

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NEONATAL BUZAĞI İSHALLERİNDEN İZOLE EDİLEN
Escherichia coli İZOLATLARINA ÖZGÜ LİTİK
BAKTERİYOFAJLARIN İZOLASYONU ve MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU**

Fatma TÜR KARSLAN AKBABA

DOKTORA TEZİ

MİKROBİYOLOJİ (VETERİNER) ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Hasan Hüseyin HADİMLİ

KONYA-2025

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NEONATAL BUZAĞI İSHALLERİNDEN İZOLE EDİLEN
Escherichia coli İZOLATLARINA ÖZGÜ LİTİK
BAKTERİYOFAJLARIN İZOLASYONU ve MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU**

Fatma TÜRKARSLAN AKBABA

DOKTORA TEZİ

MİKROBİYOLOJİ (VETERİNER) ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Hasan Hüseyin HADİMLİ

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından BAP-21212056 numaralı ve Tarım ve Orman Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü TAGEM/21/20/AR-GE/21/20 numaralı projeler kapsamında proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2025

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Fatma TÜRKRSLAN AKBABA tarafından savunulan bu çalışma, jürimiz tarafından Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans / Doktora Tezi olarak oy birliği / oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Ünvanı Adı SOYADIÜniversitesi	İmza
Danışman:	Ünvanı Adı SOYADIÜniversitesi	İmza
Üye:	Ünvanı Adı SOYADIÜniversitesi	İmza
Üye:	Ünvanı Adı SOYADIÜniversitesi	İmza
Üye:	Ünvanı Adı SOYADIÜniversitesi	İmza

ONAY:

Bu tez, Selçuk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu... tarih vesayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Unvanı Adı SOYADI

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Neonatal buzağı ishali, özellikle *E. coli* kaynaklı enfeksiyonlar nedeniyle dünyada olduğu gibi ülkemizde de sığır yetiştiriciliğinde önemli kayıplara yol açan bir hastalıktır. *E. coli* patotiplerinin virülans mekanizmalarının moleküler düzeyde anlaşılması, epidemiyolojik yaygınlığının belirlenmesi ve etkili yönetim stratejilerinin geliştirilmesi, bu patojenin neden olduğu hastalıkların kontrolünde kritik öneme sahiptir. Bu bağlamda, *E. coli* kaynaklı neonatal ishallerin kontrolü, sadece veteriner hekimliği açısından değil, aynı zamanda halk sağlığı ve gıda güvenliği perspektifinden de önem taşımaktadır. Zira, antimikrobiyal direncin yayılması ve zoonotik potansiyeli göz önüne alındığında, bu patojenin etkin yönetimi, Tek Sağlık konsepti çerçevesinde değerlendirilmesi önem taşımaktadır.

Bakteriyofaj terapisi, yenidoğan buzağılarda patojenik *E. coli* kaynaklı enfeksiyonların yönetiminde, özellikle neonatal buzağı ishali bağlamında, konvansiyonel antibiyotik tedavileri yerine umut vadeden bir alternatif olarak öne çıkmaktadır. Bu yenilikçi yaklaşım, spesifik bakterileri hedef alan ve elimine eden virüsler olan bakteriyofajların kullanımına dayanmaktadır. Bakteriyofajlar, bakteriyel yükü azaltarak ve enfeksiyonla ilişkili semptomları hafifletmek suretiyle terapötik etki göstermektedir.

Bu çalışma, TAGEM/21/20/AR-GE/21/20 numaralı ve BAP-21212056 numaralı projeler kapsamında yürütülmüştür. Araştırma, neonatal buzağı ishallerine karşı terapötik potansiyele sahip, *E. coli*'ye özgü litik fajların izolasyonu ve moleküler karakterizasyonu ve çoğalma kinetiklerinin belirlenmesi amacı ile yapıldı. Elde edilen deneysel veriler ışığında, neonatal buzağı ishallerinin tedavisinde yenilikçi bir terapötik yaklaşım olarak bakteriyofaj uygulamalarının potansiyelini ortaya koymak, veteriner hekimlik alanında giderek artan antimikrobiyal direnç sorununa karşı alternatif çözümler sunulmasına katkı sağlamak hedeflenmiştir.

Doktora eğitimim sürecinde tez konumun belirlenmesinde bana yol gösteren, bilgi ve deneyimi ile destek olan danışman hocam Prof. Dr. Hasan Hüseyin HADİMLİ'ye teşekkürlerimi sunarım. Mesleki alanda ve her konuda engin bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, meslek büyüğüm Dr. Kadri GÜNDÜZ'e, desteklerinden dolayı Konya Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürü Dr. Yasin GÜLCÜ'ye, tez çalışmasına katkı sağlayan Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı hocalarıma, Milas Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Seyda CENGİZ'e, Eğirdir Su Ürünleri Enstitüsünden Dr. Hakan EREN'e ve Doktora öğrencisi Hacer MARANGOZ'a teşekkürlerimi sunarım. Hayatım boyunca daima sevgisini esirgemeyen, emek verip bugünlere gelmemi sağlayan, annem, babam ve kardeşlerime en içten teşekkürlerimi sunarım. Doktora eğitim sürecinde ve her alanda destek veren değerli eşim Sezer AKBABA'ya, sabır ve anlayışı için canım kızım ve oğluma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Fatma TÜRKARSLAN AKBABA

Nisan / 2025

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR	v
ÖZET	vii
SUMMARY	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Antimikrobiyal Direnç Sorunu.....	1
1.2. Bakteriyofajlar.....	6
1.2.1. Genel Özellikler	6
1.2.2. Bakteriyofajların Sınıflandırılması ve Morfolojisi.....	9
1.2.3. Bakteriyofaj Sınıflandırmasındaki Yeni Gelişmeler	10
1.2.4. dsDNA Fajlar	12
1.2.5. ssDNA Fajlar.....	14
1.2.6. RNA Fajlar	15
1.2.7. Bakteriyofajların Yaşam Döngüsü	15
1.2.8. Litik Bakteriyofajlar	18
1.2.9. Lizojenik Bakteriyofajlar	21
1.2.10. Bakteriyofaj Çeşitliliği ve Karakteristik Genler.....	23
1.2.11. Faj Terapisi.....	27
1.2.12. Faj-Konakçı Etkileşimi	32
1.2.13. Bakteriyel Faj Direnci	33
1.2.14. Bakteriyofajların Bağışıklık Sistemi ile Etkileşimi.....	35
1.2.15. Neonatal Buzağı İshallerine Neden Olan <i>E. coli</i> Patotipleri.....	36
1.2.16. Enterotoksijenik <i>E. coli</i> (ETEC)	37
1.2.17. Enteropatojenik <i>E. coli</i> (EPEC)	38
1.2.18. Enterohemorajik <i>E. coli</i> (EHEC/ STEC).....	39
1.2.19. Hastalık Bulaşma Yolları ve Rezervuar	40
1.2.20. Neonatal Buzağı İshallerini Önlemeye ve Kontrol Etmeye Yönelik Mevcut Stratejiler.....	41
1.2.21. Neonatal Buzağı İshallerinin Tedavisinde Faj Terapisi.....	42
2. GEREÇ VE YÖNTEM	47
2.1. Gereç	47
2.1.1. Etik Kurul Onayı	47
2.1.2. Besiyerleri ve Kimyasallar	47
2.1.3. Oligonükleotidler	49
2.2. Yöntem.....	50
2.2.1. Örneklerin Toplanması.....	50
2.2.2. <i>E. coli</i> İzolasyonu.....	51
2.2.3. Virulens Genlerinin Multipleks PZR ile Tespiti	51
2.2.4. Multipleks PZR	51

2.2.5. Faj İzolasyonu	52
2.2.6. Bakteriyofaj Varlığının Tespiti	53
2.2.7. Bakteriyofaj İzolasyonu	53
2.2.8. Fajların Saflaştırılması	54
2.2.9. DNA Ekstraksiyonu İçin Yüksek Titrele Lizatların Hazırlanması	54
2.2.10. Faj Enfektivitesi ve Faj-Konak Büyüme Dinamiklerinin Belirlenmesi ..	56
2.2.11. Faj Etkinliği ve Virulensinin Değerlendirilmesi	57
2.2.12. Fajların Farklı Sıcaklık ve pH Ortam Şartlarına Dayanıklılıkları	58
2.2.13. Fajların Morfolojik Karakterizasyonu	59
2.2.14. Fajların Genomik DNA Ekstraksiyonu	59
2.2.15. Fajların PZR ile Moleküler Karakterizasyonu	60
2.2.16. RAPD-PZR.....	61
2.2.17. Faj Genom Sekans Analizi ve Veri Analizi	62
3. BULGULAR.....	64
3.1. <i>E. coli</i> İzolasyonu ve Virulens Gen Dağılımı	64
3.2. Faj İzolasyon Bulguları	66
3.3. Konakçı Aralığı	68
3.4. İzole Edilen Fajların Plak Morfolojileri	69
3.5. Fajların Morfolojik Karakterizasyon Bulguları.....	76
3.6. Faj Enfektivitesi ve Faj-Konak Büyüme Dinamiklerinin Belirlenmesi ..	77
3.7. Fajların Farklı Sıcaklık ve pH ortam Şartlarına Dayanıklılıklarının Belirlenmesi	101
3.8. Fajların PZR ile Karakterizasyonu	106
3.9. RAPD-PZR.....	110
3.10. Faj Genom Sekans Analizi.....	112
4. TARTIŞMA.....	118
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	132
6. KAYNAKÇA.....	134
7. EKLER	153
EK-A Analiz Sonuçları	153
EK-B Etik Kurul Kararı	163
EK-C Turnitin Raporu	164
8. ÖZGEÇMİŞ	165

SİMGELER VE KISALTMALAR

AMD : Antimikrobiyal Direnç

AMG: Yardımcı Metabolik Gen

ARG:Antimikrobiyal Direnç Gen

ATCC : American Type Culture Collection

BASEL: Bacteriophage Selection for your Laboratory

BAVS: Bakteriyel ve Archeal Alt Komitesi

CDS: Kodlayan DNA sekansı

CFU : Colony Forming Unit

CI : Centroid Indeks

CRISPR : Düzenli Aralıklarla Bölünmüş Palindromik Kısa Tekrar Dizileri

DMSO: Dimetilsülfaoksit

DNA :Deoksi ribonükleik Asit

ds DNA : Çift Sarmallı DNA

E.coli: Escherichia coli

EDTA: Etilendiamintetraasetik asit

EHEC: Enterohemorajik *Escherichia coli*

EPEC :Enteropatojenik *Escherichia coli*

ETEC: Enterotoksijenik *Escherichia coli*

FAO: Food and Agriculture Organization

HCl:Hidroklorik Asit

HGT: Horizontal Gen Transferi

HUS: Hemorajik Üremik Sendrom

ICTV: Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi

Ig A: Immunglobülin A

Ig M: Immunglobülin M

Ig Y: Immunglobülin Y

Kb: Kilobaz

KOSKİ: Konya Su ve Kanalizasyon İdaresi

LB:Luria Broth

LBA: Luria Bertani Agar

LBB: Luria Bertani Broth

LPS: Lipopolisakkarit
LT: Labil Toksin
MOI: Multiplicity of Infection (Enfeksiyon Çokluğu)
NaOH:Sodyum Hidroksit
NCBI: National Center for Biotechnology Information
NGS: Next-Generation Sequencing
OD: Optik Density
ONT: Oxford Nanopore Sequence
ORF: Open Reading Frame
PCA: Temel Bileşen Analizi
PEG: Polietilen Glikol
PG: Peptidoglikogan
RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA
RBP : Ribosome Binding Site
RNA: Ribonükleik Asit
ss DNA: Tek Sarmallı DNA
SSB: ssDNA bağlayıcı protein
ST: Stabil Toksin
STEC: Shiga Toksini üreten *Escherichia coli*
TBE: Tris-Borik asit-EDTA
TEM:Transmisyon Elektron Mikroskop
UV: Ultra Viyole
 μ M:Mikromolar
WHO : World Health Organization
WOAH: World Organisation for Animal Health

ÖZET

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Neonatal Buzağı İshallerinden İzole Edilen *Escherichia coli* İzolatlarına Özgü Litik Bakteriyofajların İzolasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu

Fatma TÜR KARSLAN AKBABA

Mikrobiyoloji (Veteriner) Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2025

Bakteriyofajlar (fajlar), dünya üzerindeki en yaygın organizmalardır ve keşfedilmiş her ekosistemde bulunabilirler. Son yıllarda dizileme ve biyoinformatik alanlarındaki ilerlemeler, faj çeşitliliği, taksonomisi, konak özgüllüğü, popülasyon yapısı ve genomik özellikler hakkında önemli bilgiler sağlamıştır. Neonatal buzağı ishali, özellikle *Escherichia coli* kaynaklı enfeksiyonlar nedeniyle dünya genelinde ve ülkemizde sığır yetiştiriciliğinde ciddi ekonomik kayıplara yol açmakta ve artan antimikrobiyal direnç sorunu ile birlikte tedavisinde yaşanan zorluklar, yeni ve alternatif tedavi yöntemlerine olan ihtiyacı artırmaktadır. Faj terapisine yönelik artan ilgi ve fajların genellikle dar konakçı aralığına sahip olması, klinik olarak önemli patojenlere karşı etkili fajların elde edilebilmesi için yeni fajların sürekli olarak izole edilmesini ve detaylı şekilde karakterize edilmesini gerekli kılmaktadır.

Bu çalışmada, yeni nesil dizi analiz teknolojisi ve biyoinformatik yaklaşımlar kullanılarak, neonatal ishali buzağılardan izole edilen enteropatogenik *E. coli* suşlarına karşı etkili litik bakteriyofajların çeşitli çevresel kaynaklardan izolasyonu, karakterizasyonu ve kolifaj koleksiyonunun oluşturulması hedeflendi. Çalışma kapsamında neonatal ishali buzağılardan izole edilen 102 *E. coli* suşunun moleküler karakterizasyonu sonucunda, patotip dağılımında STEC (%29,4), ETEC (%10,8) ve EPEC (%2) suşları tespit edilmiştir. Ayrıca 10 hibrit suş (7 STEC/ETEC, 1 ETEC/EPEC, 2 STEC/ETEC/EPEC) belirlenmiştir. Çevresel örneklerden izole edilen 27 kolifajın litik aktivite analizlerinde, fajların %30'u ETEC-1, %26'sı ETEC-2, %15'i ETEC-3, %69'u STEC ve %8'i EPEC+ETEC patotiplerini enfekte edebildiği, bunların arasından 10 fajın çoklu patotip enfeksiyon kapasitesine sahip olduğu gösterilmiştir.

Faj-konak etkileşimini ve popülasyon büyüme dinamiklerini belirlemek için oluşturulan in vitro modelde, seçilen 5 farklı *E. coli* suşuna özgü izole edilen fajlarla yapılan kültür çalışmalarında, bakteriyel büyüme dinamikleri optik yoğunluk (OD) ölçümleriyle takip edilmiştir. Faj-konak çoğalma kinetiklerinin değerlendirilmesinde OD değişimlerine duyarlı metrik bir sistem Centroid İndeks kullanılmıştır. Yüksek litik aktivite gösteren 12 faj seçilerek, üç farklı MOI (0,1, 1, 10) seviyesindeki terapötik etkinlikleri değerlendirilmiş ve pH 6.3-7.0 aralığının hem bakteriyel üreme hem de faj aktivitesi için optimal olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca fajların 30°C ve 60° arasında değişen termal stabiliteye sahip oldukları belirlenmiştir.

Seçilen beş faja ait genom dizilerinin analizi, bu fajların 44 ve 51bp arasında değişen genom boyutları ve %54,55 ile %54,67 arasında değişen GC içeriği ile doğrusal dsDNA'ya sahip olduğunu ortaya koymuştur. Taksonomik olarak, beş fajın Caudoviricetes takımı içinde yer aldığı ve Dhillonvirus cinsine ait olduğu belirlenmiştir. Bu fajların genomları, varsayımsal ve bilinen işlevsel proteinleri kodlayan 58 ila 71 arasında ORF içermektedir. Ayrıca, genomlar DNA replikasyonu, transkripsiyon düzenlenmesi, nükleotid metabolizması, fajın yapısal oluşumu (kapsid ve kuyruk) ile lizis gibi temel moleküler süreçlerle ilişkili çekirdek genleri ve olası faj savunma sistemi anti-CRISPR proteini barındırmaktadır. Hiçbir genomda integras, antimikrobiyal direnç, virülans veya toksin genleri gibi istenmeyen özelliklere rastlanmamıştır.

Bu çalışma, incelenen *E. coli* fajlarının, bilinen diğer *Escherichia* fajlarıyla yüksek düzeyde genomik ve proteomik benzerlik taşıdığını tespit etmiştir. Deneysel süreçte elde edilen bulgular, faj-konak bakteri etkileşimlerinin popülasyon dinamikleri üzerinden değerlendirilmesiyle, seçilen fajların

terapötik potansiyelini ortaya koymuştur. Bu doğrultuda, neonatal buzağı ishallerinin tedavisinde kullanılmak üzere etkinliği ve güvenliği optimize edilmiş faj tedavi protokollerinin geliştirilmesine yönelik aday fajlar belirlenmiştir. Farklı çevresel örneklerde kolifaj çeşitliliğine dair veriler sunulurken, neonatal ishallerde kullanılabilecek karakterize edilmiş bir kolifaj koleksiyonu oluşturulmasına katkı sağlamıştır

Anahtar Sözcükler: *E. coli*, Faj, Neonatal Buzağı İshali, Tek Sağlık



SUMMARY

REPUBLIC OF TURKEY

SELÇUK UNIVERSITY

HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Isolation and Molecular Characterisation of Lytic Bacteriophages Specific to *Escherichia coli* Isolates from Neonatal Calf Diarrhoea

Fatma TÜRKARSLAN AKBABA

Department of Microbiology

PhD THESIS / KONYA-2025

Bacteriophages (phages) are the most widespread organisms on Earth and can be found in every ecosystem ever discovered. In recent years, advances in sequencing and bioinformatics have provided important insights into phage diversity, taxonomy, host specificity, population structure and genomic characteristics. Neonatal calf diarrhoea, especially due to *Escherichia coli* infections, causes serious economic losses in cattle breeding worldwide and in our country, and the increasing antimicrobial resistance problem and the difficulties experienced in its treatment increase the need for new and alternative treatment methods. The increasing interest in phage therapy and the generally narrow host range of phages make it necessary to continuously isolate and characterise new phages in order to obtain effective phages against clinically important pathogens.

In this study, we aimed to isolate and characterise lytic bacteriophages effective against enteropathogenic *E. coli* strains isolated from calves with neonatal diarrhoea from various environmental sources and to establish a coliphage collection using next generation sequence analysis technology and bioinformatic approaches.

As a result of molecular characterisation of 102 *E. coli* strains isolated from calves with neonatal diarrhoea, STEC (29.4%), ETEC (10.8%) and EPEC (2%) strains were identified in the pathotype distribution. In addition, 10 hybrid strains (7 STEC/ETEC, 1 ETEC/EPEC, 2 STEC/ETEC/EPEC) were identified. In the lytic activity analyses of 27 coliphages isolated from environmental samples, it was shown that 30% of the phages were able to infect ETEC-1, 26% ETEC-2, 15% ETEC-3, 69% STEC and 8% EPEC+ETEC pathotypes, among which 10 phages had multi-pathotype infection capacity.

In the in vitro model established to determine phage-host interaction and population growth dynamics, bacterial growth dynamics were monitored by optical density (OD) measurements in culture studies with phages isolated from 5 different *E. coli* strains. Centroid Index, a metric system sensitive to OD changes, was used to evaluate phage-host proliferation kinetics. By selecting 12 phages with high lytic activity, their therapeutic efficacy at three different MOI levels (0.1, 1, 10) was evaluated and it was determined that pH 6.3-7.0 range was optimal for both bacterial growth and phage activity. In addition, phages were found to have thermal stability ranging between 30°C and 60°C.

Analysis of the genome sequences of the five selected phages revealed that these phages have linear dsDNA with genome sizes ranging between 44 and 51bp and GC content ranging between 54.55% and 54.67%. Taxonomically, five phages were identified as belonging to the order Caudoviricetes and the genus Dhillonvirus. The genomes of these phages contain between 58 and 71 ORFs encoding putative and known functional proteins. In addition, the genomes contain core genes associated with basic molecular processes such as DNA replication, transcription regulation, nucleotide metabolism, phage structural formation (capsid and tail) and lysis, and a possible phage defence system anti-CRISPR protein. No undesirable features such as integrase, antimicrobial resistance, virulence or toxin genes were found in any genome.

This study revealed that the *E. coli* phages analysed in this study have a high level of genomic and proteomic similarity with other known *Escherichia* phages. The findings obtained during the experimental process revealed the therapeutic potential of selected phages by evaluating phage-host bacterial interactions through population dynamics. Accordingly, candidate phages were identified for the development of phage therapy protocols with optimised efficacy and safety for the treatment of neonatal calf diarrhoea. By presenting data on coliphage diversity in different environmental samples,

it contributed to the establishment of a characterised coliphage collection that can be used in calves with neonatal diarrhoea.

Key Words: *E.coli*, Phage, Neonatal Calf Diarrhoea, One Health



1. GİRİŞ

1.1. Antimikrobiyal Direnç Sorunu

Modern antibiyotik çağı, 1928 yılında Sir Alexander Fleming tarafından penisilinin keşfedilmesiyle başlamıştır (Aminov 2010, Gaynes 2017). Antibiyotikler, 1940'lı yıllardan itibaren ilk olarak beşeri alanda bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılmıştır, ardından 1950'lerden sonra hayvan sağlığı hizmetlerinde terapötik amaçla yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (McEwen ve Collignon 2018). Antibiyotiklerin altın çağı, yirmiden fazla antibiyotik sınıfının keşfedilip klinik kullanıma sunulmasıyla birlikte kırk yılı aşkın bir süre devam etmiştir (Hutchings ve ark 2019).

Antibiyotiklere maruziyetin modern antibiyotik çağı ile sınırlandırılması yaygın bir görüş olmasına rağmen araştırmalar bu durumun böyle olmadığını göstermektedir. Antibiyotik direnci, insanlar tarafından antibiyotiklerin geliştirilmesi ve kullanılmasından önce doğal olarak ortaya çıkan bir olgu olduğu bildirilmiştir (Aminov 2010).

Antimikrobiyal direncin ekolojik doğası, gezegendeki yaşamın birbirine bağlılığının ve çeşitliliğinin bir yansımasıdır (Robinson ve ark 2016). Birçok patojenik bakteri, tedavi amacıyla kullanılan antimikrobiyaller ve direnç kazandıran genler, çevresel kökenlidir; bu kökenler arasında toprak önemli bir yer tutmaktadır (Collignon 2012, Gaze ve ark 2013, Holmes ve ark 2016). Örneğin, beta-laktamazlar gibi bazı önemli direnç genlerinin milyonlarca yıllık bir geçmişi bulunmaktadır (Finley ve ark 2013, Gaze ve ark 2013). Toprak ve diğer çevresel matrisler, geniş bir bakteri popülasyonu ve genetik çeşitlilik barındıran zengin rezervuarlardır (Gaze ve ark 2013, Ruuskanen ve ark 2016). Bu çeşitlilik, antimikrobiyal direnç genlerinin ortaya çıkması ve yayılması için uygun bir ortam sağlamaktadır (McEwen ve Collignon 2018).

Çeşitli ortamlarda hem mikroorganizmalar hem de yüksek ökaryotlar antibakteriyel özelliklere sahip birçok biyolojik olarak aktif molekül üretir. Bu moleküller arasında günümüz antibiyotikleri olarak yeniden tasarlananlar da bulunmaktadır (Ganz ve Lehrer 1999). Bununla birlikte, bu kimyasalların doğal ortamlardaki konsantrasyonları genellikle klinik olarak eşik değerin altındadır. Bu

durum, direncin yalnızca toksik aktivitelerden kaçmak için ortaya çıkmadığını düşündürmektedir (Gordillo Altamirano ve Barr 2019).

Ayrıca, doğada antibiyotiklerin, antibiyotik direnç mekanizmalarıyla etkileşimlerinin antimikrobiyal ajan olmalarından ziyade mikrobiyal bir topluluğun üyeleri arasında bir iletişim kanalı olarak hizmet ettiği öne sürülmüştür. Bu bileşiklerin adaptif fenotipik ve genotipik tepkileri harekete geçirdiği ve topluluğun bileşimini şekillendirdiği gösterilmiştir (Aminov 2009). Antibiyotiklere bu biyolojik perspektiften bakıldığında, modern antibiyotiklere direnç kazandıran genlerin kirlenmemiş arktik permafrost gibi eski mikrobiyal popülasyonlarda tespit edilmiş olması şaşırtıcı değildir. Bu durum, antibiyotik direncinin antropojenik etkinin yokluğunda bile var olduğunu düşündürmektedir (Perron ve ark 2015).

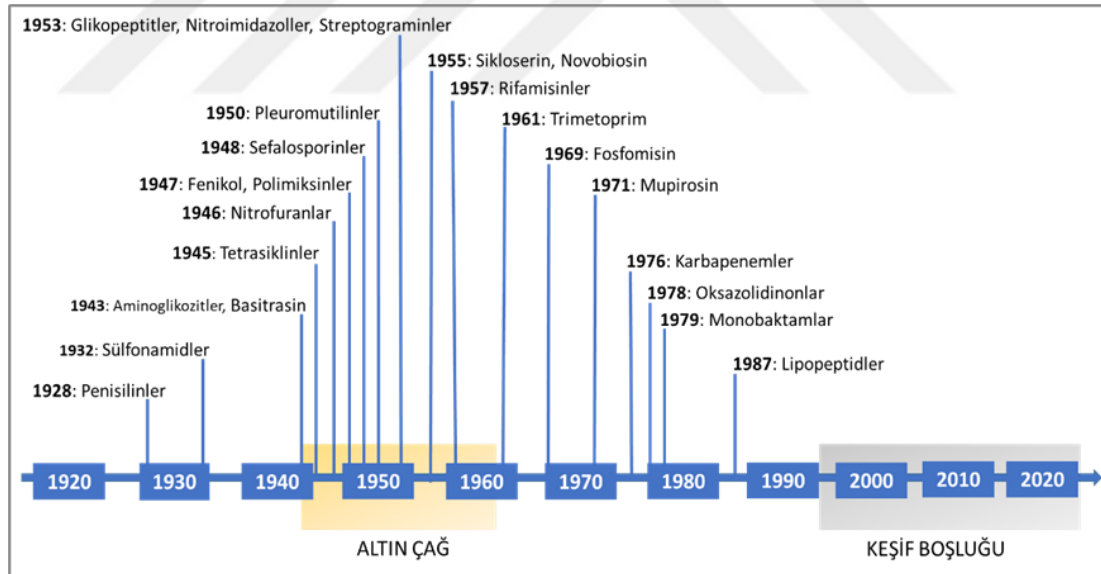
Geçmişe dönük çalışmalar, antibiyotiklerin yaygınlaşmasından önce antibiyotik üretmeyen bakterilerde direnç genlerinin mevcut olduğunu göstermektedir. Antibiyotik öncesi dönemden izole edilen çevresel bakterilerde ve modern antimikrobiyallere maruz kalmayan izole bölgelerde (örneğin mağaralar) çoklu ilaç direnci gözlemlenmiştir (Finley ve ark 2013, Holmes ve ark 2016, Collignon ve McEwen 2019).

Örneğin 1950 yılından önce liyofilize edilen otuz *E. coli* suşu üzerinde yapılan bir çalışma da dört suşun test edilen sekiz antibiyotiğe karşı çeşitli derecelerde dirençli olduğu ve direnç genlerinin *E.coli* 'ye konjuge olabildiği tespit edilmiştir (Smith 1967).

Murray koleksiyonu olarak bilinen büyük ölçüde antibiyotik öncesi dönemde (1917 ve 1954 yılları arasında) çeşitli coğrafi konumlardan toplanan 433 bakteri suşundan (çoğunlukla *Enterobacteriaceae*) oluşan koleksiyon üzerinde yapılan çalışmada; suşların %24'ünün plazmid aktarabildiği ve 11 suşun ampisilin veya tetrasikline dirençli olduğu, ancak direncin konjugatif olmadığı görülmüştür (Smith 1967). Antibiyotiklerin kullanılmaya başlanmasından önce ve sonra enterik bakteriler üzerinde yapılan çalışmalarda antibiyotik direnç profillerine dair elde edilen veriler aynı bulguları yansıtmaktadır (Houndt ve Ochman 2000). Dolayısıyla araştırma sonuçları antibiyotik direnç genlerinin doğal olarak mevcut olduğunu ve muhtemelen direnç genlerinin antibiyotik çağında uygulanan aşırı seçim baskısından çok daha

önce yatay gen aktarımı ile transfer edildiğini düşündürmektedir. Direnç genlerinin genetik aktarıma yönelik bu yatkınlığı, patojen bakteriler arasında direnç gen kazanımını ve yaygınlaşmasını hızlandırmaktadır (Allen ve ark 2010).

Direnç, rastgele mutasyonlar, rekombinasyon veya antibiyotik direncinin yayılmasında rol oynayan başlıca mekanizmalar olan horizontal gen transferi (HGT) yoluyla genlerin edinilmesinden kaynaklanabilir. Bakterilerde HGT esas olarak konjugasyon, transformasyon ve transdüksiyon yoluyla gerçekleşir (Skippington ve Ragan 2011, Von Wintersdorff ve ark 2016). Konjugasyonun antibiyotik direncinin yayılmasından sorumlu ana mekanizma olduğu düşünülmektedir (Lopatkin ve ark 2016). Konjugasyon sırasında, deoksiribonükleik asit (DNA) verici hücreden alıcıya hücreden hücreye temas yoluyla aktarılır veya plazmid transferi ya da kromozomal olarak entegre konjugasyon elementleri yoluyla gerçekleşir (Wozniak ve Waldor 2010). Transformasyonda, hücre dışı DNA bakteri tarafından çevreden alınır ve genoma dahil edilirken, transdüksiyonda gen transferine bakteriyofajlar aracılık etmektedir (Chen ve ark 2005, Balcazar 2014, Von Wintersdorff ve ark 2016).



Şekil 1. Klinik kullanımda olan farklı antibiyotik sınıflarının keşfine ilişkin zaman çizelgesi. Altın Çağ 1940'lardan 1960'a kadar olan dönemi ifade etmektedir, çünkü günümüzde yaygın olarak kullanılan antibiyotiklerin yarısı bu dönemde keşfedilmiştir. Keşif boşluğu ise 1987'den günümüze kadar olan dönemi ifade etmektedir; bu dönemde sadece birkaç yeni antibiyotik sınıfı keşfedilmiş olup, bunların çoğu yarı veya tam sentetik yapıdadır. (Silver 2011, Ribeiro da Cunha ve ark 2019)'dan uyarlanmıştır.

Antibiyotiklerin Altın Çağı, 1940'larda başlamış ve klinik kullanım için 40'tan fazla antibiyotiğin keşfi ve tanıtımıyla kırk yılı aşkın bir süre devam etmiştir (Şekil 1).

Bu dönemde, belirli bir antibiyotiğe karşı direnç gelişimi, genellikle daha iyi farmakokinetik ve farmakodinamik özellikler sergileyen yeni antibiyotiklerin hızla geliştirilmesi nedeniyle minimal bir endişe ile karşılanmıştır. Bu durum, antibiyotik keşfi, kullanımı/aşırı kullanımı ve buna bağlı olarak direnç gelişiminin birbirini beslediği bir döngüyü ortaya çıkarmıştır (Davies ve Davies 2010, Ventola 2015). Antibiyotiklerin aşırı ve yanlış kullanımı sonucunda bakteriler, çoklu antibiyotik direnç mekanizmaları geliştirmeyi başarmış ve böylece antibiyotiklerin altın çağı sona ermiştir (Davies ve Davies 2010, Malik ve Bhattacharyya 2019). Bu dönem, daha az sayıda yeni ilacın tanıtıldığı ve bunların çoğunluğunun daha önce bilinen bileşiklerin modifiye edilmiş veya birleştirilmiş versiyonları olduğu için antibiyotik araştırma ve geliştirmede keşif boşluğu olarak tanımlanmıştır (Gordillo Altamirano ve Barr 2019).

Yeni antibiyotiklerin geliştirilme hızı, antibiyotik dirençli bakterilerin ortaya çıkış hızına yetişememektedir. Bu durum, yeni tedavi seçeneklerine olan acil ihtiyacı net bir şekilde ortaya koymaktadır (Simpkin ve ark 2017). Yeni antibiyotiklerin geliştirilmesindeki azalma, mevcut tedavi seçeneklerimizin sınırlı kalmasına ve antibiyotik direnci sorununun daha da kötüleşmesine yol açmaktadır (Gordillo Altamirano ve Barr 2019).

Bakterilerde antimikrobiyal direncin ortaya çıkması ve küresel olarak yayılması, insan ve hayvanlarda bulaşıcı hastalıkların tedavisinde mevcut antibiyotiklerin etkinliğini hızla sınırlamaktadır (Prestinaci ve ark 2015).

E. coli, hayvanlarda çeşitli enfeksiyonlara neden olabilir. Bu hastalıklar arasında enterit, laktasyondaki hayvanlarda mastitis, sepsis ve kanatlılarda selülit, salpingitis, sinovitis ve omfalitis (yumurta sarısı kesesi enfeksiyonları) bulunur (Mellata 2013). Bazı *E. coli* suşları türe özgü patojenler olarak etki ederken, diğerleri zoonotik potansiyele sahiptir ve insanlar da dahil olmak üzere birden fazla türü enfekte edebilir. Birçok *E. coli* suşu, hayvanların ve insanların bağırsaklarında kommensal olarak bulunur. Bu kommensal suşlar genellikle zararsız olsa da, fırsatçı patojenlere veya diğer bakteri türlerine direnç genleri aktarabilirler (Collignon 2015).

Antimikrobiyal direnç; hem hayvan hem de insan *E. coli* enfeksiyonlarında hızla artan bir sorun teşkil etmektedir. Bu sorun, özellikle gelişmekte olan ülkelerde

insan enfeksiyonlarından elde edilen izolatlarda daha yaygın ve iyi belgelenmiştir (Walsh ve ark 2011, WHO 2019). İnsanlar, kontamine gıdalar ve yetersiz arıtılmış içme suyu yoluyla antimikrobiyal dirençli *E. coli*'ye maruz kalabilirler (Graham ve ark 2014). Üçüncü nesil sefalosporinler, florokinolonlar ve karbapenemler gibi önemli antimikrobiyal ilaçlara karşı direnç, küresel bir sağlık tehdidi oluşturmaktadır ve özellikle gelişmekte olan ülkelerde artış göstermektedir (Walsh ve ark 2011, WHO 2019).

Antimikrobiyal direnç ile mücadelede, bu sorunun karmaşık doğası ve çok yönlü etkileri göz önüne alındığında Tek Sağlık yaklaşımına ihtiyaç duyulmuş, bu kavram uluslararası düzeyde kabul görmüş ve dünya çapında birçok ülkenin eylem planlarına dahil edilmiştir (McEwen ve Collignon 2018).

Tek Sağlık terimi, insanların, hayvanların, bitkilerin ve paylaştıkları çevre arasındaki bağlantıyı tanıyarak, en iyi sağlık sonuçlarını elde etme amacıyla yerel, bölgesel, ulusal ve küresel düzeylerde çalışan işbirlikçi, çok sektörlü ve disiplinler arası bir yaklaşımı ifade etmektedir. Bu tür bütüncül bir yaklaşım, ortaya çıkan enfeksiyonlar ve antimikrobiyal direnç dahil olmak üzere birçok bulaşıcı hastalığın etkin kontrolü ve önlenmesi için gereklidir (WHO 2019).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO), Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (WOAH) ve Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) gibi çeşitli uluslararası kuruluşlar ve pek çok ülke AMD'nin yanı sıra zoonotik hastalıkların yayılmasını değerlendirmek, kontrol etmek ve önlemek için eylem planlarına Tek Sağlık yaklaşımını dâhil etmiştir (McEwen ve Collignon 2018, White ve Hughes 2019). Gerekli eylemler arasında sörveyans ve araştırmalar yoluyla direnç veri tabanlarının güçlendirilmesi, insan ve hayvan sağlığında antimikrobiyal ilaç kullanımının optimize edilmesi, etkili sanitasyon, hijyen ve enfeksiyon önleme tedbirleriyle enfeksiyon sıklığını azaltılması, ülkelerin ihtiyaçlarını da dikkate alan sürdürülebilir ekonomik yatırımların geliştirilerek antimikrobiyallere alternatiflere yatırımın artırılması yer almaktadır (McEwen ve Collignon 2018).

Direnç sorunu yaygın enfeksiyonların sağaltım seçeneklerini ve hayat kurtarıcı tıbbi prosedürlerin yerine getirilmesini giderek zorlaştırmakta ve hatta bazen

imkânsızlaştırmaktadır (WHO 2019). Dirençli bakterilerin neden olduğu enfeksiyonları tedavi etmekteki artan zorluklar nedeni ile yeni antibakteriyel tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi zorunlu hale gelmiştir. Bakteriyofajlar, hayvan hastalıklarının tedavisinde antibiyotiklere alternatif olma potansiyeline sahiptir (Sharma ve ark 2017).

1.2. Bakteriyofajlar

1.2.1. Genel Özellikler

Bakteriyofajlar (fajlar) bakterileri enfekte eden virüslerdir. Ancak, bu basit ifade içinde bir dizi potansiyel barındırmaktadır. Bakterilerin zorunlu parazitleri olan fajların ilk olarak 1915 yılında İngiliz bakteriyolog Frederick Twort tarafından besiyerinde (sonradan ölü bakteri bölgeleri olduğu anlaşılan) camsı şeffaf noktaları gözlemlediğinde keşfedildiğine inanılmaktadır (Twort 1936).

Ancak o dönemde Twort, gözlemlediği camsı şeffaf materyalin doğasını tam olarak teyit edememiştir. İki yıl sonra, Fransız-Kanadalı mikrobiyolog Felix d'Herelle bağımsız olarak benzer gözlemler yayınlamıştır (Duckworth 1976).

D'Herelle, 1915 yılında ortaya çıkan hemorajik bir dizanteri salgınında, dizanteri hastalarından alınan dışkı örneklerini filtrelemiş ve bakteri içermeyen filtratlarda "görünmez bir mikrop" olarak adlandırdığı filtrelenebilir virüsleri gözlemlemiştir. Başlangıçta filtrelenebilir virüslerin hastalığın patojenitesinde bir kofaktör olarak rol oynadığından şüphelenmiş, ancak bu fikri araştırırken hastalığın başlangıç evresinde faj titrelerinin genellikle düşük olduğunu veya hiç olmadığını hastalığın ilerleyen aşamalarında ise belirgin bir artış olduğunu, iyileşme aşamasında da en yüksek seviyeye ulaştığını gözlemlemiştir. Zaman içerisindeki bu olaylar dizisinden dizanteri hastalığının iyileşme sürecinde artan faj titresinin, litik fajın belirli patojenlere kademeli olarak adaptasyonunun, daha sonra çoğalmasının ve ardından patojenin parçalanması ile eliminasyonun iyileşme mekanizması olduğu sonucuna varılmıştır (Summers 2021).

Gözlemlediği mikroskopik canlılar hakkında tam bir hipotezi olmayan Twort'un aksine, d'Herelle bakterileri enfekte eden yeni bir virüs türü keşfettiğinden emin olarak bu varlıklara bakteri yiyen anlamına gelen bakteriyofaj adını vermiştir.

Felix d'Herelle'in tartışmasız bağımsız keşfi, fajların varlığı ve fajlar üzerine bir asırlık araştırmanın resmi olarak başlangıcı olmuştur (D'Herelle 2007).

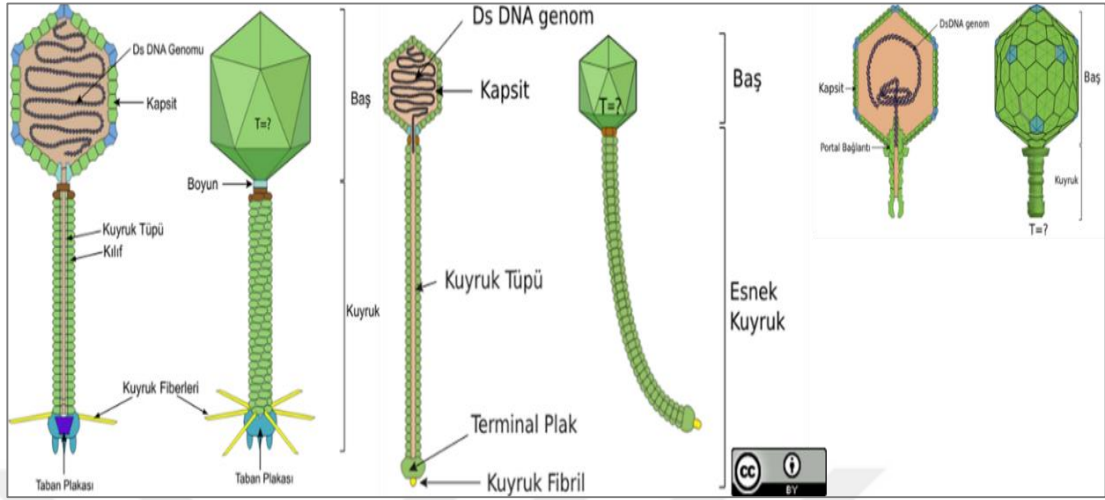
Emory Ellis ve Delbrück, 1939'da adsorpsiyon, latent dönem ve viral patlama gibi fajla ilgili anahtar kavramları ortaya çıkaran tek adımlı büyüme deneyinde fajların çoğalmasını karakterize etmiştir (Ellis ve Delbruck 1939, Salmond ve Fineran 2015). Delbrück, araştırmanın küçük bir faj grubuna odaklanılarak daha verimli olması ve laboratuvarlar arasında sonuçların karşılaştırılabilirliğini kolaylaştırmak için çalışmalarında T-fajlar, (T1–T7) olarak adlandırılan yetkili faj grubu seçmiştir (Demerec ve Fano 1945). Yapılan deneylerde T-fajlar, Gram negatif bakteri modeli haline gelen *E. coli*'yi enfekte edebilmiştir (Kutter 2009, Chapeton-Montes ve ark 2019).

İlk faj çalışmalarının ışığında, Delbrück, Hershey ve Luria virüslerin replikasyon mekanizmasını ve genetik yapısını keşfettikleri için 1969' da Nobel Fizyoloji Ödülünü kazanmışlardır. Bu noktadan sonra, bakteriyofajı model olarak kullanarak yapılan çalışmalar ile bir genin doğası nedir, mutasyonlar genleri nasıl etkiler, mutasyonlar nasıl ortaya çıkar, genler nasıl çoğalır ve yapısı nasıldır gibi karmaşık biyolojik soruları sormak ve cevaplamak mümkün olmuştur (Winter ve ark 2021).

Fajlar, tahmini $4,8 \times 10^{31}$ partikül sayısı ile biyosferdeki en bol mikroorganizmalardır. Bakterilerin bulunduğu tüm ortamlarda mevcut olan fajlar, ekosistemlerin çoğunda bakterilerin popülasyon dinamikleri ve bakteriyel/arkeal konak hücrelerinin gelişimi üzerinde önemli bir rol oynarlar. Fajlar, çoğu biyolojik süreci kendi başlarına yürütememekte ve verimli bir şekilde çoğalmak için canlı bir bakteriyel hücreye ihtiyaç duymaktadırlar. Bunun sonucu olarak, fajlar konakçı bolluğu, çeşitliliği, fizyolojisi ve metabolizması üzerinde etkiye sahiptirler (Álvarez-Espejo ve ark 2023).

Mikrobiyal çeşitliliğin itici güçleri olarak kabul edilen fajlar, bilim camiasında temel moleküler biyoloji etkileşimlerini anlama araçları, yatay gen transfer vektörleri, tanısal ve genetik araç kaynakları ve yeni bakteriyel tespit sistemleri olarak ilgi odağı olmuştur Son yirmi yılda, fajlar biyoteknoloji, tıp, gıda endüstrisi ve tarımda

kullanımları açısından da yoğun olarak incelenmiştir (Naureen ve ark 2020, Albrycht ve ark 2022).



Şekil 2. Kuyruklu fajların morfolojik yapılarının gösterimi. (ViralZone, SIB Swiss Institute of Bioinformatics kaynağından CC BY 4.0 lisansı ile uyarlanmıştır.) Tüm kuyruklu fajların genomu çevreleyen ve koruyan ve kuyruğa bağlanan bir kapsidi vardır. a) *Myoviridae* ailesindeki fajlar, kontraktıl bir kuyruk kılıfına sahip tek kuyruklu fajlardır. b) *Myoviridae* ve *Siphoviridae* ailelerine ait her iki faj da kuyruğun distal ucunda, kuyruk lifleri ve kuyruk sivri uçları gibi reseptör bağlayıcı proteinlerin (RBP'ler) bağlı olduğu bir taban plakasına sahiptir. c) *Podoviridae* üyelerinin taban plakası olmadığından, RBP'ler doğrudan kuyruğa bağlanır. *Siphoviridae* ve *Podoviridae* ayrıca kuyruk veya taban plakasının distal ucundan çıkıntı yapan merkezi bir kuyruk lifi veya sivri uca sahiptir. ViralZone (<http://viralzone.expasy.org>).

Faj çeşitliliğinin ekolojik etkileri çok derindir. Fajlar ve bakteriyel konakçıları arasındaki etkileşim dinamikleri, popülasyon yapılarını ve gelişimsel yörüngeleri önemli ölçüde etkiler. Özellikle artan faj çeşitliliğinin, birlikte adaptif dinamikleri kısıtlayarak daha istikrarlı bakteri popülasyonlarına yol açabileceği gösterilmiştir (Castledine ve ark 2022). Bu bulgu, faj terapisinin antibiyotiğe dirençli bakterilere karşı etkili bir tedavi stratejisi olarak potansiyelini vurgular. Fajların genetik çeşitliliğinin daha iyi anlaşılması, bu alanda önemli ilerlemeler sağlayabilir (Cook ve ark 2021). Ayrıca fajların çeşitli ekosistemlerdeki mikrobiyal toplulukları ve besin döngüsünü şekillendirmedeki rolü, ekolojik önemlerini açıkça ortaya koymaktadır (Heinrichs ve ark 2023).

