCC 8911) karşı denenmiş ve herhangi bir litik aktivite belirlenmemiştir. Aynı çalışmada faj DRL-P1, topraktan izole edilen 9 adet *P. aeruginosa* suşuna etkili olmuştur (Sharma vd., 2021). Jamal vd. (2017) *P. aeruginosa*'ya etkili faj AZ1'in 19 *P. aeruginosa* suşundan yalnızca 4 tanesine etkili olduğunu aynı zamanda bu fajın *Achromobacter xylosoxidans* ve *Escherichia coli* CR-061 suşlarına da etkili olduğunu bildirmiştir. Çalışmada faj AZ1'in kanalizasyon suyundan izole edildiğini, muhtemelen dışkı ve hastane atıkları da dahil olmak üzere farklı kaynaklardan gelen çok çeşitli mikroorganizmalarla aynı ortamda bulunmasının fajın konakçı skalası üzerinde bir etmen olabileceği belirtilmiştir. Başka bir çalışmada *P. aeruginosa* fajı P81, *P. aeruginosa* dışında *P. syringae* suşuna etkili olmuştur. Ancak *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *K. pneumoniae*, MRSA *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis* ve *Salmonella* suşlarına etkili olmamıştır (Kamyab vd., 2023). Elgawish vd. (2023) izole ettiği *P. aeruginosa* fajı ise yalnızca *P. aeruginosa* suşlarına etkili olmuş *E. coli*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* ve *P. mirabilis* gibi diğer bakteri türlerine karşı test ise negatif sonuç vermiştir. Fei vd. (2023) ise test edilen fajı, 37 *P. aeruginosa* suşundan 8'ine etkisiz bulmuşken yine test edilen 3 *K. pneumoniae*'den birine etkili bulmuştur.

Başarılı bir faj uygulaması için en önemli gerekliliklerden biri fajların farklı ortam koşullarında (sıcaklık, pH vb.) kararlılığıdır. Kararlılık durumu fajlar arasında bireysel olarak farklılık göstermektedir ve aynı faj ailesi içinde bile tanımlanması zor olmaktadır. Ayrıca gıda işletmelerinde kullanılacak fajların farklı

proses koşullarına uyum göstermesi ve proses sırasında stabilitesini koruyabilmesi gerekmektedir. Sıcaklık, asitlik gibi fiziksel ve kimyasal koşullar faj oluşumunu, canlılığını ve depolama ömrünü belirlemektedir. Bu koşullar fajların protein yapısının denatürasyonuna neden olabilmekte ve sonuç olarak pratik uygulamalar sırasında antimikrobiyal etkinliği azaltabilmektedir (Jończyk-Matysiak vd., 2019; Lee vd., 2023). Sıcaklık, bağlanma, penetrasyon, çoğalma ve latent periyodun uzunluğunda önemli bir rol oynamaktadır (Kwiatek vd., 2015). Bu nedenle tez kapsamında izole edilen fajların 50-80°C sıcaklıklarında titrelerindeki değişimler takip edilmiştir. Fajların titreleri 50°C’de en fazla 1 log birimlik (BK2) azalma gösterirken; 60°C’de en fazla azalma 2 log POB/mL (S11-2 ve BK2) olmuştur. Titrelerdeki azalmaya rağmen tüm fajlar 70 ve 80°C’lerde varlığını sürdürmeyi devam ettirmiştir. Fajlar sıcaklık değişimlerinden en fazla 4,3 log azalma göstererek etkilenebilir. Fajlardan D1, S16, S6 kodlu fajlar ise 80°C’de dahi başlangıç titrelerine göre sırasıyla 2; 2,1 ve 2,3 log POB/mL azalma göstermiştir. Sonuç olarak fajlar 50°C ile 80°C aralığında canlılığını korumuştur. Optimalden düşük sıcaklıklarda, faj genetik materyali bakteri konak hücrelerine daha az nüfuz etmektedir; bu nedenle, fajların az bir kısmı çoğalma aşamasına katılabilmektedir. Daha yüksek sıcaklıklar ise fajların latent süresini uzatabilmektedir (Jończyk vd., 2011). Çok daha yüksek sıcaklıklarda ise sıcaklıkla birlikte virion kapsit yapısının bozulması veya boş kapsit oluşumu, kuyruk agregasyonu, faj kafası ve kuyruğunun ayrılması vb. sorunlar görülmektedir (Brié vd., 2016; Ahmadi vd., 2017). Sharma vd., (2021) izole ettikleri fajların 60°C ve üzeri bir sıcaklıkta kararlılığının önemli ölçüde azaldığını bildirmişlerdir. Shi vd., (2024) izole ettikleri fajın 60°C’ye kadar aktivitesini koruyabildiği ancak 70°C’de inaktif hale geldiğini bildirmiştir. Benzer şekilde Jamal vd. (2017)’de *P. aeruginosa*’a etkili faj AZ1’in 65°C’ye kadar kararlı olduğunu 70°C’de ise canlılığını tamamen yitirdiğini belirtmiştir. Yine benzer olarak Yu vd. (2017) PAXYB1’in 65°C’de hayatta kalma oranında belirgin bir düşüş gözlemlendiğini ve faj parçacıklarının %1’den azının 65°C’de canlı kaldığını bildirmiştir. Adnan vd. (2020) ise MA-1 fajının 80°C ve üzeri sıcaklıkta tamamen inaktif olduğunu, aynı şekilde Wang vd. (2023), PA_LZ01 ve PA_LZ02 fajlarının 80°C veya daha yüksek sıcaklıklarda tamamen inaktif olduğunu bildirmiştir. Danis-Wlodarczyk vd. (2015), *P. aeruginosa* fajının 40-70°C sıcaklıkta 60 dakikalık bir süre boyunca titresinde herhangi bir azalma tespit edememişken, fajların %90’ından fazlasının 80°C’de 15 dakikalık inkübasyondan sonra aktivitelerini

kaybettiğini bildirmiştir. Damar Çelik vd. (2024) faj PA-56'nın termal kararlılığını 4°C ve 90°C aralığında 120 dakika boyunca belirlemiştir. PA-56 faj titresinin 65°C'de yaklaşık 6 log, 90°C'de ise yaklaşık 7 log azaldığını bildirmişlerdir. Ancak faj PA-56'nın 65°C ve 90°C'de 120 dakika inkübasyondan sonra titresindeki azalmaya rağmen aktivitesini hala koruduğu ve yüksek sıcaklıklara dayanıklı olduğunu sonuçlarımız ile benzerlik göstermektedir. Literatüre bakıldığında bu tez kapsamında izole edilen D1, S16 ve S6 kodlu fajların güçlü bir termal stabilite göstermiş olduğu anlaşılmaktadır. Sıcaklığın fajlar üzerine etkisinin tam olarak anlaşılabilmesi için fajın yapısal bileşenleri üzerine sıcaklığın etkisini anlamak gerekmektedir. Örneğin Ahmadi vd. (2017), çalıştıkları iki *Listeria* fajının yapısal proteinlerinin amino asit dizilerindeki küçük farklılıklara rağmen, yüksek sıcaklıklara farklı tepki verdiğini bulmuştur. Fajların termal kararlılığı ile ilgili yapılan bir çalışmada Caldeira ve Peabody (2007) RNA fajı PP7'nin kapsit protein dimerleri arasında disülfid bağları ile çapraz bağlanma oluşumunun termal kararlılığı sağladığını bildirmiştir.

Tez çalışması kapsamında fajların termal stabilitesi dışında farklı pH koşullarındaki stabilitesi de incelenmiştir. Genellikle, kararlı ve nötr pH'a sahip çözeltilerin, çoğu faj için ideal olduğu bilinmektedir (Xiao vd., 2022). Fajların asidik koşullardaki stabilitelerinin değerlendirilmesi için pH 2-pH 5 aralığındaki ortamlar hazırlanmış ve fajlar 25°C'de 1 saat boyunca belirlenen pH değerlerinde bekletilerek titreleri incelenmiştir. Faj titrelerinde en fazla azalma pH 2'de 4 log POB/mL ile BK1-1 kodlu fajda meydana gelmiştir. BK2 kodlu fajda asidik koşullardan benzer şekilde etkilenmiştir. Bununla birlikte asidik koşullara en dirençli faj S11-2 fajı olmuştur. Bu faj titresinde pH 2 olan ortamda dahi yalnızca 0,4 log POB/mL azalma görülmüştür. S11-1 kodlu fajda benzer şekilde pH 2 olan ortamda yalnızca 0,84 log POB/mL azalma göstermiştir. Sonuç olarak 15 fajın, pH 2-pH 5 aralığında farklı oranlarda titre düşüşü gösterse dahi varlığını koruduğu görülmektedir.

Bazik koşullarda ise pH 8-pH 12 aralığında çalışılmıştır. Faj titrelerinde en fazla azalma pH 12'de 2 log POB/mL ile S6 ve S16 kodlu fajda meydana gelmiştir. Bununla birlikte bazik koşullarda H1, BK2, D1 kodlu fajlar stabilitelerini en iyi koruyan fajlar olmuştur. Yine fajların pH 8-pH 12 aralığında canlılığını koruduğu görülmektedir. Shi vd. (2024), izole ettiği *P. aeruginosa* fajının pH 4-10 aralığında stabilitesini koruduğunu bildirmiştir. Vashisth vd. (2023), izole ettikleri 5 *P.*

aeruginosa fajının pH 2 ve pH 10 aralığındaki kararlılığını incelemişlerdir. Fajlardan yalnızca bir tanesi pH 3'te canlılık göstermiş, diğer fajlar inaktif olmuşlardır. Fajlar için maksimum stabilite pH 6-8 civarında gözlenmiştir. Sharma vd. de (2021) benzer olarak *P. aeruginosa*'ya etkili DRL-P1 fajının pH 5 ile pH 10 arasında stabil olduğunu, aynı zamanda DRL-P1'in titresinin pH 3, 4, 5, 10, 11 ve 12'de önemli seviyede azalma gösterdiğini ancak canlılığını sürdürdüğünü belirtmişlerdir. Guo vd., (2019) S1 ve S2 kodlu iki *P. aeruginosa* fajının pH stabilitelerinin farklı olduğunu bulmuşlardır. Çalışmada faj S1, pH 3 ve pH 11'de yüksek oranda canlılığını korurken; faj S2'nin enfeksiyözlüğü pH 3'te önemli ölçüde azalmış ve pH 11'de neredeyse kaybolmuştur. Her iki fajda pH 12'de canlılığını yitirmiştir. Danis-Wlodarczyk vd. (2015) pH 3 ila 12 arasında 1 saatlik inkübasyondan sonra fajların %99'undan fazlasının canlı olduğunu bildirmiştir. Yüzeylerinde fosfat ve karboksil grupları bulunduğundan fajlar diğer virüsler gibi suda olduklarında negatif yüklü bir yüzeye sahiptir. Ortam asidik olduğunda, çözeltide çok sayıda hidrojen iyonu (proton) bulunmaktadır. Bunlar fajın yüzeyindeki negatif yüklü gruplarla etkileşime girebilmektedir. Bu da faj yüzeyindeki yükü negatiften nötre hatta pozitifeye değiştirebilmekte, bu da faj ile negatif yüklü bakteri yüzeyi arasında bir itmeye yol açabilmektedir. Bu durum fajın bakteri hücrelerine bağlanmasını ve onu enfekte etmesini zorlaştırabilmektedir. Diğer bir yandan, oldukça alkali koşullar faj parçacıklarının birbirine yapışmasına da neden olabilmektedir. Ayrıca, fajların pH toleransı, deneyde kullanılan faj türüne ve bakteri türüne bağlı olmaktadır. Bunun nedeni, farklı faj ve bakteri türlerinin pH'taki değişikliklere farklı tepki vermelerinden kaynaklanmaktadır (Elgawish vd., 2023).

Tuz konsantrasyonunun ve pH'ın proteinlerdeki yüklü grupları etkilediği ve dolayısıyla konformasyonel değişikliklere neden olabileceği bilinmektedir (Schijven vd., 2016). Bu nedenle çalışma konusunu oluşturan fajların farklı tuz konsantrasyonundaki (%2-30) kararlılıkları da incelenmiştir. Fajların farklı miktarda NaCl içeren ortamlardaki stabiliteleri genel bir eğilim göstermemiştir (Şekil 3.6). Düşük konsantrasyonlarda tuz iyonları proteinlerle etkileşime girerek protein yüklerini nötralize etmekte ve protein yapısını stabilize etmektedir. Daha yüksek konsantrasyonlarda NaCl, proteinlerin termal denatürasyonunu artırabilmekte veya faj nükleik asidinin yapısal stabilitesini olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Ancak faj genomunun dışı doğru yaptığı osmotik basınç faj

parçacıklarını dış kuvvetlere karşı daha dayanıklı hale getirebilmektedir (Silva vd., 2014; Evilevitch vd., 2011). Bu etkiler fajların farklı NaCl konsantrasyonlarında farklı stabilite göstermesinin nedenleri olabilir. Çalışmada kullanılan faj titrelerinin başlangıç konsantrasyonundan %8-%10 NaCl içeren konsantrasyonlara çıkıldıkça azaldığı görülmüştür. Bu azalma en fazla 2 log POB/mL düzeyinde olmuştur. Faj titresindeki bu azalmanın, artan tuz konsantrasyonu ile ortam ozmotik basıncının değişmesi ve fajın kafa ile kuyruk kısmında kırılmalara neden olabileceği düşünülmüştür (Fister vd., 2016). Ancak %15 ve diğer artan NaCl konsantrasyonlarında fajların aynı şekilde etkilenmediği görülmektedir. Faj titreleri %15 NaCl içeren ortamda en fazla 1,21 log POB/mL (S21-1) azalma gösterirken diğer faj titreleri aynı konsantrasyonda en fazla 0,7 log POB/mL azalma göstermiştir. Yine faj titreleri %20 NaCl içeren ortamda en fazla 1,79 log POB/mL (S21-1) azalış göstermiştir. Diğer konsantrasyonlarda ise %25 NaCl içeren ortamda faj titrelerinde görülen en fazla azalış 3 log POB/mL ile S6 fajında görülmüştür. Artan %30 NaCl konsantrasyonunda ise en fazla 3 log POB/mL azalma ile S6 fajı etkilenmiştir. Diğer fajlar ise bu konsantrasyonda en fazla 1 log POB/mL düzeyinde etkilenmiştir. Çözeltilerdeki tuz konsantrasyonunun artması, fajın enzim aktivitesini azaltabilmektedir. Bununla birlikte artan iyonik güç bakteri yüzey moleküllerinin konformasyonunu türe özgü olarak değiştirebilmektedir. Böylece litik proteinin hücre duvarı bağlanma alanına ve/veya peptidoglikan içindeki bölgeye erişimi artabilmekte veya kısıtlanabilmektedir (Jończyk-Matysiak vd., 2019). Bu durumun fajların artan tuz konsantrasyonlarına farklı tepki vermesinin sebebi olabileceği düşünülmüştür. Elgawish vd. (2023), NaCl toleransının oldukça değişken olduğunu ve faja göre değişebileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca fajların maruz kaldığı ozmotik stres ile fajların tuza direncinde hem genlerin hem de çevre etkisinin karmaşık ve çok adımlı bir süreç olduğu belirtilmiştir.

