ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SALMONELLA ile BAKTERİYOFAJLARININ ÇEŞİTLİ KÖY KÜMES FOLLUKLARINDAN İZOLASYONU ve KARAKTERİZASYONU

Merve AKPINAR

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2020

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

SALMONELLA iLE BAKTERİYOFAJLARININ ÇEŞİTLİ KÖY KÜMES FOLLUKLARINDAN İZOLASYONU ve KARAKTERİZASYONU

Merve AKPINAR

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN
Eş Danışman: Doç. Dr. Yeşim SOYER

Patojenik *Salmonella* serotiplerinin meydana getirdiği gıda kaynaklı enfeksiyonlar tüm dünyada olduğu gibi Türkiye'de de önemli problemlerden biridir. Kanatlı hayvanlar, görülen *Salmonella* enfeksiyonları için önemli bir kontaminasyon kaynağınıdır. Zamanla antibiyotik direncinin görülmesi ve mevcut yöntemlerin olumsuz etkilerinden dolayı alternatif antimikrobiyel ajan arayışına girilmiştir. Bu tez çalışması farklı mevsimlerde ve lokasyonlardan toplanan köy kümesi folluklarından muhtemel faj preparatlarının doğada bulunan uygun faj adaylarını belirlemek amacıyla yapılmıştır. Faj izolasyonu için aynı numunelerden elde edilen *Salmonella* izolatları ve kültür koleksiyonunda bulunan *Salmonella* serotipleriyle çalışılmıştır. Faj izole edilen hiçbir numuneden konakçısı, konakçı *Salmonella* izole edilen hiçbir numuneden ise faj izole edilememiştir. Gıda kaynaklı enfeksiyonlarda önemli yere sahip olan Enteriditis, Typhimurium ve Infantis serotiplerine spesik etki gösteren faj izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Her bir faj izolatının gıdalarda antimikrobiyel uygulamalara uygunluğunu belirlemek için ayrı ayrı pH stabilitesi, termal stabilite, latent süresi ve patlama büyüklüğü belirlenmiştir. İzolatların replikasyon kinetiğine bakıldığında latent dönemleri 15-25 dk, patlama boyutları ise 53-106 POB/hücre aralığında belirlenmiştir. İzolatların optimum pH stabiliteleri pH 5-10 arasında değişiklik göstermekle birlikte genel olarak pH 3-11 aralığında aktivite belirlenmiştir. Farklı sıcaklıklarda farklı sürelerde inkübe edildiğinde genel olarak 30-45 ºC'ta optimum stabilite göstermekle birlikte 75 ºC'a kadar aktivite gösterdikleri belirlenmiştir. Böylece izolatların hem gıdalar için tipik pH aralığına hem de pastörizasyon koşullarına uygun olduğu belirlenmiştir. İzolatların çoğunluğu sadece kendi konakçı serotiplerine karşı büyük spesifiklik göstermiş ve çeşitli çevresel koşullara benzer davranışı gösterdiği belirlenmiştir. Atık suları gibi sirkülasyonun devamlı olduğu ortamlar yerine kuru toprak, saman ve dışkıdan oluşan folluk materyalinden izolasyonun gerçekleştirilmesi ve bu çevreye adaptasyonları bu sınırlı davranışların nedeni olarak düşünülmüştür.

Aralık 2020, 88 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Salmonella*, Tavuk dışkısı, PCR, *Salmonella* izolasyonu, Bakteriyofaj

ABSTRACT

Master Thesis

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF *SALMONELLA* AND BACTERIOPHAGES FROM VARIOUS POULTRY HOUSES

Merve AKPINAR

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Science
Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN
Co-Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Yeşim SOYER

Foodborne infections caused by pathogenic *Salmonella* serotypes in Turkey as well as all over the world is one of the important problems. Poultry are an important source of contamination for *Salmonella* infections seen. Due to the emergence of antibiotic resistance over time and the negative effects of existing methods, an alternative antimicrobial agent has been sought. This thesis study was carried out to determine suitable phage candidates in the nature of possible phage preparations from village poultry nests collected from different seasons and locations. For phage isolation, *Salmonella* isolates obtained from the same samples and *Salmonella* serotypes in the culture collection were studied. Both *Salmonella* and phage were not isolated from any same sample. Phage isolations showing specific effects on Enteriditis, Typhimurium and Infantis serotypes, which have an important place in foodborne infections, were performed. To determine the suitability of each phage isolate for antimicrobial applications in foods, pH stability, thermal stability, latent time and burst size were determined separately. Looking at the replication kinetics of the isolates, latent periods were 15-25 minutes and burst sizes were determined in the range of 53-106 POB / cell. Although the optimum pH stability of the isolates varied between pH 5-10, activity was generally determined between pH 3-11. It has been determined that when incubated for different times at different temperatures, they generally show optimum stability at 30-45 ºC, but show activity up to 75 C. Thus, it has been determined that the isolates are suitable for both the typical pH range for foods and pasteurization conditions. The majority of the isolates showed great specificity only against their host serotype and it was determined that they showed similar specificity to various environmental conditions. Isolation from nest material consisting of dry soil, straw and faeces instead of environments with continuous circulation such as wastewater and their adaptation to this environment were determined as the reason for these limited behaviors.

December 2020, 88 phages

Key Words: *Salmonella,* Chicken feces, PCR, *Salmonella* isolation, Bacteriophage

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca her zaman yanımda olan, engin bilgi ve tecrübesiyle her zaman yol gösteren, yetişmeme ve kendimi geliştirmeme katkıda bulunan, yalnızca akademik değil her alanda desteğini hissettiğim ve akademik hayatıma öğrencisi olarak başladığım için kendimi her zaman çok şanslı hissettiğim değerli danışman hocam Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN'a (Ankara Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı),

Her konuda fikir danışabildiğim ve kişisel tecrübelerini, her türlü yardımı ve desteği her zaman benimle paylaşan değerli hocam Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK'e (Ankara Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı),

Laboratuvarının imkanlarını ve engin bilgilerini bana açan çok değerli eş danışman hocam Doç. Dr. Yeşim SOYER'e (ODTÜ, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı) ve laboratuvar ekibine,

Ankara Üniversitesi'ne ilk geldiğim günden beri laboratuvar arkadaşlığının ne güzel bir şey olduğunu bana gösteren, her düştüğüm zamanda elimden tutup desteğini hissettiren ve iyi ki Ankara'lı olmuşum dedirttiren çok sevgili arkadaşım Gülten KOLCUOĞLU'na,

İyi niyeti ve yardımseverliğiyle her zaman yanımda olduğunu bildiğim, birlikte üzülüp birlikte sevinebildiğim ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum sevgili arkadaşım Arş. Grv. Merve Sılanur YILMAZ'a,

Her biri benim için çok değerli olan, hem manevi hem de mesleki anlamda çok şey öğrendiğim sevgili arkadaşlarım Arş. Grv. İrem SAKA, Arş. Grv. Fatmagül HAMZAOĞLU, Arş. Grv. Betül ARSLAN ve Arş. Grv. Kübra BULDUK'a

Son olarak, bana çok mutlu bir hayat veren, eğitim hayatımda ve kariyerimde desteklerini ve emeklerini asla esirgemeyen, eğitim hayatım boyunca büyük bir sabır ve motivasyonla bana destek olan değerli ailem Hatice AKPINAR, NURİ AKPINAR, Dr.Yeliz AKPINAR, Dr. Filiz AKPINAR'a ve canımdan çok sevdiğim canım yeğenim Alp YÜKSEL'e emekleri, sevgileri ve özverileri için en içten teşekkürü borç bilirim.

Merve AKPINAR
Ankara, Aralık 2020

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI
ETİK ..... **i**
ÖZET ..... **ii**
ABSTRACT ..... **iii**
TEŞEKKÜR ..... **iv**
SİMGELER DİZİNİ ..... **vii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **ix**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **x**
1. GİRİŞ **1**
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ **4**
2.1 Gıda Kaynaklı Patojen Mikroorganizmalar **4**
2.1.1 *Salmonella* spp. **6**
2.2 Antibiyotik Direnci **9**
2.3 Bakteriyofaj **10**
2.3.1 Bakteriyofajların tarihçesi **14**
2.3.2 Bakteriyofajların sınıflandırılması **16**
2.3.3 Bakteriyofajların konakçı ile ilişkileri, çoğalmaları ve yaşam döngüleri **20**
2.4 Gıda Güvenliği **24**
2.5 Faj Terapisi **27**
2.6 Faj Uygulamalarının Avantajları ve Dezavantajları **32**
3. MATERYAL VE YÖNTEM **34**
3.1 Materyal **34**
3.1.1 İzolasyon materyali **34**
3.1.2 Kullanılan besiyerleri ve çözeltiler **35**
3.1.2.1 CASO (Tryptic Soy) broth besiyeri **35**
3.1.2.2 Tamponlanmış peptonlu su **35**
3.1.2.3 Rappaport-Vassiliadis Soy (RVS) broth besiyeri **36**
3.1.2.4 Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) agar besiyeri **36**
3.1.2.5 XLT4 agar besiyeri **36**
3.1.2.6 Triple Sugar Iron agar besiyeri **37**
3.1.2.7 Luria Bertani (LB) broth ve agar besiyerleri **37**
3.1.2.8 Tris stok çözeltisi **37**
3.1.2.9 SM tampon çözeltisi **37**

3.2 Yöntem 38
3.2.1 *Salmonella* izolasyonu ve izolatların doğrulanması 38
3.2.1.1 Folluk örneklerinden *Salmonella* izolasyonu 38
3.2.1.2 *Salmonella* izolatlarının TSI testi ile doğrulanması 38
3.2.1.3 *Salmonella* izolatlarının moleküler doğrulanması 39
3.2.2 *Salmonella* bakteriyofaj izolasyonu ve karakterizasyonu 40
3.2.2.1 *Salmonella* bakteriyofaj izolasyonu 40
3.2.2.2 İzolasyonu yapılan *Salmonella* bakteriyofajlarının saflaştırılması (Tek plak izolasyonu)……..……..41
3.2.2.3 *Salmonella* bakteriyofaj titresinin belirlenmesi ve zenginleştirilmesi 41
3.2.2.4 Tek aşamalı gelişme eğrisi 42
3.2.2.5 Termal ve pH stabilitesi 42
3.2.2.6 İzole edilen fajların farklı konakçılara karşı duyarlılığının belirlenmesi (SPOT TEST) 43
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA 44
4.1 İzolatların Lokasyon ve Mevsimlere Göre Dağılımları 44
4.1.1 Şüpheli *Salmonella* izolatları ve koloni morfolojileri 45
4.1.2 Muhtemel *Salmonella* izolatlarının TSI testi ile doğrulaması 46
4.1.3 Muhtemel *Salmonella* izolatlarının moleküler doğrulaması 48
4.2 Folluk Örneklerinden *Salmonella* Bakteriyofaj İzolasyonu ve Karakterizasyonu 49
4.2.1 *Salmonella* bakteriyofajlarının izolasyonu 49
4.2.2 Bakteriyofaj izolatlarının saflaştırılması, titresinin belirlenmesi ve zenginleştirilmesi 55
4.2.3 İzolatların farklı *Salmonella* suş ve izolatlarına karşı duyarlılıkları 56
4.2.4 Faj izolatlarının termal stabilite 61
4.2.5 Faj izolatlarının pH stabilitesi 65
4.2.6 Faj izolatlarının tek aşamalı gelişme eğrileri 68
5. SONUÇ 72
KAYNAKLAR 75
ÖZGEÇMİŞ……..87

SİMGELER DİZİNİ

Aº	Angstrom
Ca	Kalsiyum
°C	Santigrad derece
ddH_2O	Ultra saf su
dNTPs	DNA nükleotit bazları
dk	Dakika
g	Gram
kg	Kilogram
L	Litre
Mg	Magnezyum
$MgCl_2$	Magnezyum klorür
mL	Mililitre
µL	Mikrolitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
%	Yüzde

Kısaltmalar

AB	Avrupa Birliği
APHA	Amerikan Halk Sağlığı Birliği (American Public Health Association)
CDC	Amerika Birleşik Devletleri Hastalık Koruma ve Kontrol Merkezi (Centers for Disease Control Prevention)
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dsDNA	Çift Sarmallı DNA (Double Stranded DNA)
DSÖ	Dünya Sağlık Ögütü
FDA	Gıda ve İlaç İdaresi (Food and Drug Administration)
FDA-BAM	Gıda ve İlaç Dairesi-Bakteriyolojik Analiz Kılavuzu (Bakteriological Analytical Manual)
FoodNet	Gıda Kaynaklı Hastalıklar Aktif Gözetim Ağı (Foodborne Diseases Active Surveillance Network)
EFSA	Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (European Food Safety Authority)
EPA	
GMP	Doğru (iyi) üretim uygulamaları (Good Manufacturing Practices)
GRAS	Genel Olarak Güvenli Kabul Edilen (Generally Recognized as Safe)
ICTV	Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi (International Committee on

	Taxonomy of Viruse)
IDF	Uluslararası Sütçülük Federasyonu (International Dairy Federation)
ISO	Uluslararası Standartlar Organizayonu (International Orgatnization for Standadization)
INSCD	Uluslararası Nükleotid Dizi Veritabanı İşbirliği (International Nucleotide Sequence Database Collaboration)
LB	Luria Bertani
MOI	Enfeksiyon Çokluğu (Multiplicity of Infection)
PCA	Plate Count Agar
POB	Plak Oluşturan Birim
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RVS	Rappaport-Vassiliadis Soy Broth
spp.	Türler
ssDNA	Tek Sarmallı DNA (Single Stranded DNA)
TSB	Tryptic Soy Broth
TSI	Triple Sugar Iron Agar
USDA	Amerika Birleşik Devletleri Tarım Dairesi (United States Department of Agriculture)
UV	Ultraviyole
XLD	Xylose Lysine Deoxycholate Agar

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 *Salmonella* enfeksiyon siklusu…….....…...6
Şekil 2.2 Mevcut *Salmonella* sınıflandırmasına genel bakış…….……8
Şekil 2.3 Bakteriyofajların morfolojilerine, genetik materyallerine ve temel özelliklerine göre sınıflandırılması……...……...12
Şekil 2.4 Kuyruklu bir bakteriyofajın yapısı……...13
Şekil 2.5 Bakteriyofajların tarihçesi……16
Şekil 2.6 Bakteriyofajların Bradley sınıflandırması……18
Şekil 2.7 *Caudovirales* takımına ait üç ailenin basit morfolojisi……..…….19
Şekil 2.8 Litik ve lizogenik yaşam döngüleri……..21
Şekil 2.9 Tek aşamalı gelişme kurvesi……23
Şekil 2.10 Gıda zinciri boyunca faj uygulamaları……...28
Şekil 3.1 *Salmonella* ve bakteriyofajlarının izolasyonu için numune toplanan lokasyonlar……..…….……...…..34
Şekil 4.1 Seçici *Salmonella* besiyerleri üzerinde gelişen şüpheli *Salmonella* izolatlarının koloni morfolojisi……45
Şekil 4.2 TSI Agar testi……..……..……...47
Şekil 4.3 *inv*A'ya özgü primerler kullanılarak gerçekleştirilen *Salmonella* izolatlarına ait jel görüntüsü……...…….…48
Şekil 4.4 Çift tabaka agar plak yöntemi ile izole edilen fajların LB agar üzerinde oluşturduğu plak görüntüsü……..…….....….51
Şekil 4.5. Bulanık ve berrak plakların LB agar üzerinde görüntüsü….....……54
Şekil 4.6 Faj titresinin belirlenmesi sırasında farklı titrelerdeki faj solüsyonlarının *Salmonella* üzerindeki litik etkisi……..……...…56
Şekil 4.7 Spot test ……...59
Şekil 4.8 BÇKİ19 fajının termal stabilitesi…….62
Şekil 4.9 BÇS19 fajının termal stabilitesi……...62
Şekil 4.10 BÇKY19-1 fajının termal stabilitesi……..….63
Şekil 4.11 BÇKY19-2 fajının termal stabilitesi……...64
Şekil 4.12 BÇKİ19 fajının pH stabilitesi……....66
Şekil 4.13 BÇS19 fajının pH stabilitesi……...66
Şekil 4.14 BÇKY19-1 fajının pH stabilitesi……67
Şekil 4.15 BÇKY19-2 fajının pH stabilitesi……67
Şekil 4.16 BÇS19 fajının tek aşamalı gelişme eğrisi……..….69
Şekil 4.17 BÇKİ19 fajının tek aşamalı gelişme eğrisi……69
Şekil 4.18 BÇKY19-1 fajının tek aşamalı gelişme eğrisi……70
Şekil 4.19 BÇKY19-2 fajının tek aşamalı gelişme eğrisi……70

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Başlıca gıda kaynaklı patojen mikroorganizmaların gösterdiği semptomlar, enfeksiyon kaynakları ve patojeniteleri……...…..5

Çizelge 2.2 Bakteriyofajların Ackermann sınıflandırması……..19

Çizelge 2.3 Ticari faj ürünleri……..26

Çizelge 2.4 Literatürde yer alan faj uygulamaları ve sonuçları……...30

Çizelge 2.5 Faj uygulamalarının avantajları ve dezavantajları……....32

Çizelge 3.1 *inv*A geninin PZR için Master mix karışımı……...…….39

Çizelge 3.2 *inv*A geni için PZR koşulları……39

Çizelge 4.1 *Salmonella* ve spesifik bakteriyofajlarının izolasyonu için kullanılan numunelerin mevsim ve lokasyonlara göre dağılımları……..…44

Çizelge 4.2 *Salmonella* izolatlarının mevsimlere ve lokasyonlara göre dağılımları…...46

Çizelge 4.3 İzole edilen şüpheli *Salmonella* izotlarının izolasyon lokasyonu ve dönemine göre kodlandırılması…….……...47

Çizelge 4.4 Bakteriyofaj izolasyonunda ve karakterizasyonunda kullanılan *Salmonella* suş ve izolatlarının kodlandırılması…….…….….50

Çizelge 4.5 Bakteriyofaj izolatlarının izole edildiği dönem ve lokasyon……51

Çizelge 4.6 İzole edilen fajların lokasyon ve izolasyon dönemine göre kodlandırılması, plak çapları ve plak morfolojisi…….……...…...52

Çizelge 4.7 Bakteriyofaj izolatlarının seçilen patojenlere karşı liziz duyarlılıklarının spot test ile belirlenmesi…….……..57

1. GİRİŞ

Dünya üzerinde insan yaşamını sürdürmek ve sağlığını korumak için yeterli miktarda güvenilir gıdaya erişim önemli rol oynamaktadır. Patojen bakteriler, virüsler, parazitler ve hatta biyotoksinlerle kontamine olmuş gıdaların tüketilmesiyle meydana gelen gıda kaynaklı vakalar, ishalden kansere kadar 200'den fazla önemli hastalık yelpazesine sahiptir. Ayrıca bunlara bağlı morbidite ve mortalite oranlarının yüksek olması ve meydana getirdiği ekonomik kayıplar gelişmiş ve gelişmekte olan ülkeleri ilgilendiren büyük bir sorun haline gelmiştir. Gıda kaynaklı hastalıkların birçoğunun bildirilmemesine rağmen vaka sayısı oldukça geniştir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2004 yılında kötü hijyen ve sanitasyon şartlarında güvenli olmayan su ve gıdaların tüketiminden dolayı her yıl dünyadaki her 10 kişiden yaklaşık 1'inin hastalandığını bildirmiştir (Anonymus 2020a). Bazı sanayileşmiş ülkelerin ise nüfuslarının %30'undan fazlasının gıda kaynaklı hastalıklardan muzdarip olduğu bildirilmiştir. Günümüz dünyasında ülkelerin birbirlerine olan bağımlılıklarından dolayı söz konusu salgınlar daha hızlı yayıldığı için potansiyel tehlike oluşturmaktadır (Anonymus 2020b).

Gıda kaynaklı patojenler, tarladan sofraya olmak üzere gıda zincirinde yer alan herhangi bir noktada gıdaya kontamine olup risk oluşturabilir (Amarillas vd. 2018). Gıda kaynaklı patojenler sadece gıda matrislerinde değil aynı zamanda insanda da canlılığını devam ettirebilir ve ilerleyen zamanlarda enfeksiyon tipi hastalıklara yol açabilir. Eski zamanlara dayanmakla birlikte son yıllarda da dünya çapında gıda kaynaklı vakalar bildirilmiştir. Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet) gıda kaynaklı hastalıkların ana kaynaklarını, her yıl raporlanan enfeksiyon sayısını ve yaygın olarak bulaşan gıda patojenlerini bildirmektedir. FoodNet'in 2018 raporuna göre *Campylobacter, Cyclospora, Listeria, Salmonella*, Shiga toksini üreten *Escherichia coli* (STEC), *Shigella, Vibrio* ve *Yersinia'*nın neden olduğu enfeksiyonlarla ilişkin 2017 verilerine göre artış görülmektedir. FoodNet 2018 verilerine göre *Campylobacter* enfeksiyonları 2013'ten beri en yüksek noktasındadır ve artmaya devam etmektedir. En yaygın olan ikinci enfeksiyon sebebi ise patojenik *Salmonella* serotipleridir. Enteriditis, Newport, Typhimurium serotipleri özellikle piliç ve yumurtalarda enfeksiyon kaynağını oluşturmaktadır (Anonymus 2018a). Geleneksel olarak kullanılan kimyasal

koruyucuların korozif ve toksik etkilerinden dolayı gıdaya ve çevreye olan olumsuz etkisi ve çeşitli patojenlerin bunlara direnç kazanması, dekontaminasyonda etkisiz olması sorun oluşturmaktadır. Kuru ısı, buhar veya ışınlama gibi fiziksel işlemler gıdaların kabul edilebilirliğini ve duyusal özelliklerini olumsuz etkilemektedir. Ayrıca endüstride patojen kontrolünü sağlamak için bazı yöntemler taze meyveler, sebzelerde veya bazı hazır gıdalarda doğrudan uygulanamaz. Bu nedenle patojenleri kontrol altına alabilmek için birçok koruyucu geliştirilmesine rağmen yeni ve güvenli antimikrobiyel ajanların geliştirilmesine dayanan stratejilere ihtiyaç duyulmaktadır. Bakteriyofaj uygulamaları bu stratejilerin başında gelmektedir. (Abuladze vd. 2008, García vd. 2008, Bueno vd. 2012, Park vd. 2012). Hatta gıda teknolojisinde engeller teknolojisinin daha karmaşık ve istenen uygulamalarında kullanıma açıktır. Ayrıca yapılan çalışmaların hem sıvı hem de katı gıdalarda, gıda patojenlerini kontrol etmede kullanılması umut verici bir yaklaşım olduğunu göstermiştir. Bakteriyofajların su, gıda, toprak, insan ve hayvanların gastrointestinal sistemlerinde doğal ve yüksek sayıda bulunması ve tüketim sonucunda insanda olumsuz etkisinin bulunmamasından dolayı alternatif antibakteriyel ajan olarak kullanılması bu stratejinin kullanılabilirliğine katkı sağlamıştır (El-Dougdoug vd. 2019, Kosznik-Kwasnicka vd. 2020).

Literatür çalışmalarına dayanarak fajların diğer antimikrobiyellere göre avantajları sunulsa bile bakterilerin gelişim gösterebileceği, fajlara karşı da direnç kazanabileceği ve etkinliklerinin zayıflayabileceği unutulmamalıdır. Bu nedenle yeni konakçı ve litik etkiye sahip fajların izolasyonu gereklidir (Moon vd. 2020). Araştırmalar sonucunda faj uygulamaları *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter*, *E. coli* O157:H7 gibi önemli patojenlerin indirgenmesinde olumlu sonuç verse dahi kazanılan ve "generally recognized as safe" (GRAS) statüsünü alabilen az sayıda ticari ürün vardır (Phongtang vd. 2019). Bu nedenle doğadan yeni fajlar izole etmek ve izole edilen fajlar için optimum kültür koşullarını ve kriterlerini, yaşayabilirliklerini etkileyen fiziksel ve kimsyasal faktörleri belirlemek gerekmektedir.

Fajları, en etkili ve doğru performansıları gerçekleştirebilmek ve garanti edebilmek için muhtemel koşullarda stabil kalabilecekleri ve çoğalmaya adapte olabilecekleri ait oldukları kendi yaşam alanlarından izole etmenin en uygun yöntem olduğu birçok

çalışmada da belirtilmiştir. Bakteriyofajlar, konakçılarına göre bazı faktörlere karşı daha fazla direnç gösterseler bile sıcaklık, pH, tuz oranı veya bazı iyonların varlığı ve derişimleri gibi faktörler, çoğalmaları ve depolanabilirlikleri üzerinde etkilidir. Potansiyel patojenlere karşı gıdalarda kullanılabilme stratejilerinde optimum antimikrobiyel sonuç alabilmek için kullanılan gıdanın sıcaklık, pH, a_w gibi fizikokimyasal özelliklerine ve depolama koşullarına direnç gösterebilmeleri ve karakterize edilmeleri gerekir (Gong ve Jiang 2017).

Fajların keşfinden bu yana dünya çapında yapılan araştırmalara ve literatür çalışmalarına bakıldığında özellikle *Salmonella* fajları olmak üzere spesifik fajların izolasyonu, tanımlanması ve terapötik uygulamalarıyla ilgili birçok çalışma bulunmasına rağmen bu çalışmalar ülkemiz genelinde henüz oldukça kısıtlıdır.

Bu nedenle bu çalışma, ülkemiz coğrafyasında bulunan belirli illerdeki farklı köyler gibi farklı konumlarda bulunan farklı kümeslerden toplanan folluklardan hem *Salmonella* konakçısının hem de *Salmonella* spesifik fajlarının izolasyonu ve karakterizasyonunu belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Böylece faj çeşitliliğinin artırılması ve gelecekteki muhtemel faj preparatları için olası faj adaylarının belirlenmesi hedeflenmektedir. Ayrıca bu şekilde fajlar kendi yaşam alanlarından izole edilerek biyokontrol amaçlı uygulamalarda gıda zincirine yeni bir biyolojik varlık ve kimyasal katılmaması hedeflenmektedir.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Gıda Kaynaklı Patojen Mikroorganizmalar

Gıda, yaşamın temel gereksinimidir ancak hammaddelerden, işletmelerden, ambalajlardan, hava ve sudan veya işletmelerdeki bireyler tarafından patojen mikroorganizmaların kontaminasyonuna açıktır ve birincil bulaşma yoludur (Endersen vd. 2014, Jun vd. 2018). Gıda kaynaklı patojenler endüstride yapılan müdaheleler sonucunda meydana gelen değişikliklere hızlı bir şekilde cevap verirler, canlılıklarını devam ettirme yeteneği kazanırlar ve çoğalırlar. Sadece gıda matrislerinde canlı kalmayıp insanlarda, hayvanlarda ve bitkilerde konaklayıp enfeksiyona neden olabilirler (Denes ve Wiedmann 2014, Duc vd. 2018). Yeryüzünde bulunan mikroorganizma türü ve sayısı dikkate alındığında gıda kaynaklı patojenlerin sayısı önemsizdir. Mikotoksijenik küf sayısı yaklaşık olarak 350 iken fırsatçı patojenlerde dahil olmak üzere gıda mikrobiyolojisini ilgilendiren patojen sayısı yaklaşık olarak 15-20'dir. Dünya üzerindeki ölüm ve hastalanma istatistiklerine bakarak başlıca gıda kaynaklı endişe verici patojenler olan patojenik *Salmonella* serotipleri, *Campylobacter jejuni,* Verotoksijenik *E. coli* serotipleri ve *Listeria monocytogene*s'dir ve tedavileri için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir (Drulis-Kawa vd. 2012, Endersen vd. 2014, Milho vd. 2018). Başlıca gıda kaynaklı patojen mikroorganizmaların gösterdiği semptomlar, enfeksiyon kaynakları ve patojenitelerine çizelge 2.1'de değinilmiştir.

Meydana gelen gıda kaynaklı enfeksiyonlarda söz konusu gıdanın fiziksel ve duyusal nitelikleri önemlidir. Genellikle bir gıda, $10^6/10^7$ KOB/g-mL gibi fazla sayıda mikroorganizma içeriyorsa erime, kokuşma, renk değiştirme, ekşime veya şişme şeklinde hem fiziksel hem de duyusal açıdan fark edilebilecek şekilde bozulmaya başlar ve tüketici tarafından kabul edilemez. Ancak gıdada 10^4-10^5 KOB/g-mL sayıda bulunması kolaylıkla fark edilemez (Augustine vd. 2012, Halkman 2019).

Günümüzde Türkiye'de gıda kaynaklı hastalıklarla ilgili kayıtların oldukça zayıf olmasına rağmen yapılan araştırmalara göre 1995 yılından bu yana gıda kaynaklı enfeksiyonların sayısında sürekli bir artış görülmektedir. Ülkemizde meydana gelen

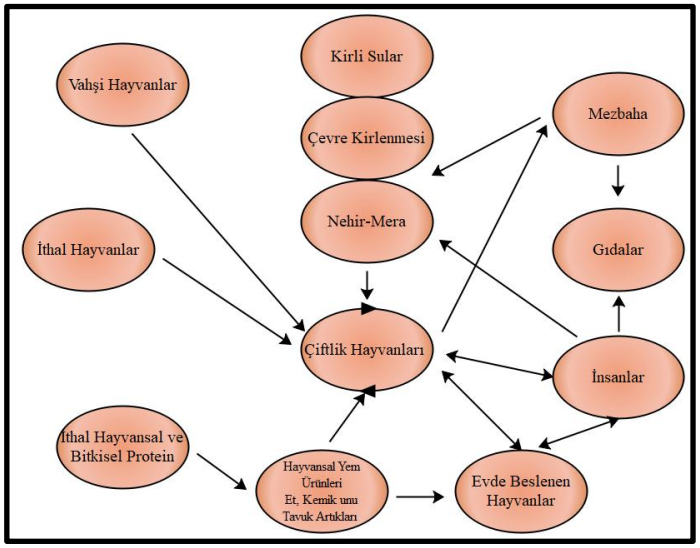
gıda kaynaklı hastalıkların sebebi olarak *Salmonella* spp. ilk sırada yer almaktadır (Aktürk 2015).

Çizelge 2.1 Başlıca gıda kaynaklı patojen mikroorganizmaların gösterdiği semptomlar, enfeksiyon kaynakları ve patojeniteleri

	EKOLOJİSİ	**TANIMI**	**ENFEKSİYON KAYNAĞI**	**PATOJENİTESİ**
Salmonella spp.	Doğal habitatları sıcakkanlı hayvanlar olarak tanımlanan memelilerin ve kanatlıların (kümes hayvanları ve kuşlar) bağırsak sistemleri	Gram negatif, fakültatif anaerop, çubuk şeklinde, optimum gelişme sıcaklıkları 37 °C ve pH 7.4	Özellikle piliç olmak üzere beyaz ve kırmızı et, yumurta, ısıl işlem görmemiş süt ve ürünleri ile fekal kontaminasyona maruz kalmış her türlü gıda	Salmonellozis: Akut semptomları bulantı, kusma, karın krampları, ishal, ateş ve baş ağrısı. Taşıyıcı (belirtisiz) evre, enterik ateş, gastroenterit, septisemi olmak üzere 4 evre
Campylobacter jejuni	Doğal habitatları yabani ve evcil hayvanların, özellikle kuşların bağırsakları (*Camp. jejuni*, sağlıklı hayvanların bağırsak sisteminde doğal olarak bulunan bir bakteridir.)	Gram negatif, spor oluşturmayan, ince ve kıvrık çubuk şeklinde, mikroaerofilik, optimum gelişme sıcaklıkları 42 °C ve pH 6.5-7.5	Pastörize edilmemiş süt, et, kümes hayvanları, kabuklu deniz ürünleri, meyve ve sebzeler	Campylobacteriozis: Şiddetli akut gastroenterit, fekal lökosit ve kan içeren sulu veya mukozlu diyare, ateş, karın ağrısı, mide bulantısı, baş ve kas ağrıları. Minimal enfeksiyon dozu 10^3-10^5 hücre, Ölüm/vaka oranı yaklaşık %0.1
E. coli O157:H7	Doğal habitatları sıcak hayvanların bağırsak sistemleri	Gram negatif, çubuk şeklinde, MUG negatif, 48 saat içinde sorbitol negatif, optimum gelişme sıcaklıkları 37 °C, pH 7.2 ve %6.5 NaCl'de gelişebilme	Doğrudan veya dolaylı olarak dışkı ile bulaşmış tüm gıdalar	Ağır ve kanlı bir ishal, abdominal kramp, hemolitik üremik sendrom (HUS), trombotik trombositopenik purpura (TTP)
Listeria monocytogenes	Yüksek nemli, yakın zamanda ekilmiş, sulanmış ya da yağmur yağmış topraklarda ve otlaklarda daha yüksek oranda bulunur	Gram pozitif, kısa çubuk şeklinde, aerobik ve fakültatif anaerop karakterli, optimum gelişme sıcaklıkları 30-35 °C, pH 6.0-8.0 ve 0-45 °C gibi geniş bir aralıkta gelişebilme, %10-12 NaCl varlığında gelişebilme	Tüketime hazır, soğukta uzun süre depolanmış ve kontamine olmuş gıdalar	Menenjit, septisemi, beyin iltihabı, karaciğer apsesi, endokardit, gebelerde düşük veya ölü doğum

2.1.1 *Salmonella* spp.

Enterobacteriaceae üyesi olan *Salmonella*, Gram negatif, fakültatif anaerop, çubuk şeklinde, katalaz pozitif, oksidaz negatif, mezofilik karakterde olup bulunduğu familyanın genel özelliklerini taşır. Genel olarak mikroskobik yapıları 0.7-1.5 x 2-5 µm boyutlarında, düz ve uç kısımları hafif yuvarlak şeklindeki bakterilerdir. Spor ve kapsül oluşturmazlar, anilin boyaları ile kolaylıkla boyanırlar ve *S.* Gallinarum ve *S.* Pullorum dışındaki türleri peritrik flagelları sayesinde hareketlidir (Halkman 2019). *S.* Typhi ve *S.* Gallinarum hariç olmak üzere tamamı glikozu katabolize ederek asit ve gaz oluştururlar. Ancak laktoz ve sakarozu fermente edemezler. Optimum olarak 37 °C sıcaklık ve 7.4 pH'ta gelişirler. Gelişme sıcaklık aralığı 5-47°C, pH aralığı ise 4-9'dur. Sıcaklık ve pH değerleri diğer faktörlere ve serotipe bağlı olarak değişiklik gösterir. (McDermott vd. 2002, Forsythe 2007, Heshmati 2019). Doğal habitatları sıcakkanlı hayvanların gastrointestinal sistemleridir. Türleri toprakta, havada, suda, atık sularında, yemlerde, hayvan dışkılarında, alet ve ekipmanda, başta kümes hayvanları olmak üzere hayvanlar ve insanlar da dahil birçok yerde yaygın olarak görülebilmektedir. Makroskobik yapıları incelendiğinde genellikle koloni çapları 2-4 mm'dir ve özel gelişme faktörlerine ihtiyaç duymadan basit ortamlarda kolaylıkla gelişirler (Halkman 2019). *Salmonella* infeksiyon döngüsü şekil 2.1'de verilmiştir.