Çoklu ilaca dirençli bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların artan sıklığı nedeniyle yeniden ilgi gören bu yöntemin önemli potansiyel faydaları bulunmaktadır. Fajlar, bakteriyel biyofilmlere nüfuz etme ve onları bozma konusunda dikkate değer bir yetenek sergilemektedir (Ferriol-González ve Domingo-Calap 2020). Ayrıca, fajlar

bakteriyel konaklarına karşı yüksek düzeyde özgüllük göstererek mikrobiyomu korurken patojenin hassas bir şekilde hedeflenmesini ve ortadan kaldırılmasını sağlamaktadır (Altamirano 2021).

Faj biyolojisi ve faj genetiği çalışmaları oldukça ilgi çekici alanlardır. Ancak, faj araştırmalarındaki esas amaç, bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde terapötik bir seçenek olarak bakteriyofajların kullanılmasına yönelik yöntemlerin geliştirilmesidir (Hanlon 2007).

1.2.2. Bakteriyofajların Sınıflandırılması ve Morfolojisi

Fajları farklı taksonomik gruplara ayırmak faj keşfini takip eden temel bir adımdır. Fajların daha iyi karakterize edilmeleri ve çeşitliliklerinin ortaya konması için sınıflandırılması gereklidir. Bakteriyofajları keşfeden iki kişiden biri olan d'Hérelle, birçok türe etkili yalnızca bir faj olduğunu (*Bakteriophage* *intestinale*) düşünmekteydi (D'Herelle 2007). Daha sonra, yapılan araştırmalar birçok bakteri türüne karşı aktif olan bakteriyofajların çok sayıda habitatte var olduğunu ortaya koymuş ve tek bir türe ait bakteriyofaj kavramı geçerliliğini yitirmiştir (Kutter ve Sulakvelidze 2004).

Enterobakteriyel fajların heterojen olduğu ve filtrasyon, konak aralığı ve stabilite testleri ile seroloji, partikül boyutuna göre alt gruplara ayrılabilceği gösterilmiştir (Burnet 1933, Kutter ve Sulakvelidze 2004). 1943'te virüs sınıflandırması için elektron mikroskopu kullanımına öncülük etmiş ve üç farklı morfolojik tipte bakteriyofajı ayırt ederek morfolojiye dayalı faj taksonomisine olanak sağlamıştır (Ruska ve Ruska 1943, Kutter ve Sulakvelidze 2004).

Holmes 1948 yılında Virales takımı içinde tek bir aile (*Phagaceae*) ve tek bir cins (*Phagus*) içinde yer alabileceklerini belirtmiştir. Bu şekilde sınıflanmış 46 faj türü için konakçı spektrumu, plak ve partikül büyüklüğü, üre ve sıcaklığa dirençlilik kriterleri temel alınmıştır (Ackermann 2007).

Lwoff, Horne ve Tournier 1962'de, nükleik asit türü (DNA veya RNA), kapsid morfolojisi ve zarflı yapılarına göre (LHT) virüs sınıflandırma sistemi geliştirilmiştir (Salmond ve Fineran 2015).

Evrensel bir viral taksonomi sağlamak için 1966 yılında Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi (ICTV) kurulmuştur (King ve ark 2011). Günümüze kadar en yaygın olarak kullanılan faj sınıflandırma yöntemi, David Bradley'in 1967 yılında fajların morfolojik özelliklerine dayalı olarak yaptığı öneriye dayanmaktadır (Turner ve ark 2021). Bakteriyofajların temel yapıları tek tip nükleik asit ve nükleik asidi çevreleyen bir kapsidden (veya kapsidler) oluşur. Bu sınıflandırma yöntemi, fajları "kuyruklu fajlar" (*Caudovirales*) ve "kübik fajlar", "ipliksi fajlar" ve "pleomorfik fajları" içeren "kuyuksuz fajlar" olarak ikiye ayırmaktadır (Salmond ve Fineran 2015).

Fajlar ICTV bünyesindeki Bakteriyel ve Archeal Alt Komitesi (BAVS) tarafından sınıflandırılmaktadır. Sistem, virüs genomunun moleküler bileşimi (ss / ds, DNA veya RNA), virüs kapsidinin yapısı ve zarflı olup olmadığı, patojenite ve dizi benzerliği, konakçı aralığı dahil olmak üzere çeşitli faj özelliklerinin değerlendirilmesine dayanmaktadır (Chibani ve ark 2019). Londra'da 2015 yılında yapılan ICTV toplantısında faj isimlendirmesi "faj" teriminin takson isimlendirmesinde kullanılmasının ICCVN (The International Code of Virus Classification and Nomenclature) kuralları ile tutarsızlığa yol açtığı öne sürülerek tür isimlendirmesinde; fajlarında bir virüs olduğu gerçeğine dayanarak, "faj" yerine "virüs" teriminin tür adı bileşeni olarak kullanılmasına karar verilmiştir. Ayrıca kollektif tür adı bileşenlerinin daha kesin orijinal bakteri konak cins adı (önceden *Enterobacteria phage HK022* yeni isimlendirme *Escherichia virus HK022* gibi) ile tamamlanması yönünde karar alınmış ve uygulanmıştır (Krupovic ve ark 2011).

1.2.3. Bakteriyofaj Sınıflandırmasındaki Yeni Gelişmeler

Fajlarla ilgili mevcut genomik ve proteomik veriler sürekli yenilenmekte ve Yeni Nesil Sekans (NGS) teknolojileri sayesinde şimdiye kadar bilinmeyen faj genomlarının tam ve fragmanlarını içeren sürekli artan miktarda genomik ve metagenomik dizi verileri elde edilmektedir (Roux ve ark 2016).

Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI) tarafından desteklenen veri tabanlarına göre, *Caudoviricetes* sınıfında tanımlanan fajların sayısı son yıllarda önemli ölçüde artmıştır. RefSeq veri tabanında 2015 yılında 1.359 olan tanımlı faj sayısı, 2022 yılında 4.483'e yükselerek yaklaşık üç katına çıkmıştır. Referans

genomların yanı sıra, GenBank veri tabanında 2022 yılında *Caudoviricetes* sınıfına ait yaklaşık 63.588 birleştirilmiş faj bulunmaktadır. Bu sayı, 2015 yılındaki 16.232 faj sayısına kıyasla neredeyse beş katlık bir artışı göstermektedir (Turner ve ark 2021)

Son yıllarda elde edilen viral genom bilgisi zenginliği, virüs sınıflandırma sistemlerinin güncellenmesi için önemli bir fırsat sunmuştur. Geleneksel olarak, virüsler morfolojik özellikleri, boyutları ve genomik bilgilerini içeren nükleik asit türlerine göre kategorize edilmiştir. Ancak ICTV, Ağustos 2022'de faj sınıflandırma sisteminde önemli değişiklikler yapmıştır.

Bu yeni sürümle birlikte, morfolojiye dayalı olarak tanımlanan *Myoviridae*, *Podoviridae* ve *Siphoviridae* aileleri kaldırılmıştır. Bunun yerine, *Caudovirales* takımı da kaldırılarak, ikozahedral kapsidli ve çift sarmallı DNA genomuna sahip tüm kuyruklu bakteriyel ve arkeal virüsleri kapsayan *Caudoviricetes* sınıfı oluşturulmuştur (Zhu ve ark 2022).

ICTV, viral sınıflandırma sisteminin birincil bileşeni olarak nükleotid dizisi homolojisini eklemiştir (Turner ve ark 2021). Bu yaklaşım, fajların daha kesin ve tutarlı bir şekilde sınıflandırılmasına olanak tanımaktadır. Örneğin, iki faj izolatının aynı bakteriyofaj türünün üyeleri olarak kabul edilebilmesi için, nükleotid dizilerinin ikili karşılaştırmasında tüm genomları boyunca en az %95 oranında özdeş olması gerekmektedir. Benzer şekilde, aynı cinse ait olduğu düşünülen fajlar, ikili bir karşılaştırmada tüm genomları boyunca en az %70 nükleotid özdeşliğine sahip olmalıdır (Ely ve ark 2023).

Bakteriyofajlar, zengin çeşitlilikleri nedeniyle mevcut viral taksonomi boyunca geniş bir alana yayılmıştır ve çift sarmallı DNA (dsDNA), tek sarmallı DNA (ssDNA), çift sarmallı RNA (dsRNA) veya tek sarmallı RNA (ssRNA) genomlarına sahip olabilirler. Bununla birlikte, uzaktan ilişkili fajlar, benzer boyut ve fiziksel yapıya sahip olabilmektedir. Bu durum, morfolojik özelliklerin tek başına sınıflandırma için yeterli olmadığını ve genetik verilerin önemini vurgulamaktadır.

Böylece, benzer morfoloji ve genom nükleik asitlerine sahip bakteriyofajlar, genom nükleotid dizilerinin benzerliğine dayalı olarak daha geniş olarak sınıflandırılabilir (Ely ve ark 2023).

1.2.4. dsDNA Fajlar

Uroviricota filumundaki bakteriyofajlar, kuyruklu çift sarmallı DNA (dsDNA) fajları olarak tanımlanmakta ve bilinen tüm faj cinslerinin neredeyse yarısını temsil etmektedir. Bu fajların kuyruk uzunlukları değişkenlik göstermekte olup, yapıları esnek veya sert, kontraktıl ya da kontraktıl olmayan özellikte olabilir. Faj başları ise izometrik, prolate veya uzamış yapıda olabilir. Genom boyutları 18 ila 500 kilobaz (kb) arasında değişmekte ve bireysel fajlar litik veya lizojenik yaşam döngülerine sahip olabilmektedir. Mart 2023 itibarıyla, *Uroviricota* filumu 4 takım, 47 familya, 98 alt familya, 1197 cins ve 3601 tür içermektedir. Bu nedenle, bu filum bilinen dsDNA bakteriyofajlarının çoğunluğunu kapsamaktadır (Ely ve ark 2023).

Uroviricota'nın aksine, *Kalamavirales* takımındaki bakteriyofajlar zarfsız, kuyruksuz ve beş köşesinde sivri uçları olan ikozahedral bir yapıya sahiptir. Genellikle 15 kb dsDNA genomlarını protein destekli bir replikasyon yöntemi kullanarak çoğaltan litik fajlardır ve genomları bir iç membranla çevrilidir (Strömsten ve ark 2005). Bu membranlar, DNA'larını konak hücreye enjekte etmek için kuyruk benzeri tüpler oluşturabilir. Mart 2023 itibarıyla, bu takım 1 familya, 5 cins ve 12 tür içermektedir ve PRD1 fajı bu takımdaki en iyi çalışılmış faj olarak öne çıkmaktadır.

Benzer şekilde, *Autolykiviridae* ailesindeki fajlar da zarfsız, ikozahedral yapıya sahip olup, doğrusal dsDNA genomları bulunmaktadır. Çift jelly-roll kapsid proteinlerine sahip olan bu fajlar, deniz bakterilerini ve arkeleri enfekte edebilirler (Kauffman ve ark 2018). Bu fajların çoğu 10 kb genoma ve nispeten geniş bir konak aralığına sahiptir. Mart 2023 itibarıyla, bu aile 2 cins ve 5 tür içermektedir.

Vinaverales, tek bir cins olan Corticovirus'u içeren bir çift sarmallı DNA (dsDNA) fajları takımıdır. Bu cinsteki fajlar, zarfsız ve kuyruksuz olup, beş köşesinde protein sivri uçları bulunan ikozahedral bir yapıya sahiptir. Genomları, yaklaşık 10 kilobaz (kb) uzunluğunda olup, bir lipid membran içine alınmış süper sarmal dsDNA formundadır (Oksanen ve Consortium 2017).

Dairesel veya doğrusal dsDNA genomlarına sahip ikinci bir virüs grubu olan *Halopanivirales*, arkeleri enfekte eden virüslerin yanı sıra termofilik bakterileri enfekte eden fajları da içermektedir. Bu virüsler, kuyruksuz ve ikozahedral kafalara

sahip olup, genomları da bir lipid membran ile çevrilidir (Demina ve ark 2017). *Halopanivirales* takımı, arkeleri enfekte eden iki cins ve termofilik bir bakteri olan *Thermus*'u enfekte eden bir cins içermektedir.

Plasmaviridae ailesi, henüz daha geniş bir taksonomik gruba dahil edilmemiş olan ve belirgin özelliklere sahip bir faj ailesidir. Bu aile, hücre duvarı olmayan *Acholeplasma* cinsine ait konakların hücre zarından tomurcuklanma yoluyla yeni viryonlarını serbest bırakan ılıman, zarflı viryonlarla karakterize edilen tek bir türden oluşmaktadır (Krupovic ve Consortium 2018).

Fajlar, konak hücrelerine, faj ve konak membranlarının füzyonu yoluyla giriş yaparlar. Hücre içine girdikten sonra, yaklaşık 12 kb büyüklüğündeki süper sarmal dsDNA faj genomu, yeni faj partikülleri üretmek üzere transkribe edilebilir veya bölgeye özgü rekombinasyon mekanizmaları aracılığıyla konak genomuna entegre olabilir. Bu entegrasyon sonucunda oluşan lizojenik bakteriler, ortamda faj varlığında düşük seviyelerde faj partikülü üretirler (Dybvig ve Maniloff 1983). Ancak, faj üretimi, mitomisin C veya ultraviyole (UV) ışık gibi ajanlarla indüklenebilir.

Olgun faj partikülleri bir araya geldikten sonra, konak hücreyi lize etmeden hücre zarından tomurcuklanarak teker teker salınırlar. Bu nedenle, enfekte konak hücre büyümeye ve bölünmeye devam edebilir, ancak yeni virüs partikülleri üretme yükü nedeniyle büyüme hızı önemli ölçüde azalır. Sonuç olarak, litik fajlar tarafından oluşturulan plakların aksine, *Plasmaviridae* fajları tarafından oluşturulan plaklar, bakteriyel hücre lizisi yerine büyüme inhibisyonundan kaynaklanmaktadır. Bu durum, *Plasmaviridae* ailesinin diğer faj ailelerinden farklı bir replikasyon stratejisi izlediğini göstermektedir (Ely ve ark 2023).

1.2.5. ssDNA Fajlar

Hofneiviricota filumu, konak hücre membranından lizis olmaksızın faj partiküllerini çıkaran filamentli tek sarmallı DNA (ssDNA) fajlarını içermektedir. Bu fajlar, konak genomlarına entegre olabilme veya ekstrakromozomal olarak var olabilme yeteneğine sahiptir. Bu filum 3 familya, 31 cins ve 51 tür içermektedir.

Bu üç familya, *Inoviridae* (25 cins, 43 tür), *Paulinoviridae* (2 cins, 2 tür) ve *Plectroviridae* (4 cins, 6 tür) olarak sınıflandırılmıştır. *Inoviridae* üyeleri, Gram-negatif hücrelerin pili yapılarına adsorbe olur ve olgun faj partikülleri konak hücreden ekstrüde edilir. Genomları, 5 ila 11 kb uzunluğunda süper sarmal ssDNA'dan oluşur. Faj DNA'sı, konak genomuna entegre olabilir veya ekstrakromozomal olarak kalabilir. Bu familyanın iyi çalışılmış bir örneği, M13 fajıdır (Knezevic ve ark 2021).

Paulinoviridae ailesi, iki farklı faj içerir: *Bifilivirus*, *Propionibacteria*'yı enfekte ederken, *Thomixvirus* ise *Thermus* cinsi bakterilerini hedef almaktadır. *Plectroviridae* ailesine ait fajlar, *Mycoplasmatota* filumundaki bakterileri enfekte eder. Bu fajlar, 4,5 ila 8 kilobaz (kb) arasında değişen dairesel genomlara sahiptir ve yeni virionlar, konak hücreyi öldürmeden salgılanır (Knezevic ve ark 2021).

Phixviricota filumundaki fajlar, dairesel tek sarmallı DNA (ssDNA) genomlarına sahip zarfsız, ikozahedral yapılıdır ve yuvarlanan daire mekanizması ile çoğalırlar. Genom boyutları 4,5 ila 6 kb arasında değişir ve 11 gen kodlar. Mart 2023 itibarıyla, bu filum 1 aile, 2 alt aile, 7 cins ve iyi çalışılmış PhiX174 fajını da içeren 22 tür barındırmaktadır. *Microviridae* ailesinin çoğu üyesi litik yaşam döngüsüne sahiptir, ancak bazıları lizojenik olabilir.

Finnlakeviridae ailesi, henüz daha büyük bir taksonomik gruba atanmış değildir. İlginç bir şekilde, *Finnlakeviridae*'nin tek türü, dairesel bir ssDNA genomuna sahiptir ve faj partikülü, iç lipid membran içeren ilk ssDNA fajı olarak dikkat çeker. Bu faj, *Flavobacterium* cinsindeki bakterileri enfekte eder ve sonunda parçalar (Knezevic ve ark 2021).

1.2.6. RNA Fajlar

Vidaverviricetes sınıfı, tri-segmentli dsRNA genomlarına sahip zarflı, ikozahedral fajları içerir. Yedi tür içeren tek bir cins, *Cystovirus* vardır. *Cystovirus* partikülleri bakteriyel konağa önce bir bakteriyel pilusa adsorbe olarak ve daha sonra pilus geri çekildiğinde hücre membranı ile kaynaşarak girer. Faj virionları konakçı hücreyi parçalayarak serbest bırakılır. Mart 2023'te *Vidaverviricetes*, Ann Vidaver tarafından keşfedilen Phi6 fajını da içeren bir cins ve yedi tür içermektedir (Vidaver ve ark 1973). Buna karşılık *Leviviricetes*, 50 yıldan daha uzun bir süre önce keşfedilen ve son zamanlarda metagenomik yoluyla büyük ölçüde genişletilen bir pozitif iplikli ssRNA faj sınıfıdır (Callanan ve ark 2021).

ICTV web sitesinde *Leviviricetes* sınıfında 2 takım, 6 aile, 271 cins ve 882 tür yer almaktadır. Metagenomik analizler yoluyla tanımlanan fajların çoğu hakkında çok fazla şey bilinmemektedir, çünkü sadece nükleotid sekans verileri mevcuttur ve bu genomlar tarafından üretilecek gerçek faj partikülleri hiçbir zaman izole edilmemiş veya gözlemlenmemiştir. Bununla birlikte, iyi çalışılmış ssRNA fajları zarfsızdır ve konakçılarına bağlanmak için bakteriyel pili gerektirir. MS2 ssRNA fajı, genomu dizilenen ilk faj olmuştur (Fiers ve ark 1976).

Picobirnaviridae ailesi, toplam 4,4 kb'lık iki segmentten oluşan dsRNA genomlarına sahip küçük, zarfsız küresel virüslerdir. Son çalışmalar, memelilerden ziyade prokaryotları enfekte ettiklerini öne sürmüştür (Krishnamurthy ve ark 2016, Boros ve ark 2018).

1.2.7. Bakteriyofajların Yaşam Döngüsü

Bakteriler, küresel biyojeokimyasal döngüleri ve diğer organizmaların biyolojisini etkileyerek biyosfer üzerinde önemli bir etkiye sahiptir (Alivisatos ve ark 2015). Ancak bu etkileşimler, faj enfeksiyonlarının dinamikleri tarafından şekillendirilir. Faj enfeksiyonları, faj genetiği, konak genetiği, faj konsantrasyonu, konak fizyolojisi ve çevresel koşullar gibi çeşitli faktörlerin etkileşimi sonucu litik (üretken) veya lizojenik döngüler arasında geçiş yapabilir. Bu faktörlerin karmaşık etkileşimi, faj-bakteri etkileşimlerinin sonucunu ve dolayısıyla bakterilerin biyosfer üzerindeki etkisini belirler (Chibani-Chennoufi ve ark 2004, Suttle 2005, Ogilvie ve Jones 2015).

Fajlar sadece bakterileri enfekte edebilen virüsler olarak tanımlanır. Fajlar bütün viruslar gibi zorunlu hücreiçi parazitlerdir. Fakat uygun konakçıda kendi replikasyonlarının sağlayacak tüm bilgiyi genomlarında taşımaktadırlar. Herhangi bir enerji ve protein sentez mekanizmaları yoktur. Konakçılarının yaşadığı her yerde sulara, toprakta, kanalizasyon ve dışkıda, derin termal menfezlerde canlılığını sürdürebilen tüm dünyada en çok bulunan yaşam formlarıdır. Yüksek düzeyde özgüllükleri, uzun vadede hayatta kalabilmeleri ve uygun konakçılarda hızla çoğalma yetenekleri sayesinde herhangi bir doğal ekosistemdeki çok çeşitli bakteri türleri arasında dinamik bir dengenin korunmasına katkıda bulunurlar. Hiçbir uygun konakçı bulunmadığı durumlarda birçok faj, dış ajanlar tarafından zarar görmedikçe, on yıllarca enfekte etme yeteneklerini koruyabilir (Kutter ve Sulakvelidze 2004).

Bakteriyofajın bir konak bakteri hücresine bağlanması, faj enfeksiyonunun ilk adımıdır. Bakteriyofajlar hareketli değildir ve hedef bakteri hücreleriyle temasa geçmeleri rastgele brownian hareketine bağlıdır (Kasman ve Porter 2019).

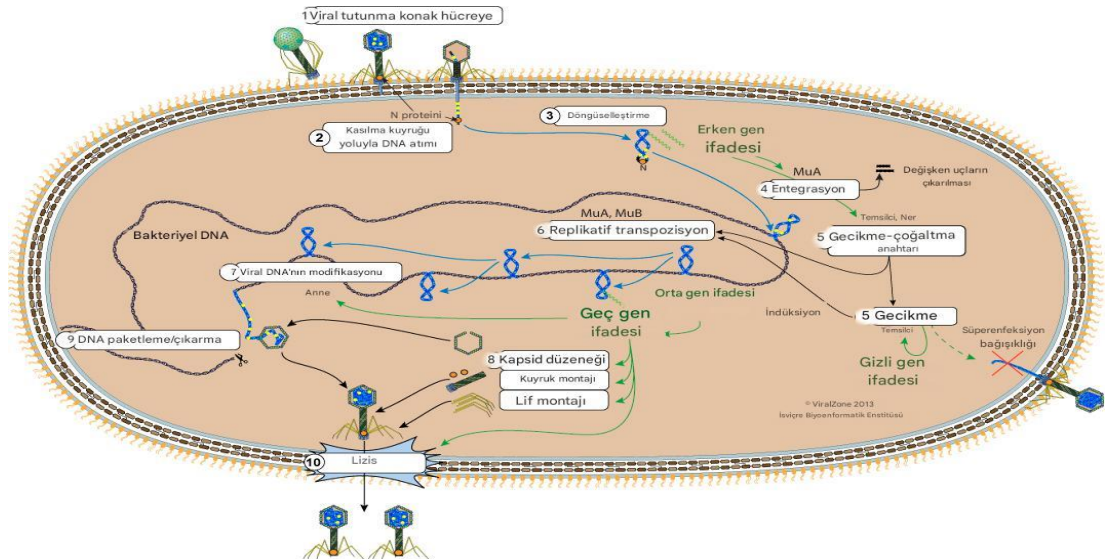
Faj daha sonra bakteriyel yüzey bileşenlerine geri dönüşümlü olarak bağlanır (Garen ve Puck 1951). Muhtemelen bu bağlamda faj reseptörü olarak bilinen belirli bir hücre dışı yapıya geri dönüşümsüz olarak bağlanana kadar fajın bakteriyel hücre ile temas halinde kalmasını sağlamak için olduğu düşünülmektedir (Bertozzi Silva ve ark 2016).

Bakteriyel konağa faj adsorpsiyonu, faj yaşam döngülerindeki kilit unsurlardan biridir. Kuyruklu bir faj duyarlı bir konak hücreyle karşılaştığında, lipopolisakkarit (LPS) gibi konak reseptör yüzey proteinlerinin veya bakteri hücre duvarındaki diğer moleküllerin (fimbria, flagella), *OmpC* (Washizaki ve ark 2016) ve *FhuA* (Breyton ve ark 2013) porinleri gibi hücre dışı proteinlerin spesifik olarak tanınmasıyla adsorpsiyon kolaylaştırılır. *E. coli*'de LPS, fajlar tarafından en sık kullanılan reseptörlerden biridir (Hantke 2020).

Farklı fajlar, bakteri hücresi üzerindeki faj reseptörüne geri dönüşümsüz olarak bağlanmak için yapılarının farklı kısımlarını kullanır; kuyruk lifleri, kuyruk spike'ları ve merkezi kuyruk spike'ları bu etkileşimin olası reseptör bağlayıcı proteinleridir (Nobrega ve ark 2018).

Bakteriyel hücre faj reseptörü ve bakteriyofaj reseptör bağlayıcı proteinin bu özgüllüğü, en azından kısmen bakteriyofaj türlerinin konak aralığının oluşturulmasından sorumludur (Yehl ve ark 2019).

Bakteriyel yüzey reseptör(ler)inin başarılı bir şekilde tanınması, kalıcı olarak fajın bağlanması ve özel enzimler kullanılarak bakteriyel hücre duvarına nüfuz edilmesine ve ardından faj DNA'sının sitoplazmik membranı geçerek sitoplazmaya enjekte edilmesine izin verir. İyi çalışılmış bir model *Myoviridae* olarak faj T4 kuyruğu, faj kuyruğunun distal ucundaki taban plakasına ve kuyruk liflerine bağlı bir iç kuyruk tüpünü çevreleyen bir dış kuyruk kılıfına sahiptir (Şekil 2). Konak hücre dış yüzeyindeki LPS'ye geri dönüşümsüz olarak bağlandıktan sonra, faj kuyruğu konformasyon değiştirir, kuyruk kılıfı büzülerek kuyruk tüpünü hücre duvarından geçirir ve faj genomu kuyruk tüpünden bakteri sitozolüne enjekte edilir (Leiman ve ark 2004, Kostyuchenko ve ark 2005). Ardından faj türüne ve konak hücrenin fizyolojik durumuna bağlı olarak, faj belirli bir yaşam döngüsüne girecektir. Litik, lizojenik, psödolizojenik ve kronik enfeksiyonlar dâhil olmak üzere dört yaygın faj yaşam döngüsü vardır (Abedon 2008, Clokie ve ark 2011, De Smet ve ark 2017, Olszak ve ark 2017). Kronik enfeksiyon sadece filamentöz fajlara özgüdür (Rakonjac ve ark 2011, Hay ve Lithgow 2019).



Şekil 3. Litik faj yaşam siklusunun şematize gösterimi (ViralZone, SIB Swiss Institute of Bioinformatics kaynağından CC BY 4.0 lisansı ile uyarlanmıştır) ViralZone (<http://viralzone.expasy.org>).

1.2.8. Litik Bakteriyofajlar

Virülan veya zorunlu litik fajlar, bakteriyel konağın mutlak patojenleridir. Bu fajlar sadece litik döngü yoluyla çoğalabilir ve enfeksiyon yeni faj partiküllerinin üretimi ve konağın lizisi ile sonuçlanır (Abedon 2008).

Faj yaşam döngüsünün litik fazı dört aşamadan oluşur. İlk aşamada, faj uygun bir konak hücreyle karşılaşır ve yüzey reseptörlerine bağlanır. Bu bağlanma, fajın konakçıya özgüllüğünü belirleyen kritik bir adımdır. Bağlanmanın ardından, faj genomik materyalini konak hücreye enjekte eder (Şekil 3). İkinci aşamada, faj, konak hücrenin iç savunma mekanizmalarını atlatmak zorundadır. Bu savunma sistemleri arasında restriksiyon enzimleri ve CRISPR-Cas sistemleri gibi mekanizmalar yer alır. Fajın bu savunmaları aşma yeteneği, sürdürülebilir bir enfeksiyon oluşturması için önem taşımaktadır (Warwick-Dugdale ve ark 2019).

Üçüncü aşamada, faj konak hücrenin kaynaklarını ele geçirerek kendi genomunu ve proteinlerini sentezler. Bu hızlı ve etkili kaynak mobilizasyonu, hücrel transkripsiyon mekanizmasının viral kontrol altına alınmasıyla sağlanır. Bu kontrol, genellikle iki temel mekanizma aracılığıyla gerçekleştirilir. İlk olarak, konak RNA polimerazının modifikasyonu söz konusudur. Viral kapsid içinde paketlenmiş ve enfeksiyon sırasında konak hücreye salınan faj faktörleri, konak RNA polimerazlarını modifiye ederek viral promotörleri tanımlarını ve viral genlerin transkripsiyonunu başlatmalarını sağlar. İkinci olarak, bazı fajlar kendi RNA polimerazlarını kodlar ve enfeksiyon sırasında konak hücreye aktarır. Bu viral RNA polimerazlar, konak RNA polimerazından bağımsız olarak viral genlerin transkripsiyonunu gerçekleştirir (Dennehy ve Abedon 2021).

Bu mekanizmalar, fajların konak hücre transkripsiyon mekanizmasını ele geçirerek viral gen ifadesini hızla başlatmasını ve konak kaynaklarını viral replikasyon için etkin bir şekilde kullanmasını sağlar. Viral replikasyon için hücrel mekanizmalar yeniden programlandıktan sonra, konak metabolizmasını manipüle eden mekanizmaları kodlayan "orta" aşama genleri ifade edilir (Breitbart ve ark 2007). AMG'ler olarak adlandırılan bu viral genlerin birçoğu, merkezi metabolik proteinleri kodlar ve farklı faj soyları arasında korunmuştur ki bu da viral replikasyon başarısı için önemlerini vurgulamaktadır. Yardımcı metabolik genlerin fosfat (Martiny ve ark

2009) ve azot metabolizmasına (Sullivan ve ark 2010), fotosentez (Lindell ve ark 2005, Frank ve ark 2013), pentoz fosfat yoluna (Thompson ve ark 2011), nükleik asit sentezine (Miller ve ark 2003) ve diğer metabolik yollarda (Sharon ve ark 2011) rol oynadığı belirtilmiştir. İlginç bir şekilde, fajlarla enfekte olmuş bakterilerin AMG aracılı olarak yeniden metabolik programlanması, küresel besin döngülerindeki dalgalanmalarla bağlantılı olabileceği bildirilmiştir (Brussaard ve ark 2008).

Birden fazla konağı enfekte eden generalist fajlar, genellikle daha düşük enfeksiyon verimliliği gösterirler, konak translasyon ve transkripsiyonunu tamamen baskılayamazlar, daha uzun latent dönemlere ve ayrık translasyon ve transkripsiyon süreçlerine sahiptirler (Campbell 1961, Koskella ve Meaden 2013, Díaz-Muñoz ve Koskella 2014).

Başarılı bir enfeksiyondan sonra faj DNA'sı transkribe edilir. Faj genomu, konak DNA'sını bozmak için endonükleazlar ve ekzonükleazlar da dahil olmak üzere erken proteinleri kodlar. Bu aşamada, viral genomun transkripsiyonu ve translasyonu sonucu viral proteinler (kapsid proteinleri, kuyruk lifleri, enzimler vb.) ve yeni viral genom kopyaları sentezlenir. Konak hücrenin ribozomları ve diğer protein sentezi mekanizmaları bu süreçte kullanılır (Dennehy ve Abedon 2021).

Bu süreç, yeni faj partiküllerinin oluşumunu sağlar. Fajlar, konak transkripsiyon mekanizmasına tam bağımlılıktan neredeyse tam bağımsızlığa kadar değişen çeşitli transkripsiyonel kontrol stratejileri geliştirmiştir (De Smet ve ark 2017). Dahası, fajlar, konak replikasyonu ve hücre bölünmesi gibi "gerekli olmayan" konak süreçlerini kapatarak enfeksiyon için enerji tasarrufu sağlayabilir (Kutter 2009, Kutter ve ark 2018, Warwick-Dugdale ve ark 2019).

Siyanofaj Syn9'un çoklu *Synechococcus* konakçılarında enfeksiyon sürecine transkripsiyonel yanıtı incelenmiş ve çarpıcı sonuçlar elde edilmiştir. Enfeksiyonu takip eden ilk 30 dakika içinde, konak hücredeki transkripsiyon aktivitesinin neredeyse tamamının faj kodlu genlerle ilişkili olduğu gözlemlenmiştir (Doron ve ark 2016).

Son aşama olan viral morfogenez sürecinde sentezlenen viral bileşenler bir araya getirilerek faj DNA'sı (veya RNA) kapsid içine paketlenir ve yeni viryonlar oluşturulur (Şekil 3). Bu süreç, kendiliğinden birleşme (self-assembly) yoluyla

gerçekleşebilir veya bazı durumlarda konak hücrenin veya virüsün kodladığı şaperon proteinlerinin yardımıyla gerçekleşebilir. Yeni oluşan viryonlar, konak hücrenin lizisiyle ortama salınır ve yeni konak hücreleri enfekte etmeye hazır hale gelir (Young 2014).

Bakteriyel membran ve hücre duvarı bozulması, holinler ve endolizinler gibi faj tarafından kodlanan spesifik lizinlerin bir kombinasyonu ile kolaylaştırılır. Holinler, bakteri plazma zarında spesifik olmayan lezyonlara neden olan, endolizinlerin peptidoglikana ulaşmasına ve bakteri hücre duvarının murein tabakasına saldırmasına izin veren küçük proteinlerdir. Gram-negatif konakçıları enfekte eden fajlar, dış membranın destabilizasyonu yoluyla lizise yardımcı olan spanin adı verilen ek proteinleri kullanabilir (Young 2014). Litik enfeksiyon mekanizmasının anlaşılması, viral ekoloji çalışmalarının yanı sıra faj terapisi gibi uygulamalar için de büyük önem taşımaktadır (Doron ve ark 2016).

1.2.9. Lizojenik Bakteriyofajlar

Lizojenik fajlar, *E. coli* fajları λ ve Mu gibi model organizmalar üzerinde yapılan çalışmalarla detaylı bir şekilde incelenmiştir. Bu fajlar, sırasıyla bölgeye özgü rekombinasyon (Casjens ve Hendrix 2015) veya rastgele transpozisyon (Harshey 2015) yoluyla bakteri kromozomuna entegre olurlar. Ancak, tüm fajlar bu entegrasyon mekanizmalarını kullanmaz. Örneğin, P1 fajı dairesel bir genom formunda ekstrakromozomal olarak kalırken (Łobocka ve ark 2004) N15 fajı doğrusal bir genom formunda ekstrakromozomal olarak bulunur (Ravin 2015). Bu farklılıklar, lizojeni sürecinin çeşitliliğini ve karmaşıklığını ortaya koymaktadır. *Vibrio cholerae* fajı CTX ϕ gibi diğer ılıman fajlar, üretken döngüler sırasında konaklarını kronik olarak enfekte ederken, lizojenik döngülerde konak genomuna entegre olurlar (McLeod ve ark 2005).

Lizojeni sırasında, faj genomu ya bir plazmid olarak kalır ya da konak kromozomuna entegre olarak profaj şeklinde stabil bir şekilde replike olur. Faj lambda'nın *E. coli* konağını enfekte etmesi ve bakteriyel kromozoma entegre olması, bu sürecin iyi çalışılmış bir örneğidir (Casjens ve Hendrix 2015). Buna karşılık, *E. coli* fajı P1, dairesel bir DNA plazmidi olarak ekstrakromozomal kalır (Łobocka ve ark 2004).

Ilıman fajlar, bakteri topluluklarını çeşitli şekillerde etkiler. Konaklarına yeni genler aktarabilir, konak genlerinin ifadesini değiştirebilir, diğer fajlar tarafından enfeksiyona karşı koruma sağlayabilir ve indüksiyon üzerine konak popülasyonlarını öldürebilirler. Bu etkiler, Howard-Varona ve ark (2017) tarafından kapsamlı bir şekilde gözden geçirilmiştir.

Bazı profajlar, bakteriyel konak pH (Kotay ve ark 2010), hidrojen peroksit muamelesi (Figueroa-Bossi ve Bossi 1999), UV ışığı veya antibiyotik muamelesi (Castellazzi ve ark 1972) gibi stres faktörleriyle aktive olabilir. Ayrıca, profajlar düşük bazal seviyede yapısal olarak da aktive edilebilir (Nanda ve ark 2014). Ilıman bakteriyofaj indüklendikten sonra, yaşam döngüsünü tamamlar, bakteri hücresi içinde daha fazla faj partikülü üretir, hücreyi parçalar ve yeni fajları çevreye salar (Weinbauer 2004).

Son alışmalar, faj kromozomunun konak kromozomuna entegre olmadan veya hücre lizisini tetiklemeden ayrı bir epizom olarak var olduğu üçüncü bir enfeksiyon döngüsü modu olan faj taşıyıcı durumuna dair kanıtlar bulmuştur. Bu epizom, lizojenik döngünün aksine, kararlı bir şekilde çoğalmaz ve yeni çoğalan fajlar arasında asimetrik olarak ayrılabilir, böylece ortaya çıkan konak hücrelerde farklı bir ifade profili oluşturur. Bu enfeksiyon formunun dikkate değer bir rneği, bakteriyel konaklarda doğrusal plazmidler olarak var olabilen *Tectiviridae* ailesinin bazı üyelerinde görülmektedir. Fajların bu epizomal formları, bakteriyel kromozomdan bağımsız olarak çoğalabilir ve konakçının DNA'sına entegre olmadan konakçı içinde faj genomunun istikrarlı bir şekilde korunmasına izin verir. Bu mekanizma hem faj hem de konakçı için hayatta kalma avantajı sağlar, çünkü faj hareketsiz bir durumda tutulabilirken uygun koşullar altında yeniden aktive olabilir (Xue ve ark 2015).

Ayrıca, epizomal faj replikasyonunun dinamikleri, konağın çevresel koşullarından ve stres tepkilerinden de etkilenebilir. Örneğin, faj lambda gibi bazı ılıman fajlar, konağın fzyolojik durumuna bağlı olarak, DNA hasarı veya besin yoksunluğu gibi stres faktörleri tarafından tetiklenebilen lizojenik ve litik döngüler arasında geçiş yapabilir. Bu bağlamda epizom, olumsuz koşullar sırasında harekete geçirilebilen, hızlı adaptasyonu ve hayatta kalmayı kolaylaştıran bir genetik materyal rezervuarı olarak hizmet edebilir (Keen 2015, Maffei ve ark 2021).

Bu tür epizomal faj davranışının etkileri antibiyotik direnci ve virlans faktörü transferi alanına kadar uzanmaktadır. Epizom olarak var olan fajlar, antibiyotik direnci veya virlans faktörleri gibi avantajlı özellikler kazandıran genler taşıyabilir ve bunlar konakçı bakteriye ve hatta transdüksiyon gibi süreçler yoluyla diğer bakterilere aktarılabilir (Shousha ve ark 2015).

1.2.10. Bakteriyofaj Çeşitliliği ve Karakteristik Genler

Fajlar, insan gastrointestinal sisteminden küresel okyanuslara kadar keşfedilen her biyomda varlık göstermektedir. Ayrıca, okyanus tabanı ve Orta Çağ'a ait fosilleşmiş dışkı örnekleri gibi beklenmedik ortamlarda da tespit edilmişlerdir (Danovaro ve ark 2011, Appelt ve ark 2014).

Fajların konak aralığı, muhtemelen bir faj ile potansiyel konakları arasındaki filogenetik, coğrafi ve ekolojik mesafe ile sınırlıdır (Scanlan ve ark 2013). Fajlar her zaman yerel konaklara adapte olmazlar (Koskella ve Parr 2015). Fajların bir türe değil, bir bölgeye özgü olduğu gözlemlenmiştir (Gómez ve Buckling 2011). Ayrıca, farklı bölgeler geniş konak aralıklı fajların farklı frekanslarını içermektedir (Hanson ve ark 2016).

Geniş konak aralıklı fajların moleküler mekanizmaları üzerine yapılan birçok çalışma bağlanma aşamasına odaklanmaktadır. Örneğin, monovalent fajlar tek bir spesifik reseptöre bağlanırlar, genellikle dar bir konak aralığına sahiptir. Bu özellik, belirli bir bakteri türüne veya suşuna özgü enfeksiyon yeteneği sağlar. Polivalent fajlar ise birden fazla farklı reseptöre bağlanabilen bu fajlardır, daha geniş bir konak yelpazesini enfekte edebilir. Bu çok yönlülük, fajın farklı bakteri türleri veya suşları arasında geçiş yapabilmesine olanak tanır (Nobrega ve ark 2018).

Faj çeşitliliğinin ve konak aralığının belirlenmesi, geleneksel olarak çevresel örneklerden bakteriyofajların izole edilmesini ve çeşitli bakteriyel konakları enfekte etme yeteneklerinin değerlendirilmesini içeren kültür bazlı yöntemlere dayanır. Bu yöntemler, fajların ekolojik rollerini ve faj terapisi ve biyoteknolojideki potansiyel uygulamalarını anlamak için gereklidir (Mirzaei ve Nilsson 2015). Faj çeşitliliğini belirlemede kullanılan temel tekniklerden biri spot test metodudur. Bu yöntem, bir bakteri konak ile inoküle edilmiş agar plakasına seyreltilmiş bir faj örneğinin uygulanmasını içerir. İnkübasyonun ardından, plakların varlığı, başarılı faj enfeksiyonu ve bakteri hücrelerinin lizisini gösterir. Plakların boyutu ve sayısı, fajın konak aralığı ve litik etkinliği hakkında bilgi sağlayabilir (Haines ve ark 2021).

Faj büyüme dinamiklerinin belirlenmesi tipik olarak, bilinen bir faj konsantrasyonunun bir bakteri kültürüne eklendiği tek adımlı bir büyüme eğrisinin

kullanılmasını içerir (Haines ve ark 2021). Kültürün OD değeri, faj bakteri hücrelerini enfekte edip lize ederken bakteri yoğunluğundaki değişiklikleri izlemek için düzenli aralıklarla ölçülür. Bu yaklaşım, araştırmacıların latent dönem, patlama boyutu ve genel faj üretkenliği dahil olmak üzere fajların büyüme parametrelerini ölçmelerine olanak tanır (Vipra ve ark 2013, Estrella ve ark 2016, Egido ve ark 2023).

Centroid İndeksi, zaman içinde büyüme dinamiklerinin merkezi eğilimini yakalayan istatistiksel bir ölçü olarak kavramsallaştırılabilir. Araştırmacılar, PCA gibi çok değişkenli analiz tekniklerini uygulayarak, farklı faj-bakteri etkileşimlerinin büyüme yörüngelerini görselleştirebilirler (Blazanin 2023).

Bakterilerin kültür metodu ile izolasyonu geleneksel yöntemine ek olarak, multiplex PZR gibi moleküler teknikler, faj bağlanması ve enfeksiyon için çok önemli olan hücre duvarı polisakkarit tiplerine göre bakteri suşlarını sınıflandırmak için kullanılmıştır. Bu moleküler yaklaşım, faj-konak etkileşimlerinin genetik temeli hakkında ek bilgi sağlayarak kültür tabanlı yöntemleri tamamlayabilmektedir. (Mahony ve ark 2015).

Yaygınlıklarının yanı sıra, fajlar çok çeşitli yapısal morfolojiler sergiler; kuyruklu fajlar ve dsDNA genomları, 2019 itibarıyla kamuya açık veritabanlarında en çok temsil edilenlerdir (Nguyen ve ark 2023). Daha az yaygın gibi görünen diğer fajlar, ssDNA, ssRNA veya dsRNA genomlarını kuyuksuz virionlar içine paketleyebilirler (Brüssow 2012). Göreceli olarak küçük genomlarına rağmen, fajlar etkileyici bir genomik çeşitlilik ve geleneksel hiyerarşik filogeniyi takip etmeyen karmaşık soy ilişkileri sergilemektedir. Bu durum, yaygın mozaikleşmeden kaynaklanmakta olup, fajların gelişimsel süreçlerini anlamak için yeni yaklaşımlar geliştirilmesini gerektirmektedir (Hatfull ve Hendrix 2011).

TEM, fajların fenotipik çeşitliliğinin ve bolluğunun doğrudan değerlendirilmesinde geleneksel olarak kullanılan bir yöntemdir. TEM, nanometre ölçeğinde yüksek çözünürlüklü görüntüleme sağlayarak, fajların yüzey özellikleri, morfolojik yapıları, boyutları ve ultrastrüktürel detayları hakkında kapsamlı bilgi sunmaktadır. Bu teknik, fajların taksonomik sınıflandırılmasında ve morfolojik çeşitliliğin karakterizasyonunda önemli bir rol oynamaktadır (Almeida ve ark 2018).

Genomların yüksek çeşitliliği nedeniyle, farklı konakçıları enfekte eden fajlar tipik olarak düşük benzerliğe sahiptir. Bununla birlikte, aynı konağı enfekte eden fajların genomlarında da önemli farklılıklar olabilir (Hatfull ve Hendrix 2011).

Fajlara özgü karakteristik (signature) genler, faj kimliğinin ve işlevselliğinin tanımlanmasında çok önemli bir rol oynar. Örneğin, HNH endonükleaz gibi spesifik endonükleazların varlığı, faj genlerinin hareketliliği ve çeşitli fajlarda gözlemlenen mozaik genom yapısı ile ilişkilendirilmiştir (Yuan ve ark 2018). Bu gen hareketliliği, fajların genetik çeşitliliğine katkıda bulunarak değişen ortamlara ve konak savunmalarına hızlı adaptasyon sağlar. Ek olarak, terminaz ve kapsid proteinleri gibi korunmuş genler de dahil olmak üzere fajların genomik mimarisi, filogenetik ilişkileri ve işlevsel yetenekleri hakkında bilgi sağlar (Tse ve ark 2022).

Metagenomik sekanslama projelerinden binlerce viral sekans tanımlanmış olmasına rağmen, bunların birçoğu referans faj genomlarıyla tespit edilebilir bir homoloji paylaşmamaktadır (Modi ve ark 2013, Touchon ve ark 2017).

