

***SALMONELLA SPP. VE ESCHERICHIA COLI'YE ETKİLİ
BAKTERİYOFAJLARIN KARAKTERİZASYONU VE
GIDA UYGULAMALARI***

**CHARACTERIZATION AND FOOD APPLICATION OF
PHAGES EFFECTIVE AGAINST *SALMONELLA SPP.* AND
*ESCHERICHIA COLI***

ESRA EKİZ

PROF. DR. İSMAİL HAKKI BOYACI

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2022

Büşra, Dursun, Fatma, Muammer Furkan,

Hacı Ali ve Yeter EKİZ'e...

ÖZET

***SALMONELLA* SPP. VE *ESCHERICHIA COLI*'YE ETKİLİ BAKTERİYOFAJLARIN KARAKTERİZASYONU VE GIDA UYGULAMALARI**

Esra EKİZ

Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. İsmail Hakkı BOYACI

Haziran 2022, 79 sayfa

Gıda kaynaklı hastalıklar ile ilişkilendirilmekte olan patojenler ile mücadelede biyolojik ve kimyasal birçok yöntem bulunmaktadır. Antimikrobiyal kimyasalların yani antibiyotiklerin kullanımı antibiyotik dirençli bakterilerin ortaya çıkmasının ivmelenmesinden dolayı geliştirmelere veya alternatiflere gereksinim duymaktadır. *Salmonella* türleri, gıda kaynaklı enfeksiyonlara yol açan ve ciddi sağlık etkileri barındıran patojen bakteriler olmalarının yanı sıra gıda bozulmalarına da yol açmaktadırlar. *Escherichia coli* (*E. coli*) ise gıdalara kontaminasyonlar, yetersiz ısıtma işlemi gibi problemler ile bulaşmakta ve gıda bozulmalarına sebebiyet vermektedir. Bakteriyofaj uygulamaları ile bu bakterilerin eliminasyonu sağlanabilmektedir. Bu tez kapsamında *E. coli* K-12 bakterisine etkili bakteriyofajlar izole edilmiş, saflaştırılmış ve konsantre edilmiştir. Bakteriyofajlar için konakçı skalası belirlenmiş ve adsorpsiyon hız

sabitleri hesaplanmıştır. Konsantre edilmiş bakteriyofajların DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve bu DNA'lar restriksiyon enzimleri ile kesim yöntemiyle fragment şablonları elde etmek amacıyla kullanılmıştır. Bu yöntemle göre farklı olduğu saptanan bakteriyofajların tek aşamalı gelişme eğrileri çıkarılmış, patlama büyüklüğü ve latent dönem süreleri hesaplanmıştır. Bakteriyofajların pH ve sıcaklık stabiliteleri belirlenmiştir. Konsantre fajlar, transmisyon elektron mikroskobu ile morfolojik olarak karakterize edilmiştir. Konak bakterilere etkili bakteriyofaj karışımları kullanılarak yağsız sütteki *S. enteritidis*, *S. typhimurium* ve *E. coli* K-12 bakterilerinin inhibisyonu test edilmiştir. Bu denemeler farklı ortam sıcaklıklarında (4 ve 25°C) ve farklı bakteri inokülasyon miktarlarında gerçekleştirilmiştir. 24 saatin sonunda 25°C'de en yüksek bakteri inaktivasyonu, *Salmonella* faj karışımı için 3,5 log₁₀ KOB/ml ve *E. coli* K-12 faj karışımı için 4,8 log₁₀ KOB/ml olarak düşük bakteri inokülasyon miktarlarında saptanmıştır. Soğuk zincirin kırılması durumunu simüle etmek amacıyla *E. coli* K-12 bakterisi içeren kontrol grubu ile farklı MOI değerinde bakteriyofaj karışımı eklenmiş deney grubu sütler 7 gün boyunca 4°C'de muhafaza edilmiştir. Süt örnekleri, 7 günün sonunda 25°C'de inkübe edilerek 24 saat boyunca bakteri/ bakteriyofaj sayılarındaki değişimler takip edilmiştir. *E. coli* K-12 inaktivasyonunda, bakteriyofaj uygulaması üzerinde stres varlığının etkisi ilk defa bu çalışma ile ortaya koyulmuştur. Tez kapsamında, yağsız süte bakteriyofaj karışımı uygulamasında ortam parametrelerinin etkisi araştırılmış olup *Salmonella* ve *E. coli* K-12 bakterilerinin biyokontrolünde bu karışımların kullanılabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Bakteriyofaj, Patogen, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* K-12, Bakteriyofaj Terapi, Süt

ABSTRACT

CHARACTERIZATION AND FOOD APPLICATION OF PHAGES EFFECTIVE AGAINST *SALMONELLA* SPP. AND *ESCHERICHIA COLI*

Esra EKİZ

Master of Science, Department of FOOD ENGINEERING

Supervisor: Prof. Dr. İsmail Hakkı BOYACI

June 2022, 79 pages

There are many biological and chemical methods to combat with foodborne pathogens. Improvements or alternatives are required about the use of antimicrobial chemicals, namely antibiotics, due to the acceleration of the emergence of antibiotic-resistant bacteria. *Salmonella* species are pathogenic bacteria that cause foodborne infections and have serious health effects, as well as induce food spoilage. *Escherichia coli*(*E. coli*) which passed foods via problems such as contamination, insufficient heat treatment causes spoilages. Phage therapy is used as a biological control method for the elimination of these bacteria. In this thesis, bacteriophages effective against *E. coli* K-12 were isolated, purified and concentrated. Host ranges of bacteriophages were determined and their adsorption rate constants were calculated. DNA isolation of concentrated bacteriophages was performed and these DNAs were used to obtain fragment templates by digesting with restriction enzymes. One-step growth curves of

bacteriophages, which were found to be different according to this method, were inferred, burst size and latent periods were determined. Moreover, pH and temperature stability are determined. Concentrated phages were also morphologically characterized by transmission electron microscopy. Inhibition of *S. enteritidis*, *S. typhimurium* and *E. coli* K-12 bacteria in skimmed milk was tested using bacteriophage mixtures effective against host bacteria. These experiments were carried out at different ambient temperatures (4 and 25°C) and different bacterial inoculation amounts. At the end of 24 hours, the highest bacterial inactivation was detected at low bacterial inoculation amounts as 3.5 log₁₀ CFU/ml for *Salmonella* phage mix and 4.8 log₁₀ CFU/ml for *E. coli* K-12 phage mix at 25°C. In order to simulate the breaking of the cold chain, the milks of the control group containing *E. coli* K-12 and the experimental group milks to which a mixture of bacteriophages with different MOIs were stored at 4°C for 7 days. At the end of 7 days, the milk samples were incubated at 25°C and the changes in bacteria or bacteriophage numbers were followed for 24 hours. The effect of the presence of stress on bacteriophage therapy in *E. coli* K-12 inactivation in milk was demonstrated for the first time with this study. Within the scope of the thesis, the effect of environmental parameters in the application of bacteriophage mixture to skimmed milk was investigated and it was concluded that these mixtures could be used in the biocontrol of *Salmonella* and *E. coli* K-12 bacteria.

Keywords: Bacteriophage, Pathogen, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* K-12, Bacterophage Therapy, Milk

TEŞEKKÜR

Lisans ve lisansüstü eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinin ışığıyla dimağımı genişletip beni öğrenmeye teşvik etmesinin yanı sıra tez yazım sürecinde de yepyeni ufuklar kazanmamı olanaklı kılan desteğiyle her zaman yanımda olan; öğrencisi olmaktan onur ve gurur duyduğum saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. İsmail Hakkı BOYACI'ya,

Tez çalışma sürecimde bilgi, deneyim ve yardımlarını esirgemeyen sevgili hocam Doç. Dr. Esra ACAR SOYKUT'a,

Bilgilerini benimle paylaşmaktan çekinmeyen, deneyimleri ile bana yol gösteren, nezaketleri ile öğrenme sürecimi kolaylaştıran, yardımları ile her zaman yanımda olan ve yanımda olmalarını temenni ettiğim sevgili arkadaşlarım Yük. Gıda Müh. Emine Kübra TAYYARCAN ve Yük. Gıda Müh. Şefika EVRAN'a,

Tez çalışmalarım esnasındaki destekleri ve yanımda olmalarının verdiği mutluluktan dolayı sevgili arkadaşlarım Yük. Gıda Müh. Kübra GÜVEN ve Kimya Müh. Ayşe Aybüke ERTÜRK'e,

Sevgili arkadaşlarım Yük. Gıda Müh. Banu SEZER, Yük. Gıda Müh. Pervin ARI AKIN, Gıda Müh. Zeyneb GÜNEYSU ve Güverte Lab. grubunun tamamına,

Her zaman yanımda olan annem Fatma EKİZ, babam Dursun EKİZ, kardeşlerim Büşra ve Muammer Furkan EKİZ, Hacı Ali ve Yeter EKİZ'e ve Kezban YILMAZ'a,

Desteklerini her zaman hissettiğim sevgili halam Fatma YILMAZ, amcam Durmuş EKİZ başta olmak üzere akrabalarımın tümüne,

sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Bakteriyofajlar.....	4
2.1.1.Tarihçesi	4
2.1.2. Morfolojileri ve Genel Özellikleri.....	5
2.1.3. Yaşam Döngüsü	8
2.1.4. Faj ve Bakteri Etkileşimi.....	10
2.2. Bakteriyofaj Çalışma Alanları.....	11
2.3. Patojen Mikroorganizmalar.....	11
2.3.1. Gıda Açısından Önemi	11
2.3.2. <i>Escherichia coli</i>	12
2.3.3. <i>Salmonella</i>	13
2.4. Süt ve Süt Ürünleri.....	15
2.4.1. Genel Özellikleri	15
2.4.2. Türkiye'de ve Dünyada Süt ve Süt Ürünleri Üretimi	17
2.4.3. Süt Bileşenleri ve Faj Etkileşimi.....	18
2.4.3.1. Karbonhidratlar	18
2.4.3.2. Lipidler	19
2.4.3.3. Proteinler	20

2.4.4. Bakteriyofaj Uygulamaları	21
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	25
3.1. Materyal	25
3.1.1. Bakteriler ve Fajlar	25
3.1.2. Besiyerleri ve Kimyasallar.....	25
3.2. Metod	26
3.2.1. <i>E. coli</i> K-12 Faj İzolasyonu, Saflaştırılması ve Konsantre Edilmesi.....	26
3.2.1.1. Faj İzolasyonu.....	26
3.2.1.2. Tek Plak İzolasyonu.....	26
3.2.1.3. Fajların Zenginleştirilmesi.....	27
3.2.1.4. Fajların Saflaştırılması ve Konsantrasyonu	28
3.2.1.5. Fajların ve Bakterilerin Muhafaza Edilmesi	28
3.2.2. Fajların Karakterizasyonu	28
3.2.2.1. Konakçı Skalasının Belirlenmesi	28
3.2.2.2. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)	29
3.2.2.2.1. Faj Nükleik Asit İzolasyonu	29
3.2.2.2.2. Restriksiyon enzimleri ile Kesim Profillerinin Çıkarılması	30
3.2.2.3. Tek Aşamalı Gelişme Eğrisi	30
3.2.2.4. Adsorpsiyon Hızı	32
3.2.2.5. Transmisyon Elektron Mikroskobu İle Morfolojinin Belirlenmesi.....	32
3.2.2.6. pH ve Sıcaklık Stabilitesi.....	32
3.2.3. Bakteriyofaj Gıda Uygulaması	33
3.2.3.1. Süt Örneklerinin Hazırlanması	33
3.2.3.2. Sütte <i>Salmonella</i> Faj Karışımı Etkinliğinin Belirlenmesi.....	33
3.2.3.3. Sütte <i>E. coli</i> K-12 Faj Karışımı Etkinliğinin Belirlenmesi	34
3.2.3.4. Soğuk Zincirin Kırılması	34
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	35
4.1. <i>E. coli</i> K-12 Faj İzolasyonu, Saflaştırılması ve Konsantre Edilmesi.....	35
4.1.1. Faj İzolasyonu.....	35
4.1.2. Tek Plak İzolasyonu.....	36
4.1.3. Fajların Zenginleştirilmesi.....	37
4.2. Fajların Karakterizasyonu.....	37

4.2.1. Fajların Konakçı Skalasının Belirlenmesi	37
4.2.2. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)	40
4.2.3. Fajların Tek Aşamalı Gelişme Eğrisi	47
4.2.4. Adsorpsiyon Hızı.....	49
4.2.5. Morfolojik Karakterizasyon	51
4.2.6. pH ve Sıcaklık Stabilitesi	52
4.3. Bakteriyofaj Gıda Uygulaması	54
4.3.1. Sütte <i>Salmonella</i> Faj Karışımı Etkinliğinin Belirlenmesi	54
4.3.2. Sütte <i>E. coli</i> K-12 Faj Karışımı Etkinliğinin Belirlenmesi	59
4.3.3. Soğuk Zincirin Kırılması.....	62
5. YORUM	66
6. KAYNAKLAR.....	70

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1.	Türkiye yıllara göre kilogram süt fiyat değişimi (TÜİK, 2022).....	17
Şekil 2. 2.	Türkiye pandemi öncesi ve pandemi döneminde, süt % fiyat değişimi (TÜİK, 2022).....	18
Şekil 2. 3.	Laktozun genel yapısı [48].	19
Şekil 2. 4.	Trigliserit moleküler yapısı [56].....	20
Şekil 2. 5.	Kazein moleküler yapısı [57].	20
Şekil 3. 1.	Tek aşamalı gelişme eğrisi [15].....	31
Şekil 3. 2.	25°C’de ve 85 rpm/dk ile inkübe edilen süt örneklerinin inkübasyonu. ...	34
Şekil 4. 1.	Spot test ile örneklerde faj varlığı.....	35
Şekil 4. 2.	Steril enjektör iğnesi ile kesilmiş, tek plak halinde düşen bölgeler.....	36
Şekil 4. 3.	Etkin MOI değerlerinin bulunması.....	37
Şekil 4. 4.	Fajların spot test ile konakçı skalasının belirlenmesi. Fajlara konaklık eden <i>E. coli</i> K-12 bakterisi için pozitif liziz yanıtı (a), Fajlar için konak olmayan <i>E. coli</i> O157:H7 bakterisi için negatif liziz yanıtı (b).....	38
Şekil 4. 5.	Faj nükleik asitlerinin jel görüntüsü.	40
Şekil 4. 6.	Faj nükleik asitlerinin HindIII enzimi ile kesimi jel görüntüsü.	41
Şekil 4. 7.	Faj nükleik asitlerinin EcoRI enzimi ile kesimi jel görüntüsü.	42
Şekil 4. 8.	Faj nükleik asitlerinin EcoRV enzimi ile kesimi jel görüntüsü.....	43
Şekil 4. 9.	Faj nükleik asitlerinin XbaI enzimi ile kesimi jel görüntüleri.....	44
Şekil 4. 10.	Faj DNA’larının KpnI enzimi ile kesimi jel görüntüsü.	45
Şekil 4. 11.	Faj DNA’larının XhoI enzimi ile kesimi jel görüntüsü.	45
Şekil 4. 12.	Tek Aşamalı Gelişme Eğrileri. K12.2b (a) ve K12.4a (b).....	48
Şekil 4. 13.	K12.2b (a) ve K12.4a (b) fajları % adsorpsiyon değişimi.....	50
Şekil 4. 14.	K12.2b (a) ve K12.4a (b) fajlarının TEM görüntüleri.....	52
Şekil 4. 15.	K12.2b ve K12.4a fajları pH (a) ve sıcaklık (b) stabilitesi. (*) Tespit edilebilir değerlerin altında.....	54
Şekil 4. 16.	25°C’de yüksek inokülasyon miktarlarında, steril yağsız süt örneklerinde <i>Salmonella</i> bakteri (a) ve faj (b) sayılarındaki değişimler.	56

Şekil 4. 17.	25°C’de düşük inokülasyon miktarlarında, steril yağsız süt örneklerinde <i>Salmonella</i> bakterisi (a) ve faj (b) sayılarındaki değişimler.....	57
Şekil 4. 18.	4°C’de düşük inokülasyon miktarlarında, steril yağsız süt örneklerinde <i>Salmonella</i> bakterisi (a) ve faj (b) sayılarındaki değişimler.....	59
Şekil 4. 19.	25°C’de yüksek inokülasyon miktarlarında, steril yağsız süt örneklerinde <i>E. coli</i> K-12 bakterisi (a) ve faj (b) sayılarındaki değişimler.	60
Şekil 4. 20.	25°C’de düşük inokülasyon miktarlarında, steril yağsız süt örneklerinde <i>E. coli</i> K-12 bakterisi (a) ve faj (b) sayılarındaki değişimler.....	62
Şekil 4. 21.	4°C’de 7 gün boyunca bakterisi (a) ve faj (b) sayıları ile sonraki 24 saatte 25°C’deki değişimi.....	64
Şekil 4. 22.	Soğuk zincirdeki kırılma sonrası 37°C’de bakterisi (a) ve faj (b) sayılarındaki değişim.	65

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2. 1. Fajların Sınıflandırılması ve Özellikleri.	5
Çizelge 2. 2. Sütte faj uygulaması ile <i>Salmonella</i> bakteri inhibisyonu.	14
Çizelge 2. 3. Süt ve süt ürünleri kaynaklı patojenler ve neden olduğu hastalıklar (Walstra ve ark, 2005).	16
Çizelge 4. 1. Tek plak izolasyonu sonrası fajların isimlendirilmesi.	36
Çizelge 4. 2. <i>E. coli</i> K-12'ye etkili fajların konakçı skalası.	38
Çizelge 4. 3. Faj DNA'larının restriksiyon enzimleri ile kesim profilleri.	46
Çizelge 4. 4. Fajların RFLP analizlerine göre gruplandırılması.	47
Çizelge 4. 5. Adsorpsiyon hız sabitleri.	49
Çizelge 4. 6. Faj boyutları.	51

SİMGELER VE KISALTMALAR

Kısaltmalar

ADB	Antibiyotik dirençli bakteriler
Ar-ge	Araştırma –geliştirme
CDC	Amerika Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
FTS	Fizyolojik Tuzlu Su
ICTV	Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi
kbp	kilo baz çifti
KOB	Koloni Oluşturan Birim
MDR	Çoklu ilaç direnci
MOI	Multiplicity of Infection
PEG	Polietilen glikol
POB	Plak Oluşturan Birim
PW	Pepton Water
SYGM	Süt Yağ Globül Membran
TBE	Tris-Borat- EDTA

1.GİRİŞ

Her yıl, dünya nüfusunun yaklaşık onda biri (600 milyon) insan kimyasal veya biyolojik kontaminasyonlara maruz kalmış gıdaları tüketerek hasta olmakta ve 420 bin insan hayatını kaybetmektedir [1]. Dünya nüfusunun 2050 yılına kadar yaklaşık 2 milyar artarak 9,7 milyara ulaşması beklenmektedir. Artan nüfus ile beraber gelecek olan gıda arzındaki artışlar, buna karşılık su kaynakları ve iklim değişikliği gibi problemlerin gıdaya ulaşılabilirlik ve güvenilir gıda ile ilgili yarattığı endişeleri, şimdiden gözler önüne sermektedir. Aynı doğrultuda, gıda bozulmaları kaynaklı ekonomik kayıplar ve gıda patojenlerinin ortaya çıkardığı geniş çaplı sağlık etkileri gıda güvenilirliğinin önemini vurgulamaktadır. Gıda bozulmalarının seyrini değiştiren olgulardan bir tanesini de tüketicinin diyetindeki değişimler oluşturmaktadır. Tüketicinin talep ettiği tuz, şeker gibi bileşenlerin oranındaki azalmalar raf ömrünü de etkilemektedir [2].

Güvenilir gıdanın geleceğini etkileyen durumlardan biri de patojen bakterilerin var olan antibiyotiklere direnç kazanmasıdır. 2016 yılında Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) klinik alanda antibiyotik dirençli bakteriler (ADB)'in eliminasyonu adına etkili ilaçların geliştirilmesine dikkat çekmiştir [3]. Ancak yeni antibiyotiklerin geliştirilmesi adına ihtiyaç duyulan Araştırma –geliştirme (Ar-ge) maliyetleri yüksektir [4]. ADB'nin önlenmesi amacıyla halkın ve sağlık personellerinin doğru antibiyotik kullanımı için kitlesel eğitimleri, antibiyotik satışının kontrolü gibi önlemler alınabilmektedir. Bununla birlikte faj terapi, dirençli bakteriler ile mücadelede alternatif bir yöntem olarak , bilim insanları tarafından çalışılmaktadır [5]. ADB ile enfekte olmuş insanlarda yapılan faj uygulamasının araştırıldığı bir meta-analitik çalışmaya göre 165 hasta insanın %85'inde dirençli bakteri yükünde azalma sağlanmıştır. Bazı araştırmacılar %15'lik faj uygulama etkinliğindeki bu başarısızlığı hatalı uygulama, düşük faj konsantrasyonu ve farklı bakteri türleri ile ko-enfeksiyon gibi sebeplere bağlamışlardır [6].

Bakteriyofajların keşfinden antibiyotiklerin yükselişine kadar ki süreçte klinik çalışmaların da yer aldığı farklı uygulamalar ile bakteriyofajların etkinliği anlaşılma

çalışılmış [7, 8] olsa da antibiyotiklerin keşfi ile bakteriyofaj çalışmaları duraklama evresine gelmiş, yalnızca Sovyet Rusya bakteriyofaj uygulamalarını gerçekleştirmeyi sürdürmüştür [7].

Dünya ölçeğinde bakıldığında yeryüzünde yaklaşık 10^{30} POB'yi aşkın sayıda fajın bulunduğu düşünülmektedir. Bu kanı fajların çevrede bakteri sayısının yaklaşık 5-10 katı kadar daha fazla bulunduğu dikkate alınarak oluşturulmuştur [9]. Bakteriyofajlar, konak hücrelerini DNA replikasyon ve protein sentezi makinesi olarak kullanarak kendiliğinden amplifiye olan biyolojik ajanlardır. Bakteriyofajlar litik veya lizojenik döngüyü takip edebilirler [10]. Litik döngüyü takip eden bakteriyofajlar ilk olarak konak bakterinin yüzeyindeki reseptörlere tutunurlar. Bağlanmanın ardından genomik materyallerini bakteri sitoplazmasına aktarırlar. Sitosolde transkripsiyon, translasyon ve replikasyonun gerçekleşmesi ile viral genomdan yeni faj partikülleri meydana gelir. Sitoplazmadaki faj partikülleri bakteri hücrelerinin lizisi ile ortama salınırlar. Yeni faj partikülleri, kendiliğinden amplifiye oldukları bu süreç doğrultusunda ortamda bulunan konak bakterileri lize etmeyi sürdürürler. Lizojenik döngüyü takip eden fajlar ise konak hücre genomuna entegre olarak hücrenin ikiye bölünmesi ile gelecek jenerasyonlara aktarırlar [8]. Litik fajlar çoklu ilaç dirençli (MDR) patojenlerin kontrolünde klinik amaçlı kullanım göstermektedir. Bu fajların kullanılmasında, yüksek konak özgüllüğü, zararlı yan etkilere yol açmaması gibi nedenler ile enfeksiyonların güvenli bir şekilde eliminasyonunun sağlanması etkilidir [6].

Bu tez çalışması kapsamında, doğal kaynaklardan izole edilen *E.coli* K12'ye etkili bakteriyofajların karakterizasyonu ve bu bakteriyofajların gıda matriksinde antimikrobiyal etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Öncelikle izolasyonu gerçekleştirilen bakteriyofajlar saflaştırılmış, gliserol içeren sıvı besiyerinde stokları hazırlanmış ve -18°C 'de muhafaza edilmiştir. Saflaştırılmış bakteriyofajlar gıda denemeleri, nükleik asit izolasyonu gibi aşamalarda kullanılabilmesi için zenginleştirme işlemine tabi tutulmuştur. Titre değerleri 10⁹-10¹⁰ POB/ml'ye ulaşan örnekler PEG yöntemi ile konsantre edilmiştir. Burada 1 M NaCl, PEG ile fajların çöktürülmesinde yardımcı ajan olarak kullanılmıştır. % 10 PEG ile çöktürülen fajlar, tampon içinde çözündürülmüş kloroform ile PEG'den ayrımı sağlanmıştır. Faj konsantreleri,

restriksiyon enzim profillerinin çıkarılması amacıyla nükleik asit izolasyonunda ve mikroskopik morfolojisinin araştırılması amaçlarıyla kullanılmıştır. Restriksiyon enzimi ile kesilen fajların verdiği jel görüntülerinden yararlanılarak farklı olduğu düşünülen iki adet bakteriyofajın karakterizasyon çalışmalarına devam edilmiştir. Bu bakteriyofajların konak aralığı, tek aşamalı gelişme eğrileri belirlenmiştir. Tek aşamalı gelişme eğrileri kullanılarak patlama büyüklüğü ve latent dönem süreleri hesaplanmıştır. Bakteriyofajların konak bakteriye adsorpsiyonun araştırılması amacıyla % adsorpsiyon ve adsorpsiyon hızları belirlenmiştir. Ayrıca bakteriyofajların pH ve sıcaklık parametrelerindeki aktivasyonu değerlendirilmiştir. Karakterizasyonu tamamlanan fajlar ile miks hazırlanarak farklı MOI, sıcaklık ve bakteri inokülasyon miktarı gibi parametreler dikkate alınmış ve yağsız sütte faj etkinliği araştırılmıştır.

Koleksiyondan elde edilen *Salmonella* fajlarından elde edilen miks ile bu çalışma ile karakterizasyonu tamamlanmış *E. coli* K-12 fajlarından oluşan miksler sütte konak bakterilerinin inaktivasyonunda kullanılarak fajların sütteki antimikrobiyel aktivitesi değerlendirilmiştir. Son olarak, karakterize edilmiş *E. coli* K-12'ye etkili fajlardan oluşan karışımın soğuk zincirin kırılması durumunda yağsız sütteki bakteri inhibisyon etkinliği araştırılmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Bakteriyofajlar

2.1.1.Tarihçesi

Bakteriyofajlar veya kısaca fajlar, mikrobiyolog Frederik Twort (1915) ve Félix d'Hérelle (1917)'in birbirlerinden bağımsız olarak yürüttükleri çalışmalar ile tarih sahnesinde rol oynamaya başlamışlardır. İlk olarak Twort, bakteri üremesini engelleyen bir "transparan materyal" gözlemlemiştir. Ardından d'Hérelle, zorunlu bakteriyel parazit olmasından hareketle bakteriyofaj veya "bakteri yiyen" olarak isimlendirdiği bir anti-Shigella mikrobu izole etmiştir. Fajların tröpatik etkisini, *Salmonella gallinarum* ile enfekte olmuş tavuklara faj uygulamasının başarısını kanıtladığı hayvan denemelerinde göstermiştir [8]. Fransız Hindiçini'nde, *Pasteurella multocida* kaynaklı sığır hemorajik septisemisinin faj uygulaması alan denemeleri yapılmıştır. Gastrointestinal ve septisemik hastalıkların tedavisinde fajların kullanımına ait veriler sonrası denemeler insan boyutuna genişletilmiştir. İnsan denemelerinde kullanmaya başlamadan önce, kendisi üzerine faj uygulaması yapmıştır. Ayrıca ailesi ve çalışma arkadaşları üzerinde faj uygulaması etkilerini gözlemlemiştir [7]. Ardından *Shigella dysenteriae* bakterisini enfekte edebilen bir faj kullanarak basilli dizanteri hastası beş insan ile insan denemesi gerçekleştirmiştir. 1927 yılında yaptığı klinik denemelerde, Hindistan'da anti-kolera fajları ile koleradan kaynaklı ölüm oranlarının % 62,8'den % 8,1'e düştüğünü göstermiştir [8]. Ayrıca, 1970'li yıllarda, Pakistan'da yapılan Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) destekli klinik çalışmalarda, koleraya karşı yüksek dozajda faj uygulamasının, tetrasiklin grubu antibiyotiklere eşdeğer sonuçlar verdiği gözlenmiştir. İkinci Dünya Savaşı sonrası, Amerika'da antibiyotik kullanımı artarken Sovyet Rusya'da faj kullanımı varlığını devam ettirmiştir. Antibiyotik kullanımının revaçta olduğu bu dönemlerde, fajların dirençli bakterilere karşı yetersiz olması sorunu da faj uygulamalarını geri plana itmiştir [7].