Biyofilmler, bakteriler ve hücre dışı polisakkarit, matris proteinleri ve hücre dışı DNA vb. dahil olmak üzere oluşmuş bakteri topluluklarıdır (Fei vd., 2023). *P. aeruginosa*'nın oluşturduğu biyofilmler hem insan sağlığı hem de endüstri için (boru vb. yerlerde) ciddi sıkıntı oluşturmaktadır (Bisht vd., 2021). Bu çalışmada izole edilen 15 fajın *P. aeruginosa* biyofilmlerine olan etkisi 3 farklı şekilde incelenmiştir. İlk olarak *P. aeruginosa* C10 suşu ile 96 kuyucuklu plakada 24 saat boyunca biyofilm oluşumu sağlanmıştır. Ardından kuyucuklar farklı oranlarda fajlar ile muamele edilerek biyofilm giderilmesi sağlanmıştır. Fajlar daha önceden

oluşan biyofilm tabakasının giderilmesinde MOI:1 ve 10 değerlerinde etkili olmamıştır. Ancak faj oranının artması ile 9 faj biyofilm giderimde etkili olmuştur. En yüksek oran ise S22-1 fajı ile %29 (MOI:1000) oranında sağlanmıştır. Yang vd. (2024) faj vB PaeM HUST 1 fajı ile 96 kuyucuklu plakada *P. aeruginosa*'nın 24 saatte oluşturduğu biyofilmin degradasyonunu hedeflenmişlerdir. Oluşturulmuş biyofilm tabakası üzerine faj inokülasyonu yapılmış ve 10 saat boyunca degradasyon takip edilmiştir. Faj vB PaeM HUST 1, 2 saatlik inkübasyondan sonra biyofilmin yaklaşık %33,33'ünü; 8 saatlik inkübasyondan sonra ise biyofilmin %90'ından fazlası parçalamıştır. Santamaría-Corral vd. (2024) faj F1Pa ile antibiyofilm çalışması için güçlü biyofilm üreticisi ve beta-laktam antibiyotikler de dahil olmak üzere MDR'ye duyarlı oldukları için *P. aeruginosa* PAO1, PA24, PA35 ve PA36 klinik suşlarını seçmiştir. Biyofilmdeki planktonik bakterilerdeki PAO1 konsantrasyonu, herhangi bir bakteriyofaj konsantrasyonda 6 saatte % 63 oranında azalmıştır. Fajlar 10^9 , 10^8 , 10^7 ve 10^6 POB/mL oranında sırasıyla PAO1 biyofilm büyümesini 6 saatte %35, %29, %26 ve %22 oranında azaltmıştır. Damar Çelik vd. (2024), *P. aeruginosa* suşlarının 24 saatlik olgun biyofilmleri üzerinde faj PA-56'nın etkisini araştırmıştır. Faj PA-56, *P. aeruginosa*-25 ve *P. aeruginosa*-15 suşlarının olgun biyofilm oluşumunu sırasıyla %45,24 ve %35,56 oranında engellemiştir. Fei vd. (2023), faj HZ2201 ile *P. aeruginosa* PAO1 ve PA143 suşlarının biyofilm oluşumunu 24 saatte sırasıyla %72,62 ve %95,61 oranında inhibe etmiştir. Yine bir çalışmada faj PaPC1, PaWP1 ve PaWP2, 24 saat sonunda olgun *P. aeruginosa* biyofilmlerini sırasıyla %66,7, %39,1 ve %62,9 oranlarında azaltmıştır (Kovacs vd., 2024).

Antibiyofilm çalışmaları kapsamında yapılan 2. analizde faj ve konakçı bakterinin eş zamanlı olarak polistiren yüzeye inoküle edilmiş ve bu yüzeyde 24 saat sonunda elde edilen biyofilm inhibisyon oranı % olarak verilmiştir. Farklı MOI değerlerinde faj uygulaması biyofilm inhibisyonuna farklı etki etmiştir. Faj ve bakterinin eşit oranlarda inoküle edildiği MOI:1 değerinde en yüksek inhibisyon oranı %25 (S9-2) iken, MOI:10 değerinde en yüksek %42 (S11-1) olarak görülmektedir. MOI:100 ve 1000 değerinde ise en yüksek inhibisyon oranlarının %72 (S9-2, BK1-2 ve BK2) olduğu görülmektedir. Abdelghafar vd. (2023b), farklı MOI lerde (0,1; 1 ve 10) faj/bakteri karışımını 37 °C'de 24 saat inkübe etmiştir. Faj vB_PaeM_PS3'ün 5 farklı klinik izolat ve 2 referans biyofilm inhibisyonunu incelemişlerdir. Artan MOI değerleri ile biyofilm inhibisyonunun sağlandığını

belirtmişlerdir. Fajların biyofilm bariyerini aşmalarını sağlayan spesifik mekanizmaları mevcuttur. Bunlar arasında EPS parçalayıcı enzimler, peptidoglikan hidrolazlar ve topluluk algılama inhibitörleri yer almaktadır (Visnapuu vd., 2022). Fajların antibiyofilm aktivitesinin en yaygın sebebi, depolimerazlar ve endolizinler gibi farklı enzimlerin üretiminden kaynaklanmaktadır. Depolimeraz, bakteri matriksindeki ekstraselüler polisakkaritleri spesifik olarak parçalayarak faj adsorpsiyonunu, penetrasyonunu ve bakteri hücresinin lizisini kolaylaştırabilmektedir. Santamaría-Corral vd. (2024), faj F1Pa'nın 10^9 ve 10^8 POB/mL konsantrasyonlarında, klinik izolat *P. aeruginosa* PA24'ün biyofilm oluşumunu pozitif kontrole kıyasla sırasıyla %83 ve %92 oranında azalttığını bildirmiştir. Aynı faj 10^9 POB/mL oranında diğer bir klinik izolat olan *P. aeruginosa* PA36'nın biyofilm oluşumunu pozitif kontrole kıyasla %82 oranında azaltabilmiştir.

Biyofilm çalışmalarının bir diğer uygulamasında faj tutundurulan polistiren bir yüzeyde konakçı bakteriler tarafından biyofilm oluşumu sağlanmıştır. Faj bulunan bir yüzeyde bakterilerin biyofilm oluşumunun hangi düzeyde engellendiği takip edilmiştir. Fajlardan yalnızca S21-2 kodlu faj MOI:1 değerinde herhangi bir etki göstermezken; MOI:1000 değerinde %39 oranında biyofilm oluşumunu engellemiştir. Fajlar MOI 10 değerinde en düşük %32, en yüksek %64; MOI 100 değerinde en düşük %13, en yüksek %35; MOI 1000 değerinde ise en düşük %31, en yüksek %46 oranında biyofilm oluşumunu engellenmiştir. Çalışmada elde edilen en yüksek değer ise %64 (D1) oranında olmuştur. Shafique vd. (2017), biyofilm içermeyen cam yüzeylerde JHP fajını ümit verici olarak bulmuştur. *P. aeruginosa* biyofilminin bakteriyel yükü faj JHP ile 24 saatlik işlemde kontrole kıyasla 9 log daha azalmıştır. Gabisoniya vd. (2016) antibiyofilm çalışmaları için plaka kuyucuklarına bakteri kültürü inokülasyonundan 4 saat önce faj inoküle etmiştir. Bakteri inokülasyonundan 24 saat sonra fajlar biyofilm oluşumunu etkin bir şekilde engellemiştir. Amankwah vd. (2022) yüzeylerde fajların biyofilm oluşumunu engelleme potansiyelini değerlendirmek için kateter ve endotrakeal tüp (ET) parçalarını fajlarla kaplamıştır. Çalışma sonucunda faj kaplı parçalar ile kaplanmamış parçalar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu bulunmuştur. Sonuçlar, kateterlerin ve ET'nin faj kaplamasının bu cihazlarda bakteri kolonizasyonunu engellediğini göstermiştir.

Elde ettiğimiz sonuçlarda ve literatürden atıf yaptığımız bazı çalışmalarda (Santamaría-Corral vd., 2024) artan faj miktarının her zaman en yüksek antibiyofilm etkisini sağlamadığı görülmektedir. Bunun birçok sebebi olabilmektedir. Artan faj sayısı ile süperenfeksiyon durumunun görülebilmesi, birçok fajın parçalanmış bakteri hücre yüzeylerine tutunabilmesi, deney sırasında yıkama işlemlerinde fajların bu hücre parçaları ile ortamdan uzaklaşması bununla birlikte çok fazla fajın kuyucuk yüzeyine homojen bir şekilde tutunamamış olabilmesi durumlarının bahsedilen sonuçlarda etkili olabileceği düşünülmüştür. Ayrıca biyofilm matrisi, fajların bağlanarak konak hücrelerine ulaşmasını engelleyen elementler olan adsorpsiyon tuzakları içerebilmektedir. Fajlar, reseptör tanıma sürecinin bir parçası olarak matristeki proteinlerin yanı sıra lipopolisakkaritler, polisakkaritler ve taykoik asitlerle etkileşime girebilir. Ayrıca biyofilm içerisinde fajların bağlanabileceği faj reseptör moleküllerine sahip olabilen ölü hücreler veya dış zar vezikülleri olabilir (Visnapuu vd., 2022). Bununla birlikte Secor vd. (2015), *P. aeruginosa*'ya etkili filamentöz Pf fajının EPS matrisine dahil olduğunu, faj ve bakterinin kristalin bir yapı oluşturduğunu, bu yapının da yapışmayı teşvik ederek, kurumaya ve antibiyotiklere karşı toleransı artırdığını bulmuştur. Bununla birlikte hareketliliğin bakteri türlerinin yeni yüzeylerde kolonileşmesine, yüzey boyunca yayılmasına ve biyofilm oluşumuna yardımcı olduğu bilinmektedir. *P. aeruginosa* da yüzeylere ulaşmak ve tutunmak için kamçı desteği ile yüzeabilen hareketli bir bakteridir (Sharma vd., 2021).

Bu çalışmada hazır ticari kit kullanılarak faj DNA'ları izole edilmiştir. İzole edilen DNA'lar yaklaşık 3'er µL, 1-2 µl Loading Dye ile karıştırıp agaroz jel elektroforeze yüklenmiştir. Böylelikle DNA'ların saflık durumu ve yoğunluğu kontrol edilmiştir. Ardından DNA'lar yoğunluklarına göre belirlenen miktarlarda enzim kesimine alınmıştır. Enzim kesiminde *SmaI*, *NdeI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *XhoI* restriksiyon enzimleri kullanılmıştır. Enzimler ile kesim reaksiyonu gerçekleştirilmiş ardından reaksiyon karışımları agaroz jelle yüklenerek DNA'ların kesim profilleri incelenmiştir. Bant profillerine göre fajların gruplandırılması sağlanmıştır. Enzimlerden *NdeI* enzimi hiçbir DNA'yı kesmemiştir. *XhoI* ise enzim kesiminde yer alan 15 faj DNA'sından 6'sını kesmemiştir. Diğer enzimler ise faj DNA'larını farklı büyüklüklerde kesmiştir. Fajlarda bu bant profillerine göre gruplandırılmışlardır. Bu gruplandırmaya göre fajlar arasından seçim yapılmıştır. RFLP sonucuna göre farklı olduğu düşünülen S9-2, S11-2, S22-2, D1, BK1-1, BK2,

S6, S16 fajları seçilmiştir. Bu fajlar sonraki analizlerde kullanılacak olan faj karışımının hazırlanmasında kullanılmıştır. Aynı zamanda fajların enzim kesim profiline göre yaklaşık genom büyüklüğü hesaplanmıştır. Buna göre fajların *SmaI* enzim kesimine göre genom büyüklükleri 40.843 bç (S21-2) ile 66.663 bç (D1) arasında bulunmuştur. *XhoI* enzim kesimine göre ise 29.741 bç (S22-1) ile 42.802 bç (D1) arasında bulunmuştur. *EcoRI* enzim kesimine göre en küçük genom boyutu yaklaşık 44.322 bç (S21-2) ve en büyük genom boyutu yaklaşık 88.059 bç (S21-1) bulunmuştur. *EcoRV* enzim kesimine göre en küçük genom boyutu yaklaşık 27.845 bç (S9-2) ve en büyük genom boyutu yaklaşık 75.622 bç (S22-2) bulunmuştur. Genom büyüklüklerinin farklı enzim kesimlerinde farklı bulunması, kesim sonucu bantların yakın veya aynı büyüklükte olmasından dolayı görsel ayrımının yapılamaması olabilir. Damar Çelik vd., (2024) izole ettikleri *P. aeruginosa* fajının genomik DNA'sını *EcoRI* ve *HindIII* restriksiyon enzimleriyle kesmiştir. Sonuç olarak, PA-56 fajı DNA'sının hem *EcoRI* hem de *HindIII* enzimlerine duyarlı olduğunu ve çeşitli boyutlarda (500 ile 11973 bç arasında) parçalar oluştuğunu belirlemiştir. Benzer olarak Jamal vd. (2017) *P. aeruginosa*'ya etkili fajın DNA'sını *EcoRI* restriksiyon enzimi kesmiş ve 1,2 ila 20 kbç arasında değişen çoklu bantlar elde etmişlerdir. Han vd. (2014), *P. aeruginosa* faj DNA'sını 9 farklı enzim ile kesime tabi tutmuştur. Bu enzimlerden *EcoRV* sonuçlarımızdan farklı olarak kesimde etkili olmamışken, *XhoI* 3 bant vermiş ve yine çalışmamızdan farklı olarak *NdeI* de kesim sağlamıştır. Başka bir çalışmada faj ϕ PSZ1 ve ϕ PSZ2'nin genomik materyali *HincII*, *EcoRI*, *NdeI*, *XbaI*, *HindIII*, ve *MspI* enzimleri ile kesime tabi tutulmuştur. Tüm kesimlerde birçok bant oluştuğu görülmüş ve elde edilen fragment boyutlarına göre belirlenen genom boyutunun çalışmamıza benzer olarak 40-50 kbç olduğu tahmin edilmiştir (Didamony vd., 2015). Sepúlveda-Robles vd. (2012) izole ettiği 65 *P. aeruginosa* fajının *NdeI*, *HindIII* ve *EcoRI* enzimleri ile RFLP analizini gerçekleştirmiştir. Her enzimin farklı sayıda faj genomunu kestğini ve analiz edilen 65 faj DNA'sından 19'unun üç enzim kesimine de dirençli olduğunu bulmuştur. Araştırmacılar ilginç bir şekilde, kesime dirençli tüm faj DNA'larının, uzun kafası olan sifovirüslere ait olduğunu bildirmiştir. Ancak, bu fajların DNA dizilerinin siliko analizlerde 3 enzime ait kesim bölgesine sahip olduğu tespit edilmiştir.

P. aeruginosa'ya etkili fajlar genetik materyal ve morfolojik olarak çeşitlilik göstermektedir. Önceki bölümlerde açıklandığı gibi *P. aeruginosa*'ya etkili fajlar

ikosahedral bir kafa ve uzun bir kuyruğa sahip olabilirken, *Cystoviridae* ailesine ait zarflı kuyruksuz küresel bir morfolojide de olabilmektedir. Bu çalışmada RFLP analizine göre birbirinden farklı olduğu tespit edilen 8 fajın elektron mikroskop görüntüsü elde edilmiştir. TEM mikrograflarına bakıldığında fajların kısa kuyruklu yani podovirüs olduğu tespit edilmiştir. Fajlara ait ölçülen kafa çaplarının 42,6 nm ile 69,6 nm arasında değiştiği bulunmuştur. Kuyruk uzunlukları ise 10 nm ile 41,6 nm arasında bulunmuştur. Faj S9-2'nin net bir mikrografi elde edilememiştir (Fotoğraf 3.13).

Bir çalışmada saflaştırılmış vB PaeM HUST 1 fajının morfolojik karakteristiği TEM ile analiz edilmiştir. Fajın uzun kuyruklu olduğu belirlenmiştir. Baş 146,65 nm × 133,32 nm ve kuyruk 199,98 nm olarak ölçülmüştür (Yang vd., 2024). Valentová vd. (2024) bakteriyofaj JBD30'un, ikosahedral bir kapsid, uzun, esnek, kasılmayan 180 nm uzunluğunda bir kuyruk ve bir taban plakasından oluştuğunu tespit etmiştir. Çalışmamıza benzer olarak Jiang vd. (2020) faj PA-YS35'in baş çapını yaklaşık 45-50 nm ve kuyruğunu yaklaşık 50 nm olarak bulmuştur. Yine Abdelghafar vd. (2023a) ise faj vB_PaeP_PS28'in podovirid bir morfoloji gösterdiğini, baş çapının 65,5 nm ve kuyruk uzunluğunun 37,8 nm olduğunu bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada atık sudan izole edilen miyovirid fajlar V523 ve V524'ün 75 nm çapında izometrik başı ve yaklaşık 140 nm'lik kasılabilir kuyruğu olduğu tespit edilmiştir (Kauppinen vd., 2021). Vashisth vd. (2023) ise izole ettiği iki fajın kalın kısa kuyruk, belirgin taban plakası, kuyruk pimleri ve kuyruk lifleri olduğunu bulmuştur. Bu iki fajdan faj φPA170, 80,87 ± 1,81 nm çapında bir ikosahedral baş ve kasılmayan haliyle 130,44 ± 6,36 nm uzunluğunda, kasılmış haliyle 48,93 ± 0,94 nm uzunluğunda ve 19,90 ± 0,65 nm kalınlığında bir kasılabilir kuyruğa sahiptir. Faj φPA180 ise 56,18 ± 2,89 nm çapında bir ikosahedral baş, 119,85 ± 11,39 nm uzunluğunda, 16,59 ± 165 nm genişliğinde bir kasılabilir kuyruk ve kalın bir taban plakasına sahip bulunmuştur. Yang vd. (2016) transmisyon elektron mikroskobu ile izole ettikleri faj partikülünün kuyruksuz, küresel ve yaklaşık 50 nm çapında olduğunu ortaya koymuştur. Li vd. (2022) izole ettikleri PhiZ98'in, yaklaşık 77,3 ± 4,0 nm çapında küresel olduğunu ve zar benzeri bir tabaka ile sarıldığını bildirmiştir.