HGT olarak adlandırılan bu tür rekombinasyon olayları, faj gelişiminin başlıca mekanizmalarından biridir ve evrimsel ilişkilerin değerlendirilmesini karmaşıktır. Fajların filogenetik ilişkilerini kesin olarak tanımlamak, karşılaştırmalı genomik analizlerdeki temel zorluklardan biridir. Bu zorluğun altında yatan en önemli nedenlerden biri, ironik bir şekilde, fajları böylesine çeşitli ve benzersiz kılan bir özellik olan genomlarının mozaik yapısıdır. Genetik mozaikleşme, yüksek dizi benzerliği gösteren genom bölgelerinin, ani geçişlerle komşu ve hiçbir benzerlik göstermeyen bölgelere dönüşmesi fenomenini ifade eder (Gómez ve Buckling 2011).

Faj genomları, soy geçmişleri farklı olan çeşitli genetik modüllerin bir araya gelmesiyle oluşmuş bir yapı sergiler. Bu durum, genellikle genetik olarak farklı iki atadan kaynaklanan rekombinasyon olaylarının bir sonucudur. Fajların hızla gen edinme ve değiştirme yeteneği, değişen ortamlara ve konak savunmalarına uyum sağlamalarına olanak tanır (Hatfull ve Hendrix 2011).

Faj imza genlerinin iyi çalışılmış kategorilerinden biri, adsorpsiyon sürecine dahil olan genlerdir. Bu genler, fajların genellikle bakteri yüzeyindeki

lipopolisakkaritler veya proteinler gibi spesifik reseptörleri tanıyan ve bunlara bağlanan proteinleri kodlamasını sağlar. Bu etkileşimler, enfeksiyonun başlaması için kritik öneme sahiptir ve fajın konak aralığını belirleyebilir (You ve ark 2018). Ayrıca, bazı fajlar, bakteriyel biyofilmleri veya quorum-sensing moleküllerini parçalayabilen enzimleri kodlayan genler taşır. Bu genler, fajların enfektivitelerini ve yoğun bakteri popülasyonlarında enfeksiyon oluşturma yeteneklerini artırır (Chatterjee ve ark 2020).

Faj imza genleri, fajların konakçı bağışıklık tepkilerinden kaçmasına yardımcı olan genleri de içerir. Örneğin, bazı fajlar, bakteriyel CRISPR-Cas sistemlerini inhibe eden anti-CRISPR proteinlerini kodlayarak, fajın konakçı içinde kalmasına ve çoğalmasına olanak tanır. Buna ek olarak, bazı fajlar, antibiyotiğe maruz kalma gibi durumların neden olduğu konağın stres tepkilerini modüle edebilen genlere sahiptir. Bu genler, hem fajın hem de konağın enfeksiyonunun devam etmesini ve hayatta kalmasını kolaylaştırır (Chatterjee ve ark 2020).

Fajlar hakkında belki de en etkileyici olanı, temsil ettikleri biyolojinin çeşitliliğidir: Doğada, hem fiziksel yapıları hem de genomları bakımından çok fazla bakteriyofaj çeşitliliği vardır ve farklı bakteri türlerini enfekte eden bakteriyofajlar çok az genom homolojisi paylaşmaktadır (Hendrix ve ark 2002). Aynı bakteri türünü enfekte edip çoğaltabilen iki bakteriyofaj bile çok farklı genomlara sahip olabilir, örn, Lambda ve T4 model fajlarının her ikisi de *E. coli*'yi enfekte eder ancak çok az benzerlikleri vardır; Lambda fajı *Siphoviridae* ailesinden lizojenik bir sifovirüstür ve genomunda 66 kodlama geni vardır (Rajagopala ve ark 2011), T4 fajı ise *Myoviridae* ailesinden litik bir miyovirüstür ve 278 geni vardır (Miller ve ark 2003).

Şu anda NCBI veri tabanında 12.000'den fazla bakteriyofaj türü bulunmaktadır ve bunların hepsi deneysel olarak karakterize edilmemiştir. Gerçekten de faj genomları muhtemelen biyosferin herhangi bir yerinde keşfedilmemiş genlerin ve proteinlerin en büyük rezervuarını temsil etmektedir (Dion ve ark 2020).

1.2.11. Faj Terapisi

Bakteriyofaj (faj) terapisi, bakteriyel enfeksiyonların tedavisi amacıyla bakteriyel virüslerin terapötik kullanımını ifade eder. Faj terapisinin tarihi, yüz yılı aşkın bir süre önce Hankin, Gamaleya, Twort ve d'Herelle gibi bakteriyologların, günümüzde virüslerle ilişkili olduğu düşünülen antibakteriyel aktivitelere dair bağımsız gözlemleriyle başlamıştır (Keen 2015).

O dönemde bakteriyel hastalıklar ciddi bir sağlık sorunu ve başlıca ölüm nedenlerindendi. Mevcut en iyi kimyasal antibiyotiklerin hem merkürük hem de arsenik bileşikleri içerdiği bir dönemde, yeni ve daha az toksik tedavi yaklaşımlarına ihtiyaç duyulmakta idi. Dolayısıyla, "bakteri yiyiciler" olarak adlandırılan bakteriyofajların potansiyel terapötik ajanlar olarak değerlendirilmiştir (D'Herelle 2007).

Bakteriyofajların terapötik kullanımı konusunda, 1925 yılına kadar 150'den fazla makale yayınlandığı iddia edilmektedir (Eaton ve Bayne-Jones 1934). Bu yaklaşım, 1925 yılında Sinclair Lewis tarafından yazılan Pulitzer Ödüllü *Arrowsmith* romanında da duyurulmuştur (Kutter ve ark 2010).

İlk modern antibiyotiklerin ve özellikle penisilin gibi geniş spektrumlu ajanların geliştirilmesiyle birlikte, bakteriyofajlar en azından Batı Avrupa ve ABD'de yeni antibiyotikler lehine bir kenara itilmiştir. Faj terapisinin, yukarıda da belirtildiği gibi, uzun ve biraz muğlak bir geçmişi vardır. Ne yazık ki, 1920'ler ve 1930'lardaki ilk çalışmalardan kaynaklanan aşırı iyimser etkinlik iddialarına rağmen birçok kişi tarafından uzun zamandır şüpheyile karşılanmıştır (Eaton ve Bayne-Jones 1934, Krueger ve Scribner 1941).

Ancak kimyasal antibiyotikler yaygın olarak kullanılmaya başlandıktan sonra bile faj tedavisi bazı yerlerde kullanımdan hiç düşmemiştir, özellikle Doğu Avrupa'da 1926 yılında, o zamanlar Sovyet Cumhuriyeti olan Gürcistan'dan bir mikrobiyolog olan George Eliava, Paris'te d'Herelle'yi ziyaret etmiştir. Gürcistan'a döndüğünde, şimdi kendi adını taşıyan merkezi bakteriyofaj enstitüsünü kurmak için çalışmıştır. Eliava'nın Stalinist tasfiyeler sırasında ölümünden sonra da çalışmalar devam etmiş ve kurduğu enstitü, Sovyetler Birliği'nde ve Doğu Avrupa'nın başka yerlerinde

kullanılmak üzere milyonlarca bakteriyofaj preparatının hazırlanmasında ve sağlanmasında öncü bir pozisyon almıştır (Summers 2001).

Hayvan sağlığı alanında tedavi amacıyla faj kullanımı, oldukça uzun bir geçmişe sahiptir. Fajın keşfinden kısa bir süre sonra, yaklaşık bir asır önce Twort ve d'Herelle'in çalışmaları bu yöntemin ilk örneklerini ortaya koymuştur. O dönemde hayvanlar üzerinde yürütülen faj terapisi deneylerinin çoğu, kanatlı tifosu gibi hayvan hastalıklarını doğrudan tedavi etmeyi veya veba, menenjit ve dizanteri benzeri insan hastalıkları için hayvanları model olarak kullanmayı hedeflemiştir (Atterbury ve Barrow 2021).

1980'lerde Williams Smith ve meslektaşlarının yürüttüğü öncü çalışmalar, Batı'da günümüze dek artarak devam eden faj terapi araştırmalarının yeniden canlanmasına önayak olmuştur. Günümüzde hayvanlara yönelik faj terapisi denemelerinin büyük bir kısmı, ağırlıklı olarak ekonomik, düzenleyici ve lojistik gerekçeler nedeniyle pet hayvanlar yerine çiftlik/gıda hayvanlarına odaklanmaktadır (Atterbury ve Barrow 2021).

Bakteriyofajlar, bakterileri enfekte eden virüslerdir ve genellikle dar konak hücre özgüllükleri nedeniyle bakteriler için potansiyel biyolojik kontrol ajanları olarak kabul edilirler. Daha da önemlisi, faj olarak da bilinen bakteriyofajlar, toprak, tatlı ve deniz suyu örnekleri ve son zamanlarda serbest atmosfer de dahil olmak üzere neredeyse tüm ortamlarda bulunur (Chibani ve ark 2019).

Bakterilerin doğal avcıları olan bakteriyofajlar, yukarıda belirtilen olumlu yönleri nedeni ile antibiyotiklere dirençli bakterilerle mücadelede cazip bir alternatif olarak yeniden ortaya çıkmıştır. Fajlar, tür ve suş düzeyinde oldukça spesifiktir ve faj konak aralığının ölçülmesi, fajın antimikrobiyal olarak kullanılmasında önemli bir rol oynamaktadır (Kutter ve ark 2010).

Doğal ortamlardaki faj bolluğu, keşif ve izolasyon sürecini oldukça basit hale getirmektedir (Clokier ve ark 2011, Abedon 2012). Ancak doğru fajların taranması ve seçilmesi, başarılı terapötik sonuçlar elde etmek için çok önemlidir. Terapötik olarak fajların bir avantajı konakçı özgüllüğüdür (Kutter ve Sulakvelidze 2004, Hyman ve Abedon 2010) ve çoğu fajın yalnızca nispeten dar bir yelpazedeki yakın ilişkili bakteri

türlerini enfekte etme yeteneği, normal bakteri florası üzerindeki etkisini sınırlar (Hyman ve Abedon 2010).

Faj konak özgüllüğü bir dizi faktörden etkilenir (Hyman ve Abedon 2010, Kutter ve Sulakvelidze 2005). Faj, enfeksiyonu başlatmak için hücre yüzeyine adsorbe olabilmelidir ve uyumlu bir hücre yüzeyi reseptörünün yokluğu veya gizlenmesi bu ilk etkileşimi önleyecektir. Başarılı bir faj adsorpsiyonu ile faj DNA'sının bir bakteri hücresine girişi, süperenfeksiyon dışlama sistemleri veya gerekli aksesuar proteinlerin yokluğu ile engellenebilir. Restriksiyon-modifikasyon ve CRISPR sistemleri, faj DNA'sını hücre sitoplazmasına ulaştıktan kısa bir süre sonra parçalayarak enfeksiyonu engeller ve faj enfeksiyonunda tetiklenen abortif enfeksiyon sistemleri, yeni fajlar üretilmeden konak hücre ölümüyle sonuçlanır. Tüm bu faktörler birlikte doğal olarak tekrarlayan fajların konak aralıklarını sınırlar ve faj konak aralığını belirlemek için tasarlanan deneylerin sonuçlarını etkileyebilir (Hyman ve Abedon 2010).

Faj terapisine artan ilgi göz önüne alındığında, faj-konakçı etkileşimlerini ortaya koyan *in vitro* testlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu testler, *in vivo* uygulama için fajların uygunluğunu belirlemeye yardımcı olmak için kullanılabilir (Hanlon 2007, Kutter ve ark 2010). Faj konak aralığının tanımları ve sonuçları test metodolojileri arasında farklılık göstermektedir (Sulakvelidze ve ark 2001, Hyman ve Abedon 2010).

Belirli bir fajın hedef bakteriyi öldürme etkinliği genellikle ilk olarak katı besiyerde spot test ile değerlendirilir (Khan Mirzaei ve Nilsson 2015). Ayrıca, fajların varlığında ve yokluğunda (enfekte olmamış kontrol) sıvı besiyerde bakteriyel büyümenin OD ölçümleri de yaygın olarak kullanılmaktadır (Hosseini ve ark 2024).

Mikroplaka spektrofotometresi kullanılarak zaman içindeki OD değişimlerinin ölçülmesi, istenen inkübasyon süresi ve sıcaklık koşullarında enfekte olmamış bakterilerin büyümesini fajla maruz kalan bakterilerle karşılaştırarak faj etkinliği dinamiklerini değerlendirmek için kullanışlı bir yöntem sunar (Turner ve ark 2012).

Faj-bakteri etkileşim çalışmalarında sıkça karşılaşılan dikkat çekici olaylardan biri, bakteri popülasyonunun fajların varlığında zamanla yeniden çoğalmasıdır. Bu fenomen, faj terapisindeki engellerden biri olarak algılanır ve aynı zamanda

biyokontrol veya terapötik uygulamalar için virulent fajların seçilmesinde dikkate alınması gereken önemli bir faktördür (Pires ve ark 2020).

Centroid Indeks, zaman içinde OD değişimleri de dahil olmak üzere bakteriyel büyüme eğrilerindeki eğilimlere duyarlı bir metrik olarak Hosseini ve arkadaşları tarafından tanıtılmıştır. Centroid, büyüme eğrisinin kütle merkezini temsil eder ve faj tedavisine yanıt olarak bakteri popülasyonunun genel büyüme dinamiklerini yansıtan tek bir değer sağlar. Bu yaklaşım, yalnızca ilk öldürme oranını değil, aynı zamanda bakteriyel yeniden büyüme potansiyelini de içerdiğinden, faj etkinliğinin daha kapsamlı bir şekilde değerlendirilmesine olanak tanır (Hosseini ve ark 2024).

CI, araştırmacılar tarafından geliştirilen ve faj tedavisi deneyleri sırasında oluşturulan büyüme eğrilerinin analizini kolaylaştıran kullanıcı dostu bir yazılım aracı kullanılarak hesaplanmaktadır. CI, büyüme eğrisinin merkezine odaklanarak, fajların zaman içinde bakteri popülasyonlarını kontrol etmedeki etkinliği hakkında bilgi sağlayabilir ve bu da onu faj tedavisi alanındaki araştırmacılar için değerli bir araç haline getirir (Hosseini ve ark 2024).

Mevcut antibiyotiklerin sınırlılıkları uzun süredir bilinmesine rağmen, yenilerini keşfetmek veya alternatif tedavileri araştırmak için çok az adım atılmıştır. Yeni antibiyotiklerin geliştirilmesi yönünde çağrılar yapılmış olsa da, büyük ilaç şirketleri, özellikle yeni bileşik sınıflarının aranmasında, erken aşamadaki antibiyotik araştırma ve geliştirmeyi finanse etme konusunda tereddüt etmektedir; çünkü bu alandaki yatırım getirisi genellikle düşük veya hatta negatiftir. Yeni bir antibiyotik adayının bulunması ve pazara sunulması 8 ila 20 yıl sürebilir (Allen ve ark 2010).

Bu noktada faj terapileri önem kazanmaktadır. Bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde bakteriyofaj virüslerinin kullanılması anlamına gelen faj terapisi, yüz yılı aşkın bir süredir bilinmektedir. Fajlar, vücudumuzdaki diğer mikrobiyal türlere zarar vermeden spesifik bakteri türlerini hedefleyerek ortadan kaldıracı küçük virüslerdir. Bu alan, büyük ölçüde mevcut antibiyotiklerin etkinliği nedeniyle ticari olarak yavaş gelişim göstermiştir; ancak son zamanlarda yeniden bir yükseliş yaşamaktadır (Abedon ve ark 2017).

Fajlar hakkında yapılan bilimsel araştırmalar, fajların nasıl tanımlanacakları ve neler yapabilecekleri hakkında ışık tutmuştur. Belirli bir bakteriyle m¼cadele etmek i¼in doğru fajları bulmak zaman alabilir. Spesifik bir bakteriye ¼ld¼rebilecek bir faj bulmak i¼in, en g¼¼l¼ etkileşimlere sahip olanları belirlemek amacıyla faj k¼t¼phanelerini test etmek gereklidir. Geleneksel olarak, bilim insanları fajları bakterilerle eşleştirmek i¼in, spot testleri ve agar overlay testleri gibi ¼eřitli y¼ntemler kullanmışlardır. Bu y¼ntemlerin hi¼biri hızlı ve kolay değildir, ancak son derece doğrudur (Glonti ve Pirnay 2022).

Faj araştırmalarında, faj resept¼r bağlayıcı proteinlerini (RBP'ler) modifiye ederek belirli bakterileri hedeflemek i¼in fajları genetik olarak tasarlama konusunda yoğun ¼alıřmalar y¼r¼tmektedir. Bu yaklaşım, bakterileri bağlayacak doğal fajları aramak i¼in harcanan zamanı azaltmaktadır. Genişletilmiş konak aralıklarına sahip mutantları taramak amacıyla y¼ksek verimli RBP ¼eřitlendirme stratejileri geliştirilmiştir. Ayrıca, sentetik biyoloji yaklaşımları, antimikrobiyal bir gen veya protein i¼eren tasarlanmış fajlar kullanarak bakteriyel ¼ld¼rme etkinliğini artırmak i¼in kullanılabilir (Nobrega ve ark 2018).

Faj tedavisinin g¼venlięi, ¼zellikle potansiyel enflamatuvar yanıtlarla ilgili olarak bir araştırma konusu olmuştur. Sui ve ark (2021), hayvan ve klinik ¼alıřmalarını g¼zden ge¼irerek faj tedavisinin genellikle ¼nemli yan etkilere neden olmadığı sonucuna varmıştır.

¼iftlik hayvanları bağlamında, faj tedavisinin g¼venlik profili olumlu g¼r¼nmektedir. Shousha ve arkadaşları tarafından bildirildiği ¼zere, gıda kaynaklarından izole edilen fajların kullanımı, tavuklarda ¼oklu diren¼li *E. coli* suşlarının neden olduğu enfeksiyonların minimal yan etkilerle tedavi edilmesinde umut vaat etmektedir. Bu durum, faj tedavisinin hayvan refahından ¼d¼n vermeden hayvancılık y¼netimi uygulamalarına entegre edilme potansiyelini vurgulamaktadır (Shousha ve ark 2015).

Antibiyotiklere diren¼li bakteriyel enfeksiyonlardaki endişe verici artış, alternatif terap¼tik stratejilerin araştırılmasını gerektirmiştir. Bakterileri enfekte eden ve par¼alayan doğal olarak oluşan vir¼sler olan bakteriyofajlar veya fajlar, umut verici

özmler olarak ortaya çıkmıştır. Bu virüsleri kullanan faj terapisi, ilaca dirençli, biyofilm üreten ve hücre içi bakteriyel enfeksiyonlar gibi en zorlu tıbbi sorunlardan bazılarının ele alınmasında umut vaat etmektedir (Smith ve ark 2023).

1.2.12. Faj-Konaki Etkileşimi

Bakteriler ve bakteriyofaj arasındaki etkileşimler, deniz suyu (Aylward ve ark 2017), toprak (Gmez ve Buckling 2011) ve memeli bağırsağı (Lourenço ve ark 2022) dahil olmak üzere birçok ortamda gelişen mikrobiyal popülasyonları şekillendirerek küresel ekosistemde önemli rollere sahiptir.

Faj, bakteri ölümünün başlıca etkenlerinden biridir (Suttle 2007). Dolayısıyla insan vücudu da dahil olmak üzere (Hanson ve ark 2016, Chevallereau ve ark 2022) doğal ortamlardaki bakteri topluluklarının bileşimini ve evrimini etkiler (Mirzaei ve Maurice 2017, Gregory ve ark 2020). Bakteriler ve fajlar her yerde bulunur ve geliştikleri ortamı güçlü bir şekilde etkiler, bu nedenle bakteri faj etkileşimlerinin deşifre edilmesi, doğal ve yapay ekosistemlerdeki değişiklikleri tahmin etmek için gereklidir (Weinbauer 2004, Clokie ve ark 2011, Chevallereau ve ark 2022).

Sıcaklık, tuzluluk, pH ve organik madde içeriğindeki değişimler, su ürünleri yetiştiriciliği ve gıda üretimi ortamlarında bakteri popülasyonlarının faj tarafından parçalanmasını etkiler (Silva ve ark 2014, Tokman ve ark 2016). Besin mevcudiyetindeki değişiklikler bakteriyel büyümeyi etkiler ve artan kanıtlar, faj popülasyonunun büyüme oranının ve patlama boyutunun artan bakteriyel büyüme oranıyla (Hadas ve ark 1997, şivec ve Podgornik 2020) arttığını ve yaşam döngüsüne bağlı olduğunu (Storms ve ark 2014) tutulma ve gizli dönemlerin ise artan bakteriyel büyüme oranıyla azaldığını göstermektedir (Hadas ve ark 1997, şivec ve Podgornik 2020).

Bununla birlikte, bazı fajlar, yavaş büyüyen durağan fazda veya yetersiz besin mevcudiyeti şartlarındaki bakteri popülasyonlarını enfekte edebilme yeteneğine sahiptir. Dahası, konak bakterinin lizisi, süperenfeksiyon ve lizis inhibisyonuna yol açan bir veya daha fazla ikincil fajın adsorpsiyonu durumunda, enfekte eden faj tarafından birkaç saat geciktirilebilir (Abedon 2019, Hernandez ve Koskella 2019).

Ayrıca, doğal ortamların spesifik yapısı bakteri-faj etkileşimleri ve fajlara karşı genetik direncin ortaya çıkması üzerinde derin bir etkiye sahiptir (Brockhurst ve ark 2004, Gómez ve Buckling 2011, Hernandez ve Koskella 2019), direnç seviyesi ise sadece mutasyon türüne göre değil (Buckling ve ark 2006) aynı zamanda besin mevcudiyetine göre de değişebilmektedir.

Faj biyolojisinin tüm yönleri gibi, konakçı aralığı da ancak fajın yaşam döngüsü bağlamında tam olarak anlaşılabilir. En iyi tanımlanmış yaşam döngüleri, litik ve temperate (ılımlı) döngülerdir. Enfeksiyon sırasında, zorunlu litik fajlar hızla yeni virüsler üretir ve konak hücreyi lizise uğratarak parçalar. Buna karşılık, temperate fajlar öncelikle genomlarını konakçı genomuna entegre ederek bir lizojen oluşturabilir ve stres faktörleri onları litik döngüye geçmeye yönlendirene kadar bu durumda kalabilirler. Kronik enfeksiyonlar ve pseudolizojeni gibi diğer yaşam döngüleri ise daha az tanımlanmıştır ve bunların yaygınlığı henüz bilinmemektedir (Cenens ve ark 2013, Siringan ve ark 2014).

Faj çeşitliliğinin ekolojik etkileri çok derindir. Örneğin, fajlar ve bakteriyel konakçıları arasındaki etkileşim dinamikleri popülasyon yapılarını ve evrimsel yörüngeleri etkileyebilir. Çalışmalar, artan faj çeşitliliğinin birlikte evrimsel dinamikleri kısıtlayarak daha istikrarlı bakteri popülasyonlarına yol açabileceğini göstermiştir (Castledine ve ark 2022). Bu durum, fajların genetik çeşitliliğinin anlaşılmasının antibiyotiğe dirençli bakterilere karşı etkili tedavi stratejilerinin geliştirilmesi konusunda bilgi sağlayabileceği faj terapisi bağlamında özellikle önemlidir (Cook ve ark 2021) Ayrıca, fajların çeşitli ekosistemlerdeki mikrobiyal toplulukları ve besin döngüsünü şekillendirmedeki rolü, ekolojik önemlerinin altını çizmektedir (Heinrichs ve ark 2023).

1.2.13. Bakteriyel Faj Direnci

Bakteriyofajlar, bakterileri enfekte eden virüsler olup biyosferdeki en bol biyolojik varlıklar olarak kabul edilir (Clokier ve ark 2011). Bakterilerin kendilerini enfekte eden fajlarla bir arada bulunmadığı bir ekosistem neredeyse yoktur; dolayısıyla fajlar, bakteriyel varoluşun her yerde karşımıza çıkan temel bir özelliğini yansıtır (Clokier ve ark 2011). Faj predasyonunun bakteriler üzerinde oluşturduğu güçlü seçim baskısı, bakterilerin geliştirdiği sofistike antifaj stratejilerinin zengin bir

cephaneliğe dönüşmesiyle sonuçlanmıştır; bu stratejiler, kısıtlama-modifikasyon sistemleri, CRISPR-Cas ve abortif enfeksiyon (Abi) gibi önceden bilinen savunma mekanizmalarının yanı sıra sinyal molekülleri olarak siklik nükleotidlerin CBASS (Cohen ve ark 2019), Pycsar (Tal ve ark 2021) kullanılması ve viral enfeksiyona yanıt olarak NAD⁺ tükenmesi gibi yenilikçi savunmaları da içerir (Dy ve ark 2014, Rostøl ve Marraffini 2019, Ofir ve ark 2021, Tal ve ark 2021). Bu yeni antifaj sistemlerine dair araştırmalar, ökaryotik bağışıklık sistemleriyle dikkat çekici benzerlikleri ortaya koymakla kalmamış, aynı zamanda bazı ökaryotik bağışıklık unsurlarının prokaryotlardan evrimleşmiş olabileceğini de düşündürmüştür (Cohen ve ark 2019, Bernheim ve ark 2021, Ofir ve ark 2021, Wein ve Sorek 2022).

Yeni savunma sistemlerinin keşfi hız kazandıkça, mevcut antiviral prokaryotik cephaneliğe bütüncül bir bakış sağlamak giderek güçleşse de, savunma sistemlerinin büyük ölçekli biyoinformatik yaklaşımlarla sistematik ve kapsamlı tanımlanması bu süreci kolaylaştırmaktadır (Doron ve ark 2018, Gao ve Altae-Tran 2020, Payne ve ark 2021, Tesson ve ark 2022). Yakın zamanda ortaya atılan bakteriyel pan-immün sistem fikri ise, faj savunma mekanizmalarının HGT yoluyla akraba bakteriler arasında yaygın olarak aktarılabileceğini ve böylece adeta bir topluluk kaynağı şeklinde işlev gördüğünü ileri sürmüştür (Bernheim ve Sorek 2020).

Anti-faj moleküllerinin araştırma tarihi, belirgin iki dönemde yoğunlaşmıştır: Birinci dönem 20. yüzyılın üçüncü çeyreğini kapsarken, ikinci dönem günümüzden sadece birkaç yıl önce başlamıştır. Özellikle 1950'lerde, fajlara karşı etkili yeni bileşiklerin keşfi büyük bir heyecanla karşılanmıştır (Schatz ve Jones 1947). Bu dönemin en dikkat çekici çalışmaları arasında, Schatz ve Jones'un 170'ten fazla *Actinomyces* suşunu ve Asheshov ve arkadaşlarının 1000'i aşkın suşu inceledikleri kapsamlı taramalar yer alır (Schatz ve Jones 1947, Asheshov ve ark 1954). Bu özverili araştırmalar sonucunda, test edilen *Actinomyces* izolatlarının kayda değer bir bölümü sırasıyla %29 (49/176) ve %17'si (144/1000) - faj plak oluşumunu engelleyen süpernatantlar üretmiştir. Bu bulgular, aktinobakterilerin anti-faj metabolit üretiminin sanılandan çok daha yaygın olduğunu ortaya koymuştur. Bu sistematik taramalar sayesinde krizomisin, fagolessin A58, nybomisin ve aklavin olmak üzere dört önemli antifaj bileşiği keşfedilmiştir. Bunlar arasında aklavinin, bir antrasiklin türevidir.

aklakinomisin A ile yakın yapısal benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (Kumar ve ark 1977).

Fajlar, lipopolisakkaritler gibi bakteriyel yüzey reseptörlerini tanıma yoluyla yüksek derecede özgüllük sergilerler (Iriyanto ve ark 2016). Ancak bu özgüllük, *E. coli*'nin adsorpsiyonu engelleme ve faj nükleik asitlerini bozma gibi direnç mekanizmaları geliştirerek faja dirençli *E. coli* suşlarının ortaya çıkmasına yol açabilir (Hong ve ark 2014). Direnci azaltmak ve terapötik etkinliği artırmak amacıyla, birden fazla fajın birleştirildiği faj kokteyllerinin geliştirilmesi stratejisi önerilmiştir (Costa ve ark 2019, Guo ve ark 2021).

1.2.14. Bakteriyofajların Bağışıklık Sistemi ile Etkileşimi

Bakteriyofajların ökaryotik hücrelerle etkileşimine bakıldığında, patojenik olmayan virüsler olarak bilinmelerine rağmen, insan ve hayvan bağışıklık sistemleri bu organizmalara karşı spesifik antikorlarla etkili bir yanıt oluşturabilmektedir. Fajlar, çoğunlukla T-bağımlı yolak aracılığıyla bir immün yanıt indüklemektedir (Gembara ve Dąbrowska 2021, Renner ve ark 2021).

Antikorlar, biyolojik rollerini belirleyen farklı sınıfları (izotipler) ve alt sınıfları temsil edebilmektedir. En yaygın ve kabul gören immün yanıt süreci, öncelikle IgM'nin indüklenmesi, ardından kan serumunda IgG'nin ve mukozal yüzeylerde IgA'nın salgılanması şeklinde gerçekleşir. IgM'ler birincil yanıtın karakteristiği iken, IgG'ler yanıtın olgunlaşmasını yansıtır. IgG izotipi, gelişmiş özgüllük gösterir ve sistemik nötralizasyon için en kritik öneme sahiptir. IgA'lar ise öncelikle mukozal yüzeylerde, örneğin gastrointestinal sistemde, bir immün bariyer oluşturur. Spesifik IgA'nın mukozal yüzeylerde salgılanması, genellikle dolaşımdaki artışıyla paralellik gösterir (Gembara ve Dąbrowska 2023).

Bir bakteriyofajın memeli organizması ile doğrudan teması, memeli immünolojik sistemini uyarabilir (Dąbrowska 2019, Gembara ve Dąbrowska 2021) Bu etkileşimin temel sonucu, tipik olarak (kuyruklu fajlarda gözlemlendiği gibi) IgM ile başlayan ve ardından IgG ve IgA ile devam eden bakteriyofaja özgü antikorların üretimidir (Majewska ve ark 2015, Majewska ve ark 2019). Bununla birlikte, antikor üretiminin yoğunluğu ve karakteri, bakteriyofaj uygulama yoluna, fajın bireysel

özelliklerine, uygulama programına ve dozuna bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir (Gembara ve Dąbrowska 2023).

Bakteriyofaj immünojenisitesi hakkında genel bir sonuca varmak veya terapötik yaklaşımlar üzerindeki etkisinin araştırılması için evrensel bir model önermek oldukça güçtür. İmmün yanıtlar, önemsiz veya tespit edilemez düzeyden (Łusiak-Szelachowska ve ark 2014), yıkıcı etkilere (Huff ve ark 2010, Archana ve ark 2021) kadar geniş bir spektrumda değişkenlik gösterebilmektedir. Fajların karmaşık protein yapıları, her proteinin birçok potansiyel epitop barındırabilmesi nedeniyle, faj spesifik olarak adlandırılan antikorlar, aslında farklı faj proteinlerine verilen yanıtların (poliklonal) bir toplamıdır. Tek bir faj epitopunu spesifik olarak tanıyan antikorlar (monoklonal) ise biyoteknolojik yöntemler kullanılarak geliştirilebilmektedir (Kurochkina ve ark 2006).

Faj nötralize edici antikorlar, muhtemelen en büyük biyolojik öneme sahiptir (Archana ve ark 2021). Fajın antikorlar tarafından nötralizasyonu, bu antikorların fajın bakterileri enfekte etme yeteneği için kritik öneme sahip proteinleri, örneğin bakteri yüzeyine bağlanan proteinleri hedef almasıyla gerçekleşir (Jerne ve Avegno 1956, Ledebøer ve ark 2002). Viryonların diğer bölgelerini hedef alan antikorlar da bulunabilir; bunlar, antikorlarla işbirliği yapan spesifik olmayan bağışıklık unsurları tarafından yürütülen fajın dolaylı nötralizasyonunu uyarabilmektedir (Gembara ve Dąbrowska 2023).

1.2.15. Neonatal Buzağı İshallerine Neden Olan *E. coli* Patotipleri

Neonatal buzağı ishali, sığır endüstrisinde önemli bir sağlık sorunu olarak öne çıkmakta ve genellikle *E. coli* çeşitli patotiplerinden kaynaklanmaktadır. Araştırmalar, *E. coli* patotiplerinin buzağılarda özellikle yaşamlarının ilk haftasında yaygın olduğunu ve bu yaş grubunun enfeksiyonlara karşı savunmasızlığını vurgulamaktadır (Robi ve ark 2024). İshalli buzağılarda *E. coli* varlığı çeşitli çalışmalarda belgelenmiş olup, raporlar *E. coli* enfeksiyonlarının yenidoğan ishali vakalarının önemli bir bölümünü oluşturduğunu göstermektedir (Salama ve ark 2023). Örneğin, bir çalışmada hasta buzağılarda %45'inden *E. coli* izole edilmiş ve bu bakterinin bu demografide önemli bir patojen olarak rol oynadığı vurgulanmıştır. Ayrıca, Shiga toksini üreten *E. coli* (STEC) ve enterotoksijenik *E. coli* (ETEC) gibi hibrit suşların tespit edilmesi, bu

suşların potansiyel halk sağlığı etkileri konusunda endişeleri artırmaktadır (Kolenda ve ark 2015, Aref ve ark 2018) .

1.2.16. Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC)

ETEC, yenidoğan buzağı ishallerinde en sık izole edilen patotip olup, ciddi ekonomik kayıplara ve hayvan refahında düşüşe neden olmaktadır (Nataro ve Kaper 1998, Muktar ve ark 2015). Özellikle üç haftalıktan küçük buzağılarda mortalitenin yaklaşık %75'ine neden olmaktadır (Ok ve ark 2009).

ETEC'nin patogeneğinde temel rol oynayan virölans faktörleri, bağırsak epiteline yapışmayı kolaylaştıran spesifik fimbrial adezinler ve enterotoksinlerdir. Özellikle K99 fimbrial antijeni, ETEC suşlarının ince bağırsak mukozasına sıkı bir şekilde tutunmasını sağlayarak enfeksiyonun başlangıcında kritik bir işlev görmektedir Bir başka adhezin olan F41 fimbriyası da yenidoğan buzağı ishalinde rol oynamaktadır (Fairbrother ve Nadeau 2019).

Fimbrialar, bakterinin konak hücrelere adezyonunu artırarak kolonizasyon ve enfeksiyonun ilerlemesinde önemli bir rol oynamaktadır. ETEC suşları, ısıya duyarlı (LT) ve ısıya dayanıklı (ST) enterotoksinler olmak üzere iki ana tip enterotoksin üretmektedir. Bu toksinlerin etkisiyle bağırsak fonksiyonları bozulmakta, ishal oluşumuna yol açmakta ve ciddi sıvı kayıpları meydana gelmektedir (Dubreuil ve ark 2016).

Benzer şekilde, yapılan bir çalışmada ETEC'in yenidoğan buzağılar, kuzular ve domuz yavrularında ishalin ana etkeni olduğunu teyit etmiş ve bu enfeksiyonlarda virölans faktörlerinin önemini bir kez daha ortaya koymuştur (Rai ve ark 2023). Algammal ve ark (2020) tarafından yapılanlar gibi son çalışmalar, ishalleri buzağılardan elde edilen izolatlarda K99 ve STa dahil olmak üzere ETEC ile ilişkili virölans genlerinin yaygınlığını tanımlamıştır. K99 fimbrial adezin, ETEC'in bağırsak mukozasına bağlanmasını kolaylaştıran, kolonizasyona ve ardından toksin üretimine izin veren kritik bir faktördür (Fairbrother ve Nadeau 2019, von Mentzer ve Svennerholm 2024).

ETEC suşları arasında antimikrobiyal direnç giderek artan bir endişe kaynağı haline gelmiştir. Çalışmalar, buzağılardan elde edilen *E. coli* izolatlarında yaygın

olarak kullanılan antibiyotiklere karşı çeşitli derecelerde direnç bildirmiştir. Örneğin, yapılan bir çalışmada ETEC suşlarında direnç genlerinin edinildiğini, bunun da tedavi seçeneklerini zorlaştırdığını ve halk sağlığı için risk oluşturduğunu vurgulanmıştır (Sobhy ve ark 2020). Buzağılarda çoklu ilaca dirençli *E. coli* suşlarının ortaya çıkması, hayvan sağlığı tedavi uygulamalarında dikkatli izleme ve sorumlu antibiyotik kullanımını gerektirmektedir (Feuerstein ve ark 2021).

Ayrıca, ETEC'in yenidoğan ishalinde birincil patojen olarak tanımlanması, salgınları azaltmak için etkili aşılama stratejilerine ve önleyici tedbirlere duyulan ihtiyacın altını çizmektedir (Rojas-Lopez ve ark 2018).

1.2.17. Enteropatojenik *E. coli* (EPEC)

EPEC, yenidoğan buzağı ishalinde rol oynayan bir diğer önemli patotiptir. Bağırsak hücrelerine yapışmaya aracılık eden ve yapışan ve lezyonların oluşumuna yol açan bir protein olan intimin'i kodlayan *eae* geninin varlığı ile karakterize edilir (Algammal ve ark 2020, Mohteshamuddin ve ark 2020). Bağlanma ve silinme (attaching and effacing, A/E) fenomeni, EPEC enfeksiyonlarının karakteristik özelliği olarak tanımlanmıştır. Bu süreç, bakterilerin konak epitel hücre membranına sıkıca tutunması ve mikrovillusların yok olmasıyla sonuçlanan karakteristik lezyonların oluşumuyla kendini gösterir (Nataro ve Kaper 1998).

EPEC suşlarının ayırt edici özelliği, bağırsak epitel hücrelerinin yüzeyinde lokalize lezyonlar oluşturabilme yeteneğidir. Bu bakteriler, hücre yüzeyini değiştirerek ve mikrovillusların kaybına neden olarak A/E lezyonlarını meydana getirir. Bu süreçte anahtar rol oynayan intimin, *eae* geni tarafından kodlanan ve bağırsak hücrelerine tutunmayı sağlayan bir dış membran proteindir. Bakterinin tutunma süreci, konak hücre plazma membranına yerleşen ve intimin için reseptör görevi gören Tir (Transloke intimin reseptörü) proteini aracılığıyla gerçekleşir. EPEC, sahip olduğu tip-üç salgı sistemi (T3SS) sayesinde konak hücrelere en az yirmi beş farklı efektör protein enjekte edebilmektedir. A/E lezyonlarının oluşumunda rol alan tüm genetik bileşenler, enterosit silinme lokusu (LEE) adı verilen büyük bir patojenite adasında kodlanmıştır (Singh ve ark 2003, Ochoa ve Contreras 2011, Cepeda-Molero ve ark 2017, de Jonge ve ark 2019).

Hosein ve ark (2019) yaptıkları çalışma, buzağılarda görülen akut ishal vakalarının %92.85'inde *E. coli*'nin tespit edilmesi ve bu izolatların tamamının EPEC karakteristiği göstermesi, bu patojenin buzağı ishallerindeki rolünü ortaya koymaktadır.

1.2.18. Enterohemorajik *E. coli* (EHEC/ STEC)

EHEC içeren STEC patotipi, ciddi bağırsak hasarına ve HUS gibi sistemik komplikasyonlara neden olabilen shiga toksinleri (Stx1 ve Stx2) üretmesiyle bilinmektedir (Engelen ve ark 2021, Feuerstein ve ark 2021). Shiga toksin genleri, Stx1 ve Stx2, başta Shiga toksin üreten *E. coli* olmak üzere belirli *E. coli* patotipleriyle ilişkili kritik virülans faktörleridir. Buzağılardan elde edilen izolatlarda Stx1, Stx2 ve "eae" gibi virülans genlerinin tespit edilmesi, bu enfeksiyonlarla ilişkili ciddi klinik sonuçların potansiyelini vurgulamaktadır (Algammal ve ark 2020, Ryu ve ark 2020).

Yapılan bir araştırmada genç süt buzağılarından elde edilen *E. coli* izolatlarında bu virülans genlerinin yaygınlığını araştırmış ve Stx2'nin varlığının, insanlarda hemorajik kolit ve hemolitik üremik sendrom dahil olmak üzere ciddi hastalık sonuçlarıyla ilişkisi nedeniyle özellikle endişe verici olduğunu belirtmiştir (Engelen ve ark 2021).

Ayrıca, Ryu ve ark (2020) süttten kesilmiş buzağılardan izole edilen *E. coli* suşlarında Stx1 ve Stx2 prevalansını bildirerek, bu virülans genlerinin buzağı popülasyonunda önemli bir varlığına işaret etmiştir. STEC ile ilişkili virülans faktörleri, patojenitesini anlamak için kritik öneme sahiptir. Shiga toksinlerinin üretimi STEC'in ayırt edici bir özelliğidir ve insanlarda ciddi bağırsak hasarına ve HUS gibi sistemik komplikasyonlara yol açar (Kaper ve ark 2004).

Bai ve ark (2019) çalışmalarında, hibrit STEC/ETEC suşlarına odaklanmıştır ve bu suşların her iki patotipten de virülans faktörlerini taşıdığını bildirmiştir. Araştırmada, hibrit suşların potansiyel patojenitesi vurgulanarak halk sağlığı açısından taşıdığı önem ortaya konmuştur. Yapılan bir çalışma da ishali buzağılarda, insanlarda ciddi hastalıklarla ilişkili olan çeşitli STEC serotiplerini tanımlamıştır; bu suşların hem buzağılarda hem de insanlarda hastalık oluşturabilme potansiyelini gösteren Stx1 ve eae gibi virülans genlerinin varlığına dikkat çekmiştir (Fakih ve ark 2017).

STEC suşları arasında antimikrobiyal direnç giderek artan bir endişe kaynağı haline gelmiştir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, buzağılardan izole edilen *E. coli* suşlarında yaygın olarak kullanılan antibiyotiklere karşı çeşitli derecelerde direnç olduğunu bildirmiştir (Feuerstein ve ark 2021).Yapılan çalışmada araştırmacılar, STEC suşlarında tedavi seçeneklerini zorlaştıran ve halk sağlığı için risk oluşturan direnç genlerinin varlığını vurgulamıştır. Çoklu ilaca dirençli STEC suşlarının ortaya çıkması, veterinerlik uygulamalarında dikkatli izleme ve akılcı antibiyotik kullanımını gerektirmektedir. Yenidoğan buzağılarda STEC enfeksiyonlarının klinik etkileri önemlidir, çünkü derhal tedavi edilmezlerse ciddi dehidrasyona ve ölüme yol açabilmektedir (Algammal ve ark 2020).

Majed ve Alazemi (2023) neonatal buzağı ishaliyle ilişkili çeşitli enterik patojenleri tartışmış ve STEC'in potansiyel bir etken olarak tanımlanmasının önemini vurgulamıştır. Son zamanlarda gerçekleştirilen araştırmalar, yenidoğan buzağılarda STEC prevalansını belgeleyerek, bu popülasyonda yaygın bir patojen olduğunu ortaya koymuştur.

1.2.19. Hastalık Bulaşma Yolları ve Rezervuar

Yenidoğan buzağılarda *E. coli*'nin bulaşma yolları öncelikle fekal-oral yollarla gerçekleşir. Buzağılar kontamine yem veya su yutarak ya da enfekte hayvanların dışkılarıyla doğrudan temas ederek enfekte olabilir (Kolenda ve ark 2015, Homeier-Bachmann ve ark 2022). *E. coli* çevrede varlığını sürdürebildiği ve sürülerde salgınlara yol açabildiği için çevre, bulaşma dinamiklerinde kritik bir rol oynamaktadır. Kötü hijyen uygulamaları, yetersiz kolostrum alımı ve buzağı barınaklarının aşırı kalabalık olması gibi faktörler *E. coli*'nin yayılmasını şiddetlendirebilir (Kolenda ve ark 2015, Abuelo 2017). Ayrıca, biberon ve kova gibi kontamine ekipmanların kullanımı da *E. coli*'nin buzağılar arasında bulaşmasını kolaylaştırabilir (Homeier-Bachmann ve ark 2022).

Epidemiyolojik çalışmalar buzağıların sadece patojenik *E. coli* için rezervuar olmadığını, aynı zamanda bu bakterilerin insanlara zoonotik geçişinde de rol oynadığını göstermiştir (Kolenda ve ark 2015, Hosein ve ark 2019). Bu durum

özellikle kontamine et veya çiftlik hayvanlarıyla doğrudan temas yoluyla bulaşabilen STEC gibi türler için endişe vericidir. Buzağılardan insanlara bulaşma potansiyeli, hayvancılık ortamlarında *E. coli* enfeksiyonlarının izlenmesi ve kontrol edilmesinin önemini vurgulamaktadır (Antaki-Zukoski ve ark 2018).

1.2.20. Neonatal Buzağı İshallerini Önlemeye ve Kontrol Etmeye Yönelik Mevcut Stratejiler

Neonatal buzağı ishalinin önlenmesinde etkili yönetim uygulamaları kritik önem taşımaktadır. Bu bağlamda en temel yaklaşım, doğumu takiben buzağının yeterli kolostrum alımının sağlanmasıdır. Kolostrum, pasif bağışıklık transferi için hayati öneme sahiptir ve yapılan araştırmalar, yeterli kolostrum alan buzağının enterik patojenlere karşı daha dirençli olduğunu göstermektedir (Vega ve ark., 2020; Maier ve ark., 2022).

Buzağı barınaklarında yüksek hijyen standartlarının sürdürülmesi, özellikle düzenli temizlik ve dezenfeksiyon uygulamaları, patojen mikroorganizmalara maruz kalma riskini önemli ölçüde azaltmaktadır (Chae ve ark. 2021). Bununla birlikte, barınaklarda aşırı yoğunluğun önlenmesi ve uygun havalandırma sistemlerinin kurulması gibi çevresel düzenlemeler, buzağılarda stres faktörlerini ve hastalık görülme sıklığını minimize etmede belirleyici rol oynamaktadır (Lorenz, 2021).

Son araştırmalar, pasif bağışıklık tedavilerini, özellikle de yumurta sarısından elde edilen immünoglobulin Y (IgY) antikorlarının neonatal buzağı ishaline karşı önleyici bir önlem olarak kullanılmasını araştırmıştır. Bu antikorlar patojenleri nötralize edebilir ve buzağının bağışıklık tepkisini artırabilmektedir (Vega ve ark 2020). IgY antikorlarının etkinliği, buzağılara uygulandığında ishal insidansında bir azalma gösteren çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Cuervo ve ark 2021, Bozkurt 2024). Bu yaklaşım, çiftlik hayvanlarında profilaktik antibiyotik kullanımına yönelik artan kısıtlamalar göz önüne alındığında özellikle değerlidir (Malmuthuge ve ark 2019).