1940'lı yıllardan sonra büyük ölçüde antibiyotik kullanımı sonrası görülmeye başlanan antibiyotik dirençli bakterilerin eliminasyonu adına, 20.yüzyılın sonlarına kadar yeni

yeni antibiyotikler keşfedilmiştir. Ancak ilerleyen yıllarda keşif hızı yavaşlamış, öyle ki 1980'lerden bu yana çok az sayıda antibiyotik sınıfı literatüre girmiştir [1, 8].

2.1.2. Morfolojileri ve Genel Özellikleri

Fajlar herhangi bir metabolizma sistemine sahip olmayan zorunlu hücre içi bakteriyel parazitlerdir [11]. Biyosferde oldukça yaygın olarak bulunan fajların genom boyutları, birkaç bin baz çiftinden 498 bin baz çiftine kadar değişiklik göstermektedir. Yüksek boyutlu genoma sahip olanlar dışındaki fajların genom boyutu, ortalama bir bakterinin genom boyutuna benzemektedir.

Faj partikülleri (virionlar), DNA veya RNA molekülüne- tek sarmallı veya çift sarmallı olan- sahiptirler ve bu nükleik asitler protein ya da lipoprotein kılıfı içerisine enkapsüle halde bulunmaktadır. Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi (ICTV)'ne göre literatürde tanımlanmış olan fajların % 95'inden fazlası ve gıda kaynaklı hastalıklara neden olan patojenlere etkili neredeyse tüm fajlar *Caudovirales* takımına aittir [11]. ICTV verilerine göre hazırlanmış, fajlara ait genel sınıflandırma ve özellikler Çizelge 2.1.'de verilmiştir [12].

Çizelge 2. 1. Fajların Sınıflandırılması ve Özellikleri.

Takım/Aile	Genom	Kılıf	Morfoloji	Virion boyutu	Konak
<i>Caudovirales/</i> <i>Myoviridae</i>	dsDNA, 1 L, 31–317 kbp	–	Kuyruklu, İkozahedral baş	Kafa (ikozahedral): 60– 145 nm; Kafa (uzatılmış): 80 × 110 nm; Kuyruk: 16– 20×80–455 nm	B, A
<i>Caudovirales/</i> <i>Podoviridae</i>	dsDNA, 1 L, 16–78 kbp	–	Kuyruklu, İkozahedral baş	Baş: 60–70 nm Kuyruk: 10–20 nm	B
<i>Caudovirales/</i>	dsDNA, 1 L,	–	Kuyruklu,	Baş: 40–80 nm;	B, A

<i>Siphoviridae</i>	21–134 kbp		İkozahedral baş	Kuyruk: 5–10 nm×100–210 nm	
<i>Microviridae</i>	ssDNA (+), D, 4.4–6.1 kbp	–	İkozahedral	25–27 nm	B
<i>Corticoviridae</i>	dsDNA, D, 10.1 kbp	–	İkozahedral, iç membran	60 nm	B
<i>Tectiviridae</i>	dsDNA, 1 L, 15 kbp	–	İkozahedral	66 nm	B
<i>Leviviridae</i>	ssRNA (+), 1 L, 3.5–4.3 kbp	–	İkozahedral	26 nm	B
<i>Cystoviridae</i>	dsRNA, 3 L, 12.7–15.0 kbp	+	Küresel	~85 nm	B
<i>Inoviridae</i>	ssDNA (+), D, inovirüsler: 5.8–12.4 kbp; plektovirüsler: 4.5–8.2 kbp	–	inovirüsler: filamentli; plektovirüsler: çubuk şekilli	inovirüsler: 7 nm×700–3500 nm; plektovirüsler: 15 nm×200–400 nm	B
<i>Plasmaviridae</i>	dsDNA, D, 12 kbp	+	Yarım küre, pleomorphic	50–125 nm	B
<i>Fuselloviridae</i>	dsDNA D, 15–18 kbp	+	Limon şekilli	55–60 nm×80–100 nm	Ar
<i>Finnlakeviridae</i>	ssDNA D, 9.2 kbp		İkozahedral, iç membran	~59 nm	B
<i>Plectroviridae</i>	ssDNA D, 4.5–8.3 kbp	-	Çubuk şekilli	Çap: 10–16 nm; Uzunluk: 70–280 nm	B
<i>Chaseviridae</i>	L, dsDNA:52–56 kbp		Kontraktıl kuyruk, izometrik baş	Baş: 53–65 nm; Kapsomer içeren, kuyruk:116–166 nm	B

<i>Herelleviridae</i>	L, dsDNA: 125–170 kbp	Kontraktıl kuyruk, izometrik baş	Baş: 85–100 nm; Kapsomer içeren, kuyruk: 130–185 nm	B
-----------------------	-----------------------------	--	--	---

L, lineer; D, Dairesel; dsDNA, çift sarmallı DNA; ssDNA, tek sarmallı DNA; ssDNA (+), pozitif tek sarmallı DNA; ssRNA, tek sarmallı RNA; dsRNA, çift sarmallı DNA; B, Bakteri; A, Arke.

Lineer veya dairesel nükleik asit içeren fajlar, şekil yapılarına göre ise kuyruklu, kübik, filamentos veya pleomorfik olabilmektedirler. Ayrıca bazı fajlar kılıf veya zarf yapılarına da sahiptirler.

Kuyruklu fajların baş kısmı izometrik ya da uzun olabilir. Kuyruk kısmı ise ya uzun ve kontraktıl ya da kısa ve kontraktıl olmayan bir morfoloji gösterebilmektedir [13]. Kuyruklu fajlar, kuyruklarındaki bağlanma alanları ve konak hücre yüzeyindeki moleküller arasındaki etkileşimler vasıtasıyla konak hücreyi tanımaktadırlar. Adezinler (Reseptör tanımlama birimleri), kuyruk yapısına ilişik olup bazı fajlar tek bir merkezi fibre kullanırken bazıları da 3, 6 veya 12 fibreden meydana gelen yığınları kullanırlar.

Ancak, muhtemel faj reseptörleri Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerde oldukça farklılık göstermektedir. Gram negatif bakterileri enfekte edebilen fajlar, konak bakteriyi tanımada, çeşitli spesifik lipopolisakkaritleri, membran proteinleri veya her iki tip reseptörleri tanımlayabilen kompleks yapıdaki adezinleri kullanabilirler. Gram pozitif bakterileri enfekte edebilenler ise peptidoglikan birimleri, teikoik asitler, lipoteikoik asitler ve bunlar ile bağlantılı proteinler yardımıyla konak bakteriyi tanıyabilmektedirler. Konak bakteriyi tanıyan ve hücre yüzeyine kuyruklarını uygun bir şekilde konumlandıran fajların, yine bu uygun konumlanmanın etkisiyle, DNA moleküllerini konak bakteri içerisine enjekte etmesi tetiklenir [14].

2.1.3. Yaşam Döngüsü

Fajların çoğu çoğalma döngülerine göre virü lent ve ılımlı fajlar olmak üzere iki ana grupta incelenebilmektedir. Virü lent fajlar litik döngüyü takip ederken ılımlı fajlar hem litik hem de lizojenik döngüleri kullanabilmektedir [11].

Kuyruklu fajlarda enfeksiyon, kuyruk fiberleri gibi adsorbe olmaya özelleşmiş yapıların hedef bakteri spesifik yüzey moleküllerine ya da kapsüllerine bağlanması ile başlar. Gram negatif bakterilerde, dış zarda bulunan proteinler, oligosakkaritler ve liposakkaritler fajların tutunmasında kullanılabilir. Altı kuyruk fiberinden en az üçünün geri dönüşümsüz olarak lipopolisakkarit tabakasının dış kısmındaki bir glukoz kalıntısına bağlanması, fajı konak bakteri yüzeyinde doğru bir şekilde konumlandırır ve kuyrukta yapısal olarak yeniden düzenlenmeyi tetikler. *Podoviridae* fajlarında, bazı durumlarda hücre dışı kapsülleri ayırabilen, enzimatik olarak aktif kuyruk proteinlerinin bulunması veya bakteri reseptörlerine erişimi kolaylaştıran O- antijeninin bulunması da adsorpsiyona yardım eder. Faj saldırısına karşılık bakteriler, çoğunlukla mutasyonla veya reseptör kaybı ile direnç gösterebilir. Bununla birlikte fajın, örneğin kuyruk fiberlerinde bir seri mutasyonlar yardımıyla adaptasyonunu sağlaması gerekebilir.

Geri dönüşümsüz adsorpsiyon sağlandıktan sonra faj genomu, Gram pozitif veya Gram negatif konak bakteri transkripsiyon/ translasyon metabolizmasına erişebilmek için iki veya üç ana bakteri bariyerini aşmak zorundadır. Genelde, faj kuyruğu uç kısmında, peptidoglikanı degrade eden bir enzim taşır ve kuyruğun bağlanması, genomik materyalin kapsitten erken ekstrüzyonunu bloke eden bir mekanizmayı devre dışı bırakır. Daha sonra DNA, membran potansiyeli veya ATP tarafından sağlanan metabolik enerjinin kullanıldığı bir mekanizma ile hücreye doğru çekilir. Fajlar, bakteri hücresi içerisinde bulunan restriksiyon ve ekzonükleaz enzimleri ile başa çıkabilmek için çok sayıda stratejiye sahiptir. Faj genomunun hücreye alınmasından sonra, konak hücre tarafından kodlanan RNA polimerazlar, faj genomunda bulunan teşvik edicileri tanır. Buna ek olarak, virion proteinleri de faj genomu ile birlikte konak hücrelerine enjekte edilebilir. Bu durum fajlara genellikle, bakteri savunma mekanizmasından koruyarak veya konak hücre metabolizmasını yönlendirerek yeni virionların sentezlenmesi için optimum koşulları oluşturmasını sağlar. Optimal koşullar sağlandıktan sonra faj genomunun replikasyonu başlar. İlimli fajların çoğu, replikasyon

için konak hücreye bağımlıyken virüent fajlar, genellikle kendi replikasyon makinesini kendisi kodlar. Replikasyondan önce DNA paketlenir, birçok kuyruklu fajda bu proses üç ana aşamada gerçekleştirilir. İlk olarak, faj baş kısmı iskele (scaffold) proteinleri etrafında toplanır. Kuyruk için bağlantı noktası oluşturan bir por kompleksi, baş kısmının bir köşesine yerleştirilir. Daha sonra terminaz, faj genomunu prokapside yerleştirir. Burada DNA translokasyonu, ATP hidrolizi ile gerçekleştirilmektedir. DNA paketlendikten sonra, kuyruk por kompleksine bağlanır [11].

Morfogenezin ardından konak hücrenin lizizi gerçekleştirilir. Kuyruklu fajların tümü liziz için iki bileşen kullanır: lizin ve holin. Lizin, peptidoglikan matriksindeki anahtar bağların birini ayırabilen bir enzimdir. Holin ise lizinin peptidoglikan tabakasına ulaşmasını ve lizizi hızlandırmasını sağlamak için uygun zamanda iç zardaki porları bir araya getiren bir proteindir [15]. Sitoplastik zarda birikmesi ve oligomerizasyonundan sonra holinler, genetik olarak önceden belirlenmiş bir zamanda, bir membran lezyonu oluşturarak iç membranı endolizin için geçirgen hale getirir. Endolizin, hücre içi ozmotik basıncı, dayanıklılığını yitinceye kadar peptidoglikan tabakayı degrade eder ve hücrenin patlaması ile birlikte olgun faj partikülleri ortama salınır. İlimli fajlar ise konak hücreyi virüent bir faj gibi parçalayarak ya da konak bakteri ile stabil bir ilişki kurarak çoğalabilir. Faj DNA'sı, konağın kromozomu ile birlikte kopyalanır ve konak için zararlı olan virüs genleri eksprese edilmez. Genel olarak faj DNA'sı, konak genomunda spesifik veya gelişigüzel bir alana entegre olur [11]. Entegre olmuş viral DNA, profaj ismini alır [16]. Bazı durumlarda faj DNA'sı, bakteri sitoplazmasında doğrusal veya dairesel plazmit olarak kalabilir. Stres koşulları altında fajlar, indüksiyon olarak adlandırılan ve litik döngü için gereken profaj genlerinin eksprese edildiği bir proses ile yeni virionların salındığı bir döngüye girebilir [11]. İlimli fajlarda her enfeksiyon döngüsünde liziz veya lizojenin gerçekleşmesi birtakım iletişim kurarak peptidlerinin ortamdaki konsantrasyonuna bağlıdır. Projeni fajları, ortamda bulunan bu moleküllerin sayısı yeteri kadar yüksek ise lizojenik döngüye geçer. Literatürde arbitrium olarak isimlendirilen bu sistem ile fajlar, önceki fajlar ile iletişim kurarak liziz-lizojeni döngüsünün kararını verirler. Bu sistem peptid sentezleyen *aimP*, hücre içi peptid reseptörü *aimR* ve negatif lizojeni regülatörü *aimX* genleri tarafından kodlanır. Farklı tip fajlarda bu iletişim molekülleri farklılık göstermektedir [17].

2.1.4. Faj ve Bakteri Etkileşimi

Faj ile bakterinin enfekte edilebilmesi için her iki türün de biraraya gelmesi gerekir ki bu durum ortam içerisinde pasif hareket (Brownian) ile sağlanmaktadır. İlk etkileşimin kurulmasının ardından enfeksiyon prosesleri başlar. Bu prosesler daha önceki kısımlarda tartışılmış olup burada yalnızca enfeksiyon prosesine etkiyen faktörlere değinilecektir.

Faj ve bakteri etkileşimini etkileyen birçok etken vardır. Bunlardan biri MOI (Multiplication of infection) değeridir ve faj sayısının bakteri sayısına oranı ile ifade edilmektedir. Başka bir deyişle, bir bakterinin ne kadar faj ile enfekte edileceğinin bir ölçüsüdür [18]. Tabla ve ark (2012) tam yağlı pastörize sütte *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) eliminasyonu üzerinde faj karışımı ve hidrostatik basınç uygulanmasının engel (hurdle) etkisini inceledikleri bir çalışmada iki farklı MOI değerinde faj uygulaması yapmışlardır. MOI 100 değerinde 1,2 ve MOI 10000 değerinde 8,4 log₁₀ KOB/ml azalma gerçekleşmiştir [19]. MOI 10000 değeri patojen inaktivasyonunda etkili olmuş olsa da yüksek MOI değerleri ekonomik açıdan daha maliyetlidir [18].

Faj uygulaması yapılacak gıdaya ait karbonhidrat, protein, yağ gibi bileşenler, gıda yapılarının birbirinden farklılaşmasından dolayı uygulamayı etkileyebilir, fajlar ile girişim yapabilirler. Ayrıca sıcaklık, pH gibi çevresel koşullardan dolayı faj stabilitesi değişiklik gösterebilmektedir. Müller-Merbach ve ark (2007) pH ve sıcaklık parametrelerinin *Lactococcus lactis* phage P008'in replikasyon ve adsorpsiyonu üzerine etkisini incelemişlerdir. Bu parametrelerin etkisini ortaya çıkarabilmek amacıyla tek aşamalı gelişme eğrisi çıkarılmıştır. Araştırma sonucuna göre pH 6,8 değerinde 20, 30 ve 35°C sıcaklıklarda latent periyot sırasıyla 37, 34 ve 24 dakika; ortalama patlama büyüklüğü ise 7, 9 ve 12 faj partikülü/ enfekte hücre olarak belirlenmiştir. pH 4,8'de 30°C sıcaklıkta ise latent periyot 25 dakika olarak hesaplanırken ortalama patlama büyüklüğü ise 22 faj partikülü/ enfekte hücre olarak bulunmuştur. pH 6,8 değerinde, 15 dakika içerisinde en yüksek % adsorpsiyon değerleri ise 20°C için 109±4, 30°C için 110±49 ve 40°C için 63±9 olarak hesaplanmıştır. pH 4,8 ve 30°C koşullarında ise fajların en fazla % 6±2'si adsorbe olmuştur [20]. Bu çalışma pH ve sıcaklığın faj replikasyon parametreleri üzerine etkisini açıkça göstermektedir.

2.2. Bakteriyofaj Çalışma Alanları

Fajlar; konaklarını enfekte etmelerinin ardından sayılarını artırmaları, tür veya serotiplere özgü olmaları ve bu nedenle yanlış pozitif sonuçların ortaya çıkma olasılığının azalması, tek bir fajın yeterli olması, düşük maliyet, liyofilize olarak daha uzun süreler saklanabilmesi, insan sağlığına tehdit oluşturacak unsurlar bulundurmaması ve hastalık veya enfeksiyon gibi riskler taşımaması, tasarlanabilir olması gibi özelliklerinden dolayı bir örnekte bakteri varlığının belirlenmesinde uygun reaktifler olarak kullanılabilirler [21].

2.3. Patogen Mikroorganizmalar

2.3.1. Gıda Açısından Önemi

DSÖ'ye göre güvenilir olmayan gıda, zararlı bakteri, virüs, parazit veya kimyasal gibi diyareden kansere kadar 200'den fazla çeşit hastalıklara sebep olan maddeleri içeren gıdalardır [22]. Bir konak üzerinde hastalıklara neden olabilen bakteri, virüs gibi organizmalar patojen, hastalık oluşturmayan tipteki organizmalar patojen olmayan organizmalar olarak adlandırılmaktadır [23].

Amerika Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi (CDC)'ne göre bazı gıda türleri gıda kaynaklı hastalıklar ile diğerlerinden daha fazla bağlantılıdır. Bu gruptaki gıdalar tavuk, sığır, domuz ve hindi etleri, meyve ve sebzeler, çiğ süt ve bunlardan yapılan ürünler, çiğ yumurtalar, deniz ürünleri ve çiğ kabuklular, filizler ve çiğ unlardır. Çiğ kümes hayvanı ürünleri *Campylobacter*, *Salmonella*, *Clostridium perfringens* gibi bakteriler içerirken çiğ et ürünleri ise *Salmonella*, *E. coli*, *Yersinia* gibi bakterileri ihtiva etmektedir. Taze meyve ve sebzeler ise tarladan sofraya herhangi bir noktada kontaminasyona maruz kalabilirler. Bu tip gıdalarda *Salmonella*, *E. coli* ve *Listeria* gibi bakterilerden kaynaklı gıda zehirlenmeleri görülebilmektedir. Pastörize olmamış süt ve bunlardan üretilen Queso fresco, Brie ve Camembert gibi yumuşak peynirler, dondurma ve yoğurt gibi ürünler çiğ süttten *Campylobacter*, *Cryptosporidium*, *E. coli*, *Listeria* ve *Salmonella* gibi insan sağlığına zararlı etkileri bulunan bakterileri taşıyabildiği için hastalıklara sebep olabilir. Yumurtalar ise *Salmonella* içerebildiklerinden dolayı tüketimden önce yumurta sarısı ve beyazının iyice pişirilmesi, yumurtaların buzdolabında muhafaza edilmesi, yumurta içeren ürünlerin çiğ yumurtalar ile

kontamine edilmemesi ve çiğ yumurta içeren hamurların tüketilmemesi mevcut bakterilerden korunmak adına önem taşımaktadır. İstiridyeler ve diğer bazı kabuklular hastalık ve ölümlere sebep olan virüs ve bakterileri içerebilir. İstiridyeler kontamine olmuş sulardan elde ediliyorsa norovirüs içerebilmektedir. Filizlerin gelişmeleri için gereksinim duyulan nemli ve sıcak ortamlar ayrıca bakterilerin gelişmeleri için de ideal ortamlar oluşturmaktadır. Alfaalfa, fasulye veya diğer filizlerin çiğ veya az pişmiş olarak tüketimi *E. coli*, *Listeria* ve *Salmonella* gibi bakterilerin sebep olduğu gıda zehirlenmelerine yol açabilmektedir. Kontamine tahıllardan elde edilen unlar ise hamur yapımında kullanıldığında ve bu hamurlar çiğ olarak tüketildiğinde hastalıklara neden olmaktadır [24].

2.3.2. *Escherichia coli*

E. coli ilk kez 1885 yılında Theodor Escherich tarafından enterit (bağırsak enfeksiyonu) olan bebeklerin dışkılarından alınan örneklerden tanımlanmış ve önceleri *Bacterium coli* olarak isimlendirilmiştir [25]. *E. coli*, *Enterobacteriaceae* familyasına mensup, gliserol veya glikoz içeren herhangi bir basit kültür içerisinde kolayca gelişebilen, spor oluşturmayan, Gram negatif, kısa basillerdir. Hareketsiz türleri olabildiği gibi flagella ile hareket eden türleri de bulunmaktadır. İndol üretimi gerçekleştirebilir, sitratı fermente edemezler. Metil red testinde pozitif sonuç veririrken üreaz ve Voges–Proskauer reaksiyonlarında negatif sonuç vermektedir [26].

Doğal mikroflorası, sıcakkanlı hayvanların gastrointestinal sistemleri olan *E. coli*, insan bağırsaklarında en yaygın olarak bulunan fakültatif anaerobik mikroorganizmalardır [27]. Bunun sebebinin glukonatı diğer türlere göre daha etkili bir şekilde kullanması olduğu düşünülmektedir. İnsan gastrointestinal sisteminde kommensal ilişki kuran *E. coli* türleri bağırsıklığı baskılanmış bireylerde ve peritonit gibi durumların dışında nadiren hastalıklara sebebiyet verirler. Kommensal *E. coli* türlerinde transpozon, plazmit, bakteriyofaj ve patojenite adaları gibi çeşitli mobil genetik elementler ile virülans faktörleri kodlanabilir [28]. *E. coli* patojen suşlarının çoğu, şiddetli diyare, dizanteri ve hemorajik kolit gibi enterik hastalıkların yanı sıra sistiziz, menejit ve septisemi gibi ekstraintestinal hastalıklara da sebebiyet vermektedir [27]. Diyareye sebep olan türleri, Enterohemorajik *E. coli* (EHEC), Enteropatojenik *E. coli* (EPEC),

Enteroagregatif *E. coli* (EAEC), Enteroinvasiv *E. coli* (EIEC), Diffuz Aderent *E. coli* (DAEC) ve Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC) olarak incelenmektedir [26].

Bakteriyofajların *E. coli* inaktivasyonunda kullanımını birçok araştırmacı tarafından çalışılmıştır [29-31]. Schmerer ve ark (2014) fajlar arası sinerjistik etki ile bir mukoid *E. coli* K-12 suşunda tek tip faj kullanımına kıyasla daha fazla etki sağlandığını göstermişlerdir. Bu alışmada T7 ve J8-65 fajlarının birlikte oluşturduğu plak boyutunun, ayrı kullanıma göre daha büyük olduğunu açıklamışlardır. Faj kokteyli, T7 ve J8-65 fajının tek kullanımlarından sırasıyla 10 ila 100 kat daha fazla bakteriyel inaktivasyon sağlamıştır. Buradaki olası mekanizmanın, J8-65 fajlarının kolanidaz aktivitesi sebebiyle hücre yüzeyinde T7 fajlarının bağlanmasını engelleyen mukoid tabakanın degradasyonu sayesinde bağlanmanın iyileştirilmesi olabileceğini söylemişlerdir [32].

2.3.3. *Salmonella*

Salmonella ilk kez 1886 yılında D.E. Salmon ve T. Smith tarafından yapılan çalışmalarda domuzlarda vebaya yol açan bir kolera basili olarak tanımlanmış ve 1900 yılında Lignieres bu bakterilere *Salmonella* cins ismi verilmesini önermiştir. *Salmonella* cinsine ait türler Gram-negatif, fakültatif anaerobik, flagella ile hareket eden, $2-3 \times 0.4-0.6$ μm boyutlarında çubuk şekilli enterobakterlerdir. *Salmonella* türlerinin çoğu 5-47°C sıcaklıklarda gelişim gsterebilseler de 2-4°C'ye kadar düşük sıcaklıklarda ve 54°C kadar yüksek sıcaklıklarda gelişim gösterebilen türler de bulunmaktadır. Optimal gelişme sıcaklıkları 35-37°C aralığındadır.

Salmonella türleri somatik (O), flagella (H) ve kapsül (v_i) antijen yapılarına göre veya farklı fajlara karşı duyarlılıklarına göre sınıflandırılabilir. Son zamanlarda yapılan moleküler analizlere göre ise iki grupta incelenmektedir: *S. enterica* ve *S. bongori*. Biyokimyasal ve genetik niteliklerine göre *S. enterica* altı (I (*enterica*), II (*salamae*), IIIa (*arizonae*), IIIb (*diarizonae*), IV (*houtenae*) ve VI (*indica*)) ve *Salmonella bongori* bir (V) alt tür içermektedir.

Çevrede oldukça yaygın olarak bulunan *Salmonella*'ya insan, hayvan, kuş ve kemirgenlerin gastrointestinal sistemleri kaynaklık etmektedir. *Salmonella* içeren gıdaların tüketimini takiben birkaç saat içerisinde diyare, ateş ve abdominal kramp gibi belirtiler gözlenebilmektedir [33].

Salmonella türlerine etkili fajlarının gıdalarda patojen inaktivasyonunda kullanımına dair birçok çalışma literatürde mevcuttur [34-36]. Sütte *Salmonella* inhibisyonu amacıyla yapılan bazı bakteriyofaj uygulamalarını içeren tablo Çizelge 2.2'de verilmiştir.

Çizelge 2. 2. Sütte faj uygulaması ile *Salmonella* bakteri inhibisyonu.

Bakteri	Faj	Başlangıç Bakteri Yükü (\log_{10} KOB/ml)	MOI	Uygulama Parametresi	Bakteri Eliminasyonu (\log_{10} KOB/ml)	Kaynak
<i>S.</i> <i>typhimurium</i>	P22	6	10	37°C x 24 saat	0	[37]
				4°C x 12 gün	3	
<i>S.</i> <i>typhimurium</i> <i>LT2</i>	TS miksi	4	1000	25°C x 48 saat	4	[38]
	NTS7 miksi			0		
	NTS4 miksi			0		
	TS miksi			3		
	NTS7 miksi			1		
<i>S.</i> <i>typhimurium</i> ST-48	ϕ Stp1, ϕ Sep1, ϕ SP3ve ϕ SP1 faj miksi	4	1000	28°C x 6 saat	1,9	[39]
				4°C x 72 saat	1,8	
<i>S.</i>	LPSE1	5	1	28°C x 6 saat	1,44	[40]

<i>enteritidis-</i> ATCC13076		3,5	100		2,37	
		5,5	1	4°C x 6 saat	0	
		3	100		0	
<i>S. albany</i>	<i>Salmonella</i> phage vB_SalP_TR2	6	0,01	37°C x 6 saat	1,8	[41]

2.4. Süt ve Süt Ürünleri

2.4.1. Genel Özellikleri

Süt, bileşimi sebebiyle mikroorganizmaların üremesi ve fermentasyonu için besin ögeleri içeren besiyerleridir [42] ve bakteriyel kontaminasyonlara uğrayabilen kolay bozulan bir gıdadır. Kontaminasyon kaynakları üretim kapasitesine göre değişiklik gösterebilir. Örneğin birkaç ineğin sağımının el ile yapıldığı işletmelerde görülen kontaminasyonlar ile 3000 ineğin sağımının yapıldığı otomatik ve kompleks sağım ekipmanları hattında meydana gelen kontaminasyonlar farklılık gösterebilmektedir. Süt için üç ana kontaminasyon kaynağı bulunur: meme içinde, meme dış kısmında ve sağım ve depolama ekipmanlarında. Sütteki mikroorganizma tipi ve sayısı, kontaminasyonları gösterir ve sütün birincil mikroflorasını oluştururlar. Birincil mikroflora sütün depolama sıcaklığından ve süresinden etkilenir, 4°C ve altında depolama ile mikroorganizmaların çoğalması 24 saatliğine geciktirilebilir [43].

Pastörizasyon, sütte potansiyel tehlike teşkil eden mikroorganizmaların çoğunu elimine edebilir ancak düzgün yapılmayan pastörizasyon ile hijyen ve sanitasyonun doğru yapılmaması kaynaklı pastörizasyon sonrası bulaşmalar, süt kaynaklı patojenlerin yol açtığı vakalara sebebiyet verebilmektedir. Süt ve süt ürünlerinde virüsler, parazitler, mantarlar ve bakteriler patojenite oluşturabilmektedir (Çizelge 2.3) [42]. Özellikle *Brucella* türleri, *Campylobacter jejuni*, *Bacillus cereus*, Shiga toksin üreten *E. coli* (*E. coli* O157:H7), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Listeria monocytogenes*, *Coxiella burniitti*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Salmonella* türleri ve *Yersinia enterocolitica* gibi patojen bakterilerin çoğu pastörize edilmemiş sütler ve bu sütlerden yapılan ürünlerde bulunabilir. Özellikle sütte, *S. aureus*'un ısıya dirençli

toksin üreten suşlarının ürettiği toksinlerin pişirme ile degradasyonu sağlanamamakta ve bu ürünlerin tüketimi ile intoksikasyonlar meydana gelmektedir [44].