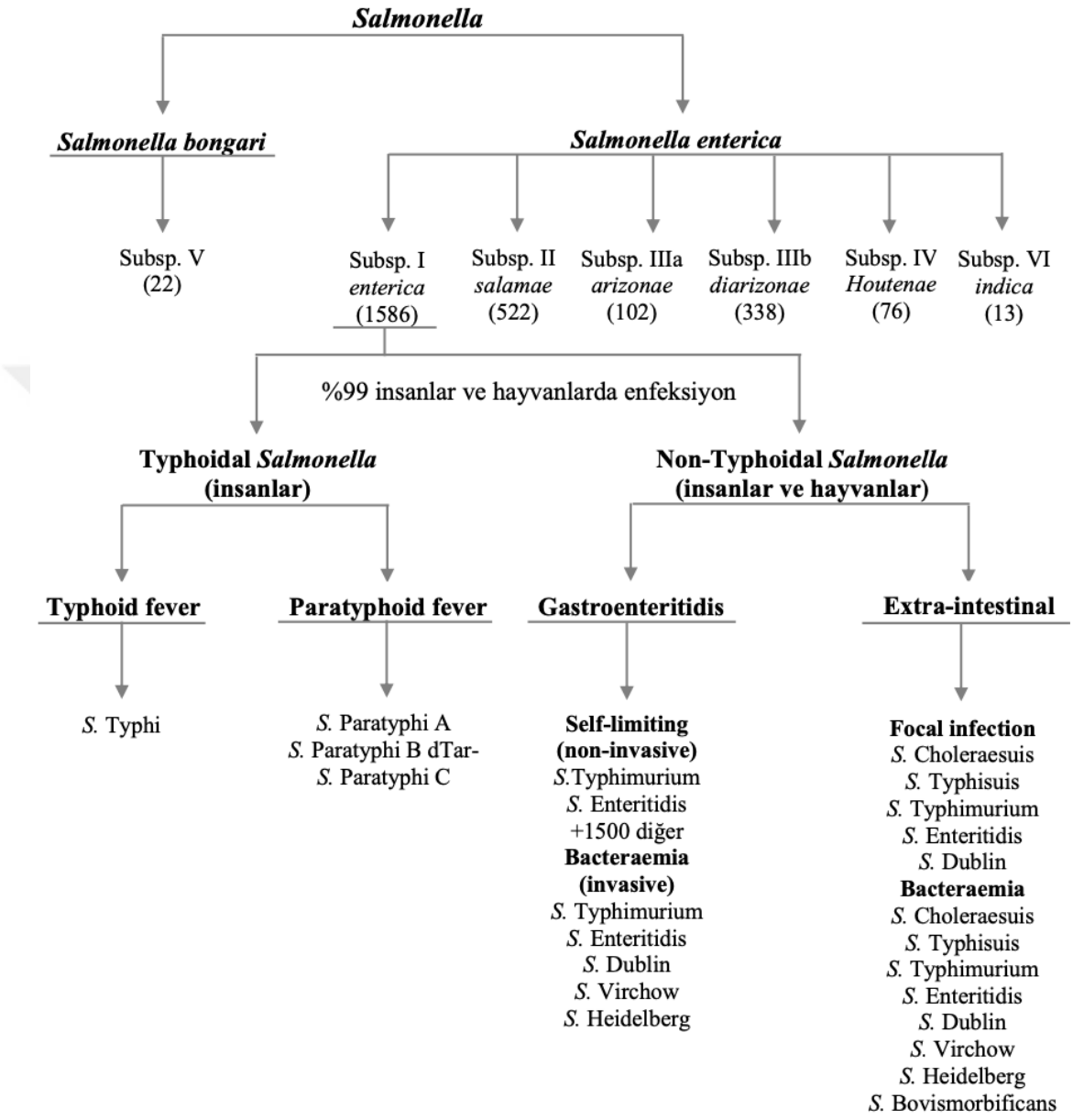
Şekil 2.1 *Salmonella* enfeksiyon siklusu (Şengül 2008)

İlk olarak 1880 yılında görülmüştür ve ilk tanımlanan üyesi *Salmonella* Typhi'dir. *Salmonella*'nın 2600'den fazla serotipi bulunmakla birlikte insanlar için yaklaşık 50 kadarı patojenite göstermektedir. Minimal enfeksiyon dozu, serotip ve suş farklılıklarına göre değişiklik göstermektedir (Halkman 2019). Amerika Birleşik Devletleri Hastalık Koruma ve Kontrol Merkezi (CDC), DSÖ *Salmonella* cinsinde *Salmonella enterica* ve *Salmonella bongori* olmak üzere 2 tür olduğunu bildirmektedir. Kauffmann-White sıralamasına göre *Salmonella enterica* türü 6 alt türe ayrılır. Taşıdıkları O, H ve V_i antijenlerine göre serogruplara ve serovarlara (serotiplere) ayrılmaktadır. O antijeni, ısıya dayanıklı hücre duvar polisakkaritidir, H antijeni ısıya duyarlı, protein yapıda kirpik antijenidir, Vi antijeni ise homolog O antiserumu ile aglütinasyonu engelleyen yüzey polisakkaritidir. Enfektif doz bireyin yaşı ve sağlığına, serotipe ve gıdaya bağlı olarak 20'den 10^6 hücreye kadar değişiklik gösterir (Forsythe 2007, Heshmati 2019). Mevcut *Salmonella* sınıflandırmasına genel bakış şekil 2.2'de verilmiştir.

Ölümle sonuçlanabilen *Salmonella* spp. kaynaklı gastroenteritit vakalarının bulunması gıda mikrobiyolojisi ve gıda güvenliği açısından önem taşımaktadır. *S.* Typhimurium, *S.* Enteritidis ve *S.* Newport, insan patojeni olan önemli serotiplerdir. *Salmonella enterica* serovarlarıyla enfeksiyon sonucu görülen gıda kaynaklı hastalığa salmonellozis adı verilmektedir. Tifoit olmayan salmonellozis vakaları gastroenterit veya bakteriyemi ile karakterize edilir. *Salmonella* ile enfekte olmuş çoğu bireyde ishal, ateş ve mide krampları gibi semptomlar görülmektedir (El-Shibiny ve El-Sahhar 2017, Demiraslan Aydın 2018).

Gıdalarda birincil veya ikincil kontaminasyonla bulunabilirler. Çoğunlukla koliformlarla kontamine olmuş gıdalarda yoğun olarak bulunmasına rağmen koliformların olmadığı bazı durumlarda *Salmonella* spp.'ye rastlanabildiği bildirilmiştir (Sadekuzzaman vd. 2017, Wang vd. 2018). Diğer gıda kaynaklı patojenlere nazaran birçok gıdada geniş sıcaklık aralığında gelişebilmesi ve kişiden kişiye yayılabilmesi ile farklılık gösterirler. Özellikle piliç olmak üzere beyaz ve kırmızı et ve ürünlerinde, yumurta, ısıl işlem görmemiş süt ve ürünleri ile fekal kontaminasyona maruz kalmış her türlü gıda salmonellozis etmeni olabilir. İnsanlarda görülen salmonellozis vakasının %70'inden fazlası kontamine kanatlı eti veya yumurta tüketiminden kaynaklı olduğu

bildirilmiştir. *Salmonella*, yüksek asitli gıdalar dışında hemen tüm gıda maddelerinde bulunabilir (Aydın 2018, Halkman 2019).



Şekil 2.2 Mevcut *Salmonella* sınıflandırmasına genel bakış (Heshmati 2019)

AB ülkelerinde piliç eti ve ürünlerinde kontrollerden sonra *Salmonella* bulunması durumunda serotiplendirme yapılmakta ve *S.* Enteritidis ve *S.* Typhimurium dışındaki serotiplerde gıda güvenliğini tehdit etmeyeceği gerekçesiyle izin verilmektedir (Burrowes vd. 2011).

2.2 Antibiyotik Direnci

Belirli mikroorganizma grupları tarafından veya sentetik olarak üretilen antibiyotikler, keşiflerinden sonra insanlarda ve hayvanlarda birçok enfeksiyon tipi hastalık ile ilgili vaka sayısını azaltmak için önemli bir araç haline gelmiştir. Günümüzde hem veteriner hekimlikte hem de tıbbi ve tarım alanlarında bakteriyel enfeksiyonlara karşı yaygın tedavi seçeneklerinden biridir (Aktürk 2015, Bao vd. 2015, Anonymous 2018b). Ancak bilinçsiz ve aşırı kullanımdan kaynaklı antibiyotik direnci artmakta ve küresel bir sorun meydana gelmektedir (Fernández vd. 2018, Uddin vd. 2018). Özellikle hayvancılık tesislerinde ve gıda endüstrisinde kullanımına bağlı çapraz direncin ortaya çıkmasıyla önemini giderek kaybetmektedir. Antibiyotiğe dirençli patojenler, hem hayvan sağlığı hem de gıdayla kontaminasyon sonucunda halk sağlığı bakımından olumsuz etkilere sahiptir. (Andreatti Filho vd. 2007). Beta laktamlar dahil olmak üzere etkinlikleri giderek azalmakta ve direnç oranları %98'i aşmaktadır (Bao vd. 2011). Yine aynı şekilde, birçok patojenin özellikle sefalosporinler, aminoglikositler ve florokinolonlar başta olmak üzere geniş spektrumlu antibiyotiklere karşı direncinin giderek arttığı bildirilmektedir. Antimikrobiyel direnç, zaman içinde doğal olarak, konjügasyon ve viral transdüksiyon yoluyla yatay gen transferi gibi genellikle genetik değişikliklerle ortaya çıkar ve direncin yayılmasına neden olur. Bunun dışında yeni direnç mekanizmaların açığa çıkması ve küresel olarak yayılması, yaygın bulaşıcı hastalıkların tedavi edilmesini tehdit etmekte ve bu durum uzun süreli hastalık, sakatlık ve ölümle sonuçlanmaktadır (Huang vd. 2018a).

Özellikle çoklu dirençlilik olmak üzere gelişen bu antibiyotik dirençliliği farklı spektrumlarda yeni antibiyotiklerin geliştirilmesini zorunlu kılmıştır. Ancak günümüzde yeni antibiyotik araştırmaları ve keşifleri oldukça yavaşlamaktadır (Gouvêa vd. 2015). Yeni antimikrobiyel ilaçların, aşıların ve teşhis araçlarının araştırılması ve geliştirilmesi için daha fazla yenilik ve yatırım gerekmektedir (Aktürk 2015). Günümüzde araştırma aşamasında olan sadece birkaç antibiyotik bulunmaktadır. Dolayısıyla bu durum mikrobiyel enfeksiyonu tedavi edebilmek için yeni stratejileri geliştirmeyi zorunlu hale getirmiştir. Bu durum sağlık otoriteleri üzerinde baskı oluşturmuş ve DSÖ tarafından da dile getirilmiştir (Bao vd. 2011, Fernández vd. 2018). Haziran 2017 tarihinde

antimikrobiyel dirence karşı Avrupa Birliği (AB) sağlık eylem planı kabul edilmiştir. Böylece yeni etkili antimikrobiyellerin geliştirilmesi ve direnci artırmak için yeni bir adım atılmıştır (Anonymous 2020a). Bu bağlamda bakteriyofajlar, antibiyotiklere veya bakteriyel patojenlere karşı diğer geleneksel kimyasal kontrol yöntemlerine alternatif olarak potansiyele sahiptir (Galarce vd. 2014).

Alternatif olarak geliştirilen stratejilerden biri olan faj tedavisinin Polonya'da kurulan bir faj tedavi merkezinde antibiyotik tedavisine nazaran daha az maliyetli olduğu bildirilmiştir. Örneğin, metisilin dirençli *S. aureus* enfeksiyonunun tedavisi için antibiyotik uygulanmasının faj uygulamalarına göre 2-8 kat daha maliyetli olduğu bildirilmiştir (Carey-Smith vd. 2006). Ayrıca faj terapisinin erken başarılı sonuçlarının yayınlanmasının ardından, fikir, bu yaklaşımın iyi karşılandığı tarım, veterinerlik, gıda güvenliği ve atık su arıtma gibi diğer alanlara hızla çevrilmiştir. Bunların yanı sıra fajların canlı hayvanlarda zoonotik paojenlere karşı kullanılmasıyla ilgili çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Akhtar vd. 2017). Tarım-gıda bağlamında, tüm gıda zinciri boyunca (çiftlikten çatala) gıda güvenliğini sağlamak için her iki tip antimikrobiyel (faj ve faj litik proteinleri) kullanır. Sonuç olarak fajlar, tarım ve hayvancılık uygulamalarıyla ilişkili antibiyotik direncindeki artışı sınırlamaya yardımcı olur (Abuladze vd. 2008).

2.3 Bakteriyofaj

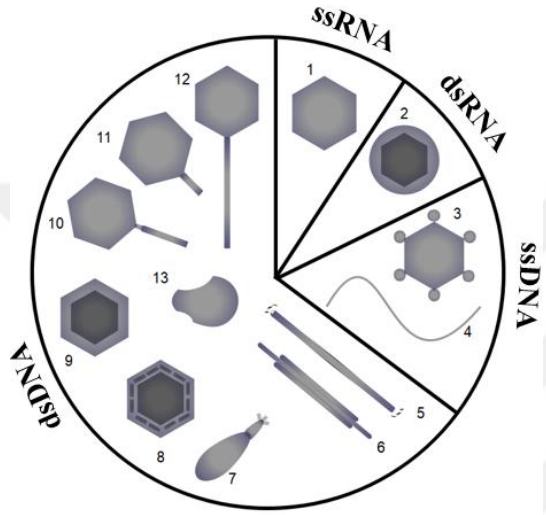
Kısaca "faj" olarak adlandırılan bakteriyofajlar, ökaryotik hücreler yerine prokaryotik hücrelere yani bakterilere spesifik olarak adsorbe olan, bakterilerin metabolik faaliyetlerini bozan ve yaşam döngüleri bakteri hücreleri ile ilişkili olan virüslerdir (Callaway vd. 2011, Guang-Han vd. 2016, Ergin vd. 2017, Grant vd. 2017). Dünya üzerinde hemen hemen her yerde bulunurlar ve tahminen dünyada en bol bulunan yaşam formudur (Krasowska vd. 2015, Chibani vd. 2019). Bilimsel çalışmalara dayandırılarak yeryüzünde yaklaşık 10^{31} kadar faj bulunduğu ve her bir prokaryotik hücre için 10 faj partikülünün olduğu belirtilmektedir (Burrowes vd. 2011, Karpe vd. 2016). Kentsel kanalizasyon, hayvan atıkları, su, toprak, içme suyu, gıdalar gibi konakçılarının bulunduğu tüm yaşam alanlarında ve doğal kaynaklarda en bol ve çeşitli şekilde bulunan organizmalardır. Fajların gıdalarla birlikte rutin olarak oldukça önemli

miktarlarda tüketildiği ifade edilmektedir (Carlton vd. 2005, Komora vd. 2018, Wang vd. 2018). Bu şekilde her yerde bulundukları için genellikle güvenli olarak kabul edilirler (Johnson vd. 2008, Guenther vd. 2012, Fong vd. 2019). Böylece bakteriyel enfeksiyonlarla mücadelede uygunlukları ve karakterizasyonları kolaylaşmaktadır. 2017'ye kadar Uluslararası Nükleotid Dizi Veritabanı İşbirliği (INSDC) veritabanına 25000 bakteriyofaj nükleotit sekansı kaydedilmiştir (Wernicki vd. 2017). Morfolojik olarak ise 6000'den fazla faj tanımlanmıştır. Bununla birlikte bakteriyofajların biyokontrol ajanları olarak etkili kullanımı, fajın etkinliğini ve güvenliğini değerlendirmek için biyolojik ve moleküler özelliklerinin anlaşılmasını gerektirir (El-Shibiny ve El-Sahhar 2017).

Bir veya daha fazla bakteri türünü veya *Archaea*'yı enfekte edebilme kapasitesinde olan binlerce faj çeşidi bulunmaktadır (Demiraslan Aydın 2018). Biyosferde bulunan ve gelişmelerini devam ettiren bakterilerin yaklaşık %4-50'sini enfekte ederek jeokimyasal döngünün devam etmesini sağlarlar (El-Shibiny and El-Sahhar 2017). Özellikle virülent fajlar konakçılarını tedavi edilmeksizin enfekte ederek yaşam döngülerini devam ettirirken konakçılarının yaşam döngülerini engeller ve yeni enfeksiyonlara neden olacak olan fajları ortama salar (Akhtar vd. 2017, Duc vd. 2018). Çoğunluğu hücre içinde optimum olarak 37 °C sıcaklık ve pH 6-6.5 aralığında gelişir (Gökçe 2010).

Virüslerin genel özelliklerine sahip olan fajlar, diğerleri gibi protein bir kılıfla çevrili genetik materyalden oluşan basit bir yapıdır. Temel özellikleri yapısal proteinlerden oluşan kapsit varlığı ve genetik bilgi taşıyıcısı olarak nükleik asit içermeleridir (Karpe vd. 2016, Wenicki vd. 2017, Rogers 2018). Yapısı incelediğinde bir faj partikülü %40 nükleik asit ve %60 kapsit adı verilen protein kılıftan oluşur (Aktürk 2015). Bu nedenle parçalandıklarında ortamda sadece nükleik asit ve amioasitler bırakılır (Carlton vd. 2005). Bakteriyofajlar, kapsit simetrisi bakımından izometrik (çok yüzlü) ve sarmal (spiral) olmak üzere ikiye ayrılır. Genetik materyal açısından çift sarmal DNA, tek sarmal DNA ve RNA'ya sahip olanlar olmak üzere üç gruba ayrılırlar. Bilinen bakteriyofajların birçoğu çift sarmallı DNA'dan oluşan bir genoma sahiptir (Wernicki vd. 2017). Bakteriyofajların morfolojilerine, genetik materyallerine ve temel özelliklerine göre sınıflandırılması şekil 2.3'te gösterilmiştir. Hiçbir organele sahip

olmayan fajlar, metabolik faaliyetlerini gerçekleştirebilmek için konakçılarına ihtiyaç duyarlar ve bu nedenle zorunlu parazit olarak görülürler. Aynı diğer virion partiküller gibi konakçılarının dışında canlılığını devam ettirebilmekte, ancak çoğalabilmek için konakçılarına ihtiyaç duymaktadırlar (Uğur 2018). Kendilerine spesifik olan konakçılarının DNA replikasyonunu ve protein sistemlerini kendi replikasyonları için kullanırlar (Park vd. 2012).

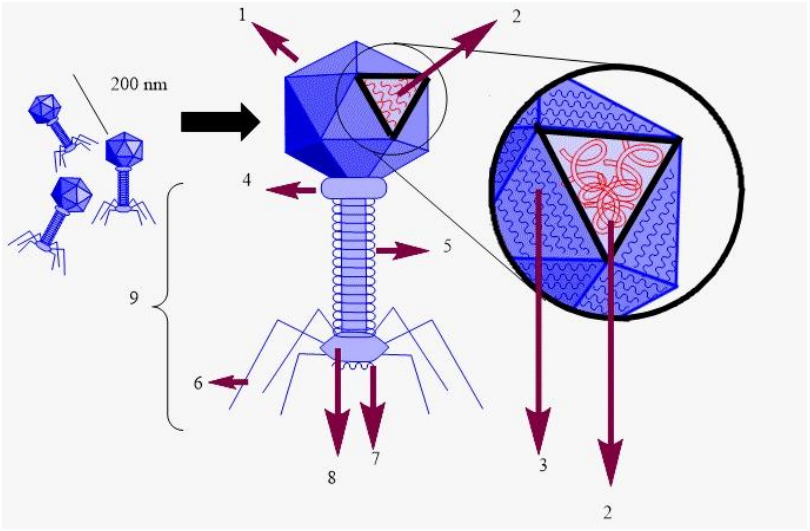


1. *Leviviridae*
2. *Cystoviridae*
3. *Microviridae*
4. *Inoviridae*
5. *Rudiviridae*
6. *Lipothyrixviridae*
7. *Fuselloviridae*
8. *Corticoviridae*
9. *Tectiviridae*
10. *Myoviridae*
11. *Podoviridae*
12. *Siphoviridae*
13. *Plasmaviridae*

Şekil 2.3 Bakteriyofajların morfolojilerine, genetik materyallerine ve temel özelliklerine göre sınıflandırılması (Ackermann 2007, Harada vd. 2018)

Genel olarak bir faj; baş, boyun, kuyruk, taban ve taban uzantıları gibi kısımlardan oluşur. Nükleik asit molekülleri baş kısımda bulunmakla birlikte kapsit adı verilen protein bir kılıfla sarılı halde bulunmaktadır. Bu kılıf, alt birimlerin bir araya gelmesiyle prizma şeklini almıştır (Uğur 2018). Kuyruklu bir bakteriyofajın yapısı şekil 2.4'te gösterilmiştir.

Büyüklükleri nm veya A° ile ifade edilir ve elektron mikroskobuyla görüntülenebilirler. Boyutları 24-200 nm arasına farklılık göstermekle birlikte farklı şekil ve formda bulunabilirler. Tanımlanan fajlar arasında T4 fajı 200 nm uzunluk ve 80-100 nm genişlikle en büyük fajdır. Bir fajın ağırlığı ortalama 5×10^{-13} gramdır (Demiraslan Aydın 2018).



1. Baş
2. Nükleik asit
3. Kapsomer
4. Boyun
5. Kuyruk kını
6. Kuyruk iplikçikleri
7. Kuyruk dikeni
8. Taban plakası
9. Kuyruk

Şekil 2.4 Kuyruklu bir bakteriyofajın yapısı (Özgün Çizim)

Yaşam faaliyetlerini devam ettirebilmek için konakçılarına ihtiyaç duyan fajlar, yüksek seviyede konakçı spesifik oldukları için genellikle spesifik türleri hatta suşları enfekte edebilirler (Akhtar vd. 2017). Bu spesifiklik ise fajların kuyruk kısımlarında yer alan reseptörlerle hedef konakçının hücre çeperinde bulunan yüzey proteinlerine, lipoposakkarit, taykoik asitler, pili ve flagella gibi kısımların bağlanmasıyla ilgilidir. Gram negatif bakterilerin bağlanma reseptörleri genellikle lipopolisakkaritler, pili, flagella ve diğer yüzey proteinleri iken Gram pozitif bakterilerde peptidoglikan, teikoik asit, lipoteikoik asitler ve diğer yüzey proteinleridir (Janez ve Loc-Carillo 2013). Konakçılarına yüksek özgüllüğe sahip olma özellikleriyle birlikte insanlar, hayvanlar ve bitkiler gibi ökaryotik canlıları enfekte edemezler (Park vd. 2012). Bu spesifiklik sayesinde doğal mikrobiyotaya zarar vermeden sadece hedef konakçıyı enfekte edebilmektedirler (Borie vd. 2008, Akhtar vd. 2017). Bu sayede fermente gıdalarda da starter kültür üzerinde etki etmeden mevcut patojenleri enfekte etmekte kullanılabilirler (Burrowes vd. 2011, Bueno vd. 2012). Ancak düşük spesifiklikle birlikte bazı fajlar, bazı benzer bakteri tür ve suşlarını da enfekte ettiği saptanmıştır (Choi vd. 2013). Bu şekilde enfekte edebilme kabiliyeti "yerel adaptasyon" olarak adlandırılmaktadır. 1998 yılında yapılan bir çalışmada hem *Pseudomonas aeruginosa* hem de *E. coli*'yi enfekte edebilen fajların izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Benzer şekilde 1985 yılında yapılan bir çalışmada ise birden fazla streptomiset türünü enfekte edebilen fajların izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Bielke vd. 2007).

Fenotip ve genotip özellikleri ve konakçı aralığı açısından fajlar heterojen bir virüs grubudur. Biyokontrol açısından antibakteriyel ajan olarak sadece virülent fajlar kullanılır ve toksin ile antibiyotiğe dirençli genleri bir konakçıdan diğerine aktaramadıkları için güvenli olarak kabul edilirler (El-Shibiny ve El-Sahhar 2017).

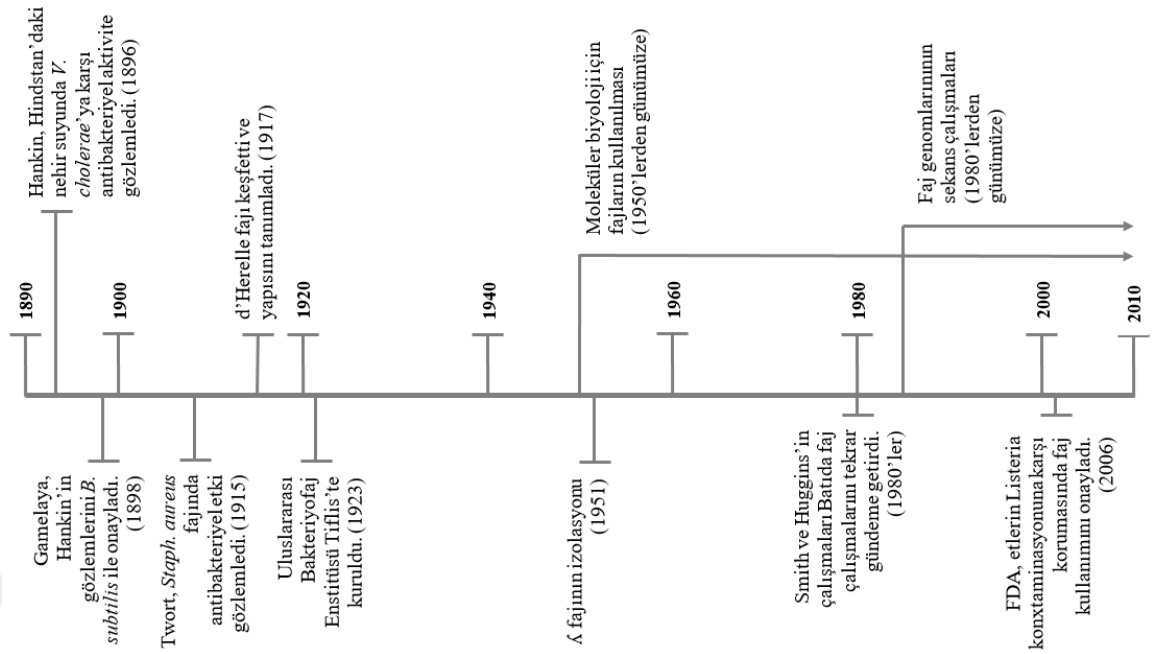
Fajlar, endüstride yaygın olarak kullanılan dezenfektanlara ve ayrıca pH, sıcaklık gibi bazı çevresel faktörler yönünden bakterilere göre çevresel zorluklara karşı genel olarak daha dirençli olma eğilimindedir (Fernández vd. 2018).

2.3.1 Bakteriyofajların tarihçesi

1896 yılında M. Ernest Hankin'in Hindistan'da bulunan Ganj ve Jumma nehirlerinde *Vibrio cholerae*'yı yok edebilen antibakteriyel etkiye sahip partikülleri tespit etmesiyle bilimsel anlamda ilk bulgular ortaya çıkmıştır. İki yıl sonra benzer tespitler *Bacillus subtilus* ile çalışan Rus bakteriyolog tarafından bildirilmiştir (El-Shibiny ve El-Sahhar 2017, Gündoğdu ve Ulu-Kılıç 2018). Ancak Frederick W. Twort'a kadar kimse hipotez olarak savunmamıştır. Daha sonraki yıllarda Felix d'herelle ve Frederick W. Twort, fajlarla ilgili ilk çalışmaları yapmış ve sonraki çalışmalara öncülük etmiştir (Aktürk 2015). 1915 yılında Twort, buzağılarda stafilokok enfeksiyonları için yaptığı aşı çalışmalarında bakteriyel gelişmeyi inhibe eden ve tanımlanamayan şekilsiz granüller olarak bildirmiştir (Mkakosya 1999). Ardından 1918 yılında d'Herelle, fajları izole etmiş ve tavuklarda *Salmonella* Gallinarium'a karşı ilk faj terapisini uygulamıştır (Wernicki vd. 2017). Kanadalı bilim adamı Felix d'Herelle, dizanteri hastalığını atlatmış bireylerin dışkılarını filtre etmiş ve filtratın dizanteri etmeni *Bacillus dysenteriae*'yı enfekte edebilen yapılardan bahsetmiş ve bu yapıların zorunlu hücre içi parazit olduğunu iddia ederek bakteriyofaj terimini ilk olarak kullanmıştır (Demiraslan Aydın 2018). Bakteriyofaj teriminin kökeni Yunanca'dan "bacteria" bakteri ve "phagein" yemek terimlerinin birleşmesiyle gelmiştir. Bunun yanı sıra d'Herelle, çift tabaka agar plak yöntemini kullanarak zon oluşumunu gözlemlemiş ve oluşan bu berrak zonlara "plak" diyerek bu terimi de literatüre kazandırmıştır (Rogers 2015, Gündoğdu ve Ulu-Kılıç 2018).

Fajların keşfinden kısa süre sonra üzerlerine yapılan bilimsel çalışmalar artmış ve hem hayvan hem de insan hastalıklarında terapötik tedaviler için kullanılmaya başlanmıştır. Bilinen ilk bakteriyofaj kullanımı 20. yüzyılın başlarında kolera, dizanteri gibi hastalıkları ve *Salmonella* kaynaklı enfeksiyonları kontrol altına alabilmek için uygulanmıştır (Huang 2018b). İlk olarak 1921 yılında Bruynoghe ve Maisin, Stafilokok sebepli hastalığa karşı faj uygulamasını gerçekleştirmiş ve terapötik amaçlı ilk bilimsel raporu yayınlanmıştır (Aktürk 2015). Ayrıca d'Herelle çalışmalarıyla 1923 yılında Gürcistan'ın Tiflis şehrinde Uluslararası Bakteriyofaj Enstitüsünün kurulmasına yardımcı olmuştur. 1952 yılında da Polonya'da kurulan Hirszfeld Enstitüsü'nün kurulmasıyla faj kokteyl preparatlarını geliştirip üreten önemli bir merkez haline gelmiştir (Endersen vd. 2014, Gündoğdu ve Ulu-Kılıç 2018).

1940'lı yıllarda Alexander Fleming'in *Penicillium notatum*'un antibakteriyel etkisini ortaya çıkarmasıyla birlikte penisilin başta olmak üzere geniş antibakteriyel spektrumlu antibiyotiklerin keşfedilmesi üzerine ilgi çekmiştir ve faj terapisi özellikle Batı Avrupa ülkelerinde popüleritesini yitirmiş ve bilim dünyasının çalışmalarında yerini kaybetmiştir. Böylece antibiyotik çağı başlamıştır (Borie vd. 2008, Drulis-Kawa vd. 2012). Ayrıca faj biyolojisinin ilk çalışmalarında faj doğası hakkında belirsizliklerin bulunması, faj terapilerindeki etkinin çoğunlukla insan bağışıklığıyla alakalı veya bakteriyel enzimlerin bir bileşeni olduğu düşünüldüğü için önemini o tarihlerde kaybetmiştir. Bu gibi sebeplerden ötürü faj terapisi evrensel olarak kabul görmemiş ve çalışmaları azalmıştır (Higgins vd. 2005, Burrowes vd. 2011). Sadece Polonya, Gürcistan ve Rusya gibi birkaç ülke bu konudaki çalışmalara devam etmiş tedavi yöntemi olarak kullanımında ilerlemiştir (Şekil 2.5) (El-Shibiny ve El-Sahhar 2017).



Şekil 2.5 Bakteriyofajların tarihçesi (Özgün Çizim)

Ancak fajların sahip olduğu ekolojik etki, potansiyel uygulama kolaylığı, insan sağlığı üzerindeki olumlu etkileri, sentetik aseptik ajanların aksine gıda güvenliği potansiyelinin popüler hale gelmesi ve çoklu ilaç dirençliliğinin artması nedeniyle keşiflerinin ardından 100 yıl sonra ilgileri yeniden üzerine çekmiştir (Drulis-Kawa vd. 2012, Jonge vd. 2019). Özellikle vankomisine dirençli *Enterococci* ve metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* gibi önemli patojenlerin neden olduğu önemli enfeksiyonlara karşı olumlu sonuçlar getirmesiyle araştırmalar ciddi boyutta artmıştır (Johnson vd. 2008). AB, 2013 yılında faj terapisinin uygulama potansiyelini araştırmak için "Phagoburn" isimli fonu sağlamıştır (Huang vd. 2018). Ayrıca bakteriyofajlar, hayvan ve kümes hayvanlarında patojenleri kontrol etmek için terapötik ajanlar olarak kullanılmaktadır (Firlieyanti vd. 2016).

2.3.2 Bakteriyofajların sınıflandırılması

Viral partiküllerin doğrudan doğruya görüntülenmesi ve sınıflandırılması, transmisyon elektron mikroskobunun bulunması ve kullanılmasıyla mümkün hale gelmiştir. Fajların sınıflandırılması ilk olarak d'Herelle tarafından birçok ırktan oluşan tek faj grubu olarak

önerilmiştir. Daha sonra 1943 yılında Ernst Ruska tarafından fajların yapısal olarak sınıflandırılması önerilmiştir. (Salmond ve Fineran 2015, Yüksel vd. 2016).

Sınıflandırılmalarında morfolojik özellikleri ve genomik materyallerinin yapısı dikkate alınmaktadır. Morfolojik özellikleri için kuyruklu/ kuyruksuz, başlı/ başsız, zarlı/ zarsız olmalarına bakılırken genomlarının tek zincirli veya çift zincirli DNA veya RNA'ya sahip olmaları dikkate alınır (Demiraslan Aydın 2018). Fajların sınıflandırılması aşamasında 1967 yılında Bradley, morfolojik yapılarını ve nükleik asit tiplerini göz önüne alırken 2003 yılında Ackermann, morfolojik özelliklerinin yanı sıra tek zincirli veya çift zincirli nükleik asit yapılarını da değerlendirmiştir. Günümüzdeki mevcut faj sınıflandırılması Bradley'in sınıflandırılmasından türetilmiştir. Yıllar içinde yeni ailelerin ve cinslerin keşfiyle fajların sınıflandırılması genişlemiştir (Ackermann 2009) Bakteriyofajların taksonomi kriterleri ICTV (Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi, EC 48, Budapeşte, Macaristan, Ağustos 2016) tarafından uygulanarak genom tipi ve virion morfolojisine dayanmaktadır (Wernicki vd. 2017, Chibani vd. 2019).

