



**YOĞURT ÜRETİMİNDE SORUN OLUŞTURAN
BAKTERİYOFAJLARIN İZOLASYONU VE
KARAKTERİZASYONU**

Feyza ERKAN

Danışman: Prof. Dr. Bülent ÇETİN

Yüksek Lisans Tezi

Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı

2022

(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI

**YOĞURT ÜRETİMİNDE SORUN OLUŞTURAN BAKTERİYOFAJLARIN
İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU**

(Isolation and Characterization of Bacteriophages that Cause Problems in Yoghurt
Production)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Feyza ERKAN

Danışman: Prof. Dr. Bülent ÇETİN

Erzurum
Eylül, 2022

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Feyza ERKAN tarafından hazırlanan “Yoğurt Üretiminde Sorun Oluşturan Bakteriyofajların İzolasyonu ve Karakterizasyonu” başlıklı çalışması 06/09/2022 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Gıda Mühendisliği Bilim Dalında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Muhammet ARICI <i>Yıldız Teknik Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Danışman:	Prof. Dr. Bülent ÇETİN <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. Salih ÖZDEMİR <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır

Enstitü Yönetim
Kurulunun / ... /
tarih ve sayılı
kararı.

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN
Enstitü Müdürü
Aslı Islak İmzalıdır

Bu çalışma BAP projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: FYL-2021-9182

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek Lisans Tezi olarak Prof. Dr. Bülent ÇETİN danışmanlığında sunulan “Yoğurt Üretiminde Sorun Oluşturan Bakteriyofajların İzolasyonu ve Karakterizasyonu” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	5	30
Kuramsal Temeller	5	30
Materyal ve Yöntem	7	35
Araştırma Bulguları ve Tartışma	2	20
Sonuç ve Öneriler	0	20
Tezin Geneli	5	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Feyza ERKAN	Prof. Dr. Bülent ÇETİN
8.9.2022	8.9.2022
İmza: Aslı Islak İmzalıdır	İmza: Aslı Islak İmzalıdır

* Tez ile ilgili YÖKTEZ'de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☐ Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmamın oluşturulması, yürütülmesi ve değerlendirilmesi aşamasında engin bilgi birikiminden faydalandığım, her daim önerileri ile yol gösteren, sabır, hoşgörü ve ilgi ile yardım ve desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Bülent ÇETİN’e

Çalışmalarım süresince bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yardımlarını esirgemeyen kıymetli hocalarım Arş. Gör. Hacer MERAL AKTAŞ ve Arş. Gör. Haktan AKTAŞ’a

Proje kapsamında, FYL-2021-9182 numaralı, “Yoğurt Üretiminde Sorun Oluşturan Bakteriyofajların İzolasyonu ve Karakterizasyonu” adlı tez çalışmamı destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimine,

Hayatımın her aşamasında, maddi ve manevi desteğini ve sevgisini her zaman hissettiğim anneme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Feyza ERKAN

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YOĞURT ÜRETİMİNDE SORUN OLUŞTURAN BAKTERİYOFAJLARIN İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU

Feyza ERKAN

Danışman: Prof. Dr. Bülent ÇETİN

Amaç: Çalışmada, *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* fajlarının izolasyonu ve karakterizasyonu gerçekleştirilmeye çalışılmıştır.

Yöntem: Erzurum ve çevre illerden temin edilen 57 çiğ süt, 20 ev tipi yoğurt, 21 endüstriyel yoğurt, 4 peyniraltı suyu ve 5 adet fabrika gideri olmak üzere toplamda 107 numune bakteriyofaj izolasyonu amacı ile kullanılmıştır. İlgili numuneler ile 46 adet konakçı kültür kullanılarak faj izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Faj izolatları TEM, RAPD-PCR, Klasik PCR ve HRM işlemleri ile morfolojik ve moleküler olarak karakterize edilmiş, fajların konakçı özgüllüğü belirlenmiştir. Konakçı kültürleri Mitomisin C, UV ışını ve sıcaklık uygulanarak lizojen suş varlığı araştırılmıştır.

Bulgular: Çalışmada, 10 adet *Streptococcus thermophilus* fajı izole edilmiş ancak *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* fajı izole edilememiştir. TEM ile görüntülenen tüm fajların Siphoviridae familyasına ait olduğu görülmüştür. DNA paketleme mekanizmasına göre 9 adet fajın cos grubuna, 1 adet fajın hiçbir gruba dahil olmadığı bulunmuştur. Fajlar, RAPD-PCR’de kullanılan P1 ve OPL5 primerine göre 4 grup, P2 primerine göre 2 grup oluşturmuştur. HRM işlemine göre ise fajların 4 gruba ayrıldığı görülmüştür. Lizojen varlığı test edilen hiçbir *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* suşunda profaja rastlanmamıştır.

Sonuç: Ülkemizde yoğurt üretiminde kullanılan suşlara yönelik faj çalışmalarının oldukça kısıtlı olduğu görülmektedir. Çalışma çerçevesinde elde edilen faj kültür koleksiyonunun bu yönüyle önemli bir kazanım olduğu görülmektedir. Ayrıca faj karakterizasyonuna katkı sağlaması açısından HRM metodunun kullanılabilir olduğu görülmüştür.

Anahtar kelimeler: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, bakteriyofaj, yoğurt, izolasyon, karakterizasyon

Eylül 2022, 89 sayfa

ABSTRACT

MASTER'S THESIS

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF BACTERIOPHAGES THAT CAUSE PROBLEM IN YOGHURT PRODUCTION

Feyza ERKAN

Supervisor: Prof. Dr. Bülent ÇETİN

Purpose: In the study, it was aimed that isolation and characterization of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* phages were carried out.

Method: A total of 107 samples were used, including 57 raw milk, 20 homemade yoghurts, 21 industrial yoghurts, 4 whey and 5 factory drainages provided from Erzurum and surrounding provinces, were used for bacteriophage isolation. In the samples, phage isolation was performed using 46 host cultures. Phage isolates were morphologically and molecularly characterized by TEM, RAPD-PCR, Classical PCR and HRM analyse, and the host specificity of phages was determined. The presence of lysogenic strains was investigated by applying Mitomycin C, UV and temperature to the host cultures.

Findings: In the study, 10 *Streptococcus thermophilus* phages were isolated, but *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* phage could not be isolated. All phages imaged by TEM were found to belong to the Siphoviridae family. According to the DNA packaging mechanism, 9 phages were found to be included in the cos group, and 1 phage was not in any group. Phages formed 4 groups according to P1 and OPL5 primer, and 2 groups according to P2 primer used in RAPD-PCR. According to the HRM process, it was observed that the phages were divided into 4 groups. Prophage was not found in any of the *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* strains tested for lysogenic presence.

Results: In our country, it is seen that phage studies on strains used in yogurt production are quite limited. Thus it is seen that phage culture collection obtained in this study is an important achievement. On the other hand, it was seen that the HRM method can be used in terms of contributing to phage characterization.

Keywords: bacteriophage, yoghurt, isolation, characterization

September 2022, 89 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ.....	ix
GİRİŞ.....	1
KURAMSAL TEMELLER.....	5
MATERYAL VE YÖNTEM	29
Materyal	29
Metot	33
Konakçı Kültürlerin Hazırlanması	33
Fajların Ön Saflaştırılması ve İzolasyonu	34
Faj Varlığının Belirlenmesi	34
Fajın Saflaştırılması.....	35
Fajın Zenginleştirilmesi.....	35
Titre Belirleme.....	35
Konakçı Özgüllüğünün Belirlenmesi	36
Bakteriyofaj Karakterizasyonu	36
Lizogen Suş Varlığının Belirlenmesi	39
İstatistiksel Analizler	40
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	41
Faj İzolasyonu ve Zenginleştirilmesi.....	41
Konakçı Özgüllüğünün Belirlenmesi.....	45
Bakteriyofaj İzolatlarının Karakterizasyonu.....	47
Lizogen Suş Varlığının Belirlenmesi.....	56
SONUÇ VE ÖNERİLER	66
KAYNAKLAR.....	68
ÖZGEÇMİŞ.....	76

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 1. Ackermann sınıflandırması.....	9
Tablo 2. Çalışmada kullanılan numune ve temin edildiği yer	29
Tablo 3. Çalışmada kullanılan suş ve kodları	32
Tablo 4. Çalışmada kullanılan 4 farklı DNA paketleme bölgesi primerleri ve özellikleri	38
Tablo 5. Faj izolasyonunun gerçekleştirildiği konakçı hücre ve numuneler	42
Tablo 6. Çalışmada elde edilen fajlar ve zenginleştirme sonrası titre değerleri	45
Tablo 7. Bakteriyofaj izolatlarının <i>Streptococcus thermophilus</i> konakçı özgüllüğü.....	46
Tablo 8. Bakteriyofaj izolatlarının <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> konakçı özgüllüğü	46
Tablo 9. Bakteriyofaj izolatlarının boyutları	49
Tablo 10. RAPD ve HRM analizler sonuçlarına göre fajların gruplandırılması	56
Tablo 11. Farklı konsantrasyonlarda MMC ile indüklenen <i>Streptococcus thermophilus</i> 43S1 suşunun absorbans değerleri	57
Tablo 12. Farklı konsantrasyonlarda MMC ile indüklenen <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> 12M2 suşunun absorbans değerleri	58
Tablo 13. Farklı sürelerde UV ışını ile indüklenen <i>Streptococcus thermophilus</i> S42 suşunun absorbans değerleri	60
Tablo 14. Farklı sürelerde UV ışını ile indüklenen <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> 8M6 suşunun absorbans değerleri	61
Tablo 15. Sıcaklık uygulaması ile indüklenen dört farklı <i>Streptococcus thermophilus</i> suşlarının absorbans değerleri	62
Tablo 16. Sıcaklık uygulaması ile indüklenen dört farklı <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> suşlarının absorbans değerleri	63
Tablo 17. Farklı karakterizasyon analiz sonuçlarına göre bakteriyofaj izolatlarının gruplandırılması.....	65

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Tipik bir bakteriyofaj yapısı.....	6
Şekil 2. Bakteriyofaj yaşam döngüleri	7
Şekil 3. Bradley sınıflandırması	8
Şekil 4. İki aşamalı HRM-PCR	12
Şekil 5. Şekil 4'deki HRM işlemi için oluşturulan türev grafiği	13
Şekil 6. HRM verilerinin PCA analizi ile değerlendirilmesi	14
Şekil 7. Denemede kullanılan süt örnekleri.....	34
Şekil 8. Fajların ilk belirlenmesi aşamasında konakçı hücreye (<i>Streptococcus thermophilus</i> ST5) etki eden ve muhtemel faj varlığı saptanan numuneler (77,78 ve 79).....	42
Şekil 9. ST5-77 fajına ait saflaştırma işleminde M17 besiyerinde gözlenen plaklar	43
Şekil 10. ST5-94B ve ST5-77 fajlarının zenginleştirme işlemine ait besiyeri ve plakları.....	44
Şekil 11. ST5-77 ve ST5-79 fajlarına ait 2. zenginleştirme plakları.....	44
Şekil 12. Çalışmada izole edilen bakteriyofajlara ait TEM görüntüleri.....	48
Şekil 13. Bakteriyofaj izolatlarına ait P1 primer RAPD-PCR agaroz jel görüntüsü.....	50
Şekil 14. Bakteriyofaj izolatlarına ait P2 primer RAPD-PCR agaroz jel görüntüsü.....	51
Şekil 15. Bakteriyofaj izolatlarına ait OPL5 primer RAPD-PCR agaroz jel görüntüsü	52
Şekil 16. DNA paketleme mekanizması açısından faj izolatlarının değerlendirilmesi.....	53
Şekil 17. Faj izolatlarının iki aşamalı HRM-PCR işlemi	54
Şekil 18. HRM verilerinin PCA analizi ile değerlendirilmesi	55
Şekil 19. Farklı konsantrasyonlarda MMC uygulamasının <i>Streptococcus thermophilus</i> 43S1 suşunun gelişimi üzerine etkisi.....	58
Şekil 20. Farklı konsantrasyonlarda MMC uygulamasının <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> 12M2 suşunun gelişimi üzerine etkisi	59
Şekil 21. Farklı sürelerde UV ışını uygulamasının <i>Streptococcus thermophilus</i> S42 suşunun gelişimi üzerine etkisi.....	60
Şekil 22. Farklı sürelerde UV ışını uygulamasının <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> 8M6 suşunun gelişimi üzerine etkisi	61
Şekil 23. Sıcaklık ile indüksiyon uygulamasının <i>Streptococcus thermophilus</i> suşlarının gelişimi üzerine etkisi.....	62
Şekil 24. Sıcaklık ile indüksiyon uygulamasının <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> suşlarının gelişimi üzerine etkisi	63

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

Abi	: Abortive Infection (Abortif Enfeksiyon)
ATCC	: American Type Culture Collection (Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu)
BREX	: Bacteriophage Exclusion (Bakteriyofaj Dışlama)
CRISPR-Cas	: Clustered regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR Associated Proteins (Kümelenmiş Düzenli Aralıklı Kısa Palindromik Tekrarlar)
DAYTAM	: Doğu Anadolu İleri Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi
DISARM	: Defence Island System Associated with Restriction-Modification (Restriksiyon-Modifikasyonla İlişkili Savunma Adası Sistemi)
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DVI	: Direct Vat Inoculation (Doğrudan kültür İnokülasyonu)
HRM	: High Resolution Melting (Yüksek Çözünürlüklü Erime)
HTST	: High Temperature Short Time (Yüksek Sıcaklık- Kısa Süre)
ICTV	: International Committee on Taxonomy of Viruses (Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi)
LAB	: Laktik Asit Bakterileri
LTLT	: Low Temperature-Long Time (Düşük Sıcaklık-Uzun Süre)
MMC	: Mitomycin C (Mitomisin C)
MRS	: de Man, Rogosa, Sharpe
PARIS	: Phage Anti-Restriction- Induced System (Faj Anti Restriksiyon İndüklenmiş Sistem)
PCA	: Principal Component Analysis (Temel Bileşen Analizi)
qPCR	: quantitative Polymerase Chain Reaction (Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
RAPD	: Random Amplified Polymorphic DNA (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA)
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism (Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi)
RM	: Restriction Modification (Restriksiyon Modifikasyon)
rRNA	: Ribozomal Ribonükleik Asit
RT-PCR	: Real Time Polymerase Chain Reaction (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
Sie	: Superinfection Exclusion (Süperenfeksiyon Dışlama)

TEM	: Transmission Electron Microscopy (Transmisyon Elektron Mikroskobu)
TGK	: Türk Gıda Kodeksi
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
UV	: Ultraviyole
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
cm	: Santimetre
ddH₂O	: Çift Distile Su
dH₂O	: Distile Su
dk	: Dakika
g	: Gram
kb	: Kilobaz
kDa	: Kilodalton
kV	: Kilovolt
m³	: Metreküp
MgSO₄	: Magnezyum Sülfat
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
NaCl	: Sodyum Klorür
nm	: Nanometre
°C	: Santigrat Derece
pob	: Plak Oluşturan Birim
rpm	: Revolutions Per Minute (Dakikadaki Devir Sayısı)
s	: Saniye
TiO₂	: Titanyum Dioksit
V	: Volt

GİRİŞ

Nobel Ödüllü ilk virolog Wendell Stanley “Virüsler, yaşamın sırrının anahtarını elinde tutuyor: Biyolojik evrimden kanserin çözümüne, kalıtımın anlaşılmasından kontrolüne her şey virüslere bağlı, belki de, dünyanın geleceğindeki tüm yaşamı onlar belirleyecek.” demiştir. Rybicki (1990) virüsleri, canlılığı açısından yaşamın kıyısındaki organizmalar olarak tarif etse de bu durum birçok mikrobiyolog ve filozofun araştırma konusu haline gelmiştir (Farnsworth 2021). Virüsler; bitkileri, hayvanları, bakterileri, algleri, arkeaları kısacası her türlü yaşam formunu enfekte edebilmektedir (Özdoğan 2021). Özellikle bakterileri enfekte eden virüsler; bakteriyofajlar, geçmişten günümüze önem arz etmektedir. Yeryüzünün en bol biyolojik varlıkları olan fajların sayısının 10^{30} 'dan fazla olduğu tahmin edilmekle birlikte günümüzde hala yeni türleri keşfedilmektedir (Nikolich and Filippov 2020).

Bakteriyofajlar, çeşitli etkileriyle hayatımızda yer almaktadır. Özellikle yaşamın temel ihtiyaçları olan gıda ve sağlık sektörü açısından önemi tartışılmaz bir gerçektir. Sağlık alanındaki uygulamalar incelendiğinde bakteriyofajların, faj tedavisi adı altında çeşitli patojen bakterilere karşı terapötik ajan olarak kullanıldığı görülmektedir. Bakteriyofajlar bu alanda ilk olarak, Felix d'Herelle tarafından 1919'da dizanteriyi tedavi etmek amacıyla 12 yaşındaki bir çocuk üzerinde uygulanmış ve tedavi süreci başarıyla sonuçlanmıştır. Buna benzer çalışmalardan elde edilen olumlu sonuçlar fajları, antibiyotiklere karşı umut vaat edici bir alternatif olarak ortaya çıkarmaktadır. Güvenli gıda üretimi amacıyla başvuru pastörizasyon, yüksek basınç uygulamaları, ısınlama ve kimyasal dezenfeksiyon gibi yaygın olarak kullanılan işlemler mikrobiyal yükü farklı oranlarda azaltmanın yanı sıra gıdanın normal florasındaki mikroorganizmaları da hedef almaktadır. Ayrıca ilgili tekniklerin uygulanması ile ürünlerin görünümü, besin içeriği ve organoleptik özellikleri olumsuz etkilenebilmekte ve kullanılan kimyasallar ekipmanları aşındırabilmektedir. “Bakteriyofaj biyokontrolü” bu anlamda önem kazanmaktadır (Sulakvelidze *et al.* 2001; Moye *et al.* 2018). Bakteriyofajların, bakteriye spesifik olması, dolayısıyla yalnızca hedeflenen patojeni enfekte edip insan ve gıda mikrobiyotasındaki ikincil bir enfeksiyon riskini azaltması, nispeten ucuz ve hızlı bir uygulama olması dikkatleri üzerine çekmiştir (Sulakvelidze *et al.* 2001).

Faj kullanımının bir dizi olumlu etkilerinin yanı sıra varlıklarının ciddi problemlere yol açtığı durumlar da mevcuttur. Standart kalitede, güvenli gıda üretiminde önemli rol oynayan starter kültürlerin kullanımı, faj bulaşmalarını da beraberinde getirmiştir. Starter kültürlerin faj

tarafından enfekte olması; fermantasyon süresinin uzamasına ve fermente ürünlerde düşük proteoliz ve laktoz hidrolizine yol açmaktadır. Böylece arzu edilen tat bileşikleri ve tekstür oluşamamakta dolayısıyla yoğurt, peynir ve turşu gibi çokça tüketilen fermente gıdaların üretimini sekteye uğratmaktadır (Quiberoni *et al.* 2006).

Fermente gıdalar içerisinde özellikle yoğurt, binlerce yıldır beslenmede önemli bir yer edinmiştir. Yüksek besleyici değeri, bağışıklık sistemini güçlendirici etkisi ve sindirim sistemi üzerindeki düzenleyici faaliyetinden dolayı fonksiyonel bir gıda olarak kabul edilmektedir (Hökelekli 2021). Ülkemizde yoğurt üretimi, süt ürünleri üretiminde ilk sırada yer almaktadır (TÜİK 2022).

Bilindiği üzere yoğurt üretiminde *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* homofermantatif laktik asit bakterileri (LAB) starter kültür olarak kullanılmaktadır. Bu iki bakteri arasında simbiyotik bir ilişki söz konusudur; ihtiyaç duydukları gelişme faktörlerini birbirlerinin faaliyeti sonucu karşılamaktadırlar. *Streptococcus thermophilus*'un ürettiği formik asit ve üre metabolizması sırasında ürettiği CO₂ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*'un gelişimini teşvik etmektedir. Proteolitik kapasitesi nispeten yüksek olan *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*'un ürettiği aminoasitler ise proteolitik aktivitesi düşük olan *Streptococcus thermophilus* tarafından kullanılmaktadır. Bu iki bakterinin aktivitesi sonucunda sütün pH'sı 6,3-6,5'ten 4,6'nın altına düşmektedir (Aktaş 2018). Ayrıca bu mikroorganizmaların faaliyetleri, üründe arzu edilen tat, aroma ve tekstürün oluşmasında önemli bir rol oynamaktadır. Yoğurt üretiminde kullanılan bu starter kültürlerin faj tarafından enfekte olması ile birlikte fermantasyon süresinin uzaması ve üründe düşük proteoliz ve laktoz hidrolizi görülmektedir. Ayrıca kullanılan starter kültürlerde görülen lizojeni, önemli bir faj kontaminasyon kaynağıdır. Dolayısıyla rotasyonda kullanılacak starter kültürlerin lizojen varlığı test edilmelidir (Quiberoni *et al.* 2006).

Uluslararası literatür ile mukayese edildiğinde ülkemizde *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ve nispeten *Streptococcus thermophilus* fajları ile ilgili çalışmaların sınırlı olduğu görülmüştür. Bu durum, yoğurt ve ayran gibi ülkemiz açısından önemli ürünlerimizden fajların izole edilmesi, tanımlanması ve arzu edilen nitelikte starter kültürlerin geliştirilmesine yönelik çalışmalara ihtiyaç olduğunu göstermektedir.

Diğer mikroorganizmalar ile mukayese edildiğinde fajlar, katı ve sıvı besiyerinde doğrudan geliştirilememesi ve özel hücrelere (kültür) ihtiyaç duyması nedeniyle çalışılması daha zordur. Öte yandan hücresel yapılarının küçüklüğü de morfolojik incelemeler için elektron mikroskobu gibi özel ve pahalı cihazlara ihtiyaç göstermektedir. Genellikle morfolojik

inceleme, sınıflandırma açısından yeterli veri sunmamaktadır. Virüs ve faj karakterizasyonunda günümüzde daha çok genetik temelli metotlar kullanılmaktadır. Ancak mevcut metotlar ile virüs saflaştırma ve DNA izolasyonunun zorluğu, genomik materyalin genel moleküler testler için uygun olmaması nedeniyle karakterizasyonda sorunlar yaşanmaktadır (Comeau *et al.* 2004).

Belirtildiği üzere fajların çeşitliliğinin ortaya konulması bakteri ve mayalarda olduğu gibi kolay ve standart olarak yapılamamaktadır. Örneğin 16S rRNA metodu ile bakterilerde cins ve tür seviyesinde tanı yapılabilir. Bu tanı da; ilgili suş açısından birçok veri, doğrudan ve dolaylı olarak elde edilebilmektedir (Gevers *et al.* 2001). Oysa virüslerde, tüm virüs gruplarını kapsayacak evrensel bir metot bulunmamaktadır. Bu nedenle virüslerde karakterizasyon çalışmaları çeşitliliğin ortaya konulmasında özel öneme sahiptir (Ackermann 2009b). Bu amaçla en çok kullanılan metotlar; elektron mikroskobu ile görüntüleme (TEM), konakçı özgüllüğünün belirlenmesi, RFLP ve RAPD gibi genom analiz metotları, klasik ve Multipleks PCR gibi genetik temelli yöntemlerdir (Samson and Moineau 2013).

Fajlar, elektron mikroskobunda incelenen ilk virüsler arasında yer almaktadır. Transmisyon elektron mikroskobu (TEM), örneklerin görüntülenmesi amacıyla ilk kez 1940'ların başında kullanılmaya başlanmış ve günümüzde birçok hücrede kullanılan önemli bir teknoloji haline gelmiştir. TEM ile elektron ışınının kısa dalga boyu sayesinde nanometre altı çözünürlük elde edilebilmektedir. Böylece fajların kapsid büyüklüğü ve kuyruk uzunluğu saptanabilmektedir (Williamson *et al.* 2011; Ackermann 2012; Winey *et al.* 2014).

Teorik olarak faj karakterizasyonunda kullanılabilecek bir diğer parametrenin konakçı özgüllüğünün belirlenmesi olduğu düşünülmektedir. Ancak ilgili verilerin kısıtlılığı konakçı aralığına göre sınıflandırmayı sınırlı kılmaktadır.

Streptococcus thermophilus fajları, DNA paketleme mekanizmasına göre uzun bir süre cos ve pac olmak üzere iki grupta incelenmekteydi. Yapılan çalışmalar ışığında ilgili gruplardan farklı özelliklere sahip 5093, 987 ve P728 grupları da ortaya çıkmıştır. Bu grupların varlığını belirlemek için farklı primer setleri tasarlanarak fajlar karakterize edilebilmektedir (Hanemaaijer *et al.* 2021).

Birçok mikroorganizma grubunda olduğu gibi tüm genomun taranabildiği GTG₅ ve M13 benzeri primerler kullanılarak ampikon farklılıklarına göre izolat sınıflandırılmasının bakteriyofajlar için de yapılabilirliği araştırılmıştır. Bakteri ve maya çeşitliliğinin belirlenmesinde olduğu kadar yaygın olmamakla beraber P1, P2, OPL5, RAPD-5, Primer 1, Primer 2, Primer 3, Primer 4, Primer 5, Primer 6, Primer A, Primer B, OPA-11, OPB-11, OPC-

08, OPC-20, OPD-03, OPD-05, OPD-07 gibi bazı primerlerin kullanılabildiği görülmektedir (Barrangou *et al.* 2002; Kumari *et al.* 2009; Gutierrez *et al.* 2011; Hassan and Youssef 2011).

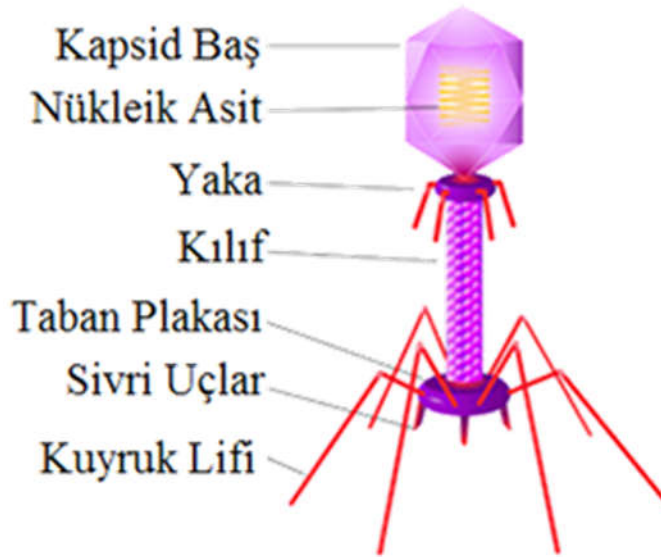
Belirtildiği üzere virüs karakterizasyonunda farklı metotlar kullanılmaktadır. Ancak virüslerin çeşitliliği ve çalışma şartlarının nispi zorluğu yeni metotlara ihtiyaç olduğunu göstermektedir. Moleküler karakterizasyonda da en çok kullanılan metotlardan biri HRM (High Resolution Melting)'dir. HRM analiziyle DNA'ya bağlanabilen floresan boyalar yardımı ile PCR işlemi yapılmış bir amplikonun nükleotit dizisindeki çeşitliliğe bağlı olarak spesifik erime sıcaklığı belirlenerek farklılıklar ortaya koyulabilmektedir. Böylece metodun bu özgülüğü sayesinde genetik tiplendirme, hastalık teşhisi gibi farklı kullanım alanları bulunmaktadır (Erdem *et al.* 2016; Forghani *et al.* 2016). Bu nedenle metodun konu ile ilgili kullanılabiliirliğinin ortaya konulması özel önem arz etmektedir.

Yapılan çalışma kapsamında ilgili örneklerde faj varlığı belirlenerek karakterizasyonu gerçekleştirilmiş ve daha kaliteli yoğurt suşlarının üretimine yönelik katkı sunulması amaçlanmıştır. Bu bağlamda konakçısı *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* olan fajlar çiğ süt, yoğurt, peyniraltı suyu ve fabrika atıklarından izole edilmiştir. Fajların karakterizasyonu morfolojik ve moleküler metotlarla gerçekleştirilmiştir. Ayrıca konakçı özgülüğü ve konakçı kültürlerin lizojen varlığı araştırılmıştır. Mevcut literatür incelendiğinde virüs karakterizasyonunun oldukça maliyetli, güç, donanımlı laboratuvar alt yapısı gerektiren bir işlem olduğu görülmektedir. Proje kapsamında, kullanılan HRM metodu ile virüslerin araştırılmasına yönelik hızlı, nispeten ekonomik ve yeni bir karakterizasyon prosedürü önerilmeye çalışılmıştır.

KURAMSAL TEMELLER

Bakterileri enfekte eden virüsler “Bakteriyofaj (faj)” olarak isimlendirilmektedir. Dünyada bakteri sayısının yaklaşık 10 katı kadar faj bulunduğu düşünülmektedir (Marcó *et al.* 2012). Fajların keşif tarihi üzerine birçok tartışma bulunmaktadır. Bununla birlikte ilk olarak 1896’da İngiliz bakteriyolog Ernest Hankin tarafından Hindistan’daki Ganj ve Jumna (Yamuna) nehirlerinin sularında *Vibrio cholerae*’ya karşı antibakteriyel bir aktivitenin varlığı gözlemlenmiştir. Hankin, su kaynatıldığında bu özelliğini kaybettiğini ve bu durumdan bir canlının sorumlu olduğunu fark etmiştir. Bakteriyofajlar ilk olarak 1915 yılında Twort tarafından tanımlanmış ve faj terimi ilk olarak 1917 yılında Felix d’Herelle tarafından ileri sürülmüştür. 1935 yılında ise Hugh Whitehead ve Geoffrey Cox tarafından ilk defa *Lactococcus lactis* fajı izole edilmiş ve tanımlanmıştır (Stanley *et al.* 2003; Capra *et al.* 2018).

Tipik bir bakteriyofajın yapısı incelendiğinde (Şekil 1), faj nükleik asidini (DNA/RNA) çevreleyen bir veya birkaç farklı proteinden oluşan ikosahedral bir baş (kapsit) bulunduğu görülmektedir. Faja ait kuyruğu kapside bağlayan, ardışık halkalardan oluşan konektör adında bir yapı bulunmaktadır. Bu yapı, fajlar için kilittası bir proteindir. DNA paketlemesinde görev almaktadır. Enfeksiyon sırasında, fajın bakteriye bağlandığı anda kuyruk aracılığıyla birlikte gönderilen sinyal ile konektör sayesinde faj nükleik asidinin çıkışı gerçekleşmektedir (Veesler and Cambillau 2011; Orlova 2012). Fajlarda bulunan kuyruk, enfeksiyon esnasında sinyal verici özelliğinin yanında, faja ait nükleik asidin konakçı bakteriye iletilmesini sağlamaktadır. Kuyruklar iki özelliği ile incelenmektedir: birincisi kısa veya uzun, ikincisi ise kontraktil veya kontraktil olmayan kuyruklardır. Fajların dahil olduğu familyaya (Siphoviridae, Myoviridae ve Podoviridae) göre kuyruk özellikleri değişiklik göstermektedir. En fazla üyesi bulunan Siphoviridae familyasına ait fajların kuyrukları, farklı görevler yapan birkaç proteinden meydana gelmektedir. Tüm kuyruk tiplerinin ucunda dış uzantılar bulunmaktadır. Genellikle birkaç lifli taban plakası ve bir uç veya konakçı reseptörlerine spesifik bir iğne bulunmaktadır. Taban plakası ve kuyruk lifleri, fajın konakçısına bağlanmasında görev almaktadır. Böylece geri döndürülemez bir bağlanma ile faj konektörü açılmakta ve faj genomu kuyruk vasıtasıyla konakçı hücreye aktarılmaktadır. Bazı fajlarda baş ile kuyruk arasında bir yaka bulunmaktadır (Orlova 2012).