RFLP analize göre birbirinden farklı kesim şablonuna sahip 8 adet fajın litik aktivite gösterdikleri 6 *P. aeruginosa* suşu üzerinde plak etkinlikleri (EOP) belirlenmiştir. *P. aeruginosa* Mr1 (EOP: 0,75) ve *P. aeruginosa* BX (EOP: 0,625),

S11-2 fajının yüksek verimlilikle çoğalmasını sağlayan konakçılardır. Yine S11-2 fajı *P. aeruginosa* Mr2 (EOP: 0,125), *P. aeruginosa* A1 (EOP: 0,187), *P. aeruginosa* R1 (EOP: 0,13) konakçıları üzerinde orta düzeyde etkinlik göstermiştir. Bununla beraber BK2 ve D1 fajları da sırasıyla *P. aeruginosa* R1 (EOP: 0,44) ve *P. aeruginosa* Mr1 (EOP: 0,11) konakçıları üzerinde orta düzeyde etkinlik göstermiştir. Diğer fajlar ise bakteriler üzerinde düşük düzeyde etkinlik göstermiştir. Vashisth vd. (2023) EOP değerinin belirlenmesini, başarılı bir litik enfeksiyonun sağlam bir kanıtı olarak betimlemiştir. Ayrıca yaptıkları çalışmada EOP deneyinden elde edilen verimlilik sonuçlarının, spot testinde elde edilen sonuçlardan farklı olduğunu gözlemlemişlerdir. Çalışmamızda da benzer bulgular gözlemlenmiştir. Konakçı skalası için damlatılan fajların hepsi *P. aeruginosa* Mr2 ve *P. aeruginosa* BX'e yüksek litik etki göstermişken, EOP testinde farklı düzeylerde verimlilik elde edilmiştir. Yine fajlardan S11-2, *P. aeruginosa* Mr1 üzerine damlatıldığında yüksek litik etki göstermemişken EOP testinde yüksek verimlilikte çoğalabildiği konakçı olmuştur. Abdelghafar vd. (2023b) izole ettikleri fajın test edilen 18 *P. aeruginosa* suşundan 10'unu (%55,5) enfekte edebildiğini göstermiştir. Araştırmacılar, çalıştıkları vB_PaeM_PS3 fajının litik aktivitesinin daha iyi değerlendirilebilmesi amacıyla duyarlı suşlar için EOP analizi yapmıştır. EOP sonuçlarına göre ise 10 suştan yalnızca bir *P. aeruginosa* izolatından yüksek verimle faj elde edildiği görülmüştür.

Çalışmamızda fajların besiyeri ortamında litik spektrumunun belirlenmesi için, MOI 1, 10 ve 100 değerini karşılayacak şekilde konakçı bakteri ile karıştırılmış ve mikrolaka okuyucu ile zamana karşı absorbans kaydedilmiştir. MOI 1 değerinde fajlar 24 saat sonunda konakçı bakterinin tamamen inhibe olmasını sağlayamamıştır. Ancak konakçının lag fazını uzatmışlardır. MOI 10 değerinde ise 24 saat sonunda kontrol olan konakçı, faj içeren kuyucuklara göre en yüksek absorbans değerine (OD₆₀₀: 1,04) sahip olmuştur. Bu da tüm fajların MOI 10 değerinde litik etkisinin arttığını göstermektedir. Fajlardan S16 ve D1, konakçı üzerinde başlangıç ve bitiş absorbans en yakın olan sonucu vermiştir. Bu sonuç bu iki fajın MOI 10 değerinde en yüksek litik etki gösteren fajlar olduğunu göstermektedir. MOI 10 değerinde faj bulunan kuyucuklardaki absorbans değerleri 0,207 ile 0,351 arasında bulunmuştur. MOI 100 değerinde ise kontrol olan bakteri, 24 saat sonunda yine en yüksek absorbans değerine sahip olmuştur. Bu da tüm fajların MOI 100 değerinde litik etkisinin varlığını göstermektedir. MOI 100

değerinde faj bulunan kuyucuklardaki absorbans değerleri 0,1 ile 0,316 arasında bulunmuştur. BK1-1 fajı konakçıyı tamamen inhibe etmişken diğer fajlarda değişen miktarlarda etkili olmuştur. Bununla birlikte S22-2 fajı ile muamele edilen *P. aeruginosa* C10'un 15. saatten sonra ani artış gösterdiği ve 23. saatten sonra tekrar azalma gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 3.9).

Fajların konakçı bakteri olan *P. aeruginosa* C10 üzerindeki litik etkisi incelendikten sonra RFLP analizine göre seçilen 8 faj (S9-2, S11-2, S22-2, D1, BK1-1, BK2, S6, S16) ile bir faj karışımı hazırlanmıştır. Yine fajların etkili olduğu bakterilerden en az bir fajın etkili olduğu 7 *P. aeruginosa* suşunun (*P. aeruginosa* NCTC12924, *P. aeruginosa* C10, *P. aeruginosa* SLT, *P. aeruginosa* R1, *P. aeruginosa* Mr1, *P. aeruginosa* Mr2, *P. aeruginosa* A1, *P. aeruginosa* BX) karışımı hazırlanmış ve bu iki karışımın litik spektrumu belirlenmiştir (Şekil 3.10). Faj karışımı MOI 1 ve MOI 10 değerinde bakteri karışımının logaritmik evrede yoğunluğunun artmasını engellemiştir. MOI:100'de ise bakteri karışımının faj karışımı ile tamamen inhibe edilmesi sağlanmıştır.

Harada vd. (2022) izole ettikleri ph0031 ve ph0034 fajlarının MOI 1 ve 1000 değerlerinde bakteriyel inaktivasyon etkisini incelemişlerdir. Faj ph0031 için inkübasyonun ilk 10 saati boyunca, inaktivasyon MOI 1 (1,3 log KOB/mL) ve 1000 (1,7 log KOB/mL) için benzer bulunmuştur. MOI 1 ve 1000'de, faj ph0031 ile maksimum *P. aeruginosa* inaktivasyonu sırasıyla 2,4 ve 5,1 log KOB/mL bulunmuştur. Faj ph0034 ile bakteri inaktivasyonunun maksimum değeri 24 saatlik inkübasyondan sonra MOI 1' de, 3,5 log KOB/mL bulunmuştur. MOI 1000 değerinde, aynı zaman periyodundan sonra inaktivasyon faktörünü (7,5 log KOB/mL) önemli ölçüde artmıştır. Ancak, inkübasyonun ilk 10 saati boyunca, inaktivasyon MOI 1 (1,3 log KOB/mL) ve 1000 (2,2 log KOB/mL) için benzer bulunmuştur. Bu çalışmada sonuçlarımıza benzer olarak artan MOI değerinde bakteri inaktivasyonun arttığı görülmektedir. Başka bir çalışmada Yang vd. (2024) fajın etkin olduğu optimum MOI değerini bulmak istemiştir. MOI 10 ve 10^{-3} aralığında bakteri ve faj karışımı hazırlanarak fajların 6-8 saat içerisindeki titresi takip edilmiştir. Bulgular, faj titresinin başlangıçta arttığını, sonunda bir zirveye ulaştığını ve daha sonra MOI azaldıkça azaldığını ortaya koymuştur. Sonuç, vB Paem HUST 1 fajının optimal MOI'sinin 0,1 olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda 3 farklı MOI değerinde (0,1;1 ve 10) faj ve bakteri karıştırılarak bakteri gelişimi optik olarak takip edilmiştir. Bakterinin 10. saatten sonra direnç kazandığı

ve optik yoğunluğunda bir artış yaşandığı tespit edilmiştir. Çalışmamızda da benzer şekilde 10. saatten sonra MOI 1 ve 10 değerlerinde bakteri yoğunluğu artış göstermiştir. Fajların bakteriyel gelişme üzerindeki etkisinin takip edildiği başka bir çalışmada, 8 saatlik inkübasyon boyunca OD 600'de optik yoğunluğu ölçülmüştür. Farklı MOI'lerle (100, 10, 1, 0.1, 0.01 ve 0.001) kurulan deneyler, faj etkisi nedeniyle bakteriyel büyümenin engellendiğini göstermiştir. Yine çalışmamıza benzer olarak artan MOI ile bakteri inhibisyonu da artış göstermiştir (Sharma vd., 2021). Lerdsittikul vd. (2022) MOI 0,1;1 ve 10 değerlerinde 6 saatlik inkübasyon boyunca optik yoğunluğu takip etmiş ve kontrole göre tüm MOI değerlerinde bakteri inhibisyonu sağlamıştır.

Fajların gıda ortamında etkinliğinin belirlenmesi amacıyla farklı MOI değerlerinde su, yağsız süt ve marul örneklerinde denemeler yapılmıştır. Denemelerde RFLP analizi sonucuna göre seçilmiş olan 8 fajın (S9-2, S11-2, S22-2, D1, BK1-1, BK2, S6, S16) karışımı hazırlanmış ve konakçı olarak ise seçilen fajlardan en az birinin litik etki göstermiş olduğu 7 *P. aeruginosa* suşunun (*P. aeruginosa* NCTC12924, *P. aeruginosa* C10, *P. aeruginosa* SLT, *P. aeruginosa* R1, *P. aeruginosa* Mr1, *P. aeruginosa* Mr2, *P. aeruginosa* A1, *P. aeruginosa* BX) karışımı kullanılmıştır. Analiz sonunda içme suyu kontrol örneğinin bakteri yükü 24 saat sonunda yaklaşık 6 log KOB/mL olarak bulunmuştur. MOI:1 örneğinde *P. aeruginosa* sayısı kontrol örneğine göre 1,31 log daha az bulunurken; MOI:10'da kontrol örneğine göre 2 log daha az bulunmuştur. Buna rağmen MOI:100 değerinde sudaki bakteriler faj karışımı ile tamamen inhibe edilmiştir (Şekil 3.11). Sanchez-Rosario vd. (2024) sularda *P. aeruginosa* gelişimini önlemek için faj SN ile bir uygulama yapmıştır. Bakteri gelişimini optik olarak takip ettikleri analizde MOI 10 değerinde faj uygulanan örneklerde herhangi bir bakteriyel gelişme olmazken, kontrol örneğinde *P. aeruginosa*'nın 37°C'de 26 saatlik inkübasyon sonunda OD değeri yaklaşık 0,01'den yaklaşık 0,1'e yükselmiştir.

Çalışmamızda süt örneklerinde başlangıç bakteri yükü 3 log KOB/mL iken kontrolün 24 saat sonunda bakteri sayısı 8,6 log KOB/mL olarak bulunmuştur. MOI 1 ve MOI 10 örneklerinde fajlar yüksek etkinlik gösterememişken, MOI 100 değerinde yağsız sütteki bakterilerin faj karışımı ile tamamen inhibe edildiği görülmektedir. Li vd. (2022) gıdalarda defektif lipopolisakkaritlere sahip *Pseudomonas* suşlarını kontrol etmek için yeni bir üç parçalı dsRNA sistovirüs phiZ98'in etkinliğini süt ve konserve dana etinde incelemiştir. Kontrollerle

karşılaştırıldığında, 20 saat sonunda aşılınmış bakteri hücrelerinin yaklaşık %98,88'i (MOI 1) ve %99,99'u (MOI 10) 4°C'de faj phiZ98 inhibe edilmiştir. Aynı koşullar altında, süt örneklerindeki bakterilerin neredeyse tamamı 25°C'de kültüre edildikten sonra faj phiZ98 tarafından tamamen lize edilmiştir. Veriler, faj phiZ98'in süt ürünlerinde *P. aeruginosa* suşlarının neden olduğu kontaminasyonları kontrol etmek için biyolojik koruyucu olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Zhang vd. (2022) faj lizini olan LysSTG2'nin *P. aeruginosa* dekontaminasyonu için bir biyolojik kontrol ajanı olarak uygulanabilirliğini sıvı gıdalarda incelemiştir. Bu amaçla su ve süt örneklerinde denemeler yapılmıştır. LysSTG2 tek başına 100 mg/mL olacak şekilde 1 saat boyunca muamele edilmiş ancak test edilen tüm sıcaklıklarda (8, 25, 37°C) şişelenmiş su ve süt örneklerinde *P. aeruginosa*'ya etkisiz olmuştur.

Çalışmamızda marul örneklerinde artan MOI değeri ile bakteri inhibisyonu sağlanmıştır. Bakteri yükünün kontrol örneğinde 7,6 log KOB/g seviyesine yükseldiği; MOI 1, MOI 10 ve MOI 100 oranında faj uygulanan örneklerde ise bakteri sayılarının sırasıyla 7,06; 6,53 ve 5,77 log KOB/g olduğu bulunmuştur. Marul örneklerinde tam bir inhibisyon elde edilemese de MOI:100 örneğinde kontrol örneğine göre bakteri sayısı artışının yaklaşık 2 log engellendiği görülmektedir. Li vd. (2022) sistovirüs phiZ98 ile 4°C'de konserve dana etinde *P. aeruginosa*'ların %76,26'sı (MOI 1) ve %91,42'sini (MOI 10) 20 saatte inhibe etmiştir.

Zhang vd. (2022) faj lizini olan LysSTG2 ile somon örneklerinde kontrol grubuna göre *P. aeruginosa* sayısını 2 saatlik inkübasyondan sonra 0,7 log KOB/parça oranında azaltmıştır. Yang vd. (2024) sığır eti ve süt örneklerinde *P. aeruginosa*'ya karşı faj vB Paem HUST'ın etkinliğini çalışmışlardır. Örnekler 100 µL, 10² KOB/mL veya 10³ KOB/mL *P. aeruginosa* ile kontamine edilmiştir. Ardından MOI 10.000 olacak şekilde faj inokülasyonu yapılmıştır. Örnekler 4°C'de 72 saat inkübe edilmiş ve her 12 saatte 1 mL'lik numune alınarak *P. aeruginosa* gelişimi takip edilmiştir. Süt örneklerinde düşük bakteri konsantrasyonunda (10² KOB/mL), fajın eklenmesi, 12 saat ve 24 saat sonunda bakteri konsantrasyonunda %68,34 ve %92'lik önemli bir azalmaya neden olmuştur. Bakterinin tamamen inhibisyonu ise faj eklenmesinden 36 saat sonra sağlanmıştır. Yüksek bakteri enfeksiyonu konsantrasyonlarında (10⁵ KOB/mL) ise süte faj eklenmesi, 72 saatten sonra, *P. aeruginosa* sayısını 5 log KOB/mL'den 2,73 log KOB/mL'ye

düşürmüştür. Sığır eti örneklerinde ise düşük konsantrasyonunda (10^2 KOB/mL), *P. aeruginosa* sayısı vB PaeM HUST 1 fajı ile tedaviden 12 saat sonra %76,34 oranında azalmıştır ve 24 saat sonunda ise tamamen ortadan kalkmıştır. Yılmaz vd. (2024) 3,08–3,12 log KOB/g ve 5,30-5,46 log KOB/g *P. aeruginosa* RM11 ile aşılana tavuk göğsü örneklerindeki fajların litik etkilerini belirlemek için, faj vB_PaeS-K10 ve faj vB_PaeS-K1 (8,30-8,39 log POB/g) ile ayrı ayrı ve kokteyl halinde faj tedavisi gerçekleştirmiştir. Örnekler buzdolabı sıcaklığında (4°C) saklanmıştır. *P. aeruginosa* RM11 sayısının (3,08-3,12 log KOB/g) depolamanın birinci gününden itibaren ve depolama süresince tespit edilebilir düzeyin altına düştüğü belirlenmiştir. Yüksek konsantrasyonlarda aşılana örneklerde ise faj vB_PaeS-K10 ve faj vB_PaeS-K13 sırasıyla depolamanın 2. saatinde 0,23 ila 0,54 log ($p>0,05$), depolamanın birinci gününde 2,78 ila 3,38 log ($p<0,05$) ve depolamanın üçüncü gününde 3,50 ila 4,16 log ($p<0,05$) azalmaya neden olmuştur. Çalışmada fajların kokteyl olarak uygulandığında tek başına uygulandığından daha etkili olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, düşük bakteri yüküne sahip gıda örneklerine faj uygulanması, başlangıçtaki bakteri yükü yüksek olan örneklerle kıyasla bakteri sayısında daha fazla azalma ile sonuçlandığı bildirilmiştir.