Çizelge 2. 3. Süt ve süt ürünleri kaynaklı patojenler ve neden olduğu hastalıklar (Walstra ve ark, 2005).

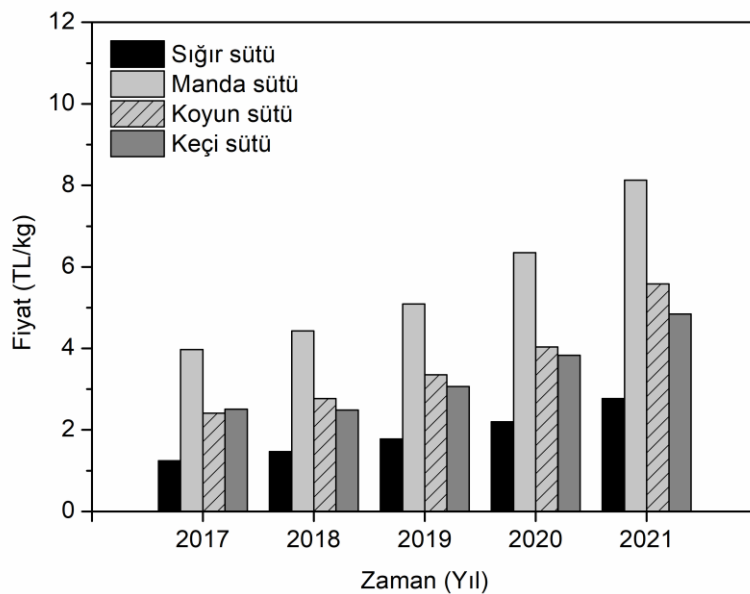
Grup	Patojen	Hastalık
Gram-negatif bakteriler	<i>Escherichia coli</i>	Gastroenterit
	<i>Salmonella</i>	Gastroenterit, tifoid ateş
	<i>Shigella</i>	Gastroenterit
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Gastroenterit
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Gastroenterit
	<i>Brucella abortus</i>	Bruselloz
	<i>Campylobacter jejuni</i>	Gastroenterit
	<i>Leptospira interrogans</i>	Leptospiroz
Gram-pozitif bakteriler	<i>Bacillus cereus</i>	İntoksikasyon
	<i>Bacillus anthracis</i>	Şarbon
	<i>Clostridium perfringens</i>	Gastroenterit
	<i>Clostridium botulinum</i>	Botulizm
	<i>Staphylococcus aureus</i>	İntoksikasyon
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Boğaz ağrısı
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Kızıl hastalığı, boğaz ağrısı
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tüberküloz
	<i>Mycobacterium bovis</i>	Tüberküloz
	<i>Mycobacterium paratuberculosis</i>	Johne hastalığı
	<i>Corynebacterium spp.</i>	Difteri
<i>Listeria monocytogenes</i>	Listerioz	
Riketsiya	<i>Coxiella burnetii</i>	Q- ateşi

Virüsler	Enterovirus, rotavirus	Enterik enfeksiyon
Mantarlar	Küfler	mikotoksikozis
Protozoa	<i>Entamoeba histolytica</i>	Amebiyaz
	<i>Cryptosporidium muris</i>	Cryptosporidiosis
	<i>Toxoplasma gondii</i>	Toksoplazmoz

2.4.2. Türkiye'de ve Dünyada Süt ve Süt Ürünleri Üretimi

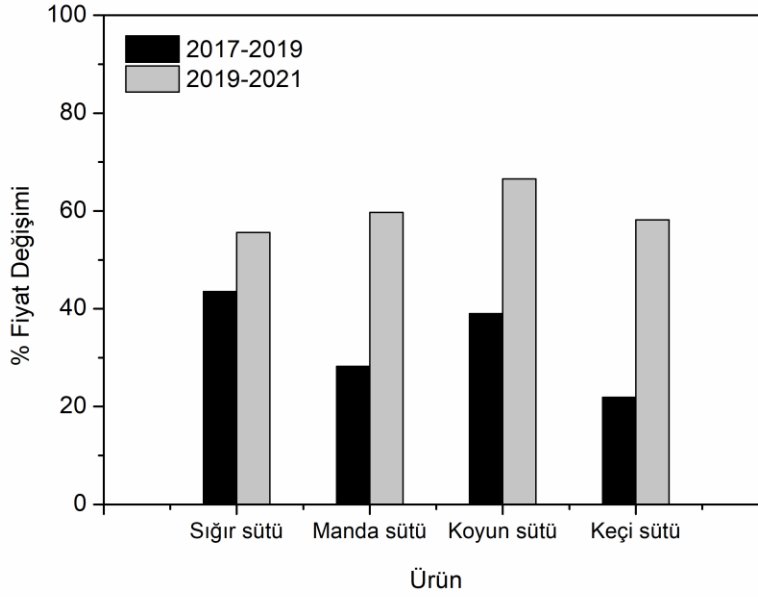
Dünyada süt, % 81'i inek, % 15'i manda ve % 4'ü koyun, keçi, deve gibi hayvanlardan temin edilmektedir [45]. Dünya süt üretimi, 2017-2019 yıllarında yıllık ortalama 876 milyon ton iken 2020 yılında yaklaşık 914 milyon tona ulaşmıştır ve bu sayının 2021 yılında 928 milyon tona ulaşması beklenmektedir [46].

TÜİK verilerine göre Türkiye'de 2020 yılında 8,7 milyon ton (8709 255 ton), 2021 yılında ise 8,6 milyon ton (8595477 ton) süt ve süt ürünleri üretimi gerçekleşmiştir. 2017 yılından 2021 yılına fiyat değişimine bakıldığında sığır sütü 1,24 TL/kg'dan 2,77 TL/kg'a, manda sütü 3,97 TL/kg'dan 8,13 TL/kg'a, koyun sütü 2,41 TL/kg'dan 5,58 TL/kg'a ve keçi sütü 2,51 TL/kg'dan 4,84 TL/kg'a yükselmiştir (Şekil 2.1) .



Şekil 2. 1. Türkiye yıllara göre kilogram süt fiyat değişimi (TÜİK, 2022)

Pandemiden önceki son üç yılın değişim oranı ile pandemi dönemi 3 yılın fiyat değişimi kıyaslandığında, pandemi dönemi süt fiyatlarında artış gözlenmektedir (Çizelge 2.2) [47].



Şekil 2. 2. Türkiye pandemi öncesi ve pandemi döneminde, süt % fiyat değişimi (TÜİK, 2022).

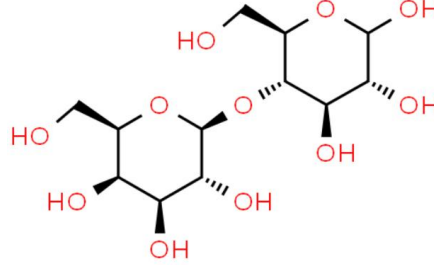
2.4.3. Süt Bileşenleri ve Faj Etkileşimi

Süt genel olarak bakıldığında iki temel gruptan meydana gelmektedir: su ve kurumadde. Sütün yaklaşık % 87,1'ini su ve % 12,9'unu kurumadde oluşturur. Kurumaddede yaklaşık % 4.6 laktoz, % 4 yağ, % 3.3 protein, % 0.7 mineral bileşenleri ve % 0.17 organik asitler bulunmaktadır [42].

2.4.3.1. Karbonhidratlar

Neredeyse tüm memeli sütlerinde bulunan laktoz (0-4-D-galaktopiranozil-(1,4)-glukopiranoz), sütteki en temel karbonhidrattır. Glukoz ve galaktozun her ikisi de memeli metabolizmasında yaygın olarak yer alsa da laktoz yalnızca süt yapan hücrelerin golgi aygıtlarında sentezlenir. Glukoz, galaktoz gibi diğer karbonhidratlar ise süt

içeriğinde oldukça düşük miktarlarda olup [42] glukokonjugat formunda bulunmaktadırlar [18].



Şekil 2. 3. Laktozun genel yapısı [48].

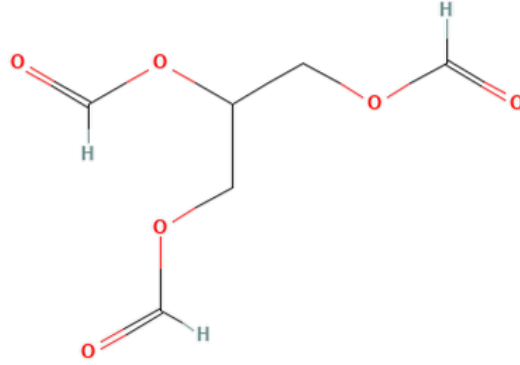
Sütte bulunan oligosakkaritlerin ve bakteri hücre duvarında yer alan karbonhidratların yapısal homoloji göstermeleri [49] fajların konak bakteri yerine karbonhidratlara bağlanmalarına yol açabilir [18]. Bu duruma binaen literatürde Süt yağ globül membran (SYGM) proteinleri ve fajların etkinliği üzerine çalışmalar bulunmaktadır [50]. Özellikle insan sütünde bulunan bazı glikoproteinler *E. coli* [51] ve rotovirüse [52] karşı koruyucu etki göstermektedir. Benzer şekilde, SYGM protein yapısında bulunan müsintipi glikoprotein (MUC-I), bakteri ve fajlar için reseptör görevi görür. Aynı zamanda bakteri peptidoglikan yapısında bulunan karbonhidratların faj reseptörleri olarak görev yapması, fajların MUC-I'e bağlanmalarına yol açar. Bu durumda bakteri ile karşılaşan faj sayısı azalmaktadır [18, 53].

2.4.3.2. Lipidler

Süt yağı, yaklaşık % 98,3 trigliserit karışımlarından meydana gelir ve süt yağının neredeyse tümü globüler halde bulunurlar. Süt yağı, $37 \text{ kJ}\cdot\text{g}^{-1}$ enerji sağlar ve sütün ozmotik basıncını artırmaz.

Patojenlerin faj ile eliminasyonunda süt yağının etkisi literatürde yer alan bazı çalışmalar ile ortaya konmuştur [54, 55]. García ve ark (2009) farklı oranlarda yağ ihtiva eden çiğ ve pastörize sütlerde *S. aureus* Sa9'a etkili fajların 37°C 'deki etkinliğini araştırmışlardır. Pastörize sütte faj uygulama grubunda kontrol grubuna göre $3,6 \log_{10}$ KOB/ml, tam ve yarım yağlı çiğ sütte ise sırasıyla 1 ve $2 \log_{10}$ KOB/mL azalma

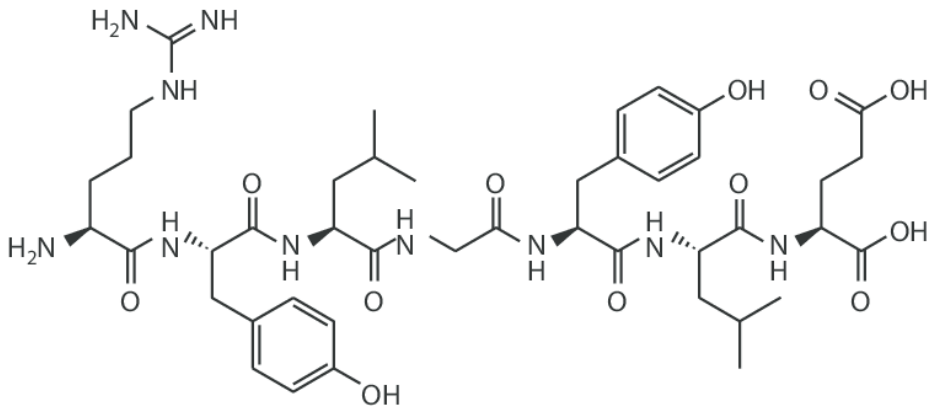
sağlanabilmiştir [54]. Bu çalışmada faj uygulaması pastörize edilmiş sütün çiğ süte göre daha etkili olduğu görülmekle beraber yağ oranının artmasının bakteri inhibisyon etkinliğini düşürdüğü ortaya koyulmuştur.



Şekil 2. 4. Triglicerit moleküler yapısı [56].

2.4.3.3. Proteinler

Süt proteinleri temel olarak serum proteinleri (% 19), kazeinler (% 78,3), laktoferrin, transferrin, membran proteinleri ve enzimlerden oluşmaktadır. Serum proteinleri β -laktoglobulin, α -laktalbumin, serum albumin, proteaz pepton, immüoglobulinlerden meydana gelmektedir. Kazeini ise α_{S1} -kazein, α_{S2} -kazein, β -kazein, κ -kazein ve γ -kazein yapıları oluşturmaktadır [42]. Moleküler ağırlıkları 11500 -25000 Dalton aralığında değişim göstermektedir.[57]



Şekil 2. 5. Kazein moleküler yapısı [57].

García-Anaya ve ark (2019) fajların protein ile etkileşimlerini peynir altı suyu (whey) ve kazein proteinleri bazında homojenize edilmiş ve edilmemiş sütler ile araştırmışlardır. Fajların peynir altı suyu proteinlerine yatkınlığı her iki grup süt için % 0.06 ila 0.48 olarak belirlenirken kazein proteinlerine yatkınlığı daha yüksek düzeylerde (% 8-20) seyretmiştir [55].

2.4.4. Bakteriyofaj Uygulamaları

Literatüre bakıldığında süt ve süt ürünlerinde *E. coli* bakterisinin faj uygulaması ile elimine edilmesinin araştırıldığı birçok yayın bulunmaktadır. Bu çalışmalardan biri Porter ve ark. tarafından yapılmış olup bakteriyofaj terapi koliform kaynaklı mastitisi elimine etmek için kullanılmıştır. Bu çalışmada, mastitisli ineklerden izole edilen *E. coli* bakterilerini % 54 ve % 58 oranlarında inhibe ettiği görülen bu faj miksi, MOI 10 değerinde bile 10 µg/ml ceftiofur ile aynı etkiyi göstermiştir. Çiğ sütte 3,3 ila 5,6 log₁₀ KOB/ml'ye kadar bakteri sayısında azalma gözlenmiştir [58].

Lee ve ark.'nın sütte ve biyofilm yapısında *E. coli* O157:H7 bakterisini inhibe etmeyi amaçladıkları bir çalışmada, ticari sütte 5 saatlik 37°C'de inkübasyonun sonunda 5 log₁₀ KOB/ml azalma sağlamışlardır. Aynı çalışmada farklı materyallerde biyofilm yapısındaki eliminasyon da farklı olarak seyretmiştir [59].

E. coli O157:H7 ile kontamine edilmiş tam yağlı süt ve biftek için faj etkinliğinin araştırıldığı Li ve ark.(2021)'in yaptığı bir çalışmada bazik koşullara dirençli bir faj kullanılmıştır. JN01 fajı atık sulardan izole edilip karakterizasyonu yapılmış, 20 *E. coli* suşundan 16'sına karşı litik aktivite göstermiştir. Latent periyodu 15 dakika ve lizis periyodu 85 dakika olarak belirlenmiştir. Patlama büyüklüğü 134 POB/enfekte hücre olarak hesaplanmıştır. Bu çalışmada fajın etkinliği öncelikle farklı MOI değerlerinde ve oda sıcaklığında CASO broth içerisinde incelenmiştir. 3 ve 6 log₁₀ KOB/ml *E. coli* O157:H7 ve E6-11-18 bakterileri ayrı ayrı inoküle edilmiş besiyerlerinde 9 log₁₀ POB/ml faj kullanılmıştır. 48 saat boyunca, 3 log₁₀ KOB/ml bakteri inokülasyonunun olduğu grupta *E. coli* O157:H7 bakterisi için faj ilave edilmiş besiyerlerinde bakteri gözlenmezken E6-11-18 bakterisi için 24 saat boyunca bakteri gözlenmemiş ve 48. saatte bakteri sayısında 2 log₁₀ KOB/ml artış olduğu gözlenmiştir. İlk bakteri

inokülasyonunun $6 \log_{10}$ KOB/ml olduğu grupta, başlangıçta *E. coli* O157:H7 için çok az eliminasyon sağlanmış, 48 saat boyunca bakteri sayısı kontrol grubu bakteri sayısından daha fazla olmuştur. E6-11-18 için ise başlangıçta eliminasyon sağlanmamış, 48 saat süresince bakteri sayısı, kontrol grubu ile kıyaslandığında çok az düşüş göstermiştir. Aynı çalışmada UHT sütte 4°C 'deki farklı bakteri yüklerindeki faj etkinliği araştırılmıştır. İlk inokülasyonu $2 \log_{10}$ KOB/ml olan sütte faj olan grupta bir günde bakteri eliminasyonu sağlanmıştır ancak ilk bakteri yükü $4 \log_{10}$ KOB/ml olan sütte 3 gün boyunca bakteri yükü yaklaşık $4 \log_{10}$ KOB/ml olarak süregelmiştir. Burada kullanılan fajlar $9 \log_{10}$ POB/ml titreye sahiptir. Çiğ ette ise bakteri ile enfekte edilmiş örneklerde 7 günün sonunda kontrol grubu $4,5 \log_{10}$ KOB/ml iken faj ilavesi yapılmış olan etlerde bakteri yükü $2 \log_{10}$ KOB/ml olarak belirlenmiştir [60].

Tabla ve ark.(2021) ise bir faj miksi kullanarak peynirde erken şişme sorununa yol açan saprofitik *E. coli* bakterisinin inhibisyonunu sağlamayı amaçlamıştır. Peynirde koliform üremesine bağlı olarak karbondioksit veya hidrojen gibi gazların yüksek oranda üretilmelerinden dolayı erken şişme sorunu görülebilmektedir. Gaz oluşumuna bağlı olarak peynir dokusunda gözenekler ve çatlaklar meydana gelebilmektedir. Bu çalışmada üç ayrı vatta peynir üretimi gerçekleştirilmiş ve 60 gün boyunca bakteri ve faj miktarındaki değişimler izlemiştir. Bir vat kontrol grubu olarak ayrılırken iki vata sırasıyla MOI 20 ve 60 olacak şekilde faj uygulanmıştır. Pıhtıda *E. coli* sayısı 20 ve 60 MOI'lerde sırasıyla 0,4 ve 0,7 \log_{10} KOB/ml azalma göstermiştir. 30 günlük periyotta kontrol ve deney grupları arasında bakteri sayısında önemli bir fark gözlenmemiştir. Ancak ilk 24 saatlik periyotta peynir dilimlerinde yapılan görüntü işleme sonucunda, gözenek ve çatlak oluşumunda kontrol grubu, 20 ve 60 MOI değerlerinde gözle görülür farklılıklar meydana gelmiştir. En az çatlak ve gözenek oluşumu(yapısal değişim) MOI 60 değerinde gözlenirken MOI 20 değerinde de kontrol grubuna göre gözenek ve çatlak oluşumunda azalmalar gözlenmiştir [61].

Shahrbabak ve ark.(2013) *E. coli* O157:H7'ye etkili bir fajın besiyeri ve steril süt ortamlarındaki aktivitesini, 37°C 'de karıştırmasız veya 150 rpm/dk karıştırarak yapılan inkübasyon ile belirlemişlerdir. PhaxI olarak isimlendirdikleri bu faj 1000 MOI değerinde, Luria–Bertani (LB) besiyeri için 60 dakika, süt için 90 dakika inkübasyonda ilk inokülasyon miktarı $3 \log_{10}$ KOB/ml olan bakterinin inhibisyonunu sağlamış ve

bakteri gözlenmemiştir. Ayrıca çalışmada karıştırmalı veya karıştırmasız inkübasyonda eliminasyon yönünden bir fark olmadığı rapor edilmiştir [62].

Kesim öncesi süte olası *E. coli* kontaminasyonlarının önüne geçmek amacı taşıyan bir çalışmada ineklere faj uygulaması yapılması araştırılmıştır [63]. Montso ve ark (2021) faj uygulamasının ineklerde kesim öncesi açlık ve Subakut Ruminal Asidoz gibi durumlarda gözlenen atipik *E. coli* üremesine etkisini simüle etmişlerdir. Çalışmada *E. coli* O177 bakterisine etkili fajlar, tek olarak ve kokteyl hazırlanarak rumen fermentasyon ortamında etkinliği araştırılmıştır. Burada uygulamaya alınan fajların fermentasyon parametrelerinde (pH 6,3, 39°C ve CO₂) stabil olmasına dikkat edilmiştir. MOI 10 olacak şekilde yapılan tek faj uygulaması, konak bakteriyi 48 saatlik bir periyotta % 61,02–62,74 oranlarında azaltırken faj kokteyli ise % 62,35–66,92 oranlarında azalma göstermiştir [64].

McLean ve ark (2013) UHT ve çiğ sütte *E. coli* ATCC 25922, enteropatojenik *E. coli* O127:H6 ve enterohemorajik *E. coli* O5:H- bakterilere karşı faj uygulamasının etkinliğini farklı depolama koşullarında araştırmışlardır. EC6, EC9 ve EC11 fajlarından bir kokteyl hazırlandıktan sonra bakteri sayısındaki değişimler, 25°C'de 24 saat ve 5–9°C'de 168 saat boyunca takip edilmiştir. Çalışmada tüm bakteriler yaklaşık 5 log₁₀ KOB/ml olacak şekilde inoküle edilmiştir. 25°C depolama koşullarında, UHT sütte *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* O127:H6 ve *E. coli* O5:H- bakterileri 3 saat sonra tespit edilmezken çiğ sütte de 3 saat sonra *E. coli* ATCC 25922 ve 6 saat sonra *E. coli* O127:H6 eliminasyonu sağlanmıştır. *E. coli* O5:H- inoküle edilmiş çiğ sütte 3. saatte bakteri tespit edilememiş olsa da 25°C'de 9. saat ve 4°C'de 144. saatten sonra bakteri sayısında tekrar artış gözlenmiştir. Bütün bakteriler, 4°C'de depolamada UHT sütte 24 saat içinde elimine edilmiş ve bakteri sayıları 168 saat boyunca tespit edilebilir değerlerin altında kalmayı sürdürmüştür [30].

E. coli O157:H7 ile kontamine edilmiş filtre edilmiş ve edilmemiş çiğ sütlerde faj uygulaması etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada iki farklı depolama koşullarında bakteri azalması izlenmiştir. Grygorcewicz ve ark (2019) MOI 5 değerinde faj eklemesi yapılan filtre edilmiş sütte, 4°C depolama koşulu için 24 saatte 1,5-2 log₁₀ KOB/ml azalma sağlamış ve 240 saat boyunca bakteri miktarı sabit kalmıştır. 25°C'de ise bu

azalma 3,5-4 log₁₀ KOB/ml değerlerini bulmuştur. Çiğ süte MOI 50 değerinde faj eklendiği zaman bakteri sayısı, 25°C’de yaklaşık 4 log₁₀ KOB/ml azalırken 4°C’deki depolamada 6. saat itibariyle tespit edilebilir değerlerin altına dş göstermiştirtir [65].

García ve ark. (2009) UHT sütte soğuk zincirin kırılması durumunu 22°C’de simüle etmiştirtir. İki fajdan meydana gelen bir karışımanın kullanıldığı tam yağlı UHT sütte *Staphylococcus aureus* Sa9 bakterisinin MOI 0,1, 1 ve 100 değerlerinde eliminasyonunu değerlendirmiştirtir. İlk 18 saat 4°C’de bekletilen sütlerde kontrol ve deney grupları için başlangıç bakteri sayısı ve faj sayıları sabit kalmıştır. Deney, sonraki 30 saat 22°C’de srdrlmştirtir. Bakteri sayısı 18 saati takip eden 8.saatte dört grup için de aynı oranda artış gösterirken MOI 100 değerinde bu zaman noktasından sonra bakteri artış hızı oldukça yavaşlamış ve 30.saatte 4 log₁₀ KOB/ml değerinde sabit kalmıştır. MOI 0,1 ve 1 değerlerinde 18 saatten sonraki 24.saate kadar bakteri sayısı artışı sürdürse de 30. saatte 4 log₁₀ KOB/ml değerlerine dşmştirtir. Bu sırada kontrol grubu artmaya devam ederek 8,5 log₁₀ KOB/ml değerine ulaşmıştır. Her  MOI değerinde de toplam 4,5 log₁₀ KOB/ml bakteri sayısında azalma sağlanmıştır. Faj sayısı soğuk zincirin kırılmasını takiben 12 saat boyunca ufak değişimler ile birlikte sabit olarak kalsa da bu zaman noktasından sonra artış gstermiştirtir. Faj titresi MOI 0,1 ve 1 için 9 log₁₀ POB/ml, MOI 100 için ise 8 log₁₀ POB/ml olarak belirlenmiştirtir [54].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Materyal

3.1.1. Bakteriler ve Fajlar

Tez kapsamında Hacettepe Üniversitesi BOYACI araştırma grubunun koleksiyonunda bulunan bakteri kültürleri ve *Salmonella* türlerine etkili karakterizasyonu yapılmış *S. Enteritidis* F5–4, *S. Typhimurium* L2–1 ve *S. Typhimurium* ICB1–1 fajlarından [36, 66-69] yararlanılmıştır. *E. coli* K-12 bakterisine etkili fajlar, çiğ süt örneklerinden (Atatürk Orman Çiftliği Süt Fabrikası, Ankara) izole edilmiştir.

3.1.2. Besiyerleri ve Kimyasallar

Bu tez çalışmasında, fajların saflaştırılması, fajların zenginleştirilmesi, bakteri çoğaltılması, etkin MOI belirlenmesi ve faj/bakteri stoklarının oluşturulmasında CASO broth (Merck Millipore Corporation, Darmstadt, Almanya); fajların saflaştırılması, faj titrelerinin ve konak aralığının belirlenmesinde CASO yumuşak agar (% 0,6 agar) ve CASO agar (% 1,5 agar) kullanılmıştır. Agarlı besiyerlerinin hazırlanmasında kullanılan agar ise Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, ABD)'den alınmıştır. Faj ve bakteri stoklarının saklanması için kullanılan gliserol Merck Millipore Corporation (Darmstadt, Almanya)'dan temin edilmiştir.

Fajların konsantre edilmesinde kullanılan PEG Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, ABD)'den; faj konsantrasyonu ve steril fizyolojik tuzlu su (FTS) hazırlanmasında kullanılan sodyum klorit, Merck Millipore Corporation (Darmstadt, Almanya)'dan alınmıştır. faj tamponu-SM tamponunun hazırlanmasında kullanılan jelatin Merck Millipore Corporation (Darmstadt, Almanya), magnezyum sülfat heptahidrat AppliChem GmbH (Darmstadt, Almanya), TRIS-hidroklorit Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, ABD)'den sağlanmıştır. Fajların pH stabilitelerinin belirlenmesinde kullanılan pepton water (PW) Merck Millipore Corporation (Darmstadt, Almanya)'dan alınmıştır.

Sütte faj etkinlik denemelerinde kullanılan süt, yağsız süt tozu (Atatürk Orman Çiftliği Süt Fabrikası, Ankara) kullanılarak hazırlanmıştır. *E. coli* K-12 bakteri sayımında kullanılan EMB agar ve *Salmonella* bakteri sayımında kullanılan XLD agar Merck Millipore Corporation (Darmstadt, Almanya)'dan temin edilmiştir.

3.2. Metod

3.2.1. *E. coli* K-12 Faj İzolasyonu, Saflaştırılması ve Konsantre Edilmesi

3.2.1.1. Faj İzolasyonu

Çiğ süttten faj izolasyonu, Acar Soykut, E. (2007) tarafından uygulanan yöntemle göre gerçekleştirilmiştir. 100 ml örnek, 6 ml % 10'luk laktik asit eklenerek bir süre bekletilmiş ve filtre kağıdından süzölmüştür. Süzöntü 5000 rpm/dk santrifüj edildikten sonra süpernatant alınmış ve %10 kloroform eklenmiştir. Logaritmik evrede bulunan 100 µl konak bakteri ile elde edilen süpernetanttan 1 ml alınarak steril tüplerde karıştırılmıştır. Karışım, fajın bakteriye adsorpsiyonu için oda sıcaklığında 15 dakika bekletilmiş ve daha sonra 37°C'de 18-24 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben örnekler 10 dakika, 5000 rpm/dk santrifüj edilmiştir ve süpernetantlar alınarak çift tabaka agar ekim yöntemi ile fajların izolasyonları gerçekleştirilmiştir [70]. Bunun için steril CASO agar yaklaşık 10 ml olacak şekilde Petrilere (LP Italiana SPA, Milano, İtalya) homojen olarak dağıtılmış ve agar katılaştıktan sonra ters çevrilerek bir gece boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ayrıca 5 ml steril CASO broth besiyerine 100 µl *E. coli* K-12 stok bakterisinden ekim yapılmış, 18-24 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. 3 ml eritilmiş steril CASO agara 150 µl *E. coli* K-12 steril koşullar altında inoküle edilmiş ve hızlıca vortekslenmiştir. Kültürlü besiyeri, ince tabaka agar dökölmüş steril Petri üzerine yayılmış, kuruyuncaya kadar bekletilmiştir. Kuruduktan sonra 50 µl faj içerdiği düşünölen örnekler damlatılmış, dikkatlice Petri kabı düz olacak şekilde 37°C'de 18-24 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır (Sanyo™ MIR-154 inkübatör). İnkübasyon sonrası plak oluşumu incelenmiştir.