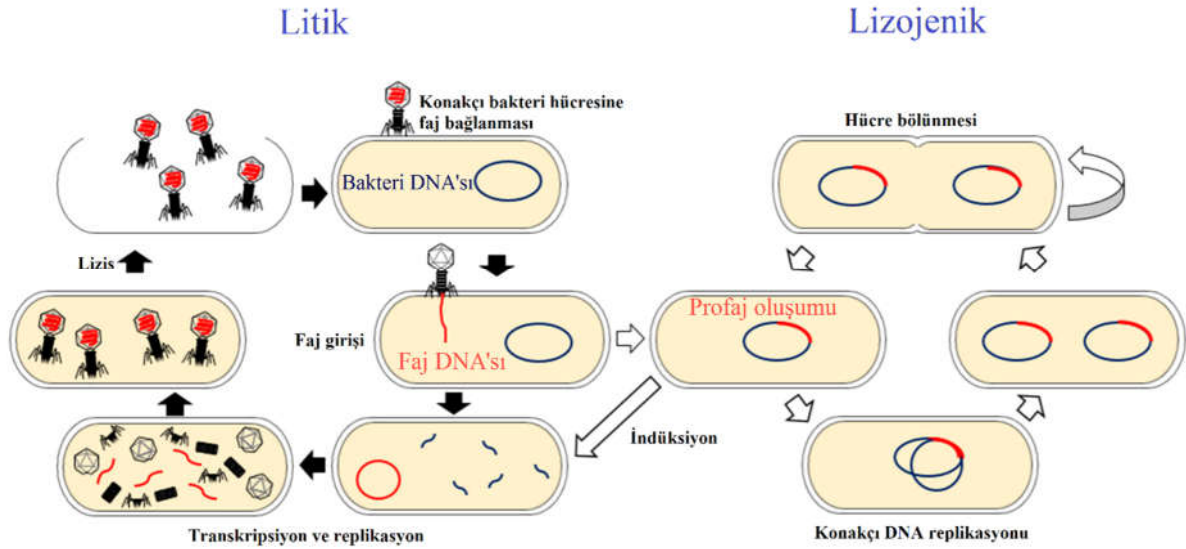
Şekil 1. Tipik bir bakteriyofaj yapısı (Mansour 2018)

Bakteriyofajların, konakçı bakteriye bağlanmasında ve konakçı özgülüğünün belirlenmesinde spesifik faj tanıma bölgeleri görev almaktadır. Fajlarda bulunan bu yapıların yanında, konakçı bakterilerinin yüzeyinde de fajların tutunabileceği reseptörler bulunmaktadır. Gram pozitif (+) ve Gram negatif (-) bakterilerin hücre duvarları, kalınlıkları, lipid ve lipoprotein muhtevası, yüzey kimyası farklılık göstermektedir. Dolayısıyla faj enfeksiyonunda farklı reseptörlerin varlığından söz edilebilmektedir. Gram (+) bakterilerde hücre duvarına bağlı protein, teikoik asit, flagella ve kapsül gibi reseptörler bulunurken; Gram (-) bakterilerde Tol-C, flagellar ve Omp-F proteini ve porin gibi reseptörler yer almaktadır (Hussain *et al.* 2021).

Bakterinin faj tarafından enfeksiyonu bir dizi olay ile gerçekleşmektedir; öncelikle faj, bakteri hücresinin yüzeyinde bulunan lipopolisakkarit, teikoik asit ve proteinler gibi spesifik reseptörlere bağlanarak adsorbsiyon gerçekleşmektedir. Adsorbsiyonu takiben fajın baş kısmının içinde bulunan nükleik asit (DNA veya RNA) bakteri sitoplazmasına aktarılmakta, daha sonra faj, bakteriye ait DNA/RNA'yı parçalamakta ve kendi DNA/RNA'sını sentezlemektedir. Faj DNA/RNA'sı replike olmakta, faja ait enzim ve proteinler sentezlenmektedir. Faja ait elementler bir araya gelmekte ve sentezlenen endolizin enzimi ile bakteri hücresi parçalanarak fajlar serbest kalmaktadır (Erkmen ve Bozoğlu 2016).

Bakteriyofajlar, bakteri hücresinde **litik** ve **lizojenik** olmak üzere iki şekilde bulunmaktadır. Fajların litik ve lizojenik yaşam şekli, birçok çevresel faktöre bağlı düzenleyici proteinlerin (Cro ve CI) ekspresyonuna bağlıdır. CI düzenleyici proteini lizojenik döngüyü, Cro proteini ise litik döngüyü desteklemektedir. Bu iki protein OL ve OR olmak üzere iki operatöre

bağlanırlar, proteinlerden hangisi bu operatörlerin öncelik verdiği bölgeye bağlanırsa kendi gelişimlerini teşvik ederken diğerinin sentezini baskılamaktadırlar. Lizojenik yaşam döngüsüne sahip olan fajlar **temperant faj** (ılıman) olarak isimlendirilmekte olup genomunu konakçı bakterinin kromozomuna entegre etmektedir. Bu şekildeki faj DNA'sına **profaj** adı verilmektedir. Böylece konakçı bakterinin (lizojen bakteri) bölünmesi durumunda faj genomu da replike olmakta ve bir sonraki hücrelere aktarılmaktadır (Şekil 2). Lizojeni durumunda, CII proteini litik promotörlerin transkripsiyonunu baskılayarak kendi sentezini teşvik etmektedir. Profaj; açlık durumu, ani sıcaklık değişimi, UV, kimyasal madde müdahalesi (Mitomycin C) gibi dışarıdan gelebilecek bir etkiye maruz kalması durumunda aktive edilmiş RecA proteini CI baskılayıcı etkisini ortadan kaldırmakta ve bakteri genomundan ayrılarak litik döngüye girmektedir (Sturino and Klaenhammer 2004; Raya and H'bert 2009).

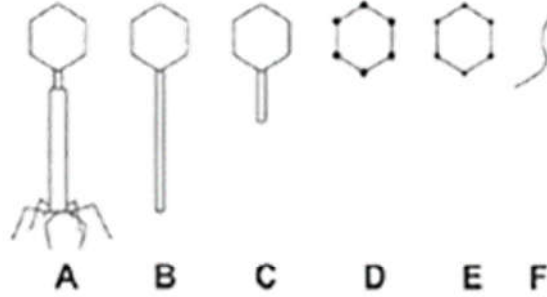


Şekil 2. Bakteriyofaj yaşam döngüleri (Batinovic *et al.* 2019)

Profaj formundaki *Streptococcus thermophilus* suşlarının yalnızca %1-2,2'lik kadar az bir kısmı mitomycin C tarafından indüklenebilmektedir. Bu oranın lizojen formda olan *Lactobacillus* suşlarında daha fazla olduğu görülmüştür. Bu yüzden çok az sayıda *Streptococcus thermophilus* suşunun lizojenik olduğu gösterilebilmiştir. Ayrıca *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*'u enfekte eden fajların *Streptococcus thermophilus*'a nispeten daha az olduğu gözlemlenmiştir (Sturino and Klaenhammer 2004; Villion and Moineau 2009; Quiberoni *et al.* 2010; Aryana and Olson 2017).

İlk faj sınıflandırması 1943'te Ernst Ruska tarafından üç morfolojik tipte şematize edilmiştir. 1948'de Holmes, bir cins ve kırk altı tür içeren konakçı aralığına dayalı bir sınıflandırma yapmıştır. 1962'de ise Lwoff, Horne ve Tournier, fajları nükleik asit tiplerine (DNA veya RNA), kapsid şekline, kapsomer sayısına ve bir zarfın bulunup bulunmamasına

göre sınıflandırma yapmıştır. 1966'da, virion ve nükleik aside göre sınıflandırmayı benimseyen ICTV (uluslararası virüs taksonomi komitesi) kurulmuştur. Şekil 3'te fajların, 1967 yılında Bradley tarafından önerilen morfolojik özelliklerine göre (A, B, C, D, E ve F) sınıflandırılması görülmektedir.



Tip	Nükleik asit	Özellik	Örnek
A	DNA, 2, L	Polihedral baş, uzun kuyruk etrafında kontraktıl kılıf kuyruk levhası (hegzagonal) kuyruk iğnesi ve fibrilleri	T2, T4, T6
B	DNA, 2, L	Polihedral baş, kontraktıl kılıfı olmayan uzun kuyruk	T1, T5, λ
C	DNA, 2, L	Polihedral baş, kontraktıl kılıfı olmayan kısa kuyruk	T3, T7, P22
D	DNA, 1, C	Kuyruksuz, ikosahedral baş, kapsid üzerinde çok büyük kapsomer	Φ X174, S13
E	RNA, 1, L	Kuyruksuz, ikosahedral baş, kapsid üzerinde çok küçük kapsomer	F2R17, Fr, MS2
F	RNA, 1, L	Fleksibl filamentöz	FE, fd, M13

Şekil 3. Bradley sınıflandırması (Gökçe 2010)

Daha sonra 1987'de, Ackermann tarafından morfolojik özelliklerine ek olarak nükleik asit yapılarına (DNA veya RNA) göre kuyruklu, polihedral, filamentöz ve pleomorfik fajlar olmak üzere dört grupta sınıflandırılmıştır (Tablo 1). Bu sınıflandırmaya göre Myoviridae, Siphoviridae ve Podoviridae familyalarının (Bradley'e göre sırasıyla A, B ve C grubu) içinde bulunduğu kuyruklu fajlar %96 gibi büyük bir oranda en geniş faj grubunu oluşturmaktadır (Ackermann 2009b).

Tablo 1. Ackermann Sınıflandırması (Ackermann 2009b)

Morfoloji	Nükleik asit	Familya	Özellikler	Örnek
Kuyruklu	dsDNA (L)	Myoviridae	Kontraktıl kuyruk	T4
	dsDNA (L)	Siphoviridae	Kontraktıl olmayan uzun kuyruk	λ
	dsDNA (L)	Podoviridae	Kısa kuyruk	T7
	ssDNA (C)	Microviridae	Belirgin kapsomerler	Φ X174
Polihedral	dsDNA (C, S)	Corticoviridae	Lipit içeren kompleks kapsit	PM2
	dsDNA (L)	Tectiviridae	Lipit içeren çift kapsit, sahte kuyruk	PRD1
	dsDNA (L)	SH1*	Lipit içeren çift kapsit	SHI
	dsDNA (C)	STIV*	Taret şeklinde çıkıntılar	STIV
	ssRNA (L)	Leviviridae	Poliovirüs benzeri	MS2
	dsRNA (L, M)	Cystoviridae	Lipit zarf	Φ 6
İpliksi	ssDNA (C)	İnoviridae	Uzun filament, kısa çubuklar	M13
	dsDNA (L)	Lipothrixviridae	Lipit zarf	TTV1
	dsDNA (L)	Rudiviridae	TMV benzeri Sert çubuklar	SIRV-1
	dsDNA (C,S)	Plasmaviridae	Kapsitsiz lipit zarf	L2
Pleomorfik	dsDNA (C,S)	Fuselloviridae	Limon şeklinde	SSV1
	dsDNA (L,S)		Limon şeklinde	His1
	dsDNA (C,S)	Guttaviridae	Damlacık şeklinde	SNDV
	dsDNA (L)	Ampullaviridae*	Şişe şeklinde, sarmal nükleokapsid	ABV
	dsDNA (C)	Bicaudaviridae*	İki kuyruklu, sarmal nükleokapsit	ATV
	dsDNA (L)	Globuloviridae*	Küresel, lipid içeren bir zarf ve sarmal bir nükleokapsid	PSV

*tanımlanmamış cins

ds: çift sarmal, ss: tek sarmal, L: lineer, C: sirküler, S: parçalı

Uluslararası Virüs Taksonomisi'ne (ICTV) göre, laktik asit bakterilerinin fajları kuyrukludur ve çoğu Siphoviridae, birkaçı Podoviridae familyasında yer almaktadır. Yoğurt bakterileri olan *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* polihedral bir başa ve kontraktıl olmayan uzun bir kuyruğa sahip olduğu için Bradley

sınıflamasında B grubunda ve Siphoviridae familyasında yer almaktadır (Ackermann 2009b; Capra *et al.* 2018).

Lactobacillus cinsinin 100'den fazla türü vardır ve dolayısıyla geniş yelpazede bir faj çeşitliliği ortaya çıkmaktadır. Bunun için *Lactobacillus* fajlarının birçok özelliği dikkate alınarak bir sınıflandırmaya gidilmiş; konakçı türüne, morfolojilerine, hibridizasyon ve karşılaştırmalı genom analizi ile DNA homolojisine göre (grup a, b, c ve d) sınıflandırma yapılmıştır. *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* fajları grup b'de yer almaktadır (Capra *et al.* 2018).

Elektron mikroskopunun keşfi virüslerin morfolojisini inceleme imkanı sunmaktadır. Bu cihaz 1930'da, Ernst Ruska ve James Hillier liderliğinde, iki bağımsız grup tarafından geliştirilmiş ve 1940 yılında ilk defa kullanılmıştır. İlk çalışmalar fajların küçük, yuvarlak veya uzun, koyu parçacıklar olduğunu ileri sürmüştür. 1950'lerin sonlarında negatif boyama yöntemi ile fajların baş, kuyruk, kuyruk kılıfı gibi yapıları ayrıntılı olarak incelenmiştir (Almeida *et al.* 2018).

Fajlar, elektron mikroskopunda incelenmek üzere bakır kaplı gridlere damlatılmakta ve bir numune tutucuya yerleştirilmektedir. Elektron tabancası tarafından gönderilen elektronlar, uygulanan hızlandırıcı voltaj ile kolondan aşağıya hareket etmektedir. Elektronik ışık numuneden geçmekte, bu sırada her bir alanın kalınlığına ve kırılma indisine bağlı olarak elektronlar saçılmaktadır. Daha sonra elektron ışını numuneden çıkmakta ve büyütülmüş görüntüyü sunan optik merceğe geçmektedir. Nihayetinde son büyütülmüş görüntü oküler lensler sayesinde oluşturulmaktadır (Aryal 2022).

Streptococcus thermophilus fajları 31-45 kb'lık çift sarmallı bir DNA genomu içermektedir. Küçük izometrik kafaya (50-90 nm) ve kontraktil olmayan uzun kuyruğa (100-360 nm) sahiptirler (Stanley *et al.* 2003).

Streptococcus thermophilus fajları DNA paketleme mekanizmasına göre cos (yapışkan) veya pac (küt) uç bulundurmaları göz önüne alınarak iki grupta incelenmiştir. Yapılan çalışmalar doğrultusunda cos grubu fajların genellikle termofilik fermantasyon ürünlerinde görüldüğü tespit edilmiştir. Bu grubun üyeleri virulent fajları içerirken pac faj gruplarının üyeleri hem virulent hem de ılıman fajları temsil etmektedir (Lavelle *et al.* 2018). Mills *et al.* (2011), yaptıkları bir çalışmada, *Streptococcus thermophilus* 5093 fajında cos ve pac bölgelerini tespit edememiş, bunun yerine korunmuş farklı bir dizinin varlığını göstermişlerdir. Dolayısıyla 3. bir grup ortaya çıkmıştır. Süt kökenli olmayan "5093 grup" fajların globüler taban plakasına sahip olması ile benzersiz morfolojik özelliklere sahip olduğu gözlemlenmiştir

(Szymczak *et al.* 2017). McDonnell *et al.* (2016), *Streptococcus thermophilus* fajları üzerinde yaptığı PCR çalışmaları doğrultusunda cos ve pac içeren faj saptama primerleri kullanıldığında amplifikasyon olmadığı görülmüş ve izolatlar genom dizilemesine tabi tutulmuştur. Bunun sonucunda 4 üyesi bulunan “987 grup” fajlar olarak 4. bir grubun varlığından söz edilmiştir. Philippe *et al.* (2020), yaptıkları çalışmada faj P728 ve D4446’nın bugüne kadar tanımlanan *Streptococcus thermophilus* fajları ile benzerliğinin sınırlı olduğunu saptamış ve dolayısıyla 5. bir grubun varlığını göstermişlerdir. Fajların bu şekilde çeşitlenmesi ile birlikte, süt ve süt ürünleri üretiminde karşılaşılan faj popülasyonunun araştırılması ve çözüm yollarının geliştirilmesine yönelik çalışmaların önemini vurgulamaktadır (Lavelle *et al.* 2018).

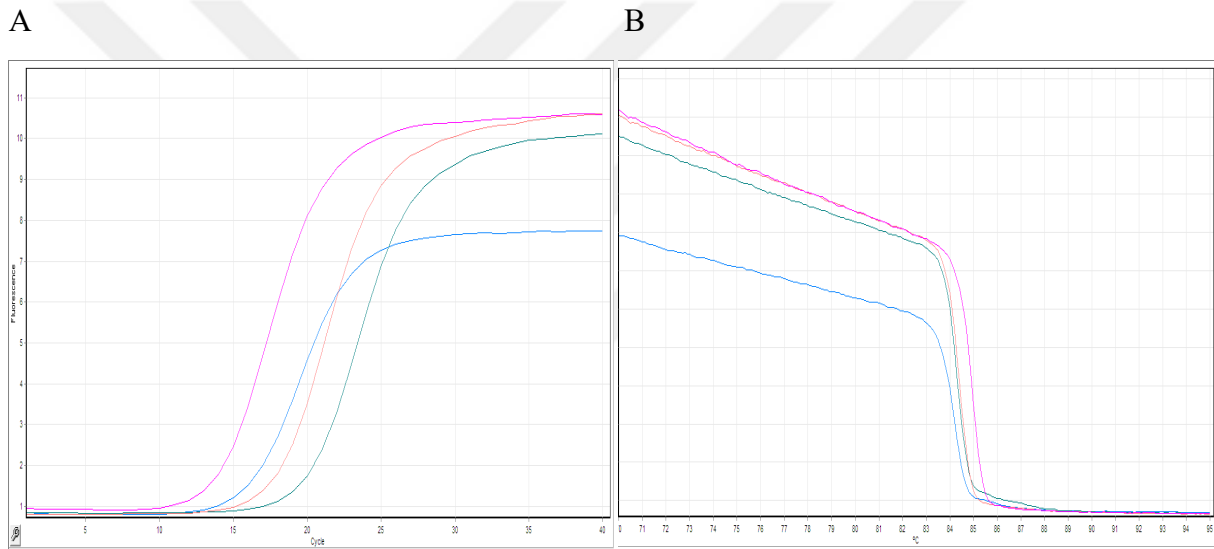
Fajları moleküler olarak tanımlama ve sınıflandırmada Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD-PCR) teknikleri kullanılabilmektedir. Diğer yöntemlere kıyasla daha hızlı ve ekonomik bir uygulamadır ve kontrollü şartlar altında tekrarlanabilir sonuçlar elde edilebilmektedir. Bu metotta universal primerler kullanılarak tüm genom üzerindeki spesifik bölgelerin amplifikasyonu sonucu virüse özgü fingerprintler elde edilmektedir. Bu fingerprintlerdeki çeşitlilik mukayese edilerek farklılıklar/benzerlikler ortaya konulabilmektedir (Rossetti and Giraffa 2005; Dias *et al.* 2020)

Virüs çeşitliliğinin ortaya konulduğu bir diğer metot Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) yöntemidir. Bu yöntem genel olarak ilgili bölgenin spesifik restriksiyon enzimleriyle kesilmesi esasına dayanır. Bu amaçla hedef bölge PCR işlemiyle çoğaltıldıktan sonra kesme işlemi uygulanabileceği gibi, yeterli miktara ulaştırılan genomda da kesme işlemi yapılabilmektedir. Virüslerde genellikle yüksek sayıya ulaştırılan titrelerde ($>10^8$ pob/mL) toplam genomik DNA/RNA saflaştırılmakta ve saflaştırılan DNA uygun restriksiyon enzimleriyle kesilerek fingerprintler elde edilmektedir. RAPD-PCR’de olduğu üzere bu fingerprintlerdeki çeşitlilik mukayese edilerek farklılıklar/benzerlikler ortaya konulabilmektedir.

Fajların karakterizasyonunda kullanılan moleküler yöntemlerden biri Multipleks PCR’dir. Bu metot ile her bir grup için genomların korunmuş bölgeleri dikkate alınarak hazırlanan primerler kullanılmaktadır (Labrie and Moineau 2000). Bakteriyofaj karakterizasyonunda en çok kullanılan primer seti paketleme mekanizmasını hedef alan primerlerin kullanımındır. Bu primerler ile *Streptococcus thermophilus* fajları 5 grup (cos, pac, 5093, 987 ve P728), laktokok fajları 3 grup (936, c2 ve P335) altında incelenmektedir (McDonnell *et al.* 2016; Philippe *et al.* 2020; Romero 2020). Böylece her primere ait ampikon uzunluğu, temsil ettiği fajın varlığını göstermektedir. Nispeten, zamandan tasarruf sağlayan bu

yöntem ile çiğ/pastörize sütte, ürüne işlenmeden önce faj varlığı saptanabilmekte, dolayısıyla rutin kontrollerde kullanılabilmektedir (del Rio *et al.* 2007).

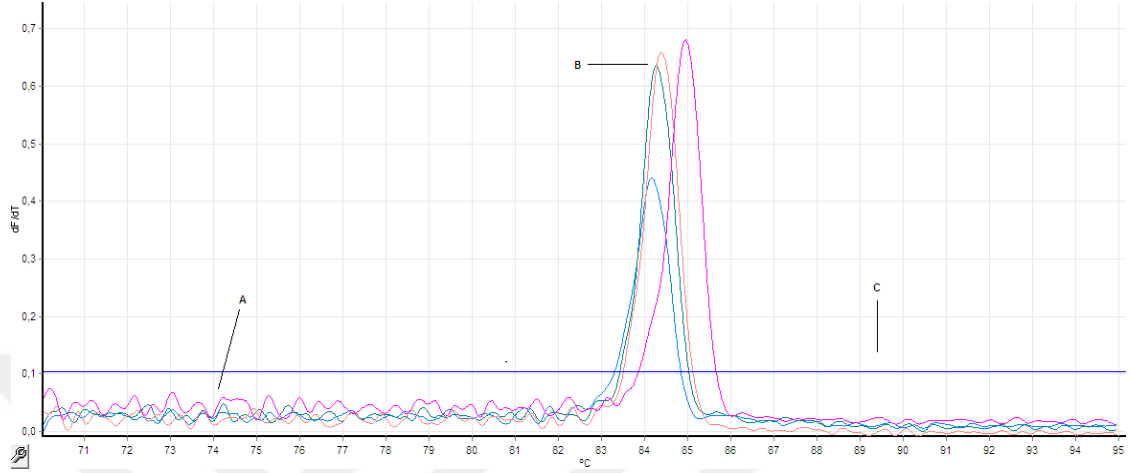
Genetik varyasyonların belirlenmesinde son yıllarda kullanılan bir diğer metot Yüksek Çözünürlüklü Erime (High Resolution Melting, HRM) yöntemidir. Bu yöntem 2 aşamalı bir prosedür içermektedir. İlk aşamada hedef bölge PCR işlemiyle çoğaltılmakta, ardından ampliconlar tedrici artırılan ısı ortamında denatüre edilmektedir. Metot, gerçek zamanlı olarak takip edilmekte, bu amaçla Real Time PCR (RT-PCR) cihazı kullanılmaktadır. Metotta hassasiyetin artırılması amacıyla klasik RT-PCR’de kullanılan SyberGreen boyası yerine EvaGreen yer almaktadır. Ancak metot gereği kullanılan amplicon uzunluğu 600 bp hatta daha fazla olabilmesine rağmen genellikle 150-250 bp uzunluğundaki ampliconların mutasyon veya varyasyonları belirlenmesinde tercih edildiği görülmektedir (Vossen *et al.* 2009).



Şekil 4. İki aşamalı HRM-PCR işlemi, A: RT-PCR işlemi, B: HRM işlemi (Tarakçıoğlu 2019)

Şekil 4’te görüldüğü üzere HRM işlemi 2 basamaktan oluşmaktadır: ilk basamakta 4 farklı suşa ait spesifik bir bölgenin amplifikasyon işlemi görülmektedir. Siklus sayısı arttıkça ampliconlar daha belirgin olmakta, eğride zamanla gözlenen yükselme plato ile sonuçlanmaktadır. İşlem boyunca ortamda bulunan EvaGreen boyası çift iplikçikli DNA moleküllerine bağlanarak ışıma vermektedir. RT-PCR’nin bittiği noktada cihaza tedrici sıcaklık artırılması komutu verilmekte ve tüp içerisinde artan kinetik enerji ile DNA iplikçiklerinde oluşan denaturasyon gözlenmektedir. Bu aşamada ampliconların oluşumu esnasında çift iplikçikli DNA’ya bağlanan EvaGreen boyası ışıma oluşturma özelliğinin aksine, oluşan denaturasyonla ışıma azalma göstermekte ve bu durum spesifik bir erime noktasının oluşmasına sebep olmaktadır. Oluşan spesifik erime noktası, nükleotit dizilimiyle bağlantılı olduğundan elde edilen sıcaklık değeri mutasyona/çeşitliliğe özgündür (Qiagen 2009).

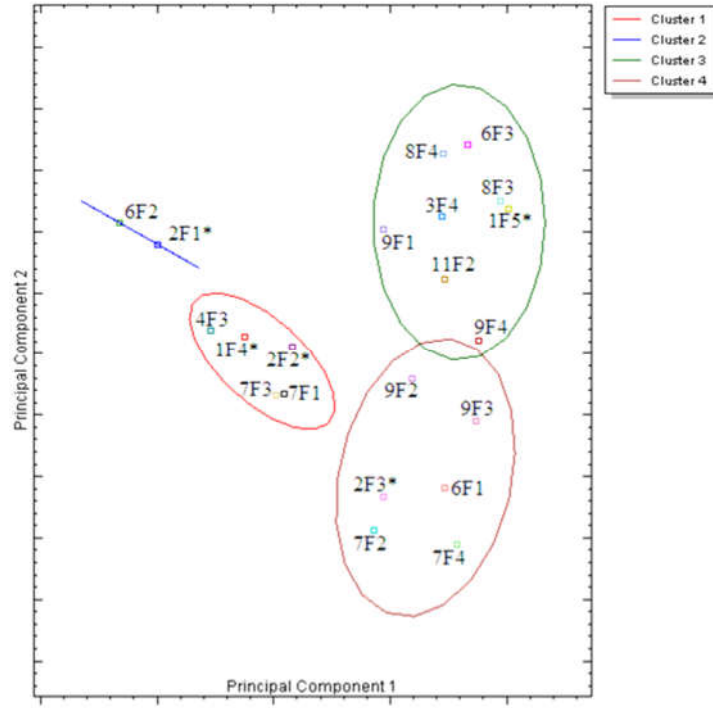
Elde edilen erime eğrileri arasındaki farklılıkların netleştirilmesi ve grupların belirginleştirilmesi amacıyla farklı işlemler uygulanabilmektedir. Bunlardan ilki ilgili eğrilerin türevleri alınarak HRM eğrilerine ait piklerin elde edilmesidir. Şekil 4'te sunulan HRM eğrilerinin türevleri Şekil 5'te verilmiştir. İlgili erime noktası farklılığına göre HRM sıcaklığı ayrımları ve farklılıkları daha net olarak gözlemlenmektedir.



A: noise (gürültü) , B: DNA'nın denature olduğu sıcaklık (erime sıcaklığı), C: treshold (eşik)

Şekil 5. Şekil 4'deki HRM işlemi için oluşturulan türev grafiği (Tarakçıoğlu 2019)

Farklı HRM eğrilerinin gruplandırılmasında kullanılan ikinci uygulama ise PCA (Principal Component Analysis) analizinin kullanılmasıdır. Bu yöntemde HRM analizi sonucu elde edilen verilerin işlenmesi ve numunelerin bu veriler yardımıyla gruplandırılması söz konusudur. Aşağıdaki şekilde (Şekil 6) farklı kaynaklardan izole edilmiş *E.coli* suşlarının V3 bölgesi kullanılarak gruplandırılmış hali görülmektedir. İlgili görselde HRM işlemi boyunca elde edilen veriler işlenerek oluşturulan 4 farklı grubun varlığı gözlemlenmektedir.



Şekil 6. HRM verilerinin PCA analizi ile değerlendirilmesi (Tarakçıoğlu 2019)

Fermentasyon işlemi gıdaların muhafazası, lezzetinin geliştirilmesi amacıyla kullanılan en eski ve sağlıklı yöntemlerden biridir. Fermentasyon sürecinde görev alan mikroorganizmalar ürüne probiyotik özellik kazandırabilmektedir. Fermente gıdaların kolon kanserini önleyen, kan kolesterol seviyesini düşüren veya stabilize eden terapötik etkileri; kalsiyum, magnezyum, demir gibi minerallerin emilimini ve besinlerin biyoyararlılığını artıran besleyici faydaları bulunmaktadır (Cetin 2011; Aktaş and Cetin 2022).

En eski fermente süt ürünlerinden biri olan yoğurdun kökeninin Orta Asya olduğu görüşü kabul edilmektedir. Kaşgarlı Mahmut, Divan-ı Lügat't Türk adlı eserinde Türkçe bir sözcük olan yoğurdun “yoğun” ve “yuğurmak (yoğunlaştırmak)” terimlerinden geldiğini belirtmektedir. Bununla beraber yoğurt ve yoğurt benzeri; dahi (Hindistan), zabadi (Mısır), mast (İran), leben raib (Suudi Arabistan), laban (Irak ve Lübnan), roba (Sudan), iogurte (Brezilya), cuajada (İspanya), dovga (Azerbaycan) ve matsoni (Gürcistan, Rusya ve Japonya) gibi ürünler de bilinmektedir (Yurdakök 2015; Fisberg and Machado 2015).

Türk Gıda Kodeksi (TGGK) Fermente Süt Ürünleri Tebliği'ne göre yoğurt; “fermentasyonda spesifik olarak *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*'un simbiyotik kültürlerinin kullanıldığı fermente süt ürünü” olarak ifade edilmektedir.

Yüksek besleyici değeri nedeniyle yoğurt, tüketiciler tarafından sıklıkla tercih edilen fermente bir gıdadır. Genellikle süte kıyasla yoğurtta laktoz miktarı daha düşük; galaktoz, laktik

asit, serbest amino asit, peptitler ve serbest yağ asitleri daha fazla bulunmaktadır. Kalsiyum, fosfor, magnezyum, B₁, B₂ ve B₁₂ vitamini açısından zengin olan yoğurdun protein içeriği yüksek, yağ içeriği ve glikemik indeksi düşüktür (Meydani and Ha 2000; Fernandez *et al.* 2017). Yoğurt oluşumu esnasında yoğurt kültürleri tarafından laktozu kullanmak üzere üretilen laktaz enzimi üründe laktoz miktarını azalttığı gibi, yoğurdun sindirimi süresince de mide pH'sından etkilenmeden kalın bağırsağa geçebilmekte ve laktozun önemli bir kısmı hidrolize olmaktadır. Dolayısıyla laktoz intoleransı olan kişilerce tüketilemeyen süt, bu sayede kolay sindirilebilir hale gelmektedir. Yoğurtta bulunan proteinlerin biyoyararlılığı yüksektir. Kültürlerin proteolitik aktivitesi sayesinde süt proteinleri önceden bir miktar sindirilerek nispeten sindirilebilirliği artmaktadır. Sütün yoğurda dönüştürülmesi sırasında artan kuru madde ile yoğurt proteinlerinin konsantrasyonu da artmaktadır. Günlük alınması önerilen protein miktarı, ortalama 200-250 g yoğurt tüketimi ile karşılanabilmektedir. Yoğurdun tam yağlı, yarım yağlı yağlı, az yağlı ve yağsız olarak üretimi yapılabilmektedir. Böylece, çocukların beslenmesinde ihtiyaç duyduğu enerjinin bir kısmı yağlı yoğurtlar vasıtasıyla karşılanabilirken; yaşlılar için ise yağsız yoğurtlar bir alternatif sunmaktadır (Özer 2006; El-Abbadi *et al.* 2014).

Yoğurt ile ilgili yapılan çalışmalarda sağlık üzerine potansiyel olumlu etkileri ortaya konulmuştur. Yoğurt oluşumundan sorumlu *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*'un metabolizması sonucu sentezlenen hidroksimetil glutarat sayesinde serum kolesterol sentezini engellediği belirtilmiştir. Yoğurdun, yetişkinlerde immün sistemini güçlendirdiği yönünde bir dizi veri bulunmaktadır. Yoğurt kültürlerinin laktozu metabolize etmesiyle oluşan laktik asit, kalın bağırsak pH'sını bir miktar düşürerek veya kültürlerin bağırsak çeperlerine tutunup hakim flora haline gelmesiyle zararlı mikroorganizmaların gelişimini kısmen engellemektedir. Yoğurt tüketimi ile konjuge linoleik asit arasındaki ilişkinin önemi bir dizi araştırmaya konu olmuştur. Birçok *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ve *Lactobacillus acidophilus* suşu serbest linoleik asidi konjuge linoleik aside dönüştürebilmektedir. Konjuge linoleik asidin tümör oluşumunu engellediği, insülin direnci, vücut yağ oranı, damar sertliği, kolesterol ve meme kanseri riskini azalttığı, vücudun yağ oranını azaltıp kas kütlesini arttırdığı ve bağışıklık sistemini güçlendirdiği görülmüştür (Kishino *et al.* 2002; Sieber *et al.* 2004; Özer 2006; Serafeimidou *et al.* 2012).