Yang vd. (2024) laboratuvar koşulları altında yapılan deneylerde, bakteri konsantrasyonunun pratiğe göre daha yüksek olduğunu ve laboratuvar koşullarında ortaya çıkmasının daha muhtemel olduğunu bildirmiştir. Bununla birlikte pratik uygulamalarda, gıdada enfekte olmuş bakteri sayısının daha az olması ve buzdolabındaki kültür koşullarının bakteri büyümesini kısıtlaması nedeniyle, fajların faj dirençli bakterileri üremeden tamamen ortadan kaldırmasına daha uygun olduğunu belirtmiştir.

P. aeruginosa, antibiyotik direnci ile ilişkili ölümlerden sorumlu ilk altı patojenden biridir (Sendra vd., 2024). İndüklenebilir β -laktamaz üretimi, *P. aeruginosa*'nın bu ajanlara karşı doğal direncinde önemli bir role sahiptir. *P. aeruginosa*'nın inhibisyonunda farklı antibiyotik seçenekleri ve kombinasyonlarıyla ilgili çalışmalar yapılmaktadır. Bununla birlikte antibiyotikler ve fajlarla kombinasyon tedavisi, gelecekteki çalışmalarda değerlendirilmesi gereken olası bir seçenek olarak görülmektedir. Antibiyotik direncine karşı bakteriyofajlar ümit verici terapötik yaklaşımlar olarak ortaya çıkmıştır. Bu nedenle fajlar ve antibiyotiklerin birlikte kullanıldığı çalışmalar yoğunluk kazanmıştır (Uchiyama vd., 2018; Horcajada vd., 2019). Bu çalışmada ise fajların konağın

antibiyotik direnci üzerinde etkisi olup olmadığı incelenmiştir. Suşlar 48 saat boyunca faj karışımına tabi tutulmuş ve süre sonunda suşların antibiyotik duyarlılıkları belirlenmiştir. *P. aeruginosa* C10'un süre sonunda streptomisin için göstermiş olduğu zon çapı ve faj uygulaması öncesi 16 mm olan zon çapı 30 mm'ye yükselmiştir. Benzer olarak *P. aeruginosa* R1'in de faj uygulaması sonrası streptomisin için karşı inhibisyon çapı 18 mm'den 24 mm'ye çıkmıştır. Diğer suşlardan *P. aeruginosa* BX, Mr1, A1 ve Mr2'nin siproflaksasine karşı zon çapları artmıştır. Suşların antibiyotik diskleri etrafındaki zon yarıçapı sırasıyla 6, 5, 4 ve 2 mm artmıştır. Bununla birlikte *P. aeruginosa* Mr2 ve *P. aeruginosa* NCTC 12924 tetrasikline karşı duyarlılık göstermiş ve uygulama öncesi sırasıyla 0 ve 20 mm olan zon çapları uygulama sonrası 12 ve 40 mm'ye yükselmiştir. *P. aeruginosa* NCTC 12924 uygulama öncesinde penisiline duyarlılık gösteren tek bakteri olmuştur. Uygulama sonrası da penisiline karşı göstermiş olduğu inhibisyon çapı artmış ve 28 mm olan zon çapı 40 mm'ye yükselmiştir. Gentamisine karşı ise hiçbir suş duyarlılık kazanmamıştır.

Grami vd. (2021) faj PA25'in *P. aeruginosa* ATCC 27853'ün antibiyotik direnci üzerine etkisini incelemişlerdir. Çalışmada kullanılan *P. aeruginosa* ATCC 27853, tetrasiklin, streptomisin ve spiramisine dirençli ve gentamisin ve rifampisine sınırlı duyarlılık göstermiştir. Ancak, bakteri süspansiyonlarına faj PA25 eklendiğinde, bakterinin antibiyotik diskine karşı göstermiş olduğu inhibisyon zon çapı artmıştır. Gentamisin duyarlılığının çapı 19'dan 21 mm'ye ve rifampisin duyarlılığının çapı 11,3'ten 20 mm'ye ve streptomisin inhibisyon zon çapı 20 mm'ye çıkmıştır. Araştırmacılar stres altındaki bakterinin antibiyotiklere daha duyarlı hale geldiğini bildirmişlerdir. *P. aeruginosa*'nın hücreye nüfuz eden farklı antibiyotikleri dışarı atan çoklu ilaç dışarı atma (Mex) sistemleri ile antibiyotikleri dışarı atması direnç mekanizmalarından biridir. Bir çalışmada *P. aeruginosa*'nın litik bir fajı olan OMK01, MexAB ve MexXY'nin dış zar porin M'sini (OprM) reseptör bağlanma yeri olarak kullanmıştır. Böylece faj saldırısına karşı bakteriyel direncin evriminin dışa akım pompası mekanizmasını değiştirdiğini ve çeşitli antibiyotik sınıflarından ilaçlara karşı duyarlılığın artmasına neden olduğunu göstermiştir (Chan vd., 2016).

Xuan vd. (2022) yaptıkları çalışmada faja direnç ile antibiyotiklere duyarlılık arasındaki takas mekanizmasına dair bilgiler sunmaktadır. Bu hipoteze dayanarak faj dirençliliği kazandırdıkları *P. aeruginosa* PAO1-R1 varyantının hem

gentamisine hem de polimiksin B'ye karşı daha duyarlı hale geldiğini bildirmişlerdir.



5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada *P. aeruginosa*'ya etkili fajların izolasyonu ve karakterizasyonu amaçlanmıştır. Bununla birlikte izole edilen fajların farklı koşullardaki stabiliteleri belirlenmiştir. Yine bu fajların *P. aeruginosa*'nın oluşturmuş olduğu biyofilme karşı etkinliği tez kapsamında incelenmiştir. Çalışma kapsamında izole edilen fajlardan RFLP analiz sonuçlarına birbirinden farklı olanlar seçilip bir faj karışımı hazırlanmıştır. Bu karışımın farklı gıda ortamlarında etkinliği belirlenmiştir. Ayrıca bu karışımın suşlar üzerindeki antibiyotik duyarlılığını etkileme durumları incelenmiştir. Bu analizlerden elde edilen sonuçlar şu şekildedir:

Öncelikli olarak fajların konakçı hücreleri olacak *P. aeruginosa* suşlarının izolasyonu yapılmıştır. Bir çiğ süt, 5 sebze, 1 tüketime hazır salata ve 1 atık su örneğinden 8 farklı *P. aeruginosa* suşu izole edilmiştir. Bununla birlikte *P. brassicacearum*, *P. monteilii*, *P. alcaligenes*, *P. tolaasii*, *P. plecoglossicida*, *P. fulva* türleri de izole edilmiş ve bu türler konakçı skalası için kullanılmıştır. Daha sonra faj izolasyonu yapılmıştır. Faj izolasyonu için laboratuvar kültür koleksiyonunda bulunan *P. aeruginosa* NCTC12924 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 standart suşları kullanılmıştır. Sonuç olarak çiğ süt (11), kanalizasyon suyu (3) ve toprak (1) örneklerinden 15 fajın izolasyonu sağlanmıştır. Bu fajların replikasyon parametreleri belirlenmiştir. Fajların latent dönemleri en az 5 dk. ve en fazla 30 dk. olarak bulunmuştur. Patlama büyüklükleri ise 10 ile 200 POB/hücre arasında bulunmuştur. Yine izole edilen fajların adsorpsiyon hızları $4,6 \times 10^{-7}$ (S22-2) ile $1,62 \times 10^{-8}$ (S21-1) mL/dk arasında bulunmuştur. Adsorpsiyon oranları ise en düşük %87 (S11-2) ve en yüksek %100 (S21-1) olarak bulunmuştur.

Fajların konakçı skalası ve EOP değerleri belirlenmiştir. Bu amaçla çalışma kapsamında izole edilen 8 farklı *P. aeruginosa* suşu, yine farklı türler olan *P. brassicacearum*, *P. monteilii*, *P. alcaligenes*, *P. tolaasii*, *P. plecoglossicida*, *P. fulva* üzerine fajların litik etkisinin olup olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca farklı cins bakteriler olan, *E. coli* O157:H7 ATCC 43888, *S. Enteritidis* NCTC 12694, *B. cereus* ATCC 10876, yerel izotlar olan *Proteus vulgaris*, *Lelliottia amnigena*, *Morganella morganii* bakterileri de test edilmiştir. Fajlar farklı cinsteki bakteri enfekte etmezken çalışmada kullanılan 8 yerel *P. aeruginosa* suşundan 2'sini enfekte edememiştir. Ayrıca ilginç olarak fajlar *P. brassicacearum*'a da litik etki

göstermiştir. Fajların farklı cinsteki bakterileri enfekte etmemesi spesifik konakçı aralığını göstermektedir. Bu da fajların *Pseudomonas* türlerini hedef alan uygulamalarda kullanılabilir olduğunu göstermektedir. Ancak kesin bir sonuca varmak için fajlar çalışmada kullanılmayan farklı cinste bakterilere karşı da denenebilir. Fajların tüm *P. aeruginosa* suşlarına etkili olmamasından dolayı bu fajlarla *P. aeruginosa*'ya karşı yapılabilecek biyokontrol/biyokoruma çalışmalarında fajların karışım halinde veya farklı antimikrobiyal ajanlarla kullanılması daha etkin olacaktır.

Bu tez kapsamında fajların farklı sıcaklık, pH ve NaCl içeren ortamlardaki stabilitesi belirlenmiştir. Fajlar 50-80°C aralığında titrelerindeki azalmaya rağmen varlığını sürdürmeyi devam ettirmiştir. Fajların asidik koşullardaki stabilitelerinin değerlendirilmesi için pH 2-pH 5 aralığındaki ortamlar hazırlanmış ve fajlar 25°C'de 1 saat boyunca belirlenen pH değerlerinde bekletilerek titreleri incelenmiştir. Fajlar, pH 2-pH 5 aralığında farklı oranlarda titre düşüşü gösterse dahi varlığını korumuştur. Bazik koşullarda ise pH 8-pH 12 aralığında çalışılmıştır. Yine fajların pH 8-pH 12 aralığında canlılığını koruduğu tespit edilmiştir. Stabilitate testleri kapsamında fajların %2-30 oranında NaCl içeren ortamlarda da canlılıklarını koruduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre fajların yüksek stabilite ve dayanıklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Bu da fajların gıda işleme proseslerinde farklı üretim koşullarına dayanabileceğini ve daha sonraki zamanlarda gıdalarda kullanılabilecek preparatlar için uygun fajlar olduğunu göstermektedir.

Tez kapsamında fajların antibiyofilm etkinliği tespit edilmiştir. Antibiyofilm etkinlikleri 3 farklı şekilde belirlenmiştir. İlk olarak *P. aeruginosa* C10 suşu ile 96 kuyucuklu plakada 24 saat boyunca biyofilm oluşumu sağlanmıştır. Ardından kuyucuklar farklı oranlarda fajlar ile muamele edilerek biyofilm degradasyonu sağlanmıştır. Fajlar olgun biyofilmlerin giderilmesinde MOI 1 ve 10 değerlerinde etkili olmamıştır. Ancak faj oranının artması ile 9 faj biyofilm giderimde etkili olmuştur. En yüksek oran ise MOI 1000 değerinde %29 oranında sağlanmıştır. Antibiyofilm çalışmaları kapsamında diğer bir deneyde faj ve konakçı bakterinin eş zamanlı olarak polistiren yüzeye inoküle edilmiş ve bu yüzeyde 24 saat sonunda elde edilen biyofilm inhibisyon oranı % olarak verilmiştir. Faj ve bakterinin eşit oranlarda inoküle edildiği MOI 1 değerinde en yüksek inhibisyon oranı %25, MOI 10 değerinde en yüksek %42, MOI 100 ve 1000 değerinde ise en

yüksek inhibisyon oranlarının %72 bulunmuştur. Antibiyofilm çalışmaları kapsamında faj tutundurulan polistiren bir yüzeyde konakçı bakteriler tarafından biyofilm oluşumu sağlanmıştır. Faj bulunan bir yüzeyde bakterilerin biyofilm oluşumunun hangi düzeyde engellendiği takip edilmiştir. Fajlardan MOI 1 değerinde en yüksek %39 oranında, MOI 10 değerinde en düşük %32, en yüksek %64; MOI 100 değerinde ise en düşük %13, en yüksek %35; MOI 1000 değerinde ise en düşük %31, en yüksek %46 oranında biyofilm oluşumu engellenmiştir.

Bu çalışmada fajlar tek başlarına antibiyofilm çalışmalarında %100 etkili bulunamamıştır. Ancak elde edilen sonuçlar fajların belli bir oranda antibiyofilm etkinliğinin olduğunu göstermiştir. Bu nedenle fajlar farklı ajanlarla birlikte biyolojik materyaller olarak gıda işleme yüzeylerinde kullanılabilir niteliktedir. Ayrıca fajların antibiyofilm etkinliğinin artırılması için karışım halindeki uygulanması sonraki çalışmaların konusu olabilir. *P. aeruginosa*'nın içme suyu arıtma tesislerinde bakteriyel biyofilmler oluşturduğu ve filtreleri tıkadığı bilinmektedir. Bu filtrelerde oluşan biyofilmi gidermek için pahalı yıkama veya klorlama işlemi yapılmaktadır. Fajların antibiyofilm etkilerinin olması fajların bu uygulamaların yerine kullanılabilir olduğunu düşündürmüştür.

Bu çalışmada hazır ticari kit kullanılarak faj DNA'ları izole edilmiştir. İzole edilen DNA'lar ve *Sma*I, *Nde*I, *Eco*RI, *Eco*RV, *Xho*I restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. RFLP analizinin sonucuna göre S9-2, S11-2, S22-2, D1, BK1-1, BK2, S6, S16 fajları farklı olarak seçilmiştir. Bu fajlar sonraki analizlerde kullanılacak olan faj karışımının hazırlanmasında kullanılmıştır. Aynı zamanda fajların enzim kesim profiline göre yaklaşık genom büyüklüğü hesaplanmıştır. Buna göre fajların *Sma*I enzim kesimine göre genom büyüklükleri 40843 bç (S21-2) ile 66663 bç (D1) arasında bulunmuştur. *Xho*I enzim kesimine göre ise 29741 bç (S22-1) ile 42802 bç (D1) arasında bulunmuştur. *Eco*RI enzim kesimine göre en küçük genom boyutu yaklaşık 44322 bç (S21-2) ve en büyük genom boyutu yaklaşık 88059 bç (S21-1) bulunmuştur. *Eco*RV enzim kesimine göre en küçük genom boyutu yaklaşık 27845 bç (S9-2) ve en büyük genom boyutu yaklaşık 75622 bç (S22-2) bulunmuştur. Dolayısıyla çoklu enzim kesimin genomları birbirinden ayırmada ve yaklaşık genom büyüklüğü hesaplamada tek enzim kullanımına göre daha sağlıklı sonuçlar verdiği düşünülmüştür.

P. aeruginosa'ya etkili fajlar genetik materyal ve morfolojik olarak çeşitlilik göstermektedir. Bu çalışmada izole edilen 8 fajın TEM mikrograflarına

bakıldığında kısa kuyruklu olduğu görülmektedir. Fajlara ait ölçülen kafa çaplarının 42,6 nm ile 69,6 nm arasında değiştiği bulunmuştur. Kuyruk uzunlukları ise 10 nm ile 41,6 nm arasında bulunmuştur. Faj S9-2'nin net bir mikrografı elde edilememiştir.

Fajların besiyeri ortamında MOI 1, 10 ve 100 değerlerinde litik spektrumu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre MOI arttıkça fajların etkisinin arttığı görülmektedir. Fajların konakçı bakteri olan *P. aeruginosa* C10 üzerindeki litik etkisi incelendikten sonra RFLP analizine göre seçilen 8 faj (S9-2, S11-2, S22-2, D1, BK1-1, BK2, S6, S16) ile bir faj karışımı hazırlanmıştır. Yine fajların etkili olduğu bakterilerden (*P. aeruginosa* NCTC12924, *P. aeruginosa* C10, *P. aeruginosa* SLT, *P. aeruginosa* R1, *P. aeruginosa* Mr1, *P. aeruginosa* Mr2, *P. aeruginosa* A1, *P. aeruginosa* BX) bakteri karışımı hazırlanmış ve bu iki karışımın litik spektrumu belirlenmiştir. Faj karışımı MOI 1 ve MOI 10 değerinde bakteri karışımının ancak logaritmik evrede yoğunluğunun artmasını engellemiştir. Bununla birlikte MOI 100'de ise bakteri karışımının tamamen inhibe edilmesi sağlanmıştır. Dolayısıyla fajların gıda denemelerinde kullanılabilmesi için önce bu çalışmada da gerçekleştirildiği gibi en uygun ve en yüksek inhibisyon sağlanan MOI değeri bulunmalı, hedef bakterinin çoğalmasına fırsat verilmeyecek düzeyde preparatlar hazırlanmalıdır.