3.2.1.2. Tek Plak İzolasyonu

Fajların saflaştırılmasından ve konsantre edilmesinden önce tek plak halinde düşürölerek tek tip faj lizinin görölmesi gerekmektedir. Öncelikle örnekler fajların liziz şiddetine göre seyreltilerek 100 µl örnek ve 150 µl bakteri, 3 ml eritilmiş yumuşak

agar içerisine alınıp hızlıca vortekslenmiştir. Ardından ince tabaka agar dökülmüş steril Petriye yayılarak kurumaya bırakılmış ve inkübasyona alınmıştır. İnkübasyon sonrası Petrilere tek plak düşen bölgeler işaretlenmiştir. Steril enjektör iğnesi yardımıyla alev çatısı altında tek plak düşen bölgeler kesilerek steril Eppendorf tüplere alınmış, ardından 500 µl FTS (100 ml için 0,85 gr NaCl) ilave edilerek vortekslenmiştir. Süspansiyon bir gün boyunca fajların FTS içerisine geçmesi için oda sıcaklığında bekletilmiştir. Tek plak düşürme işlemi üç kez tekrarlanarak faj saflığının sağlanması amaçlanmıştır.

3.2.1.3. Fajların Zenginleştirilmesi

Tek plak izolasyonu sonrası fajların titresini artırmak için 10 µl faj ve 20 µl aktif bakteri kültürü ($OD_{600} = 0,5-0,7$) steril Eppendorf tüplere alınarak adsorpsiyon için 15 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Takiben 970 µl FTS tüplere eklenmiş, 37°C'deki inkübatöre alınmıştır. İnkübasyon sonrası tüpler 12500 g'de 6 dk boyunca santrifüj edilmiş, süpernetantlar dikkatlice steril tüplere alınmıştır. İşlem iki defa tekrar edilmiştir.

Mevcut titreyi öğrenmek için 900 µl FTS steril koşullar altında Eppendorf tüplere alınmıştır. Zenginleştirilmiş örnekler için 10^{-5} 'e kadar dilüsyonlar hazırlanmış titrelerine bakılmıştır. Bu amaçla eritilmiş 3 ml yumuşak agara 100 µl faj, 150 µl log fazdaki bakteri kültürü inoküle edilmiş; hızlıca vortekslenip ince tabaka dökülmüş Petri üzerine yayılmıştır. Hazırlanan petrilere 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Faj titresini yükseltildikten sonra uygun MOI değerlerini hesaplamak amacıyla deneyler yapılmıştır. Bunun için 0,001, 0,01, 0,1, 1,0 ve 10 MOI değerlerinde Eppendorf tüplerde zenginleştirme yapılmıştır. Bundan sonra yapılan tüm zenginleştirme işlemleri titre artışının en yüksek olduğu MOI değeri baz alınarak yapılmıştır.

Fajları konsantre etmek amacıyla 50 mL'lik steril Falcon tüplere (LABSOLUTE[®], Th. Geyer GmbH & Co. KG. Renningen, Almanya) uygun MOI değerinde faj ve bakteri eklenerek 15 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Ardından Falcon tüpler, steril CASO broth ile yaklaşık 30 mL'ye tamamlanmıştır. Ardından karıştırılmalı inkübasyona (Lab Companion, SK-300 shaker, Seul, Güney Kore) alınmıştır. İnkübasyon sonrası 12

500 g'de 6 dk boyunca 4°C'de santrifüj (Sigma 3-18K, Almanya) edilip süpernatantın 0,22-µm por çaplı steril filtreler ile steril Falcon tüpler içerisine filtrasyonu sağlanmıştır. Akabinde plak sayımı yapılmış olup en az 10⁸ PFU/ml titreye ulaşınca kadar zenginleştirmelere devam edilmiştir. Her bir örnek için toplam 60 ml hacminde faj çözeltisi elde edilmiştir.

3.2.1.4. Fajların Saflaştırılması ve Konsantrasyonu

En az 10⁸ PFU/ml titreye sahip faj çözeltilerine son konsantrasyonu 1 M olacak miktarlarda NaCl eklenip hemen vortekslenmiş, 1 saat boyunca 4°C'de ve buzlu suda bekletilmiştir. Bekleme işlemi sonunda örnekler 18 000 g'de 15 dk boyunca 4°C'de santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar steril Falconlara alınmış ve % 10 PEG (Polietilen glikol, MW 8000) tüplere eklenip Shaker'da 100 rpm'de PEG homojen olarak karışınca kadar tutulmuştur. Bir gece boyunca 4°C'de ve buzlu suda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası örnekler santrifüj edildikten sonra süpernatant dikkatlice dökülüp elde edilen pelletler 700 µl SM tamponu (1 litre için 5.8 gr NaCl, 2 gr MgSO₄, 50 ml 1 M steril Tris-HCl çözeltisi(15,7 gr Tris-HCl, 100 ml saf su), 5 ml % 2 (w/v)'lik steril jelatin çözeltisi (2 gr Jelatin ve 100 ml saf su); pH 7,5) ile yıkayıp Eppendorf tüplere alınmıştır. Ardından aynı miktar kloroform eklenip vortekslenmiştir. Örnekler 9 000 g x 15 dakika ve 4°C'de santrifüj edilerek üst faz ara fazdaki PEG tabakasını dağıtmadan alınmış ve steril bir Eppendorf tüpe aktarılmıştır. Konsantre fajların titresi çift tabaka agar yöntemi ile belirlenmiş ve bir sonraki kullanıma kadar 4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.1.5. Fajların ve Bakterilerin Muhafaza Edilmesi

Faj örnekleri ve bakteriler steril % 30-40 gliserol içerecek şekilde steril tüplere alınıp -18°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.2. Fajların Karakterizasyonu

3.2.2.1. Konakçı Skalasının Belirlenmesi

Spot test, bakteri ekilmiş agar üzerine düşük hacimlerde seyreltilmiş fajların damlatılması yöntemidir. Konakçı skalasını belirlemek amacıyla kullanılabilir.

[71]. Bu çalışmada *Micrococcus luteus*, *S. enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* IC, *S. Typhimurium* ATCC BAA-190, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *S. enterica* subsp. *enterica* serovar *Enteritidis* ATCC BAA-1045, *B. subtilis*, *Erwinia amylovora* (Dal 41), *Erwinia amylovora* (Dal 44) ve *Erwinia amylovora* (Dal 33) bakterileri üzerine faj örnekleri damlatılmıştır. Faj örneklerine ait konakçı skalasının belirlenmesi amacıyla da bu yöntem kullanılmıştır. Bunun için eritilmiş 3 ml yumuşak agar içerisine 150 µL konak bakteri inoküle edilerek ince tabaka agar üzerine yayılmıştır. Agar katılaşması için 15-20 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından 7 µL faj örneği sırasıyla bütün konaklara damlatılmıştır. Bütün fajlar için aynı işlem tekrarlanmıştır. Petriler 37°C'de 18-24 saat boyunca inkübe edilmiş ve plak oluşum durumları incelenmiştir.

3.2.2.2. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)

3.2.2.2.1. Faj Nükleik Asit İzolasyonu

Faj nükleik asit izolasyonu ve restriksiyon enzimleri kesim profillerinin çıkarılması deneyleri Acar Soykut, E. (2007) tarafından verilen yöntemle göre gerçekleştirilmiştir [70]. Yaklaşık 10^{10} - 10^{11} PFU/ml titreye konsantre edilen faj örneklerinin nükleik asitlerini izole etmek amacıyla DNA izolasyon kiti (Thermo Scientific™ GeneJET Viral DNA/RNA Purification Kit, Waltham, Massachusetts, ABD) kullanma direktiflerinden yararlanılmıştır. 200 µL faj konsantresi içerisine 0,4 µL DNAaz, 0,4 µL buffer ve 0,2 µL RNAaz eklenmiş ve 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Bu sırada spin kolonların merkezine 50 µL kolon hazırlama sıvısı eklenmiş ve kullanıma kadar oda sıcaklığında tutulmuştur. İnkübasyon sonrası faj örnekleri içerisine 25 µL/ml taşıyıcı RNA içeren 200 µL liziz çözeltisi ve 50 µL Proteinaz K eklenip vortekslenmiştir. Ardından 15 dakika boyunca 56°C'de inkübe edilmiştir. 5 saniye son hızda (14 000 rpm/dk) santrifüj edilen örnekler, önceden hazırlanmış spin kolonlara alınıp 6000 g x 1 dk santrifüj edilerek yıkama tüpü atılmış ve yeni tüp yerleştirilmiştir. 700 µL Yıkama Tamponu 1 eklenip 6000 g x 1 dk santrifüj edilerek yıkama tüpü atılmış ve yeni tüp yerleştirilmiştir. Ardından işlem 500 µL Yıkama Tamponu 2 ile tekrar edilmiştir. Sonra 16 000 g x 3 dk santrifüj edilip yıkama tüpü atılmıştır. Spin kolonlar 1,5 mL'lik steril Eppendorflar içerisine alınmış 56°C'de bekletilen 60 µL eluent kolonun merkezine eklenip 3 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Ardından örnekler 13000 g x 2 dk

santrifüj edilmiş ve kolonlar atılmıştır. Tüpler parafilmlelenerek analize kadar -18°C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.2.2.2. Restriksiyon enzimleri ile Kesim Profillerinin Çıkarılması

İzole edilen faj DNA’ları % 0,8-1’lik agaroz jelde ve 60 V da yürütülmüştür (elektroforez jel tankı, Thermo Electron Corporation Minicell Primo EC320; güç kaynağı, Thermo Electron Corporation Ec 570-90). On adet faj DNA’sı *HindIII*, *EcoRI*, *EcoRV*, *XbaI*, *KpnI* ve *XhoI* enzimleri (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, ABD) ile kesime alınmıştır. Fragment büyüklüklerinin kıyaslanması amacıyla Lambda DNA/ *EcoRI*+*HindIII* marker (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, ABD) kullanılmıştır. Reaksiyon karışımı deiyonize su, ilgili enzimin tamponu (2x), DNA ve enzimden oluşmakta olup DNA miktarlarına göre değişen miktarlarda deiyonize su ilavesi yapılmaktadır (Çizelge 2.3). Sonuç olarak, karışım 20 µl hacminde olacak şekilde ayarlanmış, 37°C’de 2 saat inkübe edilmiştir.

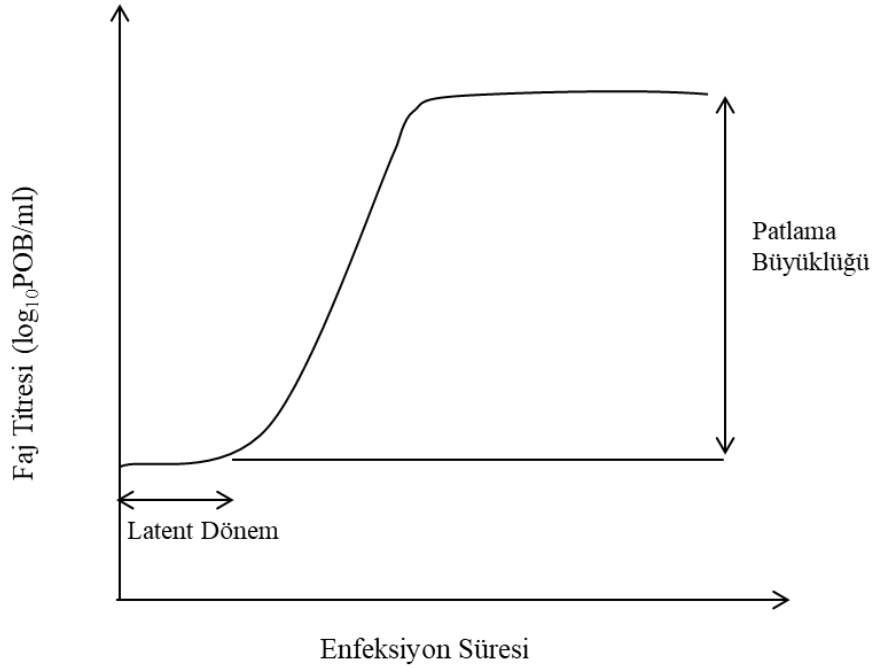
Çizelge 3. 1. Elektroforezde kullanılan reaksiyon karışım miktarları.

Reksiyon karışımı	Miktar (20 µl)
Deiyonize su	Değişken (11-16 µl)
Tampon	2 µl
DNA	Değişken (1-6 µl)
Enzim	1 µl

3.2.2.3. Tek Aşamalı Gelişme Eğrisi

Fajların tek aşamalı gelişme eğrisinin çıkarılması için, Islam ve ark (2020)’nin çalışmasından yararlanılmıştır [72]. Öncelikle, logaritmik evrenin ortalarındaki 0,6 ml aktif bakteri kültürü ile 0,6 ml faj örneği, MOI değeri 0,001 olacak şekilde 2 mL’lik steril bir Eppendorf tüp içerisine alınmıştır. Karışım, adsorpsiyon amacıyla oda sıcaklığında 15 dakika boyunca inkübe edildikten sonra, serbest haldeki bakteri/fajın ortamdan uzaklaştırılması amacıyla 7000xg’de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant dikkatlice atılmış ve pellet iki kez CASO broth ile yıkanmıştır. Ardından hacim, yine

steril CASO broth kullanılarak 30 mL'ye tamamlanmıştır. 3 paralelli olacak şekilde 200'er µL t=0 anı için örnek alınmıştır. Örnekler 13000xg'de 30 saniye santrifüj edilip uygun dilüsyonlara inilerek çift tabaka agar yöntemi ile titre bakılmıştır. Bu esnada Falcon, 37°C'de karıştırmalı inkübasyona alınmıştır. Sırasıyla 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 ve 75 dakikalar için t=0 anında yapılan deneyler tekrarlanmıştır. Latent dönem, adsorpsiyonun başladığı zaman ile ilk patlamanın görüldüğü zaman arasındaki süre olarak tanımlanmıştır [73]. Guttman ve ark'ın faj enfeksiyonunun tek aşamalı gelişme analizine ait genel grafik Şekil 3.1'de, latent dönem ve patlama büyüklüğü hesaplamaları için gerekli olan denklemler ise Eşitlik 3.1 ve 3.2'de verilmiştir [15].



Şekil 3. 1. Tek aşamalı gelişme eğrisi [15].

$$\text{Latent Dönem} = t_{\text{ilk patlama}} - t_{\text{adsorpsiyon başlangıcı}} \quad \text{Eşitlik 3.1}$$

Patlama büyüklüğü ise aşağıdaki Eşitlik 3.2 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Patlama Büyüklüğü} = \frac{\text{Patlama Döngüsü Sonundaki Faj Titresi (POB)}}{\text{İlk Faj Titresi (POB)}} \quad \text{Eşitlik 3.2}$$

3.2.2.4. Adsorpsiyon Hızı

Fajların konak hücrelerine adsorpsiyon hızı sabitlerinin belirlenmesi amacıyla Kropinski ve ark. tarafından kullanılan yöntemden faydalanılmıştır [74]. Adsorpsiyon hız sabiti belirlenecek olan faj çözeltileri ve logaritmik evredeki konak bakteri kültürü, MOI değeri 0,01 olacak şekilde karıştırılmış ve 37°C'de 10 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Kontrol grupları ise yalnızca faj çözeltileri içerecek şekilde hazırlanmıştır. İnkübasyon sonrası 10 dakika boyunca her bir dakikada bir 50 µL örnek alınmış, önceden birkaç damla kloroform eklenmiş ve buzda bekleyen 950 µL CASO broth ile seyreltilmiştir. Ardından her bir zaman aralığı için çift tabaka agar yöntemi ile titreler belirlenmiştir. Elde edilen titre değerleri yardımıyla ve Eşitlik 3.3 kullanılarak fajlara ait adsorpsiyon hız sabiti değerleri hesaplanmıştır. Burada k, adsorpsiyon hız sabiti; B, bakteri konsantrasyonu; P₀, başlangıç faj titresi; P, son faj titresi; t, faj titresi P₀'dan P'ye düşünceye kadar geçen zaman olarak ifade edilmektedir.

$$k = \left(\frac{2,3}{B.t} \right) \cdot \log \left(\frac{P_0}{P} \right) \quad \text{Eşitlik 3.3}$$

3.2.2.5. Transmisyon Elektron Mikroskobu İle Morfolojinin Belirlenmesi

Fajların morfolojik yapısının belirlenmesi amacıyla transmisyon elektron mikroskobu (TEM) kullanılmıştır. Analiz, Evran ve ark (2022) ve Tayyarcan ve ark (2022) tarafından verilen yöntemle göre gerçekleştirilmiştir [36, 66]. Öncelikle analize alınacak örnekler yukarıda belirtildiği gibi konsantre edilmiştir. Ardından 18000xg'de 1,5 saat ve 4°C'de santrifüj edilmiştir. Ardından 0,1 M amonyum asetat ile yıkayıp karbon kaplı bakır gridler üzerine eklenmiştir. % 2 uranyl asetat ile boyayıp TEM (FEI Tecnai G2 F20 S-Twin; 80 kV) (FEI Company, Hillsboro, OR, ABD) ile incelenmiştir.

3.2.2.6. pH ve Sıcaklık Stabilitesi

Fajların pH stabilite testleri için Nascimento ve ark. (2022) ve sıcaklık stabilite testleri için Li ve ark. (2021) tarafından yapılan çalışmalardan yararlanılmıştır [60, 75]. Fajların sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi amacıyla saflaştırılmış faj örnekleri SM tamponunda farklı sıcaklık değerlerinde 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. 30°C'den 80°C'ye kadar

10°C aralıklar ile inkübe edilen faj örnekleri farklı oranlarda seyreltilerek çift tabaka agar yöntemi ile titreleri belirlenmiştir.

Fajların pH stabilitesi için 10 ml PW, pH 2-11 değerlerinde pH metre (Starter 3100, Ohaus Corporation, ABD) ile ayarlanıp sterilize edilmiştir. Steril PW içerisine eklenen fajlar, 37°C sıcaklıkta ve 60 dakika süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası çift tabaka agar yöntemi ile titreler belirlenmiştir.

3.2.3. Bakteriyofaj Gıda Uygulaması

3.2.3.1. Süt Örneklerinin Hazırlanması

Karakterize edilen fajların gıdalardaki etkinliğinin araştırılması amacıyla yağsız süt kullanılmıştır. 25°C’de yapılan süt uygulamalarında yağsız süt tozu, % 10 w/v olacak şekilde saf su ile çözündürülmüş ve 110°C’de 10 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Steril süt örnekleri ~ 30 ml olacak şekilde steril Falcon tüplere alınmıştır. 4 ve 37°C’de yapılan denemelerde kullanılmak üzere UHT light süt satın alınmıştır. Faj ve bakteri karışımları 1:1 oranında olacak şekilde ayarlanmıştır.

3.2.3.2. Sütte *Salmonella* Faj Karışımı Etkinliğinin Belirlenmesi

Sütte faj miksi etkinliği üç farklı koşul için araştırılmıştır: a) 25°C’de yüksek bakteri inokülasyonu, b) 25°C’de düşük bakteri inokülasyonu ve c) 4°C’de düşük bakteri inokülasyonu. Faj karışımının *Salmonella* bakterileri üzerindeki etkinliğini belirlemek için *S. enterica subsp. enterica* serovar Typhimurium IC, *S. enterica subsp. enterica* serovar Enteritidis ATCC BAA-1045 ve *S. Typhimurium* ATCC BAA-190 bakterilerinden meydana gelen bir bakteri karışımı hazırlanmıştır. Bu bakteri karışımı üzerindeki fajların inhibisyon aktivitesini belirlemek amacıyla steril süt örneklerine, MOI değeri 10, 100 ve 1000 olacak şekilde faj miksleri ilave edilmiştir. Örnekler 25°C’de karıştırılarak inkübe edilmiş ve 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 16, 20 ve 24 saat zaman noktalarından örnekler alınarak faj ve bakteri sayımları yapılmıştır. 4°C’de ise başlangıç anından itibaren 24 saatte bir olmak üzere 5. güne kadar örnek alınmıştır. Faj titreleri, çift tabaka agar yöntemi ile belirlenirken bakteri sayımı için örnekler XLD agar üzerine yayılmıştır. Petriler, 37°C’de 18-24 saat boyunca inkübe edilerek sayım yapılmıştır.



Şekil 3. 2. 25°C’de ve 85 rpm/dk ile inkübe edilen süt örneklerinin inkübasyonu.

3.2.3.3. Sütte *E. coli* K-12 Faj Karışımı Etkinliğinin Belirlenmesi

Karakterize edilmiş *E. coli* K-12 fajları ile bir karışım hazırlanmıştır. Bu karışım Bölüm 3.2.3.2’de anlatıldığı gibi steril süt örneklerine uygulanmış, aynı zaman noktalarından örnekler alınmıştır. Faj titreleri çift tabaka agar yöntemi ile belirlenirken *E. coli* K-12 sayımı için örnekler EMB agar üzerine yayılarak inkübe edilmiştir.

3.2.3.4. Soğuk Zincirin Kırılması

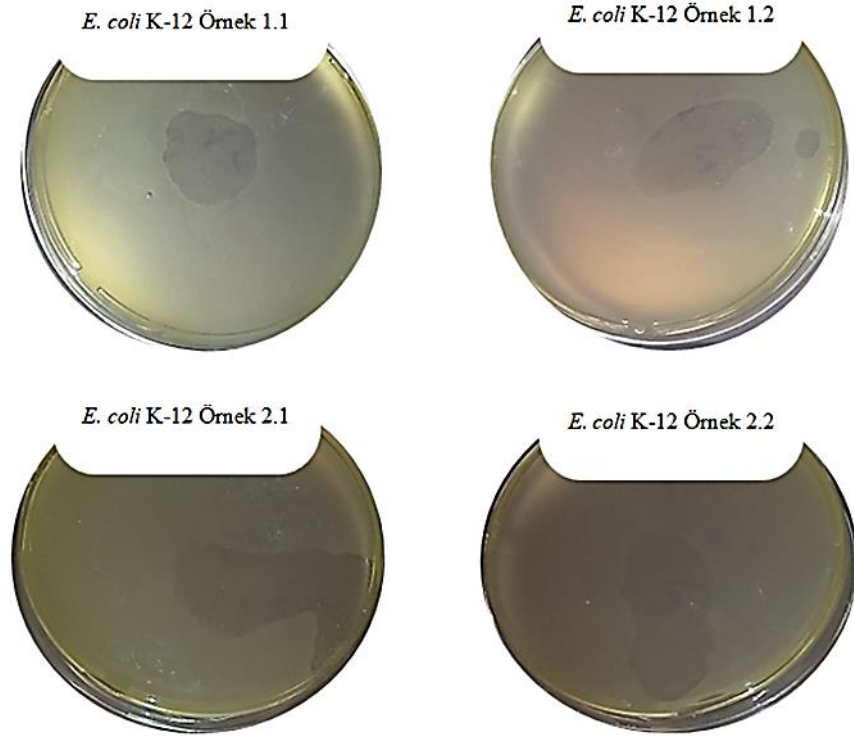
Faj uygulama etkinliğinin soğuk zincirin kırılması durumundaki değişiminin araştırılması amacıyla, 7 gün boyunca 4°C’de bekletilen *E. coli* K-12 içeren süt örnekleri iki gruba ayrılmıştır. Bir grupta 37°C’de 3. saatteki değişim izlenirken diğer grupta ise 25 °C’de 6, 12 ve 24. saatlerdeki örneklerden Bölüm 3.2.3.3’te açıklandığı gibi faj ve bakteri sayımı yapılmıştır.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. *E. coli* K-12 Faj İzolasyonu, Saflaştırılması ve Konsantre Edilmesi

4.1.1. Faj İzolasyonu

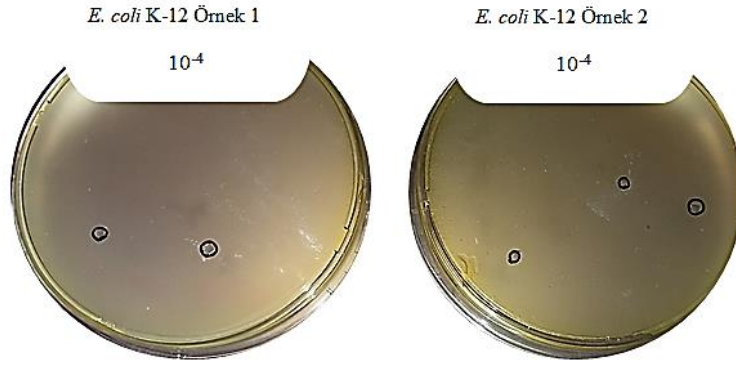
Çiğ süttten alınan örnekler kullanılarak *E. coli* K-12 bakterisini lize edebilme kabiliyeti bulunan fajların elde edilmesi amaçlanmıştır. Bölüm 3.2.1.1'deki gibi faj izolasyonu için hazırlanmış örneklerde spot test ile faj varlığı kontrol edilmiştir. Yumuşak agarlara 150 µL bakteri ekimi yapılarak ince tabaka agar üzerine yayılmış, agar katılaştıktan sonra, 50 µL örnek belirli bölgelere damlatılmıştır. İnkübasyon sonrası damlatma bölgelerinde liziz kontrolü yapılmış ve tüm damlatma alanlarında liziz pozitif sonuç alınmıştır (Şekil 4.1). Bu durum örneklerin *E. coli* K-12 bakterisini konak kabul eden faj veya fajlar içerdiğini göstermektedir. Ayrıca, Petrilerde meydana gelen lizizler parlak bir morfoloji göstermektedir.



Şekil 4. 1. Spot test ile örneklerde faj varlığı.

4.1.2. Tek Plak İzolasyonu

Faj varlığı tespit edilmiş olan örneklerin saflaştırılması için öncelikli olarak dilüsyonları hazırlanıp Petri ler üzerine tek plak halinde düşmesi sağlanmıştır. Tek plak halinde düşen bölgeler enjektör iğnesi ile kesilerek (Şekil 4.2) steril sıvı besiyerlerine alınmış ve inkübe edilmiştir. Plak alımında aynı Petri üzerinde farklı morfoloji gösteren plakların alınmasına dikkat edilmiştir. Tek plak düşürme işlemi 3 kez tekrarlanmıştır.



Şekil 4. 2. Steril enjektör iğnesi ile kesilmiş, tek plak halinde düşen bölgeler.

Saflaştırma işlemleri sonunda her bir plak Çizelge 4.1.'de belirtildiği gibi isimlendirilmiştir.

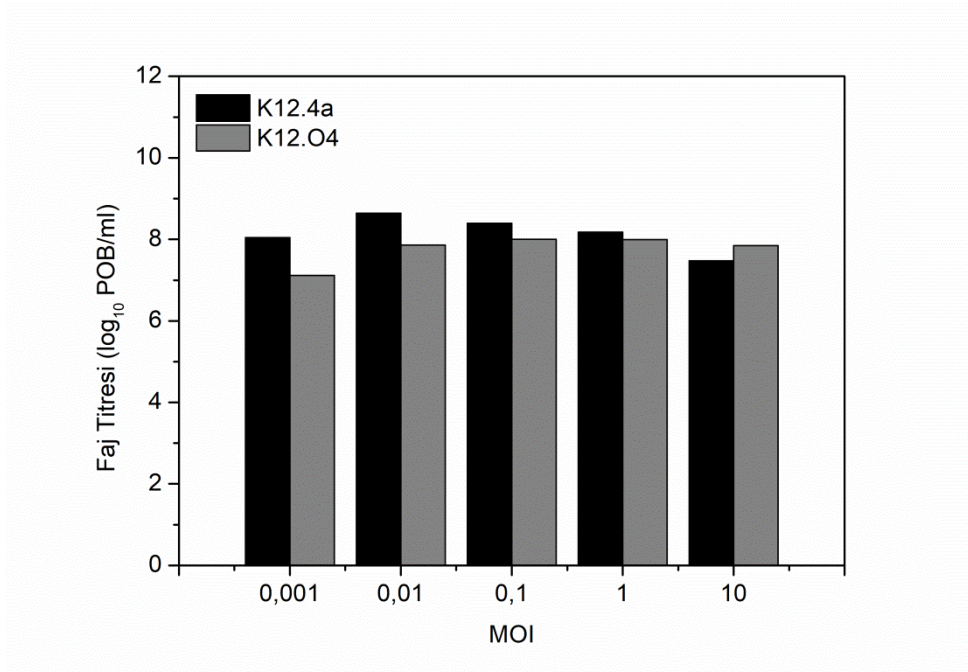
Çizelge 4. 1. Tek plak izolasyonu sonrası fajların isimlendirilmesi.