Bradley 1967 yılında baş ve kuyruk özelliklerine göre bakteriyofajları, A'dan F'ye kadar 6 tipte gruplandırmıştır. Bradley sınıflandırılması şekil 2.6'da verilmektedir. Bu sınıflandırmada kasılabilen kılıflı, kuyruklu, çift iplikli linear DNA fajlar A tipi faj; uzun kuyruklu, kılıflı, çift iplikli lineer DNA fajlar B tipi faj; kısa kuyruklu, kılıfsız, çift iplikli lineer DNA fajlar C tipi fajlar; kuyruksuz, büyük kapsomerli, tek iplikçi DNA fajlar D tipi fajlar; kuyruksuz, küçük kapsomerli, tek iplikçi RNA fajlar E tipi fajlar; başsız, ipliksi ya da filamentöz, tek iplikçi RNA fajlar ise F tipi fajlar olarak isimlendirilmiştir.

Ackermann ise morfolojik yapılarını temel alarak kuyruklu, polihedral, flamentöz ve pleomorfik fajlar olmak üzere dört gruba ayırmış ve bunların yanı sıra nükleik asitlerini de dikkate alarak 1 takım, 13 aile ve 31 cins olarak tanımlamıştır (Aydın 2018). Ackermann sınıflandırılması çizelge 2.2'de verilmiştir.

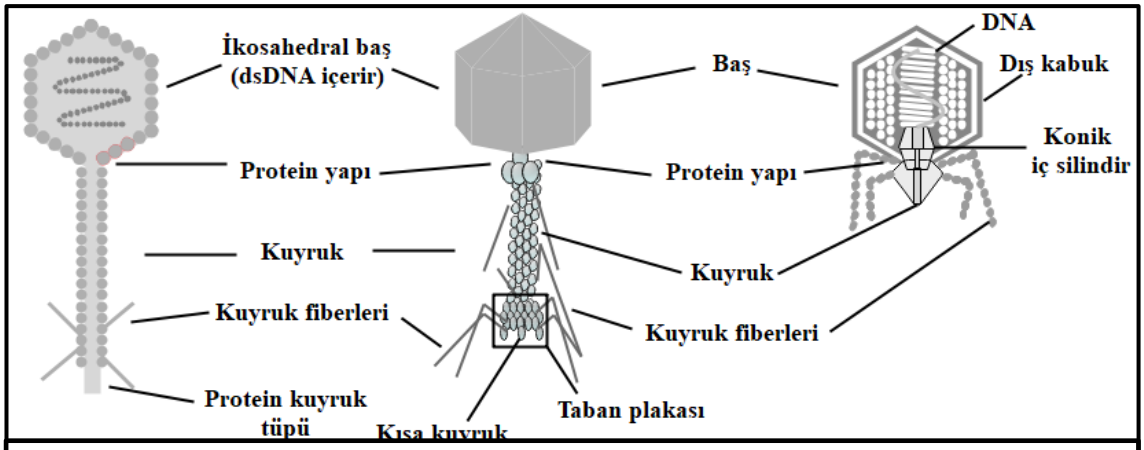
TİP	ŞEKİL	NÜKLEİK ASİT	ÖZELLİK	ÖRNEK
A		DNA Çift iplikçik Lineer	Polihedral baş, uzun kuyruk etrafında kontraktil kılıf kuyruk levhası (hegzaganol) kuyruk iğnesi ve fibrilleri	T2 T4 T6
B		DNA Çift iplikçik Lineer	Polihedral baş, kontraktil kılıfı olmayan uzun kuyruk	T1 T5 λ
C		DNA Çift iplikçik Lineer	Polihedral baş, kontraktil kılıfı olmayan kısa kuyruk	T3 T7 P22
D		DNA Tek iplikçik Sirküler	Kuyruksuz, ikosahedral baş, kapsid üzerinde çok büyük kapsomer	ΦX174 S13
E		RNA Tek iplikçik Lineer	Kuyruksuz, ikosahedral baş, kapsid üzerinde çok küçük kapsomer	F2R17 Fr MS2
F		RNA Tek iplikçik Lineer	Fleksibl filamentöz	FE fd M13

Şekil 2.6 Bakteriyofajların Bradley sınıflandırması

Faj uygulamalarında antimikrobiyel olarak ilginin üzerinde toplandığı kuyruklu fajlar, 4950 üyesiyle tanımlanmış fajların %96'sını içeren en büyük faj grubudur. Nükleik asitlerini saran kapsit ile uzun veya kısa olmak üzere kuyruğa sahiptirler ve fizyolojilerine göre çok fazla çeşitleri mevcuttur. Kuyruk kısımları, fajların konakçıları üzerinde adsorbsiyonunu sağlar ve genetik materyalin konakçıya aktarılmasında kanal görevi alır. Kuyruku fajlar kendi içlerinde *Myoviridae* (%25), *Siphoviridae* (%61) ve *Podoviridae* (%14) olarak üç aileye ayrılır (Bradley sınıflandırmasına göre A, B ve C grupları). *Myoviridae*'ler kasılabilir kuyruğa, *Siphoviridae*'lar uzun kuyruğa, *Podoviridae* kısa kuyruğa sahiptirler (Drulis-Kawa vd. 2012, Rogers 2015).

Çizelge 2.2 Bakteriyofajların Ackermann sınıflandırması

MORFOLOJİ	NÜKLEİK ASİT	AİLE	CİNS	ÖZELLİKLER	ÖRNEK
Kuyruklu	DNA, ds, L	*Caudovirales* *Myoviridae* *Siphoviridae* *Podoviridae*	15 6 6 3	Kontraktil kuyruk Uzun kuyruk Kısa kuyruk	T4 λ T7
Polihedral	DNA, ss, C ds, C, T ds, L RNA, ss, L ds, L, S	*Microviridae* *Corticoviridae* *Tectiviridae* *Leviviridae* *Cystoviridae*	4 1 1 2 1	Lipit içeren kompleks Kapsit Lipoprotein kaplı kapsit	φX174 PM2 PRD1 MS2 φ6
Filamentöz	DNA, ss, C ds, L ds, L	*Inoviridae* *Lipothrixviridae* *Rudiviridae*	2 1 1	Lipit zarf Uzun veya kısa filament TMV benzeri	fd TTV1 SIRV
Pleomorfik	DNA, ds, C, T ds, C, T	*Plasmaviridae* *Fuselloviridae*	1 1	Zarf, lipit, kapsit yok Limon formlu, kapsit yok	L2 SSV1
C, dairesel; L, lineer; S, segmentli; T, süper helikal; 1, tek zincirli; 2, çift zincirli.					



Soldan sağa *Siphoviridae* (uzun ve esnek kuyruk), *Myoviridae* (çift katlı kısalabilir kuyruk), *Podoviridae* (kısa ve kalın kuyruk)

Şekil 2.7 *Caudovirales* takımına ait üç ailenin basit morfolojisi (Özgün Çizim)

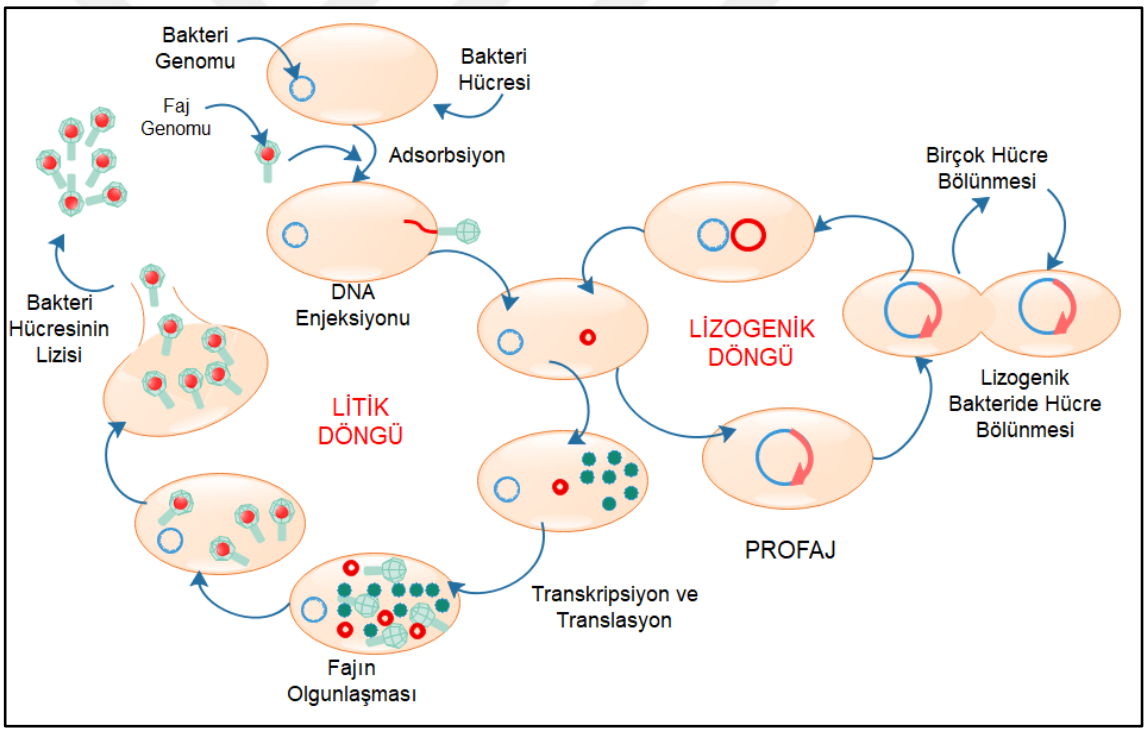
2.3.3 Bakteriyofajların konakçı ile ilişkileri, çoğalmaları ve yaşam döngüleri

Bakterilerin zorunlu hücre içi parazitleri olan bakteriyofajlar çoğalmak için çeşitli yaşam döngülerine sahiptirler. Fajlar, konakçılarına tutunduktan sonra genetik materyalini konakçısına aktarır ve litik, lizogenik ve non litik olmak üzere üç farklı yaşam döngüsünden birini seçerek enfekte olurlar (Rogers 2015). Litik enfeksiyon şekline sahip olan fajlara virülent faj adı verilmektedir. Bu yaşam şeklinde fajlar kendi makromoleküllerini sentezleyebilmek için konakçısı olduğu bakteriyi aktif olarak kullanırlar. Virülent fajlar, konakçısının metabolik faaliyetlerini üstlenir ve daha fazla faj partikülünün oluşturulması için yönlendirir (El-Shibiny ve El-Sahhar 2017). Hücre içerisinde faj genomunda kodlanmış olan litik enzimler bakteri hücresini parçalar ve konakçı hücre içerisinde oluşan yeni faj partikülleri dışarı salınır. Litik yaşam döngüsüne sahip olan fajlar, genel olarak bir bakteriyi enfekte ettikten sonra sitoplazmasında yaklaşık olarak 300'e kadar yeni faj partikülü oluşturur. Üretilen bu yeni fajların ortama salınmasıyla yeni generasyon fajlar da enfeksiyona neden olur ve bu döngü enfekte olabilecek yeni bakterilerin kalmamasıyla sonlanır (Higgins vd. 2005, Aktürk 2015, Uğur 2018).

Lizogenik enfeksiyonda ise faj genomu konakçı hücrenin DNA'sına katılır ve konakçı hücre içerisinde yaşamını sürdürür. Bu şekilde faj genomu konakçı genomunda bastırılmış bir şekilde muhafaza edilir (Endersen et al. 2014). Bu şekilde enfeksiyon oluşturan fajlara ise temperent faj denilmektedir. Faj genomunun konakçı DNA'sına katılmış formuna ise profaj adı verilmektedir. Profaj taşıyan bakteri hücresinde lizis aşaması gerçekleşmez ve profajı taşıyan bakteri lizogen bakteri olarak anılırken bu olay lizogeni olarak adlandırılır. Konakçı bakteri profajla birlikte yaşamsal faaliyetlerini devam ettirirken çoğalma aşamasında bakteri-faj genomu transfer edilir. Bu nedenle lizogenik yaşam döngüsü bakterilerdeki genetik çeşitliliğin arkasındaki ana nedenlerden biri olarak görülebilir (Hooton vd. 2011, El-Shibiny ve El-Sahhar 2017). Ancak konakçı yaşamsal olaylar açısından tehlikeye düştüğü zaman profaj bu durumdan kurtulur ve virülent bir karakter kazanabilir. Bu şekilde litik döngüyü başlatabilir ve faj kendi yaşamını garantiye almış olur. Ayrıca UV, mitomisin C, mutajenik maddeler ve

inkübasyon sıcaklığı gibi faktörlere ve değişimlere bağlı olarak profajlar litik forma geçebilir (Burrowes vd. 2011, Aktürk 2015, Ergin vd. 2017).

Temperent fajlar, profaj formuna geçtikten sonra konakçılarının metabolik faaliyetleri üzerinde etkisi olmazken litik yaşam döngüsüne sahip olan virülent fajlar konakçılarının metabolik faaliyetlerini bozup lize ederler ve böylece bakterisidal etkiye sahiptirler (Bueno vd. 2012, Park vd. 2012). Litik ve lizogenik yaşam döngüleri şekil 2.8'de verilmiştir. Fajların antimikrobiyel ajan olarak kullanılabilmeleri için litik yaşam döngüsüne sahip olmaları gerekir (Burrowes vd. 2011). Ayrıca ılıman fajların terapötik olarak doğrudan kullanımlarında aktif hale gelseler bile genetik materyalin bir bakteriden diğerine geçebilme ihtimali göz önüne alınarak kaçınılır (Johnson vd. 2008).

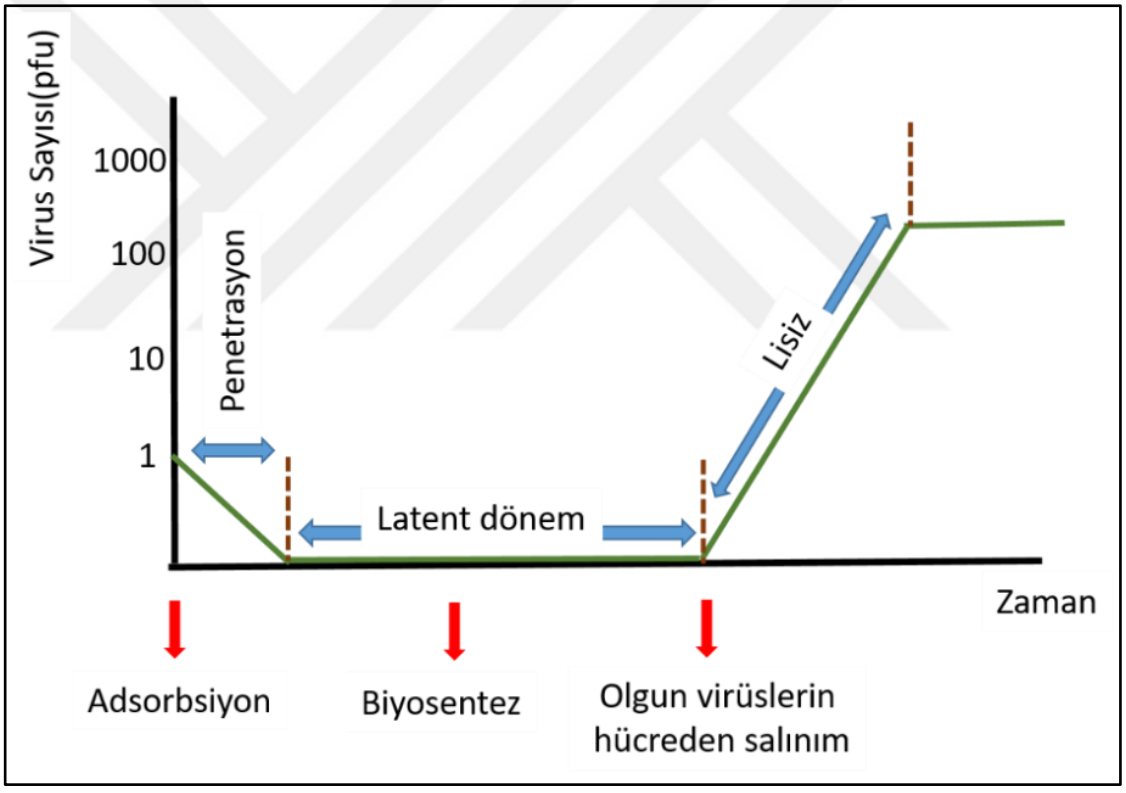


Şekil 2.8 Litik ve lizogenik yaşam döngüleri (Özgün Çizim)

Nonlitik enfeksiyonda ise faj bakteriye enfekte olduktan sonra replikasyonunu gerçekleştirir ve hücre membranlarına zarar vermeden dışarı salınır. *E. coli*'ye özgü olan M13 ve fd fajları birer nonlitik faj olmakla birlikte bu enfeksiyon tipi filamentöz fajlarla sınırlıdır (Burrowes vd. 2011, Uğur 2018).

Bakteriyofajların replikasyonları birçok açıdan ökaryotik canlıların virüslerine benzemektedir. Fajların çoğalabilmeleri için her şeyden önce kendilerine özgü olan konakçı bakterilerin bulunduğu ortamda rastgele olarak bir araya gelmesi ve konakçı yüzeylerine adsorbe olmalarını gerektirir. Fajların çoğalmaları ve yeni bir soy oluşturmaları litik enfeksiyon ile gerçekleşmektedir. Litik enfeksiyon; adsorbsiyon, penetrasyon, latent dönem ve liziz evreleriyle tamamlanır (Uğur 2018). Litik enfeksiyonun ilk adımı, faj konakçısının yüzeyine adsorbe olduğunda gerçekleşir. Daha sonra başarılı bir şekilde faj nükleik asidinin konakçı hücre içerisine penetrasyonu, hücre içinde gerçekleşen replikasyon ve yeni faj partiküllerinin salınımı ile tamamlanır (Binetti vd. 2002). Adsorpsiyon aşaması, enfekte edici fajın ve hedef konakçının yüzeylerindeki reseptörlerin etkileşimiyle ilgili oldukça spesifik bir işlemdir (Denes ve Wiedmann 2014). Hücre yüzeyindeki reseptör moleküllerini tanıma ve ona bağlanma yeteneği, bir bakteriyofajın konakçı aralığını büyük ölçüde belirler (Endersen vd. 2014). Penetrasyon evresinde, faj kuyruk kısmıyla birlikte konakçı üzerine tutunduktan sonra kılıf kasılmaya başlar. Faj kapsidi içerisinde bulunan faj nükleik asidi membrandan geçerek periplazmik boşluğa geçer ve sitoplazmaya aktarılır. Böylece genetik materyalin enjeksiyonu gerçekleştirilir. Faj genetik materyali konakçı sitoplazmasına aktarıldıktan sonra bakterinin çoğalma faaliyetleri durmaktadır. Bu aşamadan yeni faj kısımları oluşumuna kadar geçen süreye latent dönem adı verilmektedir. Bu aşamada konakçının metabolik faaliyetlerinden yararlanılarak viral nükleik asitleri ve proteinleri çoğaltılır. Konakçı sitoplazması içerisinde yeni oluşan faj kısımları bir araya gelerek olgun fajları oluşturur. Son olarak, fajda kodlanan litik enzimler konakçı bakterinin hücre duvarında bulunan peptidoglukan tabakasının zedelenmesine neden olur ve çeper iç ozmotik basıncına dayanamayarak yırtılır. Bu şekilde konakçı içerisinde oluşan faj ortama salınır. Patlama büyüklüğü faj tipine göre değişiklik gösterirken konakçı içerisinde oluşan faj sayısı hem konakçı bakteri hem de ortam koşullarına bağlıdır. Faj türüne göre değişiklik gösterse bile bu döngü genel olarak 15 dk sürer. Liziz aşamasında rol alan enzimler doğrudan konakçının hücre duvarındaki peptidoglukanın bağlarını hedef alır. Bu enzimler litik yaşam döngüsünün sonunda sentezlenirler (Burrowes vd. 2011, Drulis-Kawa vd. 2012, Janez ve Loc-Carillo 2013).

Elektron mikroskobunun keşfiyle birlikte sadece sınıflandırma değil aynı zamanda fajların konakçı hücre içerisindeki gelişim ve çoğalma süreçleri de şemalaştırılmıştır. Emory Ellis ve arkadaşları, geliştirdikleri "Tek Aşamalı Gelişme Kurvesi" yöntemiyle fajın konakçıya penetrasyon aşamasından salınmasına kadar ölçümler yapmış ve istatistiksel olarak sonuçları vermiştir (Aydın 2018). Ortamda bulunan faj sayısına karşılık inkübasyon süresi grafiğe aktarıldığında faj gelişim eğrisi elde edilmektedir. Latent dönemin tamamlanmasıyla birlikte lizis aşaması gerçekleşir ve ortamda bulunan olgun faj sayısında ciddi bir artış meydana gelir. Bütün enfekte olmuş konakçı bakterilerin lize olmasıyla birlikte olgun faj sayısı en üst seviyeye ulaşır ve sabit kalır (Uğur 2018). Tek aşamalı gelişme kurvesi şekil 2.9'da verilmiştir.



Şekil 2.9 Tek aşamalı gelişme kurvesi

Her faj, her bakterinin yüzeyine tutunamaz. Bu olay konakçı bakterinin hücre duvarında reseptörlerin yani fajların adsorbsiyonun gerçekleştiği noktaların bulunmasına bağlı bir olaydır. Pilus, flagella gibi organeller ile; protein, lipoprotein, lipopolisakkarit, taykoik asit vb. moleküller, fajların adsorbsiyonu için gerekli reseptörleri oluştururlar. Fajlar bu molekül ve yapılardan konakçı bakteri üzerine tutulur ve adsorbe olur. Adsorbsiyon

aşamasının gerçekleşmesi için konakçı hücre çeperinin faja uygun olması gerekmekle birlikte ortamda bulunan Mg^{+2} ve Ca^{+2} gibi iyonlar ve L/ D triprofan gibi yapıların varlığının adsorbsiyonu kolaylaştırdığı yapılan çalışmalarca ortaya konulmuştur (Uğur 2018). Konakçı reseptör bağlayıcı proteinin adaptasyonuna ve diğer yaşam döngülerinin farklı aşamalarında görev alan proteinlerine göre konakçı aralığı çeşitliliği belirlenir (Jonge vd. 2019).

2.4 Gıda Güvenliği

Gıda güvenliği bakımından gıdaların her türlü bozulmadan ve bulaşıdan arındırılmış hale getirilmesi gerekmektedir. Güvenli gıda kaynakları ulusal ekonomileri, ticareti ve turizmi destekler, gıda ve beslenme güvenliğine katkıda bulunur ve sürdürülebilir kalkınmayı destekler (Bueno vd. 2012). Ancak gıda piyasasının küreselleşmesi ve minimum işlenmiş gibi yeni ürün taleplerinden dolayı gıda zincirleri daha fazla uzamakta ve bulaşı riski artmaktadır. Ayrıca gıda kaynaklı patojen bakteriler ortamda meydana gelen değişikliklere adapte olup hızlı bir şekilde cevap verebilir ve böylece çeşitli koşullar altında hayatta kalma yeteneği kazanırlar. Bu cevap, genel olarak gen ekspresyonu ile ilgili olup hücre fizyolojisinde birtakım değişiklikler meydana gelir. Meydana gelen fizyolojik değişiklik sonucunda antimikrobiyellere duyarlılığını azaltmakta ve gıda endüstrisinde tespit ve indirgeme amaçlı yapılan uygulamaların etkinlikleri azalmaktadır (Cufaoglu ve Ayaz 2018). Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) ve Amerika Birleşik Devletleri Tarım Dairesi (USDA) Gıda Güvenliği Denetim Servisi gibi kurumların yanı sıra birçok ülke tüketime hazır gıdalarda bazı patojen mikroorganizmalar için sıfır tolerans politikası uygulamaktadır. Bu nedenle gıda güvenliğini devam ettirebilmek adına da yeni alternatif arayışlar içerisine girilmiştir (Kocharunchitt, vd. 2009, Denes ve Wiedmann 2014).

Dolayısıyla gıda endüstrisinde litik fajların kullanılması ve faj bazlı ürünlerin geliştirilmesi ve kullanılması hızlanmakta ve gıda güvenliği açısından önem kazanmaktadır (Endersen vd. 2014, Fernández vd. 2018). Bakteriyofajların gıda güvenliği müdahalesine katkı olarak uygulanması yakın zamanda araştırılmış ve birkaç ticari preparat onaylanarak pazarlanmıştır. Ayrıca üretim tesislerinde fajlar, gıda üretimi

ve depolanmasının hasat öncesi ve hasat sonrası aşamalarında spesifik bakterileri kontrol etmek için de kullanılmıştır (Akhtar vd. 2014). Faj preparatları üretim zincirinin herhangi bir aşamasında uygulanabilir durumdadır (Carey-Smith et al. 2006).

2006 yılında FDA ve USDA, gıdada *Listeria monocytogenes*'i kontrol altına alabilmek için spesifik LMP-102 faj preparatını, tüketime hazır gıdalarda onaylamış ve GRAS statüsünü vermiştir (Kocharunchitt vd. 2009, (Bueno vd. 2012). Bu ürün kontaminasyonu azaltabilmek için doğrudan uygulanabilen bir faj kokteylidir (Denes ve Wiedmann 2014). Ayrıca yine *Listeria monocytgenes* için (Listshield^{TM}), *Salmonella enterica* için (SalmoFresh^{TM}) ve *Escherichia coli* için (Ecoshield^{TM}) hazırlanan faj preparatlarına FDA tarafından GRAS statüsü verilmiştir. Bir ABD şirketi yüzey dezenfeksiyonu için *Salmonella* (BacWash^{TM}) ve *E. coli* O157:H7 (Finalyse^{TM}) için iki faj preparatını ticarileştirmiştir. Ayrıca ABD'de yüzey dezenfeksiyonunun yanı sıra gıda katkı maddesi olarak hazırlanan faj preparatları pazarlanmaktadır. 2009 yılında ise Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) tarafından hayvansal gıdalarda faj preparatlarının kullanımı değerlendirilmiş ve tüketiciler için zararsız olduğu kanısına varılmıştır (Kang vd. 2013, Fernández vd. 2018). Gıda endüstrisinde patojenlere karşı ticari olarak kullanılabilen ticari faj ürünleri çizelge 2.3'te verilmiştir. Bakteriyofajlar sadece bakterileri enfekte edip ve insanlara zararlı olmadığı bilinmektedir. Ayrıca kendi kendilerini kopyalayıp sınırlandırabilirler bu da onları kontamine gıda ürünlerinin dekontaminasyonu için güvenli kılar. Bu sonuçların doğrultusunda yeni bakteriyofaj bazlı ürünlerin geliştirilmesine çalışılmaktadır (Bardina vd. 2012, Bai vd. 2019).

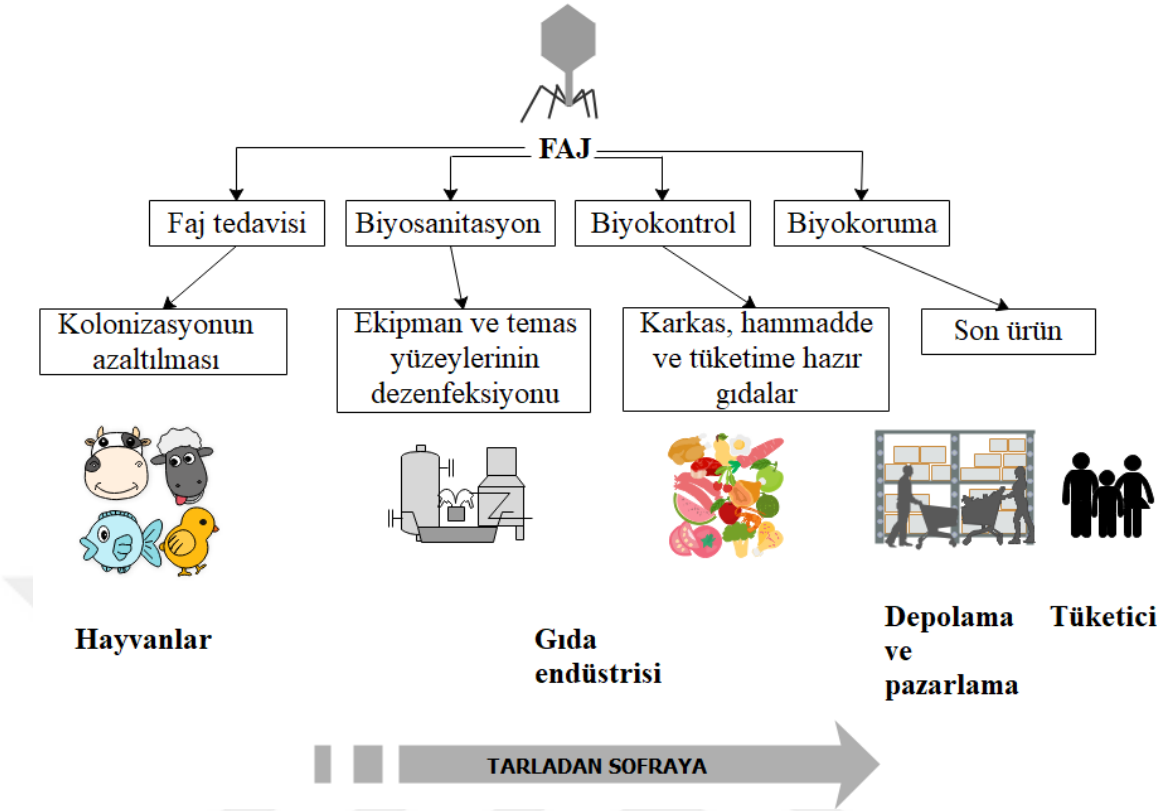
Bu gelişmelerin sonucunda doğru (iyi) üretim uygulamalarına (GMP) uygun olarak bakteriyofaj üretimi ve saflaştırma çalışmaları artmıştır. Ayrıca ticarileştirilmiş faj preparatlarında hedef bakteriye ait en etkili faj karışımlarının tasarlanmasıyla etkinlik artırılabilmektedir (Fernández vd. 2018).

Çizelge 2.3 Ticari faj ürünleri

PREPARAT/ ONAYLAYAN	**HEDEF BAKTERİ**	**KULLANIM ALANI**	**FİRMA**
AgriPhage™ (EPA)	*Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria *Pseudomonas syringae* pv. Tomato	Domates ve biber bitkileri, elma, armut ve narenciye ağaçları	Omnilytics Inc., ABD (https://www.agriphage.com/)
BioTector	*Salmonella, C. perfringens, Escherichia coli*	Kümes hayvanları	CheilJedang Corporation, Güney Kore (https://m.cjbio.net/en/products/biotector.do)
EcoShield PX™ (FDA)	*Escherichia coli*, Shiga toxin producing *E. coli* (STEC)	Kırmızı et ve ürünleri, kümes hayvanları, meyve ve sebzeler, süt ürünleri, balık ve diğer deniz ürünleri	Intralytix, USA (http://www.intralytix.com)
ListShield™ (FDA)	*Listeria monocytogenes*	Tüketime hazır ürünler	Intralytix, USA (http://www.intralytix.com)
LISTEX P100 (FDA)	*Listeria monocytogenes*	Et ve ürünleri, kanatlı et ve ürünleri, balık, kabuklu deniz ürünleri ve süt ürünlerinin işlenmesi sırasında	EBI Food Safety (http://www.ebifoodsafety.com)
SalmoFresh™ (FDA)	*Salmonella enterica*	Kırmızı et ve ürünleri, kanatlı ürünleri	Intralytix, USA (http://www.intralytix.com)
ShigaShield™ (FDA)	*Shigella* spp.	Tüketime hazır kırmızı et ve ürünleri, kanatlı et ve ürünleri, balık ve kabuklu deniz ürünleri, meyve, sebze ve süt ürünleri	Intralytix, USA (http://www.intralytix.com)

2.5 Faj Terapisi

Gıda zincirinde, gıda güvenliğini artırabilen ürünler talep edilmektedir. Fajlar; üretim, depolama ve dağıtım sırasında biyolojik bir alternatifi temsil eder. Bu nedenle faj uygulamalarının, patojen mikroorganizmalarla kontamine olmuş ya da olabilecek gıdalarda gerçekleştirilmesiyle ilgili bazı yaklaşımlar bulunmaktadır (Ramirez vd. 2018). Klinik olarak ekosistemde bakteriyofajların, enfeksiyondan sorumlu bakteri popülasyonunu indirgemek için kullanılması stratejisine faj terapisi denilmektedir. Temel prensibi daha önceden saflaştırılmış belirli dozdaki fajın ortama veya enfekte bireye verilmesi ve sonucunda fajın enfeksiyon sebebi patojeni yok etmesine dayanır (Lee vd. 2011, Gündoğdu ve Ulu-Kılıç 2018). Faj terapisi 1920'li yıllardan itibaren başarıyla uygulanmaya başlanmış ve popüleritesini kaybetmesine rağmen antibiyotiğe dirençli bakterilerin ortaya çıkmasıyla birlikte batı dünyasında tekrar umut vadetmiştir. Bakteriyofaj uygulamaları bu anlamda gıdalara kontamine olmuş patojenlerin yok edilmesi için çiftlikten sofraya potansiyelinde gıda zincirinin tüm basamaklarında uygulanabilmektedir (García vd. 2008, Park vd. 2012, Li 2020). Bu kapsamda hem çiftlik hayvanlarında zoonotik patojenlere karşı içme suyu, kaba sprey veya kas içi yolla hem de biyosanitasyonu sağlayabilmek için ekipman ve yüzeylerde, taze meyve ve sebze gibi gıdalarda, karkaslarda doğal mikroflorayı ve fermente ürünlerde starter kültürü etkilemeksizin uygulanabilir (Borie vd. 2008, Ata 2018). Gıda zinciri boyunca faj uygulamaları **şekil 2.10**'da verilmiştir. Sentetik ticari ajanlar özellikle taze ürünler olmak üzere çoğu gıda ürününün, kokusu, tadı ve dokusunu olumsuz etkilerken bakteriyofajlar gıdalar da dahil olmak üzere doğada bolca bulunduğu ve basit bir bileşimden oluştukları için gıdalarda kullanılması doğal bir süreç olarak düşünülmektedir. Örneğin, taze ve işlenmiş et ve ürünlerinde 10^8 POB/g (Plak Oluşturan Birim/g)'dan fazla faj saptandığı bildirilmiştir (Huang vd. 2018b, Leung vd. 2018). Ayrıca faj dirençli suşların ortaya çıkabilmesi beklenebilir ancak yeni uygulama yöntemleriyle farklı ve yeni stratejiler geliştirmeye açıktır (Lee vd. 2011). Ancak bir fajın biyokontrol ve terapötik amaçla kullanılabilmesi için yeni faj partiküllerinin salındığı litik enfeksiyona neden olması gerekmektedir (Gill vd. 2011). Çünkü ılıman fajlar istenmeyen virülans genleri bir konakçıdan diğerine aktarabilir ve artık faj saldırılarına duyarsız bakteriler gelişebilir (Greer 2005).