Fajların farklı gıda ortamlarında etkinliğinin belirlenmesi amacıyla içme suyu, yağsız süt ve marul örneklerinde denemeler yapılmıştır. Denemelerde içme suyu MOI 1 örneğinde kontrol örneğine göre bakteri sayısı 1,31 log daha az bulunmuşken; MOI 10'da kontrol örneğine göre 2 log bir azalma elde edilmiştir. MOI 100 değerinde su örneğindeki bakterilerin faj karışımı ile tamamen inhibe edilmesi sağlanmıştır. Süt örneklerinde MOI 1 ve MOI 10 örneklerinde fajlar yüksek inhibisyon etkinliği gösterememişken MOI 100 değerinde yağsız sütteki bakteriler faj karışımı ile tamamen inhibe edilmiştir. Çalışmamızda marul denemesinde 24 saat sonunda kontrol örneğinin bakteri yükünün 7,6 log KOB/g seviyesine yükseldiği; MOI 1, MOI 10 ve MOI 100 oranında faj uygulanan örneklerde ise bakteri sayılarının sırasıyla 7,06; 6,53 ve 5,77 log KOB/g olduğu bulunmuştur. Marul örneklerinde tam bir inhibisyon elde edilemese de MOI 100 örneğinde kontrol örneğine göre bakteri sayısı artışının yaklaşık 2 log KOB/g engellendiği görülmektedir.

Bu çalışmada fajların konağın antibiyotik direnci üzerinde etkisi olup olmadığı incelenmiştir. Suşlar 48 saat boyunca faj karışımına tabi tutulmuş ve süre sonunda suşların antibiyotik duyarlılıkları belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan suşların streptomisine, siproflaksasine, tetrasikline ve penisiline karşı farklı düzeylerde duyarlılık kazandığı görülmüştür. Suşların antibiyotiklere duyarlılık kazanmasından dolayı özellikle antibiyotik direnci ile ön plana çıkan *P. aeruginosa*'nın tedavisinde ve inhibisyonunun hedeflendiğı çalışmalarda bu fajların antibiyotiklerle birlikte tedavi amaçlı kullanılabileceğı ortaya konulmuştur.



KAYNAKLAR

- Abdelaziz, M. N. S., Maung, A. T., El-Telbany, M., Lwin, S. Z. C., Mohammadi, T. N., Zayda, M., ... & Miyamoto, T. (2024). Applications of bacteriophage in combination with nisin for controlling multidrug-resistant *Bacillus cereus* in broth and various food matrices. *Food Research International*, 114685.
- Abdelghafar, A., El-Ganiny, A., Shaker, G., & Askoura, M. (2023a). Isolation of a bacteriophage targeting *Pseudomonas aeruginosa* and exhibits a promising in vivo efficacy. *AMB Express*, 13(1), 79.
- Abdelghafar, A., El-Ganiny, A., Shaker, G., & Askoura, M. (2023b). A novel lytic phage exhibiting a remarkable in vivo therapeutic potential and higher antibiofilm activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 42(10), 1207-1234.
- Abedon, S. T. (2015). Ecology of anti-biofilm agents II: bacteriophage exploitation and biocontrol of biofilm bacteria. *Pharmaceuticals*, 8(3), 559-589.
- Abou Zeid, A. A., Swelim, M. A., Reda, F. M., Abd El Haveez, A. M., & Nasr-Eldin, M. A. (2021). Effectiveness of four lytic phages against biofilm-producing and multidrug-resistant *Escherichia coli*. *Benha Journal of Applied Sciences*, 6(1), 53-65.
- Abubakar, A., Abioye, O. P., Aransiola, S. A., Maddela, N. R., & Prasad, R. (2024). Crude oil biodegradation potential of lipase produced by *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hydrocarbon contaminated soil. *Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, 6, 26-32.
- Acar Soykut, E. (2007). *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus bulgaricus* virulent fajlarının replikasyon parametreleri, kapsid protein profilleri ve restriksiyon endonükleaz analizleri esas alınarak tanımlanmaları ve sınıflandırılmaları. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Ackermann, H. W., & Berthiaume, L. (2023). *Atlas of virus diagrams*. CRC Press.
- Adnan, M., Shah, M. R. A., Jamal, M., Jalil, F., Andleeb, S., Nawaz, M. A., ... & Kamil, A. (2020). Isolation and characterization of bacteriophage to control multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* planktonic cells and biofilm. *Biologicals*, 63, 89-96.
- Ahmadi, H., Radford, D., Kropinski, A. M., Lim, L. T., & Balamurugan, S. (2017). Thermal-stability and reconstitution ability of *Listeria* phages P100 and A511. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2375.
- Alimi, B. A., Lawal, R., & Odetunde, O. N. (2022). Food safety and microbiological hazards associated with retail meat at butchery outlets in north-central Nigeria. *Food Control*, 139, 109061.
- Alipour-Khezri, E., Skurnik, M., & Zarrini, G. (2024). *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages and their clinical applications. *Viruses*, 16(7), 1051.
- Allydice-Francis, K., & Brown, P. D. (2012). Diversity of antimicrobial resistance and virulence determinants in *Pseudomonas aeruginosa* associated with fresh vegetables. *International Journal of Microbiology*, 2012.
- Al-Saffar, M. F., & Jarallah, E. M. (2019). Isolation and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* from Babylon province. *Biochemical & Cellular Archives*, 19(1).

- Amankwah, S., Adisu, M., Gorems, K., Abdella, K., & Kassa, T. (2022). Assessment of phage-mediated inhibition and removal of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* biofilm on medical implants. *Infection and Drug Resistance*, 2797-2811.
- Anany, H., Brovko, L., el Dougdoug, N. K., Sohar, J., Fenn, H., Alasiri, N., Jabrane, T., Mangin, P., Monsur Ali, M., Kannan, B., Filipe, C. D. M., & Griffiths, M. W. (2017). Print to detect: a rapid and ultrasensitive phage-based dipstick assay for foodborne pathogens. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2017 410:4, 410(4), 1217–1230.
- Arumugam, S. N., Rudraradhya, A. C., Sadagopan, S., Sukumaran, S., Sambasivam, G., & Ramesh, N. (2018). Analysis of susceptibility patterns of *Pseudomonas aeruginosa* and isolation, characterization of lytic bacteriophages targeting multi drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 11(2), 1105-1117.
- Au, A., Lee, H., Ye, T., Dave, U., & Rahman, A. (2021). Bacteriophages: combating antimicrobial resistance in food-borne bacteria prevalent in agriculture. *Microorganisms*, 10(1), 46.
- Azam, M. W., & Khan, A. U. (2019). Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. *Drug Discovery Today*, 24(1), 350-359.
- Badillo-Larios, N. S., Turrubiarres-Martínez, E. A., Layseca-Espinosa, E., González-Amaro, R., Pérez-González, L. F., & Niño-Moreno, P. (2024). Interesting Cytokine Profile Caused by Clinical Strains of *Pseudomonas aeruginosa* MDR Carrying the *exoU* Gene. *International Journal of Microbiology*, 2024(1), 2748842
- Bassetti, M., Vena, A., Croxatto, A., Righi, E., & Guery, B. (2018). How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs in Context*, 7.
- Bhuiya, M., Sarkar, M. K., Sohag, M. H., Ali, H., Roy, C. K., Akther, L., & Sarker, A. F. (2018). Enumerating antibiotic susceptibility patterns of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from different sources in Dhaka City. *The Open Microbiology Journal*, 12, 172.
- Bintsis, T. (2017). Foodborne pathogens. *AIMS Microbiology*, 3(3), 529.
- Bisht, K., Moore, J. L., Caprioli, R. M., Skaar, E. P., & Wakeman, C. A. (2021). Impact of temperature-dependent phage expression on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *npj Biofilms and Microbiomes*, 7(1), 22.
- Bogun, K., Peh, E., Meyer-Kühling, B., Hartmann, J., Hirnet, J., Plötz, M., & Kittler, S. (2024). Investigating bacteriophages as a novel multiple-hurdle measure against *Campylobacter*: field trials in commercial broiler plants. *Scientific Reports*, 14(1), 3182.
- Bradley, D. E. (1967). Ultrastructure of bacteriophage and bacteriocins. *Bacteriological reviews*, 31(4), 230.
- Brás, A., Braz, M., Martinho, I., Duarte, J., Pereira, C., & Almeida, A. (2024). Effect of bacteriophages against biofilms of *Escherichia coli* on food processing surfaces. *Microorganisms*, 12(2), 366.
- Brié, A., Bertrand, I., Meo, M., Boudaud, N., & Gantzer, C. (2016). The effect of heat on the physicochemical properties of bacteriophage MS2. *Food and Environmental Virology*, 8, 251-261.
- Bruynoghe, R. (1927). The harben lectures, 1927. Lecture 1. The Twort-d'Herelle phenomenon. *The Journal of State Medicine (1912-1937)*, 35(11), 621-636.
- Brüssow, H., & Hendrix, R. W. (2002). Phage genomics: small is beautiful. *Cell*, 108(1), 13-16.

- Caldeira, J. C., & Peabody, D. S. (2007). Stability and assembly in vitro of bacteriophage PP7 virus-like particles. *Journal of Nanobiotechnology*, 5, 1-10.
- Carlton, R. M. (1999). Phage therapy: past history and future prospects. *Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis-English Edition*, 47, 267-274.
- Cha, Y., Son, B., & Ryu, S. (2019). Effective removal of staphylococcal biofilms on various food contact surfaces by *Staphylococcus aureus* phage endolysin LysCSA13. *Food Microbiology*, 84, 103245.
- Chan, B. K., Sistro, M., Wertz, J. E., Kortright, K. E., Narayan, D., & Turner, P. E. (2016). Phage selection restores antibiotic sensitivity in MDR *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Reports*, 6(1), 26717.
- Chaudhary, V., Kajla, P., Lather, D., Chaudhary, N., Dangi, P., Singh, P., & Pandiselvam, R. (2024). Bacteriophages: a potential game changer in food processing industry. *Critical Reviews in Biotechnology*, 1-25.
- Chegini, Z., Khoshbayan, A., Taati Moghadam, M., Farahani, I., Jazireian, P., & Shariati, A. (2020). Bacteriophage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: a review. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 19, 1-17.
- Chen, Y., Yang, L., Yang, D., Song, J., Wang, C., Sun, E., ... & Wu, B. (2020). Specific integration of temperate phage decreases the pathogenicity of host bacteria. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 14.
- Chibani, C. M., Farr, A., Klama, S., Dietrich, S., & Liesegang, H. (2019). Classifying the unclassified: a phage classification method. *Viruses*, 11(2), 195.
- Costa, A. R., van den Berg, D. F., Esser, J. Q., Muralidharan, A., van den Bossche, H., Bonilla, B. E., ... & Brouns, S. J. (2024). Accumulation of defense systems in phage-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Science Advances*, 10(8), eadj0341.
- Costa, M. J., Pastrana, L. M., Teixeira, J. A., Sillankorva, S. M., & Cerqueira, M. A. (2023). Bacteriophage delivery systems for food applications: Opportunities and perspectives. *Viruses*, 15(6), 1271.
- Damar Çelik, D., Karaynir, A., Doğan, H. S., Bozdoğan, B., & Çelik, B. O. (2024). Characterization and genomic analysis of PA-56 *Pseudomonas* phage from Istanbul, Turkey: Antibacterial and antibiofilm efficacy alone and with antibiotics. *Heliyon*, 10(17).
- Danis-Włodarczyk, K., Olszak, T., Arabski, M., Wasik, S., Majkowska-Skrobek, G., Augustyniak, D., ... & Drulis-Kawa, Z. (2015). Characterization of the newly isolated lytic bacteriophages KTN6 and KT28 and their efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *PloS One*, 10(5), e0127603.
- Didamony, G. E., Askora, A., & Shehata, A. A. (2015). Isolation and characterization of T7-like lytic bacteriophages infecting multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Egypt. *Current Microbiology*, 70, 786-791.
- Diggle, S. P., & Whiteley, M. (2020). Microbe Profile: *Pseudomonas aeruginosa*: opportunistic pathogen and lab rat. *Microbiology*, 166(1), 30-33.
- Don, P. A., & Van Den Ende, M. (1950). A preliminary study of the bacteriophages of *Pseudomonas aeruginosa*. *Epidemiology & Infection*, 48(2), 196-214.

- Edward, E. A., El Shehawy, M. R., Abouelfetouh, A., & Aboulmagd, E. (2023). Prevalence of different virulence factors and their association with antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Egypt. *BMC Microbiology*, 23(1), 161.
- Elgawish, A. M., Alkhoudher, T. K., Abu-Elsaoud, A. M., & El Kazzaz, W. M. (2023). Isolation and molecular characterization of *Pseudomonas aeruginosa* lytic bacteriophages as a potential therapeutic alternative to traditional antibiotics. *Journal of Advanced Veterinary Research*, 13(4), 568-576.
- Ellis, E. L., & Delbruck, M. (1939). The growth of bacteriophage. *The Journal of General Physiology*, 22(3), 365-384.
- El-Wafai, N. A., Al-zaban, M. I., Ahmed, A. E., Sara, A. E., Bedrous, V. S., Mousa, M. A., & Akl, B. A. (2022). Phenotypic and molecular characterization of two lytic bacteriophages against multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Saudi Journal of Biological Sciences*.
- Encu, Ş. B., Yıldırım, A., Akbaş, S., Çakır, İ., & Soykut, E. A. (2024). Taze Dilimlenmiş Meyvelerde *Salmonella* Typhimurium'un Fajlarla Biyokontrolü. *Gıda*, 49(2), 370-384.
- Evilevitch, A., Roos, W. H., Ivanovska, I. L., Jeembaeva, M., Jönsson, B., & Wuite, G. J. (2011). Effects of salts on internal DNA pressure and mechanical properties of phage capsids. *Journal of Molecular Biology*, 405(1), 18-23.
- Farlow, J., Freyberger, H. R., He, Y., Ward, A. M., Rutvisuttinunt, W., Li, T., ... & Filippov, A. A. (2020). Complete genome sequences of 10 phages lytic against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology Resource Announcements*, 9(29), 10-1128.
- Fei, B., Li, D., Liu, X., You, X., Guo, M., Ren, Y., ... & Li, Y. (2023). Characterization and genomic analysis of a broad-spectrum lytic phage HZ2201 and its antibiofilm efficacy against *Pseudomonas aeruginosa*. *Virus Research*, 335, 199184.
- Filiatrault, M. J., Picardo, K. F., Ngai, H., Passador, L., & Iglewski, B. H. (2006). Identification of *Pseudomonas aeruginosa* genes involved in virulence and anaerobic growth. *Infection and Immunity*, 74(7), 4237-4245.
- Fister, S., Robben, C., Witte, A. K., Schoder, D., Wagner, M., & Rossmannith, P. (2016). Influence of environmental factors on phage–bacteria interaction and on the efficacy and infectivity of phage P100. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1152.
- Franzetti, L., & Scarpellini, M. (2007). Characterisation of *Pseudomonas* spp. isolated from foods. *Annals of Microbiology*, 57, 39-47.
- Gabisoniya, T. G., Loladze, M. Z., Nadiradze, M. M., Chakhunashvili, N. K., Alibegashvili, M. G., Tamarashvili, N. G., & Pushkina, V. A. (2016). Effects of bacteriophages on biofilm formation by strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 52, 293-297.
- García, P., Rodríguez, L., Rodríguez, A., & Martínez, B. (2010). Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. *Trends in Food Science & Technology*, 21(8), 373-382.
- García-Cruz, J. C., Rebollar-Juarez, X., Limones-Martinez, A., Santos-Lopez, C. S., Toya, S., Maeda, T., ... & García-Contreras, R. (2024). Resistance against two lytic phage variants attenuates virulence and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13, 1280265.