SIRA	FAJ
1	K12.2a
2	K12.2b
3	K12.3
4	K12.4a
5	K12.4b
6	K12.5
7	K12.O1
8	K12.O3

9	K12.O4
10	K12.O5

4.1.3. Fajların Zenginleştirilmesi

Saflaştırılmış ve isimlendirilmiş örneklerin konsantrasyonu öncesi titresi en az 10^8 POB/ml olana kadar zenginleştirilmiştir. Bu basamakta öncelikle etkin MOI değeri bulunarak kısa sürede yüksek titreye ulaşmak amaçlanmıştır. İki farklı faj için farklı MOI'lerde elde edilen titreler Şekil 4.3'te verilmiştir. Bu kısımdan sonra yapılan tüm zenginleştirme ve çoğaltma işlemleri etkin MOI değerlerine göre yapılmıştır.



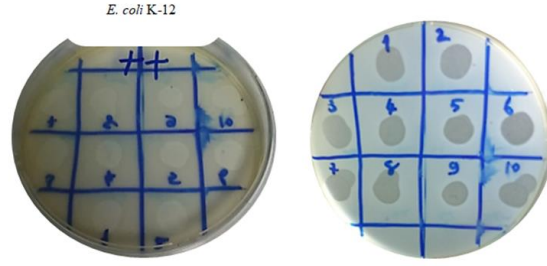
Şekil 4. 3. Etkin MOI değerlerinin bulunması.

4.2. Fajların Karakterizasyonu

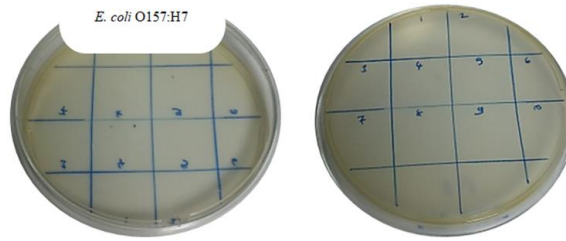
4.2.1. Fajların Konakçı Skalasının Belirlenmesi

Faj izolasyonu sonrası fajların konakçı skalası spot test ile belirlenmiştir. Çeşitli bakterilerin yayıldığı Petrilere 7 μ L faj damlatılmış ve inkübasyon sonrası liziz gözlenen bölgeler liziz yapısına göre değerlendirilmiştir (Şekil 4.2.1).

(a)



(b)



Şekil 4. 4. Fajların spot test ile konakçı skalasının belirlenmesi. Fajlara konaklık eden *E. coli* K-12 bakterisi için pozitif liziz yanıtı (a), Fajlar için konak olmayan *E. coli* O157:H7 bakterisi için negatif liziz yanıtı (b).

Tüm fajların *E. coli* K-12 dışındaki bakteriler için litik olmadığı gözlenmiştir (Çizelge 4.2). İzole edilmiş bu on fajın aynı türe ait *E. coli* O157:H7 bakterisini lize etmemiş olması, bu fajların *E. coli* K-12 bakterisine özgü olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4. 2. *E. coli* K-12'ye etkili fajların konakçı skalası.

Fajların Litik Aktivitesi										
BAKTERİ	K12.2a	K12.2b	K12.3	K12.4a	K12.4b	K12.5	K12.O1	K12.O3	K12.O4	K12.O5
<i>E. coli</i> K12	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>E. coli</i> O157:H7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

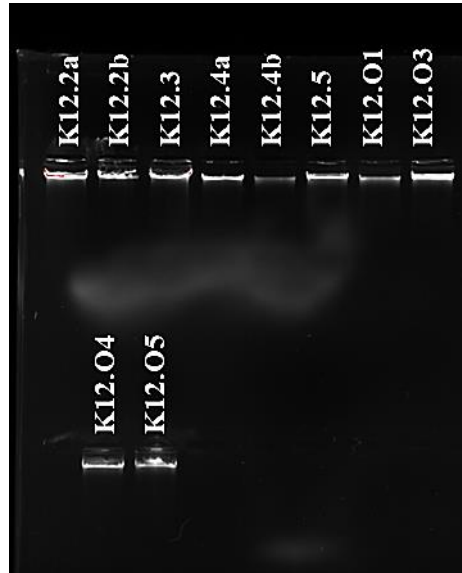
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Micrococcus luteus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium IC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC BAA-190	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas putida</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis ATCC BAA-1045	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Erwinia amylovora</i> (D 41)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Erwinia amylovora</i> (Dal 44)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Erwinia amylovora
(Dal 33)

Tam liziz, ‘++’; liziz, ‘+’; liziz yok, ‘-’ .

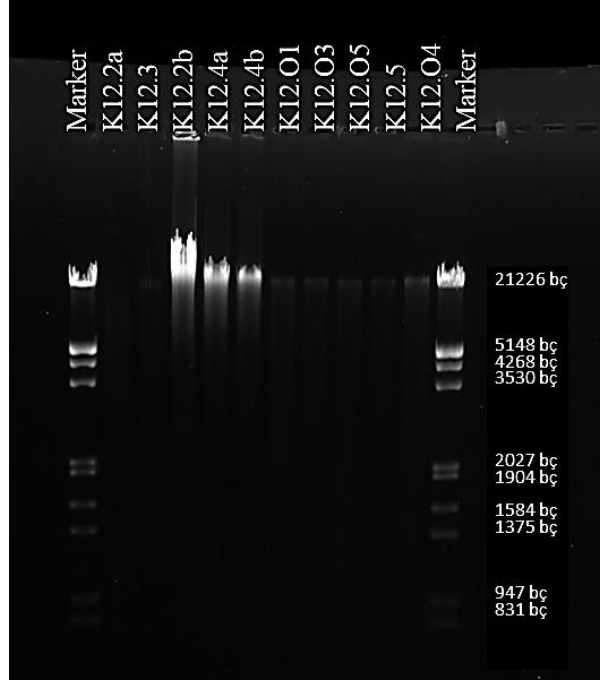
4.2.2. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)

Konsantre edilmiş on adet fajta ait nükleik asitler jellere yüklenmiş (Şekil 4. 5) ve *Hind* III, *Eco*RI, *Eco*RV, *Xba*I, *Kpn*I ve *Xho*I restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesim yapılmıştır. Fragment uzunluklarının belirlenmesinde ImageJ programından yararlanılmıştır.



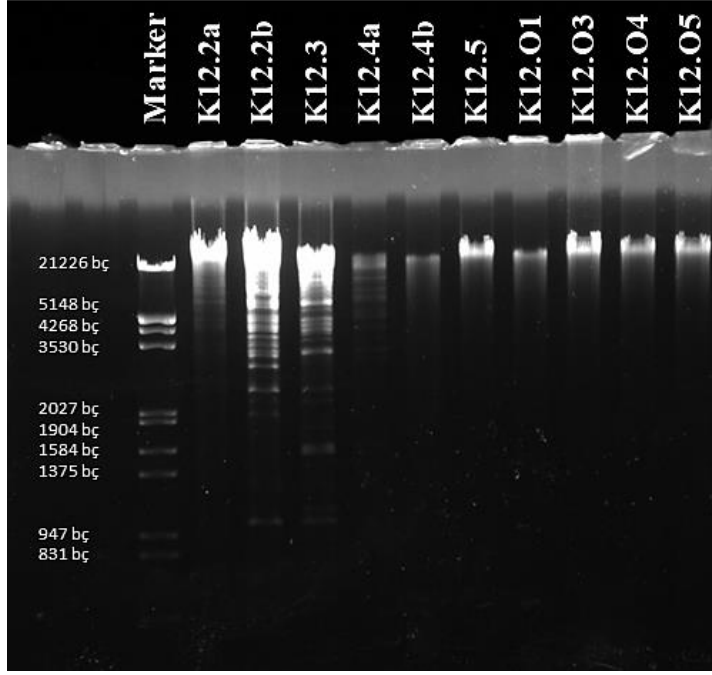
Şekil 4. 5. Faj nükleik asitlerinin jel görüntüsü.

Faj nükleik asitlerinden yalnızca üç tanesinde *Hind*III enziminin kesim bölgesi olduğu diğerlerinde ise ilgili baz diziliminin olmadığı tespit edilmiştir. Şekil 4. 6’da soldan sağa doğru K12.2a, K12.3 ve K12.2b fajlarında iyi bir kesim sağlanamamış ve bu fajlar birbirinden ayırt edilememiştir.



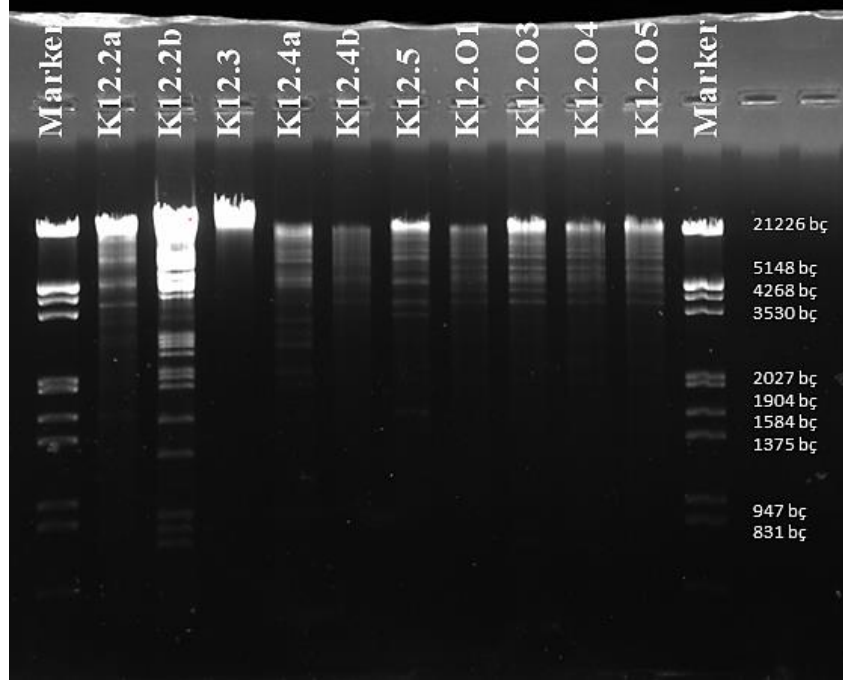
Şekil 4. 6. Faj nükleik asitlerinin HindIII enzimi ile kesimi jel görüntüsü.

E. coli K-12'ye etkili faj DNA'larının *EcoRI* enzimi ile kesiminde bazı fajlarda fragmentler meydana gelmiştir. Burada K12.2b, K12.3 ve K12.4a DNA fragment dizgesi karşılaştırıldığında farklı bantların bulunduğu gözlenmiştir. K12.2b faj DNA'sı 3312 ve 2422 baz çifti; K12.3 faj DNA'sı 1578 ve 1225 baz çifti büyüklüğünde fragmentlerine sahip olmalarından dolayı birbirinden farklıdır. K12.4a faj DNA'sı ise bu dört bölgede de fragment vermemiştir (Şekil 4. 7). Elde edilen bu bilgiler doğrultusunda K12.2b, K12.3 ve K12.4a fajlarının, *EcoRI* enzimine göre elde edilen DNA fragmentlerine göre birbirinden farklı olduğu anlaşılmaktadır.



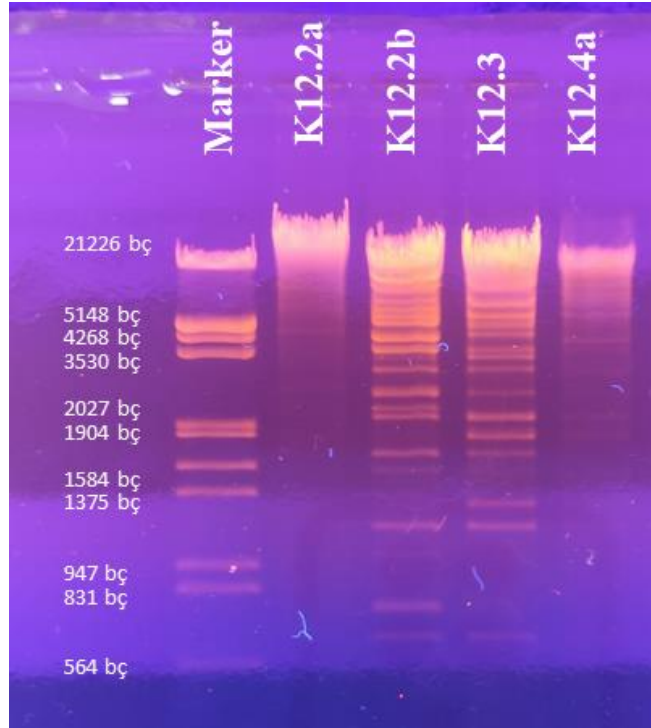
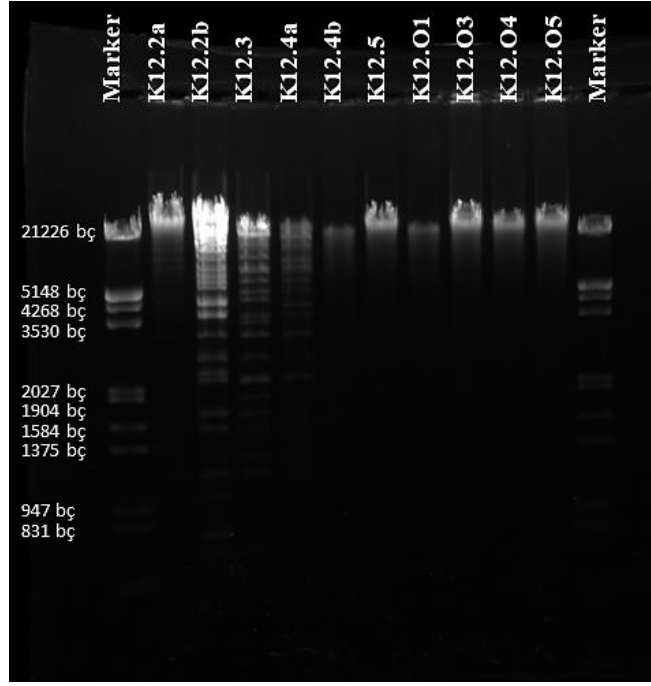
Şekil 4. 7. Faj nükleik asitlerinin *EcoRI* enzimi ile kesimi jel görüntüsü.

EcoRV enzimi ile kesime giren Şekil 4. 8’de soldan sağa doğru K12.2a, K12.2b, K12.3, K12.4a, K12.4b, K12.5, K12.O1, K12.O3, K21.O4 ve K12.O5 faj DNA’larına ait kesim profilini göstermektedir. K12.2b fajı *EcoRV* enzimi ile kesildiğinde 3005, 2797, 2061, 2002, 1584, 1325, 931, 820 ve 796 baz çifti büyüklüğünde fragmentler gözlenmiştir. K12.3 fajında fragmentler oluşmamış iken K12.4a fajında 1584, 1325, 931, 820 ve 796 baz çifti büyüklüğünde fragment bulunmamaktadır. K12.5 fajında ise 1614 baz çifti büyüklüğünde fragment var iken K12.4a fajında yoktur. Ayrıca 3492 baz çiftinde bulunan bant K12.O1, K12.O3, K12.O4 ve K12.O5 fajlarında bulunmamaktadır. Bu verilere göre K12.2b fajı tüm fajlardan farklılık göstermektedir. K12.3 fajının *EcoRI* enzimi ile kesim gösterip *EcoRV* enzimi ile kesim göstermemesi K12.2b ve K12.3 fajlarının enzim duyarlılığı yönünden birbirinden farklılık gösterdiğini vurgulamaktadır. Ayrıca K12.4b, K12.5, K12.O1, K12.O3, K21.O4 ve K12.O5 fajları *EcoRI* ile kesim göstermezken *EcoRV* ile fragment oluşumu göstermiştir. Bu durum bu altı fajın enzim duyarlılığı yönünden K12.2b, K12.3 ve K12.4a fajlarından farklı olduğunu göstermektedir. K12.O1, K12.O3, K21.O4 ve K12.O5 fajlarına ait fragment dizgeleri birbirine benzemektedir.

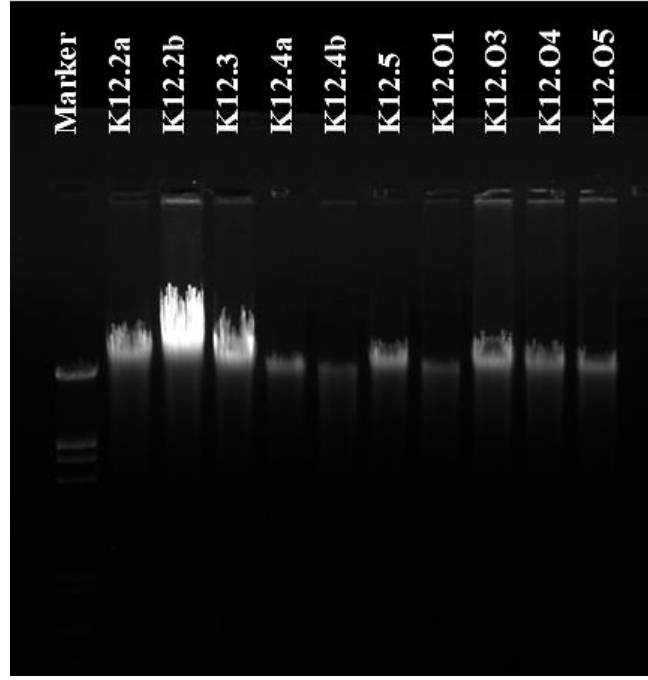


Şekil 4. 8. Faj nükleik asitlerinin *EcoRV* enzimi ile kesimi jel görüntüsü.

E.coli K12'ye etkili fajlar *XbaI* enzimi ile kesime alınmış, K12.2b, K12.3 ve K12.4a için ayırt edilebilir fragmentler elde edilebilmiştir. K12.2b fajı 2174 ve 842 baz çiftlerinde, K12.3 fajı 3566 ve 1373 baz çiftlerinde ve K12.4a fajı 5105 baz çiftinde verdiği fragmentler ile farklılaşmaktadır. Diğer fajlarda fragmentler belirgin değildir veya fragment oluşmamıştır (Şekil 4.9). Faj DNA'larının *KpnI* enzimi ile kesiminde, enzimin spesifik kesim bölgesi/bölgelerinin bu faj DNA'ları üzerinde olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.10).

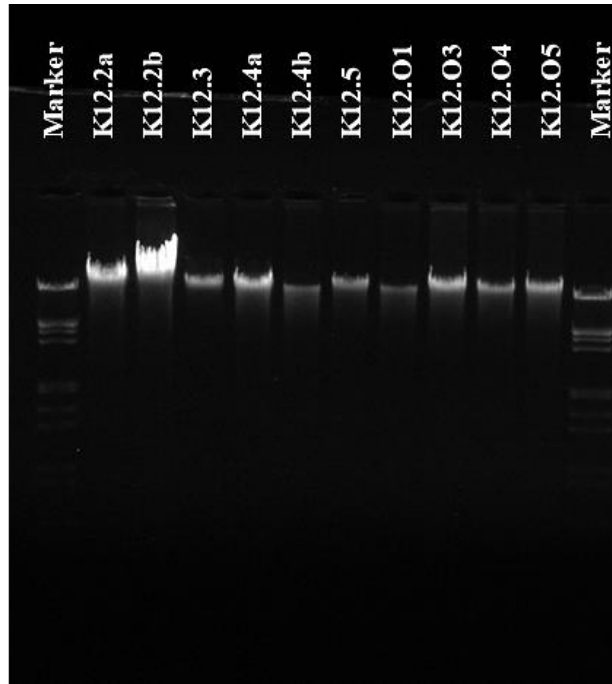


Şekil 4. 9. Faj nükleik asitlerinin *XbaI* enzimi ile kesimi jel görüntüleri.



Şekil 4. 10. Faj DNA'larının *KpnI* enzimi ile kesimi jel görüntüsü.

Fajların *XhoI* enzimi ile kesim sonucunda, bu enzimin spesifik kesim bölgesinin/bölgelerinin DNA'lar üzerinde olmadığı tespit edilmiştir.



Şekil 4. 11. Faj DNA'larının *XhoI* enzimi ile kesimi jel görüntüsü.

Verilerin daha iyi anlaşılabilmesi amacıyla faj DNA'larına ait kesim profilleri aşağıdaki tabloda özetlenmiştir.

Çizelge 4. 3. Faj DNA'larının restriksiyon enzimleri ile kesim profilleri.

Fajlar	Restriksiyon Enzimleri					
	<i>HindIII</i>	<i>EcoRI</i>	<i>EcoRV</i>	<i>XbaI</i>	<i>KpnI</i>	<i>XhoI</i>
K12.2a	-	+	+	-	-	-
K12.2b	-	++; 3312 ve 2422 bç	++; 3005, 2797, 2061, 2002, 1584, 1325, 931, 820 ve 796 bç	++; 2174 ve 842 bç	-	+
K12.3	-	++; 1578 ve 1225 bç	-	++; 3566 ve 1373 bç	-	-
K12.4a	-	+	+	++; 5105 bç	-	-
K12.4b	-	-	+	-	-	-
K12.5	-	-	++; 1614 ve 3492 bç	-	-	-
K12.O1	-	-	+	-	-	-
K12.O3	-	-	+	-	-	-
K12.O4	-	-	+	-	-	-
K12.O5	-	-	+	-	-	-

++, fragment ve farklı uzunlukta baz çiftleri var; +, fragment var; -, fragment yok veya belirgin değil.

Enzim duyarlılığı ve fragment dizgesi yönünden K12.O1, K12.O3, K12.O4 ve K12.O5 benzerdir. K12.4b belirgin olmayan fragmentler içerdiği için bu grup içerisine alınmamıştır. Belirgin olmayan fragmentler içermesine karşılık K12.2a enzim duyarlılığı yönünden diğer fajlardan farklıdır. K12.2b, K12.3, K12.4a ve K12.5 fajları ise hem fragment dizgesi hem de enzim duyarlılığı yönünden farklılık gösterdiği için diğerlerinden farklıdır. Son durumda, RFLP analizlerine göre incelenen on adet faj 6 farklı gruba ayrılmıştır. İlerleyen karakterizasyon çalışmalarına farklı gruplara ait olan K12.2b ve K12.4a fajları ile devam edilmiştir.

Çizelge 4. 4. Fajların RFLP analizlerine göre gruplandırılması.

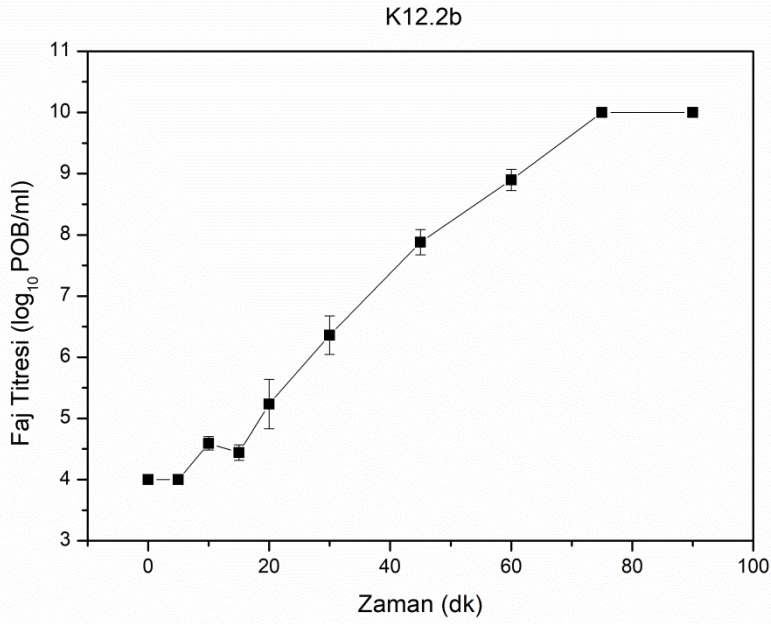
I. grup	II. grup	III. grup	IV. grup	V. grup	VI. grup
K12.2a	K12.2b	K12.3	K12.4a	K12.5	K12.O1
					K12.O3
					K12.O4
					K12.O5

4.2.3. Fajların Tek Aşamalı Gelişme Eğrisi

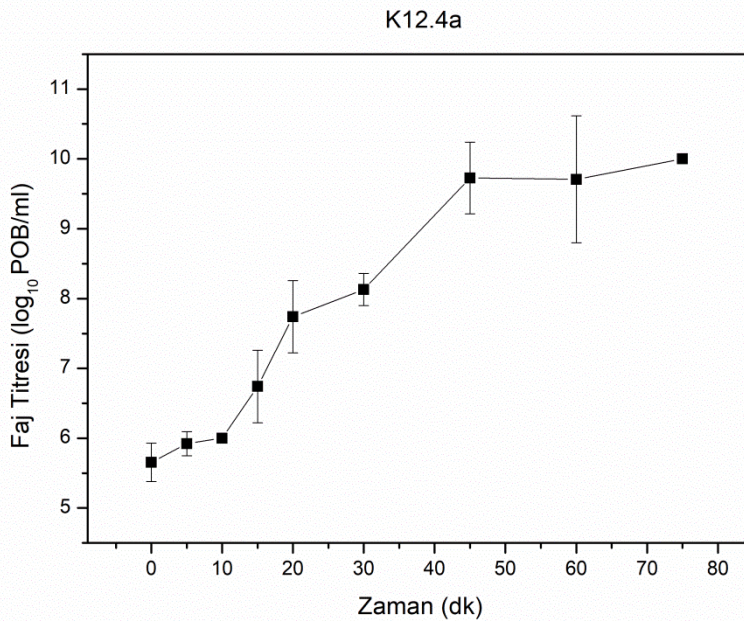
Islam ve ark (2020)'ndan uyarlanarak oluşturulan deneysel prosedüre [76] göre *E. coli* K-12'ye etkili fajlara ait tek aşamalı gelişme eğrisi çıkarılmıştır (Şekil 4.12). Bu eğrilerden yararlanılarak latent dönem süreleri ve patlama büyüklükleri hesaplanmıştır. K12.2b faji için latent dönem 15 dakika, patlama büyüklüğü 348 POB/hücre olarak hesaplanmıştır. K12.4a için de latent dönem süresi 10 dk, patlama büyüklüğü 24 POB/hücre olarak belirlenmiştir. Görüldüğü üzere, K12.4a fajından ortama salınan faj sayısı K12.2b fajından daha az olmuştur. Li ve ark (2021) tarafından yapılan çalışmada izole edilen JN01 fajının patlama büyüklüğü (134 POB/enfekte hücre), K12.2b fajının patlama büyüklüğünden daha düşük iken K12.4a fajının patlama büyüklüğünden daha yüksektir [60]. Litt ve ark (2018)'nın O157-olmayan EHEC bakterilerine etkili 45 faj ile yaptıkları çalışmada, *Myoviridae* familyasına ait fajların latent dönem sürelerini 8-37 dakika; patlama büyüklüklerini ise 12-257 POB/enfekte hücre olarak belirlemişlerdir. K12.4a fajına benzer patlama büyüklüğüne sahip J-25 (O145) fajının latent dönem

uzunluğu 28 dakikadır. K12.2b fajının patlama büyüklüğu, Litt ve ark (2018)'nın izole ettiği fajlardan daha yüksektir. K12.4a fajının ise latent dönem süresi bu çalışma ile elde edilen en kısa süreye (8 dakika) yakındır [77].

(a)



(b)



şekil 4. 12. Tek Aşamalı Gelişme Eğrileri. K12.2b (a) ve K12.4a (b).