Şekil 2.10 Gıda zinciri boyunca faj uygulamaları (Özgün Çizim)

Bakteriyofaj terapisinin ilk insan denemeleri oral yolla T4 fajıyla gerçekleştirilmiş ve yüksek güvenlikli bir profil sergilediği not edilmiştir (Park vd. 2012). PhageGuard Listex faj preparatının toksik etkisini incelemek için deney hayvanları üzerinde çalışma gerçekleştirilmiş ve yüksek titrede bile faj tüketiminin herhangi bir olumsuz etkisi görülmemiştir. Ayrıca gastrointestinal sistemdeki doğal flora üzerinde de bir etkisinin bulunmadığı kanıtlanmıştır (Uğur 2018). Ancak yine de faj terapisi için 10^9 POB/mL üst sınırı getirilmiştir (Arachchi vd. 2013).

Faj üretimi, izolasyon işlemini takiben konakçı enfeksiyonu ve saflaştırma işlemiyle gerçekleştirilir. Filtrasyon, iyon değişimi ve afinite kromatografisi gibi yöntemlerde dahil olmak üzere fajların saflaştırılması ve geri kazanımı için yöntemler geliştirilmiştir (Clavijo vd. 2019a). Bu işlemlerin sonucunda bakteriyofaj bazlı biyokontrol ve sanitasyon ürünleri geliştirilmektedir ve gıda güvenliği sektöründe hızla ilerlemektedir (Denes ve Wiedmann 2014). Ancak tıbbi, endüstriyel ve moleküler çalışmalarda fajlara

olan ilginin artmasıyla birlikte yüksek titre elde edilmesi, homojen ve saf stoklar elde edilmesi için yeni yaklaşımlara ihtiyaç duyulduğu bildirilmiştir (Bonilla vd. 2016).

Uygulama protokollerindeki önemli basamaklardan biri hedef bakteri için izolasyon ve faj seçimidir (Kuhn vd. 2002). Biyokontrol amaçlı bakteriyofaj uygulamalarında optimum bir faj performansının elde edilmesi için fajların kolay bir şekilde adapte olup en hızlı şekilde çoğalabildikleri yani ait oldukları spesifik ortamlardan izole edilmesi gerekmektedir. Güvenli antimikrobiyel faj seçimi detaylı olarak hem genetik hem de fenotipik özelliklere göre yapılarak lizojeniye bağlı genler, toksin veya enzim kodlayan genler gibi olumsuz özelliklerin önüne geçilebilir (Drulis-Kawa et al. 2012). Faj seçimi ise geniş spektrumlu veya faj kokteyli şeklinde yapılabilmektedir. Birçok fajın konakçı aralığı, tek bir tür veya türün birkaç suşuyla sınırlıdır. Bu nedenle türleri geniş kapsamda etkileyebilmek için birden fazla fajı içeren faj kokteyli kullanımını gerektirebilir (Bueno vd. 2012). Fajların doğadaki bolluğu ise kokteyl uygulamaları için izolasyon ve üretim aşamasında sınırsız bir fırsat tanımaktadır. Kokteyl üretiminde literatürde standartlaştırılmış prosedürler yer alsa bile resmi olarak bulunmamaktadır (Drulis-Kawa vd. 2012). Bir çalışmada, dış zar proteini olan OmpC ve LPS'ler de dahil olmak üzere farklı reseptörleri hedefleyip bağlanabilen fajlardan hazırlanan bir kokteylin, faj dirençli *E. coli* O157:H7'yi etkili bir şekilde indirgediği bildirilmiştir (Bai vd. 2019). Yayınlanan raporlara göre faj kokteyl uygulamasının canlı hayvan örneklerinde bağırsaktaki *Salmonella* kolonizasyonunu, piliç derisi ve kanatlı karkaslarındaki *Salmonella* kontaminasyonunu önemli oranda azalttığı bildirilmiştir (Borie vd. 2008). Faj kokteyli uygulamaları sadece oluşabilecek tek bir faj direncinin üstesinden gelebilmek için değil aynı zamanda birden fazla bakteri suşu veya türünün tedavisine olanak sağlar (Hooton vd. 2011).

Biyokontrol ve terapötik amaçlı faj uygulamalarının ekinliği, faj konsantrasyonunun bakteri konsantrasyonuna oranına önemli ölçüde bağlıdır (Wong vd 2014). Böylece konakçı patojen başına düşen enfektif faj sayısı belirlenir ve bu oran, enfeksiyon çokluğu (MOI- multiplicity of infection) olarak tanımlanmaktadır (Acar ve Tunail 2006) Terapötik uygulamaların düşük MOI değerinde gerçekleştirilmesi hem düşük

maliyet değeri hem de faj preparatlarının ticarileştirilmesi anlamında avantaj sağlamaktadır (Wong vd. 2014).

Potansiyel patojenlere karşı fajların uygulanmasında optimum sonuç alabilmek için birkaç faktör göz önünde bulundurulmalıdır. Farklı depolama ve uygulama sıcaklıkları, pH, çeşitli iyonların varlığı ve konsantrasyonları, farklı faj ve konakçı konsantrasyonu, uygulama matrisi gibi faktörler göz önüne alınarak yapılan çalışmalar ve sonuçları **çizelge 2.4**'te verilmiştir.

Çizelge 2.4 Literatürde yer alan faj uygulamaları ve sonuçları

FAJ	**HEDEF PATOJEN**	**GIDA MATRİSİ**	**İNDİRGEME** (log KOB/g-mL) veya %	**KAYNAK**
CB4Ø, WT45Ø	*Salmonella* Enteriditis	Kuluçka civcivler	1.5 5-6	(Andreatti Filho vd. 2007)
ΦSP-1 ΦSP-3 ve kokteylleri	*Salmonella* Enteriditis	Kanatlı eti	0.98-3.25	(Augustine ve Bhat 2014)
P7	*Salmonella* Typhimurium	Çiğ ve pişmiş sığır eti	Kontrol gruplarına göre farklı inkübasyon koşullarında önemli indirgemeler olmuştur	(Bigwood vd. 2008)
LISTEX ™ P100	*Listeria monocytogenes*	Peynir	2-3	(Carlton vd. 2005)
ZCSE1, ZCEC1	*Salmonella enterica*	Piliç derisi, yumurta, domates ve et	>2	(El-Shibiny ve El-Sahhar 2017)
CNPSA1, CNPSA3. CNPSA4	*Salmonella* Enteriditis	Bir günlük piliçler	3.5	(Fiorentin vd. 2005)
Faj SI1	*Salmonella* Enteriditis	Alfa alfa yonca tohumu	%38.3	(Fong vd. 2017)
fSE7, fSE8, fSE12, fSE1C, fSE4S	*Salmonella* Enteriditis	Çiğ ve füme somon	2-3	(Galarce vd. 2014)

Çizelge 2.4 Literatürde yer alan faj uygulamaları ve sonuçları (devam)

Faj kokteyli	*Listeria monocytogenes*	Tüketime hazır gıdalar	2.2	(Guenther vd. 2009)
Faj FO1-E2	*Salmonella* Typhimurium	Tüketime hazır gıdalar	1.9	(Guenther vd. 2012)
Faj 12, P22, 29C	*Salmonella* Enteriditis	Tavuk derisi	2	(Goode vd. 2003)
PHL 4	*Salmonella* Enteriditis	Karkas (Broiler)	Tüm faj tedavileri, kontrollere kıyasla *Salmonella* sayısını indirgedi	(Higgins vd. 2005)
wksl3	*S.* Typhimurium *S.* Enteriditis	Tavuk derisi	2.5	(Kang vd. 2013)
SSP5, SSP6	*S.* Oranienburg	Yonca tohumu	1	(Kocharunchitt vd. 2009)
Kokteyl SCPLX-1	*Salmonella* Enteriditis	Taze kesilmiş meyveler (kavun, elma)	2.5-3.5	(Leverentz vd. 2001)
Faj SJ2	*Salmonella* Enteriditis	Çiğ ve pastörize sütten yapılmış çedar peyniri	1–2	(Modi vd. 2001)
Faj kokteyli	*S.* Typhimurium *S.* Enteriditis	Filiz ve brokoli tohumları.	1.37-1.5	(Pao vd. 2006)
fSE1C, fSE4S, fSE7, fSE8, fSE12	*Salmonella* Enteriditis	Taze sığır eti, tavuk, domuz eti, somon, hindi, işlenmiş peynir, salam, sosis, hindi sosis	5	(Robeson vd. 2014)
PE37	*E. coli* O157:H7	Çiğ et	2.1-2.6	(Son vd. 2018)
LISTEX ™ P100	*Listeria monocytogenes*	Çiğ somon	2.3	(Soni ve Nannapaneni 2010)
P1:1	*Salmonella* Enteriditis	Kümes hayvanları	0.3-1.3	(Sklar ve Joerger 2001)
LISTEX ™ P100	*Listeria monocytogenes*	Yumuşak peynir	2.0 -3.0	(Şanlibaba 2015)
Faj SE07	*Salmonella* Enteriditis	Meyve suyu, taze yumurta, sığır eti ve tavuk eti	>2	(Thung vd. 2017)
Felix O1	*Salmonella* Typhimurium	Tavuk sosisleri	2.1	(Whichard vd. 2003)

2.6 Faj Uygulamalarının Avantajları ve Dezavantajları

Diğer antimiktobiyellerin aksine bakteriyofajlar sadece bakterilere özgü olmalarına rağmen yaşayan birer virüs olmaları sebebi ile gıda sektöründe kullanımının tüketici kabulü açısından itirazlara yol açabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle gıda sektöründeki kullanımının olumsuz geri dönüşlere sahip olabileceği düşünülse bile sektörde kabul edilen faj preparatları bulunmaktadır (Raghu vd. 2012). Fajların gıdalarda kullanımı için geleneksel antimikrobiyel sistemlerle karşılaştırıldığında avantajları hem hasat öncesi hem de hasat sonrası uygulamalarda gözden geçirilmiştir (Greer 2005, Atterbury vd. 2020). Tarladan sofraya faj uygulamalarının avantajları ve dezavantajları **çizelge 2.5'te** özetlenmiştir.

Çizelge 2.5 Faj uygulamalarının avantajları ve dezavantajları (Burrowes vd. 2011)

FAKTÖR	**+/-**	**DEĞERLENDİRME**
Dar konakçı aralığı	–	Spesifik fajların dar konakçı aralığı, klinik çalışmalarda aralığı daha geniş olan antibiyotiklerin yerine kullanılmasını engeller. Ancak faj kokteyli uygulamasıyla konakçı aralığı kısmen genişletilerek bu sorun giderilebilir.
	–	Dar konakçı aralığı, faj terapisinin normal flora üzerindeki etkisini azaltma yararına sahiptir. Tam tersine antibiyotik kullanımına bağlı kollateral hasarın *Clostridium difficile* enfeksiyonu gibi ciddi sonuçları olabilir.
Çoğalma	+	Fajların, antibiyotiklerin aksine, enfeksiyon bölgesine yüksek konsantrasyonda verilmesi zorunlu değildir. Konakçı varlığında kendi replikasyonları sayesinde tam olarak ihtiyaç duyulan yerlerde çok daha fazla sayıda faj salınımını sağlarlar.
	–	Uygulanan faj dozu, enfeksiyon bölgesinde replikasyon üzerine genişleyecektir. Bir fajın toksik özellikleri varsa, bu bir sorun olabilir. Ancak, fajların bilinen toksik etkisinin bulunmaması üzerine bunun önemli bir endişe olması pek olası değildir.
İzolasyon kolaylığı	+	Fajlar doğada çok yaygındır ve antibiyotiklerin geliştirilmesinin aksine genellikle kolayca izole edilir

Çizelge 2.5 Faj uygulamalarının avantajları ve dezavantajları (Burrowes vd. 2011) (devam)

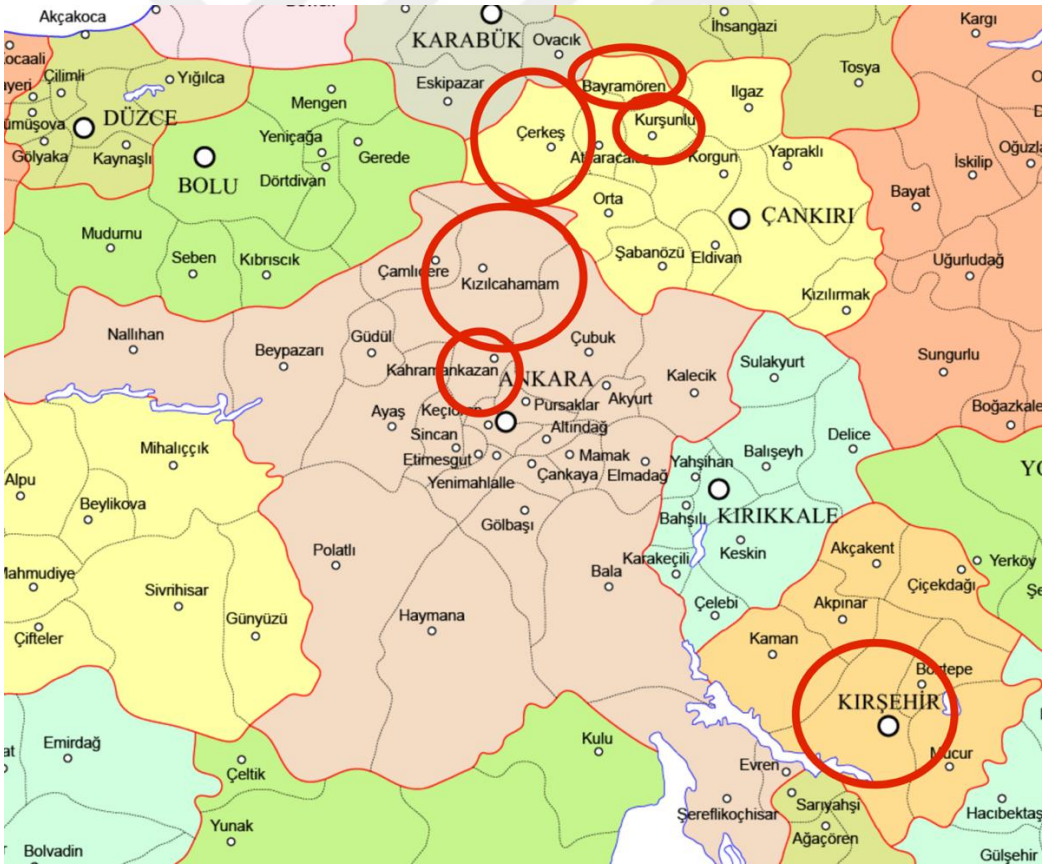
Virülans transferi	–	Genellikle ılıman faj olmak üzere çoğu faj, bakteriyel virülans faktörlerini kodlar veya harekete geçirir. Fajların yanlış seçilmesi, enfekte olan bakterilerin virülansının artmasına neden olabilir. Virülan fajların (lizogeniyi getirmeyen fajlar) kullanılması önerilir.
Manipülasyon kolaylığı	+	Fajlar bir dizi teknikle modifiye edilebilir. Mutajenez, in vitro veya in vivo evrim ve moleküler yaklaşımların hepsi, terapötik olarak geliştirilmiş faj preparatı üretmek için kullanılabilir.
Endotoksin salınımı (Herxheimer etkisi)	–	Bakterilerin, özellikle Gram negatif türlerin büyük ölçekli lizizi, toksik hücresel bileşenlerin salınmasına yol açar. Bu konu ayrıntılı bir çalışma gerektirir, ancak fajların bunun bir sorun olabileceği koşullar altında dikkatli bir şekilde kullanılması, bu konuyu bir ölçüde iyileştirecektir.
İlaca dirençli bakterilere karşı aktif	+	Antibiyotik direnci ve faj direnci büyük ölçüde ilgisiz fenomenlerdir.
İmmünojenisite	–	Faj kullanımı, doğuştan gelen ve uyarlanabilir bağışıklık tepkileriyle inaktivasyon nedeniyle sınırlı olabilir. Farklı fajların veya özel olarak uyarlanmış fajların kullanılması, bu sorunun üstesinden gelebilir.
İyi çalışılmış	+	Fajların klinik etki mekanizması ve biyolojisi iyi incelenmiştir.
Değişken raf ömrü	–	Faj preparatları için bazı fajlar, aktiviteyi sürdürmek için soğuk depolamayı gerektirebilir. Bu, fajların kendilerine ve nasıl hazırlandıklarına bağlı olacaktır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 İzolasyon materyali

Bu çalışmada *Salmonella* ve *Salmonella* fajlarının izolasyonu için doğal habitatları ve primer kaynağı olan yumurta tavuğu kümeslerinden toplanan folluklarla çalışılmıştır. Bu amaçla örnekler ülkemiz İç Anadolu Bölgesi'nde bulunan Ankara, Çankırı ve Kırşehir illerindeki farklı köylerden ve farklı kümeslerden steril poşetlere toplanmış ve soğuk depoda muhafaza edilmiştir **(Şekil 3.1)**. Mevsim değişikliğinin doğurabileceği etkiler göz önüne alınarak dört mevsim aynı lokasyonlardan örnek toplanmıştır.



Şekil 3.1 *Salmonella* ve bakteriyofajlarının izolasyonu için numune toplanan lokasyonlar

Folluk örneklerinden bakteriyofaj izolasyonu için öncelikle yine folluk örneklerinden elde edilen *Salmonella* izolatları, ODTÜ Gıda Mühendisliği Bölümü ve Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü kültür koleksiyonundan elde edilen *Salmonella* serotipleri kullanılmıştır. Bu amaçla insanlarda hastalık yapan başlıca *Salmonella* Typhimurium (N=6), *Salmonella* Enteritidis (N=13) ve *Salmonella* Infantis (N=4) serotipleri seçilmiştir.

3.1.2 Kullanılan besiyerleri ve çözeltiler

Kullanılan bütün sıvı ve agarlı besiyerleri kullanılmadan hemen önce hazırlanmış ve taze olarak kullanılmıştır. Çözeltiler hazırlandıktan sonra literatürde belirtilen depolama koşullarında muhafaza edilmiş ve depolama süresini aşmayacak şekilde kullanılmıştır.

3.1.2.1 CASO (Tryptic Soy) broth besiyeri (Merck 1.05459)

Bileşimi, peptone from casein 17.0 g/L; peptone from soymeal 3.0 g/L; D (+) glucose 2.5 g/L; NaCl 5.0 g/L; K_2HPO_4 2.5 g/L şeklinde olan genel bir besiyeridir. Otoklavda 121 °C'ta 15 dakika sterilize edilerek kullanılmıştır.

3.1.2.2. Tamponlanmış peptonlu su (Merck 1.07228)

ISO (Uluslararası Standartlar Organizasyonu) 6579 ile FDA-BAM (Gıda ve İlaç Dairesi-Bakteriyolojik Analiz Kılavuzu), IDF (Uluslararası Sütçülük Federasyonu) ve APHA (Amerikan Halk Sağlığı Birliği) yönergelerine uygundur ve uygulanan metotta ön zenginleştirme amacıyla kullanılmıştır. Sterilizasyonu otoklavda 121 °C'ta 15 dk süreyle gerçekleştirilir ve besiyeri içeriğindeki fosfat tampon, pH düşmesi durumuna karşı özellikle hasar görmüş olan bakterileri korur. Steril besiyerinin pH'sı 25 °C'ta 7.0±0.2'dir.

3.1.2.3 Rappaport-Vassiliadis Soy (RVS) broth besiyeri (Merck 1.07700)

ISO 6579 yönergesine uygundur ve *Salmonella*'ya özgü selektif sıvı besiyeridir. Otoklavda 115 °C'ta 15 dk sterilize edilir ve bileşiminde bulunan magnezyum klorür ve malaşit (malahit) yeşili konsantrasyonları, benzeri diğer besiyerlerine göre daha düşüktür. Bu derişimler 43 °C'ta inkübasyon sırasında *Salmonella* serotiplerinin gelişmesini destekleyecek seviyede tutulmuştur. Ayrıca 25 °C'ta besiyeri pH'sının 5.2 olması selektiviteyi artırmaktadır.

3.1.2.4 Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) agar besiyeri (Merck 1.05287)

ISO 6579'a uygundur ve *Salmonella*'ya özgü selektif bir katı besiyeridir. Besiyerinin sterilizasyonu otoklavlanmadan sadece besiyeri bileşimindeki agarın tamamen eritilmesiyle kaynar su banyosunda ya da mikrodalga fırında gerçekleştirilmiştir. Steril besiyerinin pH'sı 25 °C'ta 7.4±0.2'dir. Besiyeri reçetesinde yer alan demir tuzu ve tiyosülfat ile hidrojen sülfür oluşumu belirlenirken, fenol red pH indikatörü ile ksiloz ve/veya laktoz ve/veya sakkarozun kullanımı belirlenir. Ayrıca besiyeri bileşenlerinin refakatçi flora üzerinde zayıf bir inhibitör etkisi bulunmaktadır. Besiyeri ile aynı renkte, yarı saydam, siyah merkezli koloniler şüpheli *Salmonella* olarak değerlendirmeye alınmıştır.

3.1.2.5 XLT4 agar besiyeri (Merck 1.13919)

USDA yönergelerine uygundur ve patojenik *Enterobacteriaceae* ve özellikle *Salmonella* cinsi için seçici bir katı besiyeridir. Besiyeri bileşenleri *Salmonella* gelişimini teşvik etmekte ve Tergitol-4 ve sodium tetra-decylsulfate, refakatçi florayı inhibe etmektedir. Sterilizasyon, besiyeri bileşimindeki agarın tamamen eritilmesiyle kaynar su banyosunda ya da mikrodalga fırında gerçekleştirilmiştir. Steril besiyeri berrak kırmızıdır ve 25 °C'ta pH'sı 7.4±0.2'dir. Siyah merkezli koloniler şüpheli *Salmonella* olarak değerlendirmeye alınmıştır.

3.1.2.6 Triple Sugar Iron agar besiyeri (Merck 1.03915)

ISO 6579'a uygundur ve otoklavda 121 °C'ta 15 dk sterilize edildikten sonra yatık agar olarak hazırlanmıştır. Steril besiyeri berrak kırmızı renklidir ve 25 °C'ta pH'sı 7.4±0.2'dir. Besiyeri yüzeyinde kırmızı, dipte sarı ve siyah renk oluşturan ve gaz delikleri ve/veya gaz yarıkları oluşturan şüpheli koloniler *Salmonella* pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.1.2.7 Luria Bertani (LB) broth ve agar besiyerleri (Merck, 110285)

LB sıvı besiyeri bileşimi 5.0 g/L maya ekstraktı; 10.0 g/L pepton (kazein); 10.0 g/L NaCl şeklindedir. Sterilizasyonu otoklavda 121 °C'ta 15 dk da gerçekleştirilir. LB yumuşak agar besiyeri için LB sıvı besiyeri bileşimine %0.6 Agar-agar (Merck, 1.01614), LB agarlı besiyeri için ise LB sıvı besiyeri bileşimine %1.4 Agar-agar eklenir ve otoklavda 121 °C'ta 15 dk süreyle sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir.

3.1.2.8 Tris stok çözeltisi

1 M Tris stok çözeltisini hazırlamak için 12.11 g Tris Base (Sigma-Aldrich, ABD) 80 mL damıtık suda eritilmiş ve pH'ı HCl asit ile 7.5'e ayarlanmıştır ve balon joje içerisinde 100 mL'ye tamamlanmıştır.

3.1.2.9 SM tampon çözeltisi

SM Buffer çözeltisini hazırlamak için 5.8 g NaCl (MA: 58.44 g/mol, Merck), 2 g MgSO4.6H2O (MA: 203.31 g/mol, Fisher), 50 mL 1 M Tris-Cl stok çözeltisi (pH 7.5) ve 5 mL %2 jelatin, 800 mL distile su içerisinde çözdürülmüş ve 1000 mL'ye tamamlanmıştır. Otoklavda 121 °C'ta 15 dk da sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir.

3.2 Yöntem

3.2.1 *Salmonella* izolasyonu ve izolatların doğrulanması

3.2.1.1 Folluk örneklerinden *Salmonella* izolasyonu

Salmonella izolasyonu ISO 6579 numaralı standarda göre üç aşamada gerçekleştirilmiştir. Soğuk depoda muhafaza edilen örnekler aseptik koşullarda 25 g tartılarak ön zenginleştirme amacıyla 225 mL steril TPS içerisine aktarılmış ve manyetik karıştırıcı ile homojen bir şekilde karıştırılmıştır. 37 °C'ta 18±2 saat inkübasyon sonunda selektif zenginleştirme aşamasına geçilmiştir. Bu aşamada ön zenginleştirme kültüründen 10 mL steril RVS broth besiyerine 100 µL inoküle edilmiştir ve 42±1 °C'ta 24±3 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda koloni izolasyonunu gerçekleştirmek için selektif katı besiyerine sürme aşamasına geçilmiştir. Her bir selektif zenginleştirme kültüründen ISO 6579-1:2017 numaralı standartta da bulunan XLD ve XLT4 selektif katı besiyerlerine 2 paralel olacak şekilde sürme yapılmıştır ve 37 °C'ta 24±3 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda koloni yapıları incelenmiştir ve var/yok olarak sonuç değerlendirilmiştir.

3.2.1.2 *Salmonella* izolatlarının TSI testi ile doğrulanması

Şüpheli kolonilerin aktif kültürleri, yatık olarak hazırlanan TSI agar besiyerinin dip kısmına iğne öze ile saplanıp daha sonra yüzey kısmına sürülmüştür. 37 °C'ta 21±3 saat inkübasyon sonunda sonuçlar *Salmonella* pozitif veya *Salmonella* negatif olarak değerlendirilmiştir. Dip kısmında sarı, orta kısmında siyah, yüzey kısmında kırmızı ve gaz yarıkları bulunan şüpheli koloniler muhtemel *Salmonella* olarak değerlendirilmiştir.

3.2.1.3 *Salmonella* izolatlarının moleküler doğrulanması

Muhtemel *Salmonella* izolatları *inv*A geninin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile doğrulanmıştır. Plate Count Agar (PCA) besiyeri üzerinde düşürülen tek koloniler bir öze yardımıyla alınmış ve 95 µL çift deiyonize su (ddH_2O) içeren tüplere aktarılmıştır. Tüplerin ağzı kapatılıp hücre DNA'sını elde etmek için 90 V'de 30 sn süreyle mikrodalga uygulanmıştır. **Çizelge 3.1**'de yer alan reaktiflerle birlikte steril bir mikrosantrifüj tüpünde Master mix çözeltisi hazırlanmıştır. PZR tüplerinin içerisine 24 µL Master mix çözeltisinden dağıtılmıştır ve 1 µL pozitif kontrol, negatif kontrol ve lizatlar aktarılmıştır. Amplifikasyonlar, **Çizelge 3.2**'de listelenen koşullarda Thermal Cycler PZR kullanılarak yapılmıştır.

Çizelge 3.1 *inv*A geninin PZR için Master mix karışımı

Master Mix	**Primer Sequences 5'-3'**	**Konsantrasyon**	**Hacim (µL)**
ddH_2O	-		
Mg-free Taq Buffer	-	10X	
$MgCl_2$	-	20 mM	1.85
dNTPs	-	10 mM	0.5
*inv*A-F	GAATCCTCAGTTTTTCAACGTTTC	12.5 mM	1
*inv*A-R	TAGCCGTAACAACCAATACAAATG	12.5 mM	1
Taq DNA Polymerase	-	5U	0.125
TOPLAM			24.5 µL

Çizelge 3.2 *inv*A geni için PZR koşulları

Sıcaklık (°C)	**Süre**	**Döngü**
94	8 dk	X1
94	30 sn	
72	30 sn	X34
72	1 dk	
72	5 dk	X1
4	∞	X1

Amplifikasyon ürünleri jel elektroforezi ile değerlendirilmiştir. %1.5 agarose jel mikrodalgayla 0.5XTBE tamponunda çözdürülmüştür. Katılaşan jel üzerindeki ilk kuyuya 1 µL DNA Marker-H1 (100 bp-1000 bp) kullanıma hazır (Bio Basic Ins., Kanada) ladder doldurulmuştur. Her bir numuneden, pozitif ve negatif kontroller 6'şar µL sırasıyla kuyucuklara aktarılmıştır. TBE tamponu kullanılarak agarose jel elektroforezde 110 V'de 30 dk boyunca yürütülmüştür. Ardından Et-Br çözeltisinde 5 dk boyunca boyama işlemi gerçekleştirilmiştir. Tekrar 30 dk boyunca ddH_2O da bekletilmiş ve UV ışığı altında PZR sonuçları gözlemlenmiştir (Gel Doc XR Gel Documentation System, California).

3.2.2 *Salmonella* bakteriyofaj izolasyonu ve karakterizasyonu

3.2.2.1 *Salmonella* bakteriyofaj izolasyonu

Salmonella bakteriyofajlarının izolasyonu çift tabaka agar plak yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Belirtilen lokasyonlardan alınan numuneler soğuk depoya alınmıştır ve en kısa zaman içinde analiz edilmiştir. Çalışmada kullanılan bütün *Salmonella* izolatları ve kültür koleksiyonundaki *Salmonella* suşları kullanılmadan önce canlandırılmış ve 18 saatlik taze kültür olarak kullanılmıştır. Aseptik koşullarda tartılan numuneler steril SM tampon çözeltisine (1:10 w/v) eklenmiştir. Homojenizasyon için 1 saat boyunca oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda ve 1 saat +4 °C'ta bekletilmiştir. Süre sonunda kaba debrisi uzaklaştırmak için 4 °C'ta 2500x g'de 4 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Supernatant ilk olarak 0.45 µm daha sonra 0.22 µm por büyüklüğündeki filtrelerden (Millex®- GP; Filter Unit) geçirilmiş ve filtreler 10 mL steril SM tampon çözeltisi ile yıkanmıştır. 5 mL filtrat, 5 mL 2X TSB besiyeri ve 100 µL *Salmonella* kültürü (daha önce numunelerden elde edilen her bir izolat ve kültürden seçilen her bir kültür) karıştırılmıştır ve 37 °C'ta 24 saat boyunca çalkalamalı şekilde inkübasyona bırakılmıştır ve zenginleştirme kültürü elde edilmiştir. İnkübasyon sonunda 4 °C'ta 2500x g'de 10 dakika boyunca santrifüjlenmiş ve lize olan bakterilerin çöktürülmesi sağlanmıştır. Supernatant 0.22 µm pora sahip filtrelerden tekrar geçirilmiştir. 45-50 °C sıcaklıktaki 3 mL LB yumuşak agar (%0.6 agar) içerisine 100 µL zenginleştirilmiş saf faj süspansiyonu ve 100 µL konakçı aktarılarak vortekslenmiş

ve LB agar (%1.2 agar) besiyerleri içeren Petri kutularının üzerine homojen şekilde aktarılmıştır. 37°C'ta 24 saat inkübasyon sonunda plak oluşumuna göre faj varlığı tespit edilmiştir.

Plak oluşumu gözlenen her bir Petri kutusunda 10 plak referans olarak seçilmiştir. Her bir plağın çapı ölçülerek boyut aralığı ve plak morfolojisi (berrak, bulanık) belirlenmiştir.

3.2.2.2 İzolasyonu yapılan *Salmonella* bakteriyofajlarının saflaştırılması (Tek plak izolasyon)

Faj varlığının saptandığı örneklerden elde edilen faj süspansiyonlarının saflaştırılması çift tabaka agar plak yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Faj plakları tek düştükleri bölgelerden steril bir enjektör ucu ve öze yardımıyla kesilerek 5 mL LB broth besiyerine aktarılmış ve vortekslenerek fajların besiyerine geçmesi sağlanmıştır. 5 mL LB broth besiyeri ve 100 µL konakçı eklenmiş, 37°C'ta 24 saat inkübasyona bırakılmış ve 4 °C 2500x g 5 dk santrifüjleyip 0.22 µm'lik filtreden geçirilmiştir. İşlem 3 kez tekrarlanarak diğer analizler için saf *Salmonella* bakteriyofaj filtratları elde edilmiştir.

3.2.2.3 *Salmonella* bakteriyofaj titresinin belirlenmesi ve zenginleştirilmesi

Fajların titresinin zenginleştirilmesi Carey-Smith vd. (2006)'nin yöntemindeki inkübasyon süresi gibi bazı modifikasyonlarla gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılan faj solüsyonlarından SM çözeltisiyle seri dilüsyonlar hazırlanmış ve hazırlanan her bir bateriyofaj dilüsyonu için 3.2.2.1'de anlatıldığı gibi her bir *Salmonella* konakçısıyla çift tabaka agar plak yöntemiyle ekim yapılmıştır. 37°C'ta 24 saat inkübasyonun ardından fajın tek tek düştüğü noktalarda bakterinin lize olması sonucu oluşan ve çıplak gözle görülebilir sınırları belli olan, yuvarlak plaklar (şeffaf/berrak zonlar) sayılarak sayım sonucu POB/mL olarak belirtilmiş ve titre belirlenmiştir. Fajların geri kazanımı için neredeyse tamamen lize olan Petri kutuları seçilmiş ve üzerine 5 mL steril SM çözeltisi aktarılmıştır. Düzenli olarak karıştırılarak oda sıcaklığında en az 1 saat tutulmuştur. Faj süspansiyonu ve yumuşak agar kazınarak içerisinde 20 mL steril SM çözeltisi bulunan

santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Süspansiyon, 30 dk boyunca çalkalayıcıda bırakılmadan önce ve sonra vortekslenmiştir ve yumuşak agarı uzaklaştırmak için 1300 g'de 10 dk santrifüjlenmiştir. Tekrar çift tabaka agar plak yöntemiyle stok titresi belirlenerek stoklar +4 ºC'ta depolanmıştır.