- Gavric, D., & Knezevic, P. (2022). Filamentous *Pseudomonas* phage Pf4 in the context of therapy-inducibility, infectivity, lysogenic conversion, and potential application. *Viruses*, 14(6), 1261.
- Ge, H., Fu, S., Guo, H., Hu, M., Xu, Z., Zhou, X., & Chen, X. (2022). Application and challenge of bacteriophage in the food protection. *International Journal of Food Microbiology*, 380, 109872.
- Gellatly, S. L., & Hancock, R. E. (2013). *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens and Disease*, 67(3), 159-173.
- Ghanbari, M., Jami, M., Domig, K. J., & Kneifel, W. (2013). Seafood biopreservation by lactic acid bacteria—a review. *LWT-Food Science and Technology*, 54(2), 315-324.
- Ghosh, D., Mangar, P., Choudhury, A., Kumar, A., Saha, A., Basu, P., & Saha, D. (2024). Characterization of a hemolytic and antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain S3 pathogenic to fish isolated from Mahananda River in India. *Plos One*, 19(3), e0300134.
- Giri, N. (2021). Bacteriophage structure, classification, assembly and phage therapy. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 18(2), 239-250.
- Grami, E., Salhi, N., Sealey, K. S., Hafiane, A., Ouzari, H. I., & Saidi, N. (2021). Siphoviridae bacteriophage treatment to reduce abundance and antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in wastewater. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 1-10.
- Guan, J., Peng, C., Shang, J., Tang, X., & Sun, Y. (2023). PhaGenus: Genus-level classification of bacteriophages using a transformer model. *Briefings in Bioinformatics*, 24(6), 408.
- Guo, Y., Chen, P., Lin, Z., & Wang, T. (2019). Characterization of two *Pseudomonas aeruginosa* viruses vB_PaeM_SCUT-S1 and vB_PaeM_SCUT-S2. *Viruses*, 11(4), 318.
- Guttman, B., Raya, R., & Kutter, E. (2005). Basic phage biology. *Bacteriophages: Biology and Applications*, 4, 30-63.
- Halkman, A. K. (2019). Gıda mikrobiyolojisi. *Başak Matb. ve Tanıtım Hiz. Ltd, Ankara. PP*, 187.
- Han, F., Li, J., Lu, Y., Wen, J., Zhang, Z., & Sun, Y. (2014). Isolation and characterization of a virulent bacteriophage ϕ PA-HF17 of *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal Bioautomation*, 18(3), 241.
- Harada, L. K., Silva, E. C., Rossi, F. P., Cieza, B., Oliveira, T. J., Pereira, C., ... & Balcão, V. M. (2022). Characterization and in vitro testing of newly isolated lytic bacteriophages for the biocontrol of *Pseudomonas aeruginosa*. *Future Microbiology*, 17(2), 111-141.
- Hassanein, W. A. A. (2014). Characterization and immunological properties of *Pseudomonas aeruginosa* hemolytic phospholipase C. *Egyptian Journal of Botany*, 54(1), 49-70.
- Hatfull, G. F., & Hendrix, R. W. (2011). Bacteriophages and their genomes. *Current Opinion in Virology*, 1(4), 298-303.
- Haynes, W. C. (1951). *Pseudomonas aeruginosa*—its characterization and identification. *Microbiology*, 5(5), 939-950.
- Heineman, R. H., & Bull, J. J. (2007). Testing optimality with experimental evolution: Lysis time in a bacteriophage. *Evolution*, 61(7), 1695-1709.

- Hong, Q., Chang, R. Y. K., Assafiri, O., Morales, S., & Chan, H. K. (2024). Optimizing in vitro phage-ciprofloxacin combination formulation for respiratory therapy of multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. *International Journal of Pharmaceutics*, 652, 123853.
- Hoogstraten, D., Qiao, X., Sun, Y., Hu, A., Onodera, S., & Mindich, L. (2000). Characterization of $\Phi 8$, a bacteriophage containing three double-stranded RNA genomic segments and distantly related to $\Phi 6$. *Virology*, 272(1), 218-224.
- Horcajada, J. P., Montero, M., Oliver, A., Sorlí, L., Luque, S., Gómez-Zorrilla, S., ... & Grau, S. (2019). Epidemiology and treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(4), 10-1128.
- Hosseinidoust, Z., Tufenkji, N., & van de Ven, T. G. (2013). Formation of biofilms under phage predation: considerations concerning a biofilm increase. *Biofouling*, 29(4), 457-468.
- Hu, Z., Zhou, L., Tao, X., Li, P., Zheng, X., Zhang, W., & Tan, Z. (2024). Antimicrobial resistance survey and whole-genome analysis of nosocomial *P. aeruginosa* isolated from eastern Province of China in 2016–2021. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 23(1), 12.
- Huang, J., Zhai, L., Wang, J., Sun, X., Wang, B., & Wei, Z. (2024a). An evaluation of the sensitivity and applicability of a droplet digital polymerase chain reaction assay to simultaneously detect *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fragi* in Foods. *Foods*, 13(10), 1453.
- Huang, Z., Yuan, X., Zhu, Z., Feng, Y., Li, N., Yu, S., ... & Ding, Y. (2024b). Isolation and characterization of *Bacillus cereus* bacteriophage DZ1 and its application in foods. *Food Chemistry*, 431, 137128.
- Jamal, M., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M. A., Hussain, T., ... & Das, C. R. (2017). Isolation and characterization of a bacteriophage and its utilization against multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*-2995. *Life Sciences*, 190, 21-28.
- Jayaseelan, S., Ramaswamy, D., & Dharmaraj, S. (2014). Pyocyanin: production, applications, challenges and new insights. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30, 1159-1168.
- Jiang, Y. H., Liu, J. Q., Zhao, C. Y., Yu, S., Sun, Y. B., Shi, H. Y., & Huang, H. L. (2020). Isolation and genome sequencing of a novel *Pseudomonas aeruginosa* phage PA-YS35. *Current Microbiology*, 77, 123-128.
- Jończyk, E., Kłak, M., Międzybrodzki, R., & Górski, A. (2011). The influence of external factors on bacteriophages. *Folia Microbiologica*, 56, 191-200.
- Jończyk-Matysiak, E., Łodej, N., Kula, D., Owczarek, B., Orwat, F., Międzybrodzki, R., ... & Górski, A. (2019). Factors determining phage stability/activity: challenges in practical phage application. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 17(8), 583-606.
- Jurado-Martín, I., Sainz-Mejías, M., & McClean, S. (2021). *Pseudomonas aeruginosa*: an audacious pathogen with an adaptable arsenal of virulence factors. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 3128.
- Kamyab, H., Torkashvand, N., Shahverdi, A. R., Khoshayand, M. R., Sharifzadeh, M., & Sepehrizadeh, Z. (2023). Isolation, characterization, and genomic analysis of vB_PaeS_TUMS_P81, a lytic bacteriophage against *Pseudomonas aeruginosa*. *Virus Genes*, 59(1), 132-141.

- Kamyab, H., Torkashvand, N., Shahverdi, A. R., Khoshayand, M. R., Sharifzadeh, M., & Sepehrizadeh, Z. (2024). Characterization of bacteriophage vB_PaeS_TUMS_P6 infecting *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medical Bacteriology*, 12(1), 59-68.
- Karthik, K., Muneeswaran, N. S., Manjunathachar, H. V., Gopi, M., Elamurugan, A., & Kalaiyarasu, S. (2014). Bacteriophages: effective alternative to antibiotics. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 2(3S), 1-7.
- Kauppinen, A., Siponen, S., Pitkänen, T., Holmfeldt, K., Pursiainen, A., Torvinen, E., & Miettinen, I. T. (2021). Phage biocontrol of *Pseudomonas aeruginosa* in water. *Viruses*, 13(5), 928.
- Kazi, M., & Annapure, U. S. (2016). Bacteriophage biocontrol of foodborne pathogens. *Journal of Food Science and Technology*, 53(3), 1355-1362.
- King, A., & Phillips, I. (1978). The identification of pseudomonads and related bacteria in a clinical laboratory. *Journal of Medical Microbiology*, 11(2), 165-176.
- Knezevic, P., Kostanjsek, R., Obreht, D., & Petrovic, O. (2009). Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* specific phages with broad activity spectra. *Current Microbiology*, 59, 173-180.
- Knezevic, P., Adriaenssens, E. M., & ICTV Report Consortium. (2021). ICTV virus taxonomy profile: *Inoviridae*. *Journal of General Virology*, 102(7), 001614.
- Kovacs, C. J., Rapp, E. M., Rankin, W. R., McKenzie, S. M., Brasko, B. K., Hebert, K. E., ... & Barnhill, J. C. (2024). Combinations of bacteriophage are efficacious against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and enhance sensitivity to carbapenem antibiotics. *Viruses*, 16(7), 1000.
- Kropinski, A. M. (2009). Measurement of the rate of attachment of bacteriophage to cells. *Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions*, 151-155.
- Kropinski, A. M. (2000). Sequence of the genome of the temperate, serotype-converting, *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage D3. *Journal of Bacteriology*, 182(21), 6066-6074.
- Krylov, V. N., Smirnova, T. A., Minenkova, I. B., Plotnikova, T. G., Zhazikov, I., & Khrenova, E. A. (1984). *Pseudomonas* bacteriophage contains an inner body in its capsid. *Canadian Journal of Microbiology*, 30(6), 758-762.
- Kutter, E., & Sulakvelidze, A. (2004). *Bacteriophages: Biology and applications*. CRC Press.
- Kuttner, A. G. (1923). Bacteriophage phenomena. *Journal of Bacteriology*, 8(1), 49-101.
- Kwiatek, M., Mizak, L., Parasion, S., Gryko, R., Olender, A., & Niemcewicz, M. (2015). Characterization of five newly isolated bacteriophages active against *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Folia Microbiologica*, 60, 7-14.
- LaBauve, A. E., & Wargo, M. J. (2012). Growth and laboratory maintenance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Current protocols in Microbiology*, 25(1), 6E-1.
- Lalucat, J., Mulet, M., Gomila, M., & García-Valdés, E. (2020). Genomics in bacterial taxonomy: Impact on the genus *Pseudomonas*. *Genes*, 11(2), 139.
- Lambert, P. (2002). Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 95(Suppl 41), 22.

- Lambuk, F., Mazlan, N., Lesen, D., Nillian, E., & Thung, T. Y. (2024). *Staphylococcus aureus* lytic bacteriophage: Isolation and application evaluation. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 1-9.
- Langendonk, R. F., Neill, D. R., & Fothergill, J. L. (2021). The building blocks of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Implications for current resistance-breaking therapies. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 665759.
- Langsrud, S., Moen, B., Møretør, T., Løype, M., & Heir, E. (2016). Microbial dynamics in mixed culture biofilms of bacteria surviving sanitation of conveyor belts in salmon-processing plants. *Journal of Applied Microbiology*, 120(2), 366-378.
- Lee, J., Kim, D., & Kim, M. (2023). The application of adaptively evolved thermostable bacteriophage ΦYMFM0293 to control *Salmonella* spp. in poultry skin. *Food Research International*, 167, 112665.
- Leiman, P. G., Kanamaru, S., Mesyanzhinov, V. V., Arisaka, F., & Rossmann, M. G. (2003). Structure and morphogenesis of bacteriophage T4. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 60, 2356-2370.
- Lerdsittikul, V., Thongdee, M., Chaiwattananruengpaisan, S., Atitthep, T., Apiratwarasakul, S., Withatanung, P., ... & Korbsrisate, S. (2022). A novel virulent *Litunavirus* phage possesses therapeutic value against multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Reports*, 12(1), 21193.
- Li, D., Li, Y., Li, P., Han, Q., Zhang, T., Yang, B., ... & Yang, H. (2022). Phage phiZ98: A novel tri-segmented dsRNA cystovirus for controlling *Pseudomonas* strains with defective lipopolysaccharides in foods. *Food Research International*, 162, 112197.
- Li, L., Zhong, Q., Zhao, Y., Bao, J., Liu, B., Zhong, Z., ... & Le, S. (2023b). First-in-human application of double-stranded RNA bacteriophage in the treatment of pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Microbial Biotechnology*, 16(4), 862-867.
- Li, X., Gu, N., Huang, T. Y., Zhong, F., & Peng, G. (2023a). *Pseudomonas aeruginosa*: A typical biofilm forming pathogen and an emerging but underestimated pathogen in food processing. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1114199.
- Liao, C., Huang, X., Wang, Q., Yao, D., & Lu, W. (2022). Virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* and antivirulence strategies to combat its drug resistance. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 926758.
- Lin, D. M., Koskella, B., & Lin, H. C. (2017). Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*, 8(3), 162.
- Liu, L., Wang, B., Huang, A., Zhang, H., Li, Y., & Wang, L. (2024a). Bio ical characteristics of the bacteriophage LDT325 and its potential application against the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1370332.
- Liu, W., Wu, Y., Wang, H., Wang, H., & Zhou, M. (2024b). Isolation and biological characteristics of a novel phage and its application to control *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish meat. *Foodborne Pathogens and Disease*.
- Luiten, R. G., Putterman, D. G., Schoenmakers, J. G., Konings, R. N., & Day, L. A. (1985). Nucleotide sequence of the genome of Pf3, an IncP-1 plasmid-specific filamentous bacteriophage of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Virology*, 56(1), 268-276.

- Mahgoub, S. A., Muhammad, M. I., Abd-Elsalam, S. T., Alkhazindar, M. M., & Abdel-Shafy, H. I. (2020). Isolation and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus faecalis* lytic bacteriophages from wastewater for controlling multidrug resistant bacterial strains. *Plant Archive*, 20, 450-464.
- Manohar, P., Loh, B., Turner, D., Tamizhselvi, R., Mathankumar, M., Elangovan, N., ... & Leptihn, S. (2024). In vitro and in vivo evaluation of the biofilm-degrading *Pseudomonas* phage Motto, as a candidate for phage therapy. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1344962.
- Mäntynen, S., Salomaa, M. M., & Poranen, M. M. (2023). Diversity and current classification of dsRNA bacteriophages. *Viruses*, 15(11), 2154.
- Maung, A. T., Abdelaziz, M. N. S., Mohammadi, T. N., Lwin, S. Z. C., El-Telbany, M., Zhao, J., ... & Miyamoto, T. (2024). Single and combined application of bacteriophage and cinnamon oils against pathogenic *Listeria monocytogenes* in milk and smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*, 421, 110797.
- Melo, L. D., Oliveira, H., Pires, D. P., Dabrowska, K., & Azeredo, J. (2020). Phage therapy efficacy: a review of the last 10 years of preclinical studies. *Critical Reviews in Microbiology*, 46(1), 78-99.
- Meneses, L., Brandao, A. C., Coenye, T., Braga, A. C., Pires, D. P., & Azeredo, J. (2023). A systematic review of the use of bacteriophages for in vitro biofilm control. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 42(8), 919-928.
- Mesyanzhinov, V. V., Robben, J., Grymonprez, B., Kostyuchenko, V. A., Bourkaltseva, M. V., Sykilinda, N. N., ... & Volckaert, G. (2002). The genome of bacteriophage ϕ KZ of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Molecular Biology*, 317(1), 1-19.
- Miller, E. S., Kutter, E., Mosig, G., Arisaka, F., Kunisawa, T., & Rüger, W. (2003). Bacteriophage T4 genome. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(1), 86-156.
- Miranda, C. C., De Filippis, I., Pinto, L. H., Coelho-Souza, T., Bianco, K., Cacci, L. C., ... & Clementino, M. M. (2015). Genotypic characteristics of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from hospital wastewater treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, 118(6), 1276-1286.
- Monica, C. (2002). District Laboratory Practice In Tropical Countries. Part II page 136–141.
- Monk, A. B., Rees, C. D., Barrow, P., Hagens, S., & Harper, D. R. (2010). Bacteriophage applications: where are we now? *Letters in Applied Microbiology*, 51(4), 363-369.
- Morales-Espinosa, R., Delgado, G., Espinosa-Camacho, F., Flores-Alanis, A., Rodriguez, C., Mendez, J. L., ... & Cravioto, A. (2024). *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from animal with high virulence genes content and highly sensitive to antimicrobials. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 37, 75-80.
- Moye, Z. D., Woolston, J., & Sulakvelidze, A. (2018). Bacteriophage applications for food production and processing. *Viruses*, 10(4), 205.
- Nabergoj, D., Modic, P., & Podgornik, A. (2018). Effect of bacterial growth rate on bacteriophage population growth rate. *MicrobiologyOpen*, 7(2), e00558.
- Naknaen, A., Samernate, T., Wannasrichan, W., Surachat, K., Nonejuie, P., & Chaikerasitak, V. (2023). Combination of genetically diverse *Pseudomonas* phages enhances the cocktail efficiency against bacteria. *Scientific Reports*, 13(1), 8921.