Yoğurt oluşumundan sorumlu *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* laktik asit bakterileri, yoğurt üretiminde starter kültür olarak kullanılmaktadır. Bu iki bakteri tarafından gerçekleştirilen glikoliz, proteoliz ve lipoliz reaksiyonları ile aroma bileşikleri oluşabilmektedir. Yoğurt bakterileri laktozu laktik aside dönüştürmesiyle birlikte

kazein miselleri çökerek yoğurt pıhtısı oluşmaktadır. Bunun yanında yoğurdun tat ve aromasını oluşturan; asetaldehit, diasetil, serbest yağ asitleri, aseton, asetoin ve amino asitler oluşmaktadır (Özdemir ve Bodur 1994; Chen *et al.* 2017). Üretim esnasında bu iki bakteri 1:1 oranda katılmakta, ancak fermentasyon süresince bu oran sıcaklık ve asitliğe bağlı olarak değişim göstermektedir. Streptokoklar yüksek pH'da gelişim gösterebilirken asitliğe toleransı olan laktobasiller düşük pH'da üreyebilmektedir. Dolayısıyla başlangıçta sütün pH'sı 6,5-6,6 iken streptokoklar gelişmekte, asitlik düştükçe laktobasillerin sayısında artış görülmektedir. Düşük sıcaklıkta streptokokların gelişmesi desteklenirken sıcaklık arttıkça laktobasillerin gelişimi uyarılmaktadır. Yoğurt üretiminde iki bakterinin birlikte kullanımı, yalnızca birinin kullanımına kıyasla gelişimi ve faaliyetlerinin daha iyi olduğu bilinmektedir. Yoğurt bakterileri arasında simbiyotik bir ilişki söz konusudur; gelişimleri için gerekli metabolitleri birbirlerinden karşılamaktadırlar. Fermentasyonun başlangıcında *Streptococcus thermophilus* hızla çoğalarak formik asit ve CO₂ üretir ve *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*'un gelişimini teşvik eder. Proteolitik kapasitesi yüksek olan *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ise ürettiği peptit ve aminoasitlerle *Streptococcus thermophilus*'un gelişimini destekler (Hill *et al.* 2017; Nagaoka 2019).

Fajların, küresel olarak bolluğu ve önemi yadsınamaz. Hem organik madde dönüşümünü hem de bakteri evrimini etkileyen biyolojik varlıklardır. Bakteriler ise bu varlıklara yanıt niteliğinde, faj enfeksiyonundan kaçınmak amacıyla evrimleşmiş ve fajlara karşı çeşitli savunma sistemleri geliştirmiştir (Dupuis *et al.* 2013; Dy *et al.* 2014). Faj direnç sistemlerinin bütünü ele alındığında bu mekanizmalar üç ana başlık altında toplanabilmektedir: Reseptör uyarlamaları, konakçı savunma sistemleri ve faj kaynaklı savunma sistemleri (Egido *et al.* 2022).

Bakteriler, faj adsorbsiyonundan korunmak için bir yarış halindedirler. **Reseptör uyarlamalarında** bakteride meydana gelen mutasyonlar ile birlikte hücre yüzeyindeki değişiklikler fajın bakteriye tutunmasını engelleyebilmektedir. Hücre dışı matris üretimiyle faj ve reseptörler arasında bir bariyer oluşturmaları, nokta mutasyonu ile belirli reseptörlerin yapılarında değişikliklere yol açarak bakterilerin fajlara dirençli hale gelmesi, bakteri hücre yüzeyindeki faj reseptörlerini maskeleyen proteinlerin ve tuzak reseptör görevindeki dış membran veziküllerinin üretilmesiyle faj enfeksiyonunun önlenmesi bu uyarlamalara örnek olabilecek sistemlerdir (Egido *et al.* 2022).

Bakteri savunma sistemlerinden Kümelenmiş Düzenli Aralıklı Kısa Palindromik Tekrarlar (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-Associated Proteins, CRISPR-Cas), Restriksiyon Modifikasyon (Restriction Modification, RM),

Kısıtlama-Modifikasyonla İlişkili Savunma Adası Sistemi (Defence Island System Associated with Restriction-Modification, DISARM) ve Bakteriyofaj Dışlama (Bacteriophage Exclusion, BREX) virüs DNA'sını hedeflerken; Abortif Enfeksiyon (Abortive Infection, Abi), enfekte olmuş hücrenin otolizini indüklemektedir (Smug *et al.* 2022).

Restriksiyon modifikasyon, uzun yıllardır kapsamlı olarak araştırılan ve iyi anlaşılmış faj savunma sistemleridir. Bakteri ve arke genomlarının büyük bir çoğunluğunda bulunmaktadır (Labrie *et al.* 2010; Egido *et al.* 2022). Bu sistem, restriksiyon endonükleazı (REase) ve metiltransferaz (MTase) olmak üzere iki enzimatik aktiviteden oluşmaktadır. RM sistemine sahip bakteri hücresine giren yabancı DNA'nın (faj DNA'sının) metilasyon durumu değerlendirilir. MTase, konakçı DNA'sını belirli bölgelerde metilleyerek korurken; REase, modifiye edilmemiş (metillenmemiş) yabancı faj DNA'sını tanıyıp parçalamaktadır. Daha az bir ihtimalle faj DNA'sı bakteriyel metilaz ile metillenerek litik döngüye girebilmektedir. Ancak restriksiyon enzimi genellikle metilazdan daha aktif olması sebebiyle konakçı DNA metilasyon ile korunurken faj DNA'sı parçalanmaktadır (Labrie *et al.* 2010; Vasu and Nagaraja 2013; Egido *et al.* 2022).

DISARM, bakteriyi geniş yelpazedeki fajlara karşı koruyan, yakın zamanda keşfedilmiş, RM ile ilgili bir savunma sistemidir. Bu sistem, faj adsorbsiyonunu engellemeden bakterideki belirli bir diziyi metillemekte, faj replikasyonunu ve lizojeniyi erken aşamada önleyebilmektedir. DISARM için; metilaz (*drmMI*, *drmMII*), helikaz (*drmA*, *drmB* *drmD*), fosfolipaz-D/nükleaz (*drmC*) fonksiyonları yanında işlevi tam tespit edilemeyen (*drmE*) genlerin bulunduğu bir mekanizma önerilmektedir. Gen susturma deneyi ile faja karşı savunma için *drmC* geninin kısmen, diğer genlerin ise kesinlikle gerekli olduğu sonucuna varılmıştır (Ofir *et al.* 2018).

BREX, DNA metilasyonu tabanlı bir faj savunma sistemidir. Sistem, bir Lon benzeri proteaz (*brxL*), alkalın fosfataz proteini (*pglZ*), RNA bağlayıcı protein (*brxA*), DNA metilaz (*pglX*), ATPaz proteini (*brxC*) ve bilinmeyen işlevli bir proteini (*brxB*) kodlayan 6 gen içermektedir. BREX sistemlerine sahip bakteri DNA'sının palindromik olmayan dizisinde metilasyon modelleri oluşturarak faj enfeksiyonundan korunduğu tespit edilmiştir. BREX, faj adsorbsiyonuna izin vermekte ancak bir mekanizma ile litik ve lizojenik fajlara ait DNA kopyalarının oluşumunu engellemektedir. BREX sistemi, bir RM sistemi değildir. BREX, RM sistemlerinin aksine faj DNA'sını bozmamakta ve metillenme palindromik olmayan bölgelerde gerçekleşmektedir (Goldfarb *et al.* 2015).

En yaygın faj direnç sistemlerinden biri olan CRISPR-Cas (Kümelenmiş Düzenli Aralıklarla Kısa Palindromik Tekrarlar), adaptif (uyarlayıcı) bir savunma mekanizmasıdır. Birçok bakteri ve arke genomu ve nadiren plazmitlerde bulunmaktadır. CRISPR-Cas sistemleri, Sınıf 1 (Tip I, Tip III, Tip IV) ve Sınıf 2 (Tip II, Tip V, Tip VI) olmak üzere 2 farklı sınıf; Tip I (Cas3), Tip II (Cas9), Tip III (Cas10), Tip IV (Csf1), Tip V (Cpf1) ve Tip VI (C2c2) olmak üzere altı tipten oluşmaktadır. CRISPR-Cas sisteminde, faja ait DNA tanınır ve yakalanır, yakalanan DNA bakteri genomuna uygun şekilde entegre edilerek konakçının o enfeksiyonu tanınması ve faj ile bir daha karşılaştığında ona bağışıklık kazanması ve direnç göstermesi sağlanmaktadır. Bu mekanizmada cas proteinlerini kodlayan genler rol almaktadır (Li *et al.* 2016; Stout *et al.* 2017). Fermente gıdaların üretiminden sorumlu olan mikroorganizmalarda, CRISPR-Cas sistemi ile sıklıkla karşılaşmaktadır. Bu durum, fermentasyon süresince fajların baskınlığından kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte CRISPR-Cas içeren suşlar, risk oluşturan fajlara tekrar tekrar maruz kalabilmektedir. Fermentasyon teknolojisinin önemli bir suşu olan *Streptococcus thermophilus* üst üste 4 farklı faja maruz bırakılmış ve sonucunda tekrar eden palindromik bölgelerde ilgili fajlara ait dört yeni sekans (spacer) tespit edilmiştir. Bu durum, CRISPR'nın uyarlanmış bağışıklık sisteminin kesin göstergesi olarak değerlendirilmektedir (Stout *et al.* 2017).

CRISPR-Cas sistemleri; bakterilerin yaklaşık %40'ında, RM sistemleri %75'inde, BREX ise %10'unda bulunmaktadır (Doron *et al.* 2018).

Abortif enfeksiyon (Abi) sistemi genel olarak profaj ve plazmitler tarafından kodlanmaktadır. Sistemin temel prensibi, diğer savunma mekanizmalarından farklı olarak enfekte hücrenin ölümüne dayanmaktadır. Abi sistemleri ile kodlanan bakteri hücresi, faj enfeksiyonunu algıladıktan sonra, fajın replikasyon döngüsünü tamamlamasına imkan vermeden sadece enfekte hücreler ölmektedir. Böylece fajın diğer hücrelere yayılımı sınırlanmakta, konakçı hücrenin çoğunluğu ise hayatta kalmaktadır. Faj enfeksiyonunu incelemek amacıyla model organizma olarak *Escherichia coli* (*E.coli*) kullanılmış ve birçok Abi sisteminin mekanizması araştırılmıştır. Bununla beraber, süt endüstrisinde önemli kayıpların sebebi olmasıyla birlikte laktokok fajlarının savunma mekanizmalarına dair çalışmalar önem kazanmıştır. *Lactococcus lactis* fajında AbiA'dan AbiZ'ye kadar yirmiden fazla savunma geni veya sistemi tespit edilmiştir. Bu mekanizma, *E.coli* ve *Lactococcus lactis*'in yanı sıra *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Shigella dysenteriae*, *Streptococcus pyogenes* ve *Vibrio cholerae*'de görülmüştür (Chopin *et al.* 2005; Lopatina *et al.* 2020).

Bakteriler, ürettiği ikincil metabolitlerle de fajlara karşı direnç gösterebilmektedir. Son yıllarda daha birçok konakçı savunma sistemi tanımlanmaya ve karakterize edilmeye devam etmektedir (Egido *et al.* 2022).

Faj kaynaklı savunma sistemleri konakçının, faj istilasıyla beraber aktifleşen, Süperenfeksiyon dışlama (Superinfection exclusion, Sie) ve Sie olmayan şeklinde gruplandırılan iki savunma sistemini içermektedir. Özellikle Sie sistemlerinde profaj kaynaklı proteinlerin etkili olduğu görülmektedir.

Süperenfeksiyon dışlama (Sie) sistemlerinde; faj DNA'sının konakçı hücreye girişini engelleyen, faj reseptörleriyle etkileşime giren, yabancı fajın enzimlerini inhibe eden ve konformasyonel bir değişikliği tetikleyen, hücre membranına sabit veya membran bileşenleri ile ilişkili olduğu düşünülen proteinler üretilmektedir. Bu durum, spesifik fajlara karşı bağışıklık kazandırır. İlgili proteinleri kodlayan genler genellikle profajlarda bulunmaktadır. Bazı fajlar ise hücre yüzeyi reseptörlerini maskeleyici proteinler üreterek yeni enjeksiyonları engellemektedir (Egido *et al.* 2022). Yalnızca birkaç Sie sisteminin karakterize edilmesine rağmen birçok farklı Sie sistemi tanımlanmıştır. Sie sistemine sahip ılıman faj *Streptococcus thermophilus* TP-J34'te tanımlanan bir lipoprotein, DNA enjeksiyonu için kanal oluşumundan sorumlu diğer fajların proteini ile etkileşime girdiği ve faj enjeksiyonunu engellediği tespit edilmiştir. Ayrıca Kolifaj (*E.coli* fajı), *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovar Typhimurium ve *Lactococcus lactis* lizojenik fajlarda da Sie sistemlerine rastlanmıştır (Labrie *et al.* 2010; Azam and Tanji 2019).

Profajlar, Sie benzer olmayan mekanizmalarla da faj enfeksiyonuna karşı direnç gösterebilmektedir. *Mycobacterium smegmatis* gibi profajlar yeni enfekte olmuş fajların DNA'sını hedef alan RM sistemlerinin veya DNA bağlayıcı baskılayıcı proteinlerin (DNA-binding repressor proteins) ekspresyonunu sağlayarak bakteriye direnç kazandırabilmektedir. RexA-RexB gibi profajlarda görülen sistemler yeni bir faj enfeksiyonuna maruz kaldığında Abi yanıtını tetikleyebilmektedir. Konakçı savunma sistemlerinde bahsedildiği gibi faj savunma sistemlerinin de keşfi henüz devam etmektedir. Bunlardan bir tanesi Faj Anti Restriksiyon İndüklenmiş Sistem (Phage Anti-Restriction-Induced System, PARIS)'dir (Egido *et al.* 2022).

Fajlar, fermentasyon süresinin uzamasına ve böylece ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Dolayısıyla fajlar, süt endüstrisi için oldukça önemli bir risk faktörü olarak görülmektedir. Bir fabrikada faj kontaminasyon kaynaklarının belirlenmesi, yeni fajların üremesi ve yayılımının engellenmesi için önemli bir adımdır (Capra *et al.* 2018; Marcó *et al.* 2019).

Çiğ süt, fajların en olası kaynağıdır. Çiğ sütte faj, 10^1 - 10^3 pob/mL gibi düşük titrelerde bulunmaktadır. Faj kontaminasyonu sütün toplanması, taşınması, depolanması ve işlenmesi sırasında meydana gelebilmektedir. Fajlar süt gibi sıvı ortamlarda gelişebilmekte ve kolayca yayılabilmekte, dolayısıyla fermentasyon aşamasında birkaç faja duyarlı suş ile karşılaştığında faj sayısı 10^8 - 10^9 'a kadar hızlıca artabilmektedir. Süt ürünlerinin ham maddesi olan çiğ sütün faj içeriği açısından incelenmesi, bir sonraki aşamalar için kritik bir noktayı temsil etmektedir (Garneau and Moineau 2011; Szczepankowska *et al.* 2013; Pujato *et al.* 2019).

Laktik asit bakterileri üzerinde yapılan çalışmalar neticesinde LAB fajlarının genel olarak termal işlemlerden etkilenmeden aktivitelerinin devam ettiği görülmüş, HTST (yüksek sıcaklık - kısa süre, 72°C'de 15 saniye) ve LTLT (düşük sıcaklık - uzun süre, 63°C'de 30 dakika) pastörizasyon normları ile tamamen inaktif olduğu kanıtlanamamıştır (Capra *et al.* 2018; Marcó *et al.* 2019). Bu sıcaklık normları genellikle içme sütü ve peynir üretiminde kullanılmaktadır. Yoğurt üretiminde ise karakteristik pıhtı oluşumunu destekleyen protein denaturasyonuna ulaşmak için en az 85-90°C'de 20-30 dk'lık süre/sıcaklık normu uygulanmaktadır (Özer 2006). Ancak kullanılan süre/sıcaklık normu da bakteriyofajlar üzerinde her zaman etkili olmamaktadır (Guglielmotti *et al.* 2012).

Fabrikalarda tankta bulunan kontamine çiğ süt veya yüzeylerin etrafındaki hareketler ve sıvı sıçramaları havanın yer değiştirmesi ile birlikte aerosol hale gelip diğer ürünleri kontamine edebilmektedir. Hava kontaminasyonlarının kaynağının tam olarak tespit edilememesi çözüm açısından büyük bir zorluk oluşturmaktadır. Havada bulunan fajın enfeksiyona sebep olma potansiyeli enfeksiyon gücüne ve aerosolizasyon stresine dayanmasına bağlıdır (Verreault *et al.* 2008; Verreault *et al.* 2011). Süt tesisi ortamındaki merdiven, duvar, kapı kolları, zeminler, ofis masaları ve ekipman boruları gibi yüzeyler de faj kontaminasyonu için kaynak oluşturmaktadır (Marcó *et al.* 2012).

Fermentasyondan önce sütü standardize etmek, son ürünün tadını ve dokusunu iyileştirmek, besin değerini ve verimini artırmak amacıyla peyniraltı suyu proteinleri tekrar kullanılabilir. Fajlar, peyniraltı suyu protein konsantresi üretiminde uygulanan ultrafiltrasyon işleminde protein ile birlikte filtrede tutulabileceği ve faj konsantrasyonu artabileceği için ilave edileceği ürünlerde tehdit oluşturmaktadır (Garneau and Moineau 2011; Marcó *et al.* 2022).

Ticari suşlar dahil olmak üzere süt endüstrisinin en önemli laktik asit bakterilerlerinden *Lactococcus* ve *Lactobacillus* genomunda ve daha nadir olarak *Streptococcus thermophilus*'ta profaj varlığı belirlenmiştir. Suşlarda lizojeni bulunması durumunda UV ışını, Mitomisin C gibi

kimyasal ajanlar, tuz, antimikrobiyal, ısı ve yetersiz beslenme gibi stres faktörleri ile profaj indüklenerek litik döngüye girebilmektedir. Bununla birlikte *Lactococcus*, *Lactobacillus* ve *Lactocaseibacillus*'ta tespit edildiği gibi profajlar bazı durumlarda ilgili koşullar sağlanmadan da indüklenebilmektedir (Pujato *et al.* 2019; Marcó and Mercanti 2021).

Bakteriyofajların, fermentasyon işleminde sebep olduğu ekonomik kayıpları önlemek, fajları kontrol altına almak amacıyla fabrika ortamı, hammadde ve kullanılan starterlerde çeşitli kontrol yöntemleri uygulanmaktadır (Guglielmotti *et al.* 2012).

Bir fabrika ortamı tasarımının, faj enfeksiyonunu önlemede kritik bir rolü bulunmaktadır. Fermentasyon tankları ve üretim yeri ile muhtemel faj varlığının bulunduğu çiğ süt ve peyniraltı suyu atıklarının işlendiği yerler birbirinden ayrı olmalıdır. Bunun yanında hava akışının düzenli olarak analizi ve yeterli bir havalandırma sistemi ile hava kaynaklı faj kontaminasyonunun yayılması sınırlandırarak nispeten kontrol altına alınabilmektedir (Samson and Moineau 2013; Marcó and Mercanti 2021).

Fermente süt ürünlerinin üretiminde fajların kontrolü amacıyla ısıl işlem uygulanmaktadır. Fajların ısıya karşı gösterdiği direnç ve duyarlılık, konakçının türüne değil fajlara göre değişiklik göstermektedir. Süte uygulanan ısıl işlemin fajlar üzerindeki duyarlılığını değerlendirmek amacıyla belirli parametreler hesaplanmaktadır. En fazla kullanılan parametrelerden bir tanesi; fajların %99'unu inaktif etmek için gerekli zamanı temsil eden "T₉₉" değeridir. Bu değer tüm fajların yıkımından ziyade ilgili fajlardan en hassas %99'unu ifade etmektedir. Başlangıçta numunede faj sayısının yüksek olması ısıl işlem uygulansa dahi kalan faj partiküllerinin sorun oluşturmaya sebep olmaktadır. Bu yüzden tam bir inaktivasyon için gerekli olan minimum süre de T₉₉ değeri ile birlikte değerlendirilmelidir (Guglielmotti *et al.* 2012).

Temizleme prosedürleri ile fajlar düşük seviyede tutularak yayılması önlenmekte ve enfeksiyon riski azaltılabilmekte, bu amaçla biyositler kullanılabilmektedir. Süt ve süt ürünleri işletmelerinde kullanılan biyositlerin LAB fajları üzerindeki etkisi, kimyasal bileşimindeki farklılıklara bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Faj kontrolü için kullanılan kimyasallar içinde; alkoller, kuarterner bileşikler, klorlu maddeler (klor dioksit, sodyum hipoklorit), perasetik asit ve çok asidik veya çok alkali biyositler sayılabilmektedir. Bunlar; düşük toksisite ve maliyet, gıda üzerindeki olumsuz etkisinin olmaması, bakteri ve virüslere karşı etkili bulunması gibi minimum kriterleri sağlaması şartıyla sağlık yetkilileri tarafından onaylanabilmektedir. Biyositler içerisinde izopropanol ve sodyum hipoklorit laboratuvar ve ekipman yüzeylerinin temizliğinde kullanılmakta ve fajların kontrolünde daha az etkinlik

göstermektedir (Marcó *et al.* 2019; Sadiq *et al.* 2019; Panezai *et al.* 2021). Perasetik asidin; hidrojen peroksit ve asetik asit gibi çevre dostu ürünlere bozunması, katalaz ve peroksidaza dirençli olması, geniş sıcaklık ve pH aralığında ve sert sularda aktivitesini koruması sebebiyle gıda endüstrisinde ve yerinde temizlik uygulamalarında (CIP) kullanılabilir. Süt endüstrisinde kullanılan biyositler içinde faj inaktivasyonunda pratik, geniş çapta kullanıma sahiptir (Guglielmotti *et al.* 2012).

Fajların inaktivasyonunda kimyasal ve ısı işlemler gibi geleneksel yöntemler nispeten fajlarda etkilidir. Ancak uygulanan ısı işlemlerde, sıcaklığın artmasıyla birlikte süt proteininde denaturasyona, enzimatik olmayan esmerleşmeye, aromatik uçucu maddeler ve vitaminlerde kayba sebep olabileceği için gıdaların kalitesini etkileyebilmekte, ayrıca kullanılan sıcaklık/süre normlarında bakteriyofaj her zaman inaktif olmamaktadır. Benzer şekilde, gıdayla temas eden yüzeye uygulanan kimyasal ajanların muhtemel kalıntıları güvenlik açısından risk oluşturmaktadır (Fernández *et al.* 2017; Sadiq *et al.* 2019). Süt yan ürünlerinin üretiminde kullanılan sprey kurutmada havanın giriş sıcaklığı 180-200°C olsa dahi peyniraltı suyu damlacıklarında sıcaklık 60°C ve altına düşeceği için verimli faj inaktivasyonu sağlanamayabilir (Pujato *et al.* 2019). Tüm bu sebepler dikkate alınarak son yıllarda, ilgili yöntemlere alternatif niteliğinde yeni stratejilerin etkinliği araştırılmaktadır. Fotokataliz, darbeli ışık ve nano veya mikrofiltrasyon membranları, termal olmayan plazma, yüksek hidrostatik basınç, darbeli elektrik alanı, yüksek basınçlı homojenizasyon ve UV uygulaması yeni stratejilere örnek olarak verilebilmektedir (Fernández *et al.* 2017; Sadiq *et al.* 2019).

Geçmişte, fermente süt ürünlerinin üretiminde kullanılan çoklu kültürler nispeten faja toleranslıyken günümüzde DVI (Direct Vat Inoculate), yüksek konsantrasyonlu (10^{10} kob/g) ve faj ilişkisiz kültürlerin kullanımıyla birlikte daha güvenli bir üretim sağlanmıştır. Bazı araştırmacıların önerdiği bir diğer çözüm de Sie olmayan faj direnç mekanizmasına sahip suşların rotasyonda kullanılmasıdır (Szczebankowska *et al.* 2013).

Süt ve süt ürünleri üretiminin yapıldığı işletmelerde çiğ süt, yoğurt, peyniraltı suyu, starter bulk ve pastörize süt numunelerinden izole edilmiş *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* fajlarının incelendiği bir çalışmada elektron mikroskobu ile morfolojileri araştırılmış (Acar Soykut ve Tunail 2010), replikasyon parametreleri, kapsid protein profilleri ve restriksiyon endonükleaz analizleri ile tanımlanmış ve sınıflandırılmıştır. Böylece 23 adet *Streptococcus thermophilus* ve 25 adet *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* fajının morfolojileri TEM kullanılarak incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* fajları için sırasıyla; hegzonal baş çapı 53-74 nm, 47-73 nm, kontraktil olmayan kuyruk uzunluğu 182-290

nm, 131-162 nm, kuyruk genişliği 7-14 nm, 7-13 nm olarak bulunmuş ve bu fajların Siphoviridae familyasına ait olduğu görülmüştür. Çalışmada kullanılan fajlar karakterizasyon amacıyla izolat kaynağı, RFLP ve protein fingerprintleri göz önünde bulundurularak *Streptococcus thermophilus* suşlarına ait B3-X19, 231-X9, 2B3-A, 231S-A1MÖ ve 709-X5'in; *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* fajına ait Y4-X12 olmak üzere toplam 6 fajın replikasyon parametreleri belirlenmiştir. 231S-A1MÖ, 2B3-A ve B3-X19 *Streptococcus thermophilus* fajlarının plak etkinliği diğer 2 faja göre daha düşük (1'den az), tüm fajların artış dönem süreleri birbirine yakın (30-35 dk), latent dönem sürelerinin 15-35 dk olduğu ve patlama büyüklüğünün 64-620 faj partikülü arasında değiştiği görülmüştür. *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* fajının ise plak etkinliği 1, latent dönem süresi 85 dk ve patlama büyüklüğünün 140 faj partikülü olduğu bulunmuştur. Fajların kapsid protein profilleri incelendiğinde *Streptococcus thermophilus* fajlarında belirgin bir farklılık görülmemiş, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* fajların tamamının 100,8, 50 ve 26,2 kDa'luk büyüklüklere sahip olduğu bulunmuştur. Restriksiyon endonükleazları (EcoRI, EcoRV, PvuII, HindIII, ClaI, HaeII, HhaI, PstI, BamHI) ile kesilen *Streptococcus thermophilus* fajlarında EcoRI ile 5, EcoRV ile 9, PvuII ile 4, ClaI ile 4, HhaI ile 8 farklı bant oluşturduğu ancak; HaeII, HindIII, PstI ve BamHI enziminin bu denemede kesim yapamadığı görülmüştür. *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* fajlarında EcoRI ile 2, PvuII ile 2, HindIII ile 8, HhaI 4 farklı bant oluşmuş ancak; bazı faj genomlarında kesim işleminin gerçekleşmediği tespit edilmiştir. EcoRV ve BamHI iyi bir kesim oluşturamamıştır. Konakçı aralığına göre incelendiğinde; konakçısı B3 suşu olan 10 adet *Streptococcus thermophilus* fajı 44 bakteri suşu ile karşılaştırılmış ve fajların tamamına dirençli olduğu görülmüştür. Konakçısı 231, V1 ve V2 suşları olan 13 adet *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* fajı, ticari Ch-Lb12 suşu fajlara tam direnç gösterirken diğerlerinin tamamen duyarlı olduğu saptanmıştır (Acar Soykut 2002, 2007).

Özyurt (2005), yaptığı bir çalışmada 83 adet *Streptococcus thermophilus* ve 40 *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* suşu ile 9 fajın (2 adet *Streptococcus thermophilus*, 7 adet *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*) konakçı özgülüğünü belirlemiştir. 43 tanesi pastörize süt kökenli ve 30 tanesi çiğ süt kökenli olan *Streptococcus thermophilus* suşları tüm fajlara karşı tamamen direnç göstermiştir. Geri kalan 10 suştan 7 tanesi her iki suşun fajlarına dirençli iken; 2 tanesi kendi fajlarına ve 2 adet *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* fajına duyarlı bulunmuş, 1 tanesinin ise tüm fajlara karşı duyarlı olduğu saptanmıştır. Tüm *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* suşlarının genel olarak kendi fajlarına karşı duyarlı olduğu görülmüştür. 12 tanesi pastörize süt kökenli, 22 tanesi çiğ süt kökenli suşlar tüm fajlara karşı denenmiş; çiğ süt kökenli 8 adet *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* suşu 2 adet *Streptococcus thermophilus* fajına, 9 adet *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* suşu ise 1

adet *Streptococcus thermophilus* fajına duyarlı olduğu görülmüştür. 7 adet *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* suşu her iki suşa ait fajlar tarafından lize olmuştur.

Yoğurt üretiminde sorun oluşturan bakteriyofaja dirençli kültürlerin tespit edilmesi amacıyla İzmir'in çeşitli bölgelerinden toplanan yoğurt örneklerinden 60'ar adet *S. thermophilus* ve *L.bulgaicus* suşu izole edilmiş ve elde edilen izolatların konakçı olarak kullanılması ile çiğ süt, yoğurt ve peyniraltı suyundan 6 adet faj (2 *L.bulgaicus* ve 4 *Streptococcus thermophilus*) izole edilmiştir. Faj izolatlarının identifikasyonu ve konakçı özgüllüğünün belirlenmesi ile karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Fajların kullanımını test etmek amacıyla faja dirençli suşların kombinasyonu ile üretilen 63 adet yoğurt örneği biyokimyasal testlerden geçirilmiş ve 7 panelistin değerlendirmesine sunulmuştur. Sonuç olarak 16 yoğurdun tüketici tercihinine uygun olduğu görülmüştür (Kavas 1997).

Süt endüstrisinde kullanılan starter kültürlerde görülen lizojeni, önemli bir faj kontaminasyon kaynağıdır. Dolayısıyla rotasyonda kullanılacak starter kültürlerin lizojen varlığı test edilmelidir. Yapılan bir çalışmada 30'u çiğ süt, 43'ü pastörize süt, 10'u endüstriyel kökenli 83 adet *Streptococcus thermophilus* suşu; 12'si pastörize süt, 22'si çiğ süt, 5'i endüstriyel kökenli *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, 1 adet *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ATCC 118 ve 1 adet Ch-1b12 endüstriyel *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* suşu ile toplamda 123 adet suş kullanılarak indüksiyon çalışmaları yürütülmüştür. Bu amaçla 123 suşun tamamı farklı konsantrasyonlarda (0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,5 ve 1,0 µg MC/mL) Mitomisin C, UV ve ani sıcaklık değişimine maruz bırakılarak indüklenmiştir. Yapılan analizler sonucunda suşların hiçbirinde lizojeniye rastlanmamıştır (Kahraman 2006).

Başka bir çalışmada da benzer sonuçlara rastlanmıştır. İlgili araştırma kapsamında 30'u çiğ süt kökenli, 9'u ise liyofilize karışık yoğurt kültüründen izole edilen *Streptococcus thermophilus* suşları indüklenmiş ve lizojen suş varlığı belirlenmiştir. Profaj indüksiyon çalışmalarında lizojen *Streptococcus thermophilus* CNRZ 1205 suşu kontrol olarak kullanılmış, uygun mitomisin C konsantrasyonunu tespit etmek amacıyla kontrol suş 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,5 ve 1,0 µg MMC/mL ile muamele edilmiş ve en uygun konsantrasyonların 0,05, 0,1 ve 0,2 µg MMC/mL olduğuna karar verilmiş, diğer suşlar için bu konsantrasyonlar kullanılmıştır. Analiz sonucunda MMC ile indüklenen suşların hiçbirinde lizojeniye rastlanmamıştır (Kaleli 2001).

Gümüştaş (2015), bir çalışmada 4 adet çiğ süt, 1 adet peyniraltı suyu, 4 adet fabrika ve nehir atık suyu ve 2 adet matsoni örneklerinden laktik asit bakterileri ve fajları izole etmiştir. *Lactobacillus* ve *Streptococcus* suşlarına ait 59 adet laktik asit bakterisi konakçı olarak kullanılarak Matsoni örneklerinden MR3, 2C ve çiğ süt örneklerinden SR3, 3C fajları izole

etmiştir. Fajların plak morfolojilerine bakıldığında plak çapları 1-3 mm arasında olduğunu görülmüştür. İzole edilen laktik asit bakterilerinde lizojen varlığı araştırılmıştır. Bu amaçla suşlar, sıvı besiyerine (MRS/M17) son konsantrasyon 0,1g/mL olacak şekilde mitomisin C ilave edilerek indüklenmiş ve *Lactobacillus* suşlarından *Lactobacillus* 59, *Lactobacillus* 53S, *Lactobacillus* 58B’de lizojeniye rastlamıştır.