3.2.2.4 Tek aşamalı gelişme eğrisi

Fajların patlama boyutu, latent dönem gibi özellikleri tek aşamalı gelişme eğrisi ile hesaplanabilmektedir. Bunun için ilk olarak ortamdaki faj ve konakçı sayısı belirlenmiştir. Bu amaçla Huang vd. (2018a)'nin metodu modifiye edilerek kullanılmıştır. İlk olarak her bir *Salmonella* konakçısı TSB besiyerinde 37°C'ta 18 saat canlandırılmıştır (10^8 KOB/ml). 10 µL faj süspansiyonu (10^8 POB/mL) 1 mL *Salmonella* süspansiyonuna (10^8 KOB/mL) MOI değeri yaklaşık olarak 0.01 olacak şekilde aktarılmış ve 37°C'ta 15 dk faj adsorbsiyonu için inkübasyona bırakılmıştır. Adsorbe olmayan fajların uzaklaştırılması için 7000 devir/dk'da 2 dk oda sıcaklığında santrifüjlenmiştir. Elde edilen final peleti 2 kez yıkanmış, 50 mL LB broth besiyerinde tekrar karıştırılmış ve çalkalamalı şekilde 37 °C'ta inkübasyona bırakılmıştır. 1 saat boyunca belirli aralıklarla 100 µL örnek alınarak 13000 devir/dk'da 30 sn santrifüjlenmiştir. Latent dönemi belirlemek ve toplam fajı belirlemek için seri dilüsyonlar hazırlanarak çift tabaka agar plak yöntemiyle analiz edilmiştir. Tüm analizler üç tekerrür ve iki paralel olarak gerçekleştirilmiştir. Faj adsorbsiyonu ile yeni fajların salınımı arasında geçen süre latent dönem, artarak sabit kalan faj sayısının latent dönemdeki faj sayısına oranlanmasıyla patlama büyüklükleri hesaplanmıştır (Acar Soykut 2007, Duc vd. 2018).

3.2.2.5 Termal ve pH stabilitesi

İzole edilen fajların stabilitesi, Huang vd. (2018b)'nin metodunda sıcaklık-pH noktaları ve inkübasyon süreleri gibi yapılan bazı modifikasyonlarla gerçekleştirilmiştir. İstenilen titreye getirilen saf faj solüsyonları termal stabilite testi için 30, 45, 60, 75 ve 90 °C'ta 30 ve 60 dk süreyle inkübasyona bırakılmıştır. pH stabilitesi için pH 3-13 aralığında her

bir pH noktasında 37 °C'ta 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Her iki analizde de inkübasyon sonrası faj titresi çift tabaka agar plak yöntemi ile belirlenmiştir.

3.2.2.6 İzole edilen fajların farklı konakçılara karşı duyarlılığının belirlenmesi (SPOT TEST)

İzole edilebilen fajların içerisinde *S.* Typhimurium, *S.* Enteriditis, *S.* Infantis de bulunan farklı *Salmonella* suş ve izolatları üzerindeki litik aktivitelerinin incelenmesi amacıyla spot test gerçekleştirilmiştir. Fajın incelenecek olan *Salmonella* suş veya izolatı TSB besiyerinde geliştirilmiştir ve 18 saatlik canlı kültürden LB yumuşak agar (%0.6 agar) besiyerine inoküle edilerek LB agar besiyeri üzerine yayılmıştır. Titresi 10^8 POB/mL olarak ayarlanan faj solüsyonundan 10 µL alınarak daha önce ekim yapılan Petri kutusunun üzerine damlatılmıştır ve 37 °C'ta 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Petri kutusu üzerinde gelişmenin varlığı berrak alanların görülmesi fajın ilgili konakçı suş üzerinde litik aktivitesinin olduğu yönde (pozitif) değerlendirilmiş ve plak morfolojileri incelenmiştir (Ata 2018). *Salmonella* suş ve izolatları dışında *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 ve *Staphylococcus aureus* gibi önemli patojenlere karşı da spot test ile litik etkileri incelenmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Salmonella, özellikle piliçler olmak üzere sıcakkanlı hayvanların intestinal sistemlerinde bulunurlar. Bu nedenle yem, su ve kontamine folluklarla kontamine piliç eti insanlarda *Salmonella*'nın ana kaynağı olarak görülmektedir (Torun 2018, Clavijo vd. 2019b). Bu tez kapsamında gıdaların florasında primer veya sekonder kontaminasyon sonucu bulunabilen, gıda kaynaklı enfeksiyonlara neden olan *Salmonella* spp. ve *Salmonella* spp. spesifik olan bakteriyofaj izolasyonları ve litik aktivite bakımından karakterizasyonları çalışılmıştır.

4.1 İzolatların Lokasyon ve Mevsimlere Göre Dağılımları

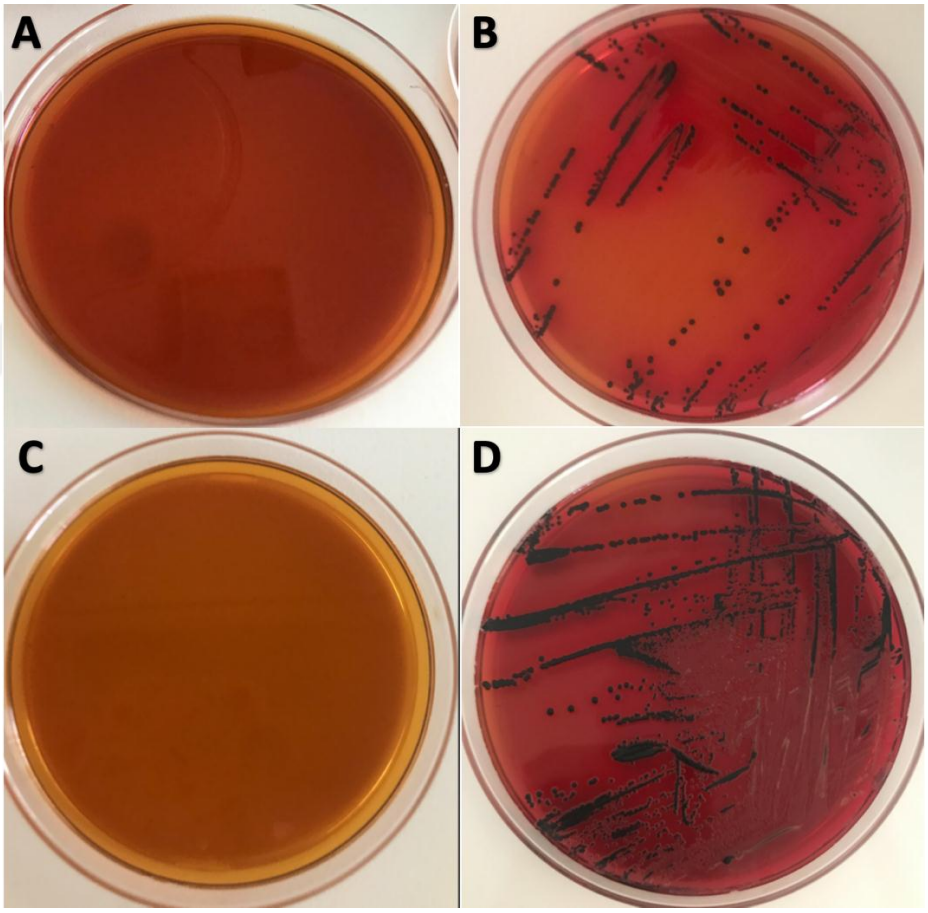
Çalışma kapsamında 3.1.1 bölümünde adı geçen bölgelerden farklı mevsimlerden toplam 100 folluk örneği toplanmış, *Salmonella* ve fajlarının varlığı bakımından incelenmiştir. Örneklerin mevsimlere ve lokasyonlara göre dağılımları **çizelge 4.1**'de verilmiştir.

Çizelge 4.1 *Salmonella* ve spesifik bakteriyofajlarının izolasyonu için kullanılan numunelerin mevsim ve lokasyonlara göre dağılımları

	Kurşunlu	**Çerkeş**	**Bayramören**	**Kırşehir**	**Kızılcahamam**	**Kahramankazan**
2018-19 Kış	20					
2019 İlkbahar	9			6	5	
2019 Yaz	12		8			
2019 Sonbahar	9	7				4
2019-20 Kış	20					

4.1.1 Şüpheli *Salmonella* izolatları ve koloni morfolojileri

Çalışmada *Salmonella* izolasyonu için XLT4 ve XLD olmak üzere iki farklı selektif besiyeri ile çalışılmıştır. XLD agarlı besiyerinin refakatçı flora üzerinde inhibitör etkisinin bulunmasıyla birlikte muhtemel *Salmonella* kolonileri besiyeri ile aynı renkte, yarı saydam ve siyah merkezlidir. XLT4 agarlı besiyerinde ise *Salmonella* kolonileri hidrojen sülfür oluşumuna bağlı olarak siyah renklidir. Bu morfolojiye sahip koloniler şüpheli *Salmonella* izolatı olarak değerlendirmeye alınmıştır. **Şekil 4.1**'de steril XLD ve XLT4 besiyerleri ve muhtemel *Salmonella* izolatlarının koloni morfolojileri verilmiştir.



Şekil 4.1 Seçici *Salmonella* besiyerleri üzerinde gelişen şüpheli *Salmonella* izolatlarının koloni morfolojisi

(A. Steril XLD agar besiyeri, B. XLD agarda gelişen *Salmonella* izolatlarının koloni morfolojileri, C. Steril XLT4 agar besiyeri, D. XLT4 agarda gelişen *Salmonella* izolatları) (Özgün Fotoğraf)

İzole edilen *Salmonella* suşlarının mevsimlere ve lokasyonlara göre dağılımları çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2 *Salmonella* izolatlarının mevsimlere ve lokasyonlara göre dağılımları

	Kurşunlu	**Çerkeş**	**Bayramören**	**Kırşehir**	**Kızılcahamam**	**Kahramankazan**
2018-19 Kış	-	-	-	-	-	-
2019 İlkbahar	2	-	-	-	-	-
2019 Yaz	1	-	1	-	-	-
2019 Sonbahar	2	2	-	-	-	-
2019-20 Kış	-	-	-	-	-	-

2019 yılının ilkbahar, yaz ve sonbahar mevsimlerinde toplanan örneklerde toplam 8 şüpheli izolasyon gerçekleştirilmiş ve hem 2018-2019 hem de 2019-2020 yılının kış mevsiminde toplanan örneklerde hiç şüpheli izolasyon gerçekleştirilememiştir.

Atterbury vd. (2007), yaptıkları çalışmada 2004 ve 2005 yılında güney İngiltere'de bulunan 26 farklı çiftlikten topladığı tavuk dışkısı ve atık sularından 70 *Salmonella* izolasyonu gerçekleştirmişlerdir. Alali vd. (2010) ise çalışmalarında kuzey Carolina'da bulunan 300 adet organik 400 ticari kümesten örnek toplamış ve organik kümeslerde 13 ticari kümeslerde ise 115 *Salmonella* izolasyonu gerçekleştirmişlerdir. Orji vd.(2005) ise 2002 yılının Mart ayından Ağustos ayına kadar her hafta 5 farklı kümes çiftliğinden örnek toplayarak toplam 120 örnekle çalışmış ve 46 *Salmonella* suşu izole ettiğini bildirmişlerdir.

4.1.2 Muhtemel *Salmonella* izolatlarının TSI testi doğrulaması

Makroskobik ve mikroskobik morfolojilerine göre şüpheli olarak seçilen *Salmonella* izolatları izolasyon lokasyonlarına göre kodlandırılmıştır. İzolat kodları çizelge 4.3'te

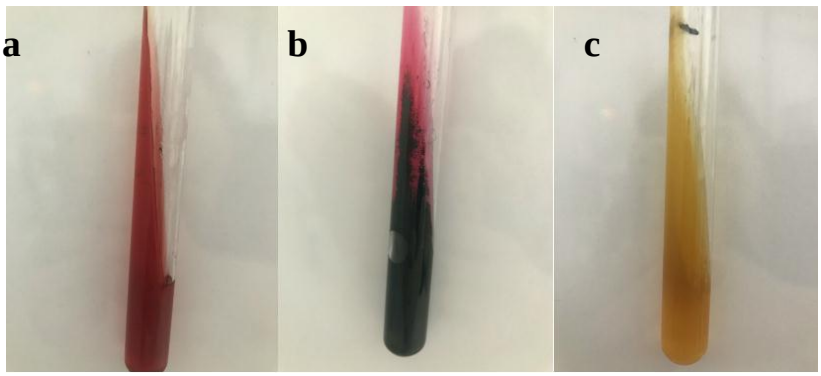
belirtilmiştir. İzolatların tamamının mikroskopik incelemeleri sonucunda kısa çubuklar olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.3 İzole edilen şüpheli *Salmonella* izotlarının izolasyon lokasyonu ve dönemine göre kodlandırılması

Kodlandırma	İzolasyon lokasyonu	İzolasyon dönemi
ÇKİ19-1	Çankırı/Kurşunlu	2019 İlkbahar
ÇKİ19-2	Çankırı/Kurşunlu	2019 İlkbahar
ÇKY19	Çankırı/Kurşunlu	2019 Yaz
ÇBY19	Çankırı/Bayramören	2019 Yaz
ÇKS19-1	Çankırı/Kurşunlu	2019 Sonbahar
ÇKS19-2	Çankırı/Kurşunlu	2019 Sonbahar
ÇÇS19-1	Çankırı/Çerkeş	2019 Sonbahar
ÇÇS19-2	Çankırı/Çerkeş	2019 Sonbahar

Makroskopik morfolojilerine göre şüpheli *Salmonella* kabul edilen izolatların doğrulanması için Triple sugar iron (TSI) agar testi yapılmıştır (Şekil 4.2).

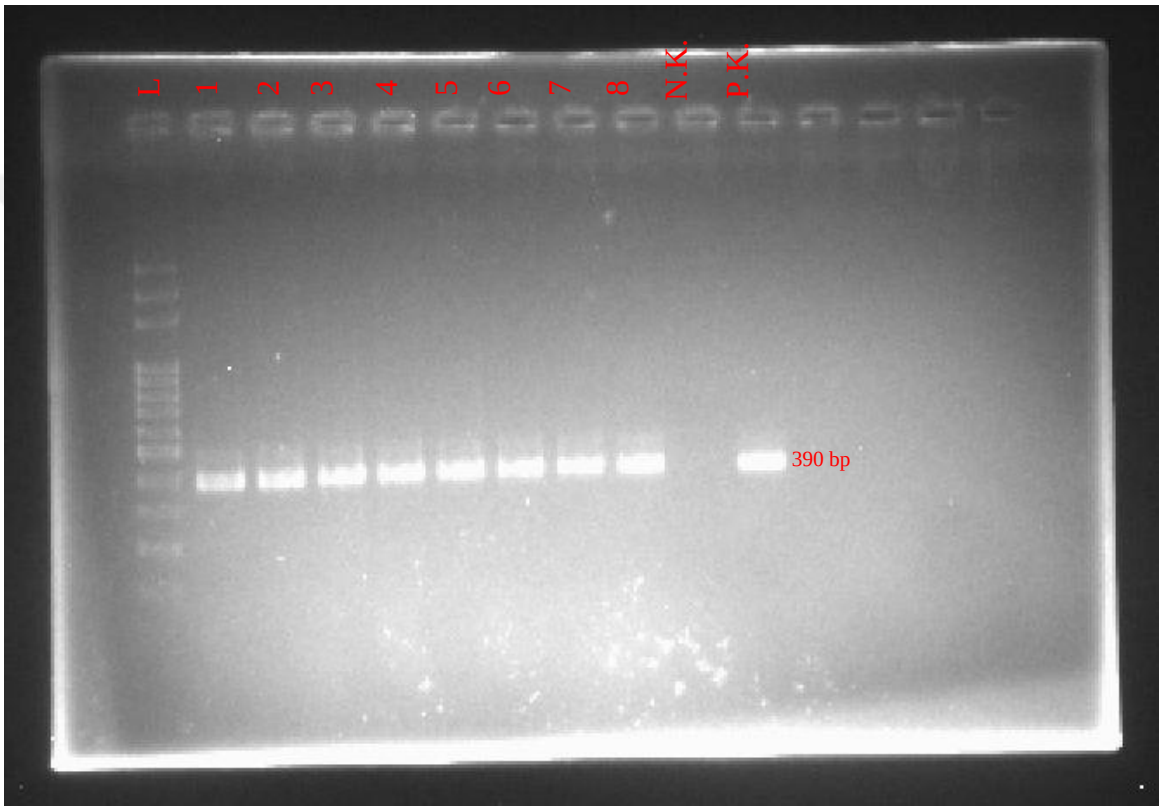
Şüpheli olarak incelenen ve doğrulamaya gidilen izolatlardan 8'i de triple sugar iron poizitif olarak görülmüştür. Biyokimyasal testlerle doğrulaması yapılan izolatlardan %62.5'i (5) Kurşunlu, %25'i (2) Çerkeş, %12.5'i (1) Bayramören lokasyonlarından izole edilmiştir. Hiçbir lokasyonda kış mevsimlerinde izolasyon gerçekleştirilemezken izolasyonların %50'si (4) 2019 sonbahar döneminde, %25'i (2) 2019 yaz döneminde ve %25'i (2) 2019 ilkbahar döneminde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.2 TSI Agar testi a. Steril besiyeri, b. Pozitif örnek, c. Negatif örnek (Özgün Fotoğraf)

4.1.3 Muhtemel *Salmonella* izolatlarının moleküler doğrulaması

Biyokimyasal testlerle doğrulanan *Salmonella* izolatlarının *inv*A'ya özgü primer çifti kullanılarak izolatların tür düzeyinde PZR'da moleküler doğrulaması yapılmıştır. 390 bp moleküler ağırlığı büyüklüğünde bant oluşumu *inv*A'nın varlığını ve izolatların *Salmonella* cinsine ait olduğunu doğrulamaktadır **(Şekil 4.3).**



Şekil 4.3 invA'ya özgü primerler kullanılarak gerçekleştirilen *Salmonella* izolatlarına ait jel görüntüsü (Özgün Fotoğraf)

4.2 Folluk Örneklerinden *Salmonella* Bakteriyofaj İzolasyonu ve Karakterizasyonu

4.2.1 *Salmonella* bakteriyofajlarının izolasyonu

Yayınlanan raporlara göre dışkı örnekleri litik *Salmonella* fajları için zengin bir kaynak olarak görülmüş ve değerlendirilmiştir (Ibrahim 1969, O'Flynn vd. 2006, Akhtar vd. 2014, Huang vd. 2018, Torun vd. 2018).

Fajların özellikle konakçılarının mevcut olduğu çevresel örneklerden izolasyonu mümkündür. Bu nedenle yerel kümeslerden folluk örnekleri toplanmış ve *Salmonella* serotiplerine karşı faj izolasyonu gerçekleştirilmiştir. *Salmonella* bakteriyofajlarının izolasyonları *Salmonella* izolasyonuyla birlikte aynı numuneler üzerinden eş zamanlı olarak gerçekleştirilmiştir. Bakteriyofaj izolasyonunda ilk olarak numunelerde bulunması muhtemel konakçı izolasyonu için çalışılmıştır. Konakçının izole edilemediği durumlarda ise bölüm 3.1.1'de adı geçen kültür koleksiyonlarından temin edilen *Salmonella* izolatları ve ATCC suşları kullanılmıştır. Önceki raporlar, *Salmonella* Enteritidis *Salmonella* Typhimurium'un kontamine gıdaların tüketilmesinden sonra salmonelloza neden olabilecek en yaygın serovarlar olduğunu göstermiştir (Huang vd. 2018a). *Salmonella* Infantis ise EFSA'nın 2016 raporunda insanlarda salmonelloza neden olan ve en yaygın görülen dördüncü serotip olarak bildirilmiştir. Ayrıca Türkiye'de kanatlılardan yapılan izolasyon çalışmalarında en çok izole edilen serotip olarak bildirilmiştir (Torun 2018). Bu nedenle seçilen serotiplerinin hepsi meydana gelen vakalara göre belirlenmiş ve konakçı izole edilemeyen numunelerde bu serotiplere spesifik faj aranmıştır.

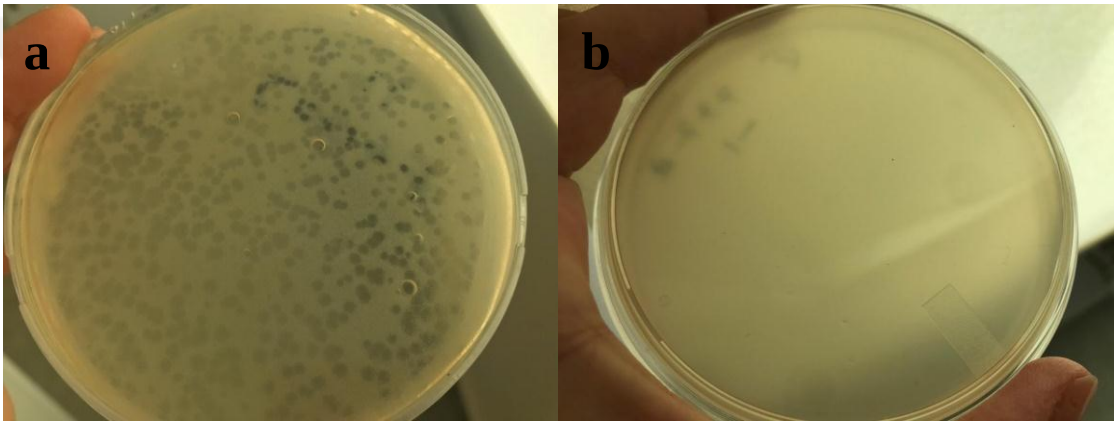
İzolasyonda ve karakterizasyonda konakçı olarak kullanılan muhtemel konakçı *Salmonella* izolatlarının ve suşlarının kodlandırılması çizelge 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.4 Bakteriyofaj izolasyonunda ve karakterizasyonunda kullanılan *Salmonella* suş ve izolatlarının kodlandırılması

Kod	Bakteri	Kod	Bakteri	Kod	Bakteri	Kod	Bakteri
ÇKİ19-1	*Salmonella* spp.	AGMA31	*Salmonella* Enteriditis	OGMX3	*Salmonella* Infantis	OGMX11	*Salmonella* Enteriditis
ÇKİ19-2	*Salmonella* spp.	AGMA32	*Salmonella* Enteriditis	OGMX4	*Salmonella* Infantis	OGMX12	*Salmonella* Enteriditis
ÇKY19	*Salmonella* spp.	AGMX1	*Salmonella* Enteriditis	OGMX5	*Salmonella* Typhimurium	OGMX13	*Salmonella* Enteriditis
ÇBY19	*Salmonella* spp.	AGMX2	*Salmonella* Enteriditis	OGMX6	*Salmonella* Typhimurium	OGMX14	*Salmonella* Enteriditis
ÇKS19-1	*Salmonella* spp.	AGMX3	*Salmonella* spp.	OGMX7	*Salmonella* Typhimurium	OGMX15	*Salmonella* Enteriditis
ÇKS19-2	*Salmonella* spp.	AGMX4	*Salmonella* Enteriditis ATCC13076	OGMX8	*Salmonella* Typhimurium	OGMX16	*Salmonella* Enteriditis
ÇÇS19-1	*Salmonella* spp.	OGMX1	*Salmonella* Infantis	OGMX9	*Salmonella* Typhimurium	OGMX17	*Salmonella* Enteriditis
ÇÇS19-2	*Salmonella* spp.	OGMX2	*Salmonella* Infantis	OGMX10	*Salmonella* Typhimurium	OGMX18	*Salmonella* Enteriditis

5 farklı dönem ve 6 farklı lokasyondan toplanan toplam 100 örnekte çift tabaka agar plak yöntemiyle bakteriyofaj izolasyonu için çalışılmıştır. İzolasyon için ilk olarak kış döneminde Çankırı/Kurşunlu lokasyonundan toplanan numuneler kullanılmıştır. Ancak birçok örnek ve yöntem denenmesine rağmen başarılı bir bakteriyofaj izolasyonu gerçekleştirilememiştir. Bir sonraki aşamada ilkbahar döneminde farklı lokasyonlardan toplanan numunelerde LB agar besiyeri üzerinde plakların oluşumu görülmüş ve

bakteriyofaj izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.4) Oluşan faj plaklarının berrak olması fajların litik olduğunu gösterirken plak boyutu patlama boyutuyla alakalıdır ve ilgili karakterizasyon çalışmaları saf faj solüsyonları hazırlandıktan sonra gerçekleştirilmiştir. Bundan sonraki lokasyon ve dönemde toplanan numunelerde bu yöntem ile çalışılmıştır. Toplam 100 örnekten çeşitli *Salmonella* serotiplerine karşı litik aktivite gösteren 6 farklı faj izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen bakteriyofajların bulunduğu örneklere ait lokasyon ve dönem çizelge 4.5'te verilmiştir. İzole edilen fajların lokasyon ve izolasyon dönemine göre kodlandırılması çizelge 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.4.a. Çift tabaka agar plak yöntemi ile izole edilen fajların LB agar üzerinde oluşturduğu plak görüntüsü b. Negatif örneğin LB agar üzerindeki görüntüsü (Özgün Fotoğraf)

Çizelge 4.5 Bakteriyofaj izolatlarının izole edildiği dönem ve lokasyon

	Kurşunlu	**Çerkeş**	**Bayramören**	**Kırşehir**	**Kızılcahamam**	**Kahramankazan**
2018-2019 Kış	-	-	-	-	-	-
2019 İlkbahar	1	-	-	1	-	-
2019 Yaz	2	-	-	-	-	-
2019 Sonbahar	1	1	-	-	-	-
2019-2020 Kış	-	-	-	-	-	-

Çizelge 4.6 İzole edilen fajların lokasyon ve izolasyon dönemine göre kodlandırılması, plak çapları ve plak morfolojisi

Kodlandırma	İzolasyon lokasyonu	İzolasyon dönemi	Konakçı	Plak çapı (mm)	Plak morfolojisi
BÇKİ19	Çankırı/ Kurşunlu	2019 İlkbahar	*S.* Enteriditis	1-2	Berrak
BKİ19	Kırşehir	2019 İlkbahar	*S.* Infantis	3-4	Bulanık
BÇKY19-1	Çankırı/ Kurşunlu	2019 Yaz	*S.* Enteriditis	0,5 -1	Berrak
BÇKY19-2	Çankırı/ Kurşunlu	2019 Yaz	*S.* Enteriditis	0,5-1	Berrak
BÇKS19	Çankırı/ Kurşunlu	2019 Sonbahar	*S.* Typhimurium	0,5-1,5	Berrak
BÇS19	Çankırı/ Çerkeş	2019 Sonbahar	*S.* Typhimurium	2-4	Bulanık

Literatürde farklı kaynaklardan yapılan çalışmalar bulunmaktadır. Akhtar vd. (2014), yaptıkları çalışmada ilkbahar ve yaz dönemlerinde sığır ve domuz çiftliklerinden ve şehir atıklarından ve atık suyundan topladığı toplam 52 örnekten farklı suşlara spesifik 59 bakteriyofaj izole ettiğini bildirmişlerdir. Huang vd. (2018a), çalışmalarında kümes, kanalizasyon, çiftlik ve atık su arıtma tesisinden topladığı örneklerde farklı plak boyutu ve yapısına sahip toplam 58 faj izole ettiğini bildirmişlerdir. Bu izolatların %32.8'i kümes kaynaklıdır. Jianxiong vd. (2010), çalışmalarında domuz ve yem çiftliklerinden alınan gübrelerden toplam 858 *Salmonella* fajı izole ettiğini bildirmişlerdir. Duc vd. (2018), çalışmalarında piliç derisi ve taşlıklarından toplam 18 litik faj izole ederken karaciğerinden izolasyon gerçekleştirememişlerdir. Ibrahim (1969), yaptığı çalışmada *Salmonella* fajları için farklı kaynakların uygunluğunu incelemiş ve bunun içinde dışkı örnekleri, hindi ve civcivlerin bağırsak içeriği ve *E. coli* ve *Salmonella* taşıyıcı kültürlerini kaynak olarak ele alıp değerlendirmiştir. Çalışmasının sonucunda dışkı örneklerin en az çeşit ve sayıda faj içerdiğini ve sadece *Salmonella* Typhimurium fajını içerdiğini belirtmiştir. Bunun yanı sıra taşıyıcı kültürlerin *S.* Typhimurium, *S.* Copenhagen ve *S.* Heidelberg de olmak üzere en çeşitli faj kaynağına sahip olduğunu bildirmiştir. Aynı zamanda dışkı örneklerinden izole edilen fajların dar litik aktiviteye sahip olup test edilen suşların %20'sini enfekte edebildiğini bildirmiştir.

Bu çalışmada izole edilen fajların tamamı aynı bölgelerden ve aynı mevsim koşullarında ve çevreyle etkileşimin az olduğu kümes folluğu (kuru saman, kuru toprak ve dışkı)

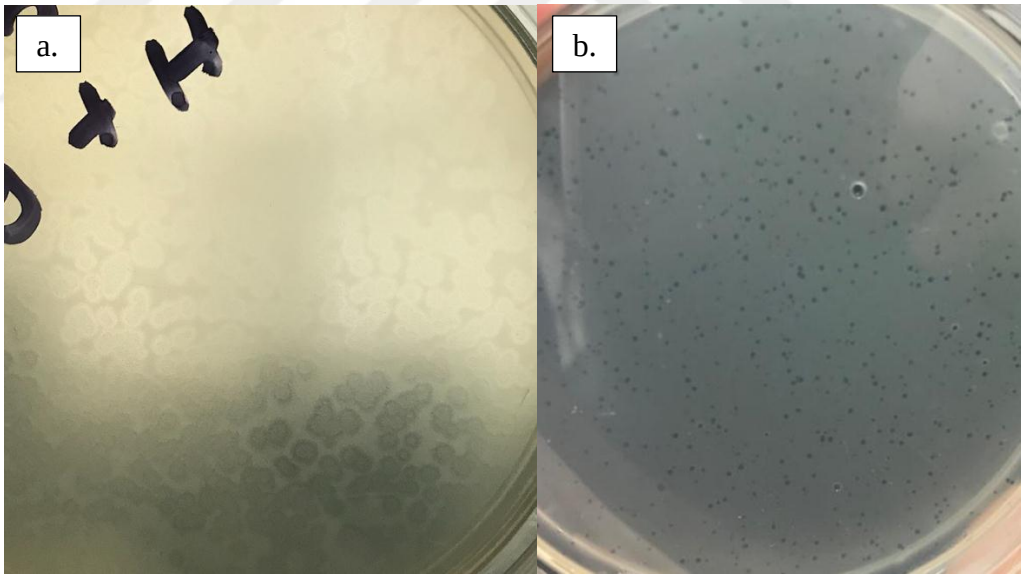
materyallerinden gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle atık su ve kanalizasyonlara göre faj izolatı sayısı ve *Salmonella* serovar çeşitliliği sınırlanmıştır. Literatüre bakıldığında atık sular ile faj izolasyonu yapılan çalışmalarda daha başarılı sonuçların alındığı görülmüştür. Örneğin Yoichi vd. (2004), çalışmalarında atık sulardan izole ettikleri fajın çeşitli *E. coli* suşları üzerinde litik aktive gösterdiğini belirtirken domuz dışkısından izole ettikleri fajın sadece *E. coli* O157:H7'yi lize edebildiğini belirtmişlerdir. Aynı şekilde Akhtar vd. (2014), çalışmalarında dışkılardan izole ettiği fajların atık sulardan izole ettiklerine göre daha az *Salmonella* suşunu enfekte ettiğini rapor etmişlerdir. Callaway vd. (2010), domuz çiftliklerinden topladıkları domuz dışkısı örneklerinde litik aktivite gösteren faj popülasyonunun çok az olduğunu belirtmişlerdir.

Bu araştırmada faj izole edilen numunelerin hiçbirinden konakçı bakteri izole edilememiştir. Ayrıca folluklardan izole edilen *Salmonella* serovarları üzerine faj izolatlarının hiçbir litik aktivitesi görülmemiştir. Bunun nedeni olarak konakçı bakteri ve fajın uzun sürede faja dirençli bir bakteri popülasyonun gelişmesine neden olabileceği düşünülmektedir. Aynı şekilde faj varlığının tespit edilip konakçı izolasyonunun gerçekleştirilememesi de izolasyon sırasında *Salmonella* negatif olmasına rağmen yakın bir geçmişte *Salmonella*'nın var olduğunu ve fajla temasa geniş olabileceği şekilde yorumlanabilir (Xie vd. 2016). Tesadüfi konakçı-faj uyumsuzluğu sonucu benzer şekilde McLaughlin ve King (2008)'in çalışmalarında da görülmektedir. Yaptıkları çalışmada domuz lagünlerinden izole ettikleri *Salmonella* fajlarının yine domuz lagünlerinden izole ettikleri *Salmonella* serovarlarını enfekte edemediği ancak referans ATCC suşlarını enfekte ettiği bildirilmiştir.

Faj izolatlarının tamamı, konakçı olarak seçilen *Salmonella* Enteriditis, *Salmonella* Infantis ve *Salmonella* Typhimurium serotipleri kullanılarak yaklaşık olarak homojen plaklar (çap) oluşturmuştur. BÇS19'un yaklaşık 2-4 mm çapında ve bulanık ve etrafı pürüzsüz plaklar oluştururken BKİ19 fajının 3-4 mm çapında bulanık plaklar oluşturduğu belirlenmiştir. Diğer dört izolatın oluşturduğu plaklar homojenlik göstermektedir. Konakçılarına karşı oluşturdukları plaklar berrak ve pürüzsüzdür. BÇKS19 ve BÇS19 fajlarının her ikisi de *S.* Typhimurium'a karşı litik etki göstermesine rağmen oluşturdukları plak boyutları ve morfolojileri farklılık

göstermektedir. Bunun nedeni olarak literatürde de belirtildiği üzere fajın oluşturduğu plakların fajın doğası, konakçı, yöntem ve inkübasyon koşullarından etkilenmesi olarak açıklanmaktadır. Ayrıca konakçının fizyolojik durumu, ortamın sıcaklık ve pH'sı da plak oluşumu üzerinde etki göstermektedir (Kumar vd. 2017). Aynı şekilde *S.* Enteriditis konakçısına karşı litik etki gösteren BÇKİ19, BÇKY19-1 ve BÇKY19-2 fajlarının oluşturdukları plak çapları da mevsimin getirmiş olduğu sıcaklık farklılıkları ve lokasyonlardan dolayı fajın doğal yapısı nedeniyle açıklanabilmektedir. Şekil 4.5'te bulanık ve berrak faj plak morfolojileri gösterilmiştir.