Aşılama, neonatal buzağı ishalini kontrol altına almak için bir diğer kritik stratejidir. Sığır rotavirüsü ve koronavirüs gibi spesifik patojenleri hedef alan aşılar, buzağının bu enfeksiyöz ajanlara maruz kalmadan önce bağışıklık tepkisini arttırmak için geliştirilmiştir (Maier ve ark 2022, Cui ve ark 2023). Gebe ineklerin aşılama

da kolostrum yoluyla maternal antikorlar sağlayarak buzağları savunmasız ilk günlerinde daha fazla koruyabilir (Maier ve ark 2022). Bununla birlikte, aşılarda mevcudiyeti ve etkinliği değişebilir ve daha etkili seçenekler geliştirmek için devam eden araştırmalara ihtiyaç vardır (Cui ve ark 2023).

Bağırsak mikrobiyomunu manipüle etmek, neonatal buzağı ishalini önlemek ve kontrol etmek için ortaya çıkan bir stratejidir. Çalışmalar, fermente yem veya probiyotiklerin dahil edilmesi gibi diyet müdahalelerinin bağırsak mikrobiyota bileşimini olumlu yönde etkileyebileceğini, buzağların bağışıklık yeterliliğini artırabileceğini ve ishal insidansını azaltabileceğini göstermiştir (Kim ve ark 2021, Wu ve ark 2022).

Antibiyotikler çiftlik hayvanlarında bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde etkili bir araçtır, ancak antibiyotiklerin büyümeyi destekleyici ya da bakteriyel hastalıkların tedavisinde terapötik olarak kullanılması küresel sağlık sorunu olan antimikrobiyal direnç önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır. Son yıllarda, dünya genelinde halk sağlığı için ciddi bir tehdit oluşturan çoklu ilaca dirençli bakterilerin yayılması, hem hayvan hem de insan sağlığı alanlarında antibiyotiklere alternatif tedavi yaklaşımlarına olan acil talebi artırmıştır. Bu gereklilik doğrultusunda, bakteriyofaj temelli tedavilerin geliştirilmesi ve test edilmesi üzerine çok sayıda çalışma yayınlanmıştır (Bianchessi ve ark 2024).

Özellikle Gram-negatif bakteriler çoklu antibiyotiklere karşı her zamankinden daha dirençli olduğundan, alternatif tedavi arayışları artık uluslararası kuruluşlar ve hükümetler (Birleşmiş Milletler, Dünya Sağlık Örgütü ve G20) tarafından güçlü bir şekilde desteklenmektedir (WHO 2019).

1.2.21. Neonatal Buzağı İshallerinin Tedavisinde Faj Terapi

Neonatal dönemde buzağlarda ishal tedavisi ve büyümeyi desteklemek amacıyla uzun yıllardır antibiyotikler kullanılmaktadır. Ancak, antibiyotiklere dirençli bakterilerin ortaya çıkması ve etteki kalıntıların oluşturduğu riskler, bu yaklaşıma yönelik endişeleri artırmıştır. Özellikle, sütten kesilmeden önce tekrarlayan ishal ve bu süreçte aşırı veya yanlış antibiyotik kullanımı, henüz tam olgunlaşmamış rumen ve bağırsak florasının dengesini bozabilmekte ve buzağlarda sindirim ve emilimde kalıcı zararlara neden olabilmektedir (Ji ve ark 2018). Bu tür sorunlar göz önünde

bulundurulduğunda, hayvan sağlığında, özellikle yenidoğan buzağılarda bakteriyel enfeksiyonları önleyecek ve tedavi edecek alternatif yöntemlerin geliştirilmesi acil bir ihtiyaç olarak öne çıkmaktadır. Bu sayede hem antibiyotik kullanımının azaltılması hem de antibiyotiğe dirençli bakterilerin yayılımının kontrol altına alınması hedeflenmektedir (Du ve ark 2023).

Bakteriyofajların, özellikle *E. coli* gibi patojenlere karşı kullanılabileceği hakkındaki kanıtlar giderek artmaktadır. Yapılan bir çalışmada, yenidoğan buzağılarda oral faj uygulamasının, ishale yol açan ETEC suşlarının baskılanmasında etkili olduğunu raporlamıştır (Bicalho ve ark 2012). Ek olarak, faj tedavisinin *E. coli* ve *Salmonella* gibi farklı patojenlere karşı pek çok hayvan türünde başarılı sonuçlar vermesi, veterinerlik alanında ticarileştirilebilir bir potansiyel taşıdığını göstermektedir (Aydoğan ve Hadimli 2016, Hadimli ve ark 2021). Faj tedavisine yönelik bu artan ilgi, çiftlik hayvanlarındaki bakteriyel enfeksiyonlarla mücadelede giderek daha pratik bir seçenek olarak kabul görmektedir (Skaradzińska ve ark 2017).

Maffei ve ark (2021) gerçekleştirdiği kapsamlı çalışmada, BASEL (Bacteriophage Selection for your Laboratory) koleksiyonu oluşturulmuştur. Bu koleksiyon, *E. coli*'yi hedef alan 68 yeni izole edilmiş faj ve 10 geleneksel model fajdan oluşmaktadır. Araştırmacılar, sistematik analizler sonucunda bu fajların çoğunluğunun, gelecekteki terapötik uygulamalar için önemli potansiyel taşıyan belirli baskın gruplarda kümелendiğini tespit etmişlerdir.

Bu alanda yapılan farklı bir çalışmada ise, genetik modifikasyon teknikleri kullanılarak gastrointestinal sisteme daha dayanıklı fajların geliştirilmesine odaklanmıştır. Bu gelişmeler, veteriner hekimlikte oral yolla uygulanan faj tedavilerinin etkinliğini önemli ölçüde artırmaktadır (Nobrega ve ark 2016).

Yenidoğan buzağılarda *E. coli* enfeksiyonlarının kontrolü amacıyla gerçekleştirilen deneysel çalışmalardan biri de Alomari ve ark (2021) tarafından raporlanmıştır. Farklı barınak sistemlerinden izole edilen fajlar kullanılarak yapılan bu deneylerde, uygulama yönteminin, faj dozajının ve deneysel enfeksiyon protokolünün faj terapisi üzerindeki belirleyici etkisi ortaya konmuştur. Buna ek olarak, süttten kesilmiş buzağılarda yürütülen çalışmada, faj uygulamasının ko-enfeksiyonları

gidermeye yardımcı olabileceğini ancak ishalin ortaya çıkışında beslenme ve çevresel koşulların da önemli rol oynadığını vurgulamıştır. Bu durum, buzağılardaki neonatal ishalin pek çok faktörden etkilendiğini ve bunun için kapsamlı bir yaklaşım gerektiğini göstermektedir (Schmoeller ve ark 2021).

Literatürde *E. coli* enfeksiyonlarına karşı faj terapisi üzerine yapılan çalışmalar, özellikle buzağı ishallerinin kontrolünde umut verici sonuçlar ortaya koymaktadır. Liao ve ark (2018), Shiga toksin üreten *E. coli* O145 suşlarına karşı litik bakteriyofajların karakterizasyonunu yaparak, bu fajların biyokontrol potansiyelini göstermiştir. Yapılan diğer bir çalışmada ise antimikrobiyal dirençli diyarejenik *E. coli* suşlarına karşı litik bakteriyofajların izolasyonu ve karakterizasyonunu gerçekleştirerek, dirençli suşlarla mücadelede fajların terapötik potansiyelini vurgulamıştır (Sada ve ark 2024).

Schmoeller ve ark (2021) gerçekleştirdiği çalışma, bakteriyofaj takviyesinin ishalleri buzağılar üzerindeki etkilerini ortaya koyan önemli bulgular sunmaktadır. Araştırmada, bakteriyofaj takviyesi alan grupta ishal süresinin kontrol grubuna kıyasla belirgin şekilde azaldığı gözlenmiştir. Ayrıca, faj grubunda *E. coli* pozitifliği önemli ölçüde düşük bulunmuş, bu durumda bakteriyofajların patojenik *E. coli*'ye karşı etkili bir koruma sağladığını göstermiştir. Çalışmanın en dikkat çekici sonuçlarından biri de bakteriyofaj takviyesi alan buzağıların daha yüksek günlük kilo alımı göstermesidir. Bu veriler ışığında, bakteriyofaj tedavisinin buzağı yetiştiriciliğinde hem hastalıkların önlenmesi hem de büyüme performansının iyileştirilmesi açısından umut verici bir koruyucu yaklaşım olabileceği ortaya konmuştur.

Sui ve ark (2021) tarafından karakterize edilen polivalent bakteriyofaj vB_EcoM_swi3'ün hem patojenik *E. coli* hem de *Salmonella enteritidis*'e karşı etkili olması, fajların geniş spektrumlu kullanım potansiyelini ortaya koymaktadır. Farklı bir çalışmada, yenidoğan buzağılarda oral bakteriyofaj uygulamasının dışkıdaki *E. coli* seviyelerini azalttığını göstermiş, bu da özellikle ETEC kaynaklı ishallerin kontrolünde faj terapisinin etkinliğini desteklemiştir (Bicalho ve ark 2012).

Kim ve ark (2022) tarafından yapılan çalışmada, bakteriyofaj EK99P-1'in enterotoksijenik *E. coli* (ETEC) K99'a karşı etkinliği incelenmiştir. Araştırma

sonuçları, bu fajın sadece patojenik bakterileri hedeflemekle kalmayıp, konağın bağışıklık yanıtını düzenleyerek bağırsak bariyerini güçlendirdiğini göstermiştir. Özellikle pro-enflamatuar sitokinlerin ekspresyonundaki azalma, faj terapisinin enflamasyonu kontrol etmedeki başarısını ortaya koymaktadır.

Yapılan iki farklı çalışmada, sığır dışkılarından izole edilen fajların çeşitli *E. coli* suşlarına karşı geniş spektrumlu etkinlik gösterdiğini belirtmektedir (Abdelrahman ve ark 2022, Bumunang ve ark 2022). Oechslin ve ark (2018)'in araştırması, oral faj tedavisinin bakteriyel aşılama sonrası bile ishali önleyebildiğini ve tedavi edilen buzağılarda faja dirençli varyantların gelişmediğini göstermiştir. Yapılan bir çalışmada yenidoğan buzağılarda oral faj uygulamasının dışkıdaki *E. coli* seviyelerini önemli ölçüde azalttığını ortaya koymuştur (Bicalho ve ark 2012).

Faj terapisinin veteriner hekimlikte ticarileşme potansiyeli, farklı hayvan türlerinde çeşitli patojenlere karşı başarılı uygulamalarla desteklenmektedir (Skaradzińska ve ark 2017). Nobrega ve ark (2016)'nın gastrointestinal sistemin asidik ortamına dayanıklı fajların geliştirilmesi konusundaki çalışmaları, oral uygulamaların başarısını artırmaya yönelik önemli katkılar sağlamıştır.

Faj terapisinin ilerlemesinde mikrokapsüllenmiş fajlar da dikkat çekmektedir. Yin ve ark (2021) *E. coli* O157:H7'yi hedef alan mikrokapsüllenmiş fajların gastrointestinal ortamda üstün stabilite sergilediğini ve enfekte sıçan modellerinde bakteri seviyelerini etkili biçimde düşürdüğünü göstermiştir.

Yapılan bir çalışmada tanımlanan ØCJ19 adlı spesifik bir bakteriyofaj, ETEC suşlarını etkili bir şekilde hedef alarak önemli bir litik aktivite sergilemiştir. Bu bulgular, hem ishal vakalarının sıkça görüldüğü buzağılarda hem de diğer çiftlik hayvanlarında ETEC enfeksiyonlarını kontrol altına almak için faj tedavisinin yüksek bir potansiyel taşıdığını göstermektedir. Bu nedenle, antibiyotik kullanımına bağlı riskleri en aza indirmek ve dirençli bakteri sorununu kontrol altına almak adına bakteriyofaj temelli tedavilerin geliştirilmesi, giderek daha geniş kabul görmektedir (Kim ve ark 2020).

Bu çalışmanın temel amacı, neonatal buzağı ishallerinin tedavisinde alternatif bir yaklaşım olarak faj terapisi stratejilerinin geliştirilmesine bilimsel katkı sağlamaktır. Bu bağlamda;

- Yeni nesil dizileme teknolojisi ve biyoinformatik analizler aracılığıyla, buzağı ishallerine neden olan enteropatojenik *E. coli* suşlarına karşı etkili litik bakteriyofajların izolasyonu, karakterizasyonu ve sistematik bir kolifaj koleksiyonunun oluşturulması,
- Faj-konakçı bakteri etkileşimlerinin popülasyon dinamiklerini inceleyerek fajların terapötik potansiyellerinin değerlendirilmesi,
- Çalışmanın bir diğer amacı, Konya ve çevresindeki sığır işletmelerinde neonatal ishalleri buzağılarda diyarejenik *E. coli* türlerinin varlığını, etken izolasyonu ve virulens genlerinin moleküler karakterizasyonu ile belirlenmesi,
- Elde edilen deneysel verilerin ışığında, buzağı ishallerinin tedavisinde kullanılabilecek optimize edilmiş, güvenli ve etkili faj terapi protokollerinin geliştirilmesi için bilimsel altyapının oluşturulması hedeflenmiştir.

Bu araştırma projesi, veteriner hekimlikte giderek artan antimikrobiyal direnç sorununa alternatif çözümler üretmeyi hedeflerken, aynı zamanda buzağı ishallerinin tedavisinde faj tabanlı yenilikçi terapötik yaklaşımların potansiyelini de ortaya koymak için katkı sağlamayı amaçlamaktadır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Etik Kurul Onayı

Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi Etik Kurulu'nun (SÜVDAMEK) 06.01.2022 tarih ve 2021/141 sayılı kararı ile onaylanmıştır. Etik kurul, çalışmanın SÜVDAMEK Yönergesi ilkelerine uygun olduğunu ve araştırma etiği açısından uygunluğunu teyit etmiştir.

2.1.2. Besiyerleri ve Kimyasallar

Bu çalışma kapsamında, bakteri üremesi ve faj çoğalması için kullanılan besiyerleri Tablo 1'de listelendi. Çalışma yöntemlerinde yer alan kimyasal ve çözeltiler Tablo 2' de belirtildi. Tüm besiyeri ve çözeltiler, sterilizasyon amacıyla 121°C'de 20 dakika süreyle otoklavlandı veya 0,22 µm gözenek çapına sahip filtre kullanılarak filtrasyon yöntemiyle sterilize edildi.

Tablo 1. Bakteri Üremesi ve Faj Çoğalmasında Kullanılan Besiyerleri

Besiyeri	Bileşenler (Miktar/Litre)
Luria Broth (LB) (Miller, Neogen ABD)	10 g Bacto tripton 5 g Bacto maya özü 5 g NaCl
Luria Bertani Agar (LBA) (Miller, Neogen ABD)	LB broth base 15 g Agar
%0,5 Üst Agar	LB broth base 5 g Agar/Agaroz
MacConkey Agar (CM0007 Oxoid, İngiltere)	20 g Pepton 10 g Laktoz 5 g Safra tuzları 0,075 g Nötral Red 12 g Agar

Tablo 2. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler ve Kimyasallar

Çözelti	İçerik
SM buffer	10 mM Tris-HCL pH 7.4 10 mM MgSO ₄ 0.01% Gelatin
Agarose gel (% 1.5)	1.5 gr Agarose 100 ml TBE 35 g NaCl
PEG presipitasyon	60 g PEG-8000 200 ml ddH ₂ O
10X TBE	108 g Tris base (T1503-Sigma-Aldrich, ABD) 55 g Borik Asit (Sigma-Aldrich, ABD) 9.3 g EDTA pH 8.3 (SigmaAldrich, ABD)
Ultra Saf Su (Moleküler grade)	AppliChem, Darmstadt, Almanya
Polyethylen glycol (PEG) 8000	Roth, Karlsruhe, Almanya
MgCl ₂	Sigma Aldrich, St. Louis, ABD
Tris-HCL pH 7.4	Roth, Karlsruhe, Almanya
Agarose	Sigma-Aldrich, ABD
NaOH	100314, Merck, Almanya
HCl	100317, Merck, Almanya
DNase I, Grade II	Takara, Japonya
RNase	Invitrogen, TM ABD
Loading Dye 6X	Thermo Scientific, Vilnius, Litvanya
Nukleik Asit Boyası	Gel Red 10000× Biotium, Fremont, ABD
Ladder100 bp	Gene Ruler, Thermo Scientific, Vilnius, Litvanya
MgSO ₄	Sigma-Aldrich, ABD

Tablo 3. Faj izolasyonunda kullanılan konakçı *E.coli* suşları

Referans Suş	Virulens Geni/Serotip	Kaynak
ATCC 43895	O157:H7	Konya Veteriner Kontrol Enstitüsü
EC	O101:H ⁻ K99 ⁺ F41 ⁺	Aşı suşu (Dollvet Biyoteknoloji)
11A	O101:H ⁻ K99 ⁺ F(Y) ⁺	Aşı suşu (Dollvet Biyoteknoloji)
<i>E.coli</i> T-57	Sta ⁺ F41 ⁺ Intimin ⁺	Bu çalışma kapsamında izole edildi
<i>E.coli</i> 157-1	Sta ⁺ F41 ⁺ K99 ⁺	Bu çalışma kapsamında izole edildi

2.1.3. Oligonükleotidler

Tablo 4. Oligonükleotid dizileri

Gen Bölgesi	Primer Adı	Primer Sekansı (5'-3')	Referans
g20 (T7-benzeri fajlar)	CPS1.1 A	5'-GTAGWATWTTYTAYATTGAYGTWGG-3'	(Sullivan ve ark 2008)
	CPS8.1 B	5'-ARTAYTTDCCDAYRWAWGGWTC-3'	
g23 (T4-benzeri fajlar)	MZIA1 F	5'-GATATTTGIGGIGTTCAGCCATGA-3'	(Filée ve ark 2005)
	MZIA6 R	5'-CGCGGTTGATTTCAGCATGATTC-3'	
T7 major capsid proteinini	RW1_T7-majorcapF	5'-GATAATCTGGTCCGCTTGA-3'	(Nguyen ve ark 2014)
	RW1_T7-majorcapR	5'-GGCTCTGACTAAGGCTCGTG-3'	
T4 major capsid proteinini	RW2_T4-majorcapF	5'-ATGCCGGTATCAACTGAAGC-3'	(Nguyen ve ark 2014)
	RW2_T4-majorcapR	5'-ACCGATAACCCATGGAATGA-3'	
Faj JK06	JK-75-F	5'-TAGGAATGCCGAACTGTAGGAT-3'	(Nguyen ve ark 2014)
	JK-75-R	5'-CGTTTGCTGGCTTAATTCTTGTCT-3'	
RAPD Primerleri	P1	5'-CCGCAGCCAA-3'	(Gutiérrez ve ark 2011)

Tablo 5. *E. coli* virülens genleri primer dizileri

Virülens faktörü	Primer sekansı 5'-3'	Ürün boyutu (bp)
Stx1	TTCGCTCTGCAATAGGTA TTCCCCAGTTCAATGTAAGAT	555
Intimin	ATATCCGTTTTAATGGCTATCT AATCTTCTGCGTACTGTGTTCA	425
F41	GCATCAGCGGCAGTATCT GTCCCTAGCTCAGTATTATCACCT	380
K99	TATTATCTTAGGTGGTATGG GGTATCCTTTAGCAGCAGTATTC	314
Sta	GCTAATGTTGGCAATTTTTATTTCTGTA AGGATTACAACAAAGTTCACAGCAGTAA	190
Stx2	GTGCCTGTTACTGGGTTTTTCTTC AGGGGTCGATATCTCTGTCC	118

2.2. Yöntem

2.2.1. Örneklerin Toplanması

Konakçı *E. coli* suş koleksiyonu oluşturmak amacıyla, Konya ve çevresindeki sığır işletmelerinde neonatal ishalli buzağılardan rektal svap örnekleri toplandı. Bakteriyofaj izolasyonu için potansiyel kaynaklar olarak sığır, koyun çiftlikleri ve kanatlı işletmelerinden dışkı (kloakal svap), altlık, gübre çukuru ve atık su (KOSKİ-kanalizasyon atık su) örnekleri kullanıldı.

Bu çalışmada, 9 farklı sığır işletmesinden toplam 110 rektal svap örneği toplandı. Neonatal ishalli buzağılardan toplanan rektal svap örnekleri, Stuart besiyeri içinde aseptik koşullarda ve soğuk zincir altında en kısa sürede laboratuvara ulaştırıldı.

Konakçı bakterileri enfekte edebilecek litik bakteriyofajların izolasyonu amacıyla, kanatlı işletmelerinden 120 adet kloakal svap ve 10 adet altlık, koyun işletmelerinden 7 adet altlık, sığır işletmelerinden 4 adet gübre çukuru ve 4 adet atık su örnekleri toplandı. Ayrıca, KOSKİ'den alınan 5 adet atık su örneği de incelendi. Toplanan örnekler, steril örnek toplama kaplarına alınarak, aseptik koşullarda ve soğuk zincir altında laboratuvara ulaştırıldı.

2.2.2. *E. coli* İzolasyonu

İzolasyon işlemi sırasıyla şu adımlarla gerçekleştirildi: Örnekler Mac Conkey agar besiyerine ekildi. Petriler 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında, laktoz pozitif koloniler seçildi. Seçilen koloniler, %20 gliserol içeren LB broth besiyerine aktarıldı. Son olarak, hazırlanan kültürler -20°C'de dondurularak saklandı (Frampton ve Restaino 1993, Gibbons ve ark 2014).

2.2.3. Virulens Genlerinin Multipleks PZR ile Tespiti

Bakteriyel DNA ekstraksiyonu için, izole edilen şüpheli kolonilerden alınarak 500 µL ultra saf suda süspanse edildi. Daha sonra, bu süspansiyon 100°C'de 10 dakika kuru ısıtıcı blokta (Bio-TDB 100, Biosan, Litvanya) kaynatıldı. Tüpler, -20°C'de dondurulduktan sonra oda sıcaklığında çözdürüldü ve 14.000 g'de 10 dakika süreyle santrifüj edildi. Elde edilen DNA, analizlere kadar 20°C'de muhafaza edildi.

Virulens genlerinin multipleks PZR ile tespiti amacıyla, izole edilen *E. coli* suşlarında altı önemli virülans faktörünün (Stx1, eae, F41, K99, STa, Stx2) varlığı araştırıldı. Yapılan analiz, Franck ve ark (1998) yılında gerçekleştirdiği çalışmaya dayanarak uyarlandı. Analizde, spesifik primer dizileri kullanıldı ve bu diziler Tablo 5'de detaylandırıldı. Pozitif kontrol olarak *E. coli* referans suş ATCC 43895 (O157:H7:Stx1+, Stx2+) kullanıldı. Negatif kontrol olarak steril su kullanıldı.

2.2.4. Multipleks PZR

Analizler, PZR Master Mix (Thermo Scientific™ 2X, ABD) kullanılarak, üretici firmanın protokolü modifiye edilerek gerçekleştirildi. Kullanılan primer dizileri Tablo 5' de belirtildi. Multipleks PZR reaksiyonu için uygulanan protokol ve cihazda (SimpliAmp™ PCR Thermal Cycler, Thermo Fisher Scientific, Singapore) kullanılan termal döngü programı Tablo 6 ve Tablo 7'de belirtilmiştir:

Tablo 6. PZR uygulamaları için kullanılan reaksiyon karışımı

Thermo Scientific™ PCR Master Mix (2X)	
PCR Master Mix (2X)	25 µL
Forward primer (10µM)	2,5 µL
Stx1-Intimin-F41-K99-Sta-Stx2	
Reverse primer (10µM)	2,5 µL
Stx1-Intimin-F41-K99-Sta-Stx2	
Su	15 µL
Kalıp DNA	5 µL
Toplam	50 µL

Tablo 7. *E. coli* virulens geni PZR uygulamaları için kullanılan amplifikasyon protokolü

	Sıcaklık	Süre	Döngü
Başlangıç Denatürasyonu	95 °C	3 dk	1 X
Denatürasyon	95 °C	30 sn	25 X
Bağlanma	50 °C	45 sn	
Uzama	72 °C	60 sn	
Son Uzama	72 °C	10 dk.	1X

Her bir örneğin PZR sonrasında çoğaltılan spesifik DNA bölgelerini (Stx1: 555 bp, eae: 425 bp, F41: 380 bp, K99: 314 bp, Sta: 190 bp, Stx2: 118 bp) görüntülemek amacıyla agar jel elektroforez sistemi (PowerPac Basic, Bio-Rad, ABD) kullanıldı. Bu işlem için, %1,5 oranında agaroz, 0,5x TBE tamponu içinde mikrodalga fırında çözdürüldü. Çözülen agaroz, 65–70 °C'ye kadar soğutulduktan sonra, içine 10,000X GelRed® (Biotium, ABD) nükleik asit boyası eklendi ve jel taşıyıcısına dökülerek katılaşması beklendi.

Donmuş jel, 0,5x TBE tamponu içeren jel tankına yerleştirildi. Her bir kuyucuğa, jel yükleme boyası ile karıştırılan PZR ürünleri sırasıyla yüklendi. Jel elektroforezi ile 60 dakika boyunca DNA bantlarının jelde göç etmesi sağlandı. Örneklerin pozitifliğini değerlendirmek için jel, UV ışığı altında bir transilluminatör (Azur 200, Azur Biosystems, ABD) yardımıyla görüntülendi.

2.2.5. Faj İzolasyonu

Faj izolasyonu için konak hücre bakteriyel modeli olarak, buzağı ishallerinde ülkemizde en sık izole edilen *E. coli* virülens gen profiline sahip patotipler arasından seçilen ve Tablo 3'te belirtilen beş farklı suş kullanıldı. Bakteriyofaj izolasyonu sürecinde, düşük konsantrasyonlarda bulunan fajların tespit edilebilme olasılığını

artırmak amacıyla örnekler, öncelikle faj zenginleştirme işlemine tabi tutuldu. Bu işlem, örneklerin bir gece boyunca konakçı *E. coli* suşları ile inkübe edilmesiyle gerçekleştirildi. Her bir konakçı suş için ayrı faj zenginleştirme protokolleri uygulandı.

Atık su örnekleri, içerdikleri partiküllerin uzaklaştırılması amacıyla 10.000 rpm'de santrifüj edildi. Ardından, süpernatant 0,22 µm membran filtreden (syringe filter, GVS, ABD) geçirildi. Elde edilen filtrat, bir gecelik *E. coli* kültürü ve LB broth ile birleştirilerek 37°C'de 24 saat boyunca inkübe edildi.

Toplanan altlık ve dışkı örneklerinden bakteriyofaj izolasyonu için modifiye edilmiş bir protokol uygulandı. Bu protokolda, her örnekten 10 gram alınarak 50 ml nihai hacim elde etmek üzere LB besiyerinde homojenize edildi. Elde edilen 50 ml homojenattan 20 ml'lik bir kısım alınarak, bir gecelik 20 ml *E. coli* kültürü ile birleştirildi ve 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Hem atık su hem de altlık/dışkı örneklerinde, inkübasyon sonrası potansiyel faj lizatları, bakteri hücrelerini uzaklaştırmak amacıyla 4000 x g'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant, kalan bakteri hücrelerinin uzaklaştırılması için 0,22 µm gözenek boyutlu bir membran filtreden geçirildi (Kropinski ve ark 2009).

2.2.6. Bakteriyofaj Varlığının Tespiti

Faj kaynaklarından elde edilen filtratlarda litik aktiviteye sahip fajların hızlı bir şekilde tespit edilmesi amacıyla öncelikle spot test yöntemi uygulandı. Kanatlı kloakal svap örnekleri 10' lu gruplar halinde örnek havuzu yapılarak çalışıldı. Bu süreçte, hedef *E. coli* suşları LB broth ortamında çoğaltıldı ve ardından LB agar yüzeyine yayılarak katı kültürler hazırlandı. Logaritmik fazda olan bu kültürlerin üzerine, her bir filtrattan 10 mikrolitre damlatıldı ve 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından, litik aktiviteyi gösteren zonlar (plaklar) gözlemlenen filtratlar seçildi. Seçilen filtratlar, daha sonra çift tabakalı agar yöntemi kullanılarak saflaştırıldı (Adams 1959).

2.2.7. Bakteriyofaj İzolasyonu

Faj izolasyonu ve saflaştırılması için çift tabakalı agar yöntemi uygulandı. Spot test sonucunda litik aktivite gösteren ve zon tespit edilen her bir filtrattan 10 µl alınarak, yaklaşık 10⁸ CFU/ml yoğunluğunda logaritmik fazdaki taze bakteri kültürü

ile 250 µl hacminde karıştırıldı. Bu karışım, faj-bakteri adsorpsiyonu sağlamak amacıyla oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Ardından, steril bir serolojik pipet kullanılarak, 10 mM CaCl₂ içeren %0,5 (w/v) LB yumuşak agar ile hazırlanan 4 ml erimiş üst agar tüpüne aktarıldı. Hazırlanan yumuşak agar/örnek/bakteri karışımı, 10 mM CaCl₂ içeren %1,5 (w/v) LB katı agar yüzeyine dökülerek kaplandı. Üst yumuşak agarın katılaşması için karışım, tezgah üzerinde 20 dakika bekletildi. Daha sonra, plaklar 37°C'de bir gece boyunca inkübe edildi. Ertesi gün, plak varlığı açısından değerlendirme yapıldı (Poxleitner ve ark 2018).

2.2.8. Fajların Saflaştırılması

Bakteriyofaj plağı gözlemlenen agarlardaki bölgelerden saflaştırma amacı ile tek plak izolasyonu yapıldı. Oluşan plaklar steril pastör pipeti ile bulundukları alanlardan toplandı ve 500 µL SM tamponu bulunan mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Toplanan plaklar +4 °C de muhafaza edildi.

Saf olarak elde edilen faj plaklarından toplanan faj lizatlarının 10 katlı seri dilusyonları yapılarak spot test ile faj titresi belirlendi. Her bir faj örneği için LB agar petri (0,-1,-8) dilusyonları ve fajsız kontrol olmak üzere 9 bölüme ayrıldı. Örnek sayısı kadar tüp hazırlandı. Her birine uygun bakteri konak kültür(ler)inden 250 µL eklendi.

Steril bir serolojik pipet kullanarak, CaCl₂ ile desteklenmiş 4 mL erimiş üst agarı tüplere eklendi ve üst agar/bakteri karışımı petrilere döküldü. Üst agarın tamamen katılaşması için petriler tezgah üzerinde 5 dakika boyunca bekletildi.

Üst agar (yumuşak agar) sertleştikten sonra her bir faj dilüsyonundan 10 µL alınarak petride etiketli alanlara damlatıldı. Petri 37°C de bir gece inkübe edildi. Ertesi gün plak varlığı yönünden değerlendirildi. Seçilen tek plağın yaklaşık titresi hesaplandı (Şekil 3). Litik aktivitesi iyi olan plak seçilerek 500 µL SM tamponuna alındı ve saf faj lizatı olarak değerlendirildi. Diğer testler yapılınca kadar +4 °C de muhafaza edildi (Poxleitner ve ark 2018).

2.2.9. DNA Ekstraksiyonu İçin Yüksek Titreli Lizatların Hazırlanması

Elde edilen her bir faj lizatı, 10⁻¹ ile 10⁻³ arasında on kat dilüsyon serilerine tabi tutuldu. Her bir dilüsyondan 10 µL alınarak, 250 µL logaritmik fazdaki *E. coli* kültürü

ile karıştırıldı. Tüpler hafifçe vortekslendi ve faj adsorpsiyonu için oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Steril bir serolojik pipet kullanılarak, CaCl₂ ile desteklenmiş 4 mL erimiş üst yumuşak agara aktarıldı. Hazırlanan yumuşak agar/örnek/bakteri karışımı, 10 mM CaCl₂ içeren %1,5 (w/v) LB katı agar yüzeyine dökülerek eşit şekilde yayıldı. Üst yumuşak agarın katılaşması için tezgah üzerinde 20 dakika bekletildikten sonra, plakların oluşumu için 37°C'de bir gece inkübe edildi. Ertesi gün, plak varlığı ve özellikleri değerlendirildi.

Plak gözlenen petrilerin yüzeylerine 4 mL SM buffer döküldü ve en az 1 saat boyunca bekletildi. Petri yüzeyinden plaklar steril bir pastör pipeti ile toplanı. Tüpe aktarılan faj lizatı 5.000xg'de 3 dakika santrifüjlenerek bakteriler uzaklaştırıldı. Süpernatant enjektöre aktarılıp 0,22 µm lik fitreden geçirildi. Diğer analizler yapılmaya kadar +4 °C de muhafaza edildi (Poxleitner ve ark 2018).

2.2.10. Faj Enfektivitesi ve Faj-Konak Büyüme Dinamiklerinin Belirlenmesi

Bu çalışmada, neonatal ishalleri buzağılardan izole edilen patojenik *E. coli* suşları ile kolifajların in vitro faj adsorpsiyon kinetiği, faj büyümesi ve bakteriyel lizis dinamikleri incelendi. Bakteriyel model olarak, buzağı ishallerinde ülkemizde en sık izole edilen *E. coli* patotipleri arasında yer alan beş farklı suş kullanıldı. Tüm fajlar MOI 1 (Multiplicity of Infection) seviyesinde test edildi. Yüksek litik aktivite gösteren fajlar seçilerek üç farklı MOI (0,1,10) seviyesinde teröpotik kullanıma uygun etkinlikleri belirlendi.

Deneylerde, *E. coli* suşlarının bir gecelik kültürleri kullanıldı ve hücre konsantrasyonu yaklaşık 10^8 CFU/ml olacak şekilde standardize edildi. Fajların bakteriyel üreme üzerindeki inhibisyonu broth ortamında değerlendirildi. Bakteri kültürleri LB broth içerisinde, faj lizatları ise SM buffer içerisinde seyreltilerek 10, 1 ve 10^{-1} başlangıç MOI seviyeleri elde edildi. Yüksek seviyede bakteri inhibisyonu gösteren fajlar seçildi ve terapötik kullanıma uygun etkinliğin belirlenebilmesi için üç farklı MOI düzeyinde testler gerçekleştirildi.

MOI, bir fajın bir bakteri popülasyonuna uygulanma oranını ifade eder ve bir bakteriyel hücre başına düşen faj partikülü sayısını belirtir. MOI hesaplaması aşağıdaki formüle göre yapılmıştır. Faj partikül sayısı titre ile belirlenmiştir.

$$\text{MOI} = (\text{Faj partikül sayısı}) / (\text{Bakteri hücre sayısı})$$

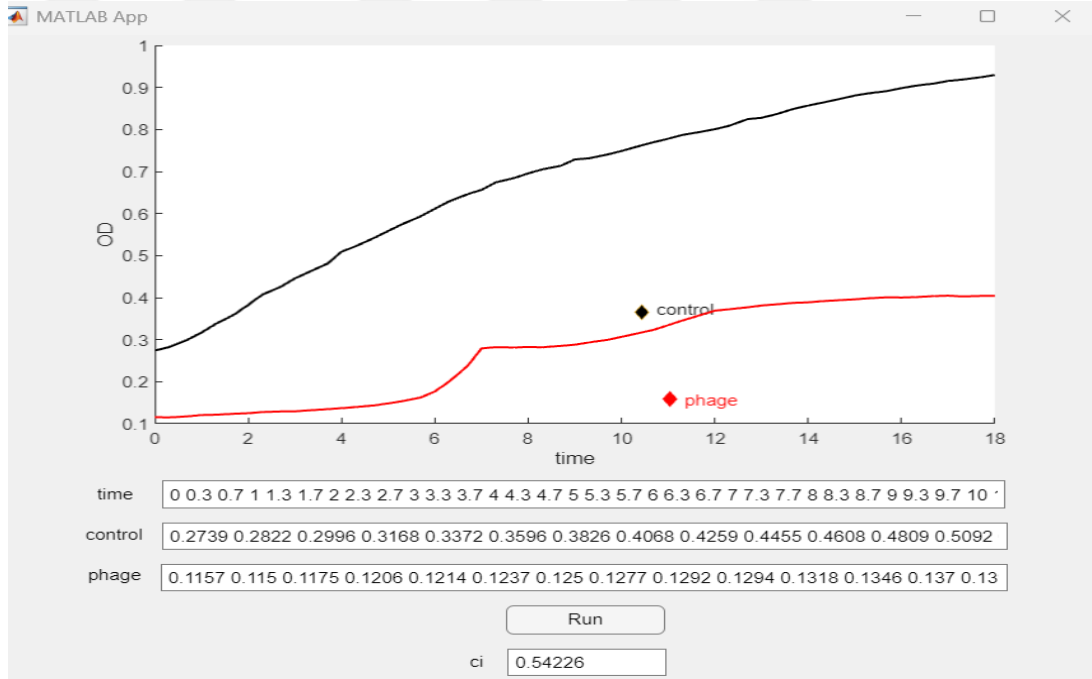
Bakteri büyüme inhibisyonu eğrilerinin oluşturulması için 96 kuyulu pleytler kullanıldı ve her kuyucuk 200 µl çalışma hacminde hazırlandı. Her pleytte kontrol olarak faj içermeyen bakteri kültürü ve bakteri içermeyen faj kültürü kuyucukları hazırlandı. Bakteri kültürlerinden 180 µl dağıtıldı ve faj lizatından 20 µl eklendi (Sorensen ve ark 2021).

Optik yoğunluk ölçümleri spektrofotometre cihazı (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific) ve SkanIt (v70.2.3) yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. Ölçümler 600 nm dalga boyunda (OD_{600}), hızlı ölçüm modunda, 20 dakikalık aralıklarla 18 saat boyunca alındı. İnkübasyon 37°C'de, orta hızda sürekli çalkalama ile gerçekleştirildi.

Büyüme eğrileri OD₆₀₀ değerlerinin zamana karşı grafiğe aktarılmasıyla oluşturuldu. Veriler analiz sırasında SkanIt yazılımı, v7.0.2. yazılımında tutuldu, ardından Excel'e aktarıldı. Tüm deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

2.2.11. Faj Etkinliği ve Virulensinin Değerlendirilmesi

Faj-konak büyüme dinamikleri, deney süresince alınan ölçümler doğrultusunda değerlendirildi. Elde edilen veriler kullanılarak faj-bakteri etkileşimlerinin zamansal profili oluşturuldu. Verilerin analizi, Hosseini ve ark. (2024) tarafından geliştirilen CI metrik sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. Bu sistem, bakteriyel büyüme eğrilerindeki eğilimlere ve zaman içindeki OD değişimlerine duyarlı bir analiz yöntemi olarak kullanıldı. Veriler Centroid İndeks Calculator Software kullanılarak hesaplandı (<https://github.com/navahs/Centroid-Index-Calculator.git>).



Şekil 4. Faj-*E. coli* enfeksiyonu Centroid İndeks analizi

Bakteriyel büyüme eğrisi, zaman içinde bakteri popülasyonundaki değişimleri gösteren latent faz (başlangıç), logaritmik büyüme fazı, durağan faz (plato) ve ölüm fazı olmak üzere dört temel fazdan oluşmaktadır. Metrik sistemde kullanılan sentroid kavramı, bakteriyel büyüme eğrisinin kütle merkezini temsil eden varsayımsal bir noktadır. Bu nokta bakteri popülasyonu yoğunluklarının zaman içindeki dağılımındaki

değişimleri özetlemektedir ve Şekil 5' de gösterilmiştir. Centroid analizi, faj tedavisine yanıt olarak bakteri popülasyonunun genel büyüme dinamiklerini tek bir değer olarak sunmaktadır. Bu yaklaşım, geometrik bir nesnenin denge noktasına benzer şekilde, büyüme eğrisinin karakteristik özelliklerini nicel olarak değerlendirmeye olanak sağlamaktadır (Hosseini ve ark 2024).

Bakteriyel büyüme eğrilerinin analizinde ideal bir faj enfeksiyonunda CI değeri 0-1 arasında olmalıdır (Hosseini ve ark 2024). Verilerin değerlendirilmesinde aşağıdaki kriterler esas alınmıştır:

CI = 1: Bakteriyofajın hedef bakteri türünü tamamen inhibe ettiğini ve maksimum etkinlikte olduğunu göstermektedir.

CI = 0: Bakteriyofajın hedef bakteri üzerinde herhangi bir etkisinin bulunmadığını ve bakteriyel büyümenin devam ettiğini ifade etmektedir.

CI <0: Faj uygulamasının bakteriyel büyümeyi teşvik ettiğini veya enfeksiyon inhibisyonunun başarısız olduğunu göstermektedir.

2.2.12. Fajların Farklı Sıcaklık ve pH Ortam Şartlarına Dayanıklılıkları

Fajların termal stabilitesi, 60 dakika boyunca 30, 40, 50, 60, 70 °C gibi farklı sıcaklıklara maruz bırakılan 10^8 PFU/mL faj lizatları kullanılarak test edilmiştir. Thermal cycler cihazında 1 saat inkübasyondan sonra, faj aktivitesi spot test yöntemi kullanılarak belirlendi.

Fajların pH stabilite ölçümleri, LB broth'un pH değerlerinde ayarlanarak gerçekleştirildi. HCl veya NaOH ile pH değerini 3, 4.5, 6.3, 7, 8.5 ve 10'a ayarlandı. Tüm bakteri azalma eğrileri, 200 µl çalışma hacmine sahip 96 kuyulu pleytler kullanılarak oluşturuldu. Kontrol deneyleri için her bir pH değeri için faj içermeyen *E.coli* bakteri kültürü ve bakteri içermeyen faj kültürü dahil edildi. Optik yoğunluk 600 nm dalga boyunda ve veriler SkanIt yazılımı, v7.0.2. kullanılarak kaydedildi.

Optik yoğunluk ölçümleri spektrofotometre cihazı (Thermo Fisher Scientific Multiskan GO Mikropleyt Spektrofotometre) OD₆₀₀ hızlı ölçüm modunda, yol uzunluğu düzeltilmesi ve geçirgenlik hesaplamaları yapılmadan gerçekleştirildi. Faj ve bakteri inokulasyonunun hemen ardından başlayan ölçümler, 18 saat boyunca 20

dakikalık düzenli aralıklarla tekrarlandı. İnkübasyon 37°C'de, orta hızda sürekli çalkalama ile gerçekleştirildi. Tüm deneyler üç tekrar olacak şekilde yapıldı. Spektrofotometrik veriler SkanIt yazılımı (v7.0.2) kullanılarak kaydedildi ve büyüme eğrileri olarak görselleştirildi.

2.2.13. Fajların Morfolojik Karakterizasyonu

Bu çalışmada izole edilen kolifajların morfolojisi transmisyon elektron mikroskobu (TEM) kullanılarak incelendi. Yüksek titreli faj lizatından ($\sim 10^{10}$ titrede) 5 µl alınarak 400 mesh karbon kaplı ızgaralara adsorbe edildi, yıkama işlemi yapıldı ve ardından 5 µl Uranil Asetat boyası (%1 w/v) ile negatif boyandı. Hazırlanan preparat Orta Doğu Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarı Elektron Mikroskop biriminde görüntülendi. Fajların FEI Tecnai G² Spirit transmisyon elektron mikroskobu (FEI Company, Hillsboro, Oregon, ABD) kullanılarak görüntüleme işlemi gerçekleştirildi (Aziz ve ark 2018).

2.2.14. Fajların Genomik DNA Ekstraksiyonu

Faj lizatlarından DNA ekstraksiyonu, QIAamp Pathogen Mini Kit (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılarak gerçekleştirildi. Uygulanan işlem basamakları aşağıda belirtilmiştir.

1. Faj lizatlarından 400 µL alınarak mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
2. Tüplere 5 µL DNaz ve RNaz enzim karışımı eklendi ve numuneler 37 °C'de 60 dakika inkübe edildi.
3. Enzimlerin inaktivasyonu amacıyla tüpler 65 °C'de 10 dakika inkübe edildi.
4. Numunelere 40 µL Proteinaz K eklendi ve karışım 10 saniye süreyle vortekslenerek homojenize edildi.
5. Karışım 56 °C'de 10 dakika inkübe edildi.
6. Numunelere 200 µL Tampon APL2 eklendi ve vorteksle 30 saniye karıştırıldı.
7. Karışım 70 °C'de 10 dakika inkübe edildi, ardından lizatlara 300 µL etanol (%96-100) eklenerek vorteksle 15-30 saniye karıştırıldı.
8. Karışımdan 600 µL alınarak QIAamp UCP Mini Spin kolona yüklendi ve 6000 x g (8000 rpm) hızında 1 dakika santrifüj edildi ve filtrat uzaklaştırıldı.

9. Kolona 600 µL Tampon APW1 eklendi ve 6000 x g (8000 rpm) hızında 1 dakika santrifüj edildi. Filtrat atıldı.
10. Kolona 750 µL Tampon APW2 eklendi ve 20.000 x g (14.000 rpm) hızında 3 dakika santrifüj edildi. QIAamp UCP Mini Spin kolon, yeni bir 2 mL toplama tüpüne yerleştirildi ve kapağı açık olarak 56 °C'de 3 dakika inkübe edilerek membranın tamamen kuruması sağlandı.
11. Kolon, temiz bir 1,5 mL elüsyon tüpüne yerleştirilmiş ve membran üzerine doğrudan 50 µL Tampon AVE eklendi. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi.
12. DNA'yı elüe etmek için tüpler 20.000 x g (14.000 rpm) hızında 1 dakika santrifüj edildi.
13. Elde edilen DNA, moleküler çalışmalar gerçekleştirilinceye kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

2.2.15. Fajların PZR ile Moleküler Karakterizasyonu

Proje çalışmaları kapsamında izole edilen fajların aile düzeyinde moleküler karakterizasyonunu gerçekleştirmek amacıyla, Tablo 4'de belirtilen primer dizileri kullanılarak PZR analizleri gerçekleştirildi. Analizler, FIREPol® Master Mix (Solis BioDyne, Estonya) kullanılarak, üretici firmanın protokolü modifiye edilerek uygulandı. PZR reaksiyonu için hazırlanan karışım ve termal döngü programı aşağıdaki Tablo 9' da belirtildiği şekilde yapıldı.