Fajın konakçısına adsorbsiyonunda pH, sıcaklık, katyonların varlığı gibi birçok faktör etkili olabilmektedir. *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* fajları (BYM, YAB ve lb3) üzerinde yapılan bir çalışmada fajların pH duyarlılığı incelendiğinde oda sıcaklığında (25-30 °C) tüm fajlar için optimum pH 4-8 olduğu bulunmuştur. BYM için Ca^{+2} yokluğunda dahi adsorbsiyon görülürken, Ca^{+2} varlığında ise BYM adsorbsiyonu hızla yükselmiştir. YAB ve lb3’ün adsorbsiyonu için Ca^{+2} iyonunun zorunlu olduğu bulunmuştur. Sıcaklığın adsorbsiyon üzerindeki etkisi YAB ve lb3 üzerinde belirgin değilken sıcaklığın artışı BYM’nin, konakçısına adsorbsiyonunu artırdığı görülmüştür (Quiberoni *et al.* 2004).

Tayyarcan vd (2018), yaptıkları çalışmada çiğ sütte *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* fajlarının tespiti amacıyla raman spektroskopisi ve kemometrik analizin beraber kullanıldığı bir metot geliştirmeyi amaçlamışlardır. İlgili çalışmada önerilen metodun *Streptococcus thermophilus* fajlarının tespitinde nispeten başarılı olduğu *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* faj tespitinde ise daha düşük bir başarı elde edildiği belirtilmiştir.

Faj karakterizasyonunda kullanılan bir diğer metot genom analizidir. Genom analizi tüm genetik yapıyı içerecek şekilde yapılabildiği gibi kısmi genom analizleri de gerçekleştirilebilmektedir. *Streptococcus thermophilus* 231-X10 fajının kısmi genomik karakterizasyonunun gerçekleştirildiği bir çalışmada dizi analizi yapılmış olan bölgede 13 farklı fonksiyonu kodlayan gen bölgesinin olabileceği ortaya koyulmuştur. İlgili fajın cos paketleme sistemine sahip bir faj olduğu ifade edilmiştir (Acar Soykut 2017).

Ma *et al.* (2015) tarafından gerçekleştirilen bir araştırmada, yoğurt üretimi esnasında faj enfeksiyonundan kaçınmak amacıyla kültür tasarımı yapmışlardır. İlgili tasarlama, 1:1 kok-çubuk oranı sağlayacak şekilde, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* lb3 ile 1 adet *Streptococcus thermophilus* (lb3-St1 veya lb3-St9) veya *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* lb3 ile 2 adet *Streptococcus thermophilus* (lb3-St1-St3 veya lb3-St3-St9) olmak üzere iki şekilde planlanmıştır. Böylece 4 adet yoğurt örneği oluşmuştur. Faj enfeksiyonu test etmek amacıyla numunelere, 1×10^3 pob/mL titrede $\phi 101$ ve $\phi 109$ fajları ilave edilmiştir. Araştırma sonucunda; *Streptococcus thermophilus*’un faja duyarlı, dirençli ve *Lactobacillus*

delbrueckii ssp. *bulgaricus*'dan oluşan yoğurt örneklerinde asitleşmenin yavaş, kok/çubuk oranlarının dengesiz ve viskozitenin düşük olduğu görülmüştür. *Streptococcus thermophilus*'un faja duyarlı ve *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*'dan oluşan yoğurt örneklerinde ise tahrip edici etki gözlenmiştir.

Havada bulunan virüslerin tespiti için standart bir prosedür geliştirilememiştir. Verreault *et al.* (2011) yaptıkları bir çalışmada, peynir üretim tesisinde faj varlığını belirlemek amacıyla 0,4µm Polikarbonat filtreler (PC), 0,3µm politetrafloroetilen (PTFE) filtre, NIOSH (National İnstitute for Occupational Safety and Health) tarafından geliştirilen iki aşamalı biyoaerosol siklonu, Coriolis siklon örnekleyicisi ve BioSamplers kullanarak hava örnekleme; svap ile de yüzeyden numune almışlardır. Numuneler, *Lactococcus lactis* faj varlığı için qPCR ile test edilmiştir. Sürüntü alınan yüzey örneklerinin çoğunda 936 ve c2 grubu laktokok fajları tespit edilmiş, hava örneklerinde ise en az 10³ genom/m³ hava konsantrasyonda fajlar tespit edilmiştir. En verimli örnekleyicinin iki aşamalı biyoaerosol siklonu olduğu bulunmuştur.

Wagner *et al.* (2017), yaptıkları bir çalışmada 13 adet peyniraltı suyu tozu ve 5 adet peyniraltı suyu tozu formülasyonlarından izole ettikleri 55 adet *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Leuconostoc pseudomesenteroides* ve *Leuconostoc mesenteroides* fajının stabilite test etmişlerdir. Bu amaçla peyniraltı suyu tozu numuneleri 4°C'de, peyniraltı suyu tozu formülasyonları oda sıcaklığında 4 yıl depolanmıştır. Birinci yılının sonunda ikişer peyniraltı suyu tozu ve formülasyonunda faj tespit edilememiştir. Dört yıl boyunca bir adet peyniraltı suyu tozu formülasyonu ve on bir peyniraltı suyu tozunda fajlar yüksek konsantrasyonlarda hayatta kalabilmişlerdir. Yedi adet peyniraltı suyu tozunda ise neredeyse hiç titre kaybı olmadan canlılıklarını devam ettirebildikleri gözlenmiştir.

Campagna *et al.* (2014) tarafından yapılan bir çalışmada, süt bakteriyofajlarına karşı dezenfektanların etkisi araştırılmıştır. Çalışmada, etanol ve izopropanolun yanı sıra peroksit ve peroksiasit (PPA) karışımları, klorlu ajanlar, kuaterner amonyum bileşikler (QAC; benzalkonyum klorür bazlı), amfoterik bileşikler, iyot bileşikler (iyot bazlı asitler) ve anyonik asit (fosforik asit bazlı) kimyasal ailelerinden seçilen 21 tanesi gıda sınıfı olmak üzere 23 adet kimyasal ürün kullanılmıştır. İlgili kimyasallar laktokok P008 fajına karşı iki farklı konsantrasyonda ve oda sıcaklığında, 2 veya 15 dk süre ile uygulanmıştır. Seçilen en etkili dezenfektanlar; Oxi-B, Oxi-D, Anyonik-B, Anyonik-D ve QAC ise en düşük konsantrasyonda 6 Laktokok (P001, P1532, AF6, CB13, Q54 ve 1358) *Lactobacillus plantarum* B1 ve *Streptococcus thermophilus* 2972 fajına karşı test edilmiştir. Araştırma sonucunda; laktokok Q54 ve 1358, P001 fajlarına ve *Streptococcus thermophilus* 2972 fajına tüm dezenfektanlar etki

ederken *Lactobacillus* faj B1'e Anyonik-B hariç tüm dezenfektanların oldukça etkili olduğu bulunmuştur. Ayrıca süt endüstrisindeki fajlar kanalizasyonda da bulunabileceğinden su dezenfektanı olarak yaygın kullanıma sahip Cl_2 -triazinrion ve BCDMH, laktokok P008, laktokok CB13 ve *Streptococcus thermophilus* 2972'ye uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde kuartern amonyum bileşikleri ve perasetik asit ve asetik asit karışımları en etkiliyken; izopropanol, hipoklorit, iyot, klorlu maddeler ve amfoterik bileşiklerin en etkisiz olduğu bulunmuştur. Yapılan benzer bir çalışmada *Streptococcus thermophilus* fajları (021-4, 021-5, OBJ, 031-D ve CYM) üzerine denenen biyositler içinde perasetik asidin en etkili olduğu tespit edilmiştir (Binetti and Reinheimer 2000). *Lactobacillus delbrueckii* (BYM, YAB, lb3 ve LL-H) fajları için yapılan bazı çalışmalar da bu sonucu desteklemektedir (Quiberoni *et al.* 2003b; Ebrecht *et al.* 2010).

Bu yöntemlere alternatif olarak fotokatalitik işlemler ortaya çıkmıştır. Bu uygulamaya örnek olan titanyum dioksit (TiO_2) düşük maliyeti ve toksik etki göstermemesi gibi özellikleri ile dikkat çekmiştir. Yöntemin test edildiği bir çalışmada; TiO_2 bulunan numuneler 180 dk boyunca UV-A ışınlarına maruz bırakılarak 10 faj (ATCC 15807-B1, 832-B1, 0241, 204, 342, MLC-A, J-1, OBJ, CHD ve QF9) üzerinde fotokatalitik inaktivasyon verileri incelenmiştir. Bunun sonucunda her faj farklı performans eğrileri oluşturmuş; en yüksek inaktivasyon etkinliği bakteriyofaj J-1'de, en düşük inaktivasyon etkinliği faj 342'de gözlenmiştir. Sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde ise UV-A/ TiO_2 muamelesi ile fajların inaktivasyonu sağlanabilmiştir. Ayrıca bu çalışmada, UV-C yerine güvenli kullanım sağlayan UV-A ışınlarının denemesi, başarılı bulunması ve personel varlığında dahi kullanılabilir olması ile işletmelerde pratik bir kullanım sunacağı fikri ortaya konmuştur (Marcó *et al.* 2011).

Yapılan araştırmalar çerçevesinde fajların kontrolü amacıyla korunmuş bölgelerin inhibisyonunun hedeflendiği tespit edilmiştir. Süt endüstrisinde özellikle yoğurt ve çeşitli peynirlerin üretiminde önemli rol oynayan *Streptococcus thermophilus* suşunu enfekte eden fajların bertaraf edilmesi amacıyla tasarlanan antisens RNA plazmit uygulaması buna bir örnektir. Bu işlemde *Streptococcus thermophilus* fajında korunan helikaz geninin translasyonunun engellenmesi hedeflenmektedir. Elde edilen mutantlar incelendiğinde plak oluşturma etkinliğinin %40-70 oranında azaldığı gözlemlenmiştir (Sturino and Klaenhammer 2002). Antisens teknolojisi, ana kapsit proteininin hedeflenmesi ile faj F4-1'e kısmi direncin sağlandığı, faj replikasyon bölgesinin hedeflenmesi ile de P335 grubu fajlara direnç sağlandığı birçok laktokok suşları ve fajlarında da gözlemlenmiştir (Murphy *et al.* 2017).

Common *et al.* (2019), tarafından yapılan bir çalışmada, 30 gün boyunca *Streptococcus thermophilus* ve bir litik faj yüksek oranda çoğaltılmış ve faj-konakçı arasındaki evrim

incelenmiştir. CRISPR kaynaklı direnç ve faj enfeksiyonunun bir yarış içinde olduğu ve bu yarışın fajın yok olması ile sonuçlandığı görülmüştür.

Faj enfeksiyonunda, konakçılarda genom çapında incelenmesi yoğun emek gerektirdiği için nispeten daha az sayıda faj ve konakçı birlikteliğini inceleyen çalışma olduğu görülmektedir. Ayrıca yüzlerce faj bu şekilde karakterize edilememekte, yöntemler sınırlı kalmaktadır. Mutalik *et al.* (2019), bu kısıtlamalara çözüm niteliğinde RB-TnSeq, CRISPRi ve DubSeq olmak üzere üç yeni yöntem geliştirmiştir. Yapılan çalışma, faj enfeksiyonu ve bakteriyel direnç için konakçıya ait kritik genleri tespit etme esasına dayanmaktadır. Bu şekilde daha hızlı, düşük maliyetli ve genom çapında kısmi veriler elde edilebilmektedir.

Bakteriyofajlar, olumsuz etkilerinin yanında süt endüstrisinde bazı patojenlerin kontaminasyonunu baskılamak amacıyla da kullanılabilir. Bu amaçla yapılan mikrokapsülasyon işlemleri de günümüzde oldukça önem kazanmıştır. Ergin (2019), çalıştığı patojenlerin antibiyotiğe direnç kazanmasına karşın sodyum aljinat ve sodyum kazeinat kaplama ile yüksek verimlilik sağlayan ve düşük pH'ya dayanıklı bakteriyofaj mikrokapsülasyonunu amaçlamıştır. Mikrokapsülasyon işleminde konakçısı *Salmonella enterica* ssp. *enterica* (DSM 18522) olan Felix O1 fajı kullanılmıştır. Çalışma esnasında model gıda olarak yoğurt seçilmiş ve içerisine mikrokapsüle ve serbest formdaki Felix O1 fajı ilave edilerek depolamanın 1, 15 ve 30. gününde 5, 60 ve 120 dakika aralıklar ile yapay mide ortamında etkinliği incelenmiştir. İzleme sonucunda, başlangıç değerine kıyasla Felix O1 sayısında azalma meydana gelmiş, 30. günde serbest formdaki Felix O1 tespit edilememiştir. Serbest formdaki Felix O1 içeren yoğurt örneklerindeki titresini mikrokapsüle Felix O1 içeren yoğurt örneklerine kıyasla daha düşük olduğu bulunmuş ve elde edilen sonuçlar mikrokapsülün zarar görmeden yoğurt ile vücuda taşınabileceğini, dolayısıyla mikrokapsülasyon işleminin başarılı olduğunu kanıtlamaktadır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Çalışma kapsamında; 57 adet çiğ süt, 20 adet ev tipi yoğurt, 21 adet endüstriyel yoğurt, 4 adet peyniraltı suyu ve 5 adet fabrika gideri olmak üzere toplamda 107 numune kullanılmıştır. Temin edilen numuneler steril numune kabında ve uygun koşullarda Atatürk Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na getirilmiş ve en kısa sürede analize başlanmıştır. Tablo 2’de numune çeşidi ve temin edildiği yerler görülmektedir.

Tablo 2. Çalışmada kullanılan numune ve temin edildiği yer

Numune No	Numune Çeşidi	Temin Edildiği Yer
1	Çiğ süt	Yakutiye / Erzurum
2	Endüstriyel yoğurt	Yakutiye / Erzurum
3	Çiğ süt	Aziziye / Erzurum
4	Çiğ süt	Yakutiye / Erzurum
5	Fabrika gideri	Yakutiye / Erzurum
6	Fabrika gideri	Yakutiye / Erzurum
7	Endüstriyel yoğurt	Yakutiye / Erzurum
8	Peyniraltı suyu	Yakutiye / Erzurum
9	Endüstriyel yoğurt	Yakutiye / Erzurum
10	Fabrika gideri	Yakutiye / Erzurum
11	Endüstriyel yoğurt	Yakutiye / Erzurum
12	Çiğ süt	Yakutiye / Erzurum
13	Çiğ süt	Yakutiye / Erzurum
14	Çiğ süt	Aziziye / Erzurum
15	Çiğ süt	Palandöken / Erzurum
16	Çiğ süt	Palandöken / Erzurum
17	Endüstriyel yoğurt	Palandöken / Erzurum
18	Çiğ süt	Palandöken / Erzurum
19	Endüstriyel yoğurt	Palandöken / Erzurum
20	Çiğ süt	Yakutiye / Erzurum
21	Ev yapımı yoğurt	Yakutiye / Erzurum
22	Endüstriyel yoğurt	Palandöken / Erzurum
23	Çiğ süt	Palandöken / Erzurum
24	Çiğ süt	Palandöken / Erzurum
25	Ev yapımı yoğurt	Yakutiye / Erzurum
26	Ev yapımı yoğurt	Aziziye / Erzurum
27	Çiğ süt	Palandöken / Erzurum

Tablo 2. (devamı)

28	Çiğ süt	Palandöken / Erzurum
29	Çiğ süt	Palandöken / Erzurum
30	Çiğ süt	Yakutiye / Erzurum
31	Çiğ süt	Yakutiye / Erzurum
32	Çiğ süt	Yakutiye / Erzurum
33	Çiğ süt	Yakutiye / Erzurum
34	Çiğ süt	Yakutiye / Erzurum
35	Çiğ süt	Yakutiye / Erzurum
36	Çiğ süt	Yakutiye / Erzurum
37	Çiğ süt	Yakutiye / Erzurum
38	Çiğ süt	Yakutiye / Erzurum
39	Çiğ süt	Yakutiye / Erzurum
40	Çiğ süt	Yakutiye / Erzurum
41	Çiğ süt	Tortum / Erzurum
42	Çiğ süt	Aşkale / Erzurum
43	Çiğ süt	Aşkale / Erzurum
44	Çiğ süt	Aşkale / Erzurum
45	Çiğ süt	Aşkale / Erzurum
46	Çiğ süt	Pasinler / Erzurum
47	Endüstriyel yoğurt	Yakutiye / Erzurum
48	Çiğ süt	Yakutiye / Erzurum
49	Çiğ süt	Yakutiye / Erzurum
50	Çiğ süt	Yakutiye / Erzurum
51	Endüstriyel yoğurt	Yakutiye / Erzurum
52	Çiğ süt	Yakutiye / Erzurum
53	Endüstriyel yoğurt	Yakutiye / Erzurum
54	Çiğ süt	Yakutiye / Erzurum
55	Çiğ süt	Yakutiye / Erzurum
56	Ev yapımı yoğurt	Palandöken / Erzurum
57	Çiğ süt	Pasinler / Erzurum
58	Çiğ süt	Aziziye / Erzurum
59	Çiğ süt	Aziziye / Erzurum
60	Çiğ süt	Aziziye / Erzurum
61	Endüstriyel yoğurt	Aziziye / Erzurum
62	Çiğ süt	Yakutiye / Erzurum
63	Ev yapımı yoğurt	Palandöken / Erzurum
64	Endüstriyel yoğurt	Yakutiye / Erzurum
65	Çiğ süt	Aşkale / Erzurum
66	Çiğ süt	Yakutiye / Erzurum
67	Çiğ süt	Yakutiye / Erzurum

Tablo 2. (devamı)

68	Çiğ süt	Yakutiye / Erzurum
69	Çiğ süt	Yakutiye / Erzurum
70	Çiğ süt	Yakutiye / Erzurum
71	Ev yapımı yoğurt	Palandöken / Erzurum
72	Ev yapımı yoğurt	Palandöken / Erzurum
73	Fabrika gideri	Yakutiye / Erzurum
74	Çiğ süt	Aşkale / Erzurum
75	Ev yapımı yoğurt	Merkez / Iğdır
76	Ev yapımı yoğurt	Merkez / Bingöl
77	Endüstriyel yoğurt	Merkez / Iğdır
78	Endüstriyel yoğurt	Merkez / Iğdır
79	Ev yapımı yoğurt	Merkez / Bingöl
80	Ev yapımı yoğurt	Merkez / Bingöl
81	Ev yapımı yoğurt	Merkez / Bingöl
82	Çiğ süt	Aziziye / Erzurum
83	Peyniraltı suyu	Aziziye / Erzurum
84	Peyniraltı suyu	Yakutiye / Erzurum
85	Çiğ süt	Yakutiye / Erzurum
86	Fabrika gideri	Aziziye / Erzurum
87	Fabrika gideri	Yakutiye / Erzurum
88	Ev yapımı yoğurt	Merkez / Erzincan
89	Ev yapımı yoğurt	Merkez / Erzincan
90	Ev yapımı yoğurt	Merkez / Erzincan
91	Ev yapımı yoğurt	Merkez / Erzincan
92	Endüstriyel yoğurt	Yakutiye / Erzurum
93	Endüstriyel yoğurt	Yakutiye / Erzurum
94	Endüstriyel yoğurt	Yakutiye / Erzurum
95	Ev yapımı yoğurt	Yakutiye / Erzurum
96	Endüstriyel yoğurt	Yakutiye / Erzurum
97	Endüstriyel yoğurt	Yakutiye / Erzurum
98	Endüstriyel yoğurt	Palandöken / Erzurum
99	Endüstriyel yoğurt	Palandöken / Erzurum
100	Çiğ süt	Yakutiye / Erzurum
101	Çiğ süt	Yakutiye / Erzurum
102	Çiğ süt	Yakutiye / Erzurum
103	Çiğ süt	Yakutiye / Erzurum
104	Ev yapımı yoğurt	Merkez / Trabzon
105	Ev yapımı yoğurt	Merkez / Trabzon
106	Ev yapımı yoğurt	Merkez / Trabzon
107	Endüstriyel yoğurt	Akçaabat / Trabzon

Bakteriyofaj izolasyonu amacıyla konakçı kültür olarak, fizikokimyasal analizleri, makroskopik, mikroskopik ve moleküler tanısı gerçekleştirilmiş 20 adet *Streptococcus thermophilus* ve 26 adet *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* suşu Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. Suş seçimi, koleksiyonda bulunan 294 suştan GTG₅ genetik fingerprint farklılıkları göz önünde bulundurularak yapılmıştır. Konakçı olarak kullanılacak suşlara tekrar canlandırma işlemi uygulanmış ve saflık kontrolleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca çalışmada, 5 adet *Streptococcus thermophilus* (ST1, ST3, ST4, ST5 ve ST6) ve 6 adet *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (M1, M3, M4, M5, M6 ve M7) ticari suşu kullanılmıştır. Çalışma kapsamında konakçı kültür olarak kullanılan *Streptococcus thermophilus* suşları ve *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* suşları Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. Çalışmada kullanılan suş ve kodları

<i>Streptococcus thermophilus</i> suşları		<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> suşları	
İzolat numarası	Temsil Ettiği İzolat Kodu	İzolat numarası	Temsil Ettiği İzolat Kodu
1	43S1	1	34M2
2	S42	2	5M5
3	48S1	3	34M1
4	37S1	4	12M2
5	18S3	5	10M5
6	1S3	6	7M1
7	1S4	7	9M1
8	20S4	8	31M1
9	S10	9	4M2
10	S36	10	26M2
11	20S1	11	16M3
12	YS1	12	M1
13	ST1	13	M3
14	ST3	14	M4
15	ST4	15	M5
16	ST5	16	M6
17	ST6	17	M7
18	11M1	18	YL1
19	S32	19	L14
20	44S1	20	L15
		21	L50
		22	L52
		23	35M3
		24	5M1
		25	15M1
		26	L12

Streptococcus thermophilus ve *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* suşlarından hazırlanan stok kültürler için, fajların izolasyonu, titrelerinin yükseltilmesi, profaj indüksiyonu ve konakçı aralığının belirlenmesi amacıyla Laktobasiller için MRS broth, MRS agar ve MRS yumuşak agar; Streptokoklar için M17 broth, M17 agar ve M17 yumuşak agar kullanılmıştır.

Metot

Faj çalışma metotları genellikle farklı deneylerin birkaç basamaktan oluşan işlemlerini içermektedir. Bu amaçla çalışmamızda kullandığımız deneyler aşağıda sunulmuştur.

- a) Konakçı kültürlerin hazırlanması
- b) Fajların Ön Saflaştırılması ve İzolasyonu
- c) Faj Varlığının Belirlenmesi
- d) Fajın Saflaştırılması
- e) Fajın Zenginleştirilmesi
- f) Titre Belirleme
- g) Konakçı Özgüllüğünün Belirlenmesi
- h) Bakteriyofaj Karakterizasyonu
 - ✓ TEM
 - ✓ RAPD
 - ✓ DNA paketleme mekanizmasının belirlenmesi
 - ✓ HRM işlemleri
- i) Konakçı Hücrelerde Lizojen Suş Varlığının Belirlenmesi
 - ✓ UV (Ultraviyole) ile Profaj İndüksiyonu
 - ✓ Mitomisin C ile Profaj İndüksiyonu
 - ✓ Sıcaklık ile Profaj İndüksiyonu

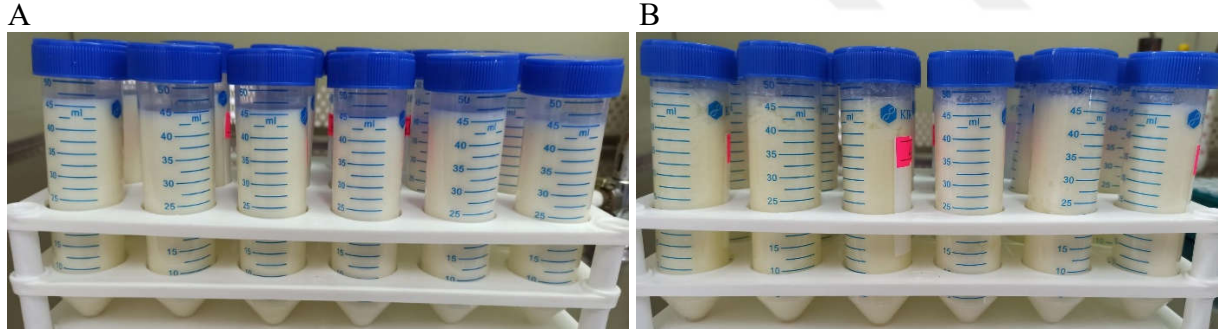
Konakçı kültürlerin hazırlanması

Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü kültür koleksiyonundan temin edilen 20 adet *Streptococcus thermophilus* suşu M17 (Merck) besiyerine, 26 adet *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* suşu ise MRS (Merck) besiyerine 3'lü çizim yapılarak canlandırma işlemine tabi tutulmuştur. Petriler 37°C'de, 2-3 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda oluşan kolonilerin saflığı kontrol edilmiş, makroskopik ve mikroskop olarak incelenmiştir. Tipik *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* morfolojisine sahip suşlar çalışmada kullanılmıştır. 5 adet liyofilize yoğurt kültürü Streptokoklar için M17 sıvı besiyerinde, Laktobasiller için ise MRS sıvı besiyerinde 18 saat boyunca çoğaltılmış ve besiyerine (M17/MRS) 3'lü çizim

yapılarak 37°C’de 2-3 boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonu takiben her suş için tek koloni yeni besiyerine (M17/MRS) çizilerek saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiş ve 37°C’de 2-3 gün boyunca inkübasyona tabi tutulmuştur. Süre sonunda oluşan kolonilerin saflığı kontrol edilmiş, makroskobik ve mikroskop olarak incelenmiştir. Tipik *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* koloni görüntüsüne sahip suşlar çalışmada kullanılmıştır.

Fajların ön saflaştırılması ve izolasyonu

Çiğ süt numunelerine, kazeinin çöktürülmesi amacıyla 100 mL süte %10’luk laktik asitten 6 mL ilave edilmiş ve bir süre çökmesi beklenmiştir (Şekil 7) (Lembke *et al.* 1980). Yoğurt örnekleri %50 oranında saf su ile seyreltilmiş, peyniraltı suyu örneklerine herhangi bir ön işlem uygulanmamıştır. Hazırlanan örnekler, 6000 rpm’de 10 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant 0,45 µm şırınga filtreden geçirilmiştir. Steril tüplere; 1 mL elde edilen süzöntü, 0,1 mL 4 saatlik konakçı kültür ve 0,5 mL 3x sıvı besiyeri (MRS/M17) ilave edilerek 37°C’de 18 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda süzöntüler 6000 rpm’de 10 dk santrifüj edilmiş ve süpernatanta hacminin %10’u kadar kloroform ilave edilmiştir (Durlu 1991; Acar Soykut 2007). Böylece, işlem sonunda üründe var olabilecek fajların ön geliştirme aşaması tamamlanmıştır.



Şekil 7. Denemede kullanılan süt örnekleri. A: laktik asit ilavesiz B: Laktik asit ilaveli

Faj varlığının belirlenmesi

Önceden hazırlanmış besiyeri (MRS/M17) üzerine, içinde 0,1 mL 4 saatlik inkübasyona tabi tutulmuş konakçı bakterinin bulunduğu 3 mL yumuşak agar (%0,2 agar ilaveli) (Merck) yayılmış ve katılaşması için bir süre beklenmiştir. Katılaşan karışım üzerine, elde edilen süpernatanttan 5 µL damlatılmış ve 37°C’de 18 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda damlatma işlemi yapılan noktada oluşan berrak zonlar (plak) faj varlığının göstergesi olarak değerlendirilmiştir (Quiberoni *et al.* 2003a).

Fajın saflaştırılması

“Fajların Ön Saflaştırılması ve İzolasyonu” aşamasında elde edilen süpernatantın 10⁻⁶'ya kadar SM buffer (100mM NaCl, 8mM MgSO₄, 50mM Tris-HCl; pH 7.5, %0,01 jelatin, 1 mL dH₂O) ile dilüsyonları hazırlanmıştır. Her bir dilüsyondan 0,2'şer mL steril tüplere alınmış ve üzerine 0,2 mL 4 saatlik konakçı kültür eklenerek adsorbsiyonu için 10 dk beklenmiştir. Elde edilen karışım 3 mL yumuşak agara (MRS/M17) ilave edilip önceden hazırlanmış besiyerine (MRS/M17) dökülmüş ve 37°C'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda plaklar, tek düştüğü bölgeden pipet yardımıyla kesilerek içinde 1 mL SM buffer bulunan steril tüpe alınmıştır. Fajın sıvı ortama geçmesi için 150 dev./dk'da 2 saat boyunca çalkalama işlemine tabi tutulmuştur. Ardından tüp içerisine 1 mL sıvı besiyeri ve 20 µL konakçı kültür ilave edilerek 37°C'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda hücre artıklarını uzaklaştırmak amacıyla karışım 8000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Karışım önce 0,45 µm şırınga filtreden, daha sonra 0,22 µm şırınga filtreden geçirilmiştir (Gencay *et al.* 2017).

Fajın zenginleştirilmesi

Saflaştırılan fajın zenginleştirilmesi amacıyla; içerisinde konakçı bakterinin bulunduğu 3 mL yumuşak agar, önceden hazırlanmış olan besiyeri üzerine dökülmüş ve katılaşması için bir süre beklenmiştir. Saf faj filtratı, katılaştıran karışım üzerine yoğun olarak damlatılmış ve 37°C'de 18 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda besiyeri üzerine 3 mL SM buffer ilave edilmiş ve çalkalamalı inkübatörde 120 rpm'de 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda yüzey, drigalski spatülü ile kazınarak 15 mL'lik falkona alınmıştır. Falkon, 10000 rpm'de 10 dk santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Elde edilen süpernatant önce 0,45 µm şırınga filtreden, daha sonra 0,22 µm şırınga filtreden geçirilmiştir (Cahan 2019).

Titre belirleme

Zenginleştirilmiş faj süspansiyonlarının 10⁻⁸'e kadar SM buffer içinde dilüsyonları hazırlanmıştır. İçerisinde 0,1 mL konakçı bakterinin bulunduğu 3 mL yumuşak agar, önceden dökülmüş besiyeri (MRS/M17) üzerine ilave edilmiştir. Üst tabakanın katılaşmasını takiben hazırlanmış olan her bir faj dilüsyonundan 10'ar µL damlatılmış ve 37°C'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Faj titresi pob/mL (plak oluşturan birim/mL) cinsinden, dilüsyon faktörü göz önünde bulundurularak aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır (Mazzocco *et al.* 2009) Faj süspaniyonları, 0,45 µm şırınga filtreden geçirilerek 4°C'de, %50 gliserol ve sıvı besiyeri (MRS/M17) ile -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

Faj titresi (pob/mL)= dilüsyon faktörü x faj plak sayısı x kullanılan hacmin mL seyrelme faktörü

Konakçı özgüllüğünün belirlenmesi

Fajların konakçı özgüllüklerinin belirlenmesi için izole edilen fajlar ile Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü kültür koleksiyonunda bulunan *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* suşları kullanılmıştır. Çalışma kapsamında her bir *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* fajı, koleksiyondaki her iki cinse ait suşlar ile test edilmiştir. Bu amaçla, içinde *Streptococcus thermophilus* veya *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* konakçısının bulunduğu 3 mL yumuşak agar önceden hazırlanmış besiyeri (MRS/M17) üzerine dökülmüş ve katılaşması beklenmiştir. Yumuşak agarın katılaşmasını takiben her bir faj süspansiyonundan 10'ar µL damlatılarak 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda plakların görülmesi konakçı bakterinin faja karşı duyarlı olduğunu; plak oluşmaması ise dirençli olduğunu göstermektedir. Böylece faja dirençli suşlar tespit edilerek, konakçı aralığı saptanmış ve cinsler arasında heterolog konakçı varlığı da belirlenmiştir (Kutter 2009).

Bakteriyofaj karakterizasyonu

Çalışmada izole edilen virüslerin karakterizasyonunda, morfolojilerinin belirlenmesi ve moleküler yöntemlerle çeşitlilikleri ortaya koyulmaya çalışılmıştır. Bu amaçla; TEM, RAPD, DNA paketleme mekanizmasının belirlenmesi ve HRM işlemleri gerçekleştirilmiştir. Çalışma kapsamında kullanılan bu metotlar aşağıda sunulmuştur.