Benzer olarak Kumar vd. (2017) çalışmalarında Hindistan'da bulunan beş farklı lokasyondan sadece ikisinden plak oluşturan *Salmonella* fajı izolasyonunu gerçekleştirebilmişlerdir. Çalışmalarında homojen plakların oluşumunu (büyük, orta, küçük çapta plaklar) görememişlerdir. Ayrıca bazı plaklar berrakken bazıları bulanık plaklar oluşturmuştur.



Şekil 4.5.a. Bulanık plakların LB agar üzerinde görüntüsü, b. Berrak plakların LB agar üzerinde görüntüsü (Özgün Fotoğraf)

Literatürde benzer plak morfolojilere sahip faj izolasyonlarının gerçekleştiği yer almaktadır. Wong vd. (2014), çalışmalarında bir tavuk çiftliğindeki dışkı materyallerinden izole ettikleri Φst1 fajının *S.* Typhimurium'a karşı litik aktivite

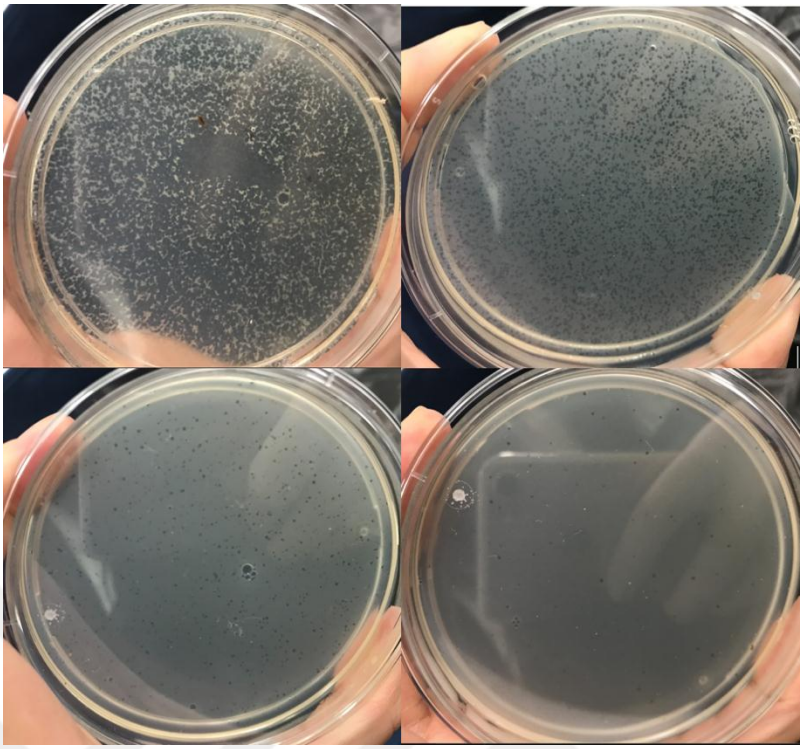
gösterdiği ve 0.5-1 mm çap aralığına sahip berrak plaklar oluşturduğunu bildirmişlerdir. Aynı şekilde Wang vd. (2017), ördek çiftliğinden *S.* Typhimurium'a göre litik aktivite gösteren ve 2-3 mm çapında plaklar oluşturan bir faj izole etmişlerdir. Plak morfolojileri bakımından incelendiğinde BÇKS19 ve BÇS19 fajları literatürde yer alan fajlara benzerlik göstermekte ve doğrulanmaktadır. Yine benzer şekilde Fiorentin vd. (2004), çalışmalarında serbest dolaşan tavuklardan topladığı 107 farklı dışkı örneğinde 5 adet faj izolasyonunu gerçekleştirdiklerini bildirmişlerdir. İzole edilen bütün fajlar çapları 1-1.5 mm arasında değişen küçük, şeffaf ve etrafı pürüzlü olmayan plaklar oluşturmuştur. Cortes vd. (2015) çalışmalarında 191 adet tavuk ve dışkı örneğiyle faj izolasyonu için çalışmıştır ve farklı lizis profiline sahip fajların izolasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Örneklerinin tamamından %28.8'i pozitif sonuç elde etmişlerdir. Bunların 33 adetinin piliç dışkısı, 22 adetinin ise domuz dışkısı kaynaklı olduğunu bildirmişlerdir.

Literatürde farklı fajların farklı konumlardan izole edilmesiyle genetik anlamda farklı fajların izole edilebileceği öne sürülmüştür (Akhtar vd. 2017).

4.2.2 Bakteriyofaj izolatlarının saflaştırılması, titresinin belirlenmesi ve zenginleştirilmesi

İzole edilen 6 *Salmonella*'ya spesifik bakteriyofajdan 2'si saflaştırma ve karakterizasyon aşamaları sırasında kaybolmuştur ve aynı numunelerden tekrar izole edilememiştir. Bundan sonraki aşamalarda geriye kalan 4 *Salmonella* bakteriyofajı ile devam edilmiştir.

İzolatların titrelerini belirlemek için;
Faj Titresi = Plak sayısı x Seyreltme faktörü x Seyreltme oranı (POB/mL) formülü kullanılmıştır. Örneğin; 10^{-5}'lik seyreltme kullanılmış Petri kutusunda 50 plak sayılmışsa faj titresi 50 x 10^{5} x 10 = 5 x 10^{7} POB/mL olarak belirlenmiştir (Gümüştaş 2015). Farklı titrelerdeki faj solüsyonlarının Petri kabında oluşturduğu plaklar şekil 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.6 Faj titresinin belirlenmesi sırasında farklı titrelerdeki faj solüsyonlarının *Salmonella* üzerindeki litik etkisi (Özgün Fotoğraf)

4.2.3 İzolatların farklı *Salmonella* suş ve izolatlarına karşı duyarlılıkları

Konakçı aralığının belirlenmesi biyokontrol uygulamalarında hedeflenen en muhtemel fajın seçilmesi için gereken önemli kriterlerden biridir. Örneğin Felix01 fajı *Salmonella* serovarlarının %96.5'ini enfekte ederek geniş bir konakçı spektrumu göstermektedir. (El-Dougdoug vd. 2019)

İzole edilen altı fajdan dördü pürifikasyon işlemi boyunca konakçı suşlarını lize edebilmiş ve saf stok olarak elde edilebilmiştir. İzolatların konakçı aralıkları seçilen üç *Salmonella* serovarının toplam 32 suş ve izolatına karşı spot (nokta) test ile denenmiştir. *Salmonella* serovarları dışında *E. coli* O157:H7 (Gram negatif), *Listeria monocytogenes* ve *Staphylococcus aureus* (Gram pozitif) gibi önemli gıda patojenlerine karşı duyarlılıkları da spot test ile belirlenmiştir. Fajların tamamı konakçılarına özgü olmakla birlikte berrak ve bulanık plaklar oluşturmuştur **(**Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7 Bakteriyofaj izolatlarının seçilen patojenlere karşı liziz duyarlılıklarının spot test ile belirlenmesi (%)

	S. Enteriditis (N=13)	**S. Infantis (N=4)**	***S.* Typhimurium (N=6)**	***E. coli* O157:H7**	***L. monocytogenes***	***Staphylococcus aureus***
BÇKİ19	69	0	33	0	0	0
BÇKY19-1	100	0	0	0	0	0
BÇKY19-2	85	25	0	0	0	0
BÇS19	77	0	100	0	0	0

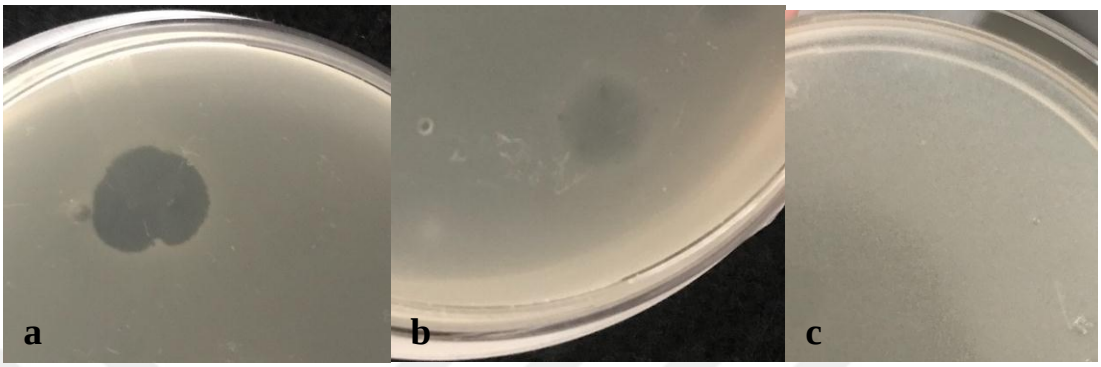
Faj izolatlarının %75'i konakçıları dışında diğer *Salmonella* serotiplerini enfekte edebilirken hiçbiri test edilen diğer gıda patojenleri üzerinde enfeksiyon etkisi gösterememiştir. Benzer sonuçlar literatürde de yer almaktadır. Rattanachaikunsopon ve Phumkhachor (2012) çalışmalarında PPSTH1 fajının farklı bakterilere karşı özgüllüğünü spot test ile gerçekleştirmiş ve 23 farklı bakteri içerisinden sadece 3 *Salmonella* Typhi suşunu enfekte ettiğini bildirmişlerdir. Aynı faj *Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Escherichia coli, Escherichia col*i O157:H7, *Salmonella* Enteriditis gibi diğer patojenleri enfekte edemediğini bildirmişlerdir. Grygorcewicz vd. (2017), çalışmalarında *Salmonella* Enteriditis'e karşı izole ettikleri sall-V01 faj yaklaşık 1mm çapında ve berrak plaklar oluşturduğunu belirtmişlerdir. İzole ettikleri faj, *S.* Enteriditis, *S.* Typhimurium, *S.* Gallinurium, *S.* Pullorum, *S.* Paratyphi üzerinde farklı litik aktiviteler gösterirken *E. coli, Yersinia enterocolitica, Shigella sonei, Shigella flexneri, Proteus vulgaris* gibi Gram negatif basiller üzerinde litik aktivite göstermediğini belirtmişlerdir. Ancak literatürde hem farklı *Salmonella* serotiplerini hem de farklı patojenleri enfekte edebilen faj izolatları da bulunmaktadır. Örneğin; López-Cuevas vd. (2011), çalışmalarında izole ettikleri 4 fajın, içerisinde çeşitli *Salmonella* serotipleri ve *E. coli* O157:H7'nin de dahil olduğu 234 farklı suş üzerindeki litik aktivitesini incelemişlerdir. Sığır çiftliği kaynaklı Bo-21 fajının Enterohomejenik ve Enterotoksinejik *E. coli* patojenleri üzerinde litik etkisinin olmadığını belirtmişlerdir. Ancak bir başka izolat olan Av-05 fajının *Salmonella* Infantis, *Salmonella* Montevideo, *E. coli* O157:H7 ve *C. freundii* dahil olmak üzere 203

suşu enfekte ettiğini bildirmişlerdir. Aynı serotipler arasındaki konakçı aralığındaki farklar belirsiz durumdadır. Amarillas vd. (2018)'nin çalışmasında et örneklerinden izole ettikleri *E. coli* O157:H7 fajlarının tamamının *S.* Infantis, *S.* Anatum, ve *S.* Oranienburg gibi üç farklı *Salmonella* serotipleri üzerinde litik etkisinin olduğu belirtilmişlerdir. Şahin vd. (2020)'nin çalışmalarında kanalizasyon sularından elde edilen *E. coli* O157:H7 faj izolatlarının hem diğer *E. coli* suşları üzerinde hem de bazı *Salmonella* serotipleri üzerinde litik etkiye sahipken *Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Yersinia enterocolitica, Citrobacter freundii, Entrerobacter aerogenes* ve *Enterobacter faecalis* gibi gıda mikrobiyolojisi açısından önemli bazı bakterilere karşı aktivitesinin olmadığı bildirilmişlerdir. Mahmoud vd. (2018)'nin çalışmalarında ise izole ettikleri 3 *Salmonella* fajının da *E. coli, Enterobacter cloacae, Citrobacter freundii* gibi çeşitli patojenler üzerinde litik aktivite gösterirken herhangi bir Gram pozitif bakteri üzerinde litik etki gösteremediğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmada elde edilen izolatlardan sadece BÇKY19-2 fajı *S.* Infantis'i (N=4, %25) enfekte edebilmiştir ancak oluşan noktaların bulanık olduğu görülmüştür. En geniş konakçı aralığına sahip faj BÇS19 olarak belirlenmiştir. *S.* Typhimurium (N=6, %100) suşlarının tamamını enfekte etmekte birlikte *S.* Enteriditis (N=13, %77) suşları üzerinde de geniş bir etkiye sahiptir. BÇKİ19 fajı BÇS19'a benzer konakçı aralığı göstermiştir. Hem *S.* Enteriditis (N=13, %69) hem de *S.* Typhimurium'u (N=6, %33) enfekte ederek berrak noktalar oluşturmuştur. BÇKY19-1 izolatı sadece konakçısını (N=13, %100) enfekte ederek en dar aralıklı faj olarak belirlenmiştir. Spot test'te görülen bulanık ve berrak nokta plakların örnekleri şekil 4.7'de verilmiştir. Gıda kaynaklı salmonellozlarda en yüksek sorumluluğa sahip olan *S.* Enteriditis'in faj izolatlarımıza karşı yüksek derecede duyarlı olduğunun belirtilmesi gerekmektedir. Konakçı aralıkları aralarındaki benzerlik literatürde de yer aldığı gibi faj izolatlarının benzer konakçı reseptörlerini tanıyıp tutunabileceğini göstermekte ve doğrulamaktadır (Fong vd. 2017).

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar faj izolatlarının çoğunlukla konakçı serovarlarına özgü olduğunu farklı serotipler üzerine çok az etkili olduğunu göstermektedir. Benzer sonuçlar literatürde de yer almaktadır ve gösterdikleri bu farklı duyarlılık profillerinin

konakçı üzerindeki spesifik olmayan reseptörler veya faj enfeksiyonu sırasında meydana gelebilecek direnç mekanizmalarından kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Akhtar vd. 2014).



Şekil 4.7 Spot test a. Berrak nokta, b. Bulanık nokta, c. Sadece konakçı içeren besiyeri (Özgün Fotoğraf)

Literatürde daha önce izole edilmiş St104a, St104b ve Felix101 fajları gibi geniş konakçı aralığına sahip olduğu bildirilen (O'Flynn vd. 2006) fajlar olmasına rağmen yüksek spesfikliğe sahip bu araştırma bulgularını destekleyecek çalışmalarda bulunmaktadır. Heringa vd. (2010) çalışmalarında kanalizasyon örneklerinden 34 *Salmonella* fajı izole etmişler ve 53 *Salmonella* serovarı kullanılarak konakçı aralığını spot test ile belirlemişlerdir. Verilerine göre izolatların büyük bir kısmı yüksek spesifiklik göstermekle birlikte sadece konakçıları üzerine litik aktiviteleri bulunmaktadır. İzolatlarının sadece 5 tanesi geniş konakçı aralığına sahip olmakla birlikte hiçbiri test serovarlarının hepsini enfekte edememiştir. Çalışmamızdaki bulgulara benzer şekilde Akhtar vd. (2014) ve Callaway vd. (2010), çalışmalarında izolatlarının *S.* Typhimurium'a karşı yüksek spesifiklik gösterdiği belirtilmiştir. Kumar vd. (2017), farklı kaynaklardan izole ettikleri PSP4, PSP5 ve PSP7 fajları farklı *Salmonella* serovarları üzerinde geniş etkiye sahipken PSP1 ve PSP6 fajları dar bir etkiye sahiptir. Fong vd. (2017), çalışmalarında *S.* Enteritidis, *S.* Typhimurium, *S.* Agona, *S.* Saintpaul, *S.* Heidelberg, *S.* Berta ve *S.* Canada gibi serotipleri kullanmıştır ve 4 faj izolatı da test edilen suşlardan yaklaşık %31-37'ini enfekte edebilmiştir. SI1 fajı test edilen 61 *Salmonella* suşundan 23'ünü enfekte ederek en geniş konakçı spektrumunu göstermesine rağmen SS1 fajı en dar spektrumlu faj olarak kabul edilmiştir. Choi vd. (2017), çalışmalarında kümes hayvanlarının bağırsak sistemlerinden

Salmonella Enteriditis ATCC 13076 suşunu enfekte ederek şeffaf plaklar oluşturan faj izolasyonu gerçekleştirmişlerdir. Konakçı özgüllüğünü belirlemek için *Salmonella enterica*'nın 14 farklı suşu ve farklı Gram pozitif ve Gram negatif bakterileri de kullanarak konakçı aralığı testini gerçekleştirmişlerdir. İzolatı *S.* Enteriditis ve *S.* Typhimurium'u enfekte edip şeffaf plaklar oluştururken, *S.* Hartford, *S.* Newport, *S.* Montevideo, ve *S.* Salamae suşlarını enfekte edip bulanık plaklar oluşturduğu belirtilmiştir. Ancak diğer patojenleri enfekte edemediğini ve böylece *Salmonella* suşları için özgün olduğunu belirtmişlerdir. El-Dougdoug vd. (2019)'nin çalışmalarında izole edilen fajların ikisi test edilen *Salmonella* serovarlarının tamamını lize ederken diğer iki tanesi sadece %25'inde litik aktivite göstermiştir. Wong vd. (2014) ise izolatları Φst1 fajının sadece *S.* Typhimurium'u değil aynı zamanda *S.* Hadar'ı da enfekte ettiğini ancak test edilen diğer *Salmonella* suşlarını enfekte edemediğini bildirmişlerdir. Kang vd. (2013) çalışmalarında seçtikleri wksl3 fajının bütün *S.* Enteriditis (n=32), *S.* Typhimurium (n=36) suşlarının üzerinde ve *S. enterica* Agona, *S.* Heidelberg ve *S.* Javiana serovarları üzerinde %100 litik aktivite gösterdiğini ayrıca 111 *Salmonella* izolatının %68'ini lize ettiğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmada elde edilen izolatların türe özgü ve dar konakçı aralığına sahip olmasının nedeni olarak faj ve çevre kaynaklı bakterilerin arasındaki evrimden kaynaklı bakterilerin reseptörlerinin kaybından kaynaklandığı düşünülmektedir. İzole edilen bakteriyofajların konakçı aralığındaki farklılıklar bakterilerin reseptörlerindeki mutasyonlardan kaynaklı adsorbsiyonun önlenmesi veya dirençli bakteri sisteminin kısıtlanması veya modifikasyonu nedeniyle bozunma ile de ilişkilendirilebilir. Fajların kuyruk uçlarındaki proteinler bakteri hücre duvarındaki reseptör molekülleri tanımalarına yardım ederler ve aynı zamanda spesifik olmayan bakteri hücrelerinin bağlanmalarına engel olurlar. Ayrıca bakteriler superinfeksiyon dışlama (Sie) sistemleri sayesinde fajlara karşı direnç kazanabilirler. Bu sistemlerin faj DNA'sının konakçı bakteriye girmesini engelleyen membranla alakalı proteinler olduğu düşünülmektedir. Molekül sistemleri tam olarak tanımlanmamış olsa bile bazı *Enterobacteriaceae* üyelerinin profajlarının Sim ve SieA proteinlerini kodlayan genlere sahip olduğu literatürde bildirilmiştir (Ibrahim 1969, Carey-Smith vd. 2006, Bielke vd. 2007, Akhtar vd. 2014).

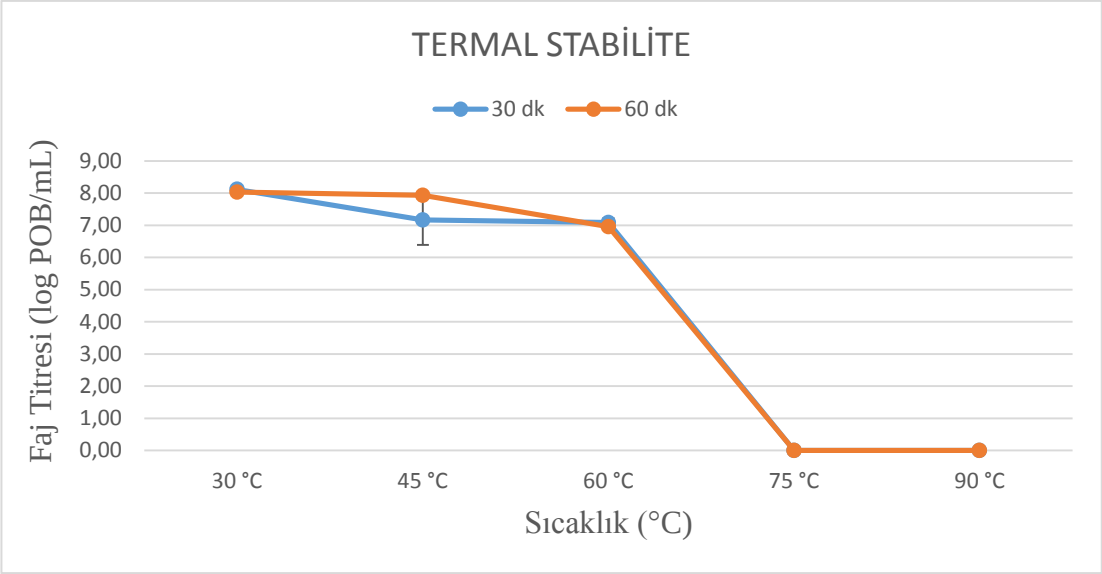
Kanalizasyon sularından izole edilen fajların konakçı yelpazesinin daha geniş olduğu ve litik aktivitelerinin cinsle sınırla olmayıp serovarlara özgü olduğu olduğu bildirilmiştir (Carey-Smith vd. 2006, Bielke vd. 2007, Akhtar vd. 2014).

Akhtar vd. (2014)'nin çalışmalarında elde ettikleri sonuçlara göre gübre örnekleri önceki çalışmalara göre daha dar aralığa sahip ılımlı faj içermektedir. Ancak atık su ve kanalizasyon örneklerinde konakçı aralığı daha geniş ve litik aktivitesi yüksek olan fajlar izole edilmiştir. Bu farka neden olarak da fajların atık su ve kanalizasyon örneklerinde farklı çevreye adapte olması ve farklı vektörleri kullanmasından kaynaklandığı belirtilmektedir. Aslında hayvanların gastrointestinal sisteminde bulunan fajlar, yaşamlarını devam ettirebilmeleri ve yayılabilmeleri için başka bir gastrointestinal sistemden gelen konakçı bakterilere ihtiyaç duyacaklardır. Diğer taraftan fajlar atık ve kanalizasyon sularında çok çeşitli bakterilere ve serovarlarına ulaşabilmektedir. Böylece farklı çevreye adapte olacak ve konakçı aralıkları genişleyecektir. Bu konuda lizogenik fajlar, faj genlerinin yayılmasında ve bu nedenle evrilmesinde rol üstlenirler.

4.2.4 Faj izolatlarının termal stabilitesi

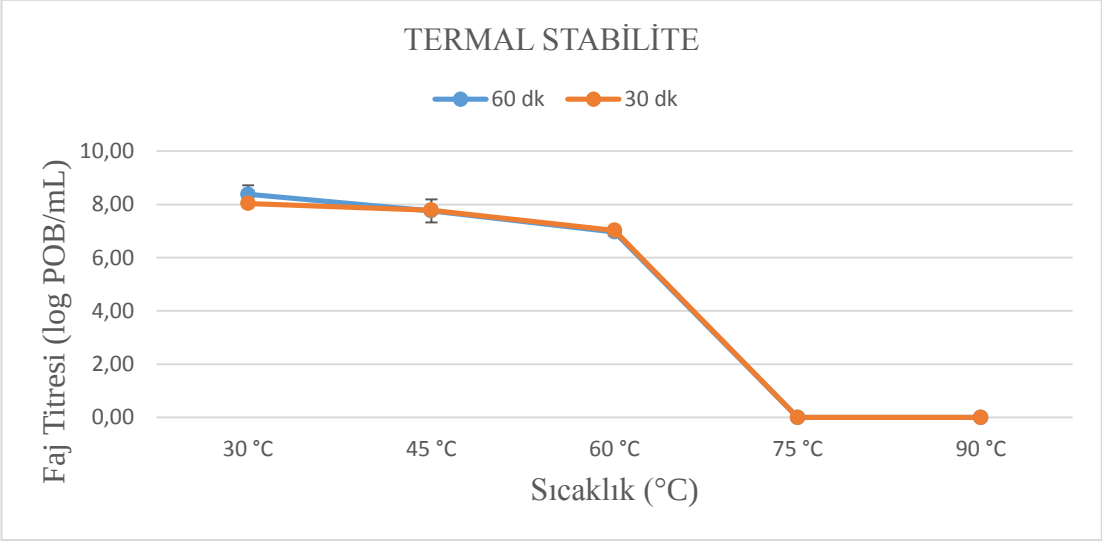
Her bir faj izolatının 30-90 ºC sıcaklık aralığında farklı inkübasyon sürelerinde stabiliteleri belirlenerek muhtemel faj uygulamalarına uygunlukları belirlenmeye çalışılmıştır.

BÇKİ19 fajının hem 30 dk hem de 60 dk inkübasyon süresinde 60 ºC'a kadar önemli derecede bir azalma görülmezken 60 ºC'tan itibaren hızlı bir azalma görülmüş ve 75 ºC'ta aktivitesinin tamamen azaldığı belirlenmiştir. Titresinde 60 ºC'a kadar 1.02 log azalma belirlenirken bu sıcaklıktan itibaren 7.09 log azalma meydana gelmiştir. Maksimum stabilitesini 30-45 ºC sıcaklık aralığında gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8 BÇKİ19 fajının termal stabilitesi

BÇS19 fajı termal stabilite bakımından BÇKİ19 fajına yakınlık göstermektedir. Titresinde her iki inkübasyon süresinde de benzer aktiviteler görülmüştür. Sırasıyla 30ºC'tan 60 ºC'a 1.42 log ve 1.01 log azalma meydana geldiği belirlenmiş ve 75 ºC'ta herhangi bir aktivite saptanmamıştır (Şekil 4.9).

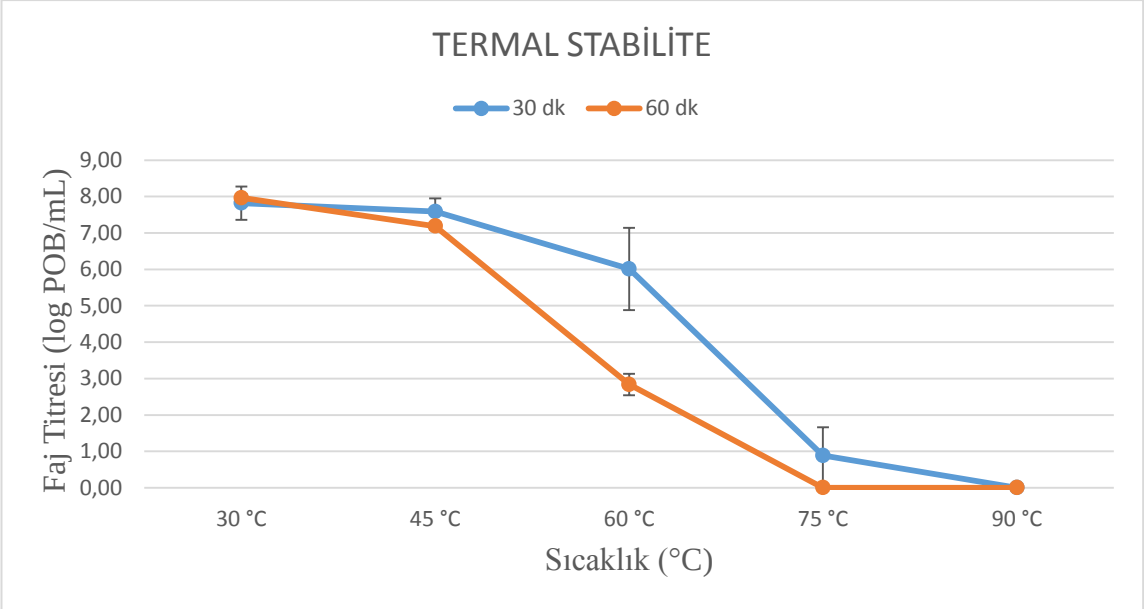


Şekil 4.9 BÇS19 fajının termal stabilitesi

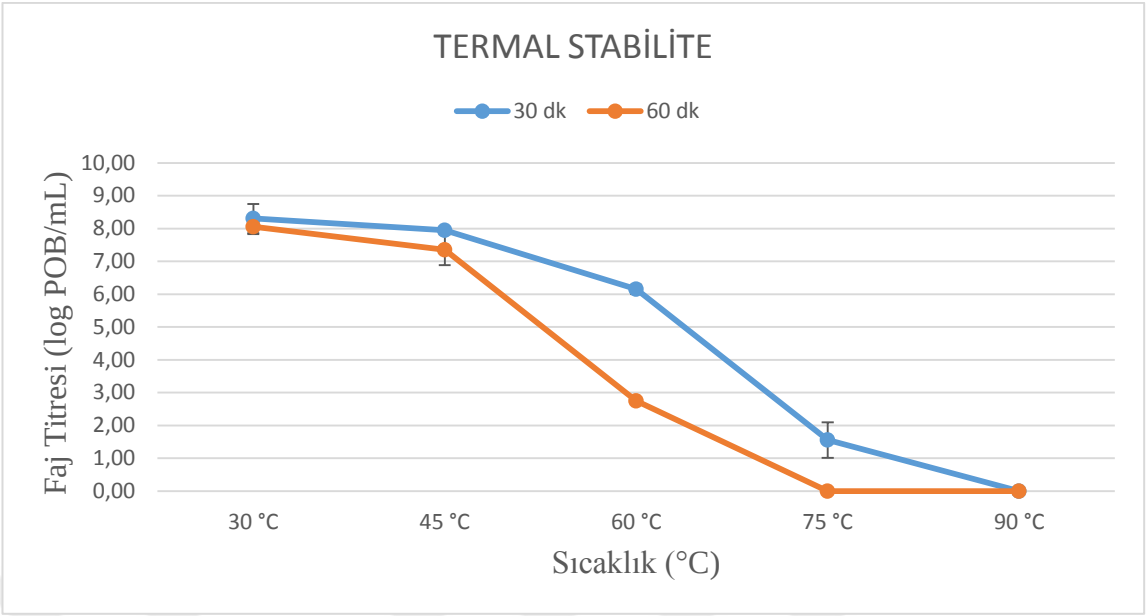
BÇKY19-1, BÇKİ19 ve BÇS19 fajlarına nazaran sıcaklık ve yüksek inkübasyon süresine daha duyarlı bir davranış göstermiştir. Her iki inkübasyon süresinde de 30-45

ºC aralığında stabilitesini korurken 60 ºC'ta 60 dk inkübasyon sonunda 30 dk inkübasyona göre titresinde 2.83 kat daha fazla azalma görülmüştür. 75 ºC'ta 60 dk inkübasyon sonucunda herhangi bir faj aktivitesi saptanmazken 30 dk inkübasyonda faj titresi belirlenmemiştir. 30 dk inkübasyon süresi için faj aktivitesinin gözlenmediği sıcaklık değeri 90 ºC'tır. 45 ºC'tan 60 ºC'a sırasıyla 1.58 ve 4.35 log indirgeme olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.10).

BÇKY19-2 fajının termal stabilitesi BÇKİ19 ve BÇS19 fajlarına nazaran BÇKY19-1 fajına nazaran daha yakınlık göstermektedir. 30 dk inkübasyon süresinde 90 ºC'ta aktivite saptanmazken 60 dk inkübasyon süresinde 75 ºC'ta faj aktivitesi belirlenememiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.10 BÇKY19-1 fajının termal stabilitesi



Şekil 4.11 BÇKY19-2 fajının termal stabilitesi

BÇKY19-1 ve BÇKY19-2 fajları, BÇKİ19 ve BÇS19 fajlarına nazaran yüksek sıcaklık uygulamalarına karşı daha duyarsız etki göstermişlerdir. Yüksek sıcaklıklarda stabilitesini koruduğu için pastörizasyon işleminde de korunabileceği düşünülmektedir.

Fajların yaşam döngüleri için sıcaklık önemli bir faktördür. Adsorpsiyon, penetrasyon ve latent dönemin uzunluğunda önemli bir yere sahiptir. Optimum sıcaklığın altında daha az faj genetik materyali konakçı hücreye daha az nüfuz ederken yüksek sıcaklıklarda latent dönem uzayabilir. Aynı zamanda fajların stabilitesini, yaşayabilirliğini ve depolanmasını da etkilemektedirler (Jończyk vd. 2011).

Literatürde bu çalışmada elde edilen izolatlarla benzer davranış sergileyen fajlar bulunmaktadır. Choi vd. (2017) çalışmalarında kümes hayvanlarının bağırsak sistemlerinden izole ettikleri *Salmonella* Enteriditis fajının 4-60 ºC'ta oldukça stabil olduğunu ancak 70 ºC'ta litik aktivitesinde yaklaşık %70 azalma olduğunu belirtmişlerdir. Kumar vd. (2017) ise çalışmalarında 5 faj izolatının ısı stabiliteleri için faj titresini 10^{11} POB/mL'ye ayarlamış ve bu sıcaklılara 15 dk, 30 dk ve 60 dk boyunca maruz bırakarak stabilitelerini incelemişlerdir. Üç inkübasyon zamanı içinde 30 ºC'tan 60 ºC'a stabil kalmışlardır. Maksimum stabilite ise 30-50 ºC aralığında görülmüştür. 60

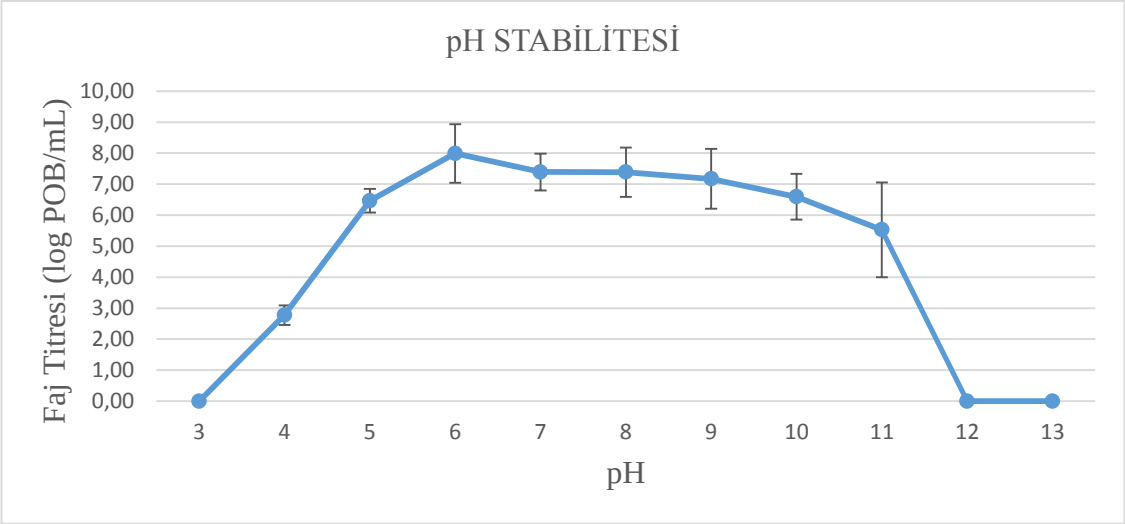
ºC'ın üzerinde faj aktivitesi düşmeye başlamış ve 70 ºC'ta etkilerini tamamen kaybetmişlerdir.