- Nami, Y., Imeni, N., & Panahi, B. (2021). Application of machine learning in bacteriophage research. *BMC Microbiology*, 21(1), 193.
- Nap, R. J., Božič, A. L., Szleifer, I., & Podgornik, R. (2014). The role of solution conditions in the bacteriophage PP7 capsid charge regulation. *Biophysical Journal*, 107(8), 1970-1979.
- Naureen, Z., Dautaj, A., Anpi ov, K., Camilleri, G., Dhuli, K., Tanzi, B., ... & Bertelli, M. (2020). Bacteriophages presence in nature and their role in the natural selection of bacterial populations. *Acta Bio Medica: Atenei Parmensis*, 91(Suppl 13).
- Olsen, N. M., Thiran, E., Hasler, T., Vanzieleghe, T., Belibasakis, G. N., Mahillon, J., ... & Schmelcher, M. (2018). Synergistic removal of static and dynamic *Staphylococcus aureus* biofilms by combined treatment with a bacteriophage endolysin and a polysaccharide depolymerase. *Viruses*, 10(8), 438.
- Peng-Fei, H., Ren-Jie, T., Huang, J., & Dan, L. (2024). Isolation, characterization and application of a novel polyvalent bacteriophage SF02 for the control of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157: H7 in foods. *LWT*, 116383.
- Phage Products, (2024) <https://www.bacteriophage.news/phage-products/> Erişim Tarihi: 13.05.2024.
- Phan, S., Feng, C. H., Huang, R., Lee, Z. X., Moua, Y., Phung, O. J., & Lenhard, J. R. (2023). Relative abundance and detection of *Pseudomonas aeruginosa* from Chronic Wound Infections globally. *Microorganisms*, 11(5), 1210.
- Piracha, Z., Saeed, U., Khurshid, A., & Chaudhary, W. N. (2014). Isolation and partial characterization of virulent phage specific against *Pseudomonas aeruginosa*. *Global Journal of Medical Research*, 14(1), 1-8.
- Pollack, M. (1983). The role of exotoxin A in *Pseudomonas* disease and immunity. *Reviews of infectious diseases*, 5(Supplement_5), S979-S984.
- Poranen, M. M., Mäntynen, S., & ICTV Report Consortium. (2017). ICTV virus taxonomy profile: *Cystoviridae*. *Journal of General Virology*, 98(10), 2423-2424.
- Poursina, S., Ahmadi, M., Fazeli, F., & Ariaii, P. (2023). Assessment of virulence factors and antimicrobial resistance among the *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from animal meat and carcass samples. *Veterinary Medicine and Science*, 9(1), 315-325.
- Qin, S., Xiao, W., Zhou, C., Pu, Q., Deng, X., Lan, L., ... & Wu, M. (2022). *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 199.
- Rafiei, S., & Bouzari, M. (2024). Genomic analysis of vB_PaS-HSN4 bacteriophage and its antibacterial activity (in vivo and in vitro) against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn. *Scientific Reports*, 14(1), 2007.
- Raja, C. E., Anbazhagan, K., & Selvam, G. S. (2006). Isolation and characterization of a metal-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22, 577-585.
- Rakhuba, D. V., Kolomiets, E. I., Dey, E. S., & Novik, G. I. (2010). Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. *Polish Journal of Microbiology*, 59(3), 145.

- Ramatla, T., Mokgokong, P., Lekota, K., & Thekiso, O. (2024). Antimicrobial resistance profiles of *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from broiler chickens. *Food Microbiology*, 120, 104476.
- Rojo-Bezares, B., Casado, C., Cenicer, T., López, M., Chichón, G., Lozano, C., ... & Sáenz, Y. (2024). *Pseudomonas aeruginosa* from river water: antimicrobial resistance, virulence and molecular typing. *FEMS Microbiology Ecology*, 100(5), fiae028.
- Römling, U., Wingender, J., Müller, H., & Tümmler, B. (1994). A major *Pseudomonas aeruginosa* clone common to patients and aquatic habitats. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(6), 1734-1738.
- Ruokoranta, T. M., Grah, A. M., Ravantti, J. J., Poranen, M. M., & Bamford, D. H. (2006). Complete genome sequence of the broad host range single-stranded RNA phage PRR1 places it in the *Levivirus* genus with characteristics shared with *Alloleviviruses*. *Journal of Virology*, 80(18), 9326-9330.
- Sae-Ueng, U., Bunsuwansakul, C., Showpanish, K., Phironrit, N., Sapcharoenkun, C., Treetong, A., & Thadajarassiri, J. (2024). Revealing bacteriophage capabilities: pH and NaCl concentration effects on RSJ2 phage infectivity and stiffness. *Journal of King Saud University-Science*, 36(8), 103344.
- Salmond, G. P., & Fineran, P. C. (2015). A century of the phage: past, present and future. *Nature Reviews Microbiology*, 13(12), 777-786.
- Samet-Bali, O., Felfoul, I., Lajnaf, R., Attia, H., & Ayadi, M. A. (2013). Study of proteolytic and lipolytic activities of *Pseudomonas* spp. isolated from pasteurized milk in Tunisia. *Journal of Agricultural Science*, 5(7), 46.
- Sanchez-Rosario, R., Garcia, J., Rodriguez, V., Schug, K. A., Hildenbrand, Z. L., & Bernal, R. A. (2024). Using Bacteriophages to Treat Resilient Bacteria Found in Produced Water. *Water*, 16(6), 797.
- Santamaría-Corral, G., Pagán, I., Aguilera-Correa, J. J., Esteban, J., & García-Quintanilla, M. (2024). A Novel Bacteriophage Infecting Multi-Drug-and Extended-Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Strains. *Antibiotics*, 13(6), 523.
- Sanz-Gaitero, M., Seoane-Blanco, M., & van Raaij, M. J. (2021). Structure and function of bacteriophages. *Bacteriophages: Biology, Technology, Therapy*, 19-91.
- Schijven, J. F., Sadeghi, G., & Hassanizadeh, S. M. (2016). Long-term inactivation of bacteriophage PRD1 as a function of temperature, pH, sodium and calcium concentration. *Water Research*, 103, 66-73.
- Secor, P. R., Burgener, E. B., Kinnorsley, M., Jennings, L. K., Roman-Cruz, V., Popescu, M., ... & Bollyky, P. L. (2020). Pf bacteriophage and their impact on *Pseudomonas* virulence, mammalian immunity, and chronic infections. *Frontiers in Immunology*, 11, 244.
- Secor, P. R., Sweere, J. M., Michaels, L. A., Malkovskiy, A. V., Lazzareschi, D., Katznelson, E., Rajadas J., Birnbaum, M. E., Arrigoni A., Braun, K. R., Evanko, S. P., Stevens D. A., Kaminsky, W., Singh, P. K., Parks, W. C., & Bollyky, P. L. (2015). Filamentous bacteriophage promote biofilm assembly and function. *Cell Host & Microbe*, 18(5), 549-559.
- Sendra, E., Fernández-Muñoz, A., Zamorano, L., Oliver, A., Horcajada, J. P., Juan, C., & Gómez-Zorrilla, S. (2024). Impact of multidrug resistance on the virulence and fitness of

- Pseudomonas aeruginosa*: a microbial and clinical perspective. *Infection*, 52(4), 1235-1268.
- Sepúlveda-Robles, O., Kameyama, L., & Guarneros, G. (2012). High diversity and novel species of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(12), 4510-4515.
- Shafique, M., Alvi, I. A., Abbas, Z., & ur Rehman, S. (2017). Assessment of biofilm removal capacity of a broad host range bacteriophage JHP against *Pseudomonas aeruginosa*. *Apmis*, 125(6), 579-584.
- Sharma, S., Chatterjee, S., Datta, S., Prasad, R., Dubey, D., Prasad, R. K., & Vairale, M. G. (2017). Bacteriophages and its applications: an overview. *Folia Microbiologica*, 62, 17-55.
- Sharma, S., Datta, S., Chatterjee, S., Dutta, M., Samanta, J., Vairale, M. G., ... & Dwivedi, S. K. (2021). Isolation and characterization of a lytic bacteriophage against *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Reports*, 11(1), 1-22.
- Shi, Z., Hong, X., Li, Z., Zhang, M., Zhou, J., Zhao, Z., ... & Liu, G. (2024). Characterization of the novel broad-spectrum lytic phage Phage_Pae01 and its antibiofilm efficacy against *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1386830.
- Shilpa, Basak, N., & Meena, S. S. (2024). Biodegradation of low-density polythene (LDPE) by a novel strain of *Pseudomonas aeruginosa* WD4 isolated from plastic dumpsite. *Biodegradation*, 35(5), 641-655.
- Sillankorva, S., Neubauer, P., & Azeredo, J. (2008). Isolation and characterization of a T7-like lytic phage for *Pseudomonas fluorescens*. *BMC Biotechnology*, 8, 1-11.
- Sillankorva, S., Pleteneva, E., Shaburova, O., Santos, S., Carvalho, C., Azeredo, J., & Krylov, V. (2010). *Salmonella* Enteritidis bacteriophage candidates for phage therapy of poultry. *Journal of Applied Microbiology*, 108(4), 1175-1186.
- Silva, Y. J., Costa, L., Pereira, C., Cunha, Â., Calado, R., Gomes, N. C., & Almeida, A. (2014). Influence of environmental variables in the efficiency of phage therapy in aquaculture. *Microbial Biotechnology*, 7(5), 401-413.
- Soberón-Chávez, G., González-Valdez, A., Soto-Aceves, M. P., & Cocotl-Yañez, M. (2021). Rhamnolipids produced by *Pseudomonas*: from molecular genetics to the market. *Microbial Biotechnology*, 14(1), 136-146.
- Sokolova, O. S., Shaburova, O. V., Pechnikova, E. V., Shaytan, A. K., Krylov, S. V., Kiselev, N. A., & Krylov, V. N. (2014). Genome packaging in EL and Lin68, two giant phiKZ-like bacteriophages of *P. aeruginosa*. *Virology*, 468, 472-478.
- Su, Q., Lu, D., Kong, J., Lin, H., Xuan, G., & Wang, J. (2024). PqsA mutation-mediated enhancement of phage-mediated combat against *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 14, 1296777.
- Swetha, C. S., Babu, A. J., Rao, K. V., Bharathy, S., Supriya, R. A., & Rao, T. M. (2017). A study on the antimicrobial resistant patterns of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from raw milk samples in and around Tirupati, Andhra Pradesh. *Asian Journal of Dairy and Food Research*, 36(2), 100-105.
- Teklemariam, A. D., Al-Hindi, R. R., Alharbi, M. G., Alotibi, I., Azhari, S. A., Qadri, I., ... & Harakeh, S. (2023). Isolation and characterization of a novel lytic phage, vB_PseuP-SA22, and its efficacy against carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics*, 12(3).

- Temiz, A. (2016). *Genel mikrobiyoloji uygulama teknikleri*. Hatiboğlu Yayınevi. ISBN 978-975-7527-76-3.
- Thi, M. T. T., Wibowo, D., & Rehm, B. H. (2020). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 8671.
- Tuon, F. F., Dantas, L. R., Suss, P. H., & Tasca Ribeiro, V. S. (2022). Pathogenesis of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: a review. *Pathogens*, 11(3), 300.
- Turner, D., Kropinski, A. M., & Adriaenssens, E. M. (2021). A roadmap for genome-based phage taxonomy. *Viruses*, 13(3), 506.
- Turner, D., Shkoporov, A. N., Lood, C., Millard, A. D., Dutilh, B. E., Alfenas-Zerbini, P., ... & Adriaenssens, E. M. (2023). Abolishment of morpho y-based taxa and change to binomial species names: 2022 taxonomy update of the ICTV bacterial viruses subcommittee. *Archives of Virology*, 168(2), 74.
- Uchiyama, J., Shigehisa, R., Nasukawa, T., Mizukami, K., Takemura-Uchiyama, I., Ujihara, T., ... & Matsuzaki, S. (2018). Piperacillin and ceftazidime produce the strongest synergistic phage–antibiotic effect in *Pseudomonas aeruginosa*. *Archives of virology*, 163, 1941-1948.
- Valentová, L., Füzik, T., Nováček, J., Hlavenková, Z., Pospíšil, J., & Plevka, P. (2024). Structure and replication of *Pseudomonas aeruginosa* phage JBD30. *The EMBO Journal*, 1-22.
- Vashisth, M., Jaglan, A. B., Yashveer, S., Sharma, P., Bardajaty, P., Virmani, N., ... & Anand, T. (2023). Development and evaluation of bacteriophage cocktail to eradicate biofilms formed by an extensively drug-resistant (XDR) *Pseudomonas aeruginosa*. *Viruses*, 15(2), 427.
- Vaz-Moreira, I., Nunes, O. C., & Manaia, C. M. (2012). Diversity and antibiotic resistance in *Pseudomonas* spp. from drinking water. *Science of the Total Environment*, 426, 366-374.
- Vidaver, A. K., Koski, R. K., & Van Etten, J. L. (1973). Bacteriophage $\phi 6$: a lipid-containing virus of *Pseudomonas phaseolicola*. *Journal of virology*, 11(5), 799-805.
- Vikram, A., Callahan, M. T., Woolston, J. W., Sharma, M., & Sulakvelidze, A. (2022). Phage biocontrol for reducing bacterial foodborne pathogens in produce and other foods. *Current Opinion in Biotechnology*, 78, 102805.
- Visnapuu, A., Van der Gucht, M., Wagemans, J., & Lavigne, R. (2022). Deconstructing the phage–bacterial biofilm interaction as a basis to establish new antibiofilm strategies. *Viruses*, 14(5), 1057.
- Vu, N. T., Kim, H., Lee, S., Hwang, I. S., Kwon, C. T., & Oh, C. S. (2024). Bacteriophage cocktail for biocontrol of soft rot disease caused by *Pectobacterium* species in Chinese cabbage. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 108(1), 11.
- Wang, W., Meng, X., Wu, Z., Fu, Y., Li, X., & Chen, S. (2024). Isolation of a virulent *Vibrio alginolyticus* Bacteriophage and Its Application in Shrimp culture. (Preprint) <https://www.researchsquare.com/article/rs-4446997/v1> Erişim Tarihi:20.11.2024
- Wang, X., Tang, J., Dang, W., Xie, Z., Zhang, F., Hao, X., ... & Xu, L. (2023). Isolation and characterization of three *Pseudomonas aeruginosa* viruses with therapeutic potential. *Microbiology Spectrum*, 11(3), e04636-22.
- Whiteley, L. E., & Whiteley, M. (2024). Characterization of a new *Pseudomonas aeruginosa* *Queuovirinae* bacteriophage. *Microbiology Spectrum*, e03719-23.4