Transmisyon Elektron Mikroskopu (TEM) ile virüslerin görüntülenmesi

Zenginleştirme işlemi tamamlanmış ($>10^8$ pob/mL) faj süspansiyonundan 100 µL alınarak tüplere konulmuş ve hizmet alımının gerçekleştirileceği ilgili laboratuvara (DAYTAM, Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi) ulaştırılmıştır. Karbon kaplı bakır gridler üzerine her bir faj örneğinden 5 µL damlatılmış ve kuruması için 10 dk beklenmiştir. Ardından gridler 5 µL ddH₂O su ile yıkanmıştır. Fazla su filtre kağıdı ile uzaklaştırılmıştır. Suyla yıkama işlemi toplam iki defa olmak üzere gerçekleştirilmiştir. Yıkama işlemini takiben gridlere 5 µL %2'lik (pH 4) Uranil asetat boyası damlatılarak negatif boyama yapılmıştır. Hazırlanan numuneler 1 gece boyunca kurumaya bırakılmıştır. Kuruma işlemi tamamlanan numuneler TEM (Hitachi HT-7700, Japonya) ile 100 kV hızlandırıcı voltaj altında 70.000x büyütme elde edilecek şekilde görüntülenmiştir (Suárez *et al.* 2002; Nale *et al.* 2012).

Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA PCR (RAPD PCR) analizi

Genetik temelli DNA analizlerinin gerçekleştirilmesi amacıyla saflaştırılan bakteriyofajların DNA'sı izole edilmiştir. DNA izolasyonu amacıyla QIAamp DNA Mini Kit

(Cat. No. 51304) kullanılmıştır. Kite önerilen protokole göre; 500 µL faj süspansiyonu 1,5 mL'lik tüpe alınmıştır. Üzerine 180 µL ATL buffer ve 20 µL Proteinaz K eklenerek ısıtıcı blok yardımı ile 56°C'de tamamen parçalanana kadar (1-3 saat) inkübe edilmiştir. Süre sonunda üzerine 200 µL AL buffer ekleyerek 15 s vortekslenmiştir. Karışım 70 °C'de ısıtıcı blokta 10 dk inkübe edilmiştir. Kapaktaki damlaları gidermek amacıyla tüp kısa süreliğine santrifüjlenmiştir. Üzerine 200 µL %96-100'lük etanol eklenerek 15 s vortekslenmiştir. Kapaktaki damlaları gidermek amacıyla tüp kısa süreliğine santrifüjlenmiştir. Tüp içeriği 2 mL'lik spin kolona aktararak kolon toplama tüpüne yerleştirilmiş ve 6000g'de (8000 rpm) 1 dk santrifüjlenmiştir. Süre sonunda toplama tüpü atılmıştır. Spin kolon ise yeni bir toplama tüpüne yerleştirilmiştir. Üzerine 500 µL AW1 buffer eklenerek 6000g'de (8000 rpm) 1 dk santrifüjlenmiştir. İşlem sonunda toplama tüpü atılmıştır. Spin kolon ise yeni bir toplama tüpüne yerleştirilmiştir. Kolon üzerine 500 µL AW2 buffer eklenerek tam hızda (20000g ya da 14000 rpm) 3 dk santrifüjlenmiştir. Süre sonunda toplama tüpü atılmıştır. Spin kolon ise yeni bir toplama tüpüne yerleştirilmiştir. Tam hızda 1 dk santrifüjleme işlemine tabi tutularak AW2 buffer'ın kolonda kalma olasılığı ortadan kaldırılmıştır. Spin kolon yeni bir 1,5 mL'lik tüpe yerleştirilmiştir. Üzerine 200 µL distile su eklenerek oda sıcaklığında 1 dk inkübasyona bırakılmıştır. DNA'yı ayırtmak için 6000g'de (8000 rpm) 1 dk santrifüjlenmiştir.

Yukarıda belirtildiği üzere elde edilen faj DNA'ları RAPD PCR analizi ile karakterize edilmiştir. Bu amaçla virüs genom analizinde kullanılan P1 (5'-CCGCAGCCAA-3'), P2 (5'-AACGGGCAGA-3') ve OPL5 (5'-ACGCAGGCAC-3') olmak üzere 3 adet primerden yararlanılmıştır (Guitérrez *et al.* 2011). PCR işlemi master mix üretici firmanın önerdiği protokol çerçevesinde gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla PCR karışımı; 2 µL primer (P1, P2 ve OPL5) 2 µL template DNA, 12,5 µL master mix (2X HS Mastermix Clear) ve 8,5 µL deiyonize su ile toplam hacim 25 µL olacak şekilde hazırlanmıştır. PCR işlemi protokolü ise; 94 °C'de 5 dk ilk denatürasyon, ardından 35 siklus olacak şekilde 94 °C 30 saniye denatürasyon, P1 ve OPL5 için 41 °C, P2 için 43 °C'de 30 saniye bağlanma, 72 °C'de 3 dakika uzama ve son olarak 72 °C'de 5 dakika son uzama şeklinde uygulanmıştır. PCR işleminin ardından yükleme tamponu ilave edilen karışım %1'lik agaroz jele yüklenmiş ve marker eşliğinde (Thermo Scientific, SM0333) 70V'luk gerilimde 3 saat boyunca yürütülmüştür. Agaroz jel ortamında mevcut bantlar UV ışık altında gözlenmiştir (Sigma, T2202).

DNA paketleme mekanizmasına göre faj karakterizasyonu

Elde edilen bakteriyofajların total genomik DNA'ları yukarıda belirtildiği üzere kit sistemi kullanılarak izole edilmiştir. Template DNA'lar mevcut literatür ışığında faj

karakterizasyonunda kullanılan 4 farklı DNA paketleme mekanizmasının hedef alındığı bölge primerleri kullanılarak incelenmiştir. Çalışmada kullanılan primerler Tablo 4’te verilmiştir.

Tablo 4. Çalışmada kullanılan 4 farklı DNA paketleme bölgesi primerleri ve özellikleri

Faj grubu	Primer 5’-3’	Amplikon uzunluğu (bp)	Bağlanma sıcaklığı (°C)	Referans
Cos	F: GGTTCACGTGTTTATGAAAAATGG R: AGCAGAATCAGCAAGCAAGCTGTT	170	60	(Quiberoni <i>et al.</i> 2006)
Pac	F: GAAGCTATGCGTATGCAAGT R: TTAGGGATAAGAGTCAAGTG	427	54	(Quiberoni <i>et al.</i> 2006)
987	F: TCTGTACCTGTCTTGTTG R: GTTTGGGGAGATGGTATT	641	51	(Szymczak <i>et al.</i> 2019)
5093	F: CTGATGCTGGACAAACT R: CACCTCCGAATTTAACAAC	321	51	(Szymczak <i>et al.</i> 2019)

Bu amaçla PCR karışımı; ilgili DNA paketleme bölgesi primerlerinden F ve R olmak üzere 1’er µL primer, 1 µL template DNA, 15 µL mastermix (2X HS Mastermix Clear) ve 13 µL deiyonize su ile toplam hacim 30 µL olacak şekilde hazırlanmıştır. PCR prosedürü 95 °C’de 10 dk ilk denatürasyon, ardından 35 siklus olacak şekilde 95 °C’de 30 saniye denatürasyon, ilgili sıcaklıkta (Tablo 4) 45 saniye bağlanma, 72 °C’de 45 saniye uzama ve son olarak 72 °C’de 10 dakika son uzama şeklinde uygulanmıştır. Ardından PCR karışımı yükleme tamponu ile %0,8’lik agaroz jele yüklenmiş ve marker eşliğinde (Solis BioDyne, 07-11-00050) 70V’luk gerilimde 3 saat boyunca yürütülmüştür. Yürüme sonrası agaroz jel transilluminatör kullanılarak görüntülenmiştir (Sigma, T2202). Denemede lizojenik *Streptococcus thermophilus* ATCC 19258 suşu pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Real-Time PCR HRM ile faj karakterizasyonu

Fajların karakterizasyonu için RT-PCR HRM işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla “DNA Paketleme Mekanizmasına Göre Faj Karakterizasyonu” başlığında belirtilen analiz gerçekleştirilmiş, izole edilen fajlardan 9’unda sadece cos bölgesi tespit edilmiş, diğer 1 tanesinde ise çalışılan bölgelerden hiçbiri belirlenememiştir. Bu nedenle çalışmada, DNA paketleme mekanizması uc bölgelerinden ve karakterizasyonda kullanılan “cos” sekansı hedef alınmıştır. Bu amaçla PCR karışımı; 0,5 µL F 5’-GGTTCACGTGTTTATGAAAAATGG-3’ ve 0,5 µL R 5’-AGCAGAATCAGCAAGCAAGCTGTT-3’ primerleri, 1 µL template DNA, 3 µL EvaGreen PCR master mix (5x HOT FIREPol EvaGreen qPCR SuperMix) ve 10 µL deiyonize su ile toplam hacim 15 µL olacak şekilde hazırlanmıştır. PCR prosedürü 95 °C’de 12 dk ilk

denatürasyon, ardından 35 siklus olacak şekilde 95°C’de 15 saniye denatürasyon, 60°C’de 30 saniye bağlanma, 72°C’de 30 saniye uzama ve son olarak 72°C’de 10 dakika son uzama şeklinde uygulanmıştır. PCR işlemini takiben gerçekleştirilen HRM prosedürü; 70°C’den 90 °C’ye 0,5°C/2 sn tedrici sıcaklık artışı olacak şekilde uygulanmıştır. HRM analizi sonucu elde edilen verilerin işlenmesi ve numunelerin bu veriler yardımıyla gruplandırılması amacıyla faj izolatlarının PCA (Principal Component Analysis) işlemi ScreenClust software package programı (Rotor-Gene ScreenClust HRM Software, Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. HRM metodunun kullanıldığı çalışmalarda farklı ampikon uzunluğunun çalışıldığı görülmekle beraber kullanmış olduğumuz 5x HOT FIREPol EvaGreen qPCR SuperMix ürün kılavuzunda 500 bp’ye kadar yüksek performans alınabileceği belirtilmiştir (Solis BioDyne).

Lizogen suş varlığının belirlenmesi

Lizojen suşların varlığı 3 farklı indüksiyon metodu kullanılarak tespit edilmiştir. Bunlar aşağıda sunulmuştur. Lizojen suşların varlığını belirlemek amacıyla *Streptococcus thermophilus* ATCC 19258 suşu kontrol olarak kullanılmıştır. Ayrıca çalışmada kullanılan tüm konakçı suşları lizojeni varlığının tespiti amacıyla pac primerleri kullanılarak PCR işlemine tabi tutulmuştur. PCR protokolü “DNA Paketleme Mekanizmasına Göre Faj Karakterizasyonu” başlığında belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

UV (Ultraviyole) ile profaj indüksiyonu

Bu amaçla Kahraman (2006), tarafından önerilen metot modifiye edilerek kullanılmıştır. Analizde kullanılan her bir *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* suşunun 18 saatlik aktif kültürü 5 mL sıvı besiyerine (MRS/M17) %2 oranında ilave edilmiş ve 600 nm’de optik yoğunluğu 0,2 absorbansa gelinceye kadar 37°C’de inkübe edilmiştir. İstenen absorbansa ulaşıldığında tüp, 5000 rpm’de 10 dk santrifüj edilmiştir. İşlem sonunda süpernatant uzaklaştırılmış, bakteri peletleri 1,12 mL 0,1 M MgSO₄ çözeltisi ile süspanse edilmiştir. Ardından 6 adet 96’lık mikropate’lere her bir bakteri süspanسیونundan 0,1 mL ilave edilmiştir. Mikropate’ler sırasıyla 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 saniye süreyle 35 cm mesafeden 254 nm dalga boyundaki UV’ye maruz bırakılmıştır. 1 adet mikropate ise negatif kontrol amacıyla UV’ye maruz bırakılmamıştır. UV işleminin ardından kuyucuklara 0,1 mL 2x sıvı besiyeri (MRS/M17) ilave edilmiş ve kültürler ışık tamir mekanizmasından kaçınmak üzere 15 dk karanlık ortamda bekletilmiştir. İndüklenen kültürler, 8 saat boyunca 37°C’de inkübasyona bırakılarak 1 saatlik periyotlar ile 600 nm’de absorbansı

ölçülmüştür. Süre ve absorbans değerleri ile oluşturulan grafikte absorbans değerlerinde gözlenen düşüş, lizis olarak değerlendirilmiştir.

Mitomisin C (MMC) ile profaj indüksiyonu

İndüklenecek her bir *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* suşunun 18 saatlik aktif kültüründen %2 oranında besiyerine (MRS/M17) ilave edilmiş ve optik yoğunluğu OD=600 nm'de 0,2 absorbansa ulaşana kadar 37°C'de inkübe edilmiştir. Tüm konakçı suşları 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 ve 1,0 µg/mL oranında MMC ilaveli sıvı besiyerinde 37°C'de mikrotelaterde inkübasyona bırakılmıştır. 1 saatlik periyotlar ile 8 saat boyunca 600 nm'de absorbansları ölçülmüştür. Süre ve absorbans değerleri ile oluşturulan grafikte absorbans değerlerinde gözlenen düşüş, lizis olarak değerlendirilmiştir. Çalışmada *Streptococcus thermophilus* ATCC 19258 suşu kontrol olarak kullanılmıştır (Kahraman 2006).

Sıcaklık ile profaj indüksiyonu

5 mL sıvı besiyeri (MRS/M17) içeren tüplere, 37°C'de 18 saat geliştirilmiş aktif *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* suşlarından %2 oranında ilave edilmiş ve 45°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresince spektrofotometre ile 600 nm'de 8 saat boyunca 1 saatlik periyotlar ile absorbansı ölçülmüştür. Süre ve absorbans değerleri ile oluşturulan grafikte absorbans değerlerinde gözlenen düşüş, lizis olarak değerlendirilmiştir (Kahraman 2006).

İstatistiksel analizler

Çalışmada elde edilen veriler SPSS for Windows Release ver. 16.00 paket programı kullanılarak istatistiksel analiz sonuçları elde edilmiştir (SPSS Inc. Chicago, IL. ABD). Faj izolatlarının cos bölgesine kullanılarak elde edilen HRM verileri için PCA (Principal Component Analysis) işlemi ScreenClust software package programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

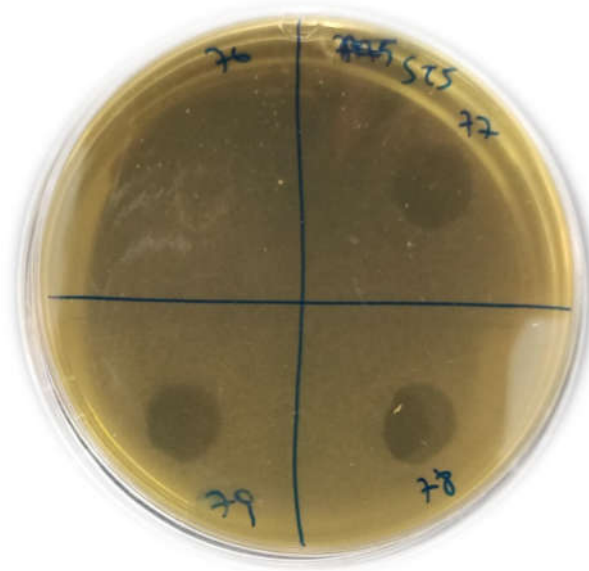
Çalışma kapsamında *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* fajlarının izolasyonu amacıyla Erzurum, Bingöl, Erzincan, Iğdır ve Trabzon illeri ve ilçelerinden temin edilen 57 adet çiğ süt, 20 adet ev tipi yoğurt, 21 adet endüstriyel yoğurt, 4 adet peyniraltı suyu ve 5 adet fabrika gideri olmak üzere toplamda 107 adet numune faj varlığı açısından incelenmiştir. Çalışmada kullanılan numunelerin 6 tanesinde faj tespit edilmiştir. Bu durumda örneklerin %5,6'sında faj varlığının tespit edildiği görülmektedir. Elde edilen fajlar izolasyon, zenginleştirme, konakçı aralığının belirlenmesi açısından incelenmiş ve karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Ayrıca çalışmada kullanılan konakçı bakteriler lizojeni açısından test edilmiştir.

Faj izolasyonu ve zenginleştirilmesi

Materyal yöntem kısmında sunulan aşağıdaki başlıklar konu bütünlüğü göz önünde bulundurularak bu başlık altında sunulmuştur;

- a) Konakçı kültürlerin hazırlanması
- b) Fajların Ön Saflaştırılması ve İzolasyonu
- c) Faj Varlığının Belirlenmesi
- d) Fajın Saflaştırılması
- e) Fajın Zenginleştirilmesi
- f) Titre Belirleme

Konakçı olarak kullanılan 20 adet *Streptococcus thermophilus* suşundan 3 tanesi faj tarafından enfekte olurken; 26 adet *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* suşundan hiçbirinde faj enfeksiyonu görülmemiştir. Fajların ön saflaştırılması işlemi ardından elde edilen örneklerle ait muhtemel faj varlığını gösteren plakların gözlendiği besiyeri Şekil 8'de görülmektedir.



Şekil 8. Fajların ilk belirlenmesi aşamasında konakçı hücreye (*Streptococcus thermophilus* ST5) etki eden ve muhtemel faj varlığı saptanan numuneler (77,78 ve 79)

Çalışmada 107 adet numune kullanılmış olup bunlardan Tablo 5'te 77, 78, 79, 86, 94 ve 97 numaralı örneklerde faj tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılan *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* suşlarının herhangi birini lize eden faja rastlanmamıştır. Öte yandan *Streptococcus thermophilus* suşlarından ise ST1, ST3 ve ST5 için faj hassasiyeti görülmüş ve 6 farklı örnekten izolasyon gerçekleştirilmiştir. Bakteriyofaj izolasyonu gerçekleştirilen örneklerin büyük bir çoğunluğunun (%90) yoğurt kaynaklı olduğu dikkat çekmektedir.

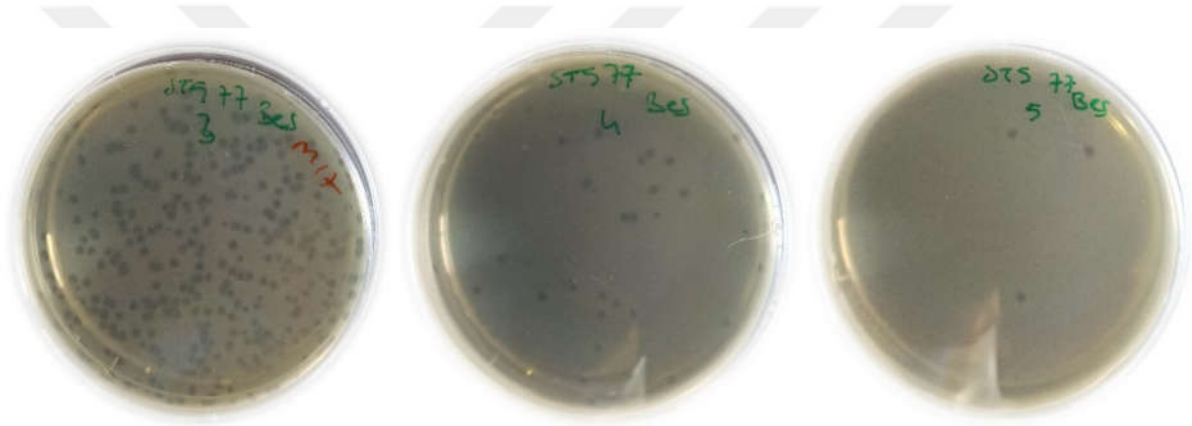
Tablo 5. Faj izolasyonunun gerçekleştirildiği konakçı hücre ve numuneler

Faj kodu	Konakçı hücre	Numune kaynağı - kodu
ST1-78	<i>Streptococcus thermophilus</i> ST1	Endüstriyel yoğurt - 78
ST3-86	<i>Streptococcus thermophilus</i> ST3	Fabrika gideri - 86
ST3-94	<i>Streptococcus thermophilus</i> ST3	Endüstriyel yoğurt - 94
ST3-97B	<i>Streptococcus thermophilus</i> ST3	Endüstriyel yoğurt - 97
ST3-97K	<i>Streptococcus thermophilus</i> ST3	Endüstriyel yoğurt - 97
ST5-77	<i>Streptococcus thermophilus</i> ST5	Endüstriyel yoğurt - 77
ST5-78	<i>Streptococcus thermophilus</i> ST5	Endüstriyel yoğurt - 78
ST5-79	<i>Streptococcus thermophilus</i> ST5	Ev yapımı yoğurt - 79
ST5-94B	<i>Streptococcus thermophilus</i> ST5	Endüstriyel yoğurt - 94
ST5-94K	<i>Streptococcus thermophilus</i> ST5	Endüstriyel yoğurt - 94

Denemede sadece *Streptococcus thermophilus* konakçısına özgün 10 adet faj izole edilebilmiş olup *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*'a özgün faj izole edilememiştir. Benzer durum

bazı çalışmalarda da görülmekle beraber (Acar Soykut 2007), her iki faj grubunun da izole edilebildiği çalışmalar da mevcuttur (Suárez *et al.* 2002). Ancak konu ile ilgili çalışmalarda *Streptococcus thermophilus* fajlarının daha yoğun izole edilebildiği görülmektedir. Yoğurt fajlarına yönelik araştırmaların büyük bir çoğunluğu *Streptococcus thermophilus* suşuna yoğunlaşmaktadır (Marcó *et al.* 2019). Öte yandan *Lactobacillus* fajlarında tam faj partiküllerinin daha az sıklıkla izole edildiği de bilinmektedir (Ebrecht *et al.* 2010).

Çalışmada ilk aşamada faj varlığı tespit edilen 8 adet faj süspansiyonunun dilüsyonları hazırlanmış ve çift tabakalı agar yöntemiyle faj plaklarının tek düşmesi sağlanmıştır. Fajlar her bir süspansiyondan “tek plak izolasyonu” yöntemiyle saflaştırılmıştır. Tek faj plaklarının görüntüsü Şekil 9’da verilmiştir.

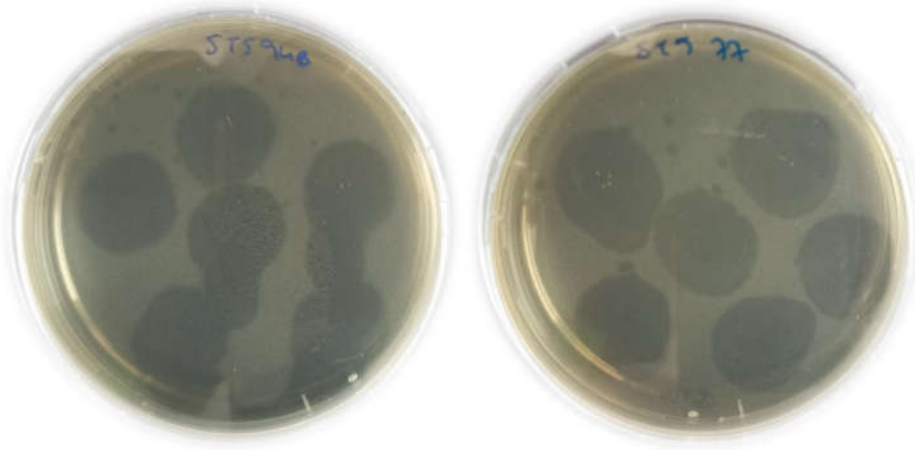


Şekil 9. ST5-77 fajına ait saflaştırma işleminde M17 besiyerinde gözlenen plaklar

Konakçısı ST3 olan 97 numaralı ve konakçısı ST5 olan 94 numaralı yoğurt örneğinden elde edilen faj süspansiyonlarında büyük ve küçük olmak üzere iki farklı boyutta plak görülmüş ve farklı bir faj olabileceği düşünülerek saflaştırılmıştır.

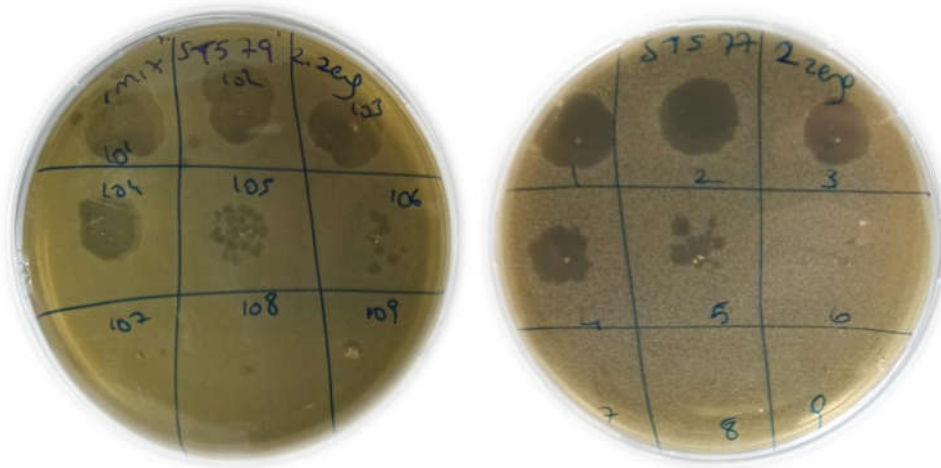
Faj varlığının belirlenmesinde kullanılan 43S1, 48S1, 1S4, 1S3, S10 ve ST6 suşları ile inokule edilmiş besiyerlerinde plak benzeri yapılar gözlenmiş ancak tekrarlanabilir sonuçlar elde edilemediği için çalışmaya dâhil edilememiştir. Bu durumun örneklerde antibiyotik varlığı gibi nedenlerden oluşabileceği düşünülmüştür.

İlgili literatür incelendiğinde örneklerden elde edilen ve saflaştırılan bakteriyofajların ileriki aşamalarda kullanılmak üzere zenginleştirildiği görülmektedir. Aşağıdaki görselde (Şekil 10) zenginleştirme işlemi ardından elde edilen besiyerleri ve ilgili plaklar görülmektedir.



Şekil 10. ST5-94B ve ST5-77 fajlarının zenginleştirme işlemine ait besiyeri ve plakları

Bakteriyofaj çalışmalarında birçok deneyin sağlıklı olarak yapılabilmesi için faj titresinin (sayı) belirlenmesi ve gerektiği durumlarda ilgili titre seviyesinin sağlanması gerekmektedir. Aşağıdaki şekilde (Şekil 11) ST5-77 ve ST5-79 faj suşlarına ait petri plakları görülmektedir. İlgili görselde (Şekil 11) 2. zenginleştirmeye ait plaklar incelendiğinde ST5-77 fajının titresi 2×10^8 ve ST5-79 fajının titresi 9×10^8 pob/mL seviyesinde olduğu görülmektedir.



Şekil 11. ST5-77 ve ST5-79 fajlarına ait 2. zenginleştirme plakları

Çalışmada elde edilen ve ilgili deneylerde kullanılan faj titre değerleri aşağıdaki tabloda (Tablo 6) sunulmuştur. Tabloda görüldüğü üzere ST5-78 ve ST5-79 suşlarının 10^9 seviyesine ulaşabildiği ancak diğerlerinin ise genel olarak 10^8 seviyesinde kaldığı görülmektedir. Öte yandan ST3-97B fajının titre yükseltme çalışmalarına diğerlerine göre nispeten daha az cevap verdiği tespit edilmiştir.

Tabloda gözlenen bir diğer durum denemede kullanılan toplam 20 *Streptococcus thermophilus* suşundan 3'ünün (ST1, ST3 ve ST5) faj hassasiyetine sahip olduğudur.

Tablo 6. Çalışmada elde edilen fajlar ve zenginleştirme sonrası titre değerleri

Faj kodu	Faj titresi (pob/mL)
ST1-78	$2,0 \times 10^8$
ST3-86	$1,0 \times 10^8$
ST3-94	$3,0 \times 10^8$
ST3-97B	$5,0 \times 10^7$
ST3-97K	$1,0 \times 10^8$
ST5-77	$5,0 \times 10^8$
ST5-78	$1,1 \times 10^9$
ST5-79	$1,0 \times 10^9$
ST5-94B	$4,0 \times 10^8$
ST5-94K	$6,0 \times 10^8$

Konakçı özgüllüğünün belirlenmesi

Çalışmada izole edilen fajların konakçı özgüllüklerinin belirlenmesi amacıyla Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü kültür koleksiyonunda bulunan 20 adet *Streptococcus thermophilus* ve 26 adet *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* olmak üzere toplam 46 yoğurt bakterisine duyarlılık testi gerçekleştirilmiştir. İlgili sonuçlar aşağıdaki tablolarda (Tablo 7 ve Tablo 8) sunulmuştur. Tablolar incelendiğinde *Streptococcus thermophilus* suşlarının %70'inin izole edilen fajlara dirençli olduğu görülmektedir. *Streptococcus thermophilus* ST5 suşu 7 farklı fajın enfeksiyonuna maruz kalmasıyla birlikte en hassas suş olduğu görülmüştür.

Tablo 7. Bakteriyofaj izolatlarının *Streptococcus thermophilus* konakçı özgüllüğü

Suş Kodu	Faj Kodu									
	ST1-78	ST3-86	ST3-94	ST3-97B	ST397K	ST577	ST578	ST579	ST594B	ST594K
YS1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ST5	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
20S1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ST4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43S1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
S36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18S3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1S3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37S1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ST6	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
ST4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1S4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ST1	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
ST3	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
S10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
48S1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11M1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44S1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gruplandırma*	a	b	b	c	d	e	e	f	e	g

+: faja hassas, -:faja dirençli, *:aynı harfler benzer konakçı özgüllüğünü göstermektedir

Lactobacillus delbrueckii ssp. *bulgaricus* suşlarının ise *Streptococcus thermophilus* fajlarına karşı dirençli olduğu belirlenmiş ve heterolog konakçı varlığı tespit edilmemiştir.

Tablo 8. Bakteriyofaj izolatlarının *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* konakçı özgüllüğü

Suş Kodu	Faj Kodu									
	ST178	ST386	ST394	ST397B	ST397K	ST577	ST578	ST579	ST594B	ST594K
34M2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5M5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34M1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12M2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10M5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7M1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9M1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31M1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4M2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26M2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16M3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15M1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
YL1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tablo 8. (devam)

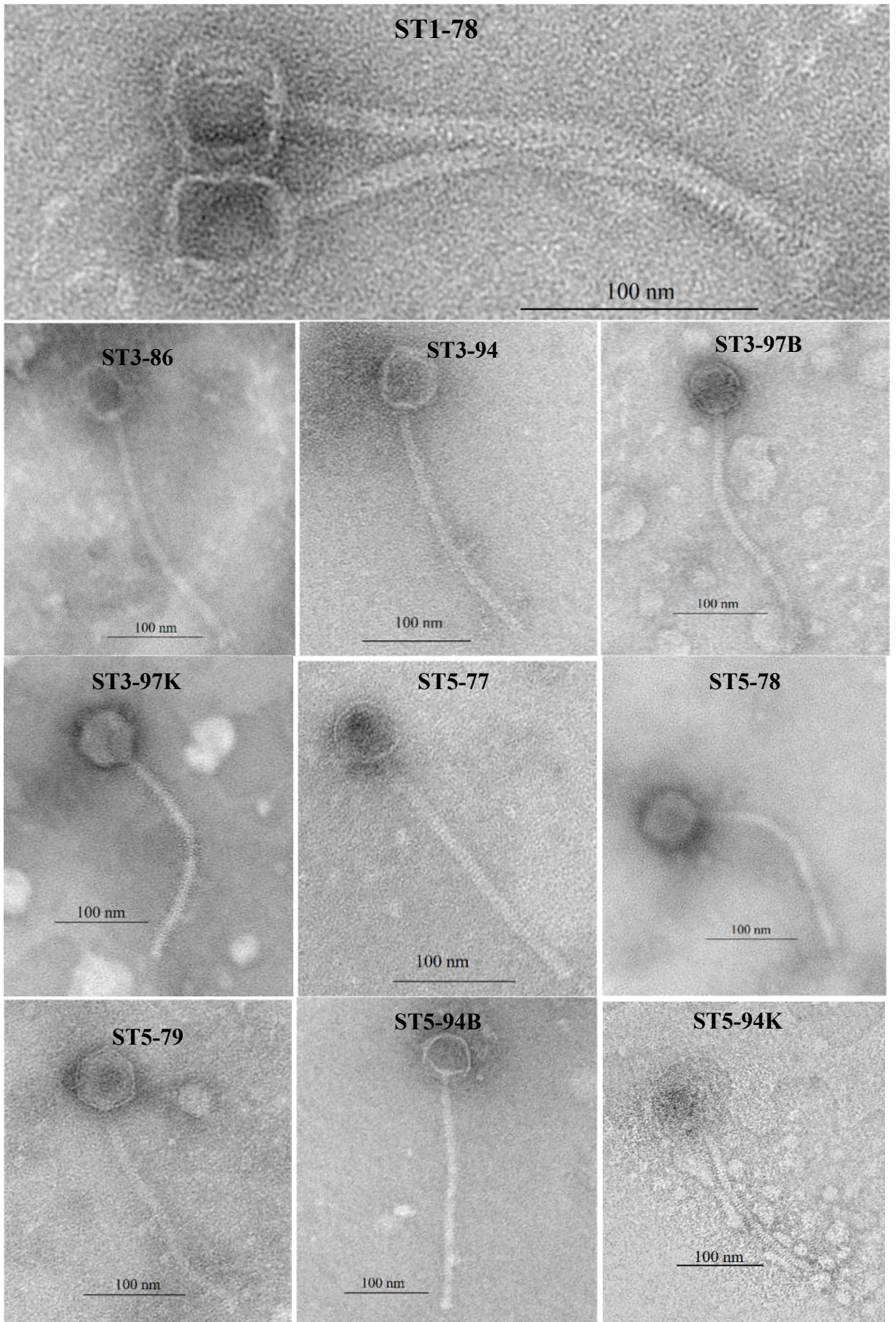
M5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35M3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5M1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+: faja hassas, -:faja dirençli

Bakteriyofaj izolatlarının karakterizasyonu

Çalışmada bakteriyofaj izolatlarının karakterizasyonu amacıyla; TEM, RAPD, DNA paketleme mekanizmasının belirlenmesi ve HRM işlemleri gerçekleştirilmiştir. Denemeler çerçevesinde elde edilen veriler aşağıda sunulmuştur.