Ancak yine konakçı duyarlılığı testinde olduğu gibi kanalizasyon ve atık sulardan elde edilen izolatların ısı stabiliteleri daha geniş spektrum göstermektedir. Rattanachaikunsopon ve Phumkhachor (2012) hastane atık sularından izole ettiği *S.* Typhi serovarına litik etki gösteren PPSTH1 fajının 50 ºC'ta faj titresinde 0.52 log azalma görülürken 60 ve 70 ºC'ta sırasıyla 2.42 ve ve 3.51 log bir indirgeme görüldüğünü bildirmişlerdir. Ayrıca 80 ve 90 ºC'a çıkıldığında ise faj tespit edilmediğini rapor etmiştir. Grygorcewicz vd. (2017) izole ettikleri Sall-V01 fajının termal stabilite testinin sonucunda ise 60 ºC'a kadar çıkan sıcaklıklarda stabil kaldığını ve daha yüksek sıcaklıklara çıkıldığında %83'e varan kayıp görüldüğünü belirtmiştir. 80 ºC'ta 1 saat inkübasyon sonunda fajların tamamını inaktive ettiğini bildirmişlerdir.

4.2.5 Faj izolatlarının pH stabilitesi

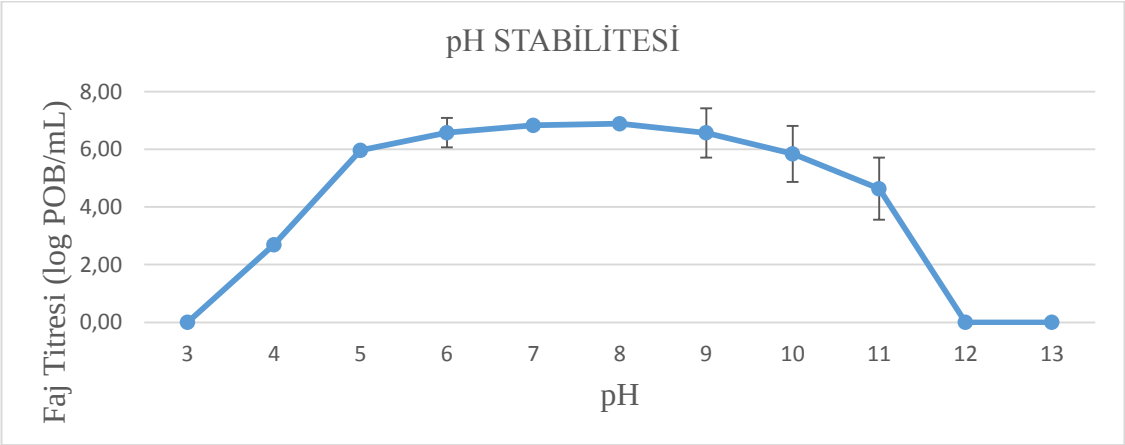
Literatürde fajların pH 3-13 aralığında stabilitelerini koruyabildiği belirtilmiştir (Wei vd. 2019). Bu nedenle her bir faj izolatının pH değişimine dayanma mekanizmasının belirlenmesi için pH 3-13 aralığında stabiliteleri belirlenmiştir. Böylece gıdaların pH aralığının dışına çıkılarak muhtemel faj uygulamalarında gıdalara uygunluklarının belirlenmesinin yanı sıra ekstrem koşullara dayanıklıkları da belirlenmeye çalışılmıştır.

BÇKİ19 (Şekil 4.12) ve BÇS19 (Şekil 4.13) fajlarının pH 5-11 aralığında stabilitesini korumuş ve bu aralıkta titresinde önemli bir değişiklik görülmemiştir. Ancak bu pH'lardan uç noktalara doğru gidildikçe titresinde azalma meydana gelmiştir. BÇKİ19 için pH 3 ve pH 11'de hiçbir şekilde faj aktivitesi saptanmazken BÇS19 için aktivite pH 3 ve pH 12'den itibaren görülmemektedir. BÇKİ19 maksimum sayıya pH 6'da ulaşırken BÇS19 için bu değer pH 8'dir.

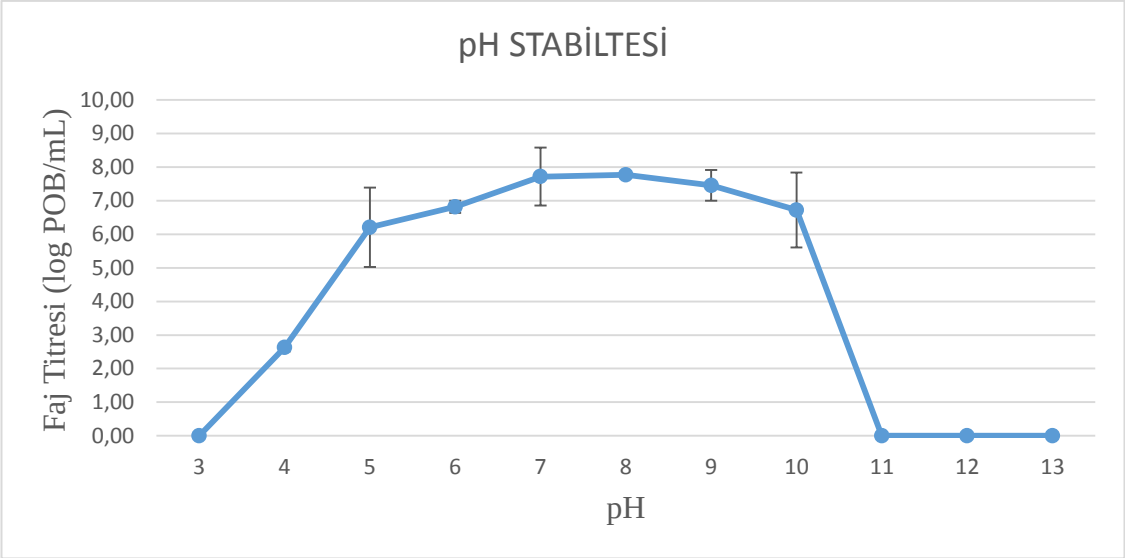


Şekil 4.12 BÇKİ19 fajının pH stabilitesi

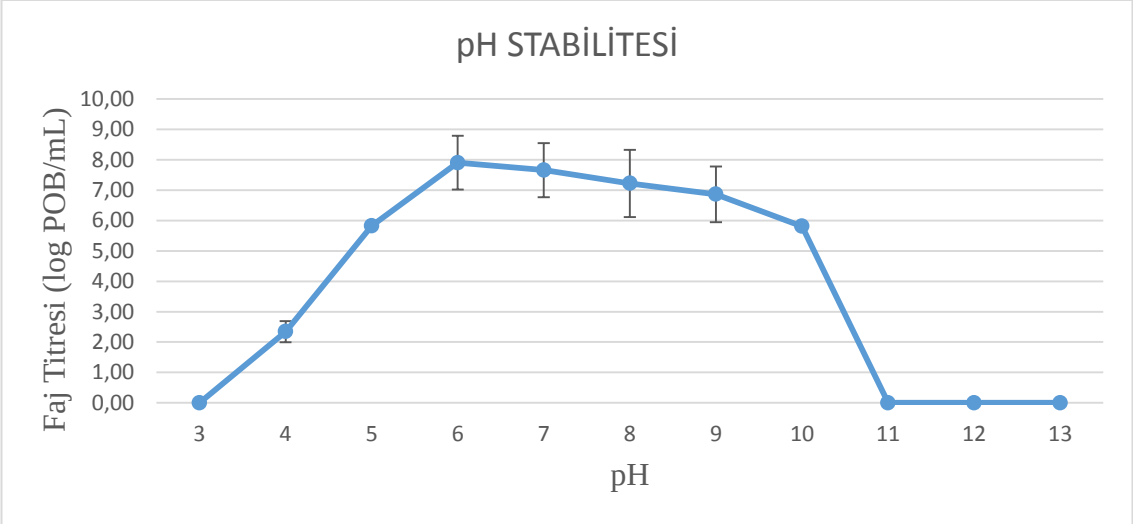
BÇKY19-1 (Şekil 4.14) fajı için maksimum stabilite pH 7-9 aralığında saptanmıştır. pH 6, pH 5 ve pH 4 de sırasıyla 0.9, 0.61 ve 3.58 log indirgeme saptanmıştır. Tıpkı BÇKİ19 gibi pH 3 ve pH 11 de faj aktivitesi saptanamamıştır. BÇKY19-2 fajı maksimum sayıya pH 6-7 aralığında ulaşmıştır. BÇKİ19 ve BÇKY19-1 gibi pH3 ve pH 11 noktalarında faj aktivitesine rastlanmamıştır. İzolatlar içerisinde pH değişimine karşı en stabil fajlar BÇKİ19 ve BÇS19 olarak belirlenmiştir. pH değişimine karşı en duyarlı faj ise BÇKY19-2 (Şekil 4.15) olarak belirlenmiştir. İzolatların hepsinin asidik koşullara karşı davranışları benzerlik göstermektedir. Ancak izolatlarımız birçok gıda için tipik pH aralığı olan pH 4-10 arasında aktifliğini korumuştur. Ayrıca literatürde yer alan çoğu faj pH 4-9 arasında stabildir (Jung vd. 2017).



Şekil 4.13 BÇS19 fajının pH stabilitesi



Şekil 4.14 BÇKY19-1 fajının pH stabilitesi



Şekil 4.15 BÇKY19-2 fajının pH stabilitesi

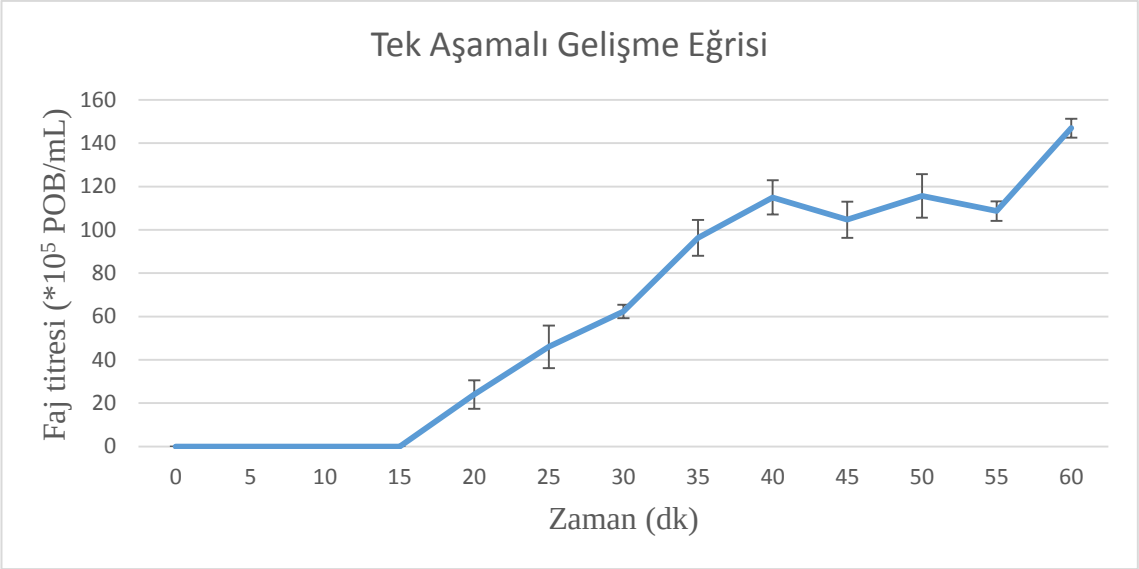
Fajların pH değişimlerine karşı dayanma mekanizmalarının doğuştan olduğu ve böylece pH değişimine açık olan izolasyon materyallerinden elde edilebildikleri literatürde bildirilmiştir (Chandra vd. 2011). Ancak ekstrem pH koşulları, konakçıda bulunan yan zincirleri değiştirerek reseptör molekül olarak hareket etme işlevlerine zarar vermektedir. Polisakkarit yapıda olan bu yan zincirlerin değişmesiyle faj adsorbsiyonu bozulacaktır. Ancak literatürde domuz mide suyunda (pH 2.5) 2 saate kadar aktivasyonunu devam ettiren fajların varlığı bilinmektedir (Wong vd. 2014).

Literatürde yer alan *Salmonella* fajları da pH değişimlerine karşı izolatlarımıza yakın davranış sergilemiştir. Örneğin; Grygorcewicz vd. (2017), izolatlarının Sall-V01 fajının pH 4-11 aralığında aktif kaldığını ancak pH 7-9 aralığında en yüksek stabilliği gösterdiğini bildirmişlerdir. Rattanachaikunsopon ve Phumkhachor (2012)'ın izolatları olan PPSTH1 fajının pH 2-12 aralığında stabilitesi belirlenmeye çalışılmış ve pH 4-10 aralığında konakçısını enfekte edebildiğini ve en yüksek pH 7'de litik aktivitesinin olduğunu bildirmişlerdir. Kumar vd. (2017), tarafından izole edilen 5 fajın stabilitesi pH 6-9 aralığında stabilitesini korurken uç noktalarda stabilitelerini önemli derecede kaybetmişler ve hem pH 3 hem de pH 11'de faj aktivitesine rastlanmamıştır. Choi vd. (2017), çalışmalarında faj izolatının pH 4-11 aralığında oldukça stabil olduğunu belirtmişlerdir. Ancak pH 3'te ise litik aktivitesinde yaklaşık %34 azalma olduğunu belirtmişlerdir. Böylece faj izolatının normal şartlar altında uygulamalarda uygun olduğunu belirtmişlerdir.

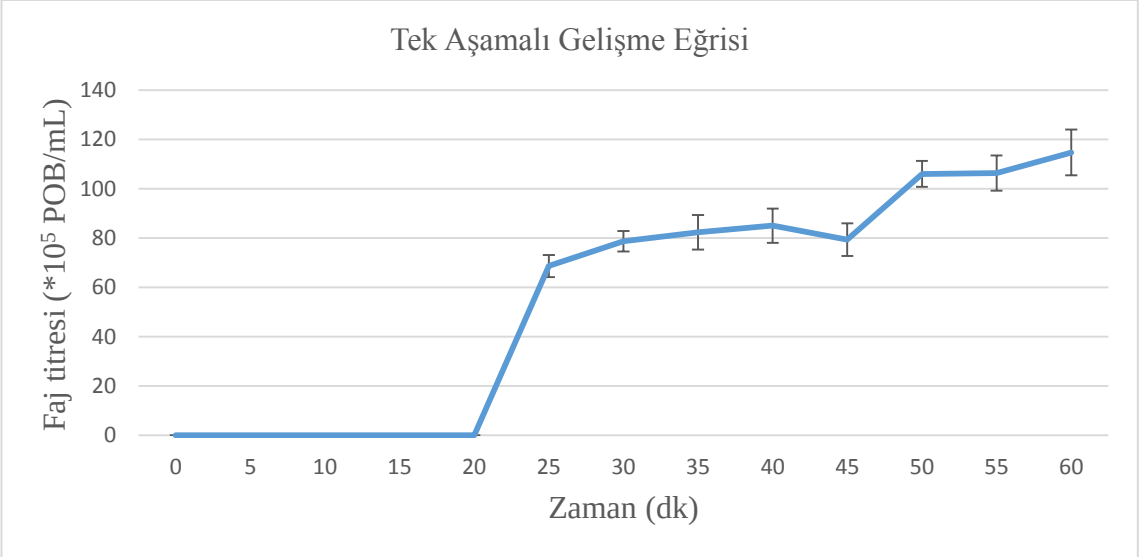
4.2.6 Faj izolatlarının tek aşamalı gelişme eğrileri

Faj izolatlarının enfeksiyon potansiyellerinin belirlenmesi için tek aşamalı gelişme eğrileri belirlenmiştir. Latent dönem, adsorpsiyonun gerçekleştiği ve bakteriyofaj titresindeki ilk artışın gözlendiği yani patlamanın başlangıcı arasındaki zaman aralığını göstermektedir. Patlama boyutu, serbest bırakılan fajların sayısının latent dönem sırasındaki enfekte olmuş bakterilerin sayısının oranı olarak belirlenir (Bao vd. 2011). Kısa latent döneme sahip fajların daha uzun olanlara kıyasla daha kısa sürede fazla sayıda hücreyi enfekte ettiği ve bu durumun biyokontrol uygulamalarında kullanımını uygun hale getirdiği literatürde yer almaktadır.

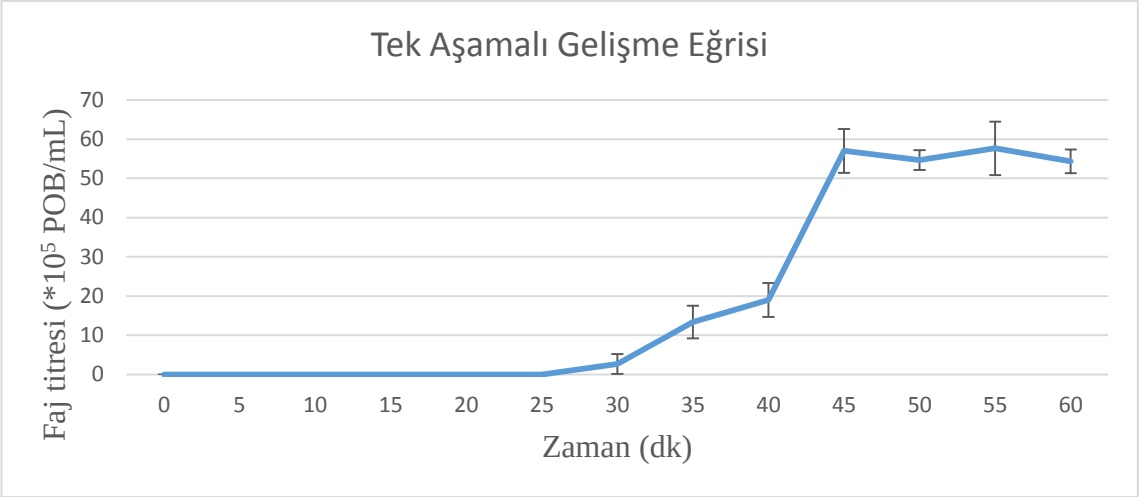
BÇS19 (Şekil 4.16), BÇKİ19 (Şekil 4.17), BÇKY-1 (Şekil 4.18) ve BÇKY19-2 (Şekil 4.19) fajlarının replikasyon kinetiği ayrı ayrı test edildiğinde latent dönemleri sırasıyla 15, 20, 25 ve 25 dk, patlama boyutları ise sırasıyla 106, 78, 53 ve 65 POB/hücre olarak belirlenmiştir.



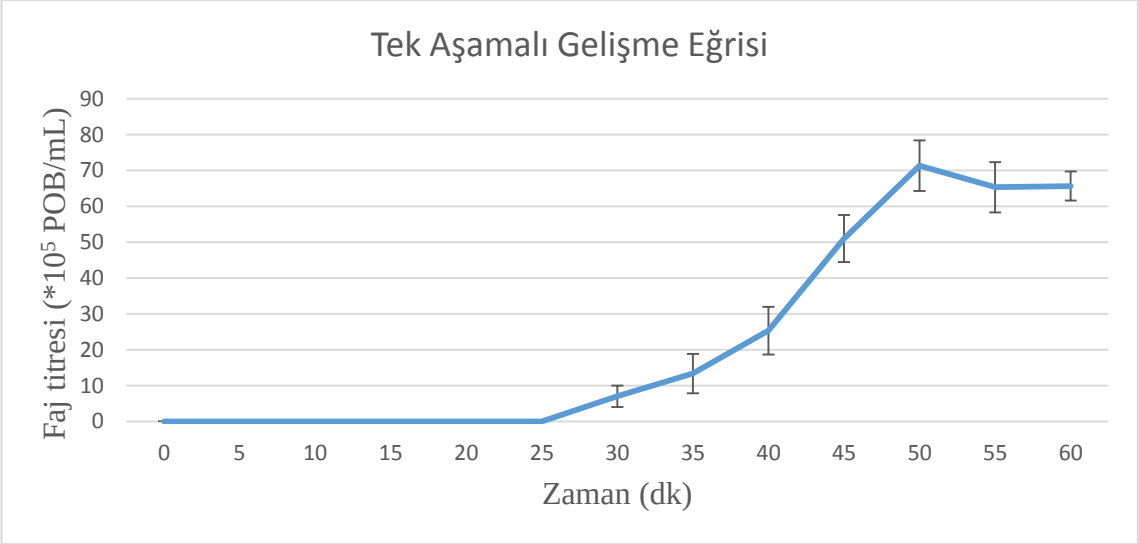
Şekil 4. 16 BÇS19 fajının tek aşamalı gelişme eğrisi



Şekil 4.17 BÇKİ19 fajının tek aşamalı gelişme eğrisi



Şekil 4.18 BÇKY19-1 fajının tek aşamalı gelişme eğrisi



Şekil 4.19 BÇKY19-2 fajının tek aşamalı gelişme eğrisi

Literatürde yer alan bazı faj izolatlarının patlama boyutunun aralığı 100-200 faj aralığında değişiklik gösterirken izolatlarımızın patlama büyüklüğünün daha az olmasının nedeni ortam, pH, konakçı ve sıcaklıktaki farklılıklardan kaynaklanıyor olabilir. Literatürde bu konuda bulgular elde edildiği bildirilmiştir (Carey-Smith vd. 2006, Wong vd. 2014). Bunun yanı sıra *Salmonella* fajı olarak bilinen Felix01 fajının latent dönemi 60 dk, patlama boyutları ise hücre başına 14 faj olarak literatürde belirtilmiştir (O'Flynn vd. 2006). Wong vd. (2014) ise, Φst1 fajının latent döneminin 40 dk olduğunu bildirmişlerdir. El-Dougdoug vd. (2019), çalışmalarında *Siphoviridae*'ye

ait iki fajın patlama boyutları 100 ve 92 latent dönemleri ise 59 ve 65 dk iken diğer iki izolatın patlama boyutu 177 ve 149 POB/ml ve latent dönemleri 53 ve 58 dk olarak bildirmişlerdir.

Ancak literatürde çalışmamızda izole ettiğimiz fajlara yakın repklikasyon kinetiği gösteren fajlar da bulunmaktadır. Örneğin; Rattanachaikunsopon ve Phumkhachor (2012) çalışmalarında PPSTH1 fajının latent dönemleri ve patlama boyutları sırasıyla 30 dk ve 79 POB/hücre olduğunu bildirilmişlerdir. Grygorcewicz vd. (2017) ise çalışmalarında Sall-V01 fajının latent dönemini 25 dk, patlama büyüklüğü ise 107 POB/hücre olarak belirlemişlerdir. Duc vd. (2018) çalışmalarında incelendikleri 5 faj izolatının latent periyotunun (15-25 dk) aralığında ve patlama boyutunun da (49-209 POB/hücre) aralığında olduğunu belirtmişlerdir. Fong vd. (2017) tarafından izole edilen SI1, SF1 ve SS1 *Salmonella* fajları 25 dk latent periyot süresine sahipken SS4 fajı için bu süre 30 dk'dır. Patlama boyutlarının sırasıyla 83, 45, 20 ve 31 faj/hücre olduğunu bildirmişlerdir. Böylece bu çalışmada elde edilen *Salmonella* fajlarının *Siphorividae* fajları için gözlenenler aralıklar içerisinde olduğu belirlenmiştir. Sritha ve Bhat (2018) çalışmalarında izole ettikleri ΦStp1 fajının latent periyodunun 30 dk, patlama büyüklüğününün 37 faj/hücre olduğunu belirtmişlerdir.

Eğer konakçı bakteriler birden fazla reseptöre sahipse agar besiyeri üzerinde daha fazla sayıda agar plak oluşumunun gözlemlenmesi muhtemeldir. Farklı bakteri türleri arasında farklı litik aktivitelerin ve plak modellerinin görülmesinin temel nedeni olarak da bu düşünülmektedir.

Literatürde latent dönemi kısa ve büyük patlama boyutuna sahip fajların, faj uygulamaları için uygun ve aranan fajlar olduğu yer almaktadır (Fong vd. 2017, Kim vd. 2020). Bu nedenle bu çalışmada elde edilen izolatlar faj uygulamaları için uygun replikasyon kinetiği sergilemiştir.

5. SONUÇ

Bu tez çalışması patojenik *Salmonella* serotiplerinin biyokontrolü için doğal ortamlardan geniş spektrumlu ve litik aktiviteye sahip *Salmonella*'ya spesifik fajların izolasyonu ve koleksiyona kazandırılması amacıyla yapılmıştır. Fajların doğal konakçılarıyla olan ilişkisine bağlı olarak ve konakçılarının var olduğu ortamlarda bulundukları göz önüne alınarak, *Salmonella*'ların doğal habitatı olan sıcakkanlı hayvanların gastrointestinal sistemleri ve dışkılarının da faj izolasyonu için doğal ve iyi bir kaynak olduğu düşünülmüştür. Bu çalışmada da farklı zaman dilimlerinde farklı bölgelerden toplanan kümes folluklarıyla çalışılmıştır. Böylece farklı mevsim koşullarının izolasyona olan etkisi de incelenmiştir.

Faj koleksiyonunu geliştirmek için izole edilen fajların karakterizasyonunu ortaya koyabilmek adına literatürde de yer alan birkaç yöntem bulunmaktadır. Bunun için bu çalışmada da ilk olarak folluk örnekleri SM tamponunda homjenize edildikten sonra bakteri kalıntılarını ve diğer atıkları uzaklaştırabilmek ve düşük titredeki popülasyonu zenginleştirmek için santrifüjlenip filtre edilmiş ve konakçısıyla bir araya getirilmiştir. Bunun dışında literatürde bakterileri uzaklaştırıp saf faj süspansiyonu elde edebilmek için kloroform kullanıldığı da yer almaktadır.

Literatüre bakıldığında fajların yeryüzünde yaklaşık 10^{31} sayıda bulunduğu ve kentsel kanalizasyon, hayvan atıkları, su, toprak, içme suyu, gıdalar gibi konakçılarının bulunduğu tüm yaşam alanlarında ve doğal kaynaklarda en bol ve çeşitli şekilde bulunan organizmalar olduğu söylenmektedir. Ancak, bu çalışmada izole edilen faj sayısı oldukça azdır. Bunun nedeni olarak literatürde yapılan çalışmaların çoğunun kanalizasyon suyu, atık suyu gibi devamlı olarak sirkülasyonun olduğu materyallerle gerçekleştirilirken bizim çalışmamızda herhangi bir sirkülasyonun olmadığı kuru toprak, kuru saman ve dışkıdan oluşan folluk materyalleri olmasından kaynaklandığı ve fajların atık su ile kanalizasyon örneklerinde farklı çevreye adapte olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Sadece hayvanların gastrointestinal sisteminde bulunan fajlar yaşamlarını devam ettirebilmeleri ve yayılabilmeleri için başka bir gastrointestinal sistemden gelen konakçı bakterilere ihtiyaç duyacaklardır. Ancak sirkülasyonun

gerçekleştiği farklı kaynaklarda çok çeşitli bakterilere ve serovarlarına ulaşabilmektedirler. Bu konuda da lizogenik fajların faj genlerinin yayılmasında ve litik fajların evrilmesinde rol aldığı literatürde yer almaktadır. Kanalizasyon ve atık sulardan izole edilen fajların geniş konakçı spektrumuna sahipken bizim izolatlarımızın çoğunlukla sadece kendi konakçı suşları üzerinde etkili olması da bu düşünceyi doğrulamaktadır. Literatürde farklı fajların farklı konumlardan izole edilmesiyle genetik anlamda farklı fajların izole edilebileceği öne sürülmüştür (Akhtar vd. 2017). Bu sonuçlar faj izolasyonunda kullanılan suş ve sayısının önemini de göstermektedir (Yıldırım vd. 2018).

Çeşitli çevresel koşullara karşı faj stabilitesi önem göstermektedir. pH ve sıcaklık gibi fizikokimyasal faktörlerin fajların yaşayabilirliği ve aktivitesi üzerinde belirgin bir etkisi vardır. Eğer dış faktörere karşı stabiliteleri dar ise biyokontrol ajan olarak kullanımları etkisiz olabilir (Thung vd. 2019). Bu tez çalışmasında yer alan karakterizasyon analizlerinde izolatların tamamının gıdaların pH aralıklarında makul bir stabilite gösterirken ılımlı pastörizasyon koşullarına da dirençli oldukları belirlenmiştir. Ancak yukarıda belirtilen sebeplerden ötürü izolatların konakçı aralıkları sınırlıdır. Tür kapsamında yapılacak faj uygulamalarında izolatla elverişli özellikler gösterirken cins kapsamında yapılacak muamelelerde daha fazla sirkülasyonun olduğu doğal kaynakların izolasyon materyali olarak kullanması önerilmektedir. Bu anlamda sadece tür kapsamında düşündüğümüzde *S.* Enteriditis suşlarını enfekte edebilen BÇS19 fajı hem çevresel koşullara karşı gösterdiği stabilite hem de enfeksiyon kapasitesi sayesinde uygulamalara en uygun faj olarak düşünmektedir. Yapılan bu karakterizasyon analizleri biyokontrol uygulamalarında potansiyel fajları belirlemek için önemli bir kriteri oluşturmaktadır.

Bakteriyofajlar hızlı bir şekilde mutasyona uğrayabildikleri için (Süperfaj) faj direnci kazanmış mutant bakterilere karşı bile kısa sürede etki gösterebilmekte ve böylece yeni antibiyotik geliştirme stratejilerine göre hem daha kolay hem de daha ucuza gelmektedir (Aktürk 2015). Fajların ökaryotik hücreleri enfekte edememesi sonucu yan etkilerinin az olması, kullanımları için büyük avantajlardan birisidir. Bu nedenle bu çalışma gıda kaynaklı bir patojen olan *Salmonella*'nın biyolojik kontrolünde alternatif

oluşturulmasına yardımcı olmaktadır. Gıda güvenliği adına yapılan bu yaklaşımda gıdalara ve proseslere uygunluğunu karakterize etmek anlamlı ve önemlidir. İlerideki çalışmalarda izole edilen fajların farklı gıda matrislerinde veya yüzeylerde antimikrobiyel olarak kullanımının araştırılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

Abuladze, T., Li, M., Menetrez, M. Y., Dean, T., Senecal, A. and Sulakvelidze, A. 2008. Bacteriophages reduce experimental contamination of hard surfaces, tomato, spinach, broccoli, and ground beef by *Escherichia coli* O157:H7. Applied and Environmental Microbiology, 74(20), 6230–6238.

Acar, E. ve Tunail, N. 2006. Yoğurt starter kültür fajlarının sınıflandırılması, Türkiye 9. Gıda Kongresi, 24-26 Mayıs, Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Bildiri Özetleri Kitabı, 425–428, Bolu.

Acar Soykut, E. 2007. *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus bulgaricus* virülent fajlarının replikasyon parametreleri, kapsid protein profilleri ve restriksiyon endonükleaz analizleri esas alınarak tanımlanmaları ve sınıflandırılmaları. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, 176, Ankara.

Ackermann, H. W. 2007. 5500 phages examined in the electron microscope. Archives of Virology, 152(2), 227–43.

Ackermann, H. W. 2009. Phage classification and characterization, In: Bacteriophages: Methods and Protocols. Clokie, M. R. J. and Kropinski, A. M. (eds), Humana Press, a part of Springer Science Business Media, 127–40.

Akhtar, M., Viazis, S. and Diez-Gonzalez, F. 2014. Isolation, identification and characterization of lytic, wide host range bacteriophages from waste effluents against *Salmonella enterica* Serovars. Food Control, 38(1), 67–74.

Akhtar, M., Viazis, S., Christensen, K., Kraemer, P. and Diez-Gonzalez, F. 2017. Isolation, characterization and evaluation of virulent bacteriophages against *Listeria monocytogenes*. Food Control, 75, 108–15.

Aktürk, E. 2015. Antibiyotik dirençli *Pseudomonas aeruginosa* suşlarına spesifik litik bakteriyofaj izolasyonu ve izole edilen bakteriyofajların litik spektrumlarının belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Şifa Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 58, İzmir.

Alali, W. Q., Takur, S., Berghaus, R. D., Martin, M. P. and Gebreyes, W. A. 2010. Prevalence and distribution of Salmonella in organic and conventional broiler poultry farms. Foodborne Pathogens and Disease, 7(11), 1363–1371.

Amarillas, L., Lightbourn-Rojas, L., Angulo-Gaxiola, A. K., Heredia, J. B., Gonzales-Robles, A. and Leon-Felix, J. 2018. The antibacterial effect of chitosan-based edible coating incorporated with a lytic bacteriophage against *Escherichia coli* O157:H7 on the surface of tomatoes. Journal of Food Safety, 38(6): 1–10.

Andreatti Filho, R. L., Higgins, J. P., Higgins, S. E., Gaona, G., Wolfenden, A. D., Tellez, G. and Hargist, B. M. 2007. Ability of bacteriophages isolated from

different sources to Reduce *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in vitro and in vivo. Poultry Science, 86(9), 1904–1909.

Anonymous. 2018a. Web Sitesi: https://www.cdc.gov/foodnet/reports/prelim-data-intro-2018.html Erişim Tarihi: 08.04.2020.