Tablo 8. PZR uygulaması için kullanılan master mix karışımı

Bileşen	Hacim (µl)
Moleküler Saf Su	13
FIREPol® Master Mix (5x)	4
Forward Primer (10 µM)	0,5
Reverse Primer (10 µM)	0,5
Kalıp DNA	2
Toplam	20

Tablo 9. Faj PZR için kullanılan amplifikasyon protokolü

	Termal Döngü		
Başlangıç Denatürasyonu	95 °C	3 dk	1 X
Denatürasyon	95 °C	15 sn	
Bağlanma	53-55 °C	30 sn	40 X
Uzama	72 °C	40 sn	
Son Uzama	72 °C	5 dk.	1X

Her bir örneğin PZR sonrasında çoğaltılan spesifik DNA bölgelerini görüntüleyebilmek amacıyla agar jel elektroforez sistemi kullanıldı. Bu amaçla, 0,5xTBE tamponu içinde % 1,5 oranında hazırlanan agarose mikrodalga fırında çözdürüldü. 65–70 °C'ye kadar soğutulan agarose jel içine nükleik asit boyası ilave edilerek uygun ısıya düştükten sonra tarak yerleştirilmiş jel taşıyıcısına döküldü ve donması bekledi. Ardından, jel 0,5X TBE tamponu bulunan jel tankına konularak, her bir kuyucuğa jel yükleme boyası ile karıştırılan PZR ürünleri sırasıyla yüklendi. Jelde 60 dakika boyunca DNA bantlarının göçü sağlandı. Örneklerin pozitifliğini değerlendirmek için jel Transilluminatör yardımıyla UV ışığı altında jel görüntülenmesi yapıldı.

2.2.16. RAPD-PZR

Faj polimorfik DNA'larının rastgele amplifikasyonu, Gutierrez ve ark (2011)'nın belirttiği metoda göre gerçekleştirildi. Bu amaçla, tabloda belirtilen primer dizileri kullanılarak PZR analizleri yapıldı. Analizler, ThermoTaq DNA Polimeraz (10X) ile üretici firmanın protokolü modifiye edilerek uygulandı (Aziz ve ark 2018). PZR reaksiyonu için uygulanacak protokol ve termal döngü programı aşağıda belirtildi:

Tablo 10. RAPD-PZR için kullanılan reaksiyon karışımı

Bileşen	Hacim (µl)
Moleküler Saf Su	19,2
10× Reaksiyon Tamponu	3,0
MgCl ₂ (25 mM)	2,4
dNTP Karışımı	0,8
Primer (P1 veya P2)	0,8
Taq DNA Polimeraz Enzimi	0,8
DMSO	1
Kalıp DNA	2
Toplam	30,0

Tablo 11.RAPD-PZR için kullanılan amplifikasyon protokolü

	Termal Döngü		
Başlangıç Denatürasyonu	95 °C	3 dk	1 X
Denatürasyon	94 °C	45 sn	
Bağlanma	30 °C	120 sn	4 X
Uzama	72 °C	60 sn	
Denatürasyon	94 °C	5 sn	
Bağlanma	36°C	30 sn	26X
Uzama	72 °C	30 sn*	
Son Uzama	75 °C		1X

*Her döngüde 1 saniye artırıldı.

Her bir örneğin PZR sonrasında çoğaltılan spesifik DNA bölgelerini görüntülemek amacıyla agaroz jel elektroforez sistemi kullanıldı. Bu amaçla, %0,5 TBE tamponu içinde %1,5 oranında hazırlanan agaroz, mikrodalga fırında çözündürüldü. Agaroz jel 65–70 °C'ye kadar soğutulduktan sonra içerisine jel boyası ilave edildi.

Uygun ısıya düştükten sonra, tarak yerleştirilmiş jel taşıyıcısına dökülerek ve donması bekledi. Ardından, jel %0,5X TBE tamponu bulunan jel tankına konuldu. Her bir kuyucuğa 1 µl 6X jel yükleme boyası ile karıştırılan 5 µl PZR ürünleri sırasıyla yüklendi. Elektroforez işleminde 60 dakika boyunca jelde DNA bantlarının göçü sağlandı. Örneklerin pozitifliğini değerlendirmek için jel, transillüminatör yardımıyla UV ışığı altında görüntülendi.

2.2.17. Faj Genom Sekans Analizi ve Veri Analizi

Konak aralığı, litik aktivite ve çoğalma kinetiği parametreleri açısından yüksek aktivite gösteren 5 faj (W1, W1/9, W8, K1 ve T1/2) izolatına ait DNA örnekleri Oxford Nanopore teknolojisi kullanılarak dizilendi. Tüm genom sekans işlemi Massive Bioinformatics Ar-Ge Tekno firmasından hizmet alımı ile gerçekleştirildi.

Elde edilmiş olan 5 adet bakteriyofaj verisi flye (versiyon 2.9.4-b1799) aracı kullanılarak de nova assembly işlemine tabii tutuldu (Kolmogorov ve ark 2019). Flye ile yapılan assembly sonrasında, tüm genom olarak elde edilen fajlar, NCBI'a ait nt veritabanında Blast kullanılarak en yakın olan türleri tespit edildi (Altschul ve ark 1990). En yakın genoma olan polimorfizmleri tespit etmek için Geneious Prime uygulaması içerisinde minimap2 (v2.24) aracı Oxford nanopore parametrelerine uygun kullanılarak hizalama yapıldı (Li 2018).

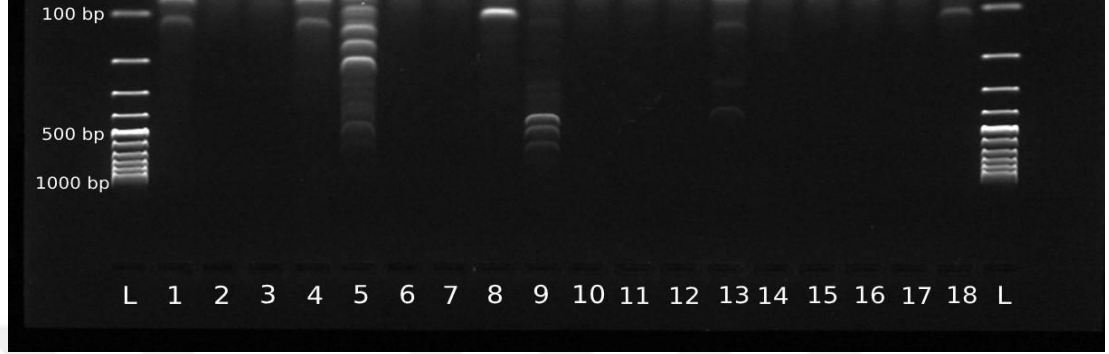
Elde edilen tüm genomların yapı ve fonksiyonlarına dair açıklamaları (ORF ve tahmini proteinler, transkripsiyon terminatörleri, tRNA ve tmRNA genleri, anti-CRISPR proteinleri, virölans faktörleri, antimikrobiyal direnç genleri, transmembran proteinler) içeren genom anotasyonu PHATEST, PhageScope, Phorakka araçları ile gerçekleştirildi (Bouras ve ark 2023, Wishart ve ark 2023, Wang ve ark 2024). Genom haritalarının oluşturulması ve görselleştirilmesinde Proksee kullanıldı (Grant ve ark 2023). NGS dizilerinin çoklu genom hizalaması Blast kullanılarak gerçekleştirildi. Bilinen referans kolifajlar, ICTV veri tabanında ve NCBI veri tabanında (Kasım 2024 verileri) bulunan tam genomlara sahip izolatlarla sınırlandırıldı. Fajların genom anotasyonları, en yakın yaklaşık 44.000 bp uzunluğundaki faj genomları üzerinde gerçekleştirildi.



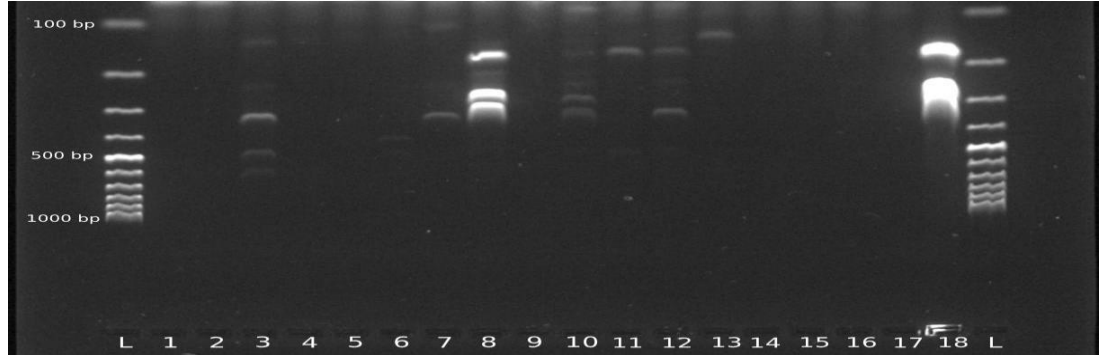
3. BULGULAR

3.1. *E. coli* İzolasyonu ve Virulens Gen Dağılımı

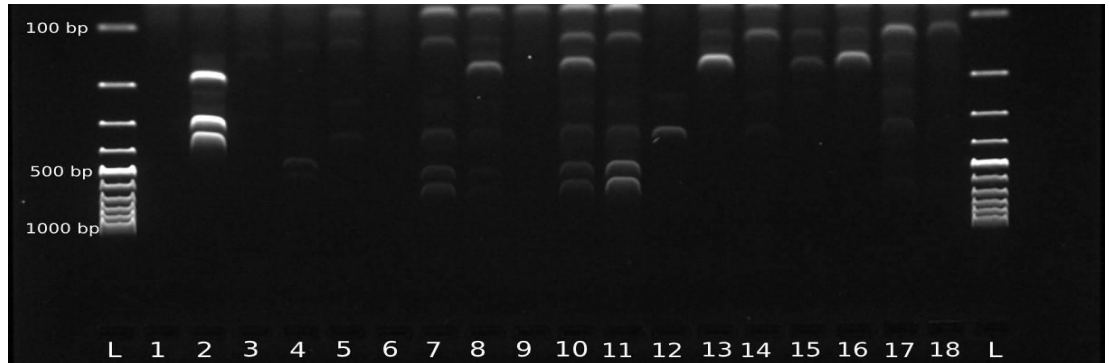
Konya ve çevresinde yer alan çiftliklerde neonatal ishalli buzağılardan alınan 110 adet rektal svap örneğinden 102 adet *E. coli* suşu izole edildi.



Şekil 5. *E. coli* virulens genleri multipleks PZR jel görüntüsü L:3 kb ladder Örnek 5'te pozitif kontrol olarak *E. coli* O157:H7 (Stx1+Stx2) suşu, örnek 6'da ise negatif kontrol olarak steril su kullanıldı. Jel görüntüsünde 1, 4, 8, 9, 13 ve 18 numaralı örneklerde ise virülens geni pozitif izolatlar karşılık gelen bantlar gözlemlendi.



Şekil 6. *E. coli* virülens genleri multipleks PZR jel görüntüsü. L: 3 kb DNA ladder. Jel görüntüsünde 3, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13 ve 18 numaralı örneklerde, virülens genine ait pozitif izolatlar karşılık gelen bantlar gözlemlendi.



Şekil 7. *E. coli* virulens genleri multipleks PZR jel görüntüsü L:3 kb ladder - 2, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 ve 17 numaralı örneklerde, virülens genine ait pozitif izolatlar karşılık gelen bantlar gözlemlendi.

Aşağıdaki tablo, multipleks PZR ile tespit edilen virulens genlerinin dağılımını göstermektedir:

Tablo 12. *E. coli* suşlarının virulens gen dağılımı.

<i>E. coli</i> Suş No	Multipleks PZR ile Tespit Edilen Virulens Genleri
2	Sta+K99
5	Stx1+Stx2
6	Stx1+Stx2
10	Stx2
12	Stx2
15	Sta+K99+F41
16	Sta
20	Stx1
21	Stx1
24	Stx1
25	Stx1
27	Sta+Stx1
29	Stx1
31	Sta
32	Stx1
33	Stx1
34	Stx1
35	Stx1
36	Sta+Stx1
37	Stx1
38	Stx1
39	Sta+K99
40	Sta+K99
41	Stx1
43	Sta+Stx1
45	Sta+K99
48	Stx2+K99
51	Intimin
52	K99+Stx2
53	Sta+K99
55	Sta+K99
56	Sta
57	Sta+Intimin+F41
58	Stx2
64	Sta+K99
81	Stx2
84	Stx2
85	Stx2+Sta+Intimin
88	Stx2
91	Sta+Stx2
97	Stx2
99	Stx2+Sta
100	Intimin
102	Stx2+K99+Intimin+Stx1

Araştırma kapsamında incelenen neonatal ishalleri buzağılardan izole edilen *E. coli* suşlarının virülens gen profillerinin analizi, patogeneze rol oynayan genlerin prevalansı ve kombinasyonları hakkında kapsamlı veriler sağladı. İncelemeye alınan toplam 102 *E. coli* izolatının moleküler karakterizasyonu sonucunda, 44 suşta (%43,1) en az bir virülens geninin varlığı tespit edildi.

Virülens determinantlarının dağılımı incelendiğinde, Sta ve Shiga toksin genleri (Stx1 ve Stx2) predominant olarak saptandı. Sta geni %17,6, Stx1 geni %17,6 ve Stx2 geni %14,7 oranında tespit edildi. Adezyon faktörlerinden K99 (F5) fimbrial antijeni %10,8, eae geni %4,9 ve F41 fimbrial antijeninin %2 prevalansa sahip olduğu belirlendi.

Patojenite açısından değerlendirildiğinde, STEC izolatları %29,4 oranı ile predominant patotip olarak belirlendi. Bunu %10,8 oranı ile ETEC suşları ve %2 oranı ile EPEC suşları izledi.

Çalışmada dikkat çeken önemli bir bulgu, farklı patotiplere ait virülens genlerini eş zamanlı olarak taşıyan hibrit suşların varlığıdır. Toplam 10 hibrit suş tespit edildi, bunların 7'si STEC/ETEC, 1'i ETEC/EPEC ve 2'si STEC/ETEC/EPEC kombinasyonuna sahip olarak belirlendi.

3.2. Faj İzolasyon Bulguları

İncelenen faj kaynaklarından toplam 27 faj izole edildi. Elde edilen izolasyonlar, kloakal svap örneklerinden 6 faj, kanatlı işletmesi altlık örneklerinden 6 faj, koyun işletmesi altlık örneklerinden 4 faj, sığır işletmesi gübre çukurlarından alınan örneklerden 4 faj, işletme atık suyundan alınan örneklerden 1 faj ve KOSKİ'den alınan atık su örneklerinden 5 faj ve rektal svap örneğinden 1 faj şeklinde dağılım göstermiştir.

İzole edilen 27 adet fajın, panelde yer alan 5 farklı *E. coli* suşuna karşı litik aktivitesi spot test ile belirlendi. Spot test sonucunda petri de şeffaf zon görülen faj örnekleri ileri analizler için saflaştırıldı ve çoğaltıldı. Sonuçlar Tablo12'de test edilen her enteropatojenik EPEC, ETEC veya EHEC *E. coli* suşunun koleksiyondaki en az bir, çoğu durumda ise birkaç veya birçok bakteriyofaj tarafından enfekte edildiğini

göstermektedir. Tablo 11’ de her bir fajın izolasyon kaynağı ve konakçı *E. coli* suşları listelendi:

Tablo 13. İzole edilen faj kaynakları ve konakçı *E.coli* suşları

	Faj Numara	İzolasyon Kaynağı	Konakçı <i>E. coli</i> Suşları
1	W1-9	Atık su	EC
2	T1/2	Kanathı altlık	EC 0157H7
3	K-1	Sığır işletmesi Gübre Çukuru	0157H7 EC
4	K-2	Sığır işletmesi Gübre Çukuru	11A
5	K-3	Sığır işletmesi Gübre Çukuru	0157H7
6	KS-1	Kloakal swap	EC 11A
7	KS-2	Kloakal swap	EC 11A 0157H7
8	KS-3	Kloakal swap	11A
9	KS-4	Kloakal swap	0157H7
10	KS-E57	Kloakal swap	E-57
11	H-1	Koyun işletmesi altlık	EC
12	H-2	Koyun işletmesi altlık	0157H7
13	H-3	Koyun işletmesi altlık	0157H7
14	H-4	Koyun işletmesi altlık	0157H7
15	Fak-2	Kanathı altlık	0157H7, E-15
16	Bİ	İshalli buzağı dışkı örneği	0157H7, 11A
17	LÇ-1	Sığır işletmesi Gübre Çukuru	11A 0157H7
18	Ç-1	Sığır işletmesi atık su	0157H7
19	T2	Kanathı Altlık	EC
20	W-1	Atık su	E-15 0157H7
21	W-2	Atık su	EC E-15
22	W-3	Atık su	E-15 0157H7
23	W-8	Atık su	E-57
24	KH	Kanathı Altlık	0157H7
25	KS-5	Kloakal swap	0157H7
26	Fak-1	Kanathı altlık	0157H7
27	T-3	Kanathı altlık	0157H7

EC Aşı suşu: (O101: H-K99+F41+), 11A Aşı suşu: (O?H-K99: F(Y))

E-15: (Sta+F41+Intımın), E-57: (Sta+F41+K99), 0157H7 Referans suş:(Stx1+Stx2)

İzole edilen 27 adet fajın farklı *E.coli* suşlarını enfekte etme oranı O157:H7 %66,7, EC %29,6, 11A %22,2, E-15 %14,8, E-57 %7,4 olarak tespit edildi. Fajların büyük çoğunluğu tek bir *E.coli* suşunu enfekte ettiği, 9 fajın ise iki farklı *E.coli* suşunu enfekte etme yeteneğine sahip olduğu belirlendi.

Elde edilen verilere göre, izole edilen kolifajlar içinde *E. coli* O157:H7 suşuna karşı enfeksiyon oranının en yüksek olduğu, *E. coli* E-57 suşunun ise en düşük enfeksiyon oranına sahip olduğu gözlemlendi. Bu sonuçlar, çalışmada test edilen fajların *E.coli* O157:H7 suşuna göre daha yüksek bir etki potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir.

3.3. Konakçı Aralığı

Tablo 14’de izole edilen kolifajların konakçı aralıkları belirtildi.

Tablo 14. Fajların litik aktivite gösterdiği *E.coli* patotipleri

Faj	ETEC-1	ETEC-2	ETEC-3	STEC	EPEC+ETEC
W1-9	+	-	-	-	-
T1/2	+	-	-	+	-
K-1	+	-	-	+	-
K-2	-	+	-	-	-
K-3	-	-	-	+	-
KS-1	+	+	-	-	-
KS-2	-	+	-	+	-
KS-3	+	+	-	+	-
KS-4	-	-	-	+	-
KS-E57	-	-	+	-	-
H-1	+	-	-	-	-
H-2	-	-	-	+	-
H-3	-	-	-	+	-
H-4	-	-	-	+	-
Fak-2	-	-	-	+	+
Bİ	-	+	-	+	-
LÇ-1	-	+	-	+	-
Ç-1	-	-	-	+	-
T2	+	-	-	-	-
W-1	-	-	-	+	+
W-2	-	+	+	-	-
W-3	-	-	+	+	-

Tablo 14 (Devam). Fajların litik aktivite gösterdiği *E.coli* patotipleri

Faj	ETEC-1	ETEC-2	ETEC-3	STEC	EPEC+ETEC
W-8	-	-	+	-	-
KH	-	-	-	+	-
KS-5	-	-	-	+	-
Fak-1	-	-	-	+	-
T-3	-	-	-	+	-

ETEC-1:EC, ETEC-2:11A, ETEC-3: E-57, STEC: O157H7, EPEC+ETEC: E-15

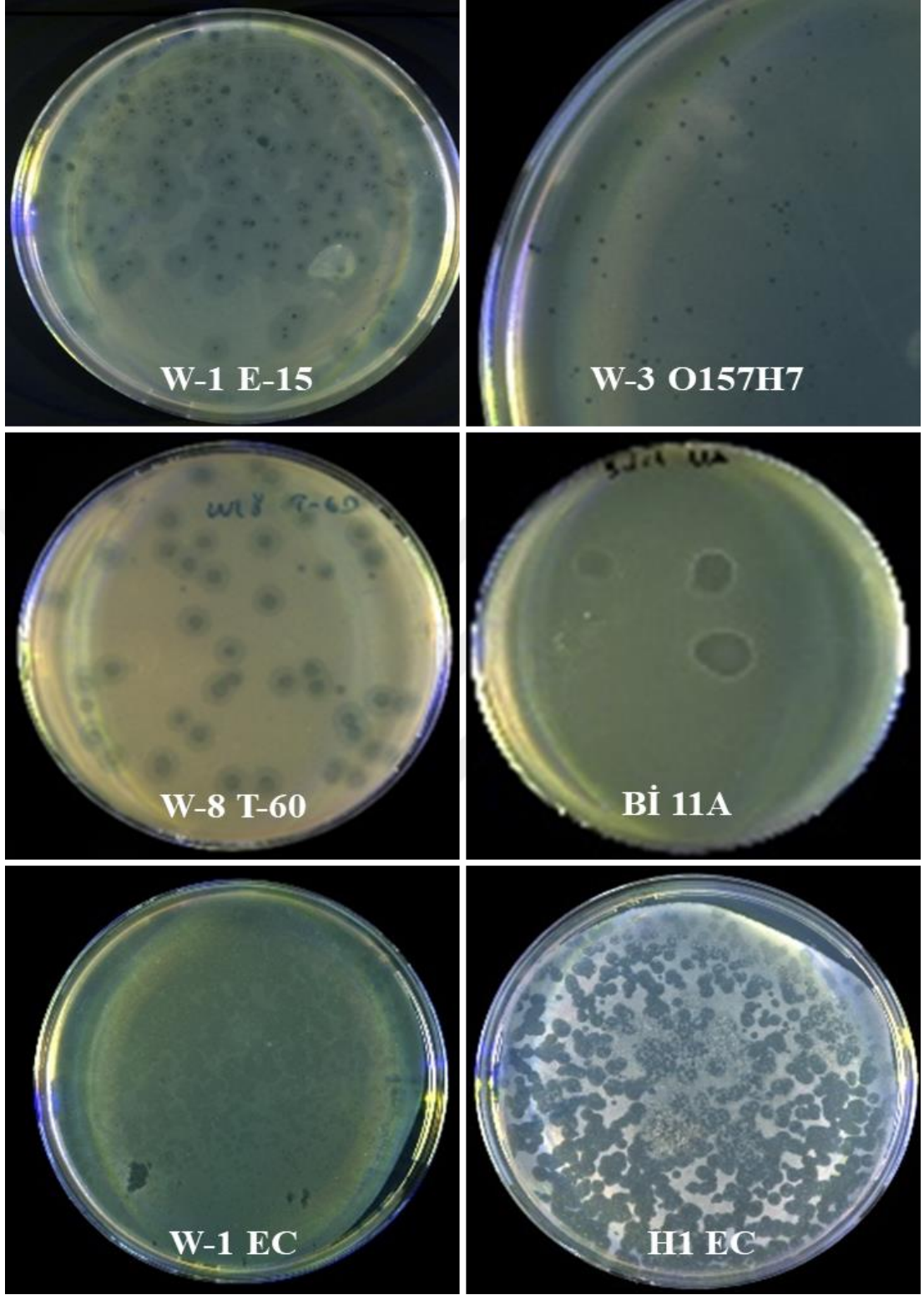
Kısaltmalar: (+) test edilen bakteriyofaj ile enfeksiyondan sonra lizis, (-) test edilen bakteriyofaj ile enfeksiyondan sonra lizis olmaması.

İzole edilen fajların %30'unun ETEC-1, %26'sının ETEC-2, %15'inin ETEC-3, %69'unun STEC patotipini ve %8'inin EPEC+ETEC patotiplerini enfekte etme yeteneğine sahip olduğu belirlendi. Ayrıca, 10 fajın birden fazla patotipi enfekte edebilme kapasitesine sahip olduğu görüldü.

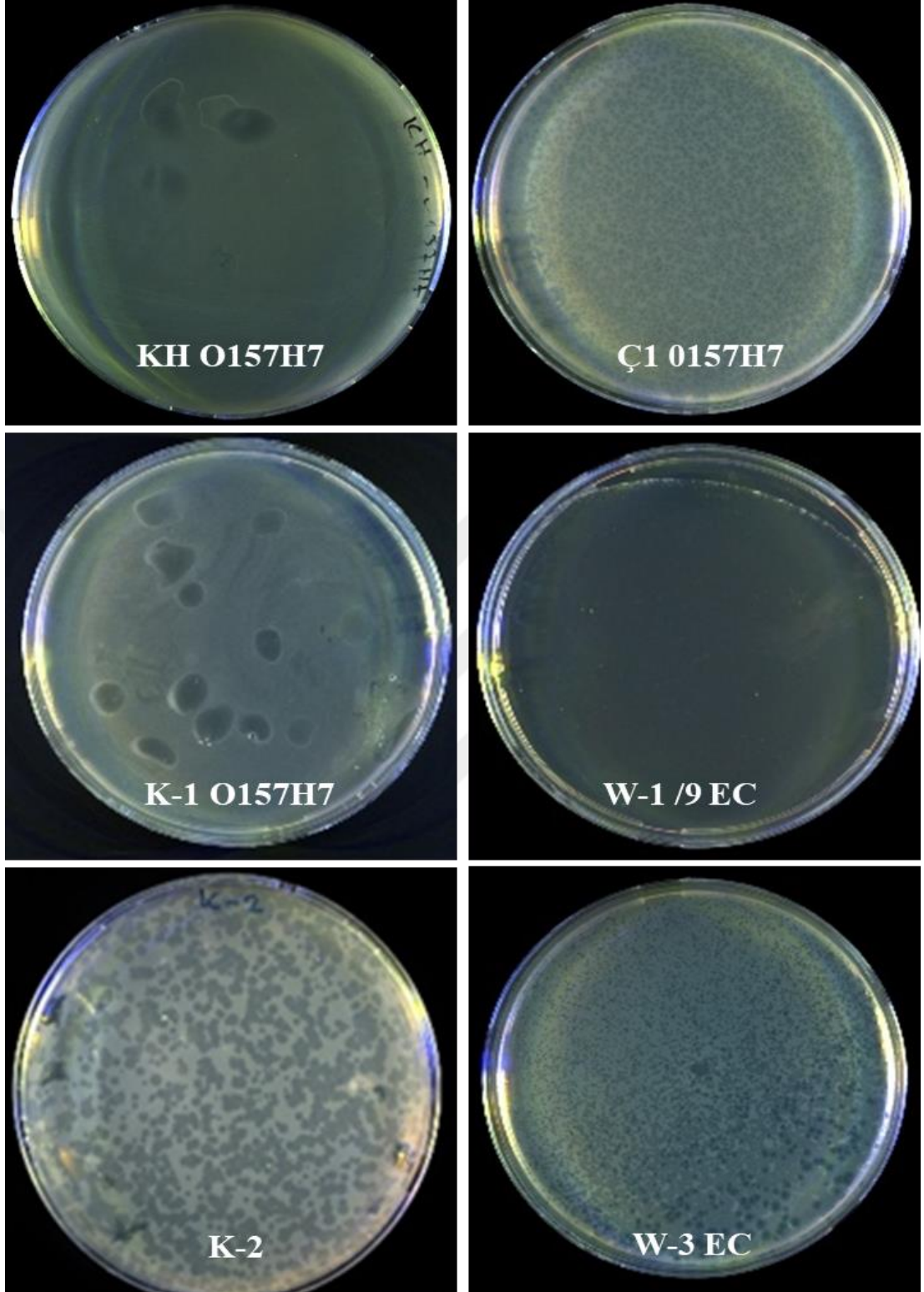
3.4. İzole Edilen Fajların Plak Morfolojileri

Çift tabakalı agar yöntemi ile çoğaltılan fajların plak morfolojileri (Şekil 8, Şekil 9, Şekil 10, Şekil 11, Şekil 12) incelendiğinde, farklı boyutlarda plaklar gözlemlendi. Farklı fajların oluşturduğu plak boyutları kayda değer farklılıklar gösterdiği görülmekte. W-2, W-8, T-2, KS E-57, K-1 ve K-2 gibi bazı fajların daha büyük plaklar oluşturduğu gözlenmiştir.

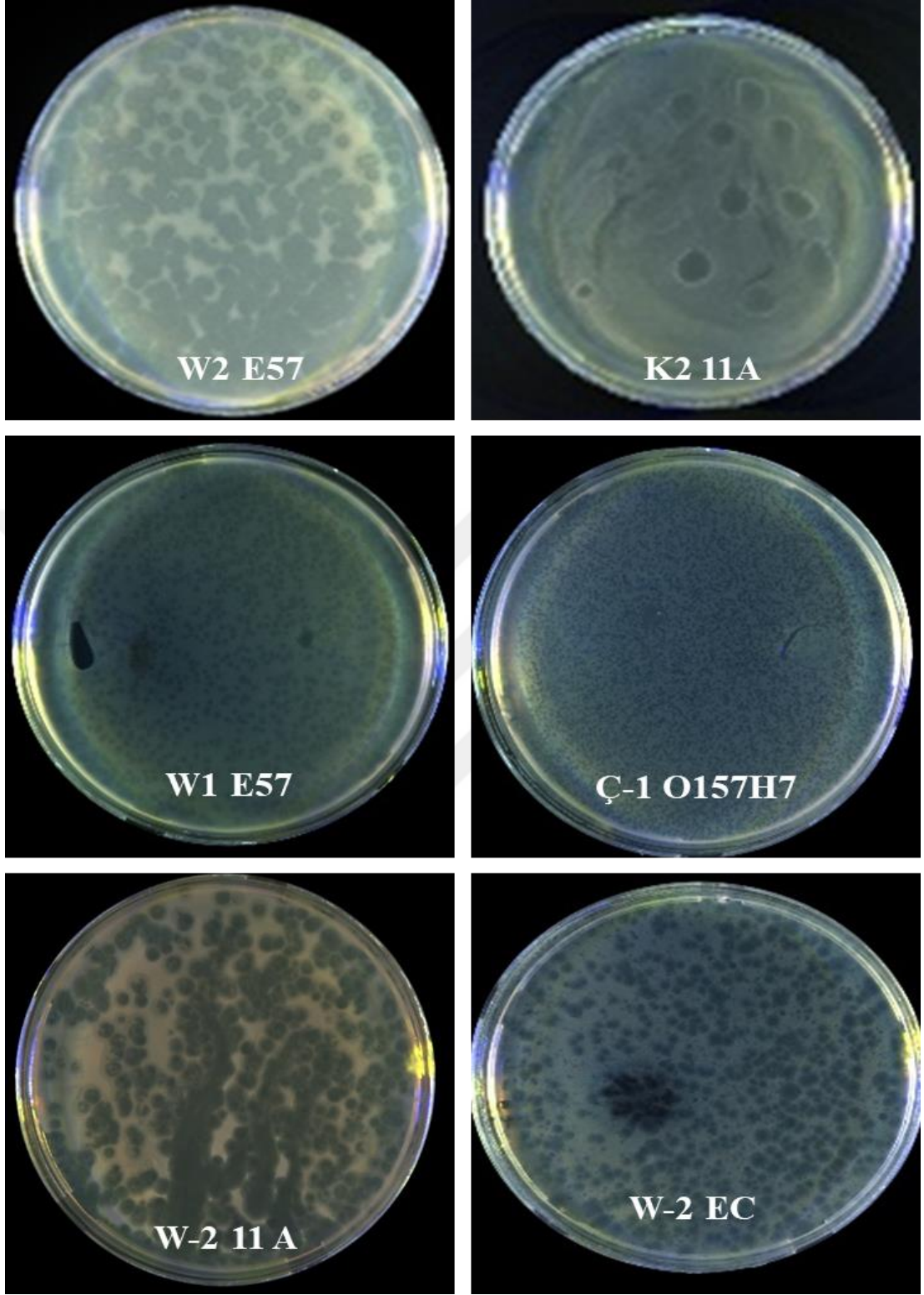
Çoğu faj, litik fajlar için tipik olan berrak plaklar oluşturdu. Bununla birlikte, *Siphoviridae* familyasına ait plakların etrafında haleler, yarı şeffaf bölgeler gözlemlendi. *Miyoviridae* fajlarında ise daha küçük zon çapına sahip plaklar görüldü.



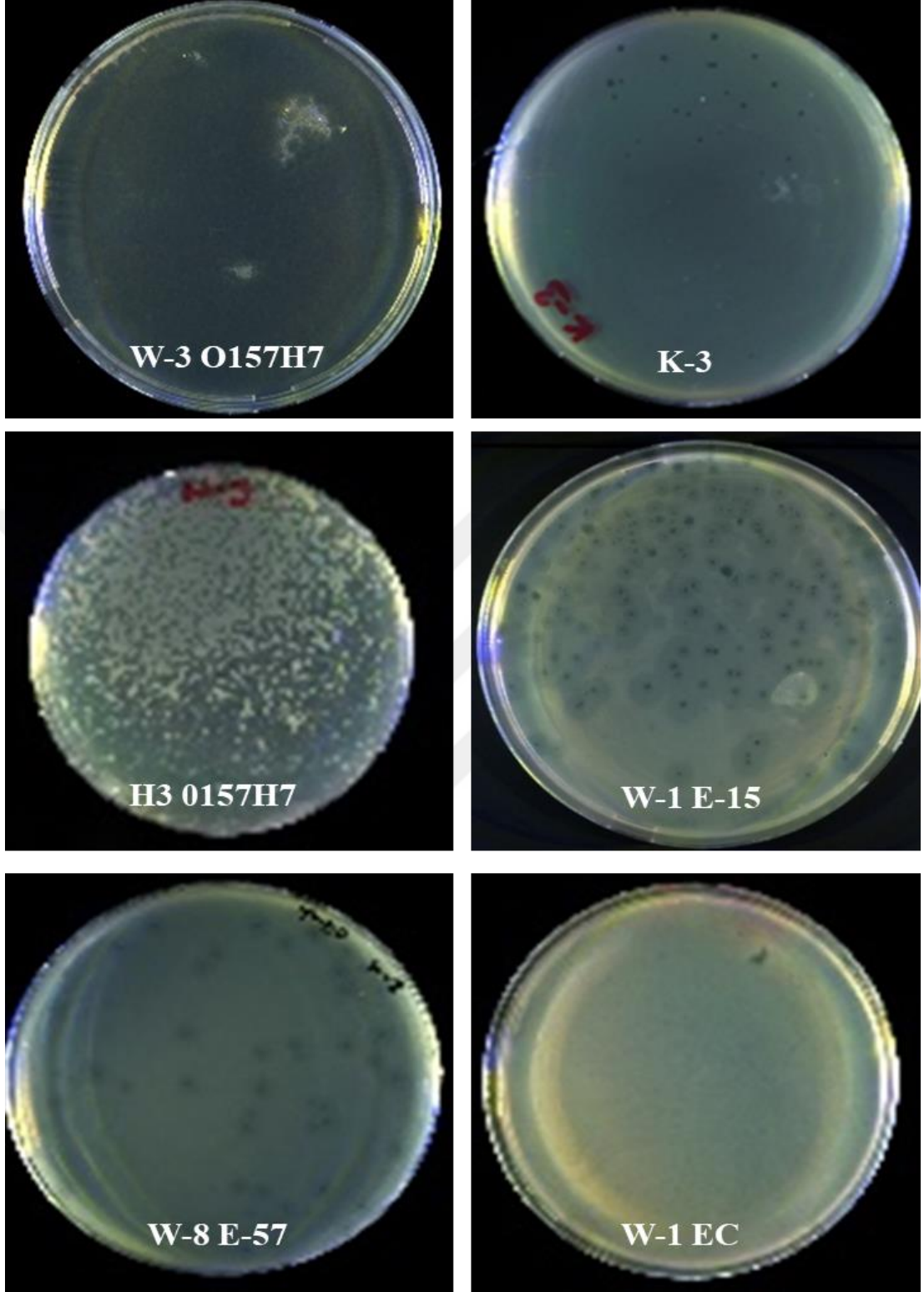
Şekil 8. Çeşitli kaynaklardan izole edilen fajların (W-1,W-3,W-8, Bİ, H-1) farklı *E. coli* suşlarını enfekte etmeleri sonucu ortaya çıkan plak morfolojileri



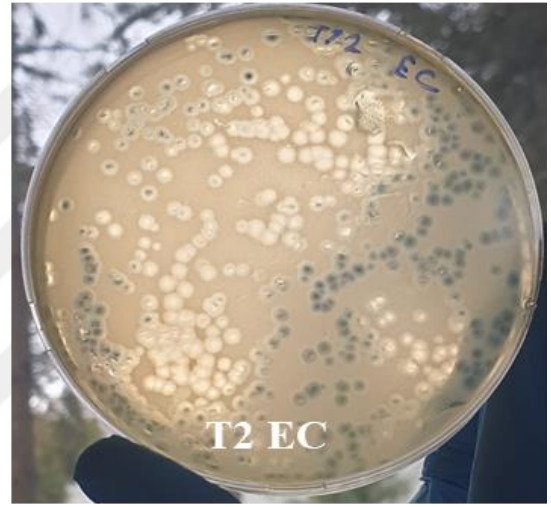
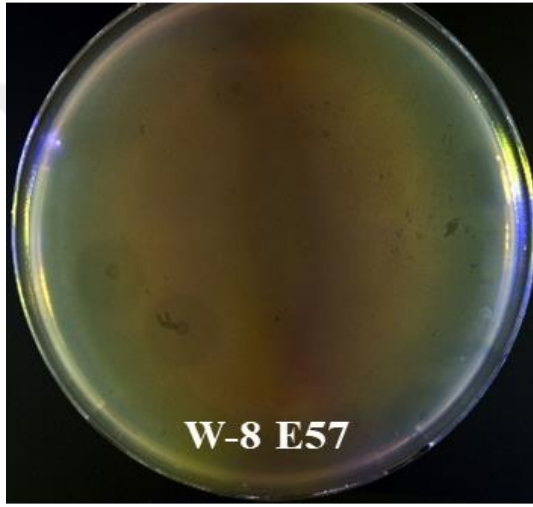
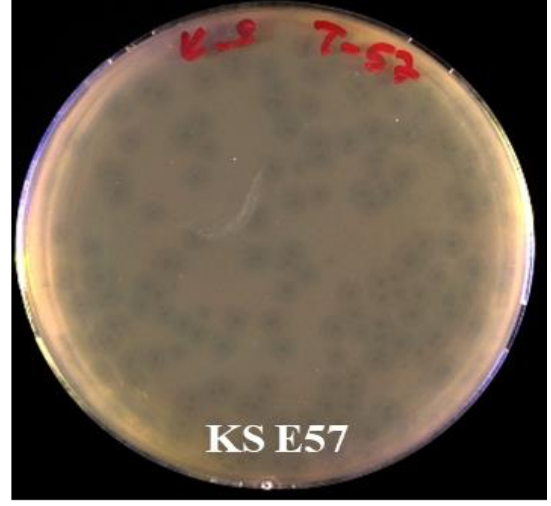
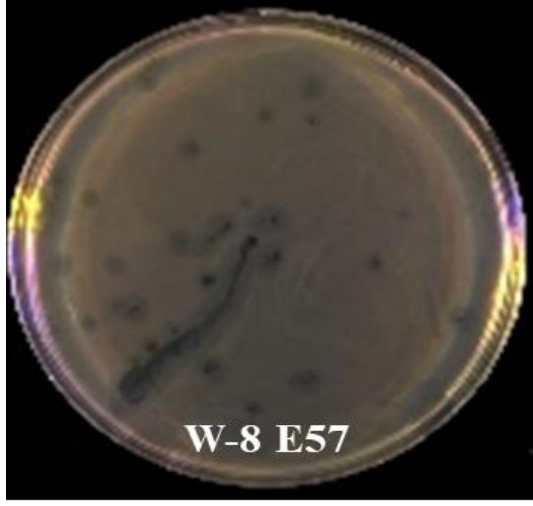
Şekil 9. Çeşitli kaynaklardan izole edilen fajların (KH, Ç-1, K-1, W-1/9, K-2, W-3) farklı *E. coli* suşlarını enfekte etmeleri sonucu ortaya çıkan plak morfolojileri



Şekil 10. Çeşitli kaynaklardan izole edilen fajların (W-1, W-2, K-2, Ç-1) farklı E. coli suşlarını enfekte etmeleri sonucu ortaya çıkan plak morfolojileri.



Şekil 11. Çeşitli kaynaklardan izole edilen fajların (W-1, W3,W-8, K-3, H-3) farklı *E. coli* suşlarını enfekte etmeleri sonucu ortaya çıkan plak morfolojileri.



Şekil 12. Çeşitli kaynaklardan izole edilen fajların (KS, W-8, T-2, Ç-1) farklı *E. coli* suşlarını enfekte etmeleri sonucu ortaya çıkan plak morfolojileri

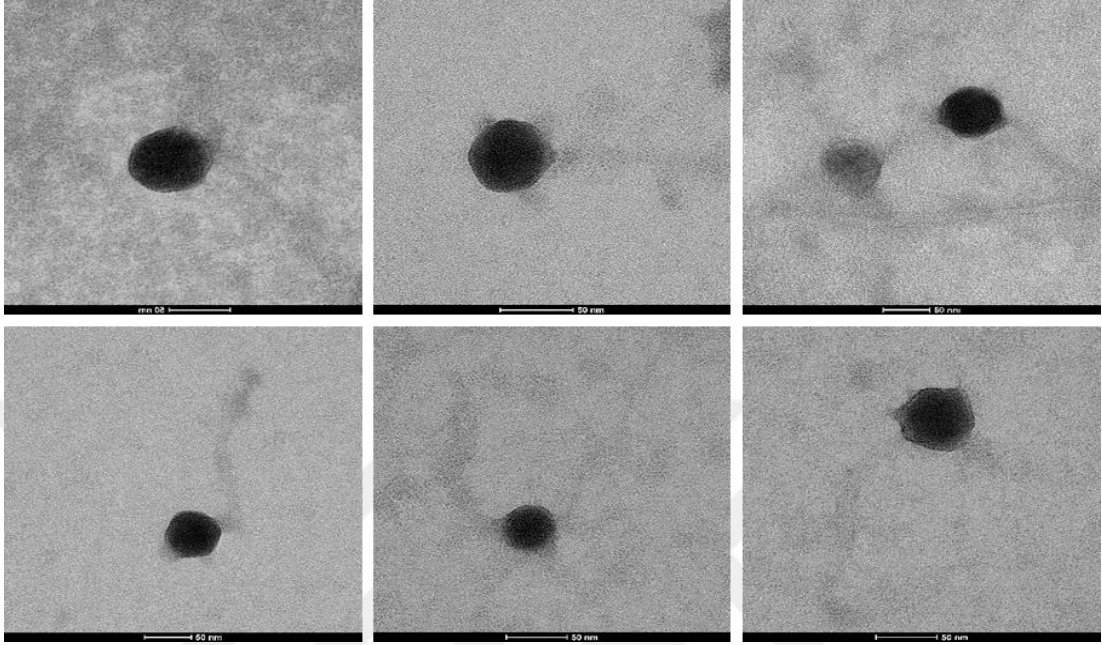
W-1, W-2, W8, KS, E-57, T-2 faj plakları, gerçek plak bölgesinden daha silik bir dış bölgeye sahipti. Depolimeraz enzimi üreten fajlarda görülen yarı saydam hale bölgesi olarak gözlemlendi.

Şekil 9' da W1/9 ve Şekil 12' de Ç1 fajlarının bakterilerin çoğalmasını tamamen inhibe ettiği bölgeler, petri yüzeyinde saydam görüntü şeklinde gözlemlendi. Bu saydam alanlar, fajlar tarafından enfekte edilen bakterilerin lizise uğradığını ve böylece çoğalamadıklarını göstermektedir. Genel olarak, W-2, W-8, T-2, KS, W-1 ve H-1 fajları diğerlerine göre daha büyük plaklar ürettiği tespit edildi.

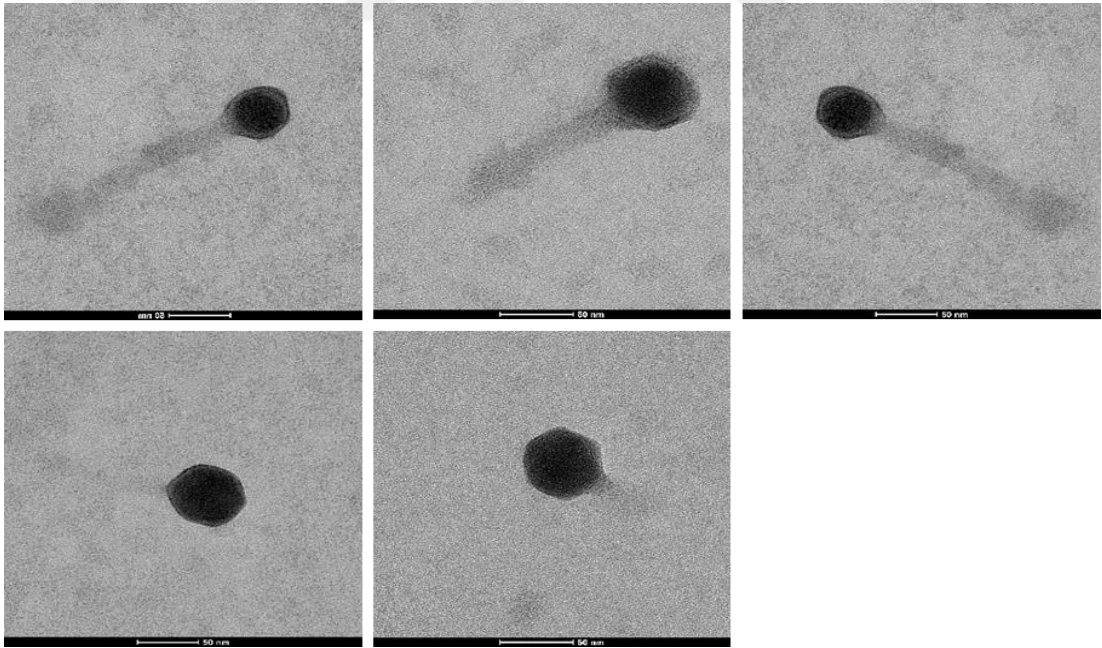


3.5. Fajların Morfolojik Karakterizasyon Bulguları

Morfolojik özelliklere dayanarak, fajlar Caudovirales takımına, *Siphoviridae* ailesine ve *Myoviridae* ailesine sınıflandırıldı.