Streptococcus thermophilus fajlarının Caudovirales takımı ve Siphoviridae familyasına ait, polihedral bir baş ve kontraktıl olmayan uzun esnek bir kuyruğa sahip olduğu bilinmektedir. Bu gruba ait fajlarda kapsit çapı 50-90 nm, kuyruk uzunluğu ise 100-360 nm aralığında değişmektedir. Şekil 12’de izole edilen fajlara ait elektron mikroskop görüntüleri sunulmuştur. İlgili görsellerde polihedral baş ve uzun kuyruk kısımları ile beraber 100 nm uzunluğunda ölçü birimi görülmektedir (Şekil 12).



Şekil 12. Çalışmada izole edilen bakteriyofajlara ait TEM görüntüleri

TEM ile elde edilen görüntülerde ölçüm işlemi gerçekleştirilmiş ve Tabloda 9'da uzunlukları sunulmuştur.

Tablo 9. Bakteriyofaj izolatlarının boyutları

Bakteriyofaj Kodu	Bakteriyofaj Özelliği	
	Kapsit (baş) Büyüklüğü (nm)	Kuyruk Uzunluğu (nm)
ST1-78	53±2	246±5
ST3-86	64,5±3	286±6
ST3-94	53±4,1	243±7
ST3-97B	61,3±3,2	316±5,2
ST3-97K	64±0,5	248±3,3
ST5-77	50±3,5	246±7,2
ST5-78	53,8±0,3	237±1,4
ST5-79	60,6±0,1	239,3±7,1
ST5-94B	64,3±3,5	248,8±1,2
ST5-94K	62,8±2,8	257±5,6

Quiberoni *et al.* (2003a) tarafından yapılan bir çalışmada yoğurt örneklerinden izole edilen on bir adet *Streptococcus thermophilus* fajının ($\phi 1$, $\phi 2$, $\phi 3$, $\phi 4$, $\phi 5$, $\phi 6$, $\phi 7$, $\phi 8$, $\phi 9$, $\phi 10$ ve $\phi 11$) Siphoviridae familyasına ait olduğu belirtilmiştir. Tüm faj izolatlarının uzun ve esnek 210,5 ila 330 nm kuyruğa sahip olduğu, baş çaplarının ise 50-71,2 nm arasında değiştiği bildirilmiştir.

TEM ile morfolojileri incelenen bir çalışmada dört adet *Streptococcus thermophilus* SW11, SW13, SW27 ve SW16 fajının kuyruk uzunlukları sırasıyla; $228,1 \pm 9,1$ nm, $231,9 \pm 5,5$ nm, $242,1 \pm 6,9$ nm ve $124,9 \pm 3,2$ nm olarak bulunmuştur. Kapsit çaplarının ise 55 ile 59 nm arasında değiştiği bildirilmiştir (Lavelle *et al.* 2018).

Capra *et al.* (2013) inceledikleri dört adet Siphoviridae familyasının üyeleri olan *Streptococcus thermophilus* fajlarının (031-D, CGL-3, CGL-4, WPC-1) yaklaşık 55 nm'lik izometrik baş ve 240 nm uzun kuyruğa sahip olduğunu tespit etmişlerdir.

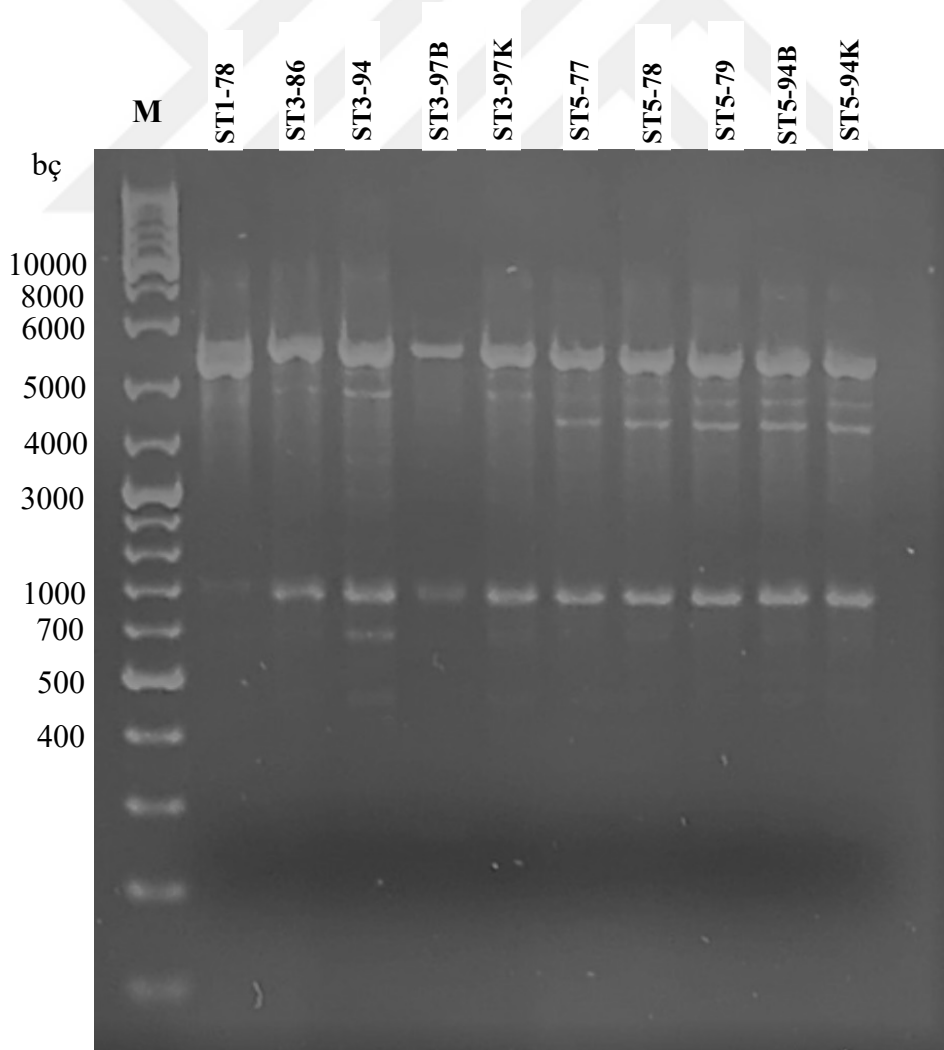
Ülkemizde gerçekleştirilen ve *Streptococcus thermophilus*'a spesifik yirmi beş fajın elektron mikroskobu ile incelendiği bir çalışma sonucunda kapsit çaplarının 53-74 nm,

kontraktil olmayan kuyruk uzunluklarının ise 182-290 nm arasında değiştiği görülmüştür (Acar Soykut ve Tunail 2010).

Çalışmamızda elde edilen fajların baş çapı ve kuyruk uzunluğuna ait veriler incelendiğinde ilgili literatür ile uyumlu olduğu görülmüştür.

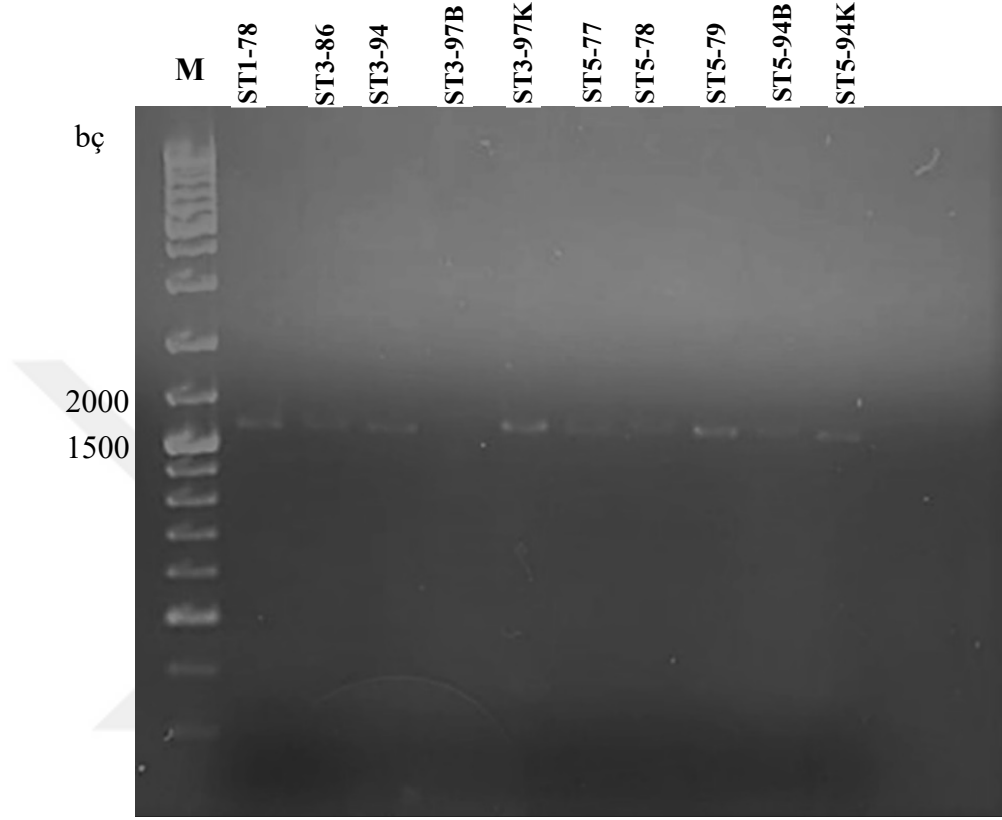
Çalışmada bakteriyofaj karakterizasyonu için RAPD-PCR işlemi uygulanmıştır. Bu amaçla literatürde faj karakterizasyonu amacıyla kullanıldığı görülen P1, P2 ve OPL5 primerleri tercih edilmiştir. İlgili primerler kullanılarak elde edilen fingerprintlere ait görseller (şekil 13, şekil 14 ve şekil 15) aşağıdaki sunulmuştur.

P1 primeri kullanılarak elde edilen fingerprint (şekil 13) incelendiğinde 4 farklı grup olduğu görülmektedir. İlk grubu ST1-78, ikinci grubu ST3-86, ST3-94 ve ST3-97K,    nc  grubu ST3-97B ve son olarak dördüncü grubu da ST5-77, ST5-78, ST5-79, ST5-94B ve ST5-94K izolatları oluşturmuştur. İlgili gruplar incelendiğinde benzer gruptaki fajların, aynı konakçı suşuna sahip olduğu görülmektedir.



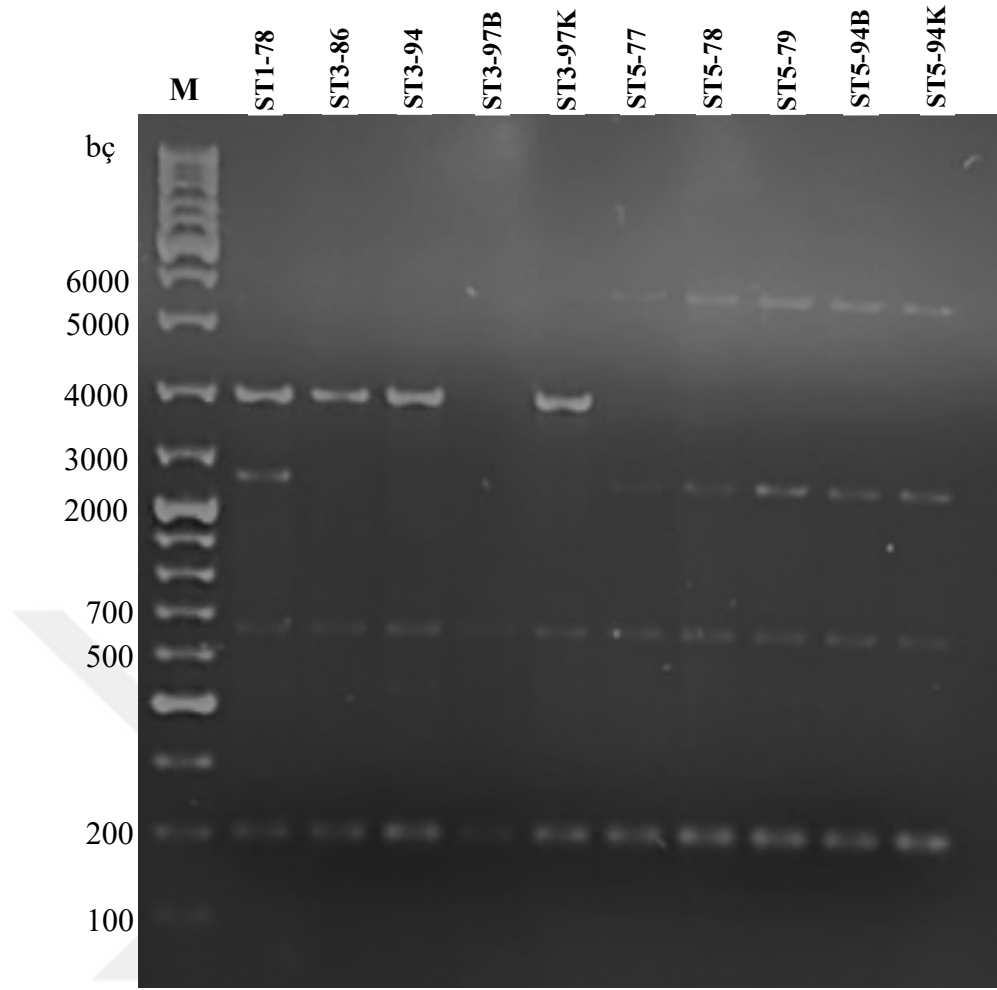
şekil 13. Bakteriyofaj izolatlarına ait P1 primer RAPD-PCR agaroz jel g r nt ş 

P2 primeri kullanılarak elde edilen fingerprintler Şekil 14'te verilmiştir. Şekil incelendiğinde ST3-97-B fajına ait herhangi bir bant görülmemiş ancak; diğer tüm suşlar için yaklaşık 1700 bp boyutunda tek bir bant tespit edilmiştir. Bu durumda P2 primeri kullanılarak elde edilen RAPD-PCR fingerprint dağılımına göre iki grup gözlemlenebildiği anlaşılmaktadır.



Şekil 14. Bakteriyofaj izolatlarına ait P2 primer RAPD-PCR agaroz jel görüntüsü

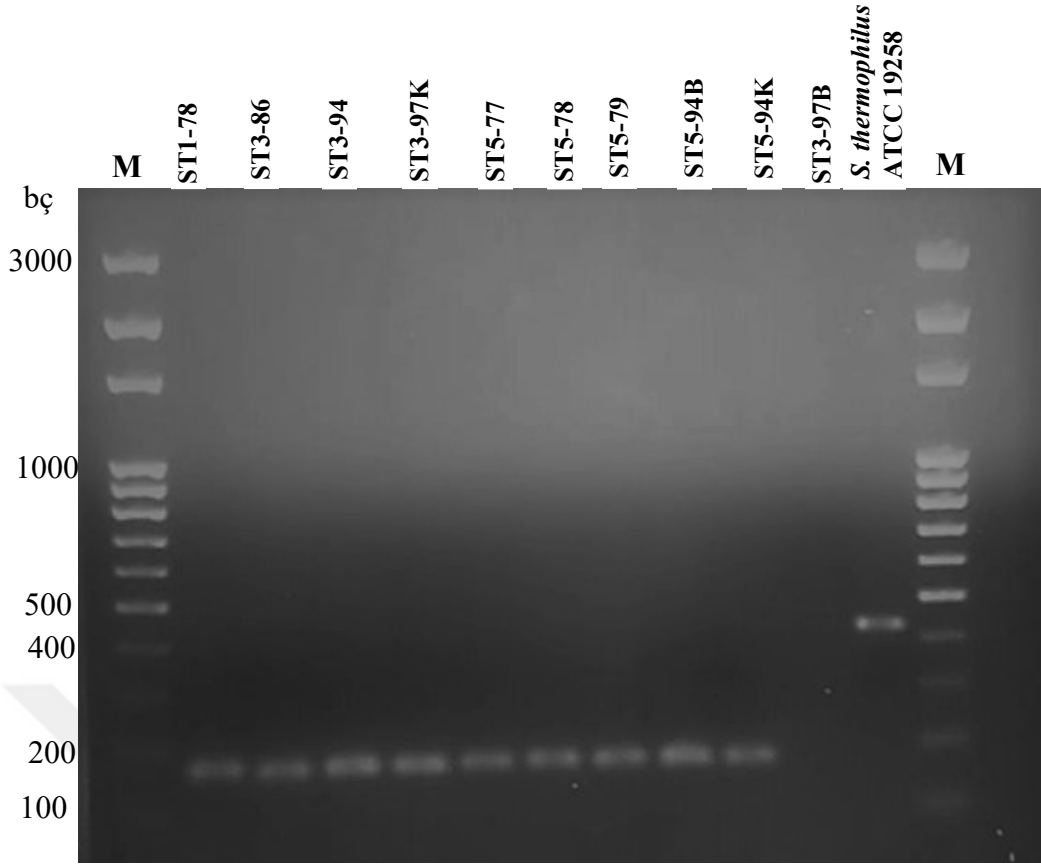
OPL5 primeri kullanılarak elde edilen fingerprintler Şekil 15'te verilmiştir. Buna göre faj izolatlarının 4 farklı gruba ayrıldığı tespit edilmiştir. ST1-78'in birinci grupta, ST3-86, ST3-94 ve ST3-97K'nın ikinci grupta, ST3-97B'nin üçüncü grupta, ST5-77, ST5-78, ST5-79, ST5-94B ve ST5-94K'nın dördüncü bir grupta toplandığı görülmüştür. Gruplar incelendiğinde, ST3-97B fajı dışında aynı gruba dahil olan fajların konakçısının da aynı olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 15. Bakteriyofaj izolatlarına ait OPL5 primer RAPD-PCR agaroz jel görüntüsü

Çalışmada kullandığımız primerlerin farklı araştırmalarda da kullanıldığı ve benzer gruplandırma performansı gösterdiği gözlenmektedir. (Shivu *et al.* 2007; Gutierrez *et al.* 2011; Cortes *et al.* 2015; Dias *et al.* 2020; Coşkun 2021).

Çalışmada faj karakterizasyonu amacıyla her bir grubu temsil eden dört adet (cos, pac, 987, 5093) primer seti kullanılmıştır. Şekil 16'daki fingerprintler incelendiğinde ST1-78, ST3-86, ST3-94, ST3-97K, ST5-77, ST5-78, ST5-79, ST5-94B ve ST5-94K fajlarının cos grubuna dahil olduğu, ST3-97B fajının ise denenen grupların hiçbirine ait olmadığı görülmüştür. Çalışmada kullanılan ve lizojen karakterde olduğu bilinen *Streptococcus thermophilus* ATCC 19258 suşu kontrol amacıyla kullanılmıştır. İlgili profajın pac grubuna dahil olduğu görülmüştür.



Şekil 16. DNA paketleme mekanizması açısından faj izolatlarının değerlendirilmesi

Süt ortamlarındaki *Streptococcus thermophilus* fajlarının çeşitliliği incelenen çalışmalarda cos tipi fajların yaygınlığı dikkat çekmektedir (Wagner *et al.* 2017).

Yakın zamana kadar dizilenmiş *Streptococcus thermophilus* fajlarının %61'nin cos grubuna, %25'inin ise pac grubuna dahil olduğu bildirilmiştir (Hanemaaijer *et al.* 2021).

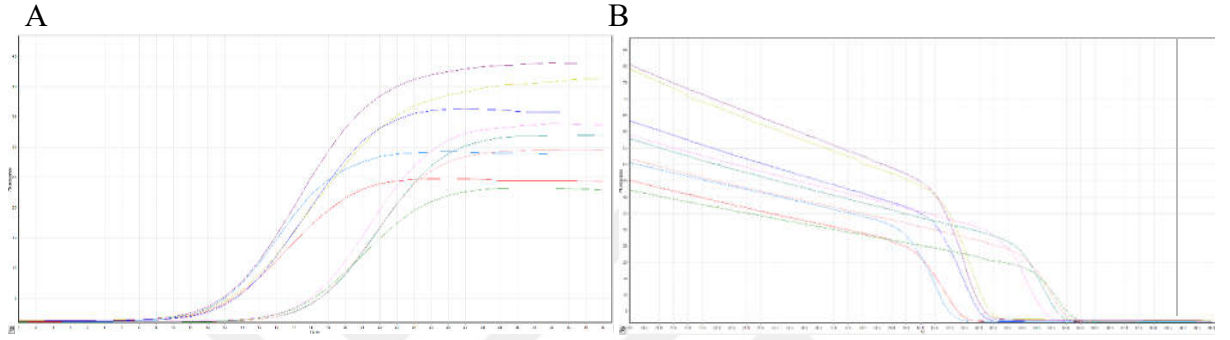
Streptococcus thermophilus'u enfekte eden yüz yetmiş üç fajın incelendiği bir çalışmada altmış ikisinin cos, iki tanesinin pac ve dokuzunun 5093 grubunda yer aldığı görülmüştür (Briggiler Marcó *et al.* 2022).

Lavelle *et al.* (2018) on ülkedeki yirmi yedi farklı fabrikadan izole ettikleri yüz yetmiş iki *Streptococcus thermophilus* faj izolatını karakterize etmiş ve yüz kırk yedi fajın cos, on birini pac, dokuzunu 987 ve beşini ise 5093 *Streptococcus thermophilus* faj grupları olarak tanımlamışlardır.

DNA paketleme mekanizması açısından karakterizasyon işleminin gerçekleştirildiği bir diğer çalışmada izole edilen yirmi altı *Streptococcus thermophilus* fajının yirmi beş tanesinin cos, bir tanesinin pac grubuna ait olduğu bulunmuştur (Zinno *et al.* 2010).

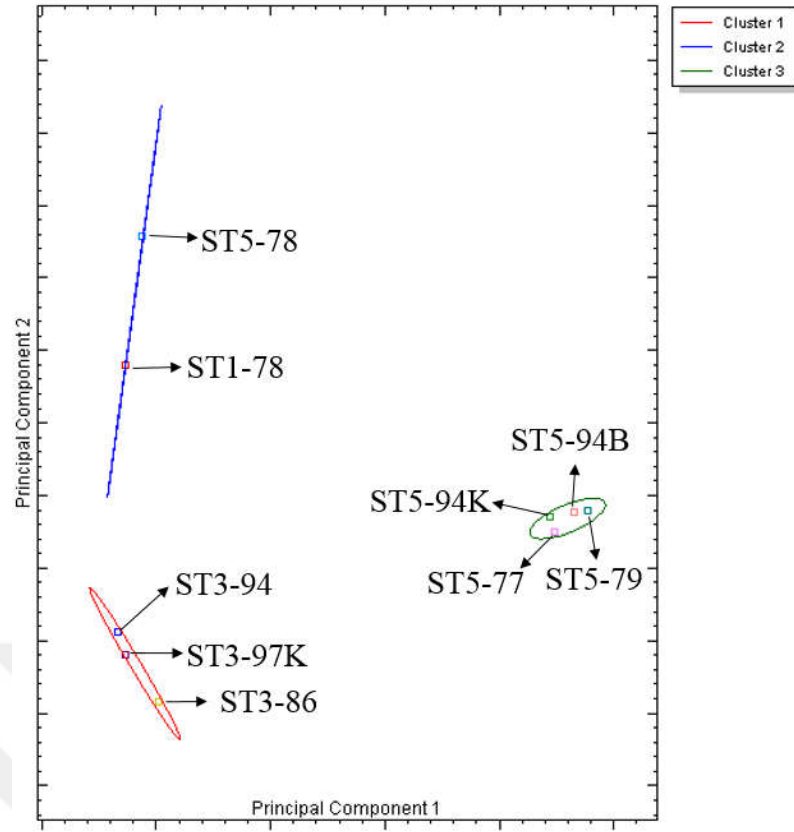
Literatürde gözlenen yukardaki bulguların çalışmamızda da tespit edildiği görülmektedir.

Belirtildiği üzere izole edilen fajların karakterizasyonunda kullanılan bir diğer metot RT-PCR HRM analizidir. Bu amaçla izole edilen ve cos geni tespit edilen 9 bakteriyofaj 170 bç uzunluğundaki ilgili bölge için RT-PCR HRM işlemine tabi tutulmuştur. Denemede öncelikle RT-PCR işlemi uygulanmış (Şekil 17A) ardından HRM analizi gerçekleştirilmiştir (Şekil 17B). Şekil 17B incelendiğinde 3 farklı grup olduğu görülmektedir. İlk grubu ST1-78 ve ST5-78, ikinci grubu ST5-77, ST5-79, ST5-94B ve ST5-94K, üçüncü grubu ST3-86, ST3-94 ve ST3-97K oluşturmaktadır. ST3-97B izolatu cos geni içermediği için HRM analizine tabi tutulamamıştır.



Şekil 17. Faj izolatlarının iki aşamalı HRM-PCR işlemi, A: RT-PCR işlemi, B: HRM işlemi

Elde edilen HRM eğrilerinin farklılıklarının ortaya konulması ve gruplandırılması amacıyla PCA (Principal Component Analysis) işlemi ScreenClust software package programı (Rotor-Gene ScreenClust HRM Software, Qiagen, Hilden, Germany) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İlgili program kullanılarak elde edilen PCA sonucu Şekil 18’de verilmiştir. Şekil incelendiğinde yukarıda belirtilen HRM gruplandırılması iki boyutlu olarak görülmektedir.



Şekil 18. HRM verilerinin PCA analizi ile değerlendirilmesi

HRM analizinin RAPD fingerprint sonuçlarıyla karşılaştırılması ve oluşan grupların dağılımı Tablo 10'da verilmiştir. Tablo (Tablo 10) ve Şekiller (Şekil 17B ve Şekil 18) incelendiğinde HRM analizinin RAPD analiz sonucundan farklı olarak ST5-78 izolatını ST1-78 ile aynı gruba dahil ettiği görülmüştür. Bununla beraber PCA analizinde bu iki izolatın benzerliği diğer gruplardaki gibi değildir. Öte yandan RAPD analizinde olduğu gibi HRM'nin de genel olarak konakçı benzerliği üzerinden gruplandırma yaptığı; ancak ST5-78'i konakçı özgüllüğünden ayırıp örnek benzerliği temelinde değerlendirdiği görülmektedir.

Tablo 10. RAPD ve HRM analizler sonuçlarına göre fajların gruplandırılması

Grup	P1	P2	Opl5	HRM
1. Grup	ST1-78	ST1-78	ST1-78	ST1-78
		ST3-86		ST5-78
		ST3-94		
		ST3-97K		
		ST5-77		
		ST5-78		
		ST5-79		
		ST5-94B		
2. Grup	ST3-86	ST3-97B*	ST3-86	ST3-86
	ST3-94		ST3-94	ST3-94
	ST3-97K		ST3-97K	ST3-97K
3. Grup	ST3-97B		ST3-97B	ST397B**
4. Grup	ST5-77		ST5-77	ST5-77
	ST5-78		ST5-78	ST5-79
	ST5-79		ST5-79	ST5-94B
	ST5-94B		ST5-94B	ST5-94K
	ST5-94K		ST5-94K	

*: ST3-97B P2 primeri ile amplifikasyon/bant gözlenmemiştir.

**: ST3-97B izolatu cos geni içermediği için farklı bir grup olarak değerlendirilmiştir.

Literatürde virüs karakterizasyonu üzerinde benzer bir çalışmaya rastlanılmamakla beraber Hinsberger *et al.* (2019) iki elma kurdu virüsü (CpGV-M ve CpGV-R5) üzerinde yaptıkları çalışma, metot benzerliği açısından değerlendirilebilir. Bu çalışmada elma kurdu virüsünün RT-PCR ve HRM ile hızlı ve güvenilir olarak belirlenmesi ve tanınması gerçekleştirilmiştir. CpGV *p38* geninin hedef alındığı çalışmada genel itibariyle karakterizasyon yapılmamıştır.

Lizogen suş varlığının belirlenmesi

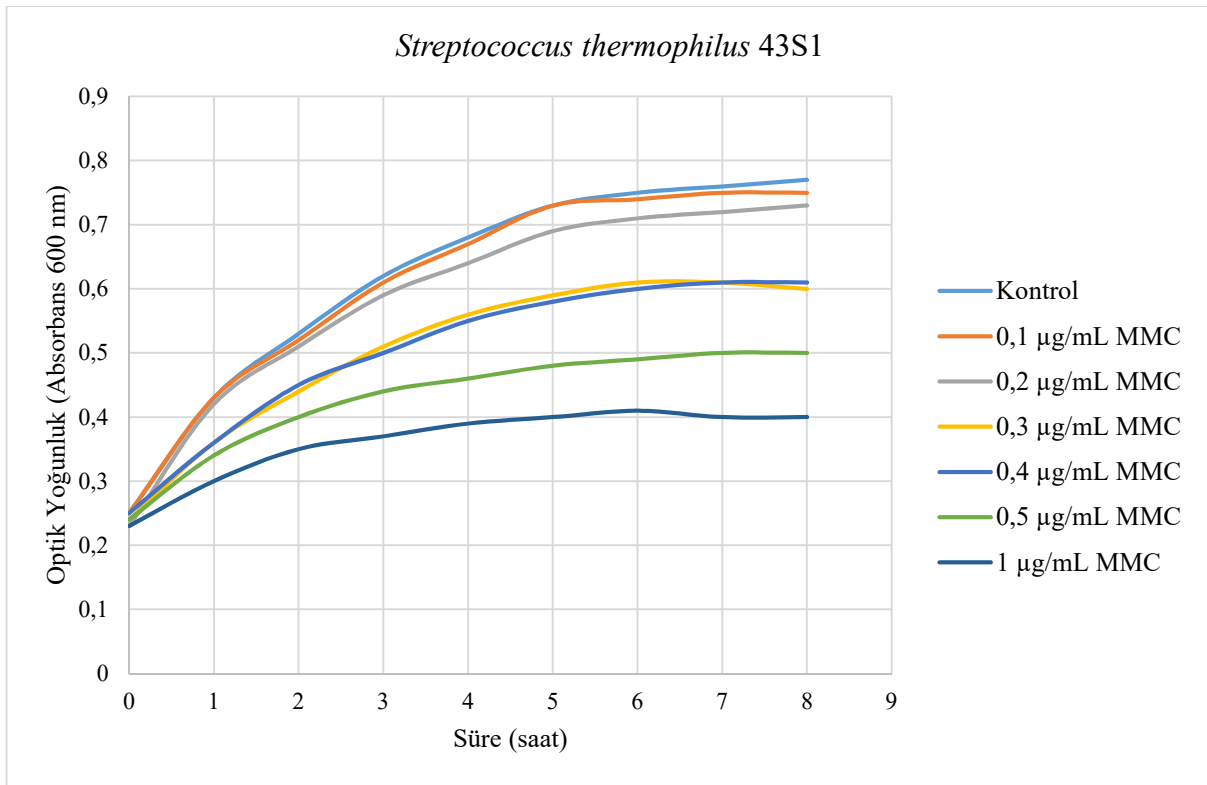
Süt ürünleri üretiminin gerçekleştirdiği fabrikalarda starter kültür olarak kullanılacak bakterilerde lizojen suşlar, önemli bir tehdit unsuru oluşturmaktadır. Lizojen suş varlığının tespit edilmesi amacıyla farklı indüksiyon metotları bulunmaktadır. Bu aşamada, indüksiyon için uygun yöntemlerin kullanılması önem arz etmektedir (Marcó *et al.* 2012).