Anonymous. 2018b. Web Sitesi: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance, Erişim Tarihi: 08.04.2020.

Anonymuos. 2020a. Web Sitesi: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety, Erişim Tarihi: 04.05.2020.

Anonymuos. 2020b. Web Sitesi: https://www.who.int/news-room/q-a-detail/questions-and-answers-foodborne-disease-burden, Erişim Tarihi: 07.04.2020.

Arachchi, G. J. G., Mutukumira, A. N., Dias-Wanigasekera, B. M., Cruz, C. D., McLntyre, L., Young, J., Flint, S. H., Hudson, A. and Bilington, C. 2013. Characteristics of three listeriaphages isolated from New Zealand seafood environments. Journal of Applied Microbiology, 115(6), 1427–38.

Ata, Z. 2018. Türkiye'de sık rastlanan *Salmonella* Enteritidis serovarlarına spesifik bakteriyofajların izolasyonu. Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi, 29(2), 136–42.

Atterbury, R. J., Van Bergen, M. A. P., Ortiz, F., Lovell, M. A., Harris, J. A., Boer, A. Wagenaar, J. A., Allen, V. M. and Barrow, P. A. 2007. Bacteriophage therapy to reduce *Salmonella* colonization of broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology,* 73(14), 4543–49.

Atterbury, R. J., Gigante, A. M., Lozano, M. S. R., Medina, R. D. M., Robinson, G., Alloush, H., Barrow, P. A. and Allen, V. M. 2020. Virology Journal, 17(98), 1-8.

Augustine, J., Louis, L., Varghese, S. M., Bhat, S. G. and Kishore, A. 2012. Isolation and partial characterization of ΦSP-1, a *Salmonella* specific lytic phage from intestinal content of broiler chicken. Journal of Basic Microbiology, 53, 111–20.

Augustine, J. and Bhat, S. G. 2014. Biocontrol of *Salmonella* Enteritidis in spiked chicken cuts by lytic bacteriophages F SP-1 and F SP-3. *J. Basic Microbio,* 54, 1–4.

Bai, J., Jeon, B. and Ryu, S. 2019. Effective inhibition of *Salmonella* Typhimurium in fresh produce by a phage cocktail targeting multiple host receptors. Food Microbiology, 77 (April), 52–60.

Bao, H., Zhang, H. and Wang, R. 2011. Isolation and characterization of bacteriophages of *Salmonella enterica* serovar Pullorum. Poultry Science, 90(10), 2370–2377.

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

Bardina, C., Spricigo, D. A., Cortés, P. and Lagostera, M. 2012. Significance of the

bacteriophage treatment schedule in reducing *Salmonella* colonization of poultry. Applied and Environmental Microbiology, 78(18), 6600–6607.

Bielke, L., Higgins, S., Donoghue, A., Donoghue, D. and Hargis, B. M. 2007. *Salmonella* host range of bacteriophages that infect multiple genera. Poultry Science, 86(12), 2536–2540.

Bigwood, T., Hudson, J. A., Billington, C., Carey-Smith, G. V. and Heinemann, J. A. 2008. Phage inactivation of foodborne pathogens on cooked and raw meat. Food Microbiology, 25(2), 400–406.

Binetti, A. G., Quiberoni, A. and Reinheimer, J. A.. 2002. Phage adsorption to *Streptococcus thermophilus* influence of environmental factors and characterization of cell-receptors. Food Research International, 35(1), 73–83.

Bonilla, N., Rojas, M. I., Flores Cruz, G. N., Hung, S. H., Rohwer, F. and Barr, J. J. 2016. Phage on tap-a quick and efficient protocol for the preparation of bacteriophage laboratory stocks. PeerJ, 2016(7), 1-18.

Borie, C., Sanchez, M. L., Navarro, C., Ramirez, S., Morales, M. A., Retamales, J. and Robeson, J. 2008. Bacteriophage treatment reduces *Salmonella* colonization of infected chickens. Avian Diseases, 52(1), 64–67.

Bueno, E., Pilar, G., Beatriz, M. and Rodríguez, A. 2012. Phage inactivation of *Staphylococcus aureus* in fresh and hard-type cheeses. International Journal of Food Microbiology, 158, 23–27.

Burrowes, B., Harper, D. R., Anderson, J., McConville, M. and Enright, M. C. 2011. Bacteriophage therapy: Potential uses in the control of antibiotic-resistant pathogens. Expert Review of Anti-Infective Therapy, 9(9), 775–85.

Callaway, T. R., Edrington, T. S., Brabban, A., Kutter, B., Karriker, L., Stahl, C., Wagstrom, E., Anderson, R., Poole, T. L., Genoseve, K., Krueger, N., Harvey, R. and Nisbet, D. J. 2010. Occurrence of *Salmonella*-specific bacteriophages in swine feces collected from commercial farms. Foodborne Pathogens and Disease, 7(7), 851–856.

Carey-Smith, G. V., Billington, C., Cornelius, A. J., Hudson, J. A. and Heinemann, J. A. 2006. Isolation and characterization of bacteriophages infecting *Salmonella* spp. FEMS Microbiology Letters, 258(2), 182–86.

Carlton, R. M., Noordman, W. H., Biswas, B., Meester, E. D. and Loessner, M.J. 2005. Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: Genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 43(3), 301–12.

Chandra, M., Thakur, S., Narang, D. and Saxena, M. 2011. Isolation of a bacteriophage against *Salmonella* Dublin and determination of its physical resistance under aried in vitro conditions. African Journal of Microbiology Research, 5(15), 2044-2047.

Chibani, C. M., Farr, A., Klama, S., Dietrich, S. and Liesegang, H. 2019. Classifying the unclassified: A phage classification method. Viruses, 11(2), 1–15.

Choi, Y., Shin, H., Lee, J. H. and Ryua, S. 2013. Identification and characterization of a novel flagellum-dependent *Salmonella* infecting bacteriophage, IEPS5. Applied and Environmental Microbiology, 79(16), 4829–37.

Choi, I. Y., Lee, J., Kim, H. and Park, M. 2017. Isolation and characterization of a novel broad-host-range bacteriophage infecting S*almonella enterica* subsp. *enterica* for biocontrol and rapid detection. Journal of Microbiology and Biotechnology, 27(12), 2151–55.

Clavijo, V., Torres-Acosta, M. A., Vives-Flórez, M. J. and Rito-Palomares, M. 2019a. Aqueous two-phase systems for the recovery and purification of phage therapy products: recovery of Salmonella bacteriophage ΦSan23 as a case study. Separation and Purification Technology, 211 (September): 322–29.

Clavijo, V., Baquero, D., Hernandez, S., Farfan, J. C., Arias, J., Arevalo, A., Donado-Gogoy, P. and Vives-Flores- M. 2019. Phage cocktail SalmoFree reduces Salmonella on a commercial broiler farm. Poultry Science, 98, 5054-5063.

Cortes, P., Spricigo, D. A., Bardina, C. and Llagostera, M. 2015. Remarkable diversity of Salmonella bacteriophages in swine and poultry. FEMS Microbiology Letters, 362,1-7.

Cufaoglu, G. and Ayaz, N. D. 2018. *Listeria monocytogenes* risk associated with chicken at slaughter and biocontrol with three new bacteriophages. Journal of Food Safety, 39(3), 1–10.

Denes, T. and Wiedmann, M. 2014. Environmental responses and phage susceptibility in foodborne pathogens: Implications for improving applications in food safety. Current Opinion in Biotechnology, 26, 45–49.

Demiraslan Aydın, Ö. 2018. Tavuk etinde *Salmonella* Enteritidis'in gelişimi üzerine *Salmonella* Enteritidis bakteriyofajlarının etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisli Anabilim Dalı, 52, Niğde.

Drulis-Kawa, Z., Majkowska-Skrobek, G. and Maciejewska, B. 2012. Learning from bacteriophages - Advantages and limitations of phage and phage-encoded protein applications. Current Protein and Peptide Science, 13, 699–722.

Duc, H. M., Hoang, M. S., Honjoh, K. and Miyamoto, T. 2018. Isolation and application of bacteriophages to reduce *Salmonella* contamination in raw chicken meat. LWT - Food Science and Technology, 91, 353–60.

El-Dougdoug, N. K., Cucic, S., Abdelhamid, A.G., Brovko, L., Kropinski, A.M., Griffiths, M.W. and Anany, H. 2019. Control of *Salmonella* Newport on cherry tomato using a cocktail of lytic bacteriophages. International Journal of Food Microbiology, 293(January), 60–71.

El-Shibiny, A. and El-Sahhar, S. 2017. Bacteriophages: The possible solution to treat infections caused by pathogenic bacteria. Canadian Journal of Microbiology, 63 (11), 865–79.

Endersen, L., O'Mahony, J., Hill, C., Ross, R. P., McAuliffe, O. and Coffey, A. 2014. Phage therapy in the food industry. Annual Review of Food Science and Technology, 5(1), 327–49.

Ergin, F., Yıldız, G., Çomak Göçer, E. M. ve Küçükçetin, A. 2017. Bakteriyofajların antibakteriyel ajan olarak kullanımı. Akademik Gıda, 15(2), 172–81.

Fernández, L., Gutiérrez, D., Rodríguez, A. and García, P. 2018. Application of bacteriophages in the agro-food sector: A long way toward approval. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 8, 1–5.

Fiorentin, L., Vieira, N. D., Júnior, B. and Barros, S. 2004. In vitro characterization and in vivo properties of *Salmonella* lytic bacteriophages isolated from free-range layers. Revista Brasileira de Ciência Avícola, 6(2), 121–28.

Fiorentin, L., Vieira, N. D. and Barioni Júnior, W. 2005. Use of lytic bacteriophages to reduce *Salmonella* Enteritidis in experimentally contaminated chicken cuts. Revista Brasileira de Ciência Avícola, 7(4), 255–60.

Firlieyanti, A. S., Connerton, P. L. and Connerton, I. F. 2016. *Campylobacters* and their bacteriophages from chicken liver: The prospect for phage biocontrol. International Journal of Food Microbiology, 237, 121–27.

Fong, K., LaBossiere, B., Switt, A. I. M., Delaquis, P., Goodridge, L., Levesque, R. C., Danyluk, M. D. and Wang, S. 2017. Characterization of four novel bacteriophages isolated from british columbia for control of non-typhoidal *Salmonella* in vitro and on sprouting alfalfa seeds. Frontiers in Microbiology, 8, 1–14.

Fong, K., Tremblay, D. M., Delaquis, P., Goodridge, L., Levesque, R. C., Moineau, S., Suttle, C. A. and Wang, S. 2019. Diversity and host specificity revealed by biological characterization and whole genome sequencing of bacteriophages infectig *Salmonella enterica*. Viruses, 11(854), 1-19.

Forsythe, S. J. 2007. The Microbiology of Safe Food. Wiley-Blackwell, 496, UK.

Galarce, N. E., Bravo, J. L., Robeson, J. R. and Borie, C. F. 2014. Bacteriophage cocktail reduces *Salmonella enterica* serovar Enteritidis counts in raw and smoked salmon tissues. Revista Argentina de Microbiologia, 46(4), 333–37.

García, P., Martínez, B., Obeso, J. M. and Rodríguez, A. 2008. Bacteriophages and their application in food safety. Letters in Applied Microbiology, 47(6), 479–85.

Gill, J. J., Summer, E. J., Russell, W. K., Cologna, S. M., Carlie, T. M., Fuller, A. C., Kitsopoulos, K., Mebane, L. M., Parkinson, B. N., Sullivan, D. Carmody, L. A., Gonzalez, C. F., LiPuma, J. J. and Young, R. 2011. Genomes and characterization of phages Bcep22 and BcepIL02, founders of a novel phage type in *Burkholderia*

cenocepacia. Journal of Bacteriology, 193(19), 5300–5313.

Gong, C. and Jiang, X. Application of bacteriophages to reduce Salmonella attachment and biofilms on hard surfaces. Poultry Science, 96, 1838-1848.

Goode, D., Allen, V. M. and Barrow, P. A. 2003. Reduction of experimental *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of chicken skin by application of lytic bacteriophages. Applied and Environmental Microbiology, 69(8), 5032–36.

Gouvêa, D. M., Santos Mendonça, R. G., Lopez Soto, M. and Cruz, R. S. 2015. Acetate cellulose film with bacteriophages for potential antimicrobial use in food packaging. LWT - Food Science and Technology, 63(1), 85–91.

Gökçe, Ö. 2010. *Lactobacillus delbrueckii* bakteriyofajı LL-H'nin konakçı spektrumu. Yüksek Lisans Tezi, Pamaukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 58, Denizli.

Grant, A., Parveen, S., Schwarz, J., Hashem, F and Vimini, B. 2017. Reduction of *Salmonella* in ground chicken using a bacteriophages. Poultry Science, 96, 2845-2852.

Greer, G. G. 2005. Bacteriophage control of foodborne bacteria. Journal of Food Protection, 68(5), 1102–11.

Grygorcewicz, B., Grudzinski, M., Wasak, A., Augustyniak, A., Pietruszka, A. and Nawrotek, P. 2017. Bacteriophage-mediated reduction of *Salmonella* Enteritidis in swine slurry. Applied Soil Ecology, 119(August) 179–82.

Guang-Han, O., Leang-Chung, C., Vellasamy, K. M., Marlappan, V., Li-Yen, C. and Vadivelu, J. 2016. Experimental phage therapy for Burkholderia pseudomallei infection. PLoS ONE, 11(7), 1–16.

Guenther, S., Huwyler, D., Richard, S. and Loessner, M. J. 2009. Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Applied and Environmental Microbiology, 75(1), 93–100.

Guenther, S., Herzig, O., Fieseler, L., Klumpp, J. and Loessner, M. J. 2012. Biocontrol of *Salmonella* Typhimurium in RTE foods with the virulent bacteriophage FO1-E2. International Journal of Food Microbiology, 154(1–2), 66–72.

Gümüştaş, A. 2015. Laktik asit bakterileri ve bakteriyofajlarinin çeşitli kaynaklardan izolasyonu ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 76, Ankara.

Gündoğdu, A. ve Ulu-Kılıç, A. 2018. Bakteriyofaj terapisi: Unutulmuş bir şifa kaynağı. Klinik Dergisi, 31(2), 78–87.

Halkman, A. K. 2019. Gıda Mikrobiyolojisi. Başak Maatbacılık ve Tanıtım Hizmetleri Ltd, 309–404, Ankara.

Harada, L. K., Silva, E. C., Campos, W. F., Del Fiol, F. S., Vila, M., Dabrowska, K., Krylov, V. N. and Balcao, V. M. 2018. Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art. Microbiological Research, 212–213(April), 38–58.

Heringa, S. D., Kim, J. K., Jiang, X., Doyle, M. P. and Erickson, M. C. 2010. Use of a mixture of bacteriophages for biological control of *Salmonella enterica* strains in compose. Applied and Environmental Microbiology, 76(15), 5327–32.

Heshmati, Behzad. 2019. Bakteriyofajların bazı gıda ve klinik örneklerden izole edilen *Salmonella* spp.ve *Salmonella* biyofilmi üzerine etkisi. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, 145, Adana.

Higgins, J. P., Higgins, S. E., Guenther, K. L., Huff, W., Donoghue, A. M., Donoghoue, D. J. and Hargis, B. M. 2005. Use of a specific bacteriophage treatment to reduce *Salmonella* in poultry products. Poultry Science, 84(7), 1141–45.

Hooton, S. P. T., Atterbury, R. J. and Connerton, I. F. 2011. Application of a bacteriophage cocktail to reduce *Salmonella* Typhimurium U288 contamination on pig skin. International Journal of Food Microbiology, 151(2), 157–63.

Huang, C., Virk, S. M., Shi, J., Zhou, Y., Willias, S. P., Morsy, M. K., Abdelnabby, H. E., Liu, J., Wang, X. and Li, J. 2018a. Isolation, characterization, and application of bacteriophage LPSE1 against *Salmonella* Enterica in ready to eat (RTE) foods. Frontiers in Microbiology, 9 (MAY), 1–11.

Huang, C., Shi, J., Ma, W., Li, Z., Wang, J. and Li, J. 2018b. Isolation, characterization, and application of a novel specific *Salmonella* bacteriophage in different food matrices. Food Research International, 111(May), 631–41.

Ibrahim, A. A. 1969. Bacteriophage typing of Salmonella. Applied microbiology, 18(3), 444–447.

Janez, N. and Loc-Carillo, C. 2013. Use of phages to control *Campylobacter* spp. Journal of Microbiological Methods, 95, 68–75.

Jianxiong, Y., Kostrzynska, M., Dunfield, K. and Warriner, K. 2010. Control of *Salmonella* on sprouting mung bean and alfalfa seeds by using a biocontrol preparation based on antagonistic bacteria and lytic bacteriophages. Journal of Food Protection, 73(1), 9–17.

Johnson, R. P., Gyles, C. L., Huff, W. E., Ojha, S., Huff, G. R., Rath, N. C. and Donoghue, A. M. 2008. Bacteriophages for prophylaxis and therapy in cattle , poultry and pigs. Animal Health Research Reviews, 9(2), 201–15.

Jończyk, E., Kłak, M., Międzybrodzki, R. and Górski, A. 2011. The influence of external factors on bacteriophages-review. Folia Microbiologica, 56(3), 191–200.

Jonge, P. A., Nobrega, F. L., Brouns, S. J. J. and Dutilh, B. E. 2019. Molecular and evolutionary determinants of bacteriophage host range. Trends in Microbiology, 27(1), 51–63.

Jun, J. W., Park, S. C., Wicklund, A. and Skurnik, M. 2018. Bacteriophages reduce *Yersinia enterocolitica* contamination of food and kitchenware. International Journal of Food Microbiology, 271: 33–47.

Jung, L., Ding, T and Ahn, J. 2017. Evaluation of lytic bacteriophages for control of multidrug-resistant Salmonella Typhimurium. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 16(66), 1-9.

Kang, H. W., Kim, J. W., Jung, T. S. and Woo, G. J. 2013. Wksl3, a new biocontrol agent for *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium in foods: Characterization, application, sequence analysis and oral acute toxicity study. Applied and Environmental Microbiology, 79(6), 1956–68.

Karpe, Y. A., Kanade, G. D., Pingale, K. D., Arankalle, V. A. and Banerjee, K. 2016. Genomic characterization of *Salmonella* bacteriophages isolated from India. Virus Genes, 52, 117-126.

Kim, J. H., Kim, H., J., Jung, S. J., Mizan, M. F. R., Park, S. H. and Ha, Sang-Do. 2020. Characterization of *Salmonella* spp.-specific bacteriophages and their biocontrol application in chicken breast meat. Journal of Food Science, 85(3), 526-534.

Kocharunchitt, C., Ross, T. and McNeil, D. N. 2009. Use of bacteriophages as biocontrol agents to control *Salmonella* associated with seed sprouts. International Journal of Food Microbiology, 128(3), 453–59.

Komora, N., Bruschi, C., Ferreira, V., Maciel, C., Brandao, T. R. S., Fernandes, R., Saraiva, J. A., Castro, S. M. and Teixeira, P. 2018. The protective effect of food matrices on *Listeria* lytic bacteriophage P100 application towards high pressure processing. Food Microbiology, 76(July), 416–25.

Kosnizk-Kwasnicka, K., Cieminska, K., Grabski, M., Grabowski, L., Gorniak, M., Jurczak-Kurek, A., Wegrzyn, G. and Wegrzyn, A. 2020. Characteristics of a series of three bacteriophages infecting Salmonella enterica strains. International Journal of Molecular Sciences, 21(6152), 1-26.

Krasowska, A., Biegalska, A., Augustyniak, D., Los, M., Richert, M. and Lukaszewicz, M. 2015. Isolation and characterization of phages infecting *Bacillus subtilis*. BioMed Research International, 2015, 1–10.

Kuhn, J., Suissa, M., Wyse, J., Cohen, I., Weiser, I., Reznick, S., Lubinsky-Mink, S., Stewart, G. and Ulitzur, S. 2002. Detection of bacteria using foreign DNA: The development of a bacteriophage reagent for *Salmonella*. International Journal of Food Microbiology, 74(3), 229–38.

Kumar, T., Rajora, V. S., Arora, N., Praskash, A. and Shukla, S. K. 2017. Isolation and characterization of *Salmonella* bacteriophages from poulty and pig sewage wastes. Indian Journal of Animal Sciences, 87(5), 562–67.

Lee, W. J., Billington, C., Hudson, J. A. and Heinemann, J. A. 2011. Isolation and characterization of phages infecting *Bacillus cereus*. Letters in Applied

Microbiology, 52(5), 456–64.

Leung, V., Szewczyk, A., Chau, J., Hosseinidoust, Z., Groves, L., Hawsawi, H., Anany, H., Griffiths, M. W., Ali, M. M. and Filipe, C. D. 2018. Long-term preservation of bacteriophage antimicrobials using sugar glasses. ACS Biomaterials Science and Engineering, 4(11), 3802–8.

Leverentz, B., Conway, W. S., Alavıdze, Z., Janisiewicz, W. J., Fuchs, Y., Camp, M. J., Chighladze, E. and Sulakvelidze, A. 2001. Examination of bacteriophage as a biocontrol method for *Salmonella* on fresh-cut fruit: A model study. Journal of Food Protection, 64(8), 1116–1121.

Li, M., Lin, H., Jing, Y. and Wang, J. 2020. Broad-host-range Salmonella bacteriophages STP4-a and its potential application evaluation in poultry industry. Poultry Science, 99, 3643-3654.

López-Cuevas, O., Campo, N. C., Leon-Felix, J., Gonzales-Robles, A. and Chaidez, C. 2011. Characterization of bacteriophages with a lytic effect on various *Salmonella* serotypes and *Escherichia coli* O157:H7. Canadian Journal of Microbiology, 7(12), 1042–1051.

Mahmoud, M., Askora, A., Barakat, A. B., Rabie, O. E. and Hassan, S. E. 2018. Isolation and characterization of polyvalent bacteriophages infecting multi drug resistant *Salmonella* serovars isolated from broilers in Egypt. International Journal of Food Microbiology, 266, 8-13.

McDermott, P. F., Zhao, S., Wagner, D. D., Simjee, S., Walker, R. D. and White, D. G. 2002. The food safety perspective of antibiotic resistance. Animal Biotechnology, 13(1), 71–84.

McLaughlin, M. R. and King, R. A. 2008. Characterization of *Salmonella* bacteriophages isolated from swine lagoon effluent. Current Microbiology, 56(3), 208–13.

Milho, C., Silva, M. D., Melo, L., Santos, S., Azeredo, J. and Sillankorva, S. 2018. Control of Salmonella Enteriditis on food contact surfaces with bacteriophage PVP-SE2. Biofouling, 34(7), 753-768.

Mkakosya, R. S. 1999. Hayvansal ve çevresel hareketli *Aeromonas* bakteriyofajlarının izolasyonu. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 56, Ankara.

Modi, R., Hirvi, Y., Hill, A. and Griffiths, M. W. 2001. Effect of phage on survival of *Salmonella* Enteritidis during manufacture and storage of cheddar cheese made from raw and pasteurized Milk. Journal of Food Protection, 64(7), 927–33.

Moon, S. H., Waite-Cusic, J. and Huang, E. 2020. Control of Salmonella in chicken meat using a combination of a commercial bacteriophage and plant-based essential oils. Food Control, 110, 106984, 1-6.

O'Flynn, G., Coffey, A., Fitzgerald, G. F. and Ross, R. P. 2006. The newly isolated lytic bacteriophages St104a and St104b are highly virulent against *Salmonella enterica*. Journal of Applied Microbiology, 101(1), 251–59.

Orji, M. U., Onuigbo, H. C. and Mbata, T. I. 2005. Isolation of *Salmonella* from poultry droppings and other environmental sources in Awka, Nigeria. International Journal of Infectious Diseases, 9(2), 86–89.

Pao, S., Rolph, S.P., Westbrook, E.W. and Shen H. 2006. Use of bacteriophages to control *Salmonella* in experimentally contaminated sprout seeds. Journal of Food Science, 69(5), 127–130.

Park, M., Lee, J. H., Shin, H., Kim, M., Choi, J., Kang, D. H., Heu, S. and Ryu, S. 2012. Characterization and comparative genomic analysis of a novel bacteriophage, SFP10, simultaneously inhibiting both *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7. Applied and Environmental Microbiology, 78(1), 58–69.

Phongtang, W., Choi, G. P., Chukeatirote, E. and Ahn, J. 2019. Bacteriophage control of Salmonella Typhimurium in milk. Food Sci Biotechnol, 28(1): 297-301.

Raghu, H. V., Manju, G., Manjunatha, B. M., Mishra, S. and Sawale, Praveen. 2012. Benefical face of bacteriophages: Applications in food processing. International Journal for Quality Research, 6(2), 101-108.

Ramirez, K., Cazarez-Montoya, C., Lopez-Moreno, H. S. and Castro-del Campo, N. 2018. Bacteriophage cocktail for biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7: Stability and potential allergenicity study. *PLoS ONE*, 13(5), 1–19.

Rattanachaikunsopon, P. and Phumkhachor, P. 2012. Bacteriophage PPST1 isolated from hospital aastewater, a potential therapeutic agent against drug resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi. In: *Salmonella* - Distribution, Adaptation, Control Measures and Molecular Technologies, Bassam, A. A. and Joshua, B. Gurtler (eds.), IntechOpen, 159,172.

Robeson, J., Turra,G., Huber, K. and Borie, C. 2014. A note on stability in food matrices of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis controlling bacteriophages. Electronic Journal of Biotechnology, 17(4), 189–91.

Rogers, K. 2018. Bacteriophages. Encylopedia Britannica 10–12. https://www.britannica.com/science/bacteriophage.

Sadekuzzaman, M., Mizan, M. F. R., Yang, S., Kim, H. and Ha S. 2017. Application of bacteriophages for the inactivation of Salmonella spp. in biofilms. Food Science and Technology International, 24(5), 424-433.

Salmond, G. P.C. and Fineran, P. C.. 2015. A century of the phage: Past, present and future. Nature Reviews Microbiology, 13(12), 777–86.

Sklar, I. B. and Joerger, R. D. 2001. Attempts to utilize bacteriophage to combat *Salmonella enterica* serovar Enteritidis infection in chickens. Journal of Food

Safety, 21(1), 15–29.

Son, H. M., Duc, H. M., Masuda, Y.,, Honjah, K. and Miyamoto, T. 2018. Application of bacteriophages in simultaneously controlling *Escherichia coli* O157:H7 and extended spectrum beta lactamase producing *Escherichia coli.* Applied Microbiology and Biotechnology, 102(23), 10259–71.

Soni, K. A. and Nannapaneni, R. 2010. Bacteriophage significantly reduces *Listeria monocytogenes* on raw salmon fillet tissue. *J*ournal of Food Protection, 73(1), 32–38.

Sakin Şahin, T., Urgancı, N. N. and Yıldırım, Z. 2020. Lytic bacteriophages effective against Escherichia coli O157:H7, a foodborne pathogen. Gıda, 45(4), 635-645.

Sritha, K. S. and Bhat, S. G. 2018. Genomics of Salmonella phage ΦStp1:Candidate bacteriophage for biocontrol. Virus Genes, 54, 311-318.

Şanlıbaba, P. ve Uymaz, B. 2015. Gıdalarda *Listeria monocytogenes*'in biyokontrolünde faj uygulaması. Akademik Gıda, 13(1), 81-88.

Şengül, S. S. 2008. Broylerlerde *Salmonella* Enteritidis ve *Salmonella* Typhimurium infeksiyonlarının Elisa ve drag sıvap yöntemleri ile incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 63, Aydın.

Thung, T. Y., Mudiyanselage, J., Chang, W. S., Loo, Y. Y., Chin, Y. Z., Kuan, C. H., Tan, C. W., Basri, D. F., Jasimah, C. W. and Radu, S. 2017. Use of a lytic bacteriophage to control *Salmonella* Enteritidis in retail food. LWT - Food Science and Technology, 78, 222–225.

Thung, T. Y., Lee, E., Mahyudin, N. A., Anuradha, K., Mazlan, N., Kuan, C. H., Pui, C. F., Ghazali, F. M., Rashid, N. M. A., Rollon, W. D., Tan, C. W. and Radu, S. 2019. Evaluation of lytic bacteriophages for biocontrol of *Salmonella* Typhimurium in different food matrices. LWT-Food Science and Technology, 105, 211-214.

Torun, E. Tavuk dışkıları ve çevresel örneklerden Salmonella Infantis fajlarının izolasyonu ve karakterizasyonu. 2018. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 72, Ankara.

Uddin, M. J., Easwaran, M. and Ahn, J. 2018. Characterization of bacteriophages specifity for antibiotic-resistant *Salmonella* Typhimurium. Annals of Microbiology, 68, 637-643.

Uğur, E. 2018. Çiğ sütten yapılan beyaz peynirde ticari faj preparatlarıyla patojen bakterilerin kontrolü. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, 124, Isparta.

Wang, C., Chen, Q., Zhang, C., Yang, J., Lu, Z. and Lu, F. 2017. Characterization of a broad host-spectrum virulent *Salmonella* bacteriophage Fmb-P1 and its application on duck meat. Virus Research, 236(April), 14–23.

Wang, Q., Zeng, X., Yang, Q. and Yang, C. 2018. Identification of a bacteriophage from an environmental multidrug-resistant *E. coli* isolate and its function in horizontal transfer of ARGs. Science of the Total Environment, 639, 617–23.

Wei, S., Chelliah, R., Rubab, M., Oh, D. H., Uddin, M. J. and Ahn, J. 2019. Bacteriophages as potential tools for detection and control of Salmonella spp. in food systems. Microorganisms, 7(570), 1-22.

Wernicki, A., Nowaczek, A. and Urban-Chmiel, R. 2017. Bacteriophage therapy to combat bacterial infections in poultry. Virology Journal, 14(179), 1–13.

Whichard, J. M., Sriranganathan, N. and Pierson, F. W. 2003. Suppression of *Salmonella* growth by wild-type and large-plaque variants of bacteriophage Felix O1 in liquid culture and on chicken frankfurters. Journal of Food Protection, 66(2), 220–25.

Wong, C. L., Sieo, C. C., Tan, W. S., Abdullah N., Hair-Bejo, M., Abu, J. and Ho, Y. W. 2014. Evaluation of a lytic bacteriophage, Φ St1, for biocontrol of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in chickens. International Journal of Food Microbiology, 172: 92–101.

Xie, Y. Savell, J. W., Arnold, A. N., Gehring, K. B., Gill, J. J. and Taylor, T. M. 2016. Prevalence and characterization of Salmonella enterica and Salmonella bacteriophages recovered from beef cattle feedlots in South Texas. Journal of Food Protection, 79(8),1332-1340.

Yıldırım, Z., Sakin, T. and Çoban, F. 2018. Isolation of lytic bacteriophages infecting Salmonella Typhimurium and Salmonella Enteriditis. Acta Biologica Hungarica, 69(3), 350-369.

Yoichi, M., Morita, M., Mizoguchi, K. Fischer, C. R., Unno, H. and Tanji, Y. 2004. The criterion for selecting effective phage for *Escherichia coli* O157:H7 control. Biochemical Engineering Journal, 19(3), 221–27.

Yüksel, H. T., Erbaş, G., Parın, U. ve Kırkan, Ş. 2016. Antibiyotik dirençli bakterilerin tedavi ve biyokontrolünde bakteriyofaj kullanımı. Animal Health Prod and Hygiene, 5(2), 477–80.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Merve AKPINAR
Doğum Yeri :Ankara
Doğum Tarihi :17.11.1992
Medeni Hali :Bekar
Yabancı Dili :İngilizce

Eğitim Durumu

Lise :Ankara Alparslan Anadolu Lisesi (2017-2011)
Lisans :Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü (2011-2016)
Yüksek Lisans :Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı (2018-)

Çalıştığı Kurum ve Yılı

Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü (2018-)

Hakemli Dergiler

Akpınar, M., Halkman, A. 2019. Gıda Patojenlerinin Biyokontrolünde Bakteriyofaj Uygulamaları. Gıda, 44 (6), 1106-1120.

Ulusal Kongre Sunum

Akpınar, M., Halkman, A. K. 2020. Salçadan izole edilen *Pediococcus acidilactici* suşunun çeşitli patojenler üzerine antimikrobiyel etkisi. Türkiye 13. Ulusal Gıda Kongresi, 21-23 Ekim, Bildiri Özetleri Kitabı, Çanakkale, TÜRKİYE.

Akpınar, M., Bayrak, A., Erdem, C., Halkman, A. K. 2020. Dezenfektan kombinasyonlarının farklı zaman parametrelerinde farklı mikroorganizmalar üzerine etkisi. Türkiye 13. Ulusal Gıda Kongresi, 21-23 Ekim, Bildiri Özetleri Kitabı, Çanakkale, TÜRKİYE.

Akpınar, M., Topacık, L., Işık, E., Güler, Y. B., Halkman, A. K. 2020. Yeşil yapraklı sebzelerin sterilizasyonunda çeşitli dezenfektanların etkisi. Türkiye 13. Ulusal Gıda Kongresi, 21-23 Ekim, Bildiri Özetleri Kitabı, Çanakkale, TÜRKİYE.

Yılmaz, M. S., Akpınar, M., Şakıyan, Ö. 2020. Farklı bitkilerden elde edilen uçucu yağların antifungal etkileri. Türkiye 13. Ulusal Gıda Kongresi, 21-23 Ekim, Bildiri Özetleri Kitabı, Çanakkale, TÜRKİYE.

Uluslararası Kongre Sunum

Akpınar, M., Kolcuoğlu, G., Halkman, A. K. 2018. *Lactobacilli* as a cause of deterioration in pastry, 3rd International Congress on Food Technology, 10-12 October, Book of Abstracts, Nevşehir, TURKEY.

Editörlük

3rd International Congress on Food Technology Abstract Book, (2018). Editor: A. Kadir HALKMAN, Gülten KOLCUOĞU, Naciye KUTLU KANTAR, Merve AKPINAR.

Türkiye 13. Gıda Kongresi Bildiri Özetler Kitabı, (2020). Editör: A. Kadir HALKMAN, Merve AKPINAR, Gülten KOLCUOĞLU.

Kitap Bölümleri

Halkman A. K., Ataman, P., Akpınar, M. 2019. *Gıda Güvenliği*. A. Kadir Halkman (Ed) *Gıda Mikrobiyolojisi.* Başak Matbaacılık ve Tanıtım Hizmetleri Ltd, Ankara, 648 s. ISBN: 978-605-245-683-5.