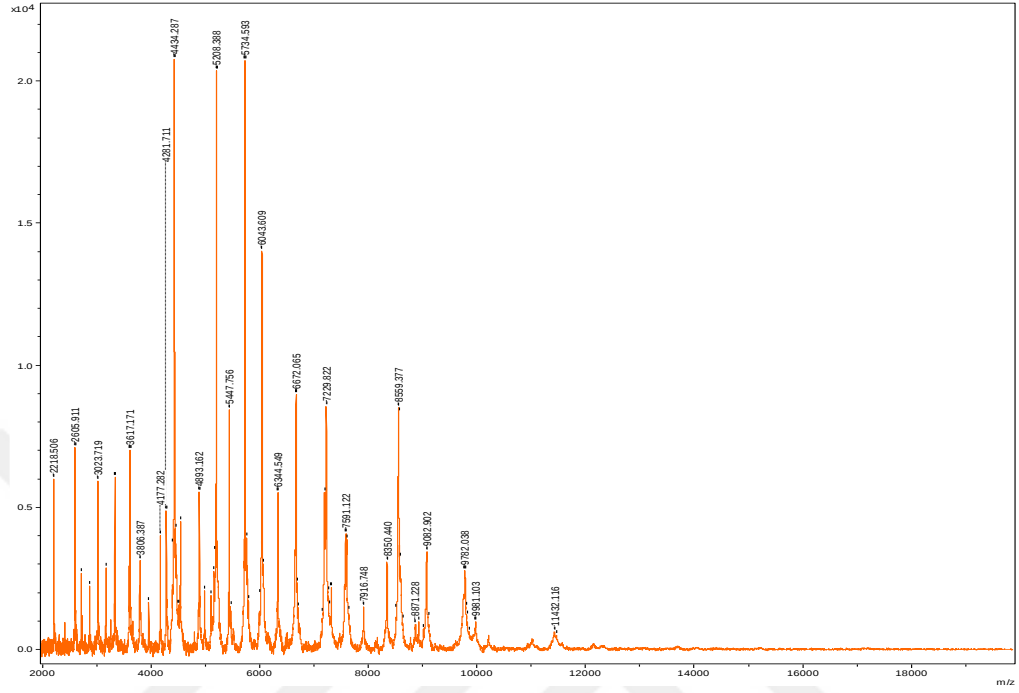
- WHO, (2024). updates list of drug-resistant bacteria most threatening to human health, Erişim Tarihi: 13.05.2024.
- WHO, (2017). WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed, Erişim Tarihi: 13.05.2024.
- Xiao, Y., Huang, P., Huang, Z., Yu, K., Song, Y., Guo, N., ... & Wei, Q. (2022). Influencing factors on the preservation of lytic bacteriophage VP3. *Biosafety and Health*, 4(05), 314-320.
- Xu, Z., Xie, J., Soteyome, T., Peters, B. M., Shirtliff, M. E., Liu, J., & Harro, J. M. (2019). Polymicrobial interaction and biofilms between *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*: an underestimated concern in food safety. *Current Opinion in Food Science*, 26, 57-64.
- Xuan, G., Lin, H., Kong, J., & Wang, J. (2022). Phage resistance evolution induces the sensitivity of specific antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology Spectrum*, 10(5), e01356-22.
- Yang, X., Hussain, W., Chen, Y., Xu, P., Yang, X., Wang, H., Zhang X., Fu, Q. & Wang, S. (2024). A New type of *Pseudomonas aeruginosa* Phage with Potential as a Natural Food Additive for Eradicating biofilms and Combating Multidrug-Resistant Strains. *Food Control*, 110888.
- Yang, Y., Lu, S., Shen, W., Zhao, X., Shen, M., Tan, Y., ... & Le, S. (2016). Characterization of the first double-stranded RNA bacteriophage infecting *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific reports*, 6(1), 38795.
- Yap, M. L., & Rossmann, M. G. (2014). Structure and function of bacteriophage T4. *Future Microbiology*, 9(12), 1319-1327.
- Yıldırım, A. (2023). *Gıdalarda Faj Terapi Yöntemi ile Lactococcus garvieae İnhibisyonunda Kullanılabilir Fajların İzolasyonu ve Karakterizasyonu*, Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Bolu.
- Yilmaz, N., Yildirim, Z., Sahin, T. S., & Karaoğlan, M. (2024). Isolation and characterization of lytic bacteriophages specific to foodborne pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* and use as a biopreservative in chicken meat. *Food and Bioprocess Technology*, 1-16.
- Yu, X., Xu, Y., Gu, Y., Zhu, Y., & Liu, X. (2017). Characterization and genomic study of “phiKMV-Like” phage PAXYB1 infecting *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Reports*, 7(1), 13068.
- Yuan, Y., Qu, K., Tan, D., Li, X., Wang, L., Cong, C., ... & Xu, Y. (2019). Isolation and characterization of a bacteriophage and its potential to disrupt multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbial Pathogenesis*, 128, 329-336.
- Zameer, F., Rukmangada, M. S., Chauhan, J. B., Khanum, S. A., Kumar, P., Devi, A. T., ... & Dhananjaya, B. L. (2016). Evaluation of adhesive and anti-adhesive properties of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and their inhibition by herbal plants. *Iranian journal of Microbiology*, 8(2), 108.
- Zhang, Y., Huang, H. H., Duc, H. M., Masuda, Y., Honjoh, K. I., & Miyamoto, T. (2022). Application of endolysin LysSTG2 as a potential biocontrol agent against planktonic and biofilm cells of *Pseudomonas* on various food and food contact surfaces. *Food Control*, 131, 108460.

- Zhang, Y., Wang, R., Hu, Q., Lv, N., Zhang, L., Yang, Z., ... & Wang, X. (2024). Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages and control hemorrhagic pneumonia on a mice model. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1396774.
- Zhou, Y., Wan, Q., Bao, H., Guo, Y., Zhu, S., Zhang, H., ... & Wang, R. (2022). Application of a novel lytic phage vB_EcoM_SQ17 for the biocontrol of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 and Enterotoxigenic *E. coli* in food matrices. *Frontiers in Microbiology*, 13, 929005.
- Zhu, Y., Shang, J., Peng, C., & Sun, Y. (2022). Phage family classification under *Caudoviricetes*: A review of current tools using the latest ICTV classification framework. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1032186.
- Zrelavs, N., Dislers, A., & Kazaks, A. (2020). Motley crew: overview of the currently available phage diversity. *Frontiers in Microbiology*, 11, 5794.

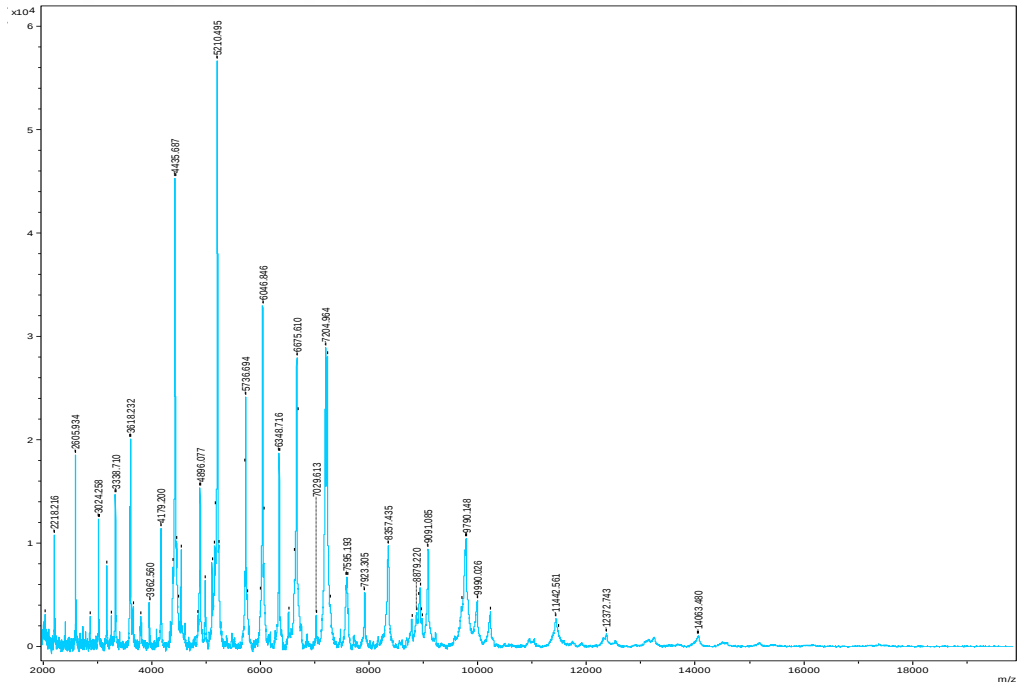


EKLER

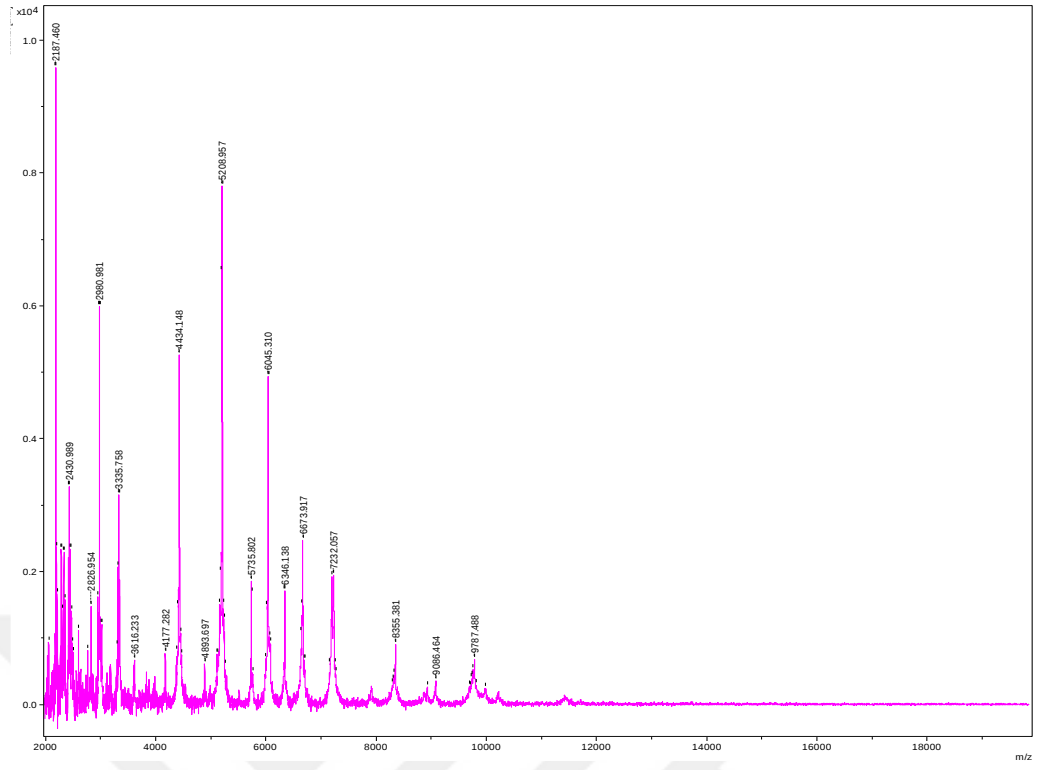
EK 1 *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının MALDI-TOF Sonuçları



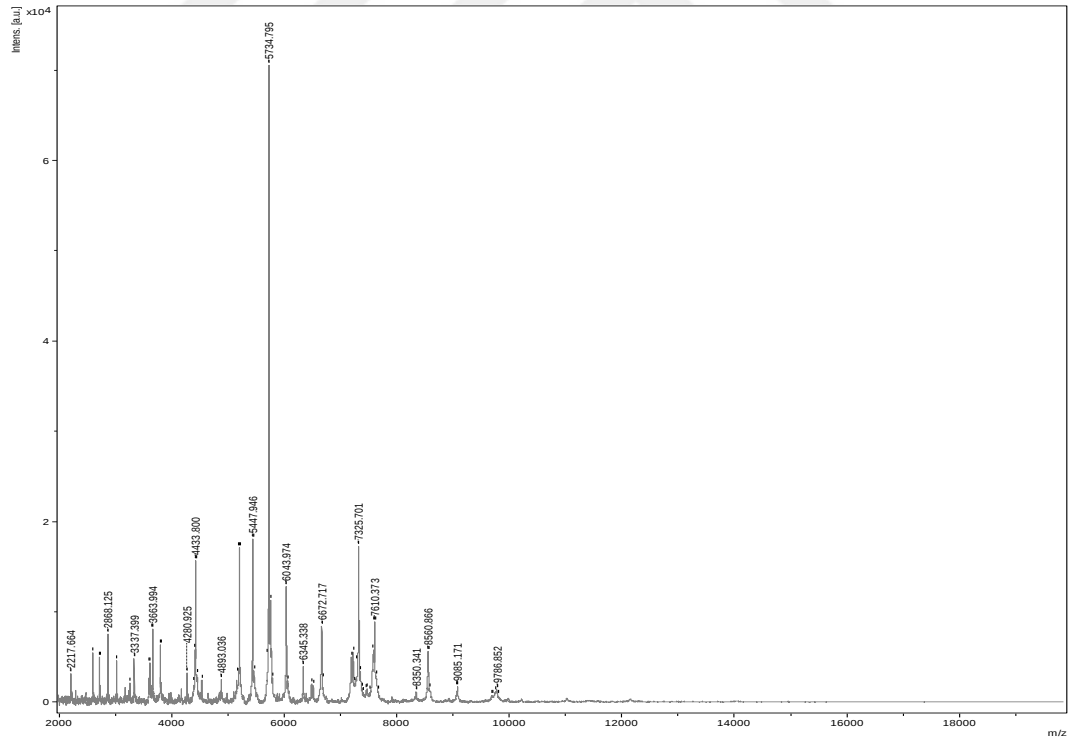
Pseudomonas aeruginosa C10 ölçüm sonucu



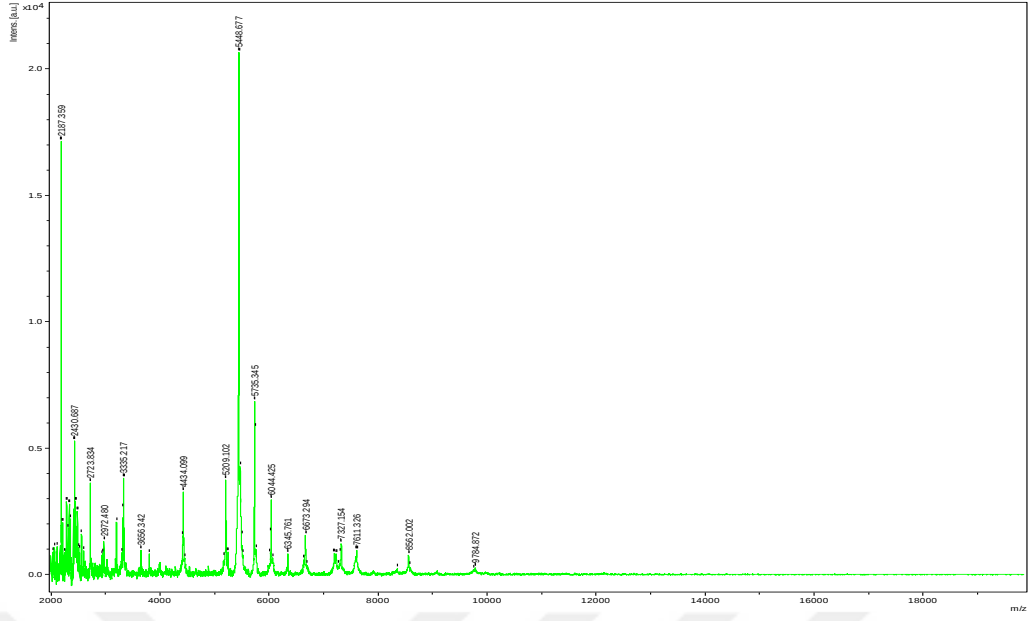
Pseudomonas aeruginosa SLT ölçüm sonucu



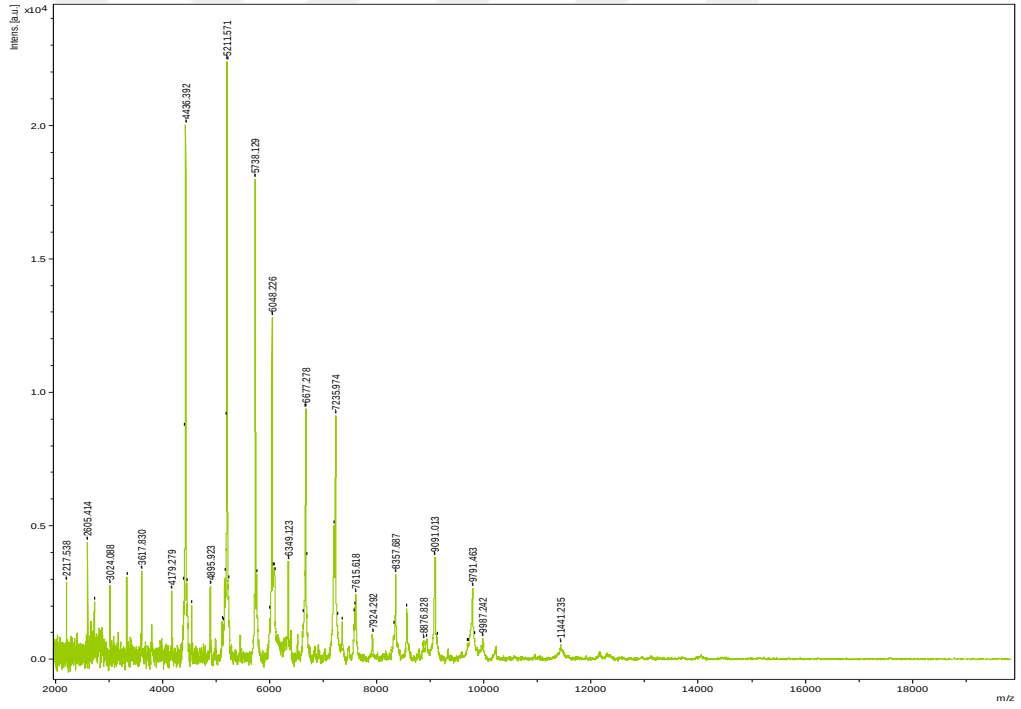
Pseudomonas aeruginosa R1 ölçüm sonucu



Pseudomonas aeruginosa Mr1 ölçüm sonucu



Pseudomonas aeruginosa Mr2 ölçüm sonucu



Pseudomonas aeruginosa A1 ölçüm sonucu