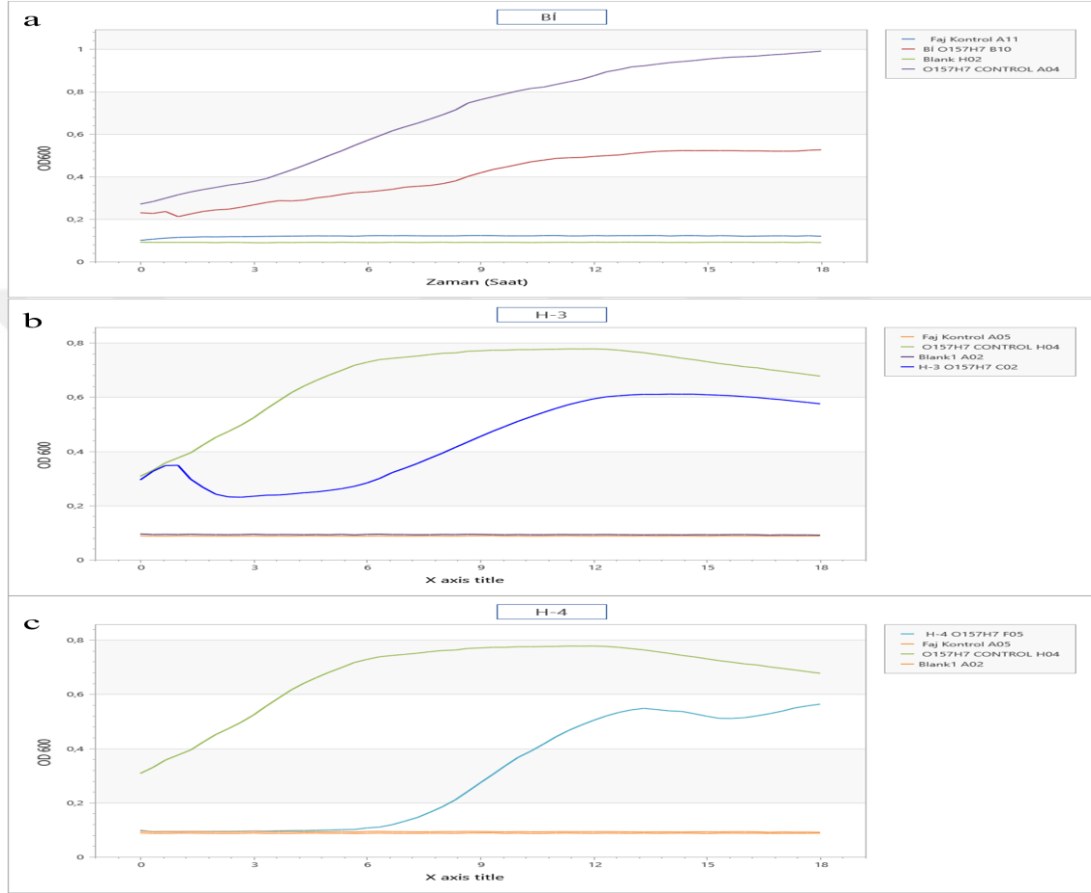
Şekil 13. W8 *Siphoviridae* kolifajının TEM görüntüleri. *Siphoviridae* ailesine ait uzun, ince kontraktil olmayan kuyruk yapısı görülmektedir. Baş yaklaşık 60 nm çapındadır.



Şekil 14. K-1 *Myoviridae* kolifajının TEM görüntüleri. *Myoviridae* ailesine ait kısa, kalın ve kontraktil kuyruk yapısı açıkça görülmektedir. İkozahedral baş yaklaşık 60 nm çapındadır.

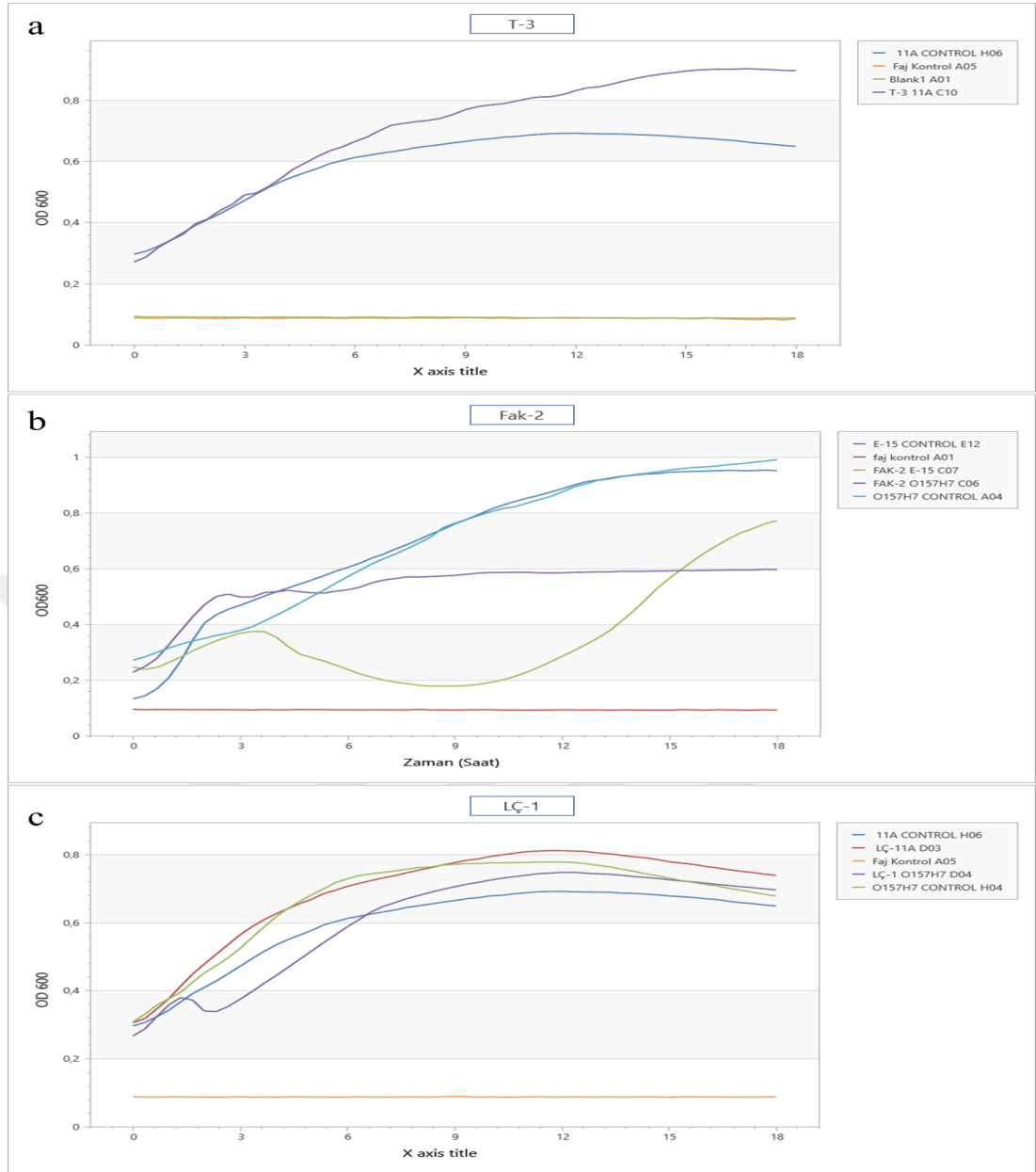
3.6. Faj Enfektivitesi ve Faj-Konak Büyüme Dinamiklerinin Belirlenmesi

Faj-konak büyüme dinamikleri ve faj enfektivitesi, deney süresince alınan ölçümler doğrultusunda OD₆₀₀ değerlerinin zamana karşı grafiğe aktarılmasıyla elde edilen büyüme eğrileri ile görselleştirildi. Her bir faja ait veriler aşağıdaki şekillerde gösterildi.



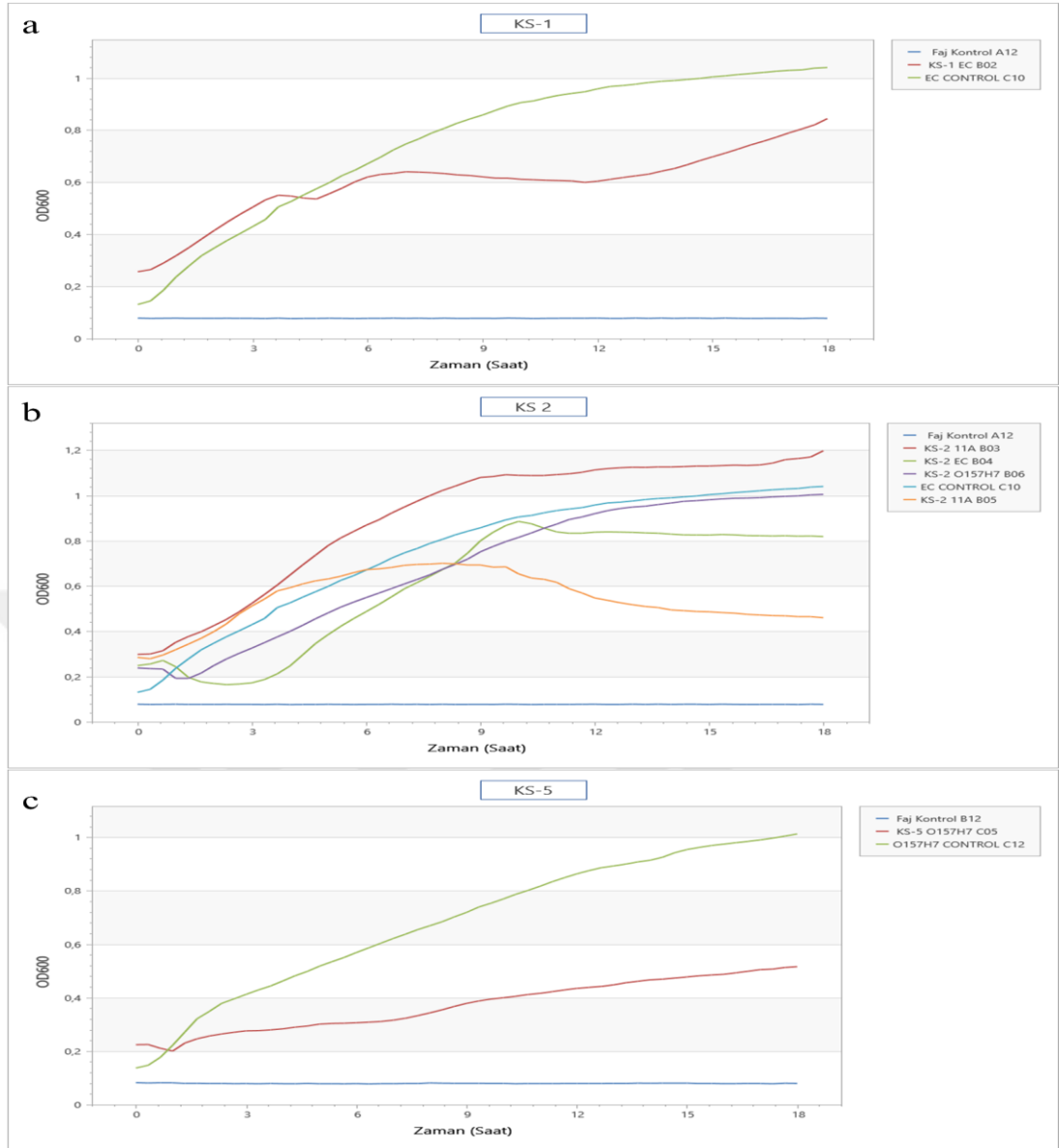
Şekil 15. a) B1 ve b) H3 ve c) H4 fajlarının EC O157:H7 suşu bakteriyel çoğalma ve faj enfeksiyonu dinamiklerinin farklı zaman noktalarında ölçülen ortalama OD değerleri üzerinden izlenmesi.

X eksenini zamanı (saat), Y eksenini ise OD₆₀₀ değerini göstermektedir. Şekil 15 a) B1, b) H-3 ve c) H-4 fajının *E. coli* O157:H7 suşu üzerindeki büyüme dinamiklerinin incelenmesi sonucunda, fajların *E. coli* çoğalmasını büyük oranda baskıladığı gözlenmiştir. Fajsız kontrol grubundaki *E. coli* kültüründe düzenli OD artışı ve logaritmik faza geçiş açıkça görülürken, fajla enfekte edilmiş kültürde OD değerlerinin oldukça düşük kaldığı ve kontrol eğrisinin belirgin şekilde altında seyrettiği tespit edildi.



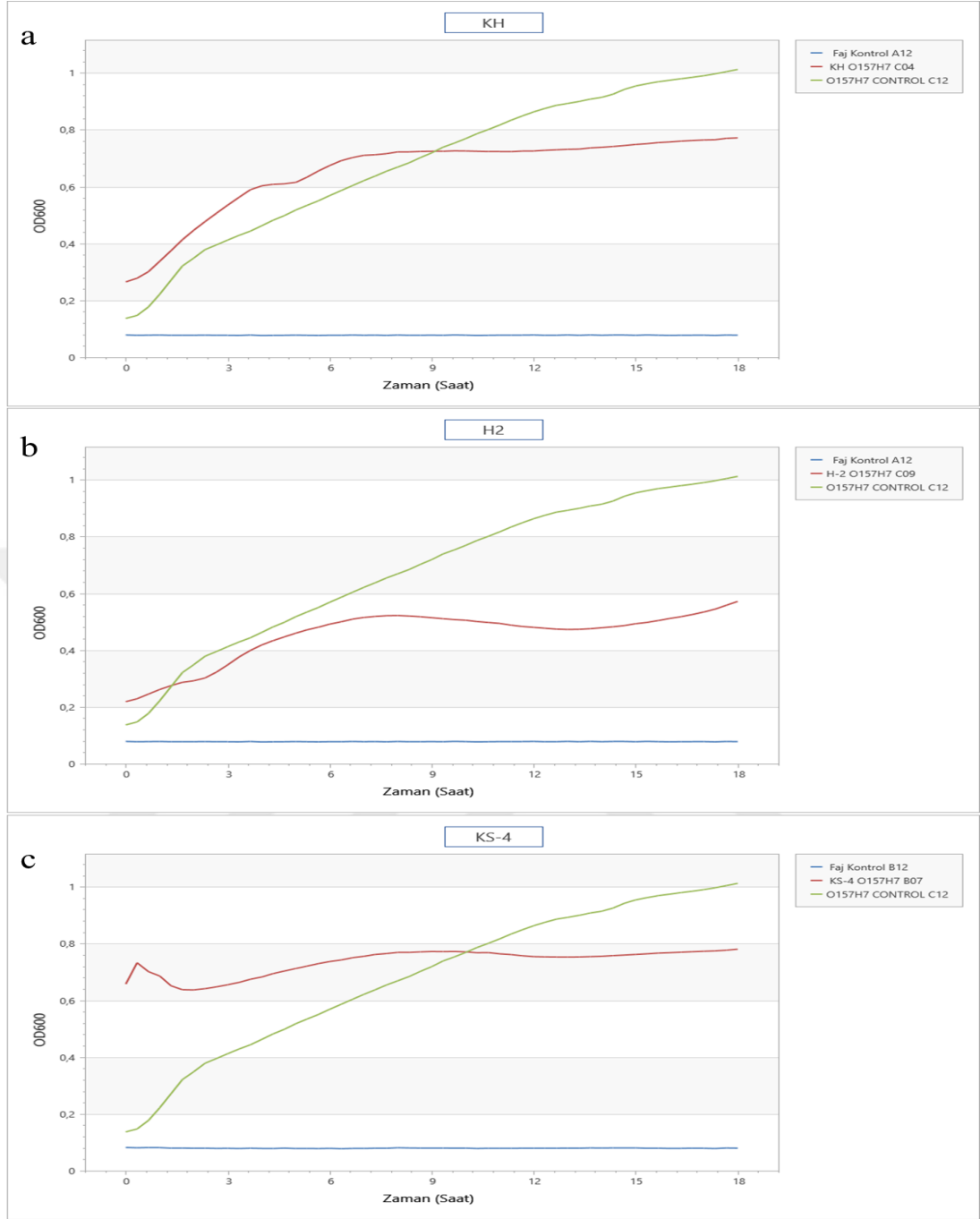
Şekil 16. a) T3 b) F-2 ve c) LÇ-1 fajlarının E-15, O157:H7 ve 11A *E. coli* suşlarının bakteriyel çoğalma ve faj enfeksiyonu dinamiklerinin farklı zaman noktalarında ölçülen ortalama OD değerleri üzerinden izlenmesi.

Faj içermeyen kontrol gruplarında bakteriyel çoğalma düzenli bir şekilde artış gösterirken, faj uygulaması yapılan gruplarda farklı düzeylerde inhibisyon gözlemlendi. LÇ-1 fajının O157:H7 üzerinde düşük inhibisyon düzeyi sergilemekle birlikte, T-3 fajı düşük seviyede litik aktivite gösterdiği görüldü. FAK-2 fajının E-15 ve O157:H7 suşlarına litik aktivitesi ve faj enfeksiyonunun başarısı incelendiğinde, FAK-2 fajının her iki suşta da aynı derecede etkin olduğu tespit edildi.

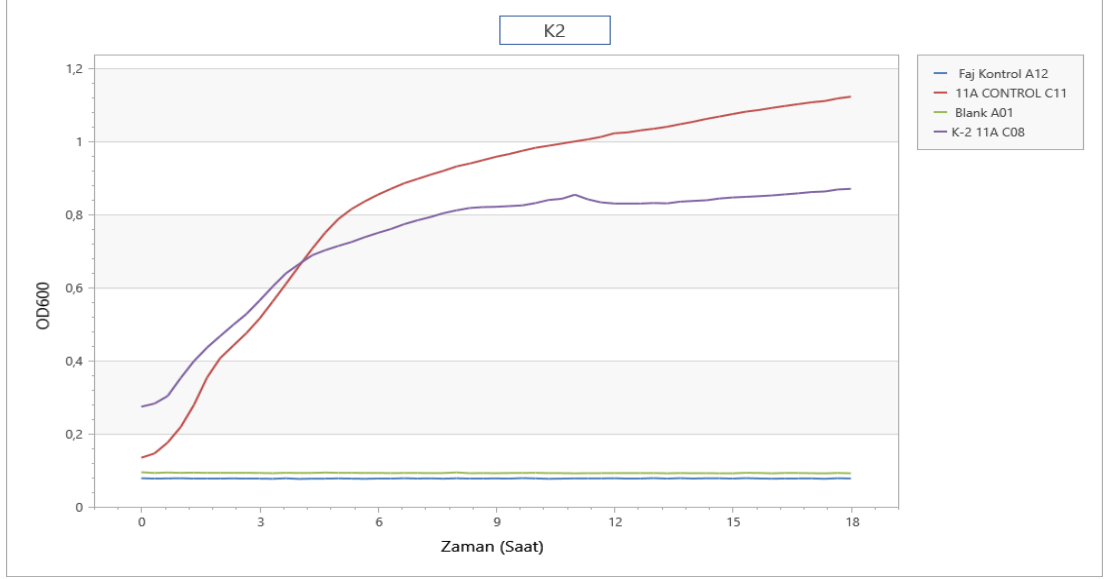


Şekil 17 a) KS-1 ve b) KS-2 ve c) KS-5 fajlarının EC O157:H7 ve 11A *E.coli* suşlarının bakteriyel çoğalma ve faj enfeksiyonu dinamiklerinin farklı zaman noktalarında ölçülen ortalama OD değerleri üzerinden izlenmesi.

KS-5 fajlarının *E.coli* O157:H7 suşunun çoğalmasını inhibisyon potansiyeli incelendiğinde, KS-5 fajının bakteri üremesini tamamen baskılayacak düzeyde yeterli litik aktivite gösterdiği görüldü. Kontrol grubunda, faj uygulaması yapılmayan bakterilerin çoğalmasının düzenli ve kesintisiz bir şekilde arttığı gözlemlendi. KS-1 fajının *E. coli* EC suşu ve KS-2 fajının *E. coli* 11A ile O157:H7 suşlarıyla oluşturulan enfeksiyon eğrileri incelendiğinde, bu fajların *E. coli* suşlarının çoğalmasında orta derecede baskılandığı görüldü.



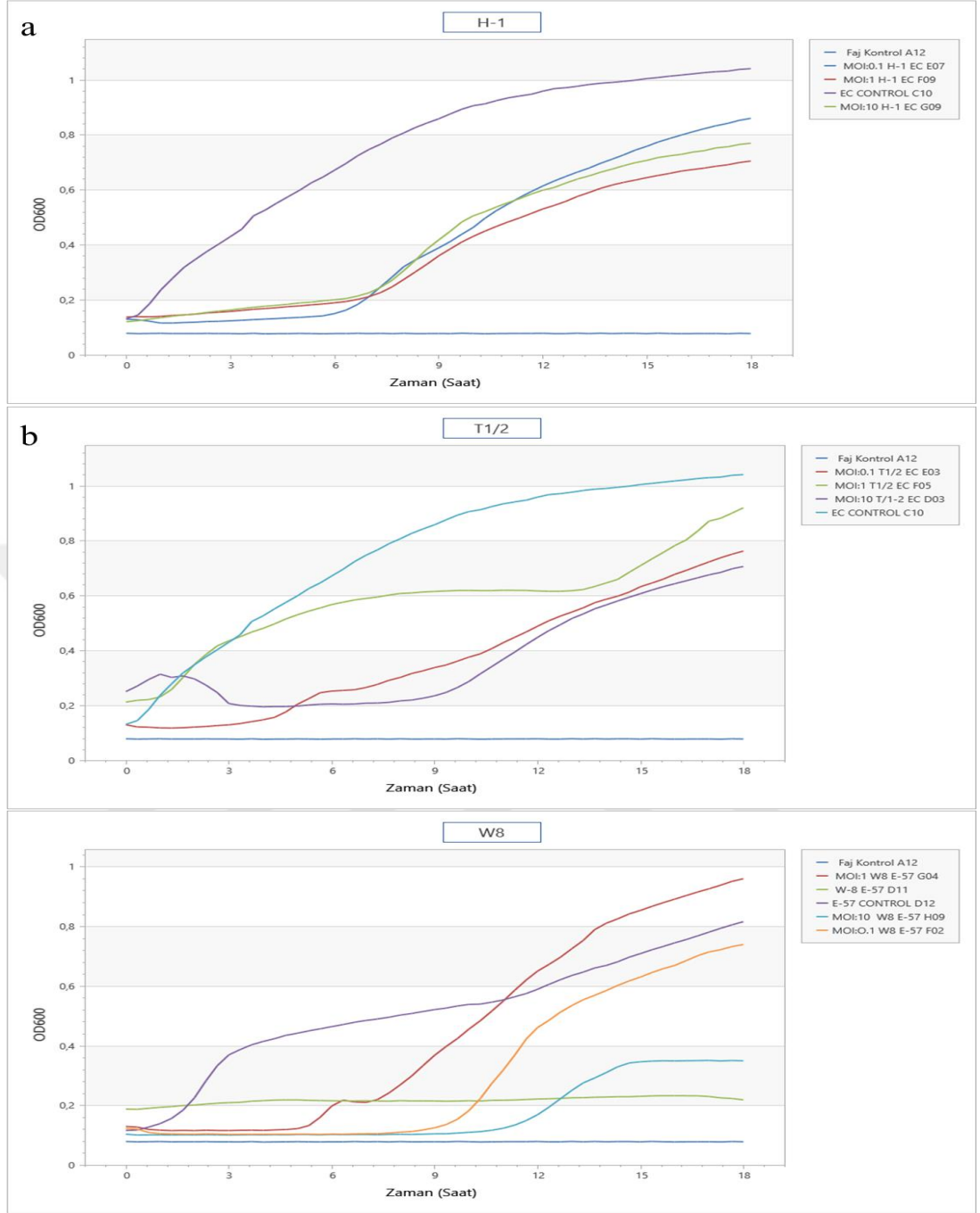
Şekil 18. KH b) H-2 c) KS-4 fajların *E. coli* O157:H7 ile bakteriyel büyüme ve faj enfeksiyonu dinamiklerinin farklı zaman noktalarında ölçülen ortalama OD değerleri üzerinden izlenmesi.



Şekil 19. K-2 fajlarının *E.coli* 11A suşu bakteriyel çoğalma ve faj enfeksiyonu dinamiklerinin farklı zaman noktalarında ölçülen ortalama OD değerleri üzerinden izlenmesi

KH fajında başlangıçta, ilk 4 saate kadar OD₆₀₀ değerinde düzenli bir artış gözlemlendi; ancak bu süreden sonra oluşan eğri, *E. coli* O157:H7'nin üreme eğrisinin altında seyrettiği görüldü. H-2 fajın bakteriyel azalma eğrileri incelendiğinde, oldukça yüksek litik aktivite sergilediği; KS-4 fajının *E.coli* O157:H7'yi orta düzeyde inhibe edebildiği; K-2 fajının ise 11A suşuna karşı düşük düzeyde litik aktivite gösterdiği tespit edildi. Kontrol grubunda bakteriyel çoğalma düzenli bir şekilde artış gösterdi.

Yüksek litik aktivite gösteren W1-9 (EC), T1/2 (EC), KS (E-57), T-2 (EC), W-2 (EC), W-1 (E-15), W-8 (E-57), W-3 (O157H7), K-3 (O157H7), K-1 (O157H7) Ç-1 (O157H7) H-1 (EC) fajlarının teröpotik kullanıma uygun etkinlikleri belirlenmesi amacı ile üç farklı MOI (0,1,1,10) seviyesinde faj çoğalma kinetikleri belirlendi. Elde edilen bulgular Tablo 21, Tablo 22, Tablo 23 ve Tablo 24'de belirtildi.

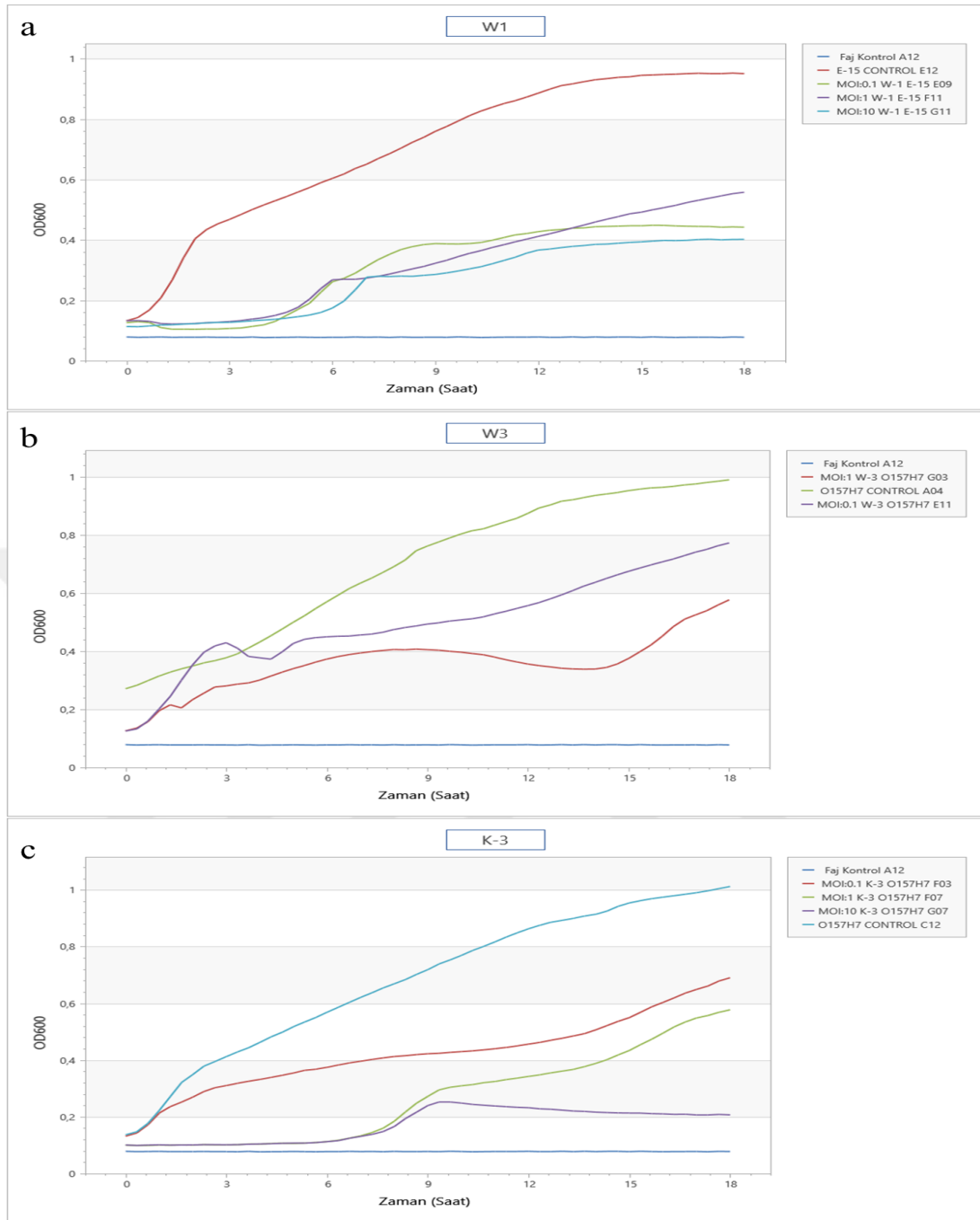


Şekil 20. Farklı MOI seviyelerinde (0,1, 1, 10) test edilen a) H-1 b) T1-2 c) W-8 fajlarının-konakçı *E.coli* etkileşimlerinin dinamikleri, bakteriyel çoğalma ve faj enfeksiyonu süreçlerinin çeşitli zaman noktalarında ölçülen ortalama OD değerleri üzerinden izlenmesi

Şekil 21’de farklı MOI seviyelerinde (0,1, 1, 10) test edilen H-1 fajının *E.coli* suşları üzerindeki etkisi incelendiğinde, MOI 10 seviyesinde bakteriyel çoğalmanın en etkili şekilde inhibe edildiği görüldü. MOI 1 seviyesinde de belirgin bir inhibisyon gözlemlenirken, MOI 0,1 seviyesinde inhibisyon etkisi daha sınırlı kaldığı belirlendi. Kontrol grubunda OD artışı düzenli olup bakteriyel çoğalma sürekli artış gösterdi.

T1/2 fajının farklı MOI seviyelerinde etkisi değerlendirildiğinde, MOI 10 seviyesinde bakteriyel çoğalmanın tamamen baskılandığı tespit edildi. MOI 1 seviyesinde inhibisyon etkisi gözlemlenmekle birlikte, MOI 0,1 seviyesinde bu etkinin daha düşük olduğu görüldü. Kontrol grubunda ise bakteriyel çoğalma düzenli bir şekilde arttığı görüldü.

W8 fajının farklı MOI seviyelerindeki etkisi değerlendirildiğinde; MOI 10 seviyesinde bakteriyel çoğalma güçlü bir şekilde baskıladı. MOI 1 seviyesinde inhibisyon etkisi iyi düzeyde gözlemlendi. MOI 0,1 seviyesinde inhibisyon yeterli seviyede tespit edildi. Kontrol grubunda ise faj uygulaması yapılmayan bakterilerin çoğalması düzenli ve kesintisiz olarak artış gösterdiği görüldü.



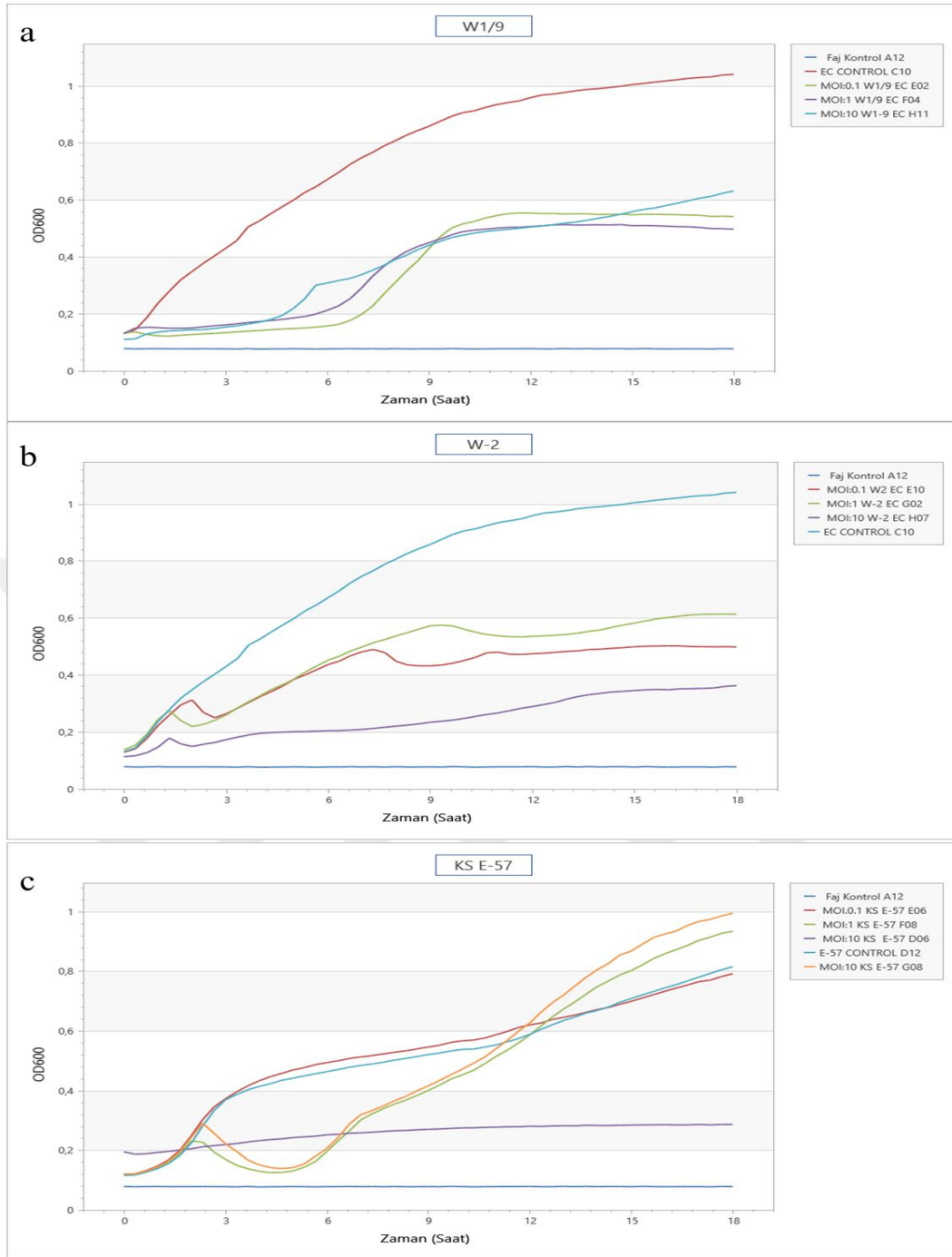
Şekil 21. Farklı MOI seviyelerinde (0,1, 1, 10) test edilen a) W1, b) W3, c) K3 fajları ve *E. coli* E-15, *E. coli* O157H7 ile faj-konakçı etkileşimlerinin dinamikleri, bakteriyel çoğalma ve faj enfeksiyonu süreçlerinin çeşitli zaman noktalarında ölçülen ortalama OD değerleri üzerinden izlenmesi

Şekil 22’de W3 fajının farklı MOI seviyelerinde (0,1, 1, 10) *E. coli* suşları üzerindeki etkisi incelendiğinde, MOI değerlerine bağlı olarak farklı inhibisyon seviyeleri gözlemlenmiştir. MOI 10 seviyesinde bakteriyel çoğalmanın en etkili şekilde inhibe edildiği ve OD₆₀₀ değerlerinin diğer gruplara kıyasla daha düşük

seyrettiği tespit edildi. MOI 1 seviyesinde orta düzeyde bir inhibisyon etkisi gözlemlenirken, MOI 0,1 seviyesinde inhibisyon etkisinin biraz düştüğü ancak görüldü. Kontrol grubunda ise faj uygulaması yapılmayan bakterilerin OD₆₀₀ değerleri düzenli bir artış gösterdi.

W1 fajının farklı MOI seviyelerindeki etkisi değerlendirildiğinde, MOI 10 seviyesinde bakteriyel çoğalmanın belirgin şekilde baskılandığı görüldü. MOI 1 seviyesinde inhibisyon etkisi gözlemlenmekle birlikte, bu etki MOI 10'a göre daha düşük seviyede kaldığı görüldü. MOI 0,1 seviyesinde üremeyi inhibe ettiği tespit edildi. Kontrol grubunda bakteriyel çoğalma kesintisiz ve düzenli bir artış sergiledi.

K3 fajının farklı MOI seviyelerindeki etkisi incelendiğinde, MOI 10 seviyesinde bakteriyel çoğalmanın güçlü bir şekilde inhibe edildiği ve OD₆₀₀ değerlerinin deney süresince belirgin şekilde düşük seyrettiği gözlemlendi. MOI 1 seviyesinde inhibisyon etkisi de benzer şekilde görüldü. MOI 0,1 seviyesinde ise başlangıçta kısmi inhibisyon görüldü, ancak ilerleyen saatlerde bakteriyel çoğalma kontrol grubuna benzer bir artış eğilimi gösterdi. Kontrol grubunda, faj uygulaması yapılmayan bakterilerin çoğalması beklenen şekilde sürekli bir artış gösterdi.



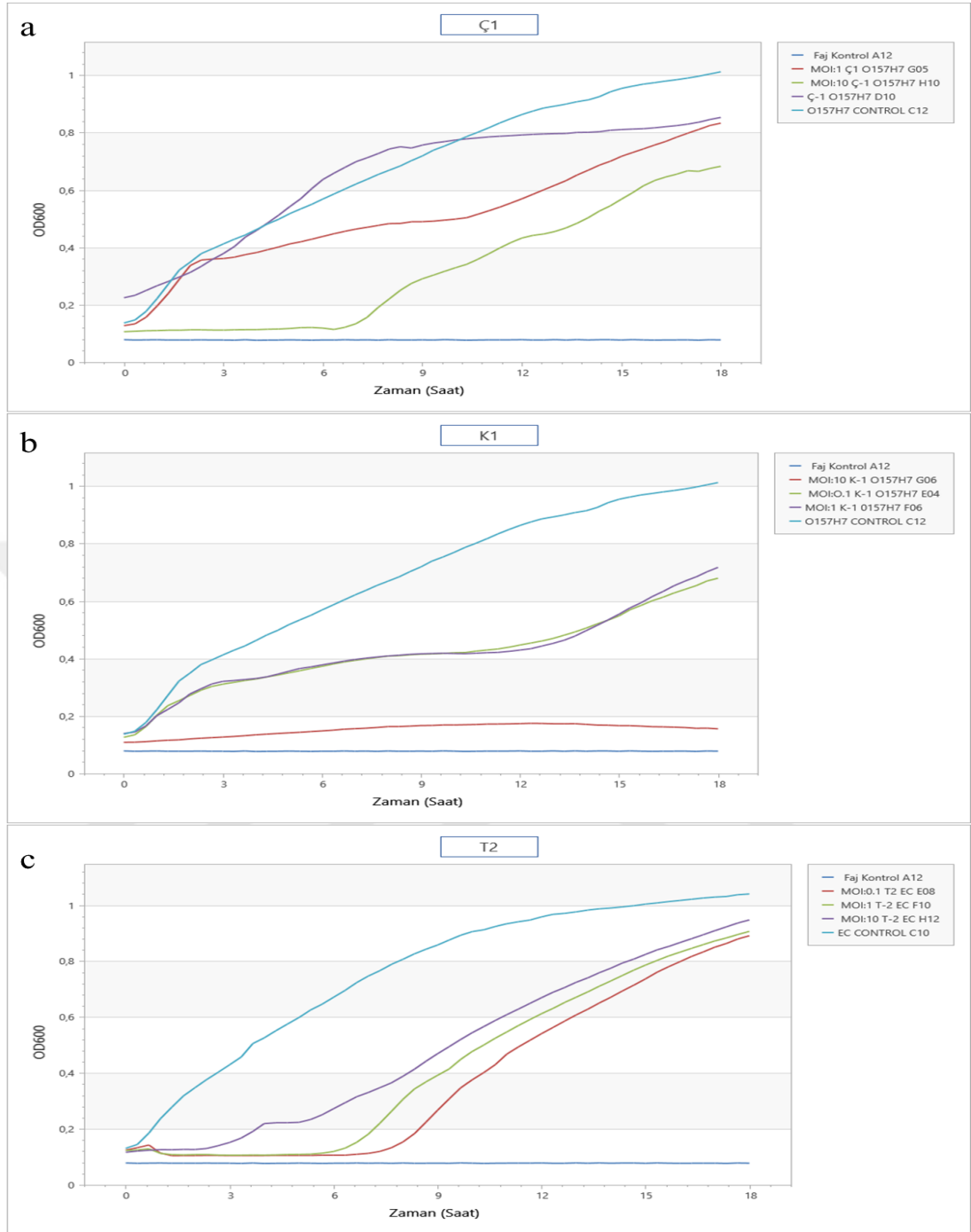
Şekil 22. Farklı MOI seviyelerinde (0,1, 1, 10) test edilen a) W1/9, b) W-2, c)KS E-57 fajları ve *E. coli* E-57, *E. coli* EC ile faj-konakçı etkileşimlerinin dinamikleri, bakteriyel çoğalma ve faj enfeksiyonu süreçlerinin çeşitli zaman noktalarında ölçülen ortalama OD değerleri üzerinden izlenmesi

W1/9 fajının uygulandığı deneylerde, kontrol grubunda (faj uygulanmayan bakteriler) OD₆₀₀ değerleri deney süresince düzenli ve hızlı bir artış sergiledi. Faj uygulanan gruplarda ise yüksek MOI seviyelerinde bakteriyel çoğalma daha uzun süre baskılanarak OD₆₀₀ değerleri düşük seyretti. MOI düzeyi azaldığında, inhibisyon etkisi kısmen zayıflasa da tamamen ortadan kalkmadığı ve kontrol grubuna kıyasla belirgin bir çoğalmanın engellendiği gözlemlendi.

W-2 fajıyla yapılan testlerde de kontrol grubu (*E.coli*) OD₆₀₀ değerleri hızla yükseldiği, yüksek seviyelere ulaştığı görüldü. Faj uygulaması yapılan gruplarda, MOI değeri arttıkça bakteriyel çoğalma daha etkili biçimde sınırlandırıldı ve düşük OD₆₀₀ değerleri daha uzun süre korundu. Buna karşın, MOI'nin düşürülmesiyle birlikte inhibisyon kısmen azalma gösterse dahi, kontrol grubuna nazaran dikkate değer oranda çoğalmanın engellemesi devam ettiği görüldü.

KS E-57 fajına ait verilerde de kontrol grubu, diğerlerinde olduğu gibi, sürekli artan OD₆₀₀ değeriyle hızlı bir çoğalma eğrisi sergilemiştir. Yüksek MOI uygulamalarında fajın etkisi daha belirgin olup, OD₆₀₀ değerleri uzun süre düşük kalmıştır. MOI seviyesi düştüğünde inhibisyon etkisi bir miktar gerilese de kontrol grupla kıyaslandığında yine de kayda değer bir baskılama gözlemlendi.

Genel olarak, her üç fajda da MOI arttıkça bakteriyel çoğalma daha güçlü bir biçimde engellendiği görüldü. Bununla birlikte, MOI düşüşlerinde dahi inhibisyon tamamen ortadan kalkmadığı, kontrol grubuna kıyasla gözle görülür bir büyüme kontrolü sağlanmaya devam ettiği tespit edildi.



Şekil 23. Farklı MOI seviyelerinde (0,1, 1, 10) test edilen a) Ç-1, b) K-1 ve c) T-2 fajları ve *E. coli* O157:H7, *E. coli* EC ile faj-konakçı etkileşimlerinin dinamikleri, bakteriyel çoğalma ve faj enfeksiyonu süreçlerinin çeşitli zaman noktalarında ölçülen ortalama OD değerleri üzerinden izlenmesi

Şekil 24’de Ç1, K1 ve T2 fajlarının bakteriyel büyüme üzerindeki etkilerine bakıldığında: Ç1 fajında, OD₆₀₀ değerleri kontrol grubuna kıyasla daha düşük seviyelerde seyrettiği tespit edildi. Özellikle MOI 10’da Ç-1 fajları bakteriyel büyümeyi önemli ölçüde baskıladı. Ancak, tam bir inhibisyon gözlenmemiş, özellikle 8. saatten sonra kısmi bir bakteriyel büyüme devam ettiği görüldü.