Latent dönem uzunluğu, spesifik faj gelişme hızı, fizyolojik koşullar, konak bakteri, inkübasyon koşulları, sıcaklık, besiyeri gibi parametrelere bağlıdır [78]. Latent dönem uzunluğunun ve adsorpsiyon süresinin kısa olması, patlama büyüklüğünün yüksek olması biyokontrol ajanı olarak kullanılacak fajlar için istenen özelliklerdir [79]. Bu bilgilere göre, K12.2b ve K12.4a fajlarından, hem patlama büyüklüğü hem de latent dönem süresi yönünden biyokontrol ajanı olarak istenen niteliklere sahip faj karışımları oluşturulabilmektedir.

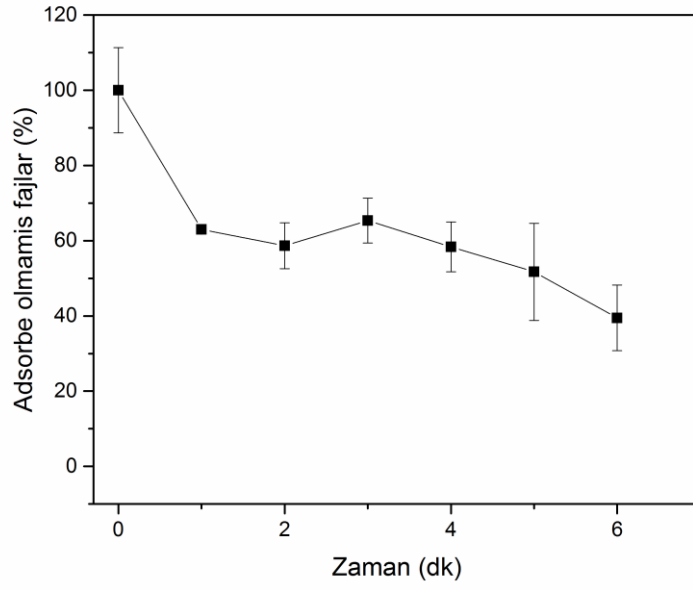
4.2.4. Adsorpsiyon Hızı

Fajların adsorpsiyon hız sabitlerinin hesaplanmasında 10 dakika boyunca birer dakika aralıklar ile örnek alınmış ve titre bakılmıştır. K12. 2b fajı için 6. dakikada en yüksek adsorpsiyon sağlanmış olup mevcut fajların % 45'i ise adsorbe olmamıştır. K12.4a fajı ise 10. dakika en yüksek adsorpsiyon oranını sağlamış, fajların %18'i adsorbe olmamıştır (Şekil 4.13). Konak bakteri yüzeyine en yüksek adsorpsiyonu K12.4a fajı sağlamaktadır. Ayrıca bu veriler, Eşitlik 3.3'te yerine konularak adsorpsiyon hız sabitleri hesaplanmıştır (Çizelge 4.3). Buna göre K12.2b fajının adsorpsiyon hız sabiti K12.4a fajından daha büyüktür. Niu ve ark (2012), *Siphoviridae* familyasına ait AKFV33 fajı için adsorpsiyon hız sabitini 9.31×10^{-9} ml/dk olarak belirlemişlerdir [80]. K12.2b ve K12.4a fajlarının adsorpsiyon hız sabiti, AKFV33 fajından daha yüksektir ama bu çalışma kapsamında yararlanılan *Salmonella* bakterilerine etkili SE-PH1 ve SE-PH fajları ile benzerdir [36].

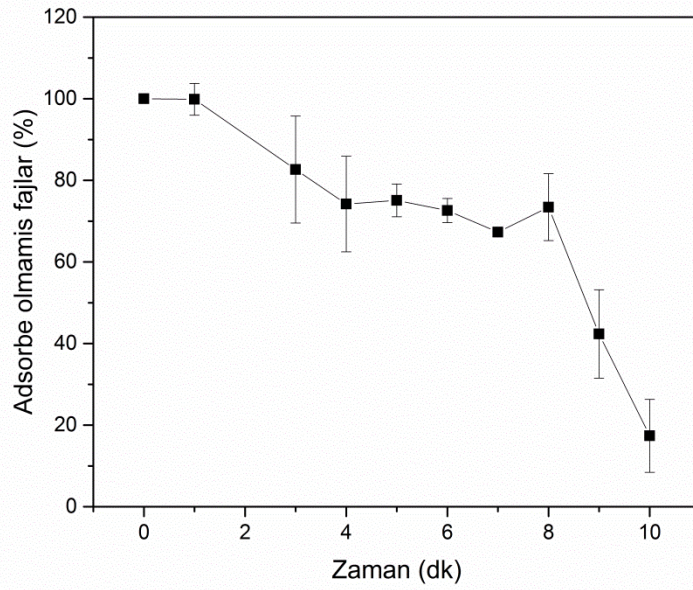
Çizelge 4. 5. Adsorpsiyon hız sabitleri.

Faj	Adsorpsiyon Hız Sabiti (ml/dk)	Standart Sapma
K12.2b	$1,60 \times 10^{-8}$	$4,66 \times 10^{-9}$
K12.4a	$1,78 \times 10^{-8}$	$6,04 \times 10^{-9}$

(a)



(b)



Şekil 4. 13. K12.2b (a) ve K12.4a (b) fajları % adsorpsiyon değışimi.

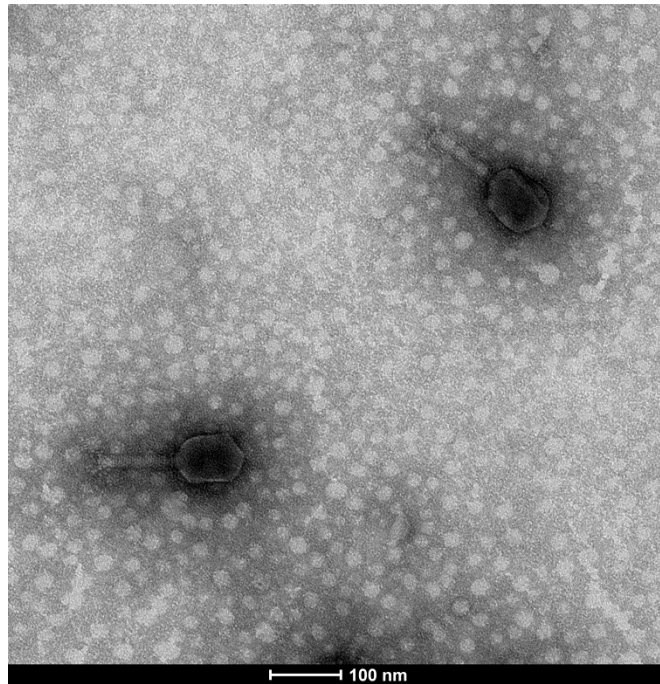
4.2.5. Morfolojik Karakterizasyon

PEG ile konsantre edilen faj örnekleri K12.2b ve K12.4a uranil asetat ile gridler üzerinde boyanmış ve TEM ile fajlara ait elektronmikrograflar elde edilmiştir (Şekil 4.14). Devamında elde edilen fajlara ait görüntüler ImageJ programı ile ölçülmüştür. Ölçüm sonuçları Çizelge 4. 4'te sunulmuştur.

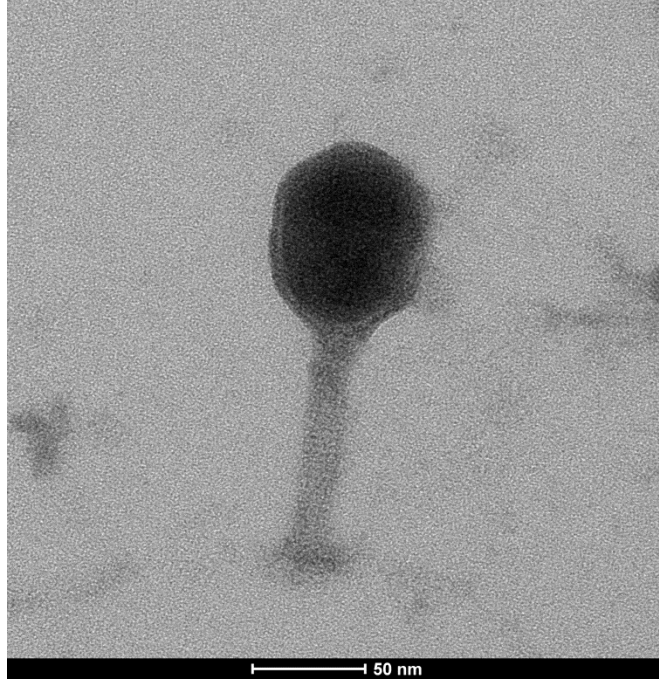
Çizelge 4. 6. Faj boyutları.

Parametre	K12.2b			K12.4a		
	Uzunluk(nm)	Standart Sapma	Değer (nm)	Uzunluk(nm)	Standart Sapma	Değer (nm)
Kuyruk uzunluğu	99.068	6.398	99,07 ± 6,40	93.198	9.206	93,20 ± 9,21
Kuyruk çapı	18.430	1.618	18,43 ± 1,62	17.273	2.124	17,27 ± 2,12
Kafa (Uzatılmış)	98.084	1.315	98,08 ± 1,32	92.842	0.577	92,84 ± 0,58
Kafa (İkozahedral)	70.492	3.680	70,49 ± 3,68	68.758	2.028	68,76 ± 2,03

(a)



(b)



Şekil 4. 14. K12.2b (a) ve K12.4a (b) fajlarının TEM görüntüleri.

Şekil 4.14'te görüldüğü üzere her iki faj da kontraktıl kuyruk yapısı ve ikozahedral kafaya sahiptir [81]. Çizelge 4.4'te belirlenmiş değerler Çizelge 2.1 ile kıyaslandığında *Myoviridae* familyası özelliklerini sağladığı görülmüştür.

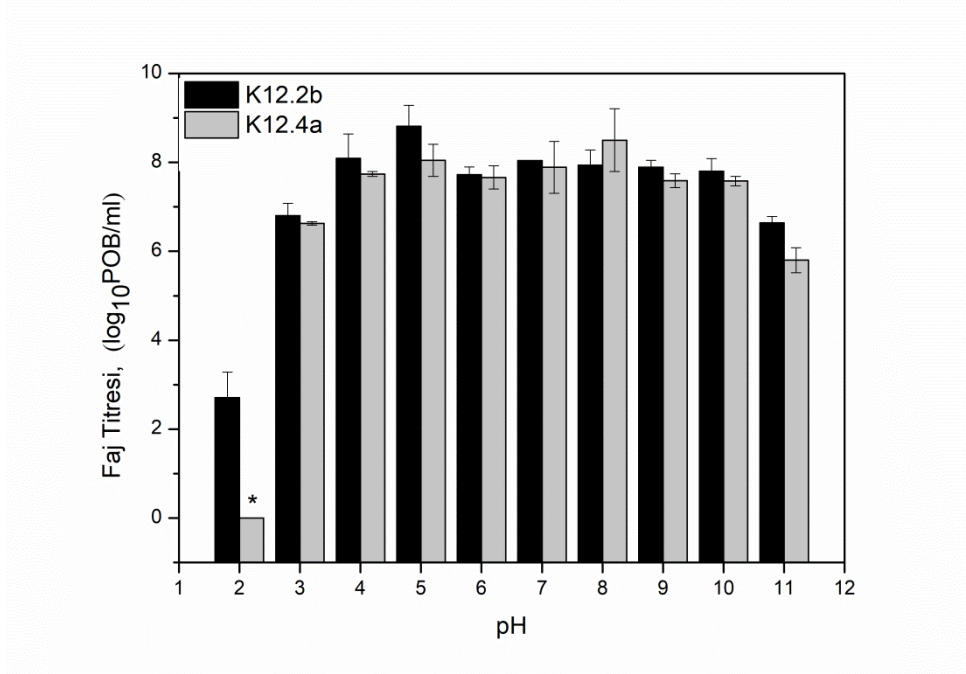
4.2.6. pH ve Sıcaklık Stabilitesi

pH duyarlılığının tespiti amacıyla fajlar, pH 2 ila 11 aralığında hazırlanmış steril PW içerisinde 37°C'de 1 saat boyunca bekletilmiştir. İnkübasyon sonrası alınan örneklerde çift tabaka agar yöntemi ile titre bakılmış ve mevcut faj titreleri Şekil 4.6 (a)'da verilmiştir. pH 2 değerinde yalnızca K12.2b fajı gözlenmiş olup titresi 2,7 log₁₀ (POB/ml) olarak belirlenmiştir. K12.2b fajı pH 5 değerinde, K12.4a fajı ise pH 8 değerinde en yüksek titreyi vermiştir. Literatüre bakıldığında Li ve ark (2021) tarafından izole edilen *E. coli* O157:H7 bakterisine etkili JN01 fajı pH 4-13 arası aktif iken [60] Liao ve ark (2019) tarafından izole edilen *E. coli* O145 bakterisine etkili Ro145clw fajı ise pH 3-10 aralığında aktivite göstermiştir [82]. K12.2b fajı genel olarak pH 4-10 aralığında, K12.4a fajı ise pH 5-9 aralığında daha stabildir. Bu iki fajdan

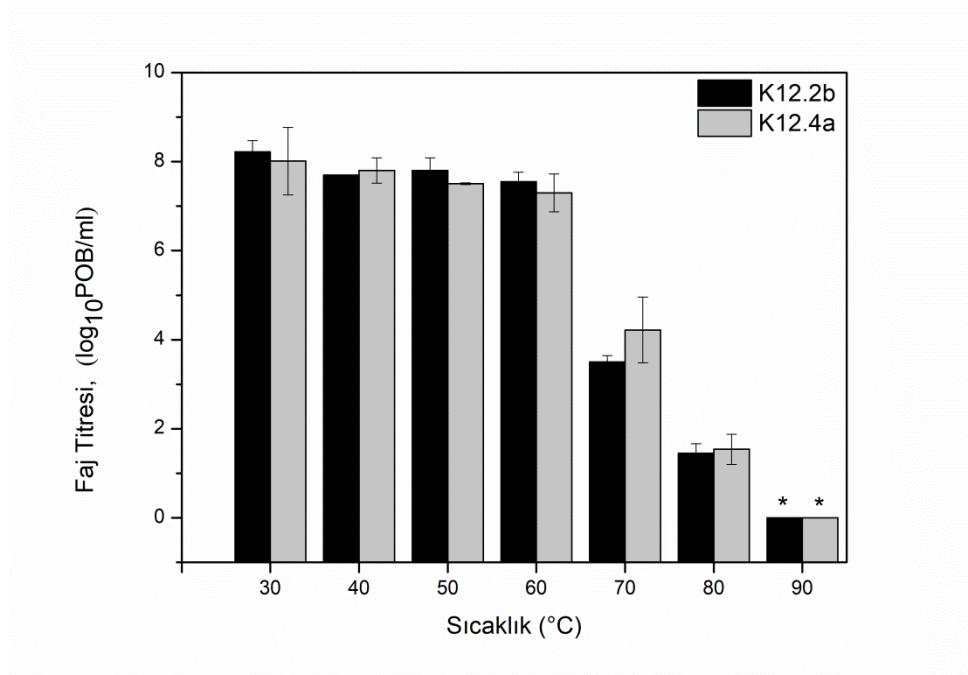
meydana gelecek karışımda pH 2-11 arası aktif olan fajlar olacağı için bu pH aralığında bulunan gıdalarda bakteriyel eliminasyon sağlanabilir.

Sıcaklık stabilitesinin tespiti için fajlar SM tamponu içerisinde 30 – 90 °C’lerde 1 saat boyunca bekletilmiştir. İnkübasyon sonrası çift tabaka agar yöntemi ile örneklerin titresi bakılmış ve mevcut faj miktarları Şekil 4.6 (b)’de verilmiştir. Buna göre tüm fajlar 30 ila 60 °C aralığında stabilitelelerini korurken 70 °C’de faj titresinde yaklaşık % 50 azalma gözlenmiştir.

(a)



(b)



Şekil 4. 15. K12.2b ve K12.4a fajları pH (a) ve sıcaklık (b) stabilitesi. (*) Tespit edilebilir değerlerin altında.

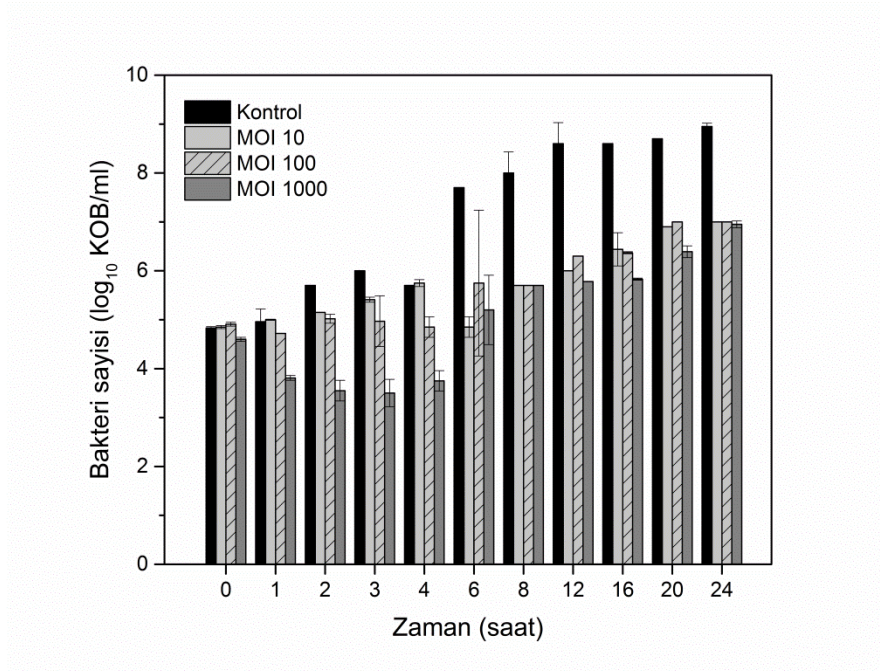
4.3. Bakteriyofaj Gıda Uygulaması

4.3.1. Sütte *Salmonella* Faj Karışımı Etkinliğinin Belirlenmesi

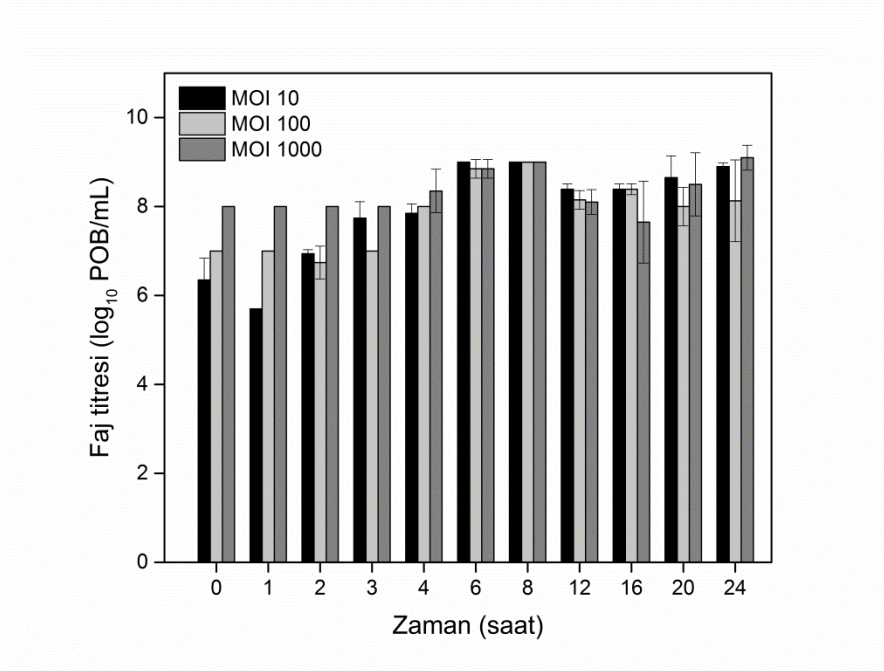
Salmonella bakteri karışımı ile muamele edilmiş sütler, 25°C'de inkübe edilmiş ve 24 saat boyunca belirli aralıklarla örnekler alınarak faj ve bakteri sayımları yapılmıştır. Şekil 4.16'da bu deney boyunca örnek ve kontrol gruplarında bulunan faj ve bakteri sayıları sunulmaktadır. *Salmonella* bakterileri ile kontamine edilmiş süt örneklerinde, kontrol gruplarında ve MOI 10 iken bakteri değerlerinde ilk 4 saatte bir artış yaşanırken MOI 100 iken sayı sabit kalmış, MOI 1000 değerinde ise 0,8 log₁₀ KOB/ml bir azalma gözlenmiştir. Ardından, 24. saate kadar tüm gruplardaki bakteri sayılarında genel olarak bir artış yaşanmıştır. Son durumda kontrol grubunda 8,9 log₁₀ KOB/ml bakteri bulunurken MOI 10, 100 ve 1000 değerlerinde ortak olarak 7 log₁₀ KOB/ml bakteri sayılmıştır. Deney grubunda en yüksek azalmalar MOI 10, 100 ve 1000'de sırasıyla 6, 8-12 ve 12. saatlerde meydana gelmiştir. Azalmalar ise sırasıyla 2,9, 2,3 ve 2,8 log₁₀ KOB/ml olarak belirlenmiştir. *Salmonella* bakterilerine etkili fajların başlangıç sayıları MOI 10, 100 ve 1000 için sırasıyla 6,4, 7 ve 8 log₁₀ POB/ml olarak belirlenmiştir. Tüm MOI değerlerinde 8. saate kadar faj miktarı genel olarak artış göstermiş ve 9 log₁₀

POB/ml'ye kadar ulaşmıştır. Bu saatten 24. saate kadar faj miktarlarında yaşanan azalmalar sonrası, MOI 10 ve 1000 için faj miktarı tekrar $9 \log_{10}$ POB/ml değerlerine ulaşırken bu miktar MOI 100 için $8,1 \log_{10}$ POB/ml olarak sayılmıştır. Park ve ark (2021), başlangıç bakteri yükü $4 \log_{10}$ KOB/ml olan süt örneklerinde üç farklı faj miksinin etkinliğini araştırmışlardır. 25°C 'de inkübe edilen örneklerde TS miksi 48 saatin sonunda $4 \log_{10}$ KOB/ml azalma sağlamış ancak diğer iki miks (NTS7 ve NTS4) bakteri eliminasyonunda etkili olamamıştır [38]. Bu çalışma kapsamında hazırlanan miks ise 24 saatin sonunda $1,9 \log_{10}$ KOB/ml eliminasyon sağlamaktadır. Bu miks, TS miksinden daha düşük inhibisyon aktivitesi gösterse de NTS7 ve NTS4 faj karışımlarından daha etkilidir. Başlangıç bakteri yükü $4 \log_{10}$ KOB/ml olan bir diğer çalışmada, ϕStp1 , ϕSep1 , ϕSP3 ve ϕSP1 faj miksi ile 28°C 'de 6 saat inkübasyon sonrası $1,9 \log_{10}$ KOB/ml bakteri elimine edilmiştir [39]. Bu çalışma kapsamında hazırlanan *Salmonella* faj miksi, MOI 10 iken 6 saat inkübasyon sonrası $2,9 \log_{10}$ KOB/ml bakteri azalması göstermiştir ve ϕStp1 , ϕSep1 , ϕSP3 ve ϕSP1 fajlarından oluşan faj karışımından bakteriyel eliminasyon yönünden daha etkilidir.

(a)



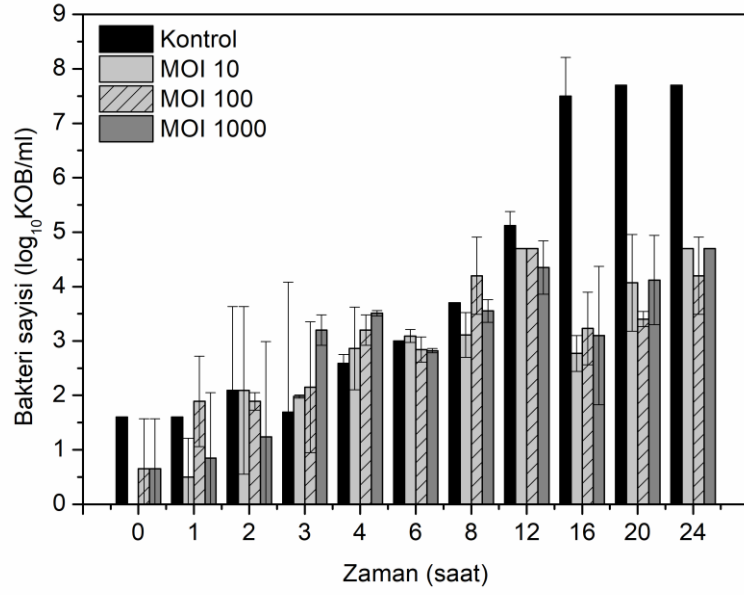
(b)



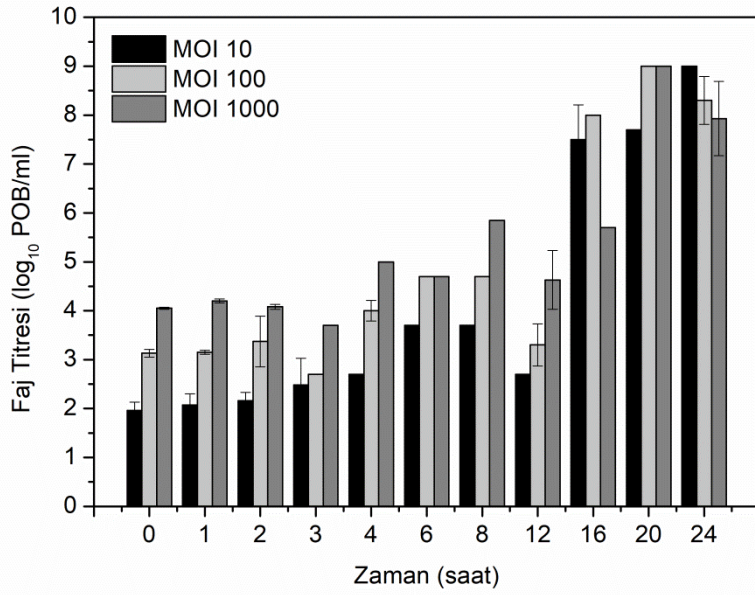
Şekil 4. 16. 25°C’de yüksek inokülasyon miktarlarında, steril yağsız süt örneklerinde *Salmonella* bakteri (a) ve faj (b) sayılarındaki değişimler.

25°C’de, *Salmonella* faj etkinliği düşük inokülasyon miktarlarında tekrarlanmıştır. Burada da başlangıçta 1-2 log₁₀ KOB/ml bakteri inoküle edilmiş ve 24 saat boyunca bakteri ve faj sayılarındaki değişim takip edilmiştir (Şekil 4.8). Başlangıçta kontrol ve MOI 100 değerinde yaklaşık 2 log₁₀ KOB/ml bakteri bulunmakta iken MOI 10 ve 1000 değerlerinde bakteri sayısı tespit edilebilir değerlerin altındadır (< 10 KOB/ml). En yüksek bakteri eliminasyonu MOI 10 için 16. saatte 4,7 log₁₀ KOB/ml, MOI 100 için 20. saatte 4,3 log₁₀ KOB/ml ve MOI 1000 için 16. saatte 4,4 log₁₀ KOB/ml olarak belirlenmiştir. 24 saat sonra kontrol 7,7 log₁₀ KOB/ml bakteri içermekte iken, MOI 10, 100 ve 1000 değerlerinde sırasıyla 4,7, 4,2 ve 4,7 log₁₀ KOB/ml bakteri, 9, 8,3 ve 7,9 log₁₀ POB/ml faj bulunmaktadır. Bu çalışmada, 24 saatin sonunda 3,5 log₁₀ KOB/ml’ye kadar bakteriyel azalma sağlanmıştır ve Huang ve ark (2018)’nin elde ettikleri eliminasyondan (2,37 log₁₀ KOB/ml) daha yüksek bakteri eliminasyonu göstermiştir [40]. *Salmonella* faj etkinliği açısından başlangıç bakteri yükünün etkisi kıyaslandığı zaman düşük inokülasyon miktarlarında faj etkinliğinin daha yüksek olduğu saptanmıştır.