Araştırmamızda lizojen suşların varlığının tespit edilmesi amacıyla Mitomisin C, UV ve sıcaklık uygulaması ile indüksiyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ancak denemede kullanılan *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* suşlarının hiçbirisi bahsedilen indüksiyon metotları ile indüklenememiştir. Araştırma sonucu elde edilen verilere ait örnek şekil (Şekil 19-Şekil 24 arası) ve tablolar (Tablo 11 - Tablo 16 arası) aşağıda sunulmuştur.

Mitomisin C ile indüksiyon çalışmalarının yürütüldüğü bakterilerden biri olan *Streptococcus thermophilus* 43S1 suşuna ait Tablo 11 ve Şekil 19 incelendiğinde; uygulanan en düşük MMC konsantrasyona (0,1 µg/mL) ait gelişim eğrisinin kontrol suşa oldukça yakın, en yüksek MMC konsantrasyonuna ait eğrinin ise en düşük asorbans değerlerini verdiği görülmüştür. Dolayısıyla MMC konsantrasyonundaki artışla birlikte *Streptococcus thermophilus* 43S1 suşunun gelişiminin de sınırlandığı ve indüklenmediği tespit edilmiştir.

Tablo 11. Farklı konsantrasyonlarda MMC ile indüklenen *Streptococcus thermophilus* 43S1 suşunun absorbans değerleri

Mitomisin C									
Konsantrasyonu (µg/mL)	Süre (saat)								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Kontrol	0,25	0,43	0,53	0,62	0,68	0,73	0,75	0,76	0,77
0,1	0,25	0,43	0,52	0,61	0,67	0,73	0,74	0,75	0,75
0,2	0,23	0,42	0,51	0,59	0,64	0,69	0,71	0,72	0,73
0,3	0,24	0,36	0,44	0,51	0,56	0,59	0,61	0,61	0,60
0,4	0,25	0,36	0,45	0,50	0,55	0,58	0,60	0,61	0,61
0,5	0,24	0,34	0,40	0,44	0,46	0,48	0,49	0,50	0,50
1	0,23	0,30	0,35	0,37	0,39	0,40	0,41	0,40	0,40

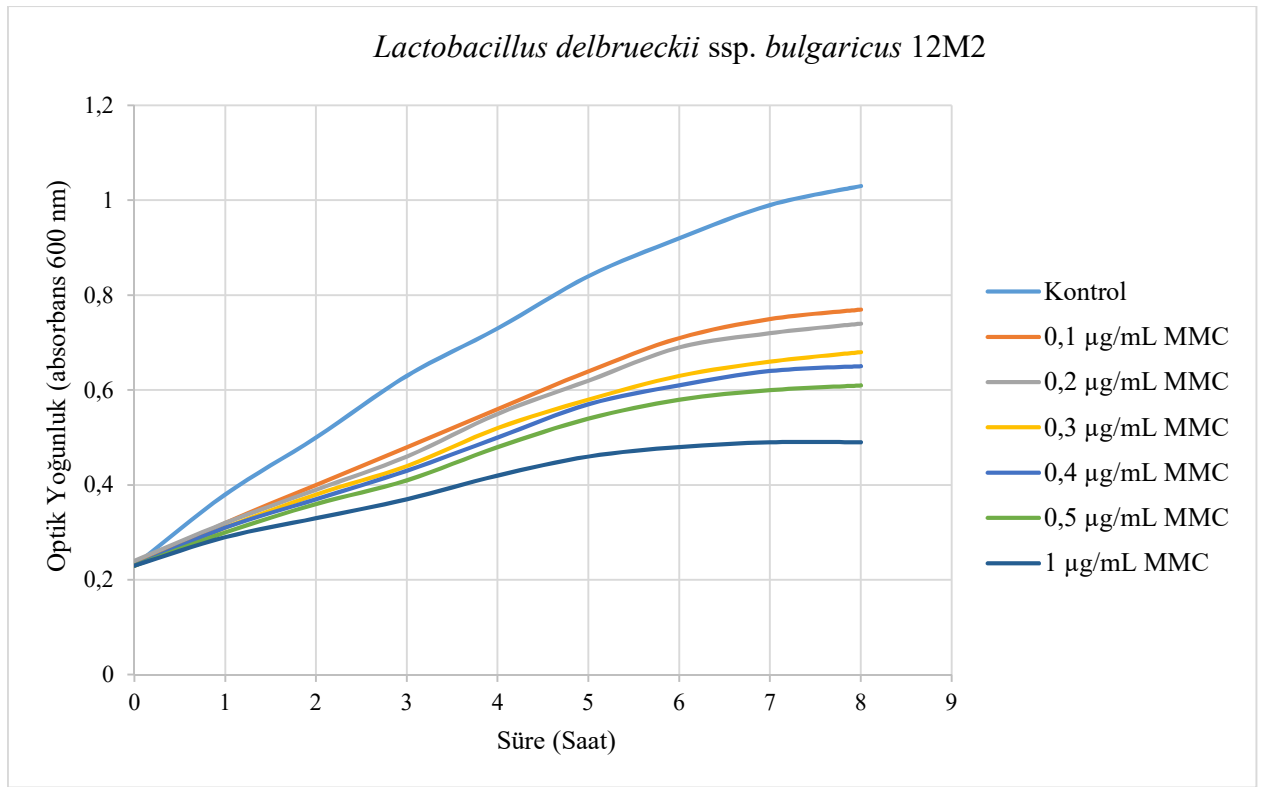


Şekil 19. Farklı konsantrasyonlarda MMC uygulamasının *Streptococcus thermophilus* 43S1 suşunun gelişimi üzerine etkisi

Lactobacillus delbrueckii ssp. *bulgaricus* 12M2 suşuna ait Tablo 12 ve Şekil 20 incelendiğinde MMC'deki artışla beraber suşun gelişiminin sınırlandığı görülmektedir.

Tablo 12. Farklı konsantrasyonlarda MMC ile indüklenen *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 12M2 suşunun absorbans değerleri

Mitomisin C									
Konsantrasyonu (µg/mL)	Süre (saat)								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Kontrol	0,23	0,38	0,5	0,63	0,73	0,84	0,92	0,99	1,03
0,1	0,23	0,32	0,4	0,48	0,56	0,64	0,71	0,75	0,77
0,2	0,24	0,32	0,39	0,46	0,55	0,62	0,69	0,72	0,74
0,3	0,23	0,31	0,38	0,44	0,52	0,58	0,63	0,66	0,68
0,4	0,23	0,31	0,37	0,43	0,5	0,57	0,61	0,64	0,65
0,5	0,23	0,3	0,36	0,41	0,48	0,54	0,58	0,6	0,61
1	0,23	0,29	0,33	0,37	0,42	0,46	0,48	0,49	0,49

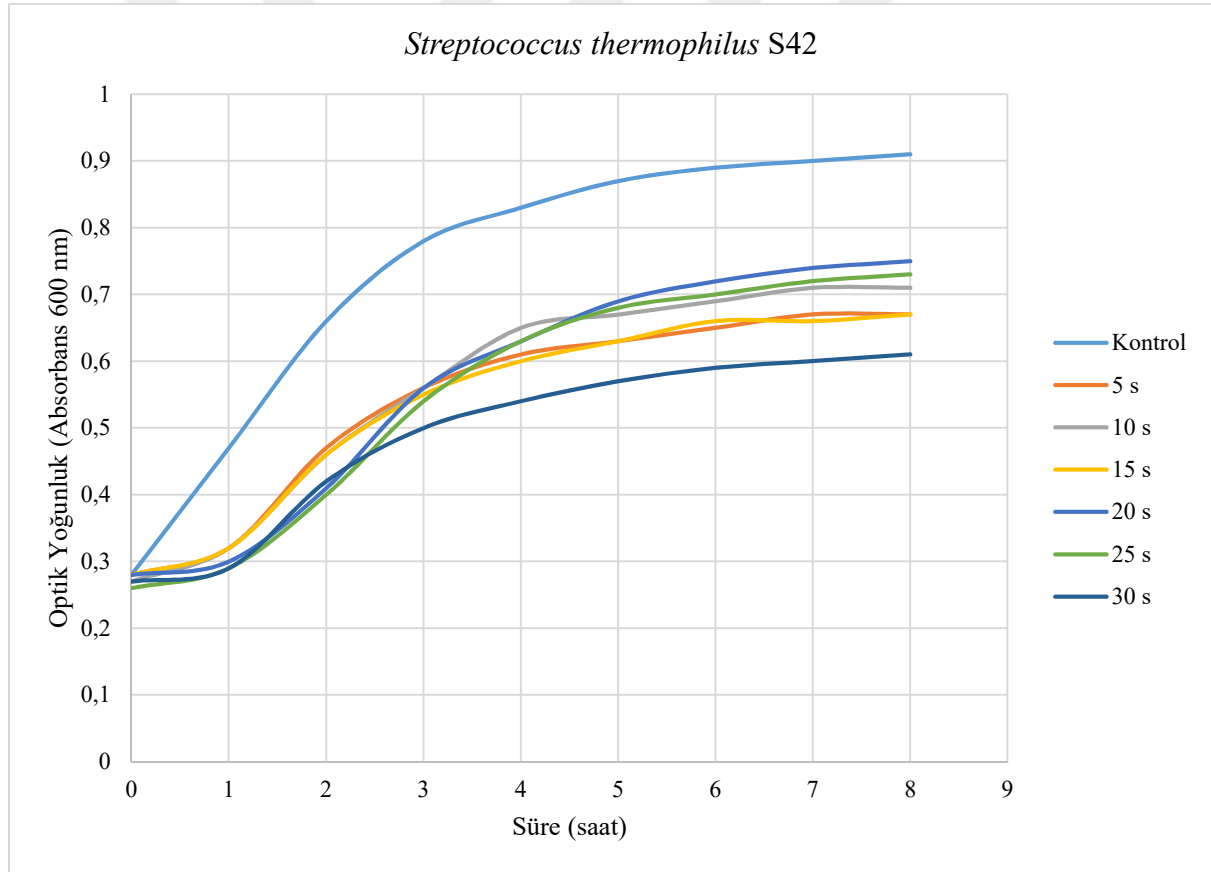


Şekil 20. Farklı konsantrasyonlarda MMC uygulamasının *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 12M2 suşunun gelişimi üzerine etkisi

UV ışını ile uyarılan *Streptococcus thermophilus* (Tablo 13 ve Şekil 21) ve *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (Tablo 14 ve Şekil 22) suşlarında kontrole kıyasla yaklaşık ilk bir saatlik süre boyunca UV etkisiyle gelişim görülmediği; ancak bu süreden sonra gelişimine devam ettiği tespit edilmiştir. Farklı süreler boyunca UV ışınına maruz bırakılan *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 8M6 suşu negatif kontrolü ile yakın bir gelişme eğrisi oluştururken; UV ışını uygulanan *Streptococcus thermophilus* S42 suşunun negatif kontrole kıyasla daha düşük absorbans değerleri ile gelişimine devam ettiği görülmüştür.

Tablo 13. Farklı sürelerde UV ışını ile indüklenen *Streptococcus thermophilus* S42 suşunun absorbans değerleri

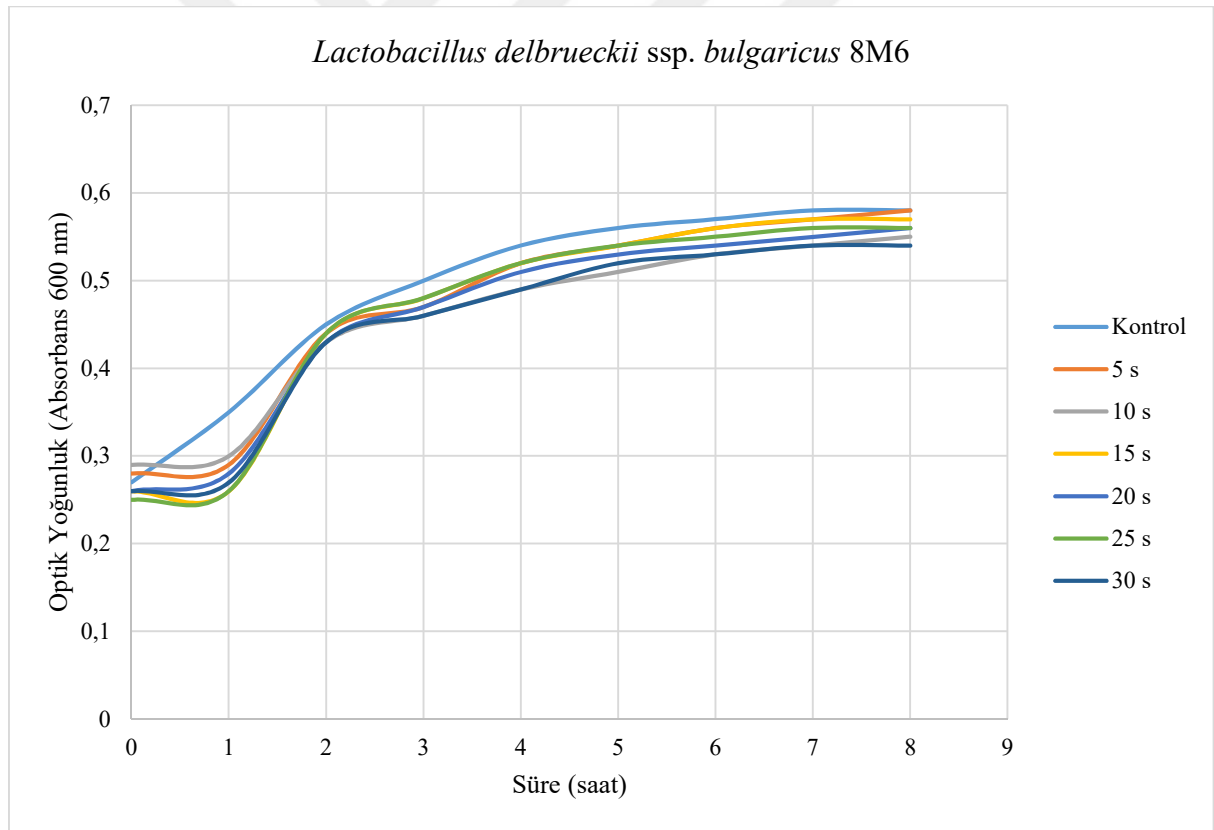
UV ışınlarına maruz kalma süresi (saniye)	Süre (saat)								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Kontrol	0,28	0,47	0,66	0,78	0,83	0,87	0,89	0,90	0,91
5	0,28	0,32	0,47	0,56	0,61	0,63	0,65	0,67	0,67
10	0,27	0,32	0,46	0,56	0,65	0,67	0,69	0,71	0,71
15	0,28	0,32	0,46	0,55	0,60	0,63	0,66	0,66	0,67
20	0,28	0,30	0,41	0,56	0,63	0,69	0,72	0,74	0,75
25	0,26	0,29	0,40	0,54	0,63	0,68	0,70	0,72	0,73
30	0,27	0,29	0,42	0,50	0,54	0,57	0,59	0,60	0,61



Şekil 21. Farklı sürelerde UV ışını uygulamasının *Streptococcus thermophilus* S42 suşunun gelişimi üzerine etkisi

Tablo 14. Farklı sürelerde UV ışını ile indüklenen *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 8M6 suşunun absorbans değerleri

UV ışınlarına maruz kalma süresi (saniye)	Süre (saat)								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Kontrol	0,27	0,35	0,45	0,5	0,54	0,56	0,57	0,58	0,58
5	0,28	0,29	0,44	0,47	0,52	0,54	0,56	0,57	0,58
10	0,29	0,3	0,43	0,46	0,49	0,51	0,53	0,54	0,55
15	0,26	0,26	0,44	0,48	0,52	0,54	0,56	0,57	0,57
20	0,26	0,28	0,43	0,47	0,51	0,53	0,54	0,55	0,56
25	0,25	0,26	0,44	0,48	0,52	0,54	0,55	0,56	0,56
30	0,26	0,27	0,43	0,46	0,49	0,52	0,53	0,54	0,54



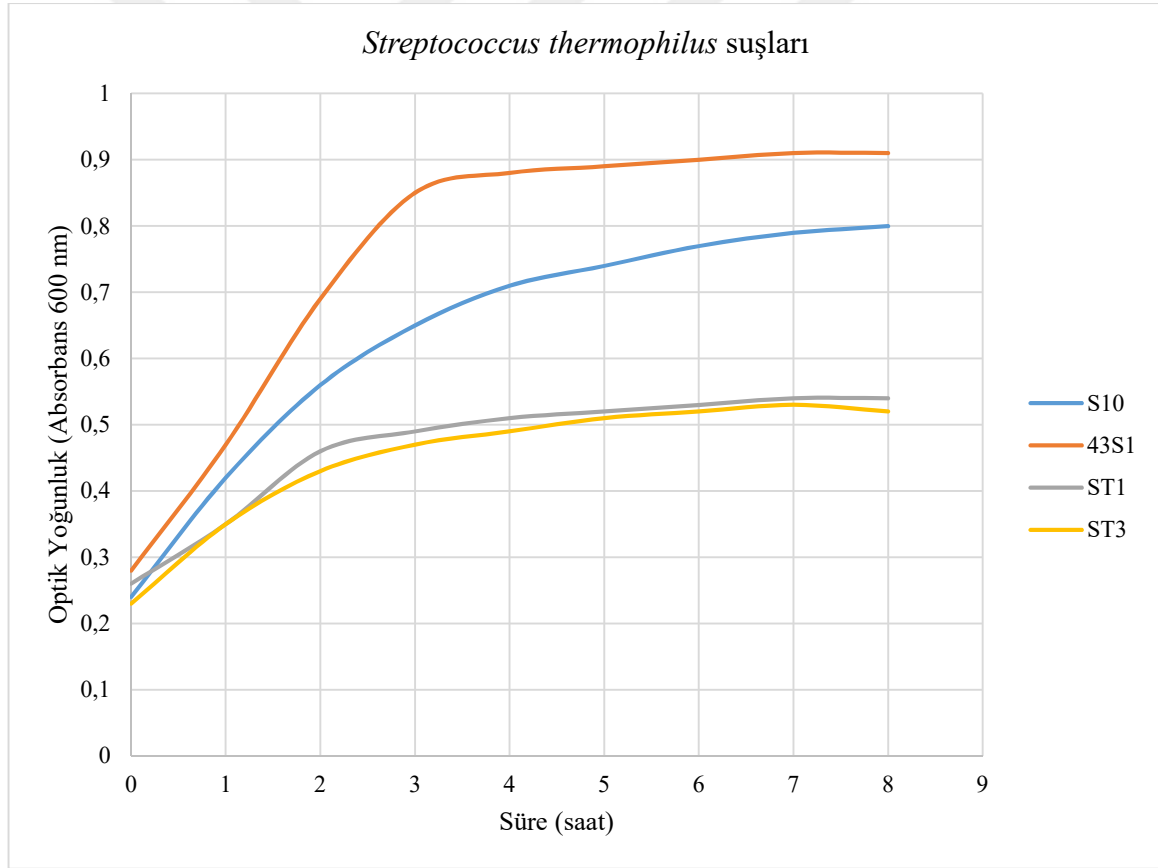
Şekil 22. Farklı sürelerde UV ışını uygulamasının *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 8M6 suşunun gelişimi üzerine etkisi

Sıcaklığın yükseltilmesi ile gerçekleştirilen indüksiyon çalışmalarında kullanılan dört farklı *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* suşlarına ait veriler tablo (Tablo 15 ve Tablo 16) ve şekillerde (Şekil 23 ve Şekil 24) gösterilmiştir.

Tablo 15 ve Şekil 23 incelendiğinde *Streptococcus thermophilus* 43S1 suşunun 3. saatten itibaren, ST1 ve ST3 suşlarının 2.saatten itibaren ve S10 suşunun ise 4. saatten itibaren durağan faza geçmeye başladığı görülmüş ancak absorbans değerlerinde herhangi bir düşüş gözlenmemiştir.

Tablo 15. Sıcaklık uygulaması ile indüklenen dört farklı *Streptococcus thermophilus* suşlarının absorbans değerleri

<i>Streptococcus</i> <i>thermophilus</i> suşları	Süre (saat)								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
S10	0,24	0,42	0,56	0,65	0,71	0,74	0,77	0,79	0,8
43S1	0,28	0,47	0,69	0,85	0,88	0,89	0,9	0,91	0,91
ST1	0,26	0,35	0,46	0,49	0,51	0,52	0,53	0,54	0,54
ST3	0,23	0,35	0,43	0,47	0,49	0,51	0,52	0,53	0,52



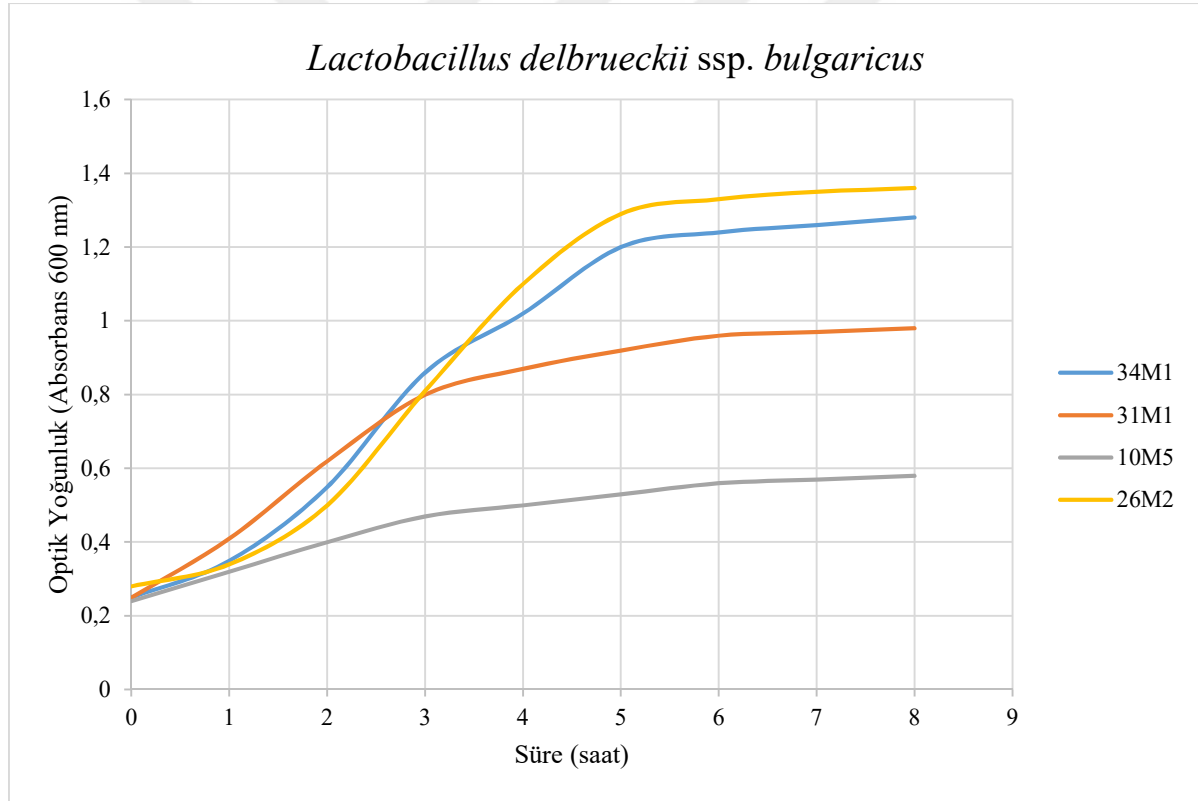
Şekil 23. Sıcaklık ile indüksiyon uygulamasının *Streptococcus thermophilus* suşlarının gelişimi üzerine etkisi

Tablo 16 ve Şekil 24 incelendiğinde *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 34M1 ve 26M2 suşlarının 5.saatten itibaren durağan faza geçmeye başladığı, 31M1 ve 10M5 suşlarının ise 3. saatten itibaren daha düşük bir absorbans değeri ile durağan faza geçmeye başlayıp daha

uzun sürede ilgili gelişme eğrisini tamamladığı görülmüştür. Devam eden ölçümler ile birlikte absorbens değerlerinde belirgin bir düşüş gözlenmemiştir.

Tablo 16. Sıcaklık uygulaması ile indüklenen dört farklı *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* suşlarının absorbens değerleri

<i>Lactobacillus</i>										
<i>delbrueckii</i>		Süre (saat)								
ssp.										
<i>bulgaricus</i>		0	1	2	3	4	5	6	7	8
suşları										
34M1		0,25	0,35	0,55	0,86	1,02	1,20	1,24	1,26	1,28
31M1		0,25	0,41	0,62	0,8	0,87	0,92	0,96	0,97	0,98
10M5		0,24	0,32	0,4	0,47	0,5	0,53	0,56	0,57	0,58
26M2		0,28	0,34	0,5	0,81	1,1	1,29	1,33	1,35	1,36



Şekil 24. Sıcaklık ile indüksiyon uygulamasının *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* suşlarının gelişimi üzerine etkisi

Yahya and Naeima (2014)'nın izole ettiği 60 adet *Streptococcus thermophilus* suşunu 0,05-0,5 µg/mL arasındaki konsantrasyonlarda Mitomisin C ile indüklenmiş ve üç adet (TP-YA1, TP-YA2 ve TP-YA3) lizojenik faj izole edilmiştir. Çalışmada kullanılan YA1 ve YA3 suşlarının optimum indüksiyon konsantrasyonu 0,1 µg/mL iken YA1 suşunun 0,05 µg/mL olduğu bildirilmiştir.

Basmechi *et al.* (2014) tarafından yapılan bir çalışmada süt ürünlerinden izole edilen 65 adet *Lactobacillus* suşuna karşı Mitomisin C, UV ışını ve sıcaklık uygulanmıştır. Her bir indüksiyon analizinin sonucunda farklı oranlarda profajın indüklenerek faj izole edilebildiği görülmüştür.

Guo *et al.* (2016) tarafından yapılan bir çalışmada yoğurttan izole edilen *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* SDMCC050201 suşu Mitomisin C (0,25, 0,50, 0,75, 1,0 ve 1,25 µg/mL) ve UV ışını (30, 60, 90 ve 120 s) ile indüklenerek faj vB_LdeS-phiJB izole edilmiştir. Her iki metotla izole edilen fajlara ait genomik DNA BamHI enzimi ile kesilmiş ve elde edilen fingerprintlerin aynı olduğu gösterilmiştir. İzole edilen ılıman faj, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* SDMCC050201 ve 7 farklı *Lactobacillus delbrueckii* suşuna karşı gerçekleştirilen plak testi sonucunda hiçbir suşa karşı zon oluşturmadığı tespit edilmiştir.

On sekiz adet *Streptococcus thermophilus* suşunun 0,2 µg/mL Mitomisin C'ye maruz bırakıldığı bir çalışmada ise CHCC2070 suşunun indüklendiği; ancak denemede kullanılan hiçbir *Streptococcus thermophilus* suşuna karşı herhangi bir plak oluşturmadığı bildirilmiştir (Zinno *et al.* 2010).

Quiberoni *et al.* (2003a) tarafından Mitomisin C ile indüksiyon testinin yapıldığı bir çalışmada 11 *Streptococcus thermophilus* suşunun hiçbirinde profaj varlığına rastlanmamıştır. Kahraman (2006) tarafından gerçekleştirilen bir başka çalışmada, 83 adet *Streptococcus thermophilus* ve 40 adet *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* suşu farklı konsantrasyonlarda Mitomisin C ve farklı sürelerde UV'ye maruz bırakılmış, tüm suşlar sıcaklık ile indüksiyona tabi tutulmuştur. Deneme sonucunda hiçbir *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* suşunun indüklenmediği bulunmuştur.

Yukarıda belirtildiği üzere, çalışmada elde edilen bakteriyofaj izolatlarının karakterizasyonu amacıyla TEM, RAPD-PCR, DNA paketlenme mekanizması, HRM ve konakçı özgüllüğü testleri yapılmıştır. Bu metotlar ortak bir tabloda (Tablo 17) biraraya getirilerek farklı faj izolatlarına özel bir gruplandırma yapılmaya çalışılmış ve böylece fajların birbirleri arasındaki farklılıklar oluşturulan karakterizasyon kodu ile ortaya konulmuştur.

Tablo 17. Farklı karakterizasyon analiz sonuçlarına göre bakteriyofaj izolatlarının gruplandırılması

Bakteriyofaj Kodu	TEM	RAPD-PCR			DNA Paketleme Mekanizması	HRM	Konakçı Özgüllüğü	Bakteriyofaj karakterizasyon kodu
		P1	P2	OPL5				
ST1-78	S*	A	1	x	c	α	a	SA1xc α a
ST3-86	S	B	1	y	c	β	b	SB1yc β b
ST3-94	S	B	1	y	c	β	b	SB1yc β b
ST3-97B	S	C	2	z	-	γ	c	SC2z- γ c
ST3-97K	S	B	1	y	c	β	d	SB1yc β d
ST5-77	S	D	1	t	c	δ	e	SD1tc δ e
ST5-78	S	D	1	t	c	α	e	SD1tc α e
ST5-79	S	D	1	t	c	δ	f	SD1tc δ f
ST5-94B	S	D	1	t	c	δ	e	SD1tc δ e
ST5-94K	S	D	1	t	c	δ	g	SD1tc δ g

*: karakterizasyon amacıyla yapılan gruplandırma kodları aşağıda sunulmuştur.

TEM: Tüm faj izolatlarının tek bir gruba (Siphoviridae, S) ait olduğu görülmüştür.

P1: A, B, C ve D

P2: 1 ve 2

OPL5: x, y, z ve t

DNA Paketleme Mekanizması: Cos: c, Pac: p, 5093: 5 ve 981: 9

HRM: α , β , γ ve δ

Konakçı özgüllüğü: a, b, c, d, e, f ve g

Tablo 17’de görüldüğü üzere konakçı özgüllüğü dikkate alındığında izole edilen 10 fajın 8 farklı gruba ayrılabilirdiği görülmektedir. Ancak bakteriyal faj direnç mekanizmasından dolayı değişebilmesi ve farklı fajlar için standart bir konakçı kültür koleksiyonunun oluşturulmasındaki zorluklar nedeniyle konakçı özgüllüğüne dayalı bir sınıflandırmanın yapılması nispeten zor görünmektedir. Konakçı özgüllüğü dikkate alınmadığında ise 5 farklı grubun olduğu görülmektedir. Bu durumun, herhangi bir karakterizasyon metodunun tek başına değerlendirilmesinden daha iyi olduğu görülmektedir. İlgili tablo (Tablo 17) incelendiğinde karakterizasyon kabiliyetinin artırılmasında HRM analizinin etkili olduğu görülmektedir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmada; Erzurum ve çevre illerden temin edilen 57 çiğ süt, 20 ev tipi yoğurt, 21 endüstriyel yoğurt, 4 peyniraltı suyu ve 5 adet fabrika gideri olmak üzere toplamda 107 numune kullanılmıştır. Sırası ile konakçı kültürlerin hazırlanması, fajların ön saflaştırılması ve izolasyonu, faj varlığının belirlenmesi, saflaştırılması, zenginleştirilmesi ve titre belirleme işlemleri gerçekleştirilmiştir. Bu işlemler sonrasında 10 adet *Streptococcus thermophilus* fajı izole edilmiş olup *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* fajı tespit edilememiştir. İzole edilen fajların karakterizasyonu amacıyla ilk olarak TEM ile görüntüleme gerçekleştirilmiş ve tüm faj izolatlarının Siphoviridae familyasına ait olduğu görülmüştür. Ardından moleküler karakterizasyon amacıyla; cos, pac, 5093 ve 987 grup primerleri ile DNA paketleme mekanizmasına göre PCR temelli gruplandırma; P1, P2 ve OPL5 primerleri ile RAPD-PCR ve cos primerleri ile RT-PCR HRM işlemi gerçekleştirilmiştir. İşlem sonucunda 9 adet fajın cos grubuna ait olduğu, birinin ise hiçbir gruba dahil olmadığı belirlenmiştir. Fajların P1 ve OPL5 RAPD-PCR sonuçlarına göre 4, P2 RAPD-PCR sonucuna göre 2 grup oluşturduğu tespit edilmiştir. Amplikon uzunluğunun uygun olduğu görülen cos grubu fajlar için de ilgili primer kullanılarak yapılan RT-PCR HRM analizi ile 3, cos olmayan faj dikkate alındığında toplam 4 grubun varlığı tespit edilmiştir.