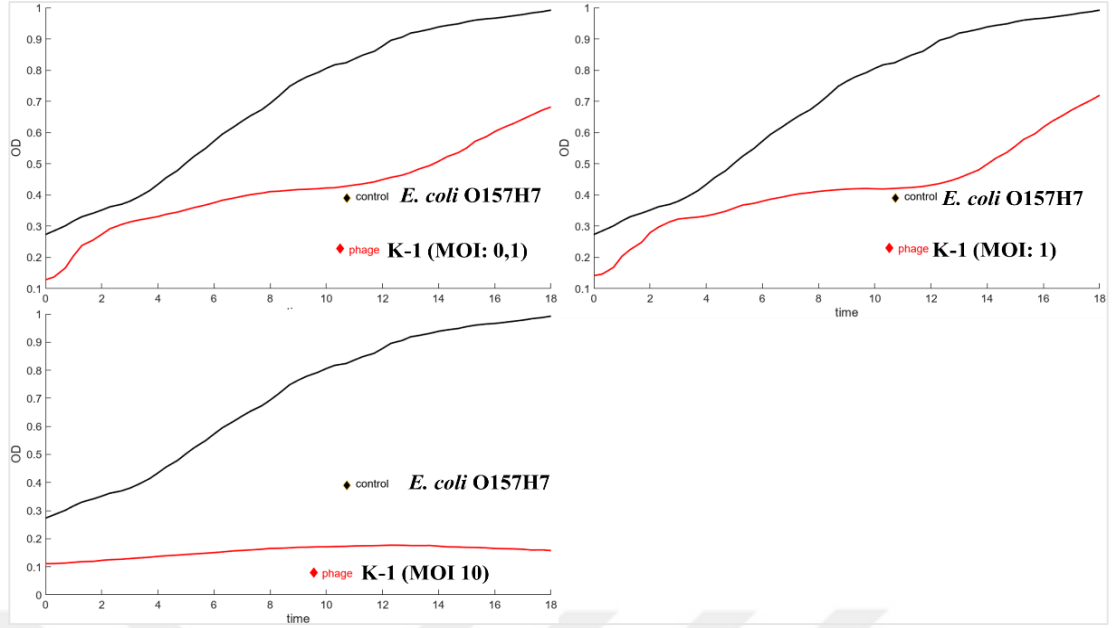
K1 fajında en etkili inhibisyon gözlemlendi. Hem MOI 10 hem de MOI 0,1 K1 fajı OD₆₀₀ değerlerini kontrol grubuna göre belirgin şekilde düşük tuttuğu gözlemlendi.. Bu durum, K1 fajlarının bakteriler üzerinde güçlü bir inhibisyon etkisi gösterdiğini ve bakteriyel popülasyonu başarılı bir şekilde kontrol altına aldığını gösterdi.

T2 fajında ise, MOI 10 ve MOI 0,1 de başlangıçta etkili bir inhibisyon göstermiş, ancak zamanla bakteriyel çoğalma kısmen devam etti. OD₆₀₀ değerleri kontrol grubundan düşük kalmakla birlikte, tam bir inhibisyon sağlanamadı. Bu durum, T2 fajlarının bakteriler üzerinde düşük düzeyde bir inhibisyon etkisi gösterdiğini, ancak tüm bakteriyel popülasyonu kontrol altına alamadığını gösterdi.

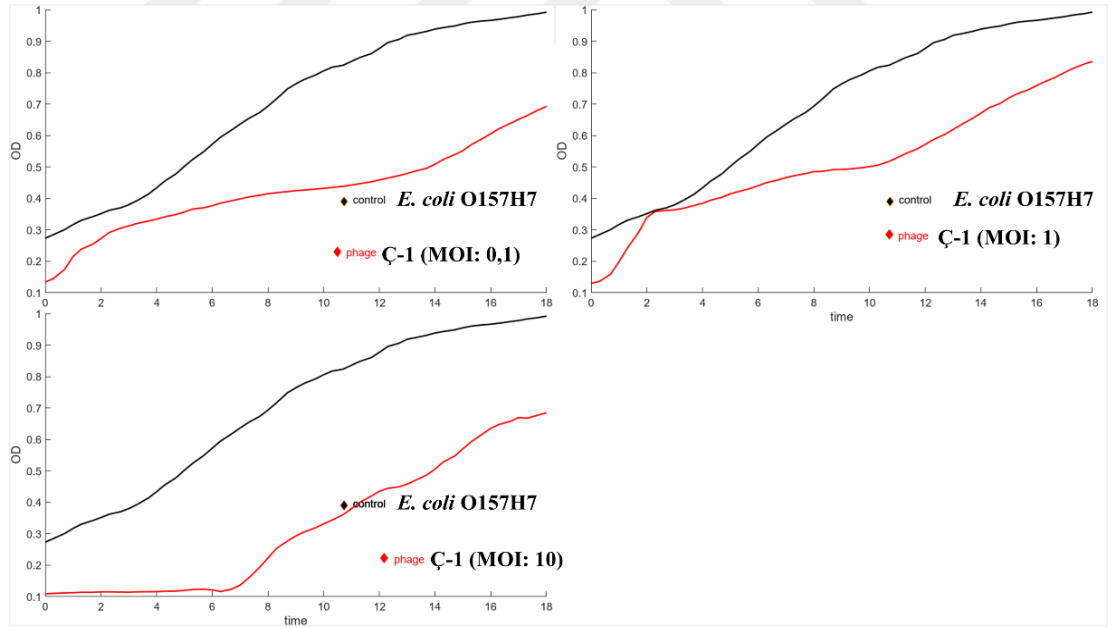
Faj çoğalma kinetiklerinin centroid analizi yapılarak ve faj enfeksiyonuna yanıt olarak bakteri popülasyonunun genel büyüme dinamiklerini gösteren sayısal veriler Tablo 13’ de belirtildi.

İzole edilen tüm fajların MOI 1 de faj enfeksiyon kinetikleri incelendi ve en verimli olan fajlar seçildi. Seçilen 12 adet fajın MOI 0,1, MOI 1, MOI 10’ da 5 farklı *E.coli* suşlarına karşı enfektivitesini ve teröpotik potansiyelini gösteren sayısal veriler Tablo 13’ de gösterildi.

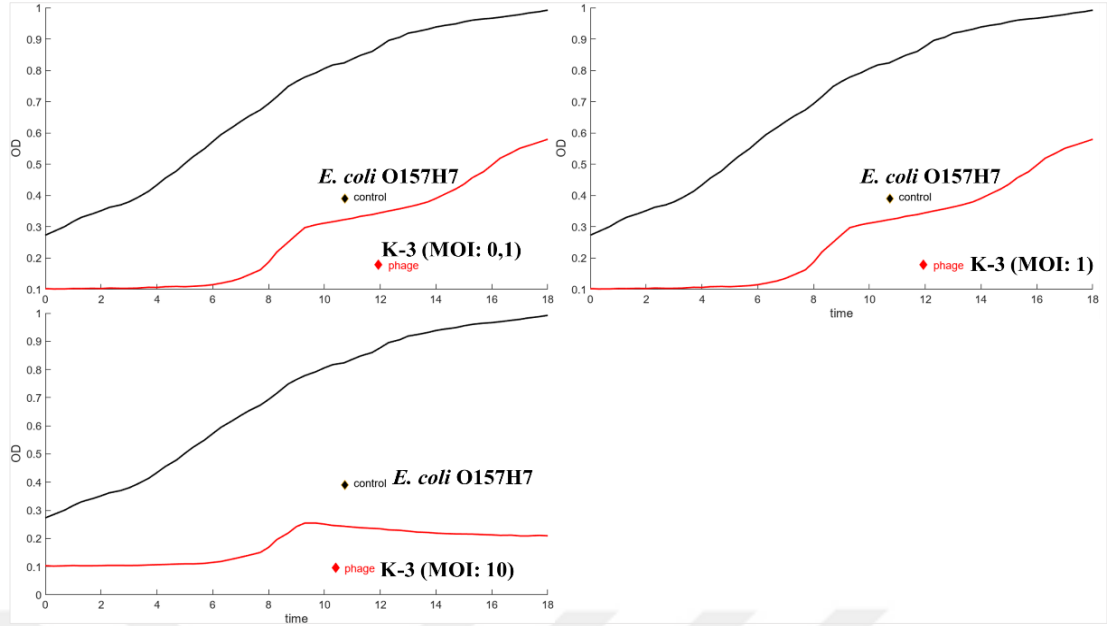
CI değerlerinin değerlendirilmesinde CI değerlerinin 0-1 değerleri arasındaki skalada yorumlandı. Enfeksiyon derecesinde (başarılı, kısmen başarılı veya başarısız) tespit edilen varyasyonlar tespit edildi. En başarılı enfeksiyonlar MOI 10’da gözlenirken, en düşük enfeksiyon seviyesi MOI 0,1’de gerçekleştiği görüldü.



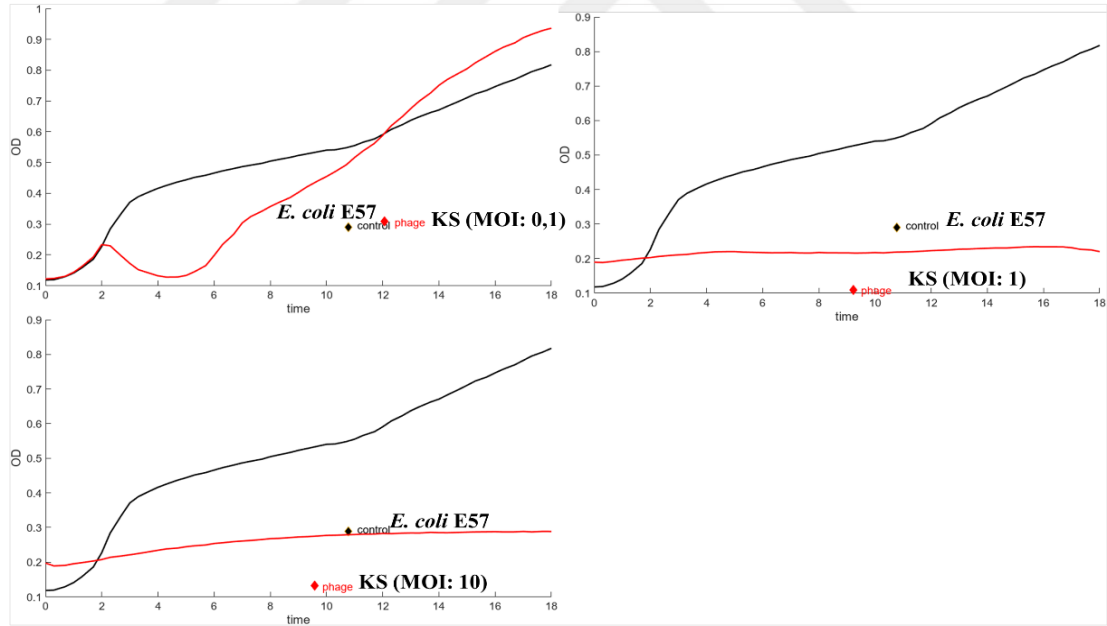
Şekil 24. *E. coli* O157:H7 suşunun büyüme eğrileri ve K-1 fajı ile farklı enfeksiyon oranlarında (MOI: 0,1, 1 ve 10) etkileşiminin şematik gösterimi Centroid İndeks analizinde, siyah eğri kontrol grubu olan *E. coli* O157:H7'yi, kırmızı eğri ise K-1 fajı ile enfekte edilmiş bakterileri göstermektedir. Her bir grafikte renkli elmaslar (♦) ile işaretlenen noktalar, ilgili eğrilerin merkezlerini temsil etmektedir. Grafikler, zaman (saat) ve optik yoğunluk (OD) değerleri arasındaki ilişkiyi göstermektedir.



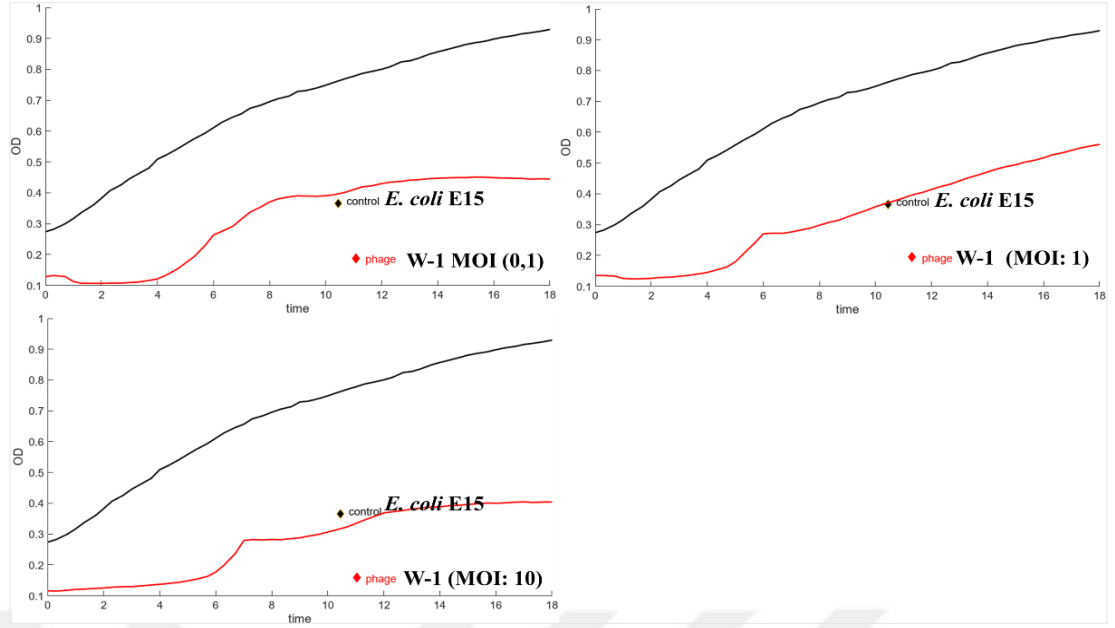
Şekil 25. *E. coli* O157:H7 suşunun büyüme eğrileri ve Ç-1 fajı ile farklı enfeksiyon oranlarında (MOI: 0.1, 1 ve 10) etkileşiminin şematik gösterimi Grafikte siyah eğri kontrol grubu olan *E. coli* O157:H7'yi, kırmızı eğri ise Ç-1 fajı ile enfekte edilmiş bakterileri göstermektedir. Her bir grafikte renkli elmaslar (♦) ile işaretlenen noktalar, ilgili eğrilerin merkezlerini temsil etmektedir. Grafikler, zaman (saat) ve optik yoğunluk (OD) değerleri arasındaki ilişkiyi göstermektedir.



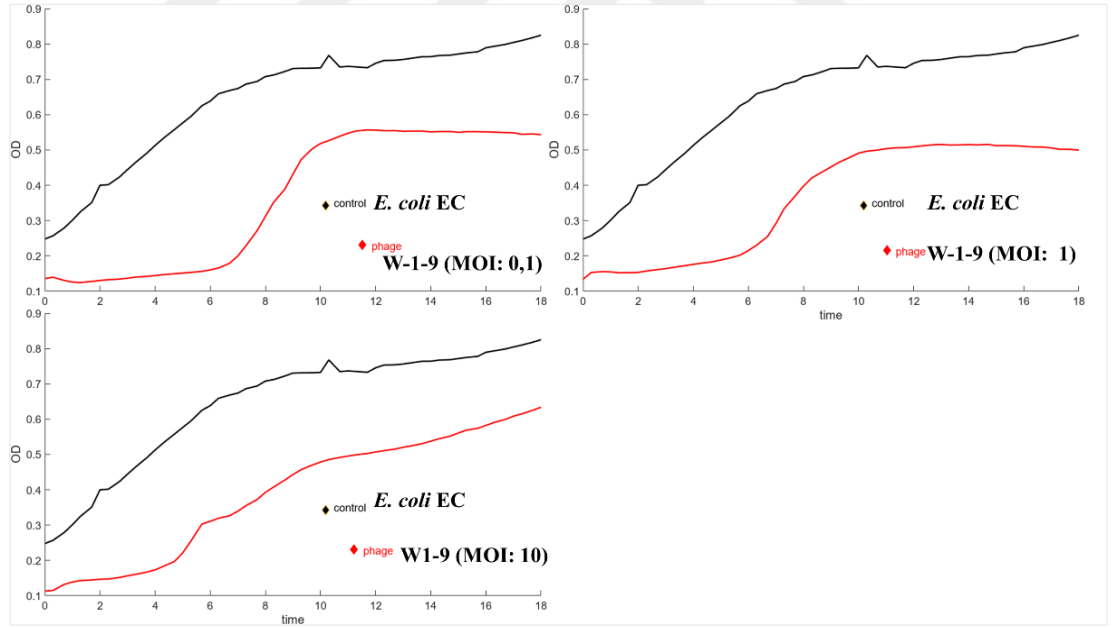
Şekil 26. *E. coli* O157:H7 suşunun büyüme eğrileri ve K-3 fajı ile farklı enfeksiyon oranlarında (MOI: 0.1, 1 ve 10) etkileşiminin şematik gösterimi. Grafikte siyah eğri kontrol grubu olan *E. coli* O157:H7'yi, kırmızı eğri ise K-3 fajı ile enfekte edilmiş bakterileri göstermektedir. Her bir grafikte renkli elmaslar (♦) ile işaretlenen noktalar, ilgili eğrilerin merkezlerini temsil etmektedir. Grafikler, zaman (saat) ve optik yoğunluk (OD) değerleri arasındaki ilişkiyi göstermektedir.



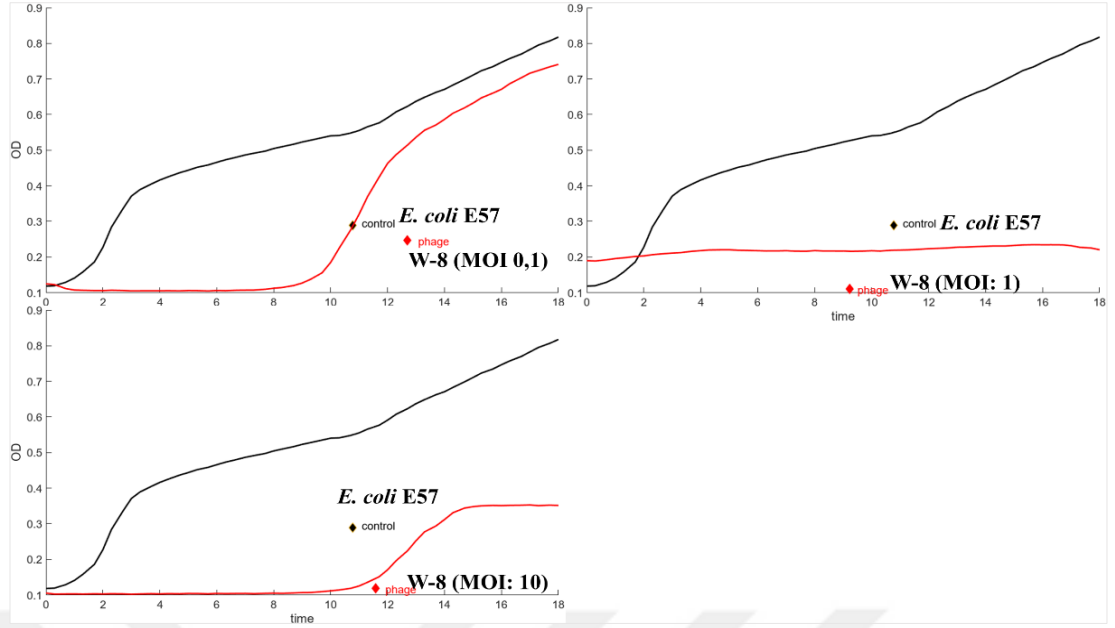
Şekil 27: *E. coli* E-57 suşunun büyüme eğrileri ve KS fajı ile farklı enfeksiyon oranlarında (MOI: 0.1, 1 ve 10) etkileşiminin şematik gösterimi. Grafikte siyah eğri kontrol grubu olan *E. coli* E-57'yi, kırmızı eğri ise KS fajı ile enfekte edilmiş bakterileri göstermektedir. Her bir grafikte renkli elmaslar (♦) ile işaretlenen noktalar, ilgili eğrilerin merkezlerini temsil etmektedir. Grafikler, zaman (saat) ve optik yoğunluk (OD) değerleri arasındaki ilişkiyi göstermektedir.



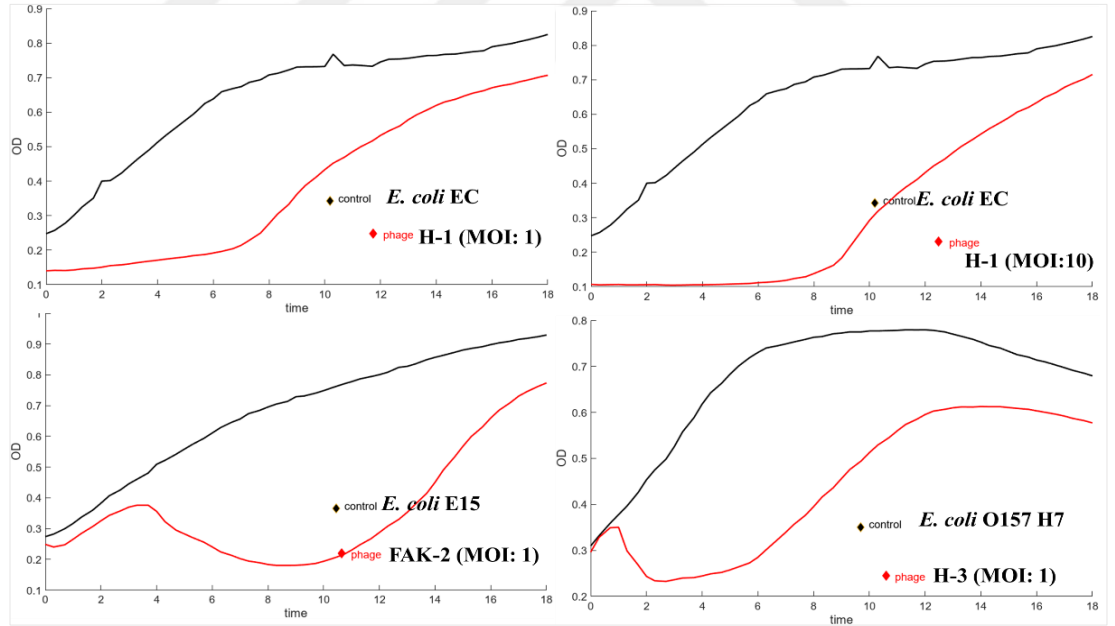
Şekil 28. *E. coli* E-15 suşunun büyüme eğrileri ve W-1 fajı ile farklı enfeksiyon oranlarında (MOI: 0.1, 1 ve 10) etkileşiminin şematik gösterimi. Grafikte siyah eğri kontrol grubu olan *E. coli* E-15 i, kırmızı eğri ise W-1 fajı ile enfekte edilmiş bakterileri göstermektedir. Her bir grafikte renkli elmaslar (♦) ile işaretlenen noktalar, ilgili eğrilerin merkezlerini temsil etmektedir. Grafikler, zaman (saat) ve optik yoğunluk (OD) değerleri arasındaki ilişkiyi göstermektedir



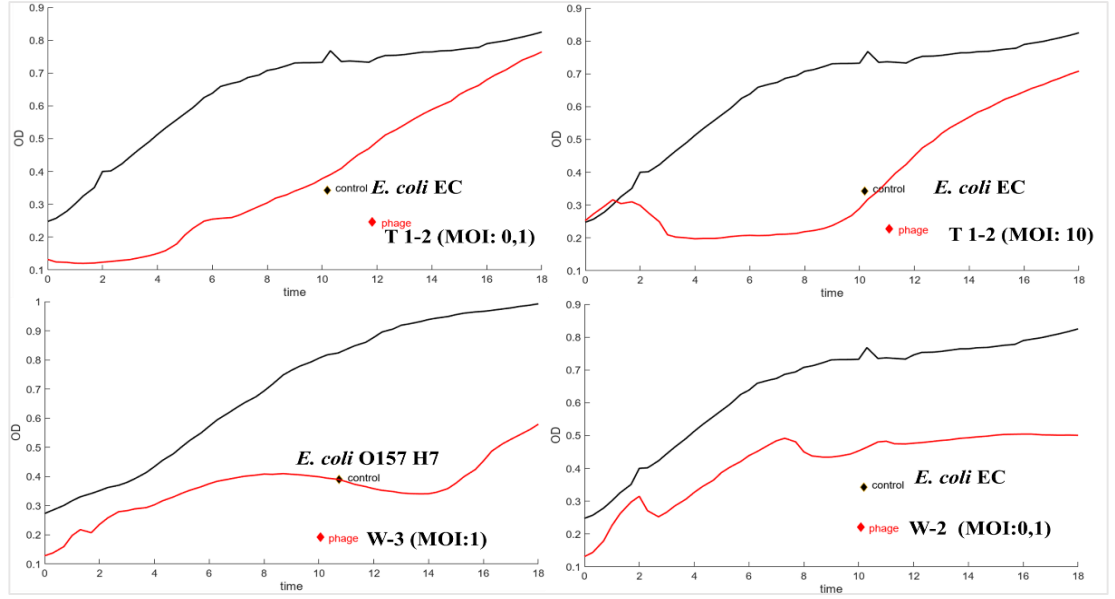
Şekil 29. *E. coli* EC bakterisinin büyüme eğrileri ve W1-9 fajı ile farklı enfeksiyon oranlarında (MOI: 0.1, 1 ve 10) etkileşiminin şematik gösterimi. Grafikte siyah eğri kontrol grubu olan *E. coli* EC'yi, kırmızı eğri ise W1-9 fajı ile enfekte edilmiş bakterileri göstermektedir. Her bir grafikte renkli elmaslar (♦) ile işaretlenen noktalar, ilgili eğrilerin merkezlerini temsil etmektedir. Grafikler, zaman (saat) ve optik yoğunluk (OD) değerleri arasındaki ilişkiyi göstermektedir.



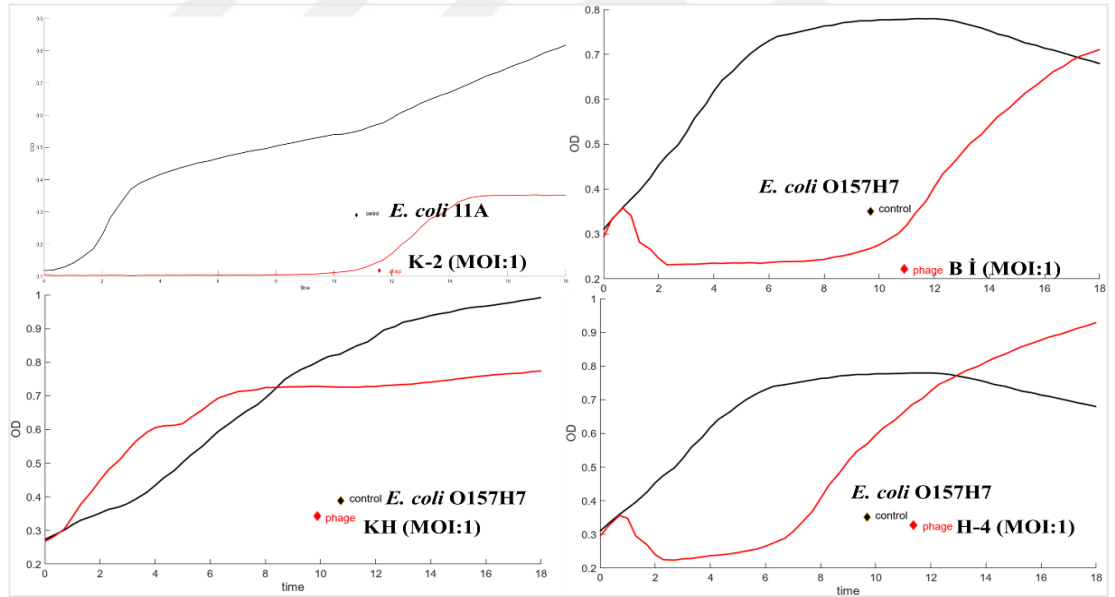
Şekil 30 *E. coli* E-57 suşunun büyüme eğrileri ve W-8 fajı ile farklı enfeksiyon oranlarında (MOI: 0.1, 1 ve 10) etkileşiminin şematik gösterimi. Grafikte siyah eğri kontrol grubu olan *E. coli* E-57'yi, kırmızı eğri ise W8 fajı ile enfekte edilmiş bakterileri göstermektedir. Her bir grafikte renkli elmaslar (♦) ile işaretlenen noktalar, ilgili eğrilerin merkezlerini temsil etmektedir. Grafikler, zaman (saat) ve optik yoğunluk (OD) değerleri arasındaki ilişkiyi göstermektedir.



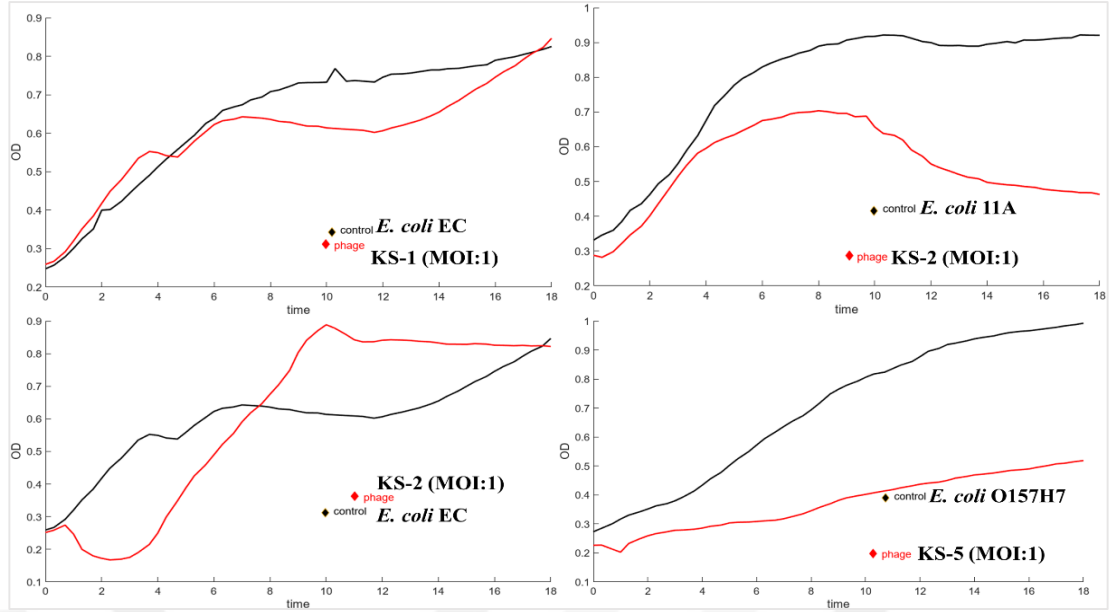
Şekil 31. *E. coli* EC, *E. coli* E-15 ve *E. coli* O157:H7 suşlarının büyüme eğrileri ve H-1, MOI:1 ve MOI:10 da Fak-2 ve H-3 fajları etkileşimini gösteren büyüme eğrilerini göstermektedir. Sol üst grafik: *E. coli* EC suşunun kontrol grubu (siyah eğri) ve H-1 fajı ile MOI:1 de faj enfeksiyonu (kırmızı eğri) gösterilmektedir. Sağ üst grafik: *E. coli* EC suşunun kontrol grubu (siyah eğri) ve H-1 fajı ile MOI:10 de (kırmızı eğri) gösterilmektedir. Sol alt grafik: *E. coli* E15 suşunun kontrol grubu (siyah eğri) ve FAK-2 fajı ile MOI:1 oranında enfekte edilmiş durumu (kırmızı eğri) gösterilmektedir. Sağ alt grafik: *E. coli* O157:H7 suşunun kontrol grubu (siyah eğri) ve H-3 fajı ile MOI:1 oranında enfekte edilmiş durumu (kırmızı eğri) gösterilmektedir.



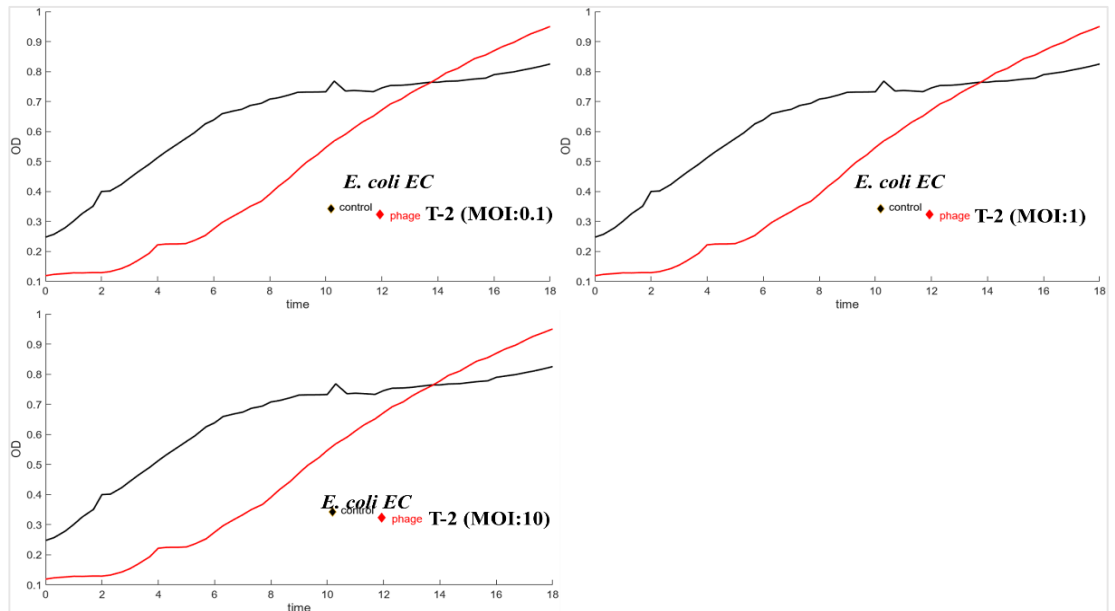
Şekil 32: Sol üst grafik: *E. coli* EC suşunun büyüme eğrisi (siyah) ve T1-2 fajı ile MOI:0.1 enfeksiyon oranında çoğalma eğrileri (kırmızı). Sağ üst grafik: *E. coli* EC suşunun çoğalma eğrisi (siyah) ve T1-2 bakteriyofajı ile MOI:10 enfeksiyon oranında çoğalma eğrisi (kırmızı). Sol alt grafik: *E. coli* O157:H7 bakterisinin büyüme eğrisi (siyah) ve W-3 bakteriyofajı ile MOI:1 enfeksiyon oranında çoğalma büyüme eğrisinin (kırmızı) Sağ alt grafik: *E. coli* EC bakterisinin büyüme eğrisi (siyah) ve W-2 bakteriyofajı ile MOI:0.1 enfeksiyon oranında çoğalma eğrisi (kırmızı) olarak görülmektedir.



Şekil 33. *E. coli* EC, *E. coli* 11A ve *E. coli* O157:H7 suşları ile K-2, B1, KH ve H-4 fajları ile enfeksiyonunun büyüme eğrileri. Sol üst grafik: *E. coli* 11A suşunun büyüme eğrisi (siyah) ve K-3 bakteriyofajı ile MOI:1 enfeksiyon oranında büyüme eğrileri (kırmızı). Sağ üst grafik: *E. coli* O157:H7 suşunun büyüme eğrisi (siyah) ve B1 fajı ile MOI:1 enfeksiyon oranında büyüme eğrisi (kırmızı). Sol alt grafik: *E. coli* O157:H7 suşunun büyüme eğrisi (siyah) ve KH fajı ile MOI:1 enfeksiyon oranında çoğalma eğrisi (kırmızı). Sağ alt grafik: *E. coli* O157:H7 suşunun büyüme eğrisi (siyah) ve H-4 bakteriyofajı ile MOI:1 enfeksiyon oranında çoğalma eğrisi (kırmızı). Grafiklerde x eksenini zamanı (saat), y eksenini ise optik yoğunluğu (OD) göstermektedir. Renkli elmas (♦) işaretleri, ilgili eğrilerin merkez noktalarını temsil etmektedir. Grafikler, farklı bakteriyofajların *E. coli* suşları üzerindeki büyüme inhibisyon etkilerini karşılaştırmalı olarak göstermektedir.



Şekil 34. *E. coli* suşlarının *E. coli* EC, *E. coli* 11A ve *E. coli* O157:H7 K-2 ,Bİ, KH ve H-4 fajları ile etkileşiminin çoğalma eğrileri. Sol üst grafik: *E. coli* 11A suşunun büyüme eğrisi (siyah) ve K-3 fajı ile MOI:1 enfeksiyon oranında çoğalma eğrisi (kırmızı). Sağ üst grafik: *E. coli* O157:H7 bakterisinin büyüme eğrisi (siyah) ve Bİ bakteriyofajı ile MOI:1 enfeksiyon oranında çoğalma eğrisi (kırmızı). Sol alt grafik: *E. coli* O157:H7 suşunun büyüme eğrisi (siyah) ve KH fajı ile MOI:1 enfeksiyon oranında çoğalma eğrisi (kırmızı). Sağ alt grafik: *E. coli* O157:H7 suşunun büyüme eğrisi (siyah) ve H-4 fajı ile MOI:1 enfeksiyon oranında çoğalma eğrisi (kırmızı). Grafiklerde x eksenı zamanı (saat), y eksenı ise optik yoğunluğu (OD) göstermektedir. Renkli elmas (♦) işaretleri, ilgili eğrilerin merkez noktalarını temsil etmektedir.



Şekil 35. *E. coli* EC suşunun büyüme eğrileri ve T-2 fajı ile farklı enfeksiyon oranlarında (MOI: 0.1, 1 ve 10) büyüme eğrilerinin şematik gösterimi. Grafikte siyah eğri kontrol grubu olan *E. coli* EC'yi, kırmızı eğri ise T-2 fajı ile enfekte edilmiş bakterileri göstermektedir. Her bir grafikte renkli elmaslar (♦) ile işaretlenen noktalar, ilgili eğrilerin merkezlerini temsil etmektedir. Grafikler, zaman (saat) ve optik yoğunluk (OD) değerleri arasındaki ilişkiyi göstermektedir.

İzole edilen tüm fajların MOI 1 de faj enfeksiyon kinetikleri incelendi (Tablo 16) ve en verimli olan fajlar seçildi. Seçilen 12 adet fajın MOI 0,1, MOI 1, MOI 10' da 5 farklı *E.coli* suşlarına karşı enfektivitesini ve teröpotik potansiyelini gösteren sayısal veriler Tablo 15' de gösterildi.



Tablo 15. Centroid analizi verileri

Faj Adı	MOI	CI
W1-9 EC	MOI:0,1	0.25
	MOI:1	0.39
	MOI:10	0.42
T1/2 EC	MOI:0,1	0,16
	MOI:1	0.27
	MOI:10	0.30
KS E-57	MOI:0,1	0.59
	MOI:1	0.59
	MOI:10	0.60
T-2 EC	MOI:0,1	0,16
	MOI:1	0,12
	MOI:10	0,17
W-2 EC	MOI:0,1	0.36
	MOI:1	0.24
	MOI:10	0.59
W-1 E-15	MOI:0,1	0.45
	MOI:1	0.42
	MOI:10	0.54
W-8 E-57	MOI:0,1	0.56
	MOI:1	0.59
	MOI:10	0.67
W-3 O157H7	MOI:0,1	0.51
	MOI:1	0.53
	MOI:10	0.70
K-3 O157H7	MOI:0,1	0.48
	MOI:1	0.48
	MOI:10	0.75
K-1 O157H7	MOI:0,1	0.41
	MOI:1	0.42
	MOI:10	0.80
Ç-1 O157H7	MOI:0,1	0.35
	MOI:1	0.26
	MOI:10	0.41
H-1 EC	MOI:0,1	0.04
	MOI:1	0,16
	MOI:10	0.06

Tablo 16. Centroid analizi verileri

Faj Adı	MOI	CI
KS-1 EC	MOI:1	0,10
KS-2 O157H7	MOI:1	0,108
KS -2 EC	MOI:1	-0.2
KS-2 11A	MOI:1	0.37
KS-4 O157H7	MOI:1	0.25
KS-5 O157H7	MOI:1	0.51
LÇ-O157H7	MOI:1	0,18
K-2 11A	MOI:1	0,07
H-2 O157H7	MOI:1	0.44
H-3 O157H7	MOI:1	0.52
H-4 O157H7	MOI:1	0.51
T-3 O157H7	MOI:1	0,11
FAK-2 O157H7	MOI:1	0.45
FAK-2 E-15	MOI:1	0.38
KH O157H7	MOI:1	0,19
Bİ O157H7	MOI:1	0.45

Çalışmada, farklı MOI seviyelerinde (0,1, 1 ve 10) fajların enfeksiyon etkinliği CI değerleri ile yorumlandı. Tablo 15 ve Tablo 16’da gösterilen CI değerleri, fajların bakteriyel büyümeyi inhibe etme etkinliğini göstermektedir. K-1 fajının, *E.coli* O157:H7 suşuna karşı enfeksiyon etkinliğine bakıldığında CI değeri MOI arttıkça düzenli bir şekilde artmış ve MOI: 10’da en yüksek CI değeri (0.80) elde edildi. Bu faj, tüm MOI değerlerinde etkili olup, özellikle yüksek MOI’de en etkili faj olduğu tespit edildi.

K-3 fajı, *E.coli* O157H7 suşuna karşı MOI: 0,1 (0.41) ve MOI: 1’de (0.42) sabit bir CI değeri gösterdi, ancak MOI: 10’da belirgin bir artışla yüksek bir CI değeri (0.75) elde edildi. Yüksek MOI’de oldukça etkili bir fajdır. W-3 fajı *E.coli* O157:H7 suşuna karşı MOI: 0,1 (0.51), MOI: 1 (0.53) ve MOI: 10 (0.70) değerleri ile MOI arttıkça düzenli bir şekilde artış gösterdi ve MOI: 10’da yüksek bir CI değeri elde edildi. Tüm MOI değerlerinde etkili bir faj olarak değerlendirildi.

W-8 fajı, *E.coli* E-57 suşuna karşı MOI: 0,1 (0.56), MOI: 1 (0.59), MOI: 10 (0.67) değerlerinde, MOI arttıkça düzenli bir şekilde CI artışı göstermiş ve MOI: 10’da yüksek bir CI değeri elde edildi. KS fajı, *E.coli* E-57 suşuna karşı MOI: 0,1’de CI değeri 0.59 olup, düşük MOI seviyesinde bile başarılı bir enfeksiyonla yüksek inhibisyon etkisi gösterdi. MOI: 1’de CI değeri 0.59, MOI: 10’da ise 0.60 olarak tespit edildi. KS fajı, tüm MOI seviyelerinde başarılı bir enfeksiyon gerçekleştirmiş olup, MOI artışıyla CI değerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmedi.

W-1 fajı, *E.coli* E-15 suşuna karşı MOI: 0,1 (0.45), MOI: 1 (0.42), MOI: 10 (0.54) değerleriyle artış eğilimi göstermiş ve MOI: 10’da en yüksek CI değerine ulaşmıştı görüldü. Özellikle yüksek MOI’de etkili bir fajdır. W1-9 fajı, *E.coli* EC suşuna karşı MOI: 0,1’de CI değeri 0.25, MOI: 1’de 0.39, MOI: 10’da 0.42 olarak hesaplandı. W1-9 fajı, tüm MOI seviyelerinde başarılı bir enfeksiyon gerçekleştirmiş olup ve MOI arttıkça inhibisyon etkisinin yükseldiği tespit edildi.

T1/2 fajı, *E.coli* EC suşuna karşı MOI: 0,1’de CI 0,16, MOI: 1’de 0.27, MOI: 10’da 0.30 olarak tespit edildi. T1/2 fajı, her MOI seviyesinde enfeksiyon gerçekleştirmiş olmasına rağmen, CI değerlerinin düşük olması nedeniyle inhibisyon etkisi sınırlı kaldığı tespit edildi. T-2 fajı, *E.coli* EC suşuna karşı MOI: 0,1’de CI 0,16,

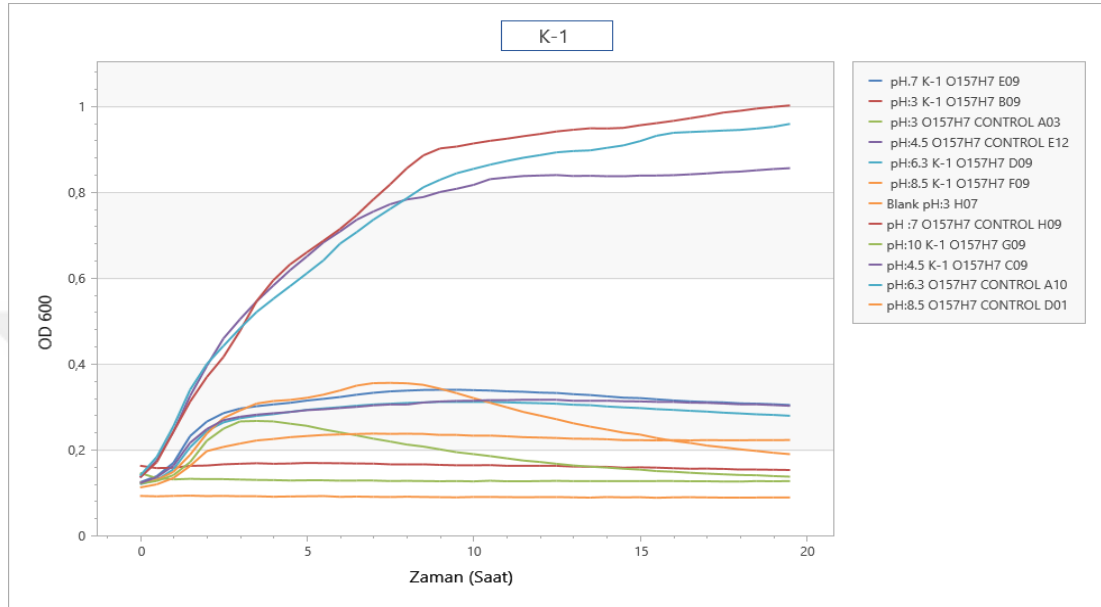
MOI: 1'de 0,12, MOI: 10'da 0,17 olarak hesaplandı. CI değerlerinin düşük olması nedeniyle inhibisyon etkisinin sınırlı olduğu görüldü.