(a)



(b)

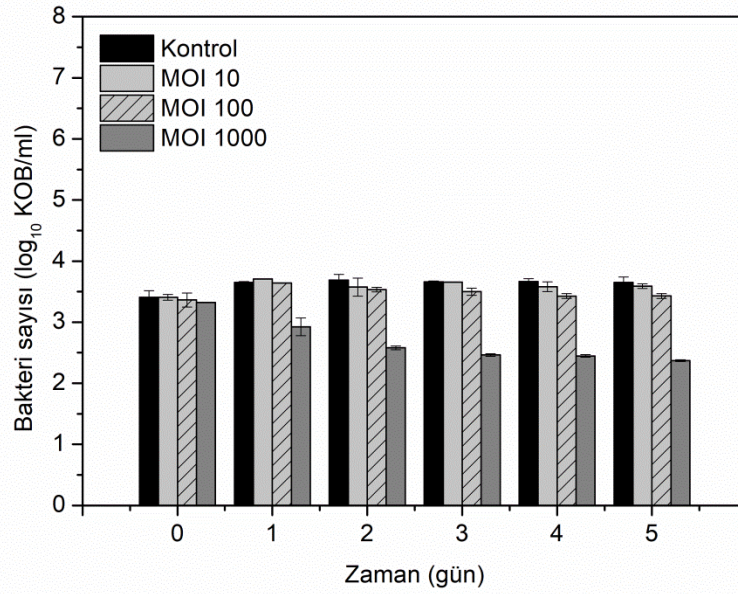


Şekil 4. 17. 25°C’de düşük inokülasyon miktarlarında, steril yağsız süt örneklerinde *Salmonella* bakterisi (a) ve faj (b) sayılarındaki değişimler.

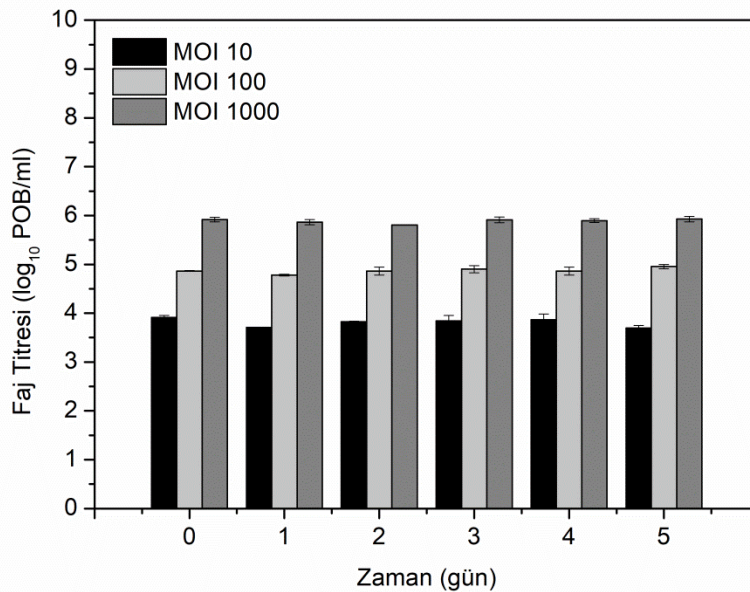
Son olarak UHT süt üzerindeki faj karışımı etkinliği 4°C’de yapılan denemeler ile belirlenmiştir. Bu amaçla 30 ml’lik Falconlarda bulunan UHT süt örnekleri 5 gün

boyunca takip edilmiştir. Bulgular doğrultusunda elde edilen grafikler Şekil 4.18’de verilmektedir. Sonuçta en yüksek azalma 5. günde MOI 1000 değerinde sağlanmış olup 1,3 log₁₀ KOB/ml olarak belirlenmiştir. Literatüre bakıldığında bazı fajlar veya faj karışımları (NTS4 ve LPSE1) bu sıcaklıktaki depolamada bakteri eliminasyonu göstermezken bazı fajların 3 log₁₀ KOB/ml’ye kadar eliminasyon sağladığı raporlanmıştır [37-40].

(a)



(b)

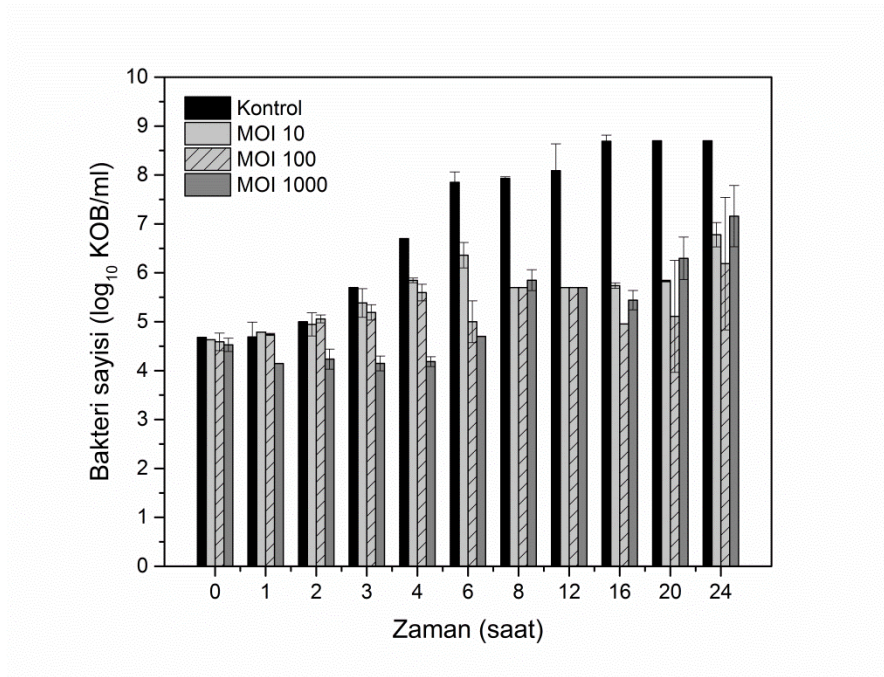


Şekil 4. 18. 4°C’de düşük inokülasyon miktarlarında, steril yağsız süt örneklerinde *Salmonella* bakteri (a) ve faj (b) sayılarındaki değişimler.

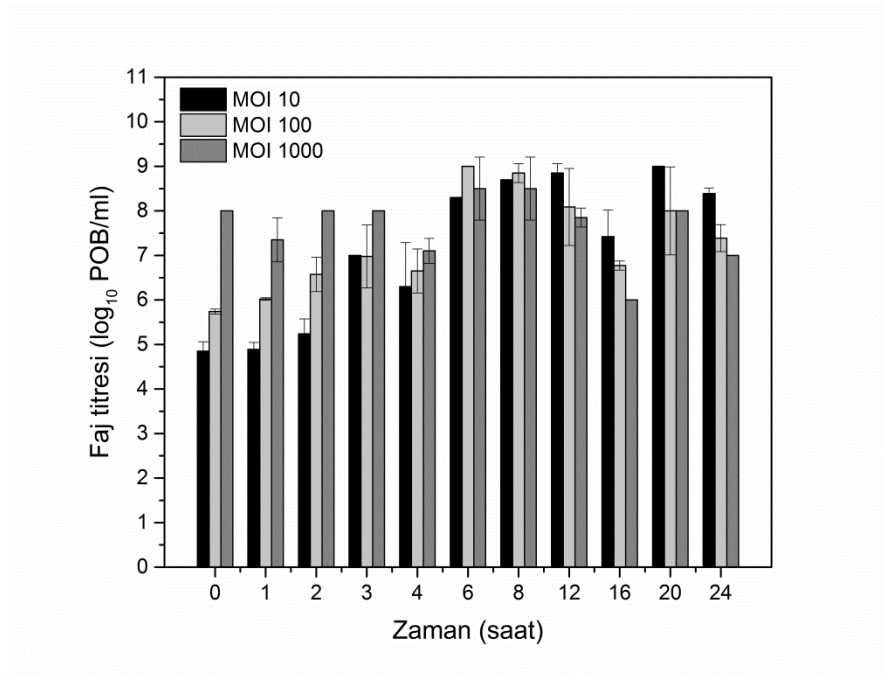
4.3.2. Sütte *E. coli* K-12 Faj Karışımı Etkinliğinin Belirlenmesi

E. coli K-12 bakterisi ile kontamine edilmiş, farklı MOI’lerdeki süt örneklerinin bakteri ve faj sayılarındaki değişimler 24 saat boyunca izlenmiştir. Faj ilavesi yapılmayan kontrol grupları ve örnek grupları değişimi ile oluşturulan grafikler Şekil 4.19’da verilmektedir. Başlangıç *E. coli* K-12 bakteri sayısı kontrol grubunda, MOI 10 ve 100 değerlerinde artış yaşanmış ve MOI 100 için 4 saat, MOI 10 için 6 saat boyunca bu artış devam etmiştir. MOI 10 için 8. saatte yaşanan 0,6 log₁₀ KOB/ml azalmadan sonra 20. saate kadar bakteri sayısı sabit kalmış, MOI 100 için azalış ve artışlar meydana gelmiştir. Aynı zamanda, MOI 1000 için ise ilk 1 saatteki 0,4 log₁₀ KOB/ml’lik azalmanın ardından 4 saat boyunca bakteri sayısı sabit kalmış, devamında bakteri sayılarında genel olarak artış gözlenmiştir. 24. saate gelindiğinde kontrol grubu 8,7 log₁₀ KOB/ml değerlerine ulaşırken, sırasıyla MOI 10, 100 ve 1000 değerleri 6,8, 6,2 ve 6,7 log₁₀ KOB/ml değerlerini bulmuştur. Bakteri sayılarındaki en yüksek inhibisyon deney grubunda 16. saatte meydana gelmiştir. Bu azalmalar MOI 10, 100 ve 1000 için sırasıyla 3, 3,7 ve 3,3 log₁₀ KOB/ml olarak belirlenmiştir. Faj sayıları ise başlangıçta MOI 10, 100 ve 1000 değerlerinde sırasıyla 4,9, 5,7 ve 8 log₁₀ POB/ml olarak belirlenmiştir. MOI 10 için 12., MOI 100 için 6. ve MOI 1000 için 8. saate kadar faj sayılarında genel olarak bir artış yaşanmış, ardından her bir grupta 16. saate kadar sayı azalarak devam etmiştir. Son durumda faj sayıları MOI 10, 100 ve 1000 için 8,4, 7,4 ve 7 log₁₀ POB/ml değerlerine ulaşmıştır.

(a)



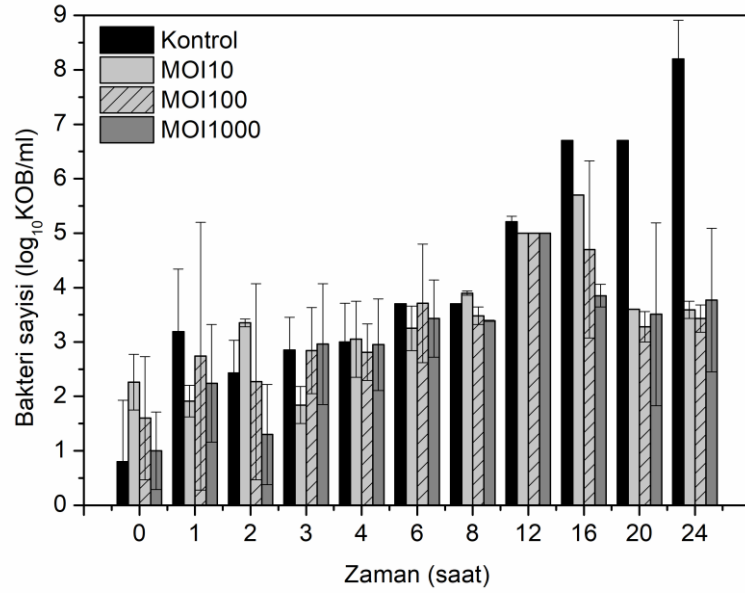
(b)



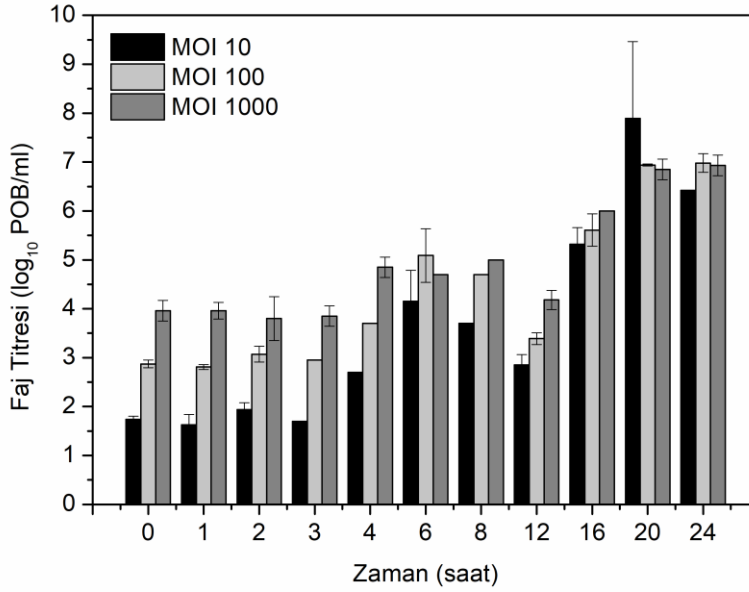
Şekil 4. 19. 25°C’de yüksek inokülasyon miktarlarında, steril yağsız süt örneklerinde *E. coli* K-12 bakterisi (a) ve faj (b) sayılarındaki değişimler.

25°C’de yapılan faj etkinlik deneyleri düşük inokülasyon derecelerinde de tekrarlanmıştır (Şekil 4.19) Burada başlangıçta 1-2 log₁₀ KOB/ml bakteri inoküle edilmiştir ve 24 saat boyunca bakteri ve faj sayılarındaki değişim takip edilmiştir. 24 saatin sonunda kontrol grubu bakteri sayısı 8,2 log₁₀ KOB/ml’ye ulaşırken sırasıyla MOI 10,100 ve 1000 değerlerinde bakteri sayısı 3,59, 3,43 ve 3,77 log₁₀ KOB/ml olarak saptanmıştır. Deney grubunda faj ile en yüksek bakteri inhibisyonu 24.saatte gözlenmiştir. Faj titreleri ise 6,5-7 log₁₀ POB/ml’ye ulaşmıştır.

(a)



(b)



Şekil 4. 20. 25°C’de düşük inokülasyon miktarlarında, steril yağsız süt örneklerinde *E. coli* K-12 bakterisi (a) ve faj (b) sayılarındaki değişimler.

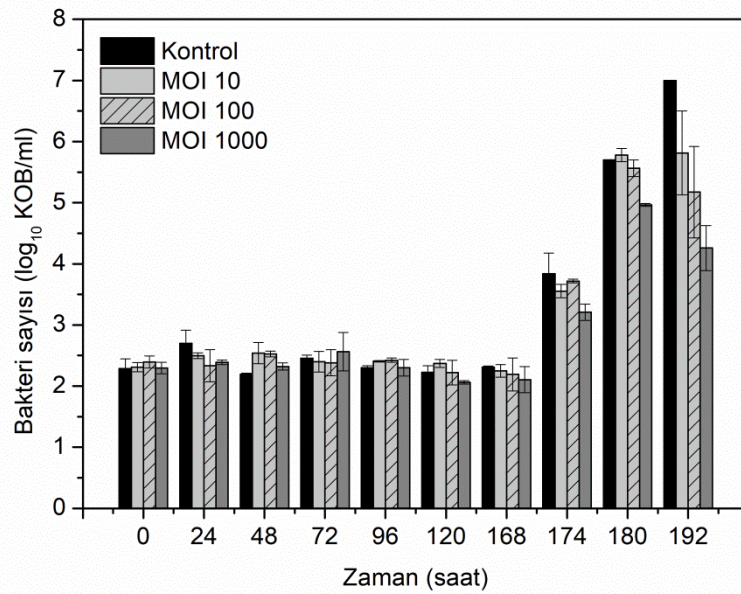
4°C’de bakteriyofaj etkinliğinin belirlenmesi amacıyla MOI 10, 100 ve 1000 değerlerindeki deney grubu ve faj ilavesi olmayan kontrol grubu UHT süt örnekleri 7 gün boyunca takip edilmiştir. En yüksek bakteri eliminasyonu 7. günde MOI 1000 değerinde 0,2 log₁₀ KOB/ml olarak belirlenmiştir.

4.3.3. Soğuk Zincirin Kırılması

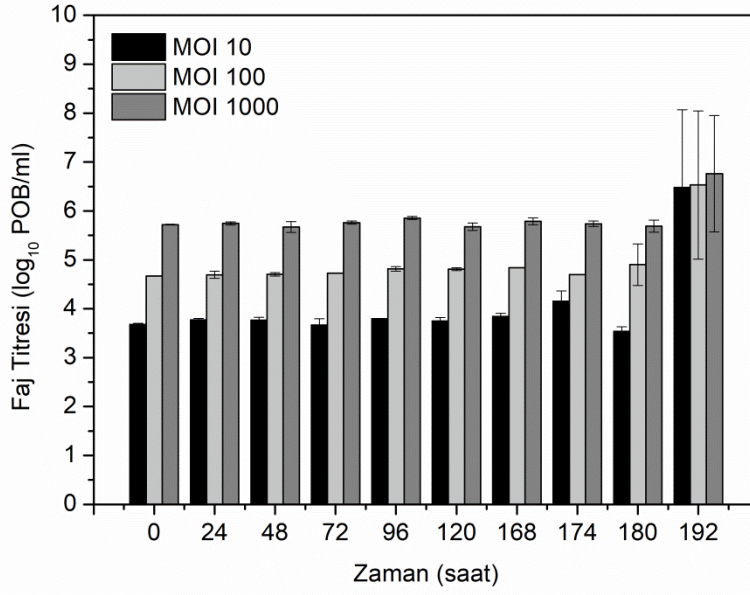
Son olarak 7 gün boyunca 4°C’de muhafaza edilen faj ilavesi olan ve olmayan kontamine UHT süt örnekleri ile soğuk zincirin kırılması koşulundaki faj inhibisyon aktivitesi araştırılmıştır. Soğuk muhafazadan sonra 25 ve 37°C koşullarında inkübe edilen örneklerin faj ve bakteri değerlerindeki değişimler aşağıdaki grafiklerde verilmiştir. 25°C’ye geçişte en yüksek bakteri eliminasyonu 24. saatte gözlenmiştir. MOI 10, 100 ve 1000 değerlerinde sırasıyla 1,2, 1,8 ve 2,7 log₁₀ KOB/ml bakteri eliminasyonu sağlanmıştır. 4°C’de 7 gün inkübasyonda bakterilerin düşük sıcaklıkta üreme faaliyetlerinin azalması sebebiyle bakteri sayısında değişim oldukça düşüktür. Bakteri sayısına bağlı olarak faj sayısında da değişim gözlenmemiştir. Ancak soğuk

zincirin kırılması ile birlikte ilk 6. saatte bakteri sayıları tüm gruplarda 1-2 log₁₀ KOB/ml artış gösterirken faj sayıları ilk 12 saat boyunca çok az değişim göstermiştir. 24. saatte faj sayılarındaki artışı takiben kontrol grubuna kıyasla deney grubu bakterilerinde azalma gözlenmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda soğuk zincirin modellenmesinin yapılması amacıyla 10, 22, 25 ve 28°C gibi sıcaklıklarda faj aktiviteleri test edilmiş ve bakteri inhibisyonunu sağladığı gözlenmiştir. Soğuk zincirin kırılması durumunu simüle eden bir çalışmada 37°C’de sütte faj aktivitesi verilmiş ve 22°C’de soğuk zincirin kırılması durumundaki faj aktivitesi 30 saatlik bir zaman diliminde verilmiştir [54]. Ancak bu çalışma ile öncelikle birçok çalışmada da yapıldığı gibi 25°C’de 24 saat boyunca bakteri sayısındaki değişim ve faj aktivitesi takip edilmiştir. Devamında soğuk zincirin kırılması durumunda, 25°C’de 24 saatte faj ve bakteri değişimi izlenmiştir. Soğuk zincirin kırılması durumunda aynı MOI değerlerinde bakteri inhibisyonu azalmıştır. Bu çalışma ile ilk kez *E. coli* K-12 ile kontamine edilmiş sütlerde soğuk zincirin simüle edildiği sıcaklıklardaki faj etkinliği ve bakteri inhibisyonu ortaya koyulmuştur. Bu çalışma, süt ortamında bakteriyel stres ortamının aynı sıcaklık ve sürede bakteri inhibisyonunu etkilediğini göstermektedir. Her iki koşulda da fajlar bakteri eliminasyonunu sağlamaktadır. Bu durum fajların sütte biyokontrol ajanı olarak kullanımı ile bakteri sayısını azalttığını, bakteri sayısının artmasını sağlayan durumlarda fajların etkinliğinin arttığını göstermektedir.

(a)



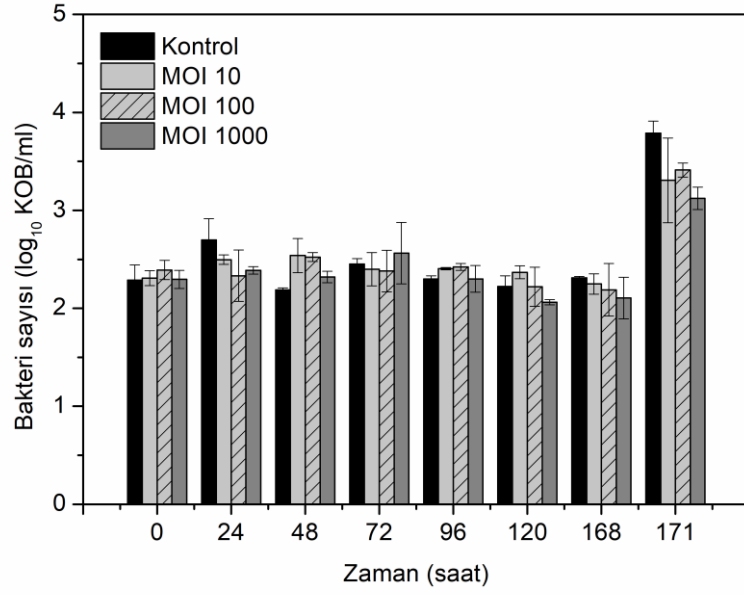
(b)



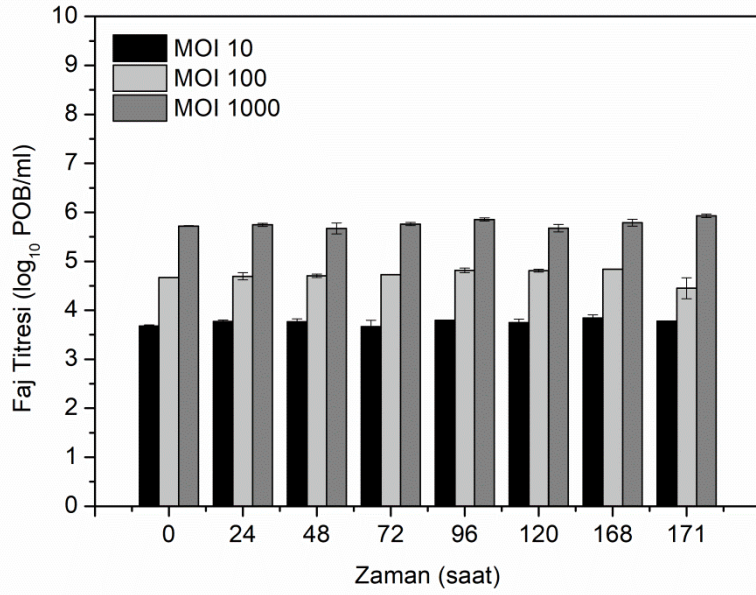
Şekil 4. 21. 4°C’de 7 gün boyunca bakteri (a) ve faj (b) sayıları ile sonraki 24 saatte 25°C’deki değişimi.

Ayrıca 4°C’den bakteri gelişiminin en yüksek olduğu 37°C’ye geçişte faj aktivitesi değişimi Şekil 4.22’de verilmiştir. 37°C’de 3.saatte kontrol grubunda 3,7 log₁₀ KOB/ml bakteri sayılmıştır. MOI 10, 100 ve 1000 değerlerinde ise *E. coli* K-12 sayısında sırasıyla 0,48, 0,38 ve 0,66 log₁₀ KOB/ml azalma sağlanmıştır. Bu durum stres koşulları altındaki bakterinin (4°C), 25 ve 37°C sıcaklıklara geçişte optimum koşulda daha hızlı gelişme sağlandığını göstermektedir. Faj sayısı ise genel olarak sabit kalmıştır.

(a)



(b)



Şekil 4. 22. Soğuk zincirdeki kırılma sonrası 37°C’de bakteri (a) ve faj (b) sayılarındaki değişim.

5. YORUM

Antibiyotik türlerinin gelişiminin yavaşlaması ve ADB'nin artmasından dolayı var olan antibiyotik gruplarının tedavilerde etkin sonuçlar verememesinden dolayı alternatif yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Antibiyotik tedavisine alternatif olarak geliştirilen yöntemlerden bir tanesi de faj terapidir. Bu tez çalışması kapsamında, faj terapinin patojen eliminasyonunda kullanımı araştırılmıştır.

Öncelikle çiğ süt örneklerinden on adet *E. coli* K-12'ye etkili faj izolasyonu gerçekleştirilmiş ve bu fajların kapsamlı karakterizasyonu yapılmıştır. İlk olarak, izole edilen fajlar saflaştırılmış ve uygulamaya hazır olması için titreleri zenginleştirilerek artırılmıştır. Bu fajlara ait konakçı skalası farklı türdeki bakteriler ile test edilmiştir. Yapılan bu testlerin sonuçlarına göre fajların monolitik olduğu, yalnızca *E. coli* K-12'ye etkili olduğu saptanmıştır.

Konakçı skalası belirlenen fajlar konsantre edilmiş ve DNA'ları izole edilmiştir. Bu faj DNA'ları RFLP yöntemi ile incelenmiş ve elde edilen jellerin görüntüsünden faydalanılarak birbirlerinden farklı olup olmadığı test edilmiştir. *HindIII* ve *KpnI* enzimlerinin spesifik kesim bölgeleri K12.2b ve K12.4a faj DNA'ları üzerinde olmadığı için fragment oluşturmamıştır. *EcoRI*, *EcoRV*, *XbaI* ve *XhoI* enzimleri ile kesimde ise fragment meydana gelmiştir. Farklı baz çifti uzunluğundaki fragmentler ve enzim kesiminden yararlanılarak dokuz adet faj altı gruba ayrılmıştır. K12.4b fajının fragment dizgesi belirgin olmadığı için bu gruplandırmaya dahil edilmemiştir. İki farklı grupta bulunan K12.2b ve K12.4a fajları ile karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla tek aşamalı gelişme eğrileri oluşturulmuş ve elde edilen verilerden latent dönem süresi ve patlama büyüklükleri hesaplanmıştır. Her iki faj için de latent dönem süresi ve patlama büyüklükleri birbirinden farklı olarak bulunmuştur. Ayrıca her iki faj için adsorpsiyon hız sabiti değerleri benzer olsa da K12.2b fajının % adsorpsiyon oranının K12.4a fajından daha düşük olduğu gözlenmiştir. Karakterizasyona pH ve sıcaklık stabiliteilerinin belirlenmesi ile devam edilmiştir. Tüm fajlar 30-60°C sıcaklıkta ve pH 5-9 aralığında stabiliteilerini korumuştur. K12.4a fajı pH 2 değerinde aktivite

göstermezken K12.2b fajında bu değerlerde de aktivite saptanmıştır. Her iki faj da 80°C’de aktivite göstermesine karşılık 90°C’de faj aktivitesi tespit edilebilir değerlerin altındadır. Bu durum faj miksinin 90°C ve üzerindeki sıcaklıklardaki 1 saatlik ısı işlem ile aktivitesini kaybettiğini ancak 80°C ve altındaki 1 saatlik ısı işlem sonrası aktivitesini devam ettirdiğini göstermektedir. Son olarak, konsantre edilmiş fajların morfolojik görüntülemesi yapılarak karakterizasyon çalışmaları sonlandırılmıştır. Çizelge 2.1’deki verilerden yararlanılarak ve kontraktıl kuyruk yapısı göstermesi sebebiyle fajların *Myoviridae* familyasına ait olduğu saptanmıştır. Böylelikle gıda uygulamalarında kullanılmak üzere karakterizasyonu tamamlanmış olan fajlar stoklanarak muhafaza edilmiştir.