Fajların yoğurt bakterilerini lize edebilme yeteneklerinin tespiti amacıyla Atatürk Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Gıda Mikrobiyolojisi Laboratuvarı Kültür Koleksiyonunda bulunan 294 *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* suşundan makroskobik, mikroskobik ve moleküler karakterizasyon çalışmalarında (Aktaş 2018; Fırat 2019) gözlenen farklılıkları dikkate alınarak 20 adet *Streptococcus thermophilus* ve 26 *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* olmak üzere toplamda 46 suş kullanılmıştır. Çalışmada izole edilen 7 farklı bakteriyofaj tarafından lize edilebilen *Streptococcus thermophilus* ST5 suşu en hassas yoğurt bakterisi olarak değerlendirilmiştir. *Streptococcus thermophilus* suşlarının %70'inin izole edilen fajlara dirençli olduğu görülmüştür.

Denemede kullanılan 46 suş için lizojeni varlığı UV, Mitomisin C ve sıcaklık uygulamaları ile araştırılmıştır. Araştırma sonucunda çalışmada kullanılan hiçbir suşta lizojeni tespit edilememiştir. Bununla beraber kullanılan suşlar, lizojen varlığında gözlenen paketleme mekanizması olması nedeniyle pac grubu açısından PCR temelli olarak değerlendirilmiştir.

Benzer şekilde hiçbir suş, pac primerleri için PCR işlemi sonucunda amplifikasyon göstermemiştir.

Çalışmamızda virüs karakterizasyonunda HRM analizinin kullanılabilirliği test edilmiş olup özellikle uygun genlere yönelik HRM temelli metot optimizasyonunun konuyla ilgili çalışmalara katkı sağlayacağı görülmüştür.

Konu ile ilgili literatür incelendiğinde, *Lactobacillus* fajlarının izolasyon sıklığının daha az olduğu görülmektedir. Bizim çalışmamızda da *Streptococcus thermophilus* fajlarının izolasyonu bu bilgiyi teyit eder niteliktedir.

Çalışmada dikkat çeken bir diğer husus, faj hassasiyeti olan suşların tümünün ticari yoğurt kültürü izolatları olmalarıdır. Bu durum; belirli aralıklarla, faj direnci olan suşların sektöre kazandırılma ihtiyacını da ortaya koymaktadır.

Literatür çalışmalarında gözlenen bir durum gıda sektörü açısından tehdit oluşturan fajlara yönelik direnç mekanizmaları çalışmalarının oldukça az olduğudur. Oysa direnç mekanizmalarının aydınlatılması hem faj dirençli starter kültürlerinin üretilmesi için hem de patojen ve bozucu mikroorganizmaların kontrol altına alınabilmesi açısından oldukça önemlidir.

Yoğurt, özellikle ülkemizde toplam beslenmesindeki yeri ve sağlık üzerindeki olumlu etkileri ile üretim, dolayısıyla tüketim miktarının fazlılığı nedeniyle üzerinde çalışmalar yapılan ve daha birçok çalışmanın yapılması gereken milli bir ürünümdür. Bu çalışmayla ilgili literatüre ve özellikle *Streptococcus thermophilus* fajlarına yönelik yapılan karakterizasyon metotlarına katkı sağlanmaya çalışılmıştır. Çalışmada kullanılan HRM metodunun karakterizasyon açısından sağladığı katkı önemli bulunmuş olup hem yoğurt fajları ile ilgili çalışmalar açısından hem de diğer fajların karakterizasyonu açısından kullanılabilir olduğu görülmüştür.

KAYNAKLAR

- Acar Soykut, E. ve Tunail, N., 2010. *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Virulent Fajlarının Morfolojik Karakterizasyonu. Gıda, 35(5), 317-323.
- Acar Soykut, E., 2007. *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Virulent Fajlarının Replikasyon Parametreleri, Kapsid Protein Profilleri ve Restriksiyon Endonükleaz Analizleri Esas Alınarak Tanımlanmaları ve Sınıflandırılmaları. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Acar Soykut, E., 2017. *Streptococcus thermophilus* 231-X10 Fajının Kısmi Genomik Karakterizasyonu. Gıda, 42(2), 136-144.
- Acar, E., 2002. Yoğurt starter kültür fajlarının elektron mikroskobu ile morfolojik karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Ackermann, H.W., 2009a. Basic Phage Electron Microscopy. Bacteriophages, Ed: Clokie, M.R. and Kropinske, A.M. Yeni Delhi, Hindistan, 113-126.
- Ackermann, H.W., 2009b. Phage Classification and Characterization. Bacteriophages, Ed: Clokie, M.R. and Kropinske. Humana Press, A.M. Yeni Delhi, Hindistan, 127-140.
- Ackermann, H.W., 2012. Bacteriophage Electron Microscopy. Advances in Virus Research, Ed: M, Łobocka. and W.T. Szybalski. Academic Press, Quebec, Canada, 1-32.
- Aktaş, H. and Cetin, B., 2022. Investigation of starter culture properties and antifungal activities of pickle-derived lactic acid bacteria. Gıda, 47(3), 387-398.
- Aktaş, H., 2018. Ev Yapımı ve Endüstriyel Olarak Üretilen Yoğurtların Mikrobiyolojik Özelliklerinin İncelenmesi ve Potansiyel Probiyotik Suşların Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Almeida, G. M., Leppänen, M., Maasilta, I. J. and Sundberg, L. R., 2018. Bacteriophage imaging: past, present and future. Research in microbiology, 169(9), 488-494.
- Aryal, S., 2022. Electron Microscope- Definition, Principle, Types, Uses, Labeled Diagram. <https://microbenotes.com/electron-microscope-principle-types-components-applications-advantages-limitations/#1-transmission-electron-microscope-tem> (27.05.2022).
- Aryana, K. J. and Olson, D.W., 2017. A 100-Year Review: Yogurt and other cultured dairy products. Journal of Dairy Science, 100(12), 9987-10013.
- Azam, A.H. and Tanji, Y., 2019. Bacteriophage-host arm race: an update on the mechanism of phage resistance in bacteria and revenge of the phage with the perspective for phage therapy. Applied microbiology and biotechnology, 103(5), 2121-2131.
- Barrangou, R., Yoon, S. S., Breidt Jr, F., Fleming, H. P. and Klaenhammer, T. R., 2002. Characterization of six *Leuconostoc fallax* bacteriophages isolated from an industrial sauerkraut fermentation. Applied and Environmental Microbiology, 68(11), 5452-5458.
- Basmechi, M., Mirdamady, S., Bagheri, F. and Azizmohseni, F., 2014. Study of phage infection in lactic acid bacteria isolated from home made. Iranian Journal of Public Health, 43(2), 251.
- Batinovic, S., Wassef, F., Knowler, S. A., Rice, D. T., Stanton, C. R., Rose, J., Tucci, J., Nittami, T., Vinh, A., Drummond, G.R., Sobey, C.G., Chan, H.T., Seviour, R.J., Petrovski, S. and Franks, A.E., 2019. Bacteriophages in natural and artificial environments. Pathogens, 8(3), 100.

- Binetti, A. G. and Reinheimer, J. A., 2000. Thermal and chemical inactivation of indigenous *Streptococcus thermophilus* bacteriophages isolated from Argentinian dairy plants. *Journal of food protection*, 63(4), 509-515.
- Cahan, Y., 2019. *Streptococcus pyogenes*'in Tanısında Kullanılan Testlerin Karşılaştırılması, Bakteriyofaj İzolasyonu ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Rize.
- Campagna, C., Villion, M., Labrie, S. J., Duchaine, C. and Moineau, S., 2014. Inactivation of dairy bacteriophages by commercial sanitizers and disinfectants. *International journal of food microbiology*, 171, 41-47.
- Capra, M. L., Neve, H., Sorati, P. C., Atamer, Z., Hinrichs, J., Heller, K. J. and Quiberoni, A., 2013. Extreme thermal resistance of phages isolated from dairy samples: Updating traditional phage detection methodologies. *International Dairy Journal*, 30(2), 59-63.
- Cetin, B., 2011. Production of probiotic mixed pickles (Tursu) and microbiological properties. *African Journal of Biotechnology*, 10(66), 14926-14931.
- Chen, C., Zhao, S., Hao, G., Yu, H., Tian, H., and Zhao, G. 2017. Role of lactic acid bacteria on the yogurt flavour: A review. *International Journal of Food Properties*, 20(sup1), 316-330.
- Chopin, M. C., Chopin, A., and Bidnenko, E., 2005. Phage abortive infection in lactococci: variations on a theme. *Current opinion in microbiology*, 8(4), 473-479.
- Comeau, A.M., Short, S.M., and Suttle, C.A., 2004. The use of degenerate-primed random amplification of polymorphic DNA (DP-RAPD) for strain-typing and inferring the genetic
- Common, J., Morley, D., Westra, E.R. and van Houte, S., 2019. CRISPR-Cas immunity leads to a coevolutionary arms race between *Streptococcus thermophilus* and lytic phage. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 374(1772), 20180098.
- Cortes, P., Spricigo, D. A., Bardina, C. and Llagostera, M., 2015. Remarkable diversity of *Salmonella* bacteriophages in swine and poultry. *FEMS Microbiology Letters*, 362(2), 1-7.
- del Rio, B., Binetti, A. G., Martín, M. C., Fernandez, M., Magadan, A. H. and Alvarez, M. A., 2007. Multiplex PCR for the detection and identification of dairy bacteriophages in milk. *Food microbiology*, 24(1), 75-81.
- Dias, R.S., Abe, A.E., Lima, H.S., Silva, L.C.F., de Paula, S.O., and da Silva, C.C., 2020. Viral concentration methods for diversity studies in soil samples. *Applied Soil Ecology*, 155, 103666.
- Doron, S., Melamed, S., Ofir, G., Leavitt, A., Lopatina, A., Keren, M., and Sorek, R., 2018. Systematic discovery of antiphage defense systems in the microbial pangenome. *Science*, 359(6379), eaar4120.
- Dupuis, M. È., Villion, M., Magadán, A. H., and Moineau, S. 2013. CRISPR-Cas and restriction–modification systems are compatible and increase phage resistance. *Nature communications*, 4(1), 1-7.
- Durlu, F., 1991. Türkiye’de Peynir Yapımında Kullanılan Streptokok İçeren Ticari Starterlerin Yerli Bakteriyofajlara Karşı Dirençliliklerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Dy, R. L., Przybilski, R., Semeijn, K., Salmond, G. P. and Fineran, P. C. 2014. A widespread bacteriophage abortive infection system functions through a Type IV toxin–antitoxin mechanism. *Nucleic acids research*, 42(7), 4590-4605.

- Ebrecht, A. C., Guglielmotti, D. M., Tremmel, G., Reinheimer, J. A. and Suárez, V. B., 2010. Temperate and virulent *Lactobacillus delbrueckii* bacteriophages: comparison of their thermal and chemical resistance. *Food microbiology*, 27(4), 515-520.
- Egido, J. E., Costa, A. R., Aparicio-Maldonado, C., Haas, P. J. and Brouns, S. J., 2022. Mechanisms and clinical importance of bacteriophage resistance. *FEMS microbiology reviews*, 46(1), fuab048.
- El-Abbadi, N. H., Dao, M. C. and Meydani, S. N., 2014. Yogurt: role in healthy and active aging. *The American journal of clinical nutrition*, 99(5), 1263S-1270S.
- Erdem, M., Kesmen, Z., Özbekar, E., Çetin, B., and Yetim, H., 2016. Application of high-resolution melting analysis for differentiation of spoilage yeasts. *Journal of Microbiology*, 54(9), 618-625.
- Ergin, F., 2019. Bakteriyofaj Mikrokapsülasyonunun Optimizasyonu ve Mikrokapsüle Bakteriyofajın Yoğurt Üretiminde Kullanım Olanaklarının Araştırılması. *Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Antalya*.
- Erkmen, O., and Bozoglu, T. F., 2016. *Food microbiology, 2 volume set: Principles into practice*. John Wiley and Sons, Ltd, Gaziantep, Turkey.
- Farnsworth, K.D., 2021. An organisational systems-biology view of viruses explains why they are not alive. *Biosystems*, 200, 104324.
- Fernández, L., Escobedo, S., Gutiérrez, D., Portilla, S., Martínez, B., García, P. and Rodríguez, A., 2017. Bacteriophages in the dairy environment: From enemies to allies. *Antibiotics*, 6(4), 27.
- Fernandez, M. A., Picard-Deland, É., Le Barz, M., Daniel, N. and Marette, A., 2017. Yogurt and health. In *Fermented Foods In Health And Disease Prevention*, Ed: Frias, J., Villaluenga, C.M. and Penas, E. Academic Press, 305-338.
- Fisberg, M., and Machado, R., 2015. History of yogurt and current patterns of consumption. *Nutrition reviews*, 73(suppl_1), 4-7.
- Forghani, F., Singh, P., Seo, K. H. and Oh, D. H., 2016. A novel pentaplex real time (RT)-PCR high resolution melt curve assay for simultaneous detection of emetic and enterotoxin producing *Bacillus cereus* in food. *Food Control*, 60, 560-568.
- Garneau, J. E., and Moineau, S., 2011. Bacteriophages of lactic acid bacteria and their impact on milk fermentations. *Microbial cell factories*, 10(1), 1-10.
- Gencay, Y. E., Birk, T., Sørensen, M. C. H., and Brøndsted, L., 2017. Methods for isolation, purification, and propagation of bacteriophages of *Campylobacter jejuni*. In *Campylobacter jejuni*, Ed: Butcher, J. and Stintzi, A. Humana Press, New York, NY, 19-28.
- Gevers, D., Huys, G. and Swings, J., 2001. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS microbiology letters*, 205(1), 31-36.
- Goldfarb, T., Sberro, H., Weinstock, E., Cohen, O., Doron, S., Charpak-Amikam, Y., Afik, S., Ofir, G. and Sorek, R., 2015. BREX is a novel phage resistance system widespread in microbial genomes. *The EMBO journal*, 34(2), 169-183.
- Gökçe, Ö., 2010. *Lactobacillus delbrueckii* Bakteriyofajı LL-H'nin Konakçı Spektrumu. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Pamukkale.
- Guglielmotti, D. M., Mercanti, D. J., Reinheimer, J. A. and Quiberoni, A.D.L., 2012. Efficiency of physical and chemical treatments on the inactivation of dairy bacteriophages. *Frontiers in microbiology*, 2, 282.

- Guo, T., Zhang, C., Xin, Y., Xin, M. and Kong, J., 2016. A novel chimeric prophage vB_LdeS-phiJB from commercial *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 43(5), 681-689.
- Gutiérrez, D., Martín-Platero, A. M., Rodríguez, A., Martínez-Bueno, M., García, P. and Martínez, B., 2011. Typing of bacteriophages by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR to assess genetic diversity. FEMS microbiology letters, 322(1), 90-97.
- Gümüştas, A., 2015. Laktik Asit Bakteri Ve Bakteriyo fajlarının Çeşitli Kaynaklardan İzolasyonu ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Hanemaaijer, L., Kelleher, P., Neve, H., Franz, C. M., de Waal, P. P., van Peij, N.N. and Mahony, J., 2021. Biodiversity of Phages Infecting the Dairy Bacterium *Streptococcus thermophilus*. Microorganisms, 9(9), 1822.
- Hassan, A. A., and Youssef, M. A. H., 2011. Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* bacteriophages using electron microscope and RAPD-PCR. Journal of Agricultural Chemistry and Biotechnology, 2(12), 343-359.
- Hill, D., Ross, R. P., Arendt, E. and Stanton, C., 2017. Microbiology of yogurt and bio-yogurts containing probiotics and prebiotics. In Yogurt in health and disease prevention, Ed: Shah, N.P. Academic Press, 69-85.
- Hinsberger, A., Theulier Saint Germain, S., Guerrero, P., Blachère-López, C., López-Ferber, M. and Bayle, S., 2019. A combination of real-time PCR and high-resolution melting analysis to detect and identify CpGV genotypes involved in type I resistance. Viruses, 11(8), 723.
- Hökelekli, Ç., 2021. Yoğurt Bakterilerinin Elektropüskürtme Yöntemi ile Kapsülasyonunun Optimizasyonu ve Kapsüle Yoğurt Bakterilerinin Yoğurt Üretiminde Kullanım Olanaklarının Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Antalya.
- Hussain, W., Ullah, M. W., Farooq, U., Aziz, A. and Wang, S., 2021. Bacteriophage-based advanced bacterial detection: Concept, mechanisms, and applications. Biosensors and Bioelectronics, 177, 112973.
- Kahraman, E., 2006. *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Suşlarında Lizogeninin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Kaleli, D., 2001. *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* fajlarının izolasyonu ve yoğurt starter kültürleri üzerine litik etkilerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Kavas, G., 1997. Faja Dayanıklı Yoğurt Kültürü Elde Edilmesi Üzerinde Bir Araştırma. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Kishino, S., Ogawa, J., Omura, Y., Matsumura, K. and Shimizu, S., 2002. Conjugated linoleic acid production from linoleic acid by lactic acid bacteria. Journal of the American Oil Chemists' Society, 79(2), 159-163.
- Kumari, S., Harjai, K. and Chhibber, S., 2009. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* PAO specific bacteriophages isolated from sewage samples. Am J Biomed Sci, 1(2), 91-102.
- Kutter, E., 2009. Phage host range and efficiency of plating. In Bacteriophages, Ed: Clokie, M.R. and Kropinski, A.M.. Humana Press, 141-149.
- Labrie, S. and Moineau, S., 2000. Multiplex PCR for detection and identification of lactococcal bacteriophages. Applied and Environmental Microbiology, 66(3), 987-994.

- Labrie, S. J., Samson, J. E. and Moineau, S., 2010. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature Reviews Microbiology*, 8(5), 317-327.
- Lavelle, K., Martinez, Í., Neve, H., Lugli, G.A., Franz, CMAP., Ventura, M., Bello, F.D., Sinderen, D.V. and Mahony, J., 2018. Biodiversity of *Streptococcus thermophilus* phages in global dairy fermentations. *Viruses*, 10(10):577.
- Lembke, J., Krusch, U., Lompe, A. and Teuber, M., 1980. Isolation and ultrastructure of bacteriophages of group N (lactic) streptococci. *Zentralblatt für Bakteriologie: I. Abt. Originale C: Allgemeine, angewandte und ökologische Mikrobiologie*, 1(1), 79-91.
- Li, W., Bian, X., Evivie, S. E. and Huo, G. C., 2016. Comparative analysis of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) of *Streptococcus thermophilus* St-I and its bacteriophage-insensitive mutants (BIM) derivatives. *Current microbiology*, 73(3), 393-400.
- Lopatina, A., Tal, N., and Sorek, R., 2020. Abortive infection: bacterial suicide as an antiviral immune strategy. *Annual review of virology*, 7, 371-384.
- Ma, C., Chen, Z., Gong, G., Huang, L., Li, S. and Ma, A., 2015. Starter culture design to overcome phage infection during yogurt fermentation. *Food Science and Biotechnology*, 24(2), 521-527.
- Mansour, N.M., 2018. Bacteriophages are natural gift, could we pay further attention!. *Journal of Food Microbiology*, 2(1), 1-3.
- Marcó, M. B. and Mercanti, D. J., 2021. Bacteriophages in dairy plants. In *Advances in Food and Nutrition Research*, Ed: Toldrá, F. Academic Press, 1-54.
- Marcó, M. B., del Luján Quiberoni, A., Negro, A. C., Reinheimer, J. A., and Alfano, O. M. 2011. Evaluation of the photocatalytic inactivation efficiency of dairy bacteriophages. *Chemical engineering journal*, 172(2-3), 987-993.
- Marcó, M. B., Moineau, S. and Quiberoni, A., 2012. Bacteriophages and dairy fermentations. *Bacteriophage*, 2(3), 149-158.
- Marcó, M. B., Suárez, V. B., Quiberoni, A. and Pujato, S.A., 2019. Inactivation of dairy bacteriophages by thermal and chemical treatments. *Viruses*, 11(5), 480.
- Marcó, M., Machado, N., Quiberoni, A. and Suárez, V., 2022. *Streptococcus thermophilus* Phages in Whey Derivatives: From Problem to Application in the Dairy Industry. *Viruses*, 14(4), 810.
- Mazzocco, A., Waddell, T. E., Lingohr, E. and Johnson, R.P., 2009. Enumeration of bacteriophages using the small drop plaque assay system. In *Bacteriophages*, Ed: Clokie, M.R. and Kropinski, A.M. Humana Press, 81-85
- McDonnell, B., Mahony, J., Neve, H., Hanemaaijer, L., Noben, J. P., Kouwen, T., and van Sinderen, D., 2016. Identification and analysis of a novel group of bacteriophages infecting the lactic acid bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Applied and environmental microbiology*, 82(17), 5153-5165.
- Meydani, S. N., and Ha, W. K., 2000. Immunologic effects of yogurt. *The American journal of clinical nutrition*, 71(4), 861-872.
- Mills, S., Griffin, C., O'sullivan, O., Coffey, A., McAuliffe, O. E., Meijer, W. C., Serrano, L.M. and Ross, R.P., 2011. A new phage on the 'Mozzarella' block: bacteriophage 5093 shares a low level of homology with other *Streptococcus thermophilus* phages. *International dairy journal*, 21(12), 963-969.

- Moye, Z. D., Woolston, J. and Sulakvelidze, A., 2018. Bacteriophage applications for food production and processing. *Viruses*, 10(4), 205.
- Murphy, J., Mahony, J., Fitzgerald, G.F. and van Sinderen, D., 2017. Bacteriophages infecting lactic acid bacteria. In Cheese, Ed: McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter, P.D. and Everett, D.W. Academic Press, Cork, Ireland, 249-272.
- Mutalik, V.K., Novichkov, P.S., Price, M.N., Owens, T.K., Callaghan, M., Carim, S., Deutschbauer, A.M. and Arkin, A.P., 2019. Dual-barcoded shotgun expression library sequencing for high-throughput characterization of functional traits in bacteria. *Nature communications*, 10(1), 1-14.
- Nagaoka, S., 2019. Yogurt production. In Lactic acid bacteria, Ed: Kanauchi, M. Humana Press, New York, NY. 45-54,
- Nale, J. Y., Shan, J., Hickenbotham, P. T., Fawley, W. N., Wilcox, M. H., and Clokie, M. R., 2012. Diverse temperate bacteriophage carriage in *Clostridium difficile* 027 strains. *PloS one*, 7(5), e37263.
- Nikolich, M.P. and Filippov, A.A., 2020. Bacteriophage therapy: developments and directions. *Antibiotics*, 9(3), 135.
- Ofir, G., Melamed, S., Sberro, H., Mukamel, Z., Silverman, S., Yaakov, G., Doron, S. and Sorek, R. (2018). DISARM is a widespread bacterial defence system with broad anti-phage activities. *Nature microbiology*, 3(1), 90-98.
- Orlova, E., (2012). Bacteriophages and their structural organisation. InTech. 3-30
- Özdemir, S., Bodur, A.E., 1994. Yoğurt üretimi sırasında oluşan fiziksel, kimyasal ve biyokimyasal olaylar. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 25(3), 479-487.
- Özer, B., 2006. Yoğurt Bilimi Ve Teknolojisi. Sidas Medya LTD.ŞTİ., 488s, Şanlıurfa.
- Özyurt, Ş., 2005. Doğal (yerel) *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suşlarında endüstriyel öneme sahip özelliklerin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Panezai, N., 2021. Strategies Used to Control Bacteriophages Contamination in Dairy Food and Industry. *Pak-Euro Journal of Medical and Life Sciences*, 4(Special Is), S1-S10.
- Philippe, C., Levesque, S., Dion, M. B., Tremblay, D. M., Horvath, P., Lüth, N., Cambillau, C., Franz, C., Neve, H., Fremaux, C., Heller, K.J. and Moineau, S., 2020. Novel genus of phages infecting *Streptococcus thermophilus*: genomic and morphological characterization. *Applied and environmental microbiology*, 86(13), e00227-20.
- Pujato, S.A., Quiberoni, A. and Mercanti, D.J., 2019. Bacteriophages on dairy foods. *Journal of applied microbiology*, 126(1), 14-30.
- Qiagen Type-it HRM PCR Handbook 2009.
- Quiberoni, A., Auad, L., Binetti, AG, Suárez, VB, Reinheimer, J.A. and Raya, R.R., 2003a. Comparative analysis of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages isolated from a yogurt industry plant. *Gıda Mikrobiyolojisi*, 20 (4), 461-469.
- Quiberoni, A., Guglielmotti, D. M. and Reinheimer, J. A., 2003b. Inactivation of *Lactobacillus delbrueckii* bacteriophages by heat and biocides. *International journal of food microbiology*, 84(1), 51-62.
- Quiberoni, A., Guglielmotti, D., Binetti, A. and Reinheimer, J. 2004. Characterization of three *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* phages and the physicochemical analysis of phage adsorption. *Journal of Applied Microbiology*, 96(2), 340-351.

- Quiberoni, A., Moineau, S., Rousseau, G.M. and Reinheimer, J., 2010. *Streptococcus thermophilus* bacteriophages. *International Dairy Journal*, 20, 657-665.
- Quiberoni, A., Tremblay, D., Ackermann, H. W., Moineau, S. and Reinheimer, J. A., 2006. Diversity of *Streptococcus thermophilus* phages in a large-production cheese factory in Argentina. *Journal of Dairy Science*, 89(10), 3791-3799.
- Raya, R.R. and Hebert, E.M., 2009. Isolation of Phage via Induction of Lysogens. *Bacteriophages*, Clokie, M.R. and Kropinske, A.M. Yeni Delhi, Hindistan, 23-32.
- Romero, D. A., Magill, D., Millen, A., Horvath, P. and Fremaux, C., 2020. Dairy lactococcal and streptococcal phage-host interactions: an industrial perspective in an evolving phage landscape. *FEMS Microbiology Reviews*, 44(6), 909-932.
- Rossetti, L. and Giraffa, G., 2005. Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated, RAPD-PCR fingerprint databases. *Journal of microbiological methods*, 63(2), 135-144.
- Rybicki, E., 1990. The classification of organisms at the edge of life or problems with virus systematics. *South African Journal of Science*, 86(4), 182.
- Sadiq, F. A., He, G., Sakandar, H. A., Li, Y. and Ou, K., 2019. Lactococcus lactis phages from the perspective of their diversity, thermal and biocidal resistance. *International Dairy Journal*, 90, 28-38.
- Samson, J. E. and Moineau, S., 2013. Bacteriophages in food fermentations: new frontiers in a continuous arms race. *Annual review of food science and technology*, 4, 347-368.
- Serafeimidou, A., Zlatanov, S., Laskaridis, K. and Sagredos, A., 2012. Chemical characteristics, fatty acid composition and conjugated linoleic acid (CLA) content of traditional Greek yogurts. *Food Chemistry*, 134(4), 1839-1846.
- Shivu, M. M., Rajeeva, B. C., Girisha, S. K., Karunasagar, I., Krohne, G. and Karunasagar, I., 2007. Molecular characterization of *Vibrio harveyi* bacteriophages isolated from aquaculture environments along the coast of India. *Environmental microbiology*, 9(2), 322-331.
- Sieber, R., Collomb, M., Aeschlimann, A., Jelen, P. and Eyer, H., 2004. Impact of microbial cultures on conjugated linoleic acid in dairy products-a review. *International Dairy Journal*, 14(1), 1-15.
- similarity among closely related viruses. *J Virol Methods* 118: 95–100
- Smug, B. J., Majkowska-Skrobek, G. and Drulis-Kawa, Z., 2022. PhREEPred: Phage Resistance Emergence Prediction web to foresee encapsulated bacterial escape from phage cocktail treatment. *Journal of Molecular Biology*, 167670.
- Solis BioDyne 5x HOT FIREPol EvaGreen qPCR Supermix Handbook.
- Stanley, E., Grath, S. M., Fitzgerald, G. F. and Sinderen, D.V., 2003. Comparative genomics of bacteriophage infecting lactic acid bacteria. In *Genetics of Lactic Acid Bacteria*. Springer, 45-94, Boston, MA.
- Stout, E., Klaenhammer, T. and Barrangou, R., 2017. CRISPR-Cas technologies and applications in food bacteria. *Annual review of food science and technology*, 8, 413-437.
- Sturino, J. M. and Klaenhammer, T.R., 2002. Expression of antisense RNA targeted against *Streptococcus thermophilus* bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(2), 588-596.

- Sturino, J. M. and Klaenhammer, T.R., 2004. Bacteriophage defense systems and strategies for lactic acid bacteria. *Advances in applied microbiology*, 56, 332-378.
- Suárez, V. B., Quiberoni, A., Binetti, A. G. and Reinheimer, J. A., 2002. Thermophilic lactic acid bacteria phages isolated from Argentinian dairy industries. *Journal of food protection*, 65(10), 1597-1604.
- Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., and Morris Jr, J.G., 2001. Bacteriophage therapy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(3), 649-659.
- Szczepankowska, A. K., Górecki, R. K., Kołakowski, P. and Bardowski, J. K., 2013. Lactic acid bacteria resistance to bacteriophage and prevention techniques to lower phage contamination in dairy fermentation. *Lactic Acid Bacteria-R & D for Food, Health and*, 23-71.
- Szymczak, P., Janzen, T., Neves, A. R., Kot, W., Hansen, L. H., Lametsch, R., Neve, H., Franz, C.M.A.P. and Vogensen, F.K., 2017. Novel variants of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages are indicative of genetic recombination among phages from different bacterial species. *Applied and environmental microbiology*, 83(5), e02748-16.
- Szymczak, P., Vogensen, F. K. and Janzen, T., 2019. Novel isolates of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages from group 5093 identified with an improved multiplex PCR typing method. *International dairy journal*, 91, 18-24.
- Tarakçıoğlu, F., 2019. Model süt işletmesinde kontaminasyon kaynağının belirlenmesi amacı ile yüksek çözünürlüklü erime (HRM) analizinin kullanımı. *Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum*.
- Tayyarcı, K., Acar Soykut, E. and Boyacı, İ.H., 2018. A raman-spectroscopy-based approach for detection and discrimination of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* phages at low titer in raw milk. *Folia Microbiologica*, 63, 627-636.
- TÜİK, Türkiye İstatistik Kurumu. Süt ve Süt Ürünleri Üretimi (Ocak 2022). <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Sut-ve-Sut-Urunleri-Uretimi-Ocak-2022-45748>.
- Vasu, K. and Nagaraja, V., 2013. Diverse functions of restriction-modification systems in addition to cellular defense. *Microbiology and molecular biology reviews*, 77(1), 53-72.
- Veesler, D. and Cambillau, C., 2011. A common evolutionary origin for tailed-bacteriophage functional modules and bacterial machineries. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(3), 423-433.
- Verreault, D., Gendron, L., Rousseau, G. M., Veillette, M., Massé, D., Lindsley, W. G., Moineau, S. and Duchaine, C., 2011. Detection of airborne lactococcal bacteriophages in cheese manufacturing plants. *Applied and environmental microbiology*, 77(2), 491-497.
- Verreault, D., Moineau, S. and Duchaine, C., 2008. Methods for sampling of airborne viruses. *Microbiology and molecular biology reviews*, 72(3), 413-444.
- Villion, M. and Moineau, S., 2009. Bacteriophages of *Lactobacillus*. *Frontiers in Bioscience* 14, 1661-1683.
- Vossen, R.H., Aten, E., Roos, A. and den Dunnen, J.T., 2009. High-Resolution Melting Analysis (HRMA)—More than just sequence variant screening. *Human mutation*, 30(6), 860-866.
- Wagner, N., Brinks, E., Samtlebe, M., Hinrichs, J., Atamer, Z., Kot, W., Franz, C.M.A.P., Neve, H. and Heller, K.J., 2017. Whey powders are a rich source and excellent storage matrix for dairy bacteriophages. *International Journal of Food Microbiology*, 241, 308-317.

- Winey, M., Meehl, J. B., O'Toole, E. T. and Giddings Jr, T.H., 2014. Conventional transmission electron microscopy. *Molecular biology of the cell*, 25(3), 319-323.
- Yahya, H.A. and Naeima, M.Y., 2014. Detection and characterization of bacteriophages attacking dairy *Streptococcus thermophilus* starter cultures. *African Journal of Microbiology Research*, 8(27), 2598-2603.
- Yurdakök, M., 2015. Yoğurdun öyküsü: Probiyotiklerin tarihi. Güneş Tıp Kitabevleri.
- Zinno, P., Janzen, T., Bennedsen, M., Ercolini, D. and Mauriello, G., 2010. Characterization of *Streptococcus thermophilus* lytic bacteriophages from mozzarella cheese plants. *International journal of food microbiology*, 138(1-2), 137-144.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Feyza ERKAN
Doğum tarihi:	
Doğum Yeri:	
Uyruğu:	
Adres:	
E-mail:	
Eğitim	
Lisans:	Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi
Yüksek lisans:	Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı (2019-2022)
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	İyi