W-2 fajı, *E.coli* EC suşuna karşı MOI: 0,1'de CI 0.24, MOI: 1'de 0.36, MOI: 10'da 0.59 olarak elde edildi. Tüm MOI seviyelerinde başarılı bir enfeksiyon gerçekleştiren W-2, yüksek MOI düzeyinde belirgin bir inhibisyon artışı gösterdi. H-1 fajı, *E.coli* EC suşuna karşı MOI: 0,1'de CI 0.04, MOI: 1'de CI 0,16, MOI: 10'da CI 0.06 olarak hesaplandı. Her ne kadar tüm MOI seviyelerinde enfeksiyon gerçekleşmiş olsa da CI değerlerinin oldukça düşük olması, sınırlı bir inhibisyonu işaret etmekte olduğu görüldü.

Sonuçlar incelendiğinde, en etkili fajlar olarak *E.coli* O157:H7 suşuna karşı W-3, K-3 ve K-1; *E.coli* E-57 suşuna karşı ise W-8 ön plana çıktığı gözlemlendi. Bu fajlar özellikle yüksek MOI seviyesinde (MOI 10) en yüksek CI değerlerine ulaşarak bakteriyel büyümeyi etkili bir şekilde inhibe etmiştir. Ayrıca, KS fajının düşük MOI seviyesinde dahi yüksek performans gösterdiği tespit edildi.

3.7. Fajların Farklı Sıcaklık ve pH ortam Şartlarına Dayanıklılıklarının Belirlenmesi

Faj çoğalma kinetik analizleri neticesinde, teröpotik potansiyeli yüksek olarak belirlenen beş fajın, farklı pH ortamlarının (3,0 4,5, 6,3, 7,0, 8,5, 10) çoğalmaları üzerindeki etkileri değerlendirildi.

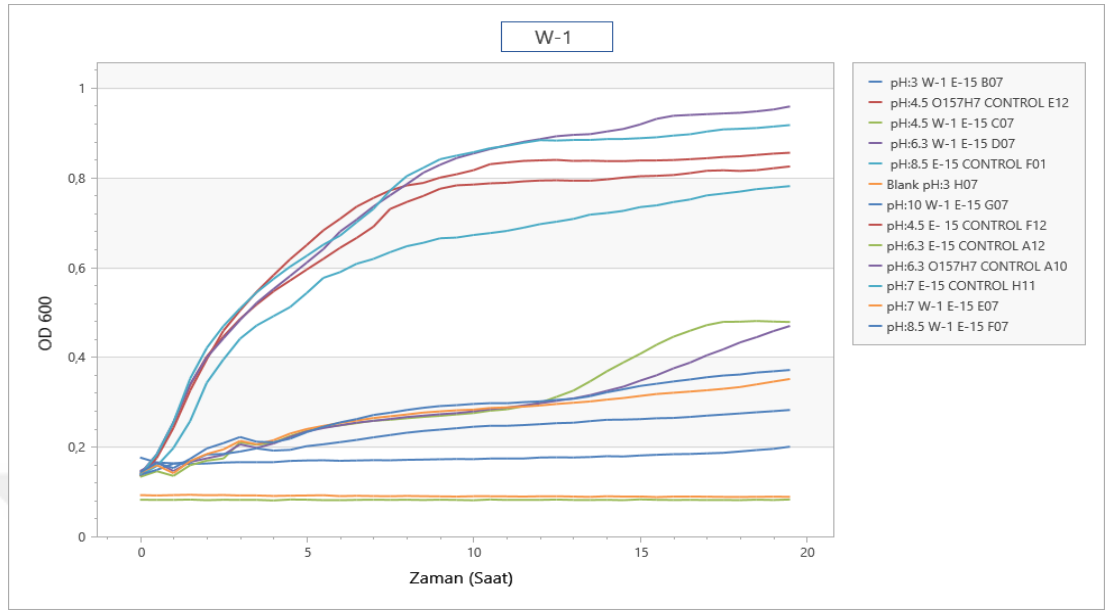


Şekil 36. Farklı pH koşullarında (pH 3,0-10) K-1 fajlarının *E. coli* O157H7 üzerine inhibisyon etkisi. Yapılan deneyde; kontrol grupları faj uygulanmayan *E. coli* kültürlerini, faj grupları ise ilgili fajın MOI:1 oranında uygulandığı *E. coli* kültürlerini göstermektedir. Bakteriyel üreme, spektrofotometrik olarak OD₆₀₀ değerleri ölçülerek 20 saat boyunca takip edilmiştir.

Farklı pH değerlerinde bakteri kontrol gruplarının büyüme eğrileri incelendiğinde, düşük pH'larda (pH 3,0 ve 4,5) bakterilerin çok sınırlı üreme gösterdiği görüldü. Bu pH'larda gözlenen düşük OD₆₀₀ değerleri, K-1 faj enfeksiyonundan değil, asidik ortamın bakteriyel büyümeyi engellemesinden kaynaklandığı düşünüldü. Bu nedenle düşük pH'lardaki faj enfeksiyon etkinliği değerlendirmesi yanıltıcı olabilmektedir.

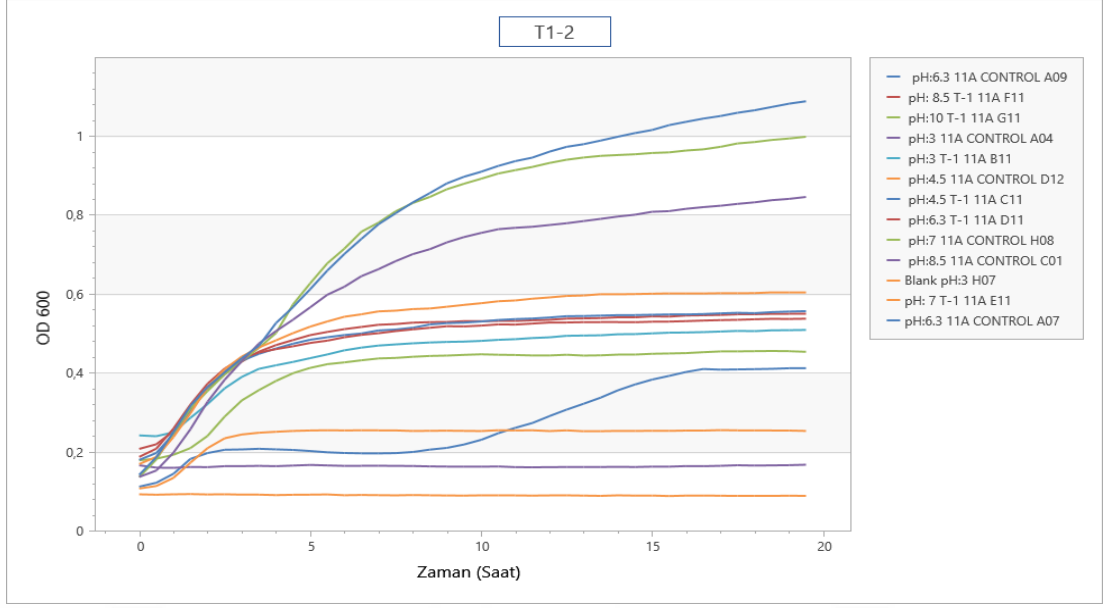
Faj enfeksiyonunun etkisine bakıldığında, özellikle pH 6,3 ve 8,5 gibi nötre yakın pH'larda faj uygulanmış *E. coli* O157:H7 E-15 gruplarında belirgin bir lizis gözlemlendi. Bu pH'larda OD₆₀₀ değerleri 0.2-0.4 aralığında seyretmektedir. Bu durum, K-1 fajının bu pH aralığında etkili bir enfeksiyon gerçekleştirdiğini gösterdi. Buna karşılık pH 6,3 ve 8,5'te bakteri kontrol grupları normal üreme gözlemlendi. Bu pH'larda K-1 fajı uygulanmış gruplardaki OD₆₀₀ düşüşleri gerçek faj aktivitesini yansıttığı tespit

edildi. Dolayısıyla faj etkinliği değerlendirmesi için bu pH aralığı daha güvenilir sonuçlar sunduğu belirlendi.



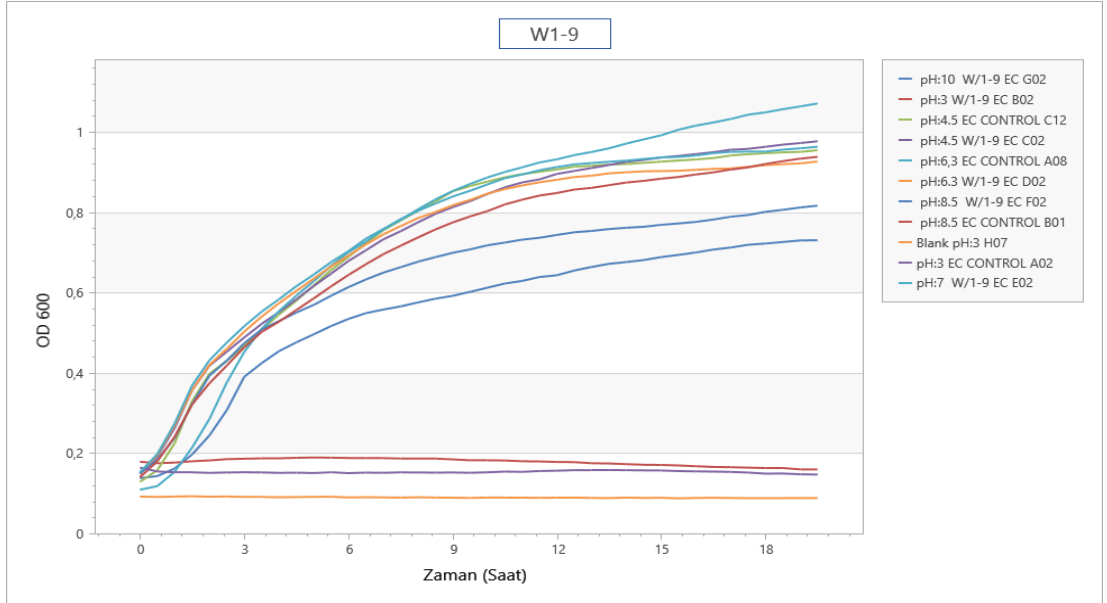
Şekil 37. Farklı pH koşullarında (pH 3,0-10) W-1 fajının *E. coli* E-15 üzerine inhibisyon etkisi.

E. coli E-15, pH 6,3–7,0 aralığında en hızlı ve yüksek seviyede üreme gösterdi. Asidik (pH < 6,0) ve bazik (pH > 8,0) ortamda bakteri üremesi genel olarak daha yavaş ve sınırlı kalmaktadır. En belirgin faj inhibisyonu, *E.coli*'nin optimum ürediği pH 6,3-7,0 aralığında gözlemlendi. Bu pH değerlerinde faj, *E. coli* üremesini önemli ölçüde baskılamış; OD₆₀₀ değerleri kontrol gruplarına kıyasla belirgin şekilde düşük (örneğin 0,2–0,4 civarı) seyrettiği görüldü. pH değerleri asidik ya da bazik yönde uçlara gittikçe (pH < 6,0 veya pH > 8,0), fajların inhibisyon kapasitesinde azalma görüldü. Uygulamada, nötre yakın ortamlar bakteriyel enfeksiyon kontrolünde faj tedavisinin daha verimli olduğu görüldü.



Şekil 38. Farklı pH koşullarında (pH 3,0-10) T1-2 fajının *E. coli* 11A üzerine inhibisyon etkisi.

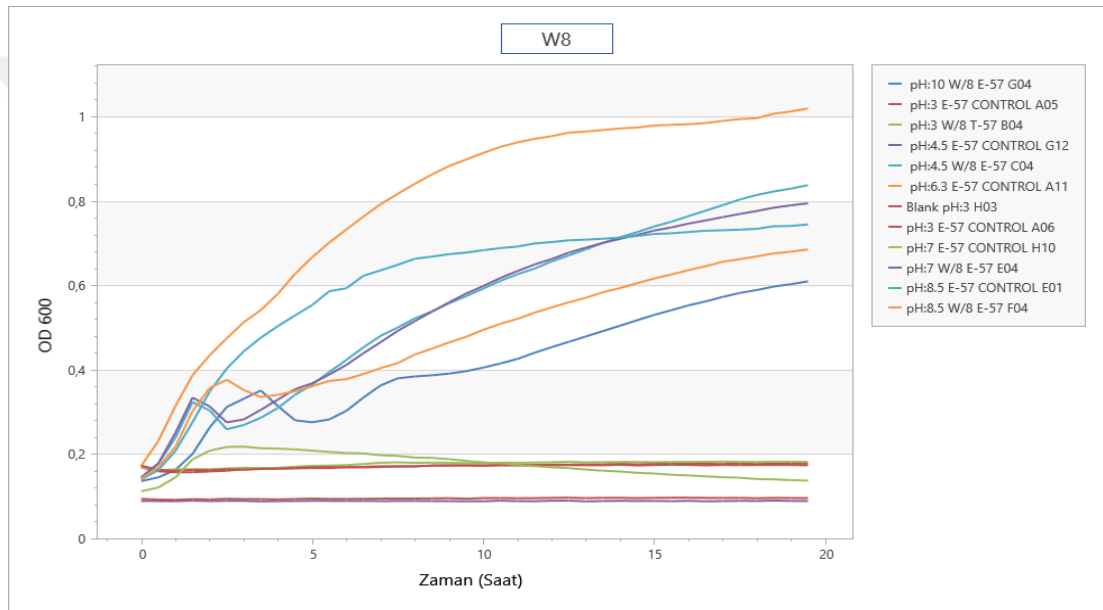
Asidik ve bazik uç pH değerlerinde bakteriyel üreme daha yavaş ve daha düşük seviyelerde olduğu tespit edildi. Faj uygulanan gruplarda bakteriyel üreme önemli ölçüde inhibe edildiği gözlemlendi. İnhibisyon etkisi pH koşullarına göre farklılık göstermektedir. pH 6,5-7,0 aralığı optimum inhibisyon için en uygun aralık olarak görülmekte olup, özellikle pH 7,0 civarında en etkili sonuçlar elde edildi.



Şekil 39. Farklı pH koşullarında (pH 3,0-10) W1-9 fajının *E. coli* EC üzerine inhibisyon etkisi.

Elde edilen büyüme verilerine göre pH 6,3 ve pH 7,0 gibi *E. coli* EC'nin optimumuna yakın ürettiği değerlerde, W1-9 fajı kontrol grubuna kıyasla çok daha düşük OD₆₀₀ değerlerinde (0,2–0,4/bazen 0,5 civarında) kaldığı belirlendi.

pH 4,5 veya pH 8,5 gibi ortalama asidik/bazik koşullarda da kontrol grubuna göre kayda değer bir azalma gözlemlendi; ancak inhibisyon, pH 6,3–7,0 aralığındaki kadar çarpıcı değildi. Uç değerler olan pH 3,0 veya pH 10'da bakteri üremesi zaten kısıtlı olduğu için faj etkisinin farkı grafikte daha az görüldü yine de W1-9 uygulanan gruplar çoğunlukla kontrolün altında kalmayı sürdürdü ve W1-9 fajı, özellikle pH 6,3–7,0 gibi bakterinin de hızlı çoğaldığı aralıkta en etkili inhibisyonu sergilediği tespit edildi

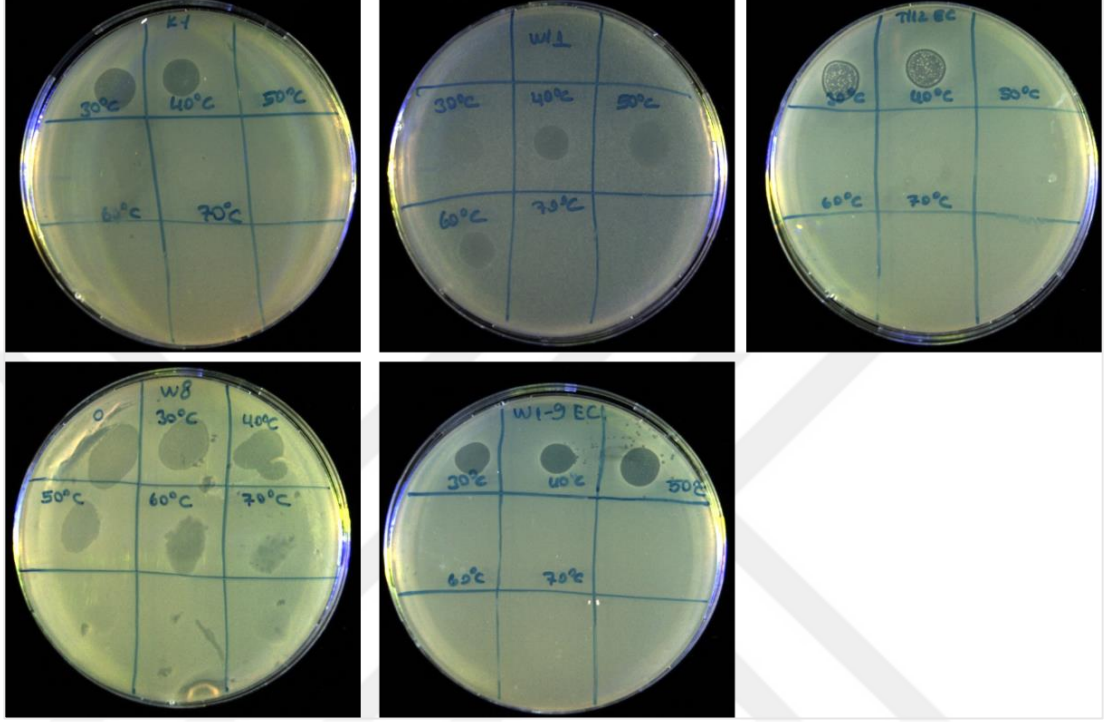


Şekil 40. Farklı pH koşullarında (pH 3,0-10) W-8 fajının *E. coli* E-57 üzerine inhibisyon etkisi

Şekilde gösterilen eğriler incelendiğinde; pH 6,3-7,0 aralığında *E. coli* E-57 kontrol grupları en yüksek OD₆₀₀ değerlerine (0,8-1,0) ulaştı. pH 4,5 (asidik) ve pH 8,5 (bazik) koşullarda orta düzeyde üreme gerçekleşirken pH 3'te bakteriyel üreme oldukça sınırlı kaldığı görüldü. pH 4,5 ve pH 8,5'te fajın orta düzeyde inhibisyon etkisi gözlemlendi. pH 3'te bakteriyel üreme zaten düşük olduğundan inhibisyon etkisi çok belirgin olmadığı görüldü.

W-8 fajı en etkili inhibisyonu pH 6,3-7,0 aralığında gösterdi. Nötr pH'ya yakın değerler hem faj aktivitesi hem de bakteri kontrolü için optimum olduğu tespit edildi.

Faj çoğalma kinetik analizleri neticesinde, teröpotik potansiyeli yüksek olarak belirlenen beş faj, 60 dakika boyunca 30°C, 40°C, 50°, 60°C, 70°C olmak üzere farklı sıcaklıklara maruz bırakıldıktan sonra dayanıklılıklarına ilişkin olarak petri üzerindeki litik alanlar Şekil 41’ de gösterildi.



Şekil 41. Fajların farklı sıcaklık şartlarında spot test ile litik aktivitelerinin gösterimi

Fajların termal stabilitesine bakıldığında K-1 ve T1-2 fajları en fazla 40° C de aktifliğini koruyabilirken, W1-9 fajı 50° C de W8 ve W1 fajlarıda 60°C de litik aktivitesini devam ettirebildiği gözlemlendi.

3.8. Fajların PZR ile Karakterizasyonu

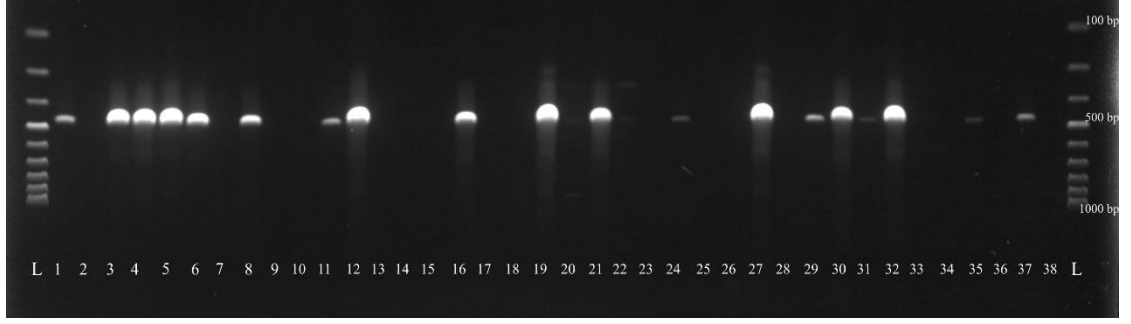
Çalışma kapsamında izole edilen toplam 27 adet faj, moleküler karakterizasyon amacıyla PZR metodu kullanılarak genomik düzeyde incelendi. DNA ekstraksiyon işleminin ardından, viral familyalara özgü spesifik genler hedeflenerek tiplendirme gerçekleştirildi. Faj JK06 için spesifik primerler ile herhangi bir pozitif sonuç elde edilemedi. Ayrıca mevcut primerler kullanılarak 4 adet faj tiplendirilemedi.

Tablo 17’ de, her bir fajın moleküler karakterizasyonu ve tiplendirme sonuçları listelendi.



Tablo 17. İzole edilen fajlara ait moleküler karakterizasyon bulguları

	Faj Numara	Moleküler Karakterizasyon (PZR)
1	W1-9	Tiplendirilemedi
2	T1/2	T-4 like
3	K-1	T-4 like + Mzia
4	K-2	T-4 like
5	K-3	T-4 like
6	KS-1	T-4 like Mzia
7	KS-2	T-4 like
8	KS-3	T-4 like
9	KS-4	T-4 like
10	KS-T57	T-4 like
11	H-1	RAPD-PZR
12	H-2	T-4 like
13	H-3	T-4 like
14	H-4	T-4 like
15	Fak-2	RAPD-PZR
16	Bi	T-4 like Mzia
17	LÇ-1	Tiplendirilemedi
18	Ç-1	T-4 like Mzia
19	T2	T-4 like
20	W-1	T-4 like Mzia
21	W-2	T-4 like T-7 like
22	W-3	T-4 like T-7 like
23	W-8	T-7 like Mzia
24	KH	RAPD-PZR
25	KS-5	Tiplendirilemedi
26	Fak-1	Tiplendirilemedi
27	T-3	T-4 like

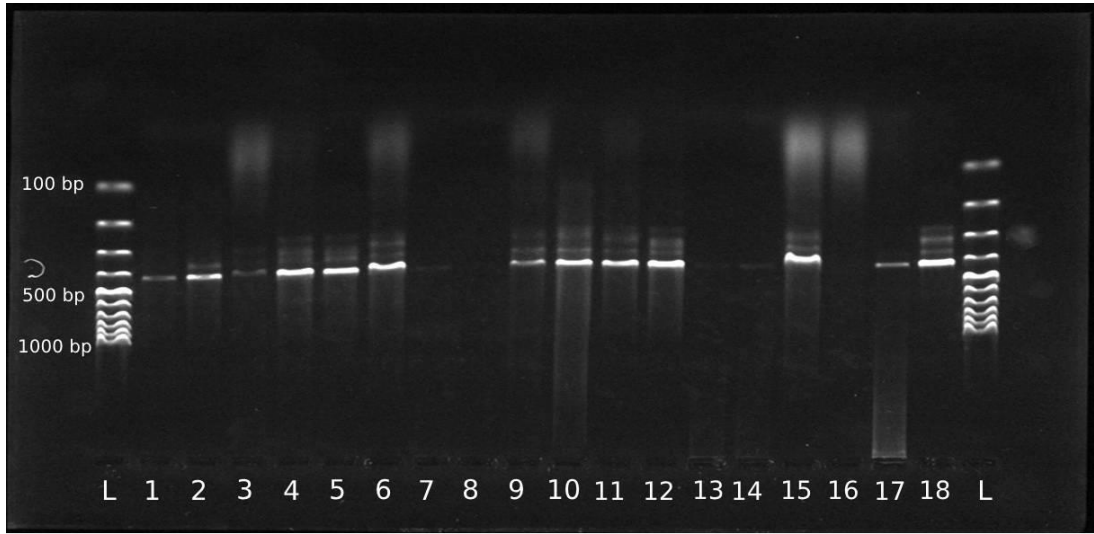


Şekil 42. *Myoviridae* (T4 benzeri fajlar) için g23 primerleri ile yapılan PZR'ye ait jel görüntüsü L:3 Kb Ladder Görüntüde pozitif 1, 3, 4, 5, 6, 8, 11, 12, 17, 20, 22, 24, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 35, 37 numaralı örneklerde 450 bp uzunluğunda bantlar görülmektedir.

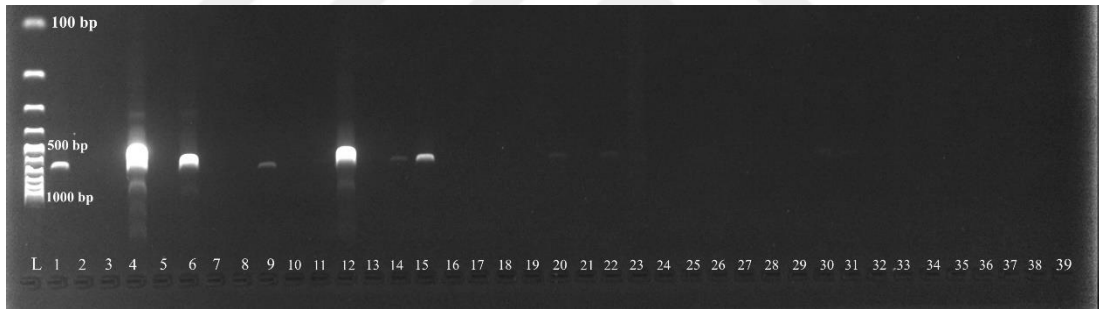


Şekil 43. *Myoviridae* (T4 benzeri fajlar) için g23 primerleri ile yapılan PZR 'a ait jel görüntüsü. L:3 Kb Ladder Görüntüde pozitif 1, 2, 3, 5, 13 numaralı örneklerde 450 bp uzunluğunda bantlar görülmektedir.

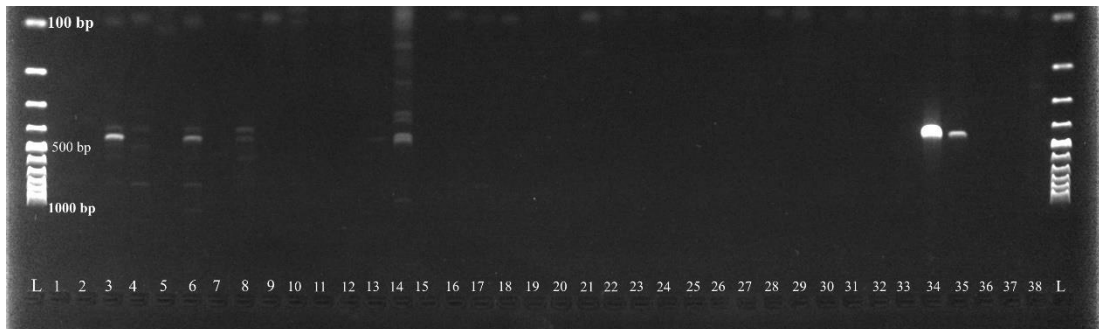
PZR analizlerinde dört farklı viral familya için spesifik primerler kullanıldı. *Siyanomiyovirüsler* (T7 benzeri fajlar) için g20 primerleri seçildi; bu primerler portal-vertex-kapsid protein genini hedefleyerek yaklaşık 600 bp uzunluğunda bir amplicon elde edilmesini sağladı. *Myoviridae* (T4 benzeri fajlar) için ise g23 primerleri kullanıldı; bu primerler ana kapsid protein genini çoğaltarak PZR ürünleri elde edildi.



Şekil 44. Fajlaryn (T-4 like) g23 primerlerine ait familya spesifik PZR reaksiyonu jel elektroforez görüntüsü L:3 Kb Ladder Jel görüntüsünde 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 17 ve 18 numaralı örnekler pozitif olup 450 bp uzunluğunda bantlar gözlemlendi.



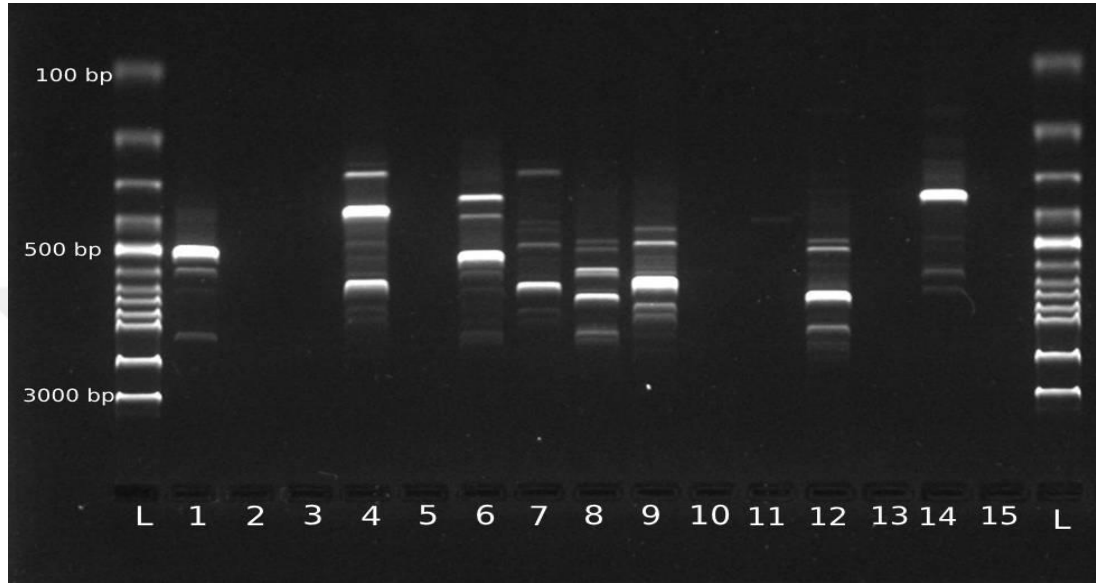
Şekil 45. Mzia (T-4 like) primerlerine ait PZR reaksiyonu jel elektroforez görüntüsü L:3 Kb Ladder Jel görüntüsünde, pozitif sonuç veren 4, 6, 9, 12, 14 ve 15 numaralı örneklerde 650 bp uzunluğunda belirgin bantlar gözlemlendi.



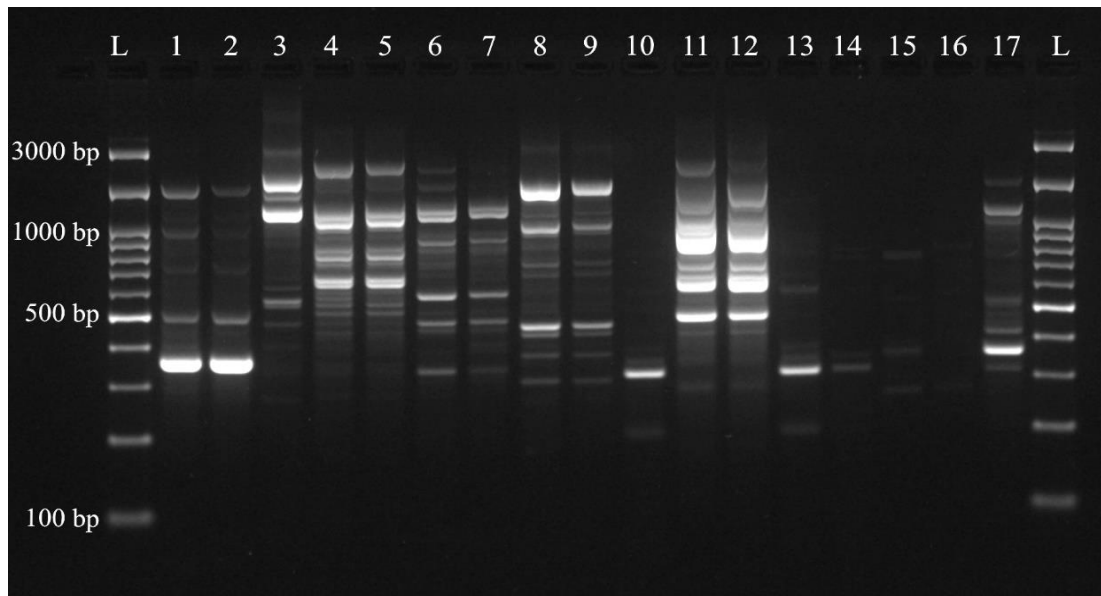
Şekil 46. g20 (T-7 like) primerlerine ait familya spesifik PZR reaksiyonu jel elektroforez görüntüsü L:3 Kb Ladder Jel görüntüsünde, pozitif 3, 34 ve 35 numaralı örneklerde 450 bp uzunluğunda belirgin bantlar gözlemlendi.

3.9. RAPD-PZR

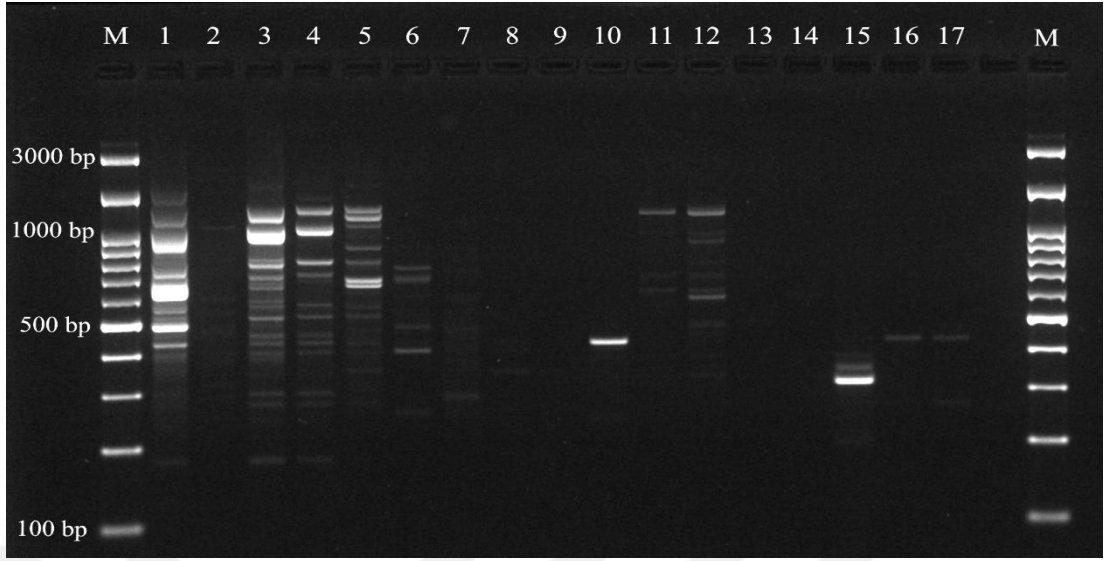
RAPD-PZR reaksiyonu ile incelenen fajlar arasındaki genetik çeşitlilik ve varyasyonlar P1 primeri kullanılarak RAPD-PZR belirlendi. Jel üzerinde görülen bantlar, farklı DNA parçalarının amplifikasyonunu temsil etmektedir. Jel görüntüsü Şekil 47, Şekil 48 ve Şekil 49’ da verildi.



Şekil 47. P1 primerine ait RAPD-PZR jel elektroforez görüntüsü L:3 Kb Ladder, 1: Bİ, 4: Ç1, 6: FAK2, 7: H-1, 8: H-2, 9: H4, 12: KH, 14: KS fajlarına ait bant desenleri



Şekil 48. P1 primerine ait RAPD-PZR jel elektroforez görüntüsü M:3 Kb Ladder 1-17: W3, 2: Bİ, 4: Ç1, 6-7: W8, 9: Fak 2, 11: H-2, 13: KH, 15: W-2 fajlarına ait bant desenleri



Şekil 49. P1 primerine ait RAPD-PZR jel elektroforez görüntüsü L:3 Kb Ladder, 5: H-1, 8: H-4, 10: K-1, 12:KS, 15:T1/2, 17: W1, 18:W8 fajlarına ait bant desenleri

Jel görüntülerinde çok sayıda farklı bant desenleri gözlemlendi. Sütunlar arasındaki bant desenlerinin farklılığı, fajlar arasındaki genetik varyasyon olduğunu gösterdi. Bazı sütunlarda benzer bant desenleri görüldü, bu durumda bu fajların genetik olarak daha yakın olduğu tespit edildi.

3.10. Faj Genom Sekans Analizi

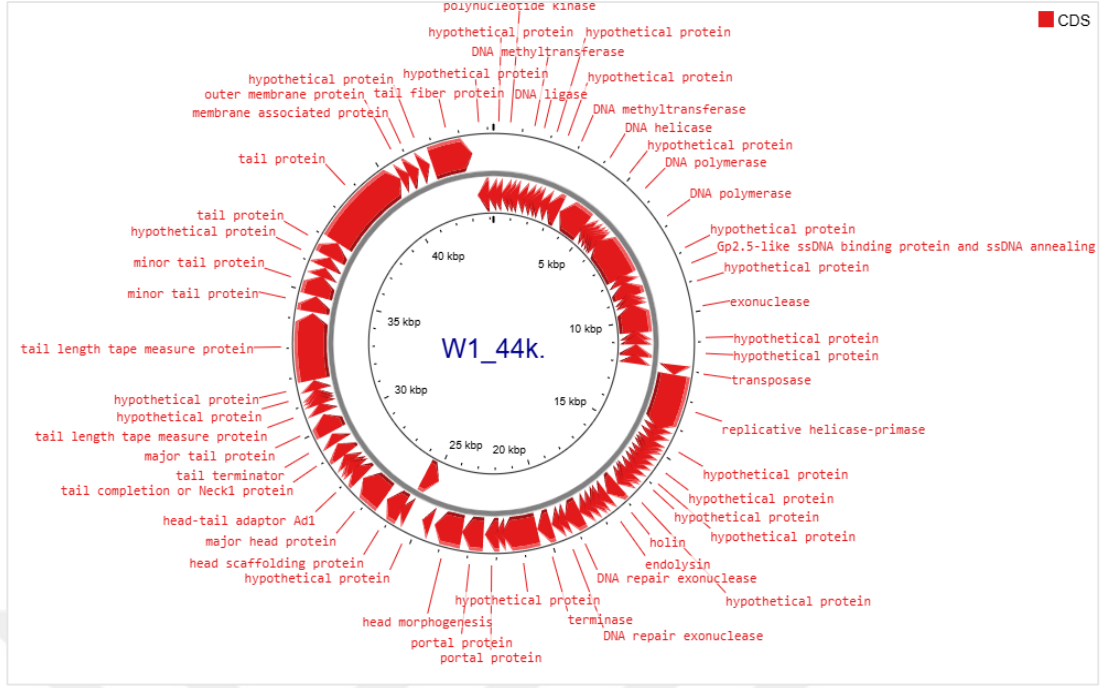
W-1, W-1/9, W8, K-1, T1/2 fajlarının genomuna ait genel özellikler Tablo 18 'de sunuldu. Genom analizleri neticesinde tüm fajların aynı aileye ait olduğu tespit edildi. Gen Bank nükleotit veri tabanında yüksek benzerlik gösterdiği fajlar Tablo 19' da sunuldu. En yakın benzerlik gösteren fajların, uzunlukları 44.890 ile 51,000 bp arasında değişen doğrusal bir çift sarmallı DNA genomuna sahip olduğu tespit edildi.

Fajların GC oranı ise sırasıyla W1 için %54,60; K-1 için %54,63; T1/2 için 54,67; W1/9 için %54,55; W8 için %54,67 olarak belirlendi (Tablo 18). Faj terminaz küçük alt birimi, faj terminaz büyük alt birimi, faj portal proteini ve faj major kapsid proteinleri ve kuyruk proteinlerini kodlayan CDS'ler, incelenen 5 kolifaj genom dizisinin tamamında tanımlandı. Bu genler, genel bir gen sıralamasıyla aynı korunmuş genom yapısını sergilediği görüldü.

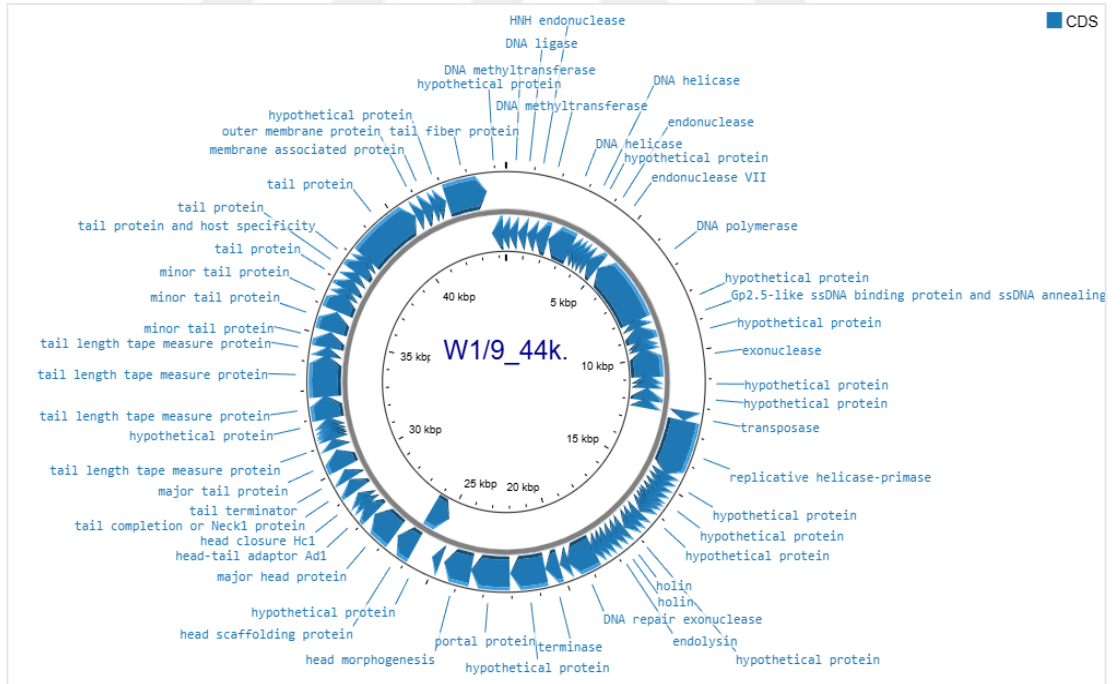
Genom anotasyonları sonucunda; K1 fajında 62, W1 fajında 58 ve W1/9 fajında 60 CDS tahmin edildi. CDS lerin sırasıyla 13'ü, 14'ü ve 13'ü varsayımsal proteinler olarak tahmin edildi Benzer şekilde, T1/2 ve W8 fajlarının herbirinde 71 CDS tahmin edildi, bu genlerden sırasıyla 17 'si ve 13 'ü varsayımsal protein olarak sınıflandırıldı ve Pharokka verileri (Bkz. EK-A) belirtildi.

Tablo 18.Faj genomlarının taksonomik tanımlaması ve genomik özellikleri

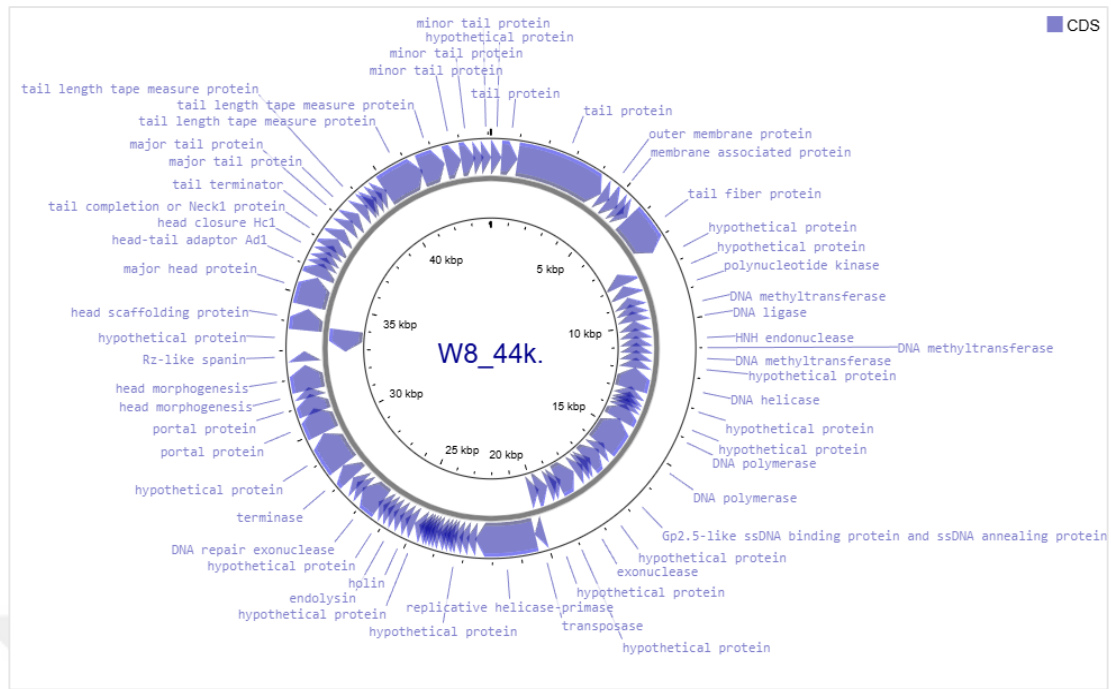
Faj	Boyut (bp)	Bütünlük Score	GC Oranı (%)	CDS	Taksonomi	Virülens Faktör	AMR Gen	tRNA	İntegraz Varlığı	Yaşam Döngüsü
W1	44204	150	54,60	58	<i>Caudoviricetes</i>	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Virulent
K1	44492	150	54,63	62	<i>Caudoviricetes</i>	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Virulent
T1/2	44888	150	54,67	71	<i>Caudoviricetes</i>	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Virulent
W1/9	44402	150	54,55	60	<i>Caudoviricetes</i>	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Virulent
W8	44098	150	54,67	71	<i>Caudoviricetes</i>	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Virulent



Şekil 50. Faj W-1'in genomik haritası. Harita Proksee ile oluşturuldu.



Şekil 51. Faj W 1/9' un genomik haritası. Harita Proksee ile oluşturuldu.