Salmonella fajları ve karakterizasyonu tamamlanmış olan *E. coli* K-12 fajlarının etkinliği yağsız süt ortamında araştırılmıştır. 25°C’de 24 saatlik inkübasyonun sonunda ve yüksek bakteri inokülasyon miktarlarında *Salmonella* faj karışımı 1,9 log₁₀ KOB/ml bakteri eliminasyonu sağlarken *E. coli* K-12 faj karışımı 2,5 log₁₀ KOB/ml bakteriyi elimine etmiştir. *Salmonella* fajları için MOI değeri belirleyici olmazken *E. coli* K-12 fajları için belirleyicidir ve en etkin uygulama MOI 100 iken sağlanmıştır. Aynı inkübasyon koşullarında ve düşük bakteri inokülasyon miktarlarında ise *Salmonella* faj karışımı MOI 100 değerinde 3,5 log₁₀ KOB/ml bakteriyi ve *E. coli* K-12 faj karışımı MOI 100 iken 4,8 log₁₀ KOB/ml bakteriyi elimine etmiştir. Bu çalışmalar ile her iki tip bakteriye etkili olan faj karışımlarının da başlangıç bakteri yükünün 1-2 log₁₀ KOB/ml olduğu durumda daha etkili olduğu saptanmıştır. Bakteri yükünün artması faj etkinliğini olumsuz yönde etkilemektedir.

4°C’de yapılan denemelerde ve beş günlük periyotta *Salmonella* faj miksi *E. coli* K-12 faj miksinin oranla daha fazla eliminasyon sağlamıştır. Düşük sıcaklık değerinde bakteriyel metabolizma faaliyetlerinin yavaşlamasının da etkisiyle faj sayısı 5 günlük süre boyunca çok az değişmiştir. Düşük sıcaklıkta konak bakteri gelişiminin engellenmesi, faj titresinin sabit kalmasına yol açtığı için virülans etkinin düşük olmasına yol açmaktadır [40]. Bu durum, 25°C ile kıyaslandığında bakteri inhibisyonunun daha düşük olmasını açıklamaktadır. Ancak fajlar 4°C gibi düşük derecelerde dahi düşük miktarlarda da olsa eliminasyon sağlamaktadır. Sterilizasyon

sonrası kontaminasyonlara maruz kalmış veya sterilizasyon doğru uygulanmamış sütlerde, bu faj karışımları 4°C’de depolamada bakteri eliminasyonu sağlayabilir.

Bu çalışmalar kapsamında, soğuk zincirin kırılması durumunda *E. coli* K-12 faj karışımının bakteri inhibisyonuna etkisi de araştırılmıştır. 7 gün boyunca 4°C’de tutulan süt örneklerinde en yüksek bakteri eliminasyonu MOI 1000 değerinde sağlanmış olup 0,21 log₁₀ KOB/ml olarak belirlenmiştir. Soğuk zincirin 25°C ile kırılmasını takiben MOI 1000 değerinde 6. ve 12. saatlerde sırasıyla 0,63 ve 0,74 log₁₀ KOB/ml bakteri inaktivasyonu sağlanmıştır. 24. saatin sonunda, MOI 10, 100 ve 1000 değerlerinde sırasıyla 1,2, 1,8 ve 2,7 log₁₀ KOB/ml bakteri inaktivasyonu sağlanmıştır. Bu çalışma ile 25°C’de bakteriyel stresin bakteri eliminasyonuna etkisi ortaya koyulmuştur. Stres koşullarına maruz kalmış bakteride, aynı süredeki inkübasyonda faj etkinliği daha düşüktür. Ayrıca stres koşullarına maruz bırakılmamış grupta en etkin bakteri inaktivasyonu MOI 100 değerinde sağlanırken stres koşullarına maruz bırakılmış grupta MOI 1000 iken en etkin bakteri eliminasyonu sağlanmıştır. Enfeksiyona etki eden faktörlerden biri olan MOI değeri, bakteriyel stres koşullarından etkilenmiştir.

Bu tez ile birlikte *Salmonella* faj miksinin ve karakterizasyonu tamamlanmış *E. coli* K-12 faj miksinin süt uygulamalarındaki etkinliği test edilmiştir. Bunun yanı sıra, bakteriyel stres koşulunun faj etkinliğine etkisi ortaya koyulmuştur. Bakteriyel stres koşulu altında faj etkinliği azalma göstermiş olsa da 1,2-2,7 log₁₀ KOB/ml bakteri eliminasyonu sağlanabilmiştir. Miks oluştururken farklı formüller geliştirilerek etkin mikser tasarlanabilmektedir [83]. *E. coli* K-12 eliminasyonu amacıyla kullanılan faj miksi iki adet fajdan meydana gelmektedir. Bakteri eliminasyon etkinliğinin artırılması amacıyla literatürde belirtilen faj miksi tasarım yöntemlerinden yararlanılabilir.

Yağsız sütün 4°C’de muhafaza koşullarında faj etkinliği sabit kalsa da sütün oda sıcaklığına alındığı koşullarda bakteri artışı sınırlandırılmış, bu noktada faj uygulamasından etkin sonuçlar elde edilmiştir. Koliform bakteri bulaşısı olmuş süttten yapılan peynirlerde erken şişme sorunu gözlenmektedir ve bulaşı sonrası ilk 24 saat önem taşımaktadır. Literatürde süte faj uygulaması ile peynir yapımında bu bulaşılardan kaynaklanan erken şişme sorununun önlenmesi, istenmeyen gözenek ve deliklerin oluşumu gibi teknolojik kusurların önüne geçilmesi çalışılmıştır [61]. İlerleyen çalışmalarda bu faj mikserinin süttten üretilen ürünlerdeki bulaşılardan önüne geçmek, raf

ömrünün artırılmasını sağlamak ve ekonomik kayıpların önüne geçmek amacıyla yararlanılabilir. Önceki bölümlerde sunulan TÜİK verilerine göre süt fiyatlarında son beş yıldır artış meydana geldiği gözlenmiştir. Buna ek olarak artan nüfus ile gıda arzında yaşanabilecek artışlar, üretimden tüketime kadar gıda kayıplarının önüne geçmek için yapılması gereken müdahaleleri zorunlu kılmaktadır. Bakteriyofaj terapi son yıllarda yeniden gündeme gelen biyokontrol yöntemlerinden birisi olarak çeşitli alanlardaki araştırmacılar tarafından çalışılmaktadır. Tez kapsamında elde edilen veriler ile bakteriyofaj uygulama etkinliğine etki eden faktörlerin yağsız süt ortamında bakteri eliminasyonunu nasıl etkilediği üzerinde durulmuş ve yapılacak çalışmalar için kaynak niteliğinde bulgulara ulaşılmıştır. Bunun yanı sıra, bu çalışma ile literatürde ilk kez sütte *E. coli* K-12 bakterisinin eliminasyonunda stres koşulu altında ve stres koşulu olmadan yapılan faj etkinlik denemelerinin birbirinden farklılık gösterdiği ortaya koyulmuştur. Özellikle soğuk depolama koşullarında muhafaza edilen gıdalarda, gerçek koşulların simülasyonunda bakteriyel stresin faj etkinliğini etkilediği sonucunun göz önünde bulundurulması gerekmektedir. Bu tez kapsamında elde edilen veriler ile yağsız sütte değişen koşulların *Salmonella* ve *E. coli* K-12 bakterilerinin inhibisyonunu etkilese de faj mikslarının etkili olduğu ve bu bakterilerin biyokontrolü amacıyla kullanılacakları sonucuna ulaşılmıştır.

6. KAYNAKLAR

- [1] The Pew Charitable Trusts. A scientific roadmap for antibiotic discovery (The Pew Charitable Trusts, 2016), <https://www.pewtrusts.org/en/research-and-analysis/reports/2016/05/a-scientific-roadmapfor-antibiotic-discovery> (Erişim tarihi: **1 Mayıs 2022**).
- [2] Y.E. Gencay, L. Brøndsted, Bacteriophages for Biological Control of Foodborne Pathogens, in: M. P. Doyle, F. Diez-Gonzalez, C. Hill (Eds.) Food Microbiology: Fundamentals And Frontiers, ASM Press, Washington, DC, **2019**.
- [3] OPGA/WHO/FAO/OIE, At UN, global leaders commit to act on antimicrobial resistance, Collective effort to address a challenge to health, food security, and development, <http://who.int/mediacentre/news/releases/2016/commitment-antimicrobial-resistance/en/> (Erişim tarihi: **1 Mayıs 2022**).
- [4] M. Merabishvili, J.-P. Pirnay, K. Vogelee, D.J. Malik, Production of Phage Therapeutics and Formulations: Innovative Approaches, in: A. Górski, R. Międzybrodzki, J. Borysowski (Eds.) Phage Therapy: A Practical Approach, Springer International Publishing, Cham, **2019**.
- [5] M. Kutateladze, R. Adamia, Bacteriophages as Potential New Therapeutics to Replace or Supplement Antibiotics, Trends in Biotechnology, 28 (**2010**) 591-595.
- [6] C. Aranaga, L.D. Pantoja, E.A. Martínez, A. Falco, Phage Therapy in the Era of Multidrug Resistance in Bacteria: A Systematic Review, International Journal of Molecular Sciences, 23 (**2022**).
- [7] W.C. Summers, Bacteriophage Therapy, Annual Review of Microbiology, 55 (**2001**) 437-451.

- [8] K.E. Kortright, B.K. Chan, J.L. Koff, P.E. Turner, Phage Therapy: A Renewed Approach to Combat Antibiotic-Resistant Bacteria, *Cell Host & Microbe*, 25 (2019) 219-232.
- [9] R.W. Hendrix, Bacteriophages: Evolution of the Majority, *Theoretical Population Biology*, 61 (2002) 471-480.
- [10] B. Coffey, S. Mills, A. Coffey, O. McAuliffe, R.P. Ross, Phage and Their Lysins as Biocontrol Agents for Food Safety Applications, *Annual Review of Food Science and Technology*, 1 (2010) 449-468.
- [11] P.M. Sabour, M.W. Griffiths, *Bacteriophages in the Control of Food- and Waterborne Pathogens*, ASM Press, Washington, DC, 2010.
- [12] ICTV, Virus Taxonomy: The ICTV Report on Virus Classification and Taxon Nomenclature, https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/ (Erişim tarihi: **1 Mayıs 2022**).
- [13] H.W. Ackermann, A. Audurier, L. Berthiaume, L.A. Jones, J.A. Mayo, A.K. Vidaver, Guidelines for Bacteriophage Characterization, *Adv Virus Res*, 23 (1978) 1-24.
- [14] E. Kutter, R. Raya, K. Carlson, Molecular Mechanisms of Phage Infection, in: E. Kutter, A. Sulakvelidze (Eds.) *Bacteriophages: Biology and Applications*, CRC Press, Boca Raton, FL, 2004.
- [15] B. Guttman, R. Raya, E. Kutter, Basic Phage Biology, in: E. Kutter, A. Sulakvelidze (Eds.) *Bacteriophages: Biology and Applications*, CRC Press, Boca Raton, FL, 2004.
- [16] A.I.M. Switt, A. Sulakvelidze, M. Wiedmann, A.M. Kropinski, D.S. Wishart, C. Poppe, Y. Liang, *Salmonella* Phages and Prophages: Genomics, Taxonomy, and Applied Aspects, in: H. Schatten, A. Eisenstark (Eds.) *Salmonella: Methods and Protocols*, Humana Press, New York, NY, 2015.

- [17] Z. Erez, I. Steinberger-Levy, M. Shamir, S. Doron, A. Stokar-Avihail, Y. Peleg, S. Melamed, A. Leavitt, A. Savidor, S. Albeck, G. Amitai, R. Sorek, Communication Between Viruses Guides Lysis–Lysogeny Decisions, *Nature*, 541 (2017) 488-493.
- [18] M.C. García-Anaya, D.R. Sepulveda, A.I. Sáenz-Mendoza, C. Rios-Velasco, P.B. Zamudio-Flores, C.H. Acosta-Muñiz, Phages as Biocontrol Agents in Dairy Products, *Trends in Food Science & Technology*, 95 (2020) 10-20.
- [19] R. Tabla, B. Martínez, J.E. Rebollo, J. González, M.R. Ramírez, I. Roa, A. Rodríguez, P. García, Bacteriophage Performance against *Staphylococcus aureus* in Milk is Improved by High Hydrostatic Pressure Treatments, *International Journal of Food Microbiology*, 156 (2012) 209-213.
- [20] M. Müller-Merbach, K. Kohler, J. Hinrichs, Environmental Factors for Phage-induced Fermentation Problems: Replication and Adsorption of the *Lactococcus lactis* phage P008 as Influenced by Temperature and pH, *Food Microbiology*, 24 (2007) 695-702.
- [21] R. Derda, M.R. Lockett, S.K. Tang, R.C. Fuller, E.J. Maxwell, B. Breiten, C.A. Cuddemi, A. Ozdogan, G.M. Whitesides, Filter-based Assay for *Escherichia coli* in Aqueous Samples Using Bacteriophage-based Amplification, *Anal Chem*, 85 (2013) 7213-7220.
- [22] Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/food-safety> (Erişim tarihi: 1 Mayıs 2022).
- [23] European Commission (EC), Glossary: Pathogenic Organisms, http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/ (Erişim tarihi: 1 Mayıs 2022).
- [24] Center for Disease Control and Prevention (CDC), Foods That Can Cause Food Poisoning, <https://www.cdc.gov> (Erişim tarihi: 1 Mayıs 2022).
- [25] S.D. Manning, H. Babcock, *Escherichia coli* Infections, Infobase Publishing, New York, NY, 2010.

- [26] L. Rivas, G.E. Mellor, K. Gobius, N. Fegan, Detection and Typing Strategies for Pathogenic *Escherichia coli*, Springer New York, NY, **2015**.
- [27] E.F. Boyd, Bacteriophages and Bacterial Virulence, CRC Press, Boca Raton, FL, **2004**.
- [28] J.B. Kaper, J.P. Nataro, H.L.T. Mobley, Pathogenic *Escherichia coli*, Nature Reviews Microbiology, 2 (**2004**) 123-140.
- [29] D. Tomat, D. Mercanti, C. Balagué, A. Quiberoni, Phage Biocontrol of Enteropathogenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* during Milk Fermentation, Letters in Applied Microbiology, 57 (**2013**) 3-10.
- [30] S.K. McLean, L.A. Dunn, E.A. Palombo, Phage Inhibition of *Escherichia coli* in Ultrahigh-Temperature-Treated and Raw Milk, Foodborne Pathogens and Disease, 10 (**2013**) 956-962.
- [31] M.H. Tolba, A.M.S. Meshref, M.M.A. Zeinhom, Biocontrol of *Escherichia coli* O126:H7 in Skim Milk Using Bacteriophages, American Journal of Animal and Veterinary Sciences, 9 (**2014**).
- [32] M. Schmerer, I.J. Molineux, J.J. Bull, Synergy as a Rationale for Phage Therapy Using Phage Cocktails, PeerJ, 2 (**2014**) e590.
- [33] S.C. Ricke, J.R. Calo, Chapter 3 - Antibiotic Resistance in Pathogenic *Salmonella*, in: C.-Y. Chen, X. Yan, C.R. Jackson (Eds.) Antimicrobial Resistance and Food Safety, Academic Press, San Diego, **2015**, pp. 37-53.
- [34] P. Zinno, C. Devirgiliis, D. Ercolini, D. Ongeng, G. Mauriello, Bacteriophage P22 to Challenge *Salmonella* in Foods, International Journal of Food Microbiology, 191 (**2014**) 69-74.
- [35] R. Modi, Y. Hirvi, A. Hill, M.W. Griffiths, 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 (**2001**) 927-933.

- [36] E.K. Tayyarcan, S. Evran, P. Ari Akin, E. Acar Soykut, I.H. Boyaci, The Use of Bacteriophage Cocktails to Reduce *Salmonella enteritidis* in Hummus, *LWT*, 154 (2022) 112848.
- [37] W. Phongtang, G.-P. Choi, E. Chukeatirote, J. Ahn, Bacteriophage Control of *Salmonella typhimurium* in Milk, *Food Science and Biotechnology*, 28 (2019) 297-301.
- [38] H. Park, J. Kim, M. Kim, Y. Park, S. Ryu, Development of New Strategy Combining Heat Treatment and Phage Cocktail for Post-contamination Prevention, *Food Research International*, 145 (2021) 110415.
- [39] S.K. S, S.G. Bhat, In vitro Efficiency Evaluation of Phage Cocktail for Biocontrol of *Salmonella* spp. in Food Products, *Archives of Microbiology*, 203 (2021) 5445-5452.
- [40] C. Huang, S.M. Virk, J. Shi, Y. Zhou, S.P. Willias, M.K. Morsy, H.E. Abdelnabby, J. Liu, X. Wang, J. Li, Isolation, Characterization, and Application of Bacteriophage LPSE1 against *Salmonella enterica* in Ready to Eat (RTE) Foods, *Frontiers in Microbiology*, 9 (2018).
- [41] Y. Shang, Q. Sun, H. Chen, Q. Wu, M. Chen, S. Yang, M. Du, F. Zha, Q. Ye, J. Zhang, Isolation and Characterization of a Novel *Salmonella* Phage vB_SalP_TR2, *Frontiers in Microbiology*, 12 (2021).
- [42] P. Walstra, J.T. Wouters, T.J. Geurts, *Dairy Science and Technology*, CRC press, Boca Raton, FL, 2005.
- [43] R. Robinson, P. Itsaranuwat, *Dairy Microbiology Handbook: The Microbiology of Milk and Milk Products*, John Wiley & Sons, New York, NY, 2005, pp. 175-211.
- [44] L. Fernández, S. Escobedo, D. Gutiérrez, S. Portilla, B. Martínez, P. García, A. Rodríguez, Bacteriophages in the Dairy Environment: From Enemies to Allies, *Antibiotics*, 6 (2017) 27.

[45] Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Dairy and dairy products, In OECD-FAO agricultural outlook 2021-2030, <https://www.fao.org/> (Erişim tarihi: **1 Mayıs 2022**).

[46] Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Dairy market review - Emerging trends and outlook, December 2021, <https://www.fao.org/dairy-production-products/resources/publications/en/> (Erişim tarihi: **1 Mayıs 2022**).

[47] Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK), <https://www.tuik.gov.tr/> (Erişim tarihi: **1 Mayıs 2022**).

[48] National Center for Biotechnology Information (2022), PubChem Compound Summary for CID 6134, beta-Lactose, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/beta-Lactose> (Erişim tarihi: **1 Mayıs 2022**).

[49] D.S. Newburg, W.A. Walker, Protection of the Neonate by the Innate Immune System of Developing Gut and of Human Milk, *Pediatric Research*, 61 (**2007**) 2-8.

[50] J.A. Peterson, M. Hamosh, C.D. Scallan, R.L. Ceriani, T.R. Henderson, N.R. Mehta, M. Armand, P. Hamosh, Milk Fat Globule Glycoproteins in Human Milk and in Gastric Aspirates of Mother's Milk-Fed Preterm Infants, *Pediatric Research*, 44 (**1998**) 499-506.

[51] H. Schrotten, F.G. Hanisch, R. Plogmann, J. Hacker, G. Uhlenbruck, R. Nobis-Bosch, V. Wahn, Inhibition of Adhesion of S-fimbriated *Escherichia coli* to Buccal Epithelial Cells by Human Milk Fat Globule Membrane Components: a Novel Aspect of the Protective Function of Mucins in the non-Immunoglobulin Fraction, *Infection and Immunity*, 60 (**1992**) 2893-2899.

[52] R.H. Yolken, J.A. Peterson, S.L. Vonderfecht, E.T. Fouts, K. Midthun, D.S. Newburg, Human Milk Mucin Inhibits Rotavirus Replication and Prevents Experimental Gastroenteritis, *J Clin Invest*, 90 (**1992**) 1984-1991.

- [53] H. Schroten, Chemistry of Milk Mucins and Their Anti-Microbial Action, *Advances in Nutritional Research*, 10 (2001) 231-245.
- [54] P. García, C. Madera, B. Martínez, A. Rodríguez, J. Evaristo Suárez, Prevalence of Bacteriophages Infecting *Staphylococcus aureus* in Dairy Samples and Their Potential as Biocontrol Agents, *Journal of Dairy Science*, 92 (2009) 3019-3026.
- [55] M.C. García-Anaya, D.R. Sepulveda, C. Rios-Velasco, P.B. Zamudio-Flores, C.H. Acosta-Muñiz, Effect of Homogenization on Binding-affinity of Bacteriophage A511 in Bovine Milk Fractions, *Journal of Food Engineering*, 244 (2019) 73-79.
- [56] National Center for Biotechnology Information, PubChem Compound Summary for CID 5460048, Triglyceride, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Triglyceride> (Erişim tarihi: 1 Mayıs 2022).
- [57] A. Reddy, B. Manjula, K. Sudha, T. Jayaramudu, R. Sadiku, 7 Polyethylene/Other Biomaterials-Based Biocomposites and Bionanocomposites, 2016, pp. 279-314.
- [58] J. Porter, J. Anderson, L. Carter, E. Donjacour, M. Paros, In vitro Evaluation of a Novel Bacteriophage Cocktail as a Preventative for Bovine Coliform Mastitis, *Journal of Dairy Science*, 99 (2016) 2053-2062.
- [59] Y.-D. Lee, J.-H. Park, Characterization and Application of Phages Isolated from Sewage for Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 in biofilm, *LWT - Food Science and Technology*, 60 (2015) 571-577.
- [60] Y.-K. Li, H. Chen, M. Shu, C. Zhong, Y. Bi, H.-H. Yang, G.-P. Wu, Isolation, Characterization and Application of an Alkaline Resistant Virulent Bacteriophage JN01 against *Escherichia coli* O157:H7 in milk and beef, *LWT*, 144 (2021) 111266.
- [61] R. Tabla, A. Gómez, J.E. Rebollo, F. Molina, I. Roa, Effectiveness of a Bacteriophage Cocktail in Reducing Cheese Early Blowing Caused by *Escherichia coli*, *LWT*, 153 (2022) 112430.

- [62] S.S. Shahrabak, Z. Khodabandehlou, A.R. Shahverdi, M. Skurnik, H.-W. Ackermann, M. Varjosalo, M.T. Yazdi, Z. Sepehrizadeh, Isolation, Characterization and Complete Genome Sequence of PhaxI: a Phage of *Escherichia coli* O157:H7, *Microbiology*, 159 (2013) 1629-1638.
- [63] E.A. Rozema, T.P. Stephens, S.J. Bach, E.K. Okine, R.P. Johnson, K. Stanford, T.A. McAllister, Oral and Rectal Administration of Bacteriophages for Control of *Escherichia coli* O157:H7 in Feedlot Cattle, *J Food Prot*, 72 (2009) 241-250.
- [64] P.K. Montso, C.M. Mnisi, C.N. Ateba, V. Mlambo, An Assessment of the Viability of Lytic Phages and Their Potency against Multidrug Resistant *Escherichia coli* O177 Strains under Simulated Rumen Fermentation Conditions, *Antibiotics*, 10 (2021) 265.
- [65] B. Grygorcewicz, W. Chajęcka-Wierzchowska, A. Augustyniak, A. Wasak, X. Stachurska, P. Nawrotek, B. Dołęgowska, In-milk Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 by the Environmental Lytic Bacteriophage ECPS-6, *Journal of Food Safety*, 40 (2020) e12747.
- [66] S. Evran, E.K. Tayyarcı, E. Acar-Soykut, İ.H. Boyacı, Applications of Bacteriophage Cocktails to Reduce *Salmonella* Contamination in Poultry Farms, *Food and Environmental Virology*, 14 (2022) 1-9.
- [67] B. Sezer, E.K. Tayyarcı, İ.H. Boyacı, The Use of Bacteriophage-based Edible Coatings for the Biocontrol of *Salmonella* in Strawberries, *Food Control*, 135 (2022) 108812.
- [68] H. İlhan, E.K. Tayyarcı, M.G. Caglayan, İ.H. Boyacı, N. Sağlam, U. Tamer, Replacement of Antibodies with Bacteriophages in Lateral Flow Assay of *Salmonella enteritidis*, *Biosensors and Bioelectronics*, 189 (2021) 113383.
- [69] E. Acar Soykut, E.K. Tayyarcı, Ş. Evran, İ.H. Boyacı, İ. Çakır, M. Khaaladi, S. Fattouch, Microencapsulation of Phages to Analyze Their Demeanor in Physiological Conditions, *Folia Microbiologica*, 64 (2019) 751-763.

- [70] E. Acar Soykut, “*Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus bulgaricus* Virüilent Fajlarının Replikasyon Parametreleri, Kapsid Protein Profilleri ve Restriksiyon Endonükleaz Analizleri Esas Alınarak Tanımlanmaları ve Sınıflandırılmaları,” Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Müh. Ana Bilim Dalı Doktora Tezi, vol. 176, Ankara, **2007**.
- [71] P. Hyman, S.T. Abedon, Bacteriophage Host Range and Bacterial Resistance, *Adv Appl Microbiol*, 70 (**2010**) 217-248.
- [72] M.S. Islam, Y. Zhou, L. Liang, I. Nime, T. Yan, S.P. Willias, M.Z. Mia, W. Bei, I.F. Connerton, V.A. Fischetti, J. Li, Application of a Broad Range Lytic Phage LPST94 for Biological Control of *Salmonella* in Foods, *Microorganisms*, 8 (**2020**) 247.
- [73] Y. Yi, A.G. Abdelhamid, Y. Xu, A.E. Yousef, Characterization of Broad-host Lytic *Salmonella* Phages Isolated from Livestock Farms and Application against *Salmonella enteritidis* in Liquid Whole Egg, *LWT*, 144 (**2021**) 111269.
- [74] M.R.J. Clokie, A. Kropinski, Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions, Humana Press, Totowa, NJ, **2009**.
- [75] E.C.d. Nascimento, M.C. Sabino, L.d.R. Corguinha, B.N. Targino, C.C. Lange, C.L.d.O. Pinto, P.d.F. Pinto, P.M.P. Vidigal, A.S. Sant’Ana, H.M. Hungaro, Lytic Bacteriophages UFJF_PfDIW6 and UFJF_PfSW6 Prevent *Pseudomonas fluorescens* Growth in vitro and the Proteolytic-caused Spoilage of Raw Milk during Chilled Storage, *Food Microbiology*, 101 (**2022**) 103892.
- [76] M.S. Islam, Y. Hu, M.F. Mizan, T. Yan, I. Nime, Y. Zhou, J. Li, Characterization of *Salmonella* Phage LPST153 that Effectively Targets Most Prevalent *Salmonella* Serovars, *Microorganisms*, 8 (**2020**).
- [77] P.K. Litt, J. Saha, D. Jaroni, Characterization of Bacteriophages Targeting Non-O157 Shiga Toxigenic *Escherichia coli*, *Journal of Food Protection*, 81 (**2018**) 785-794.

- [78] S.T. Abedon, P. Hyman, C. Thomas, Experimental Examination of Bacteriophage Latent-period Evolution as a Response to Bacterial Availability, *Appl Environ Microbiol*, 69 (2003) 7499-7506.
- [79] López-Cuevas Osvaldo, C.-d. Campo Nohelia, León-Félix Josefina, González-Robles Arturo, Chaidez Cristóbal, Characterization of bacteriophages with a lytic effect on various *Salmonella* serotypes and *Escherichia coli* O157:H7, *Canadian Journal of Microbiology*, 57 (2011) 1042-1051.
- [80] Y.D. Niu, K. Stanford, A.M. Kropinski, H.-W. Ackermann, R.P. Johnson, Y.-M. She, R. Ahmed, A. Villegas, T.A. McAllister, Genomic, Proteomic and Physiological Characterization of a T5-like Bacteriophage for Control of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157:H7, *Plos One*, 7 (2012) e34585.
- [81] J. Maniloff, H.-W. Ackermann, A. Jarvis, Phage Taxonomy and Classification, in: A. Granoff, R.G. Webster (Eds.) *Encyclopedia of Virology* Elsevier, Oxford, 1999, pp. 1221-1228.
- [82] Y.-T. Liao, A. Salvador, L.A. Harden, F. Liu, V.M. Lavenburg, R.W. Li, V.C.H. Wu, Characterization of a Lytic Bacteriophage as an Antimicrobial Agent for Biocontrol of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O145 Strains, *Antibiotics*, 8 (2019) 74.
- [83] F. Molina, A. Simancas, M. Ramírez, R. Tabla, I. Roa, J.E. Rebollo, A New Pipeline for Designing Phage Cocktails Based on Phage-Bacteria Infection Networks, *Frontiers in Microbiology*, 12 (2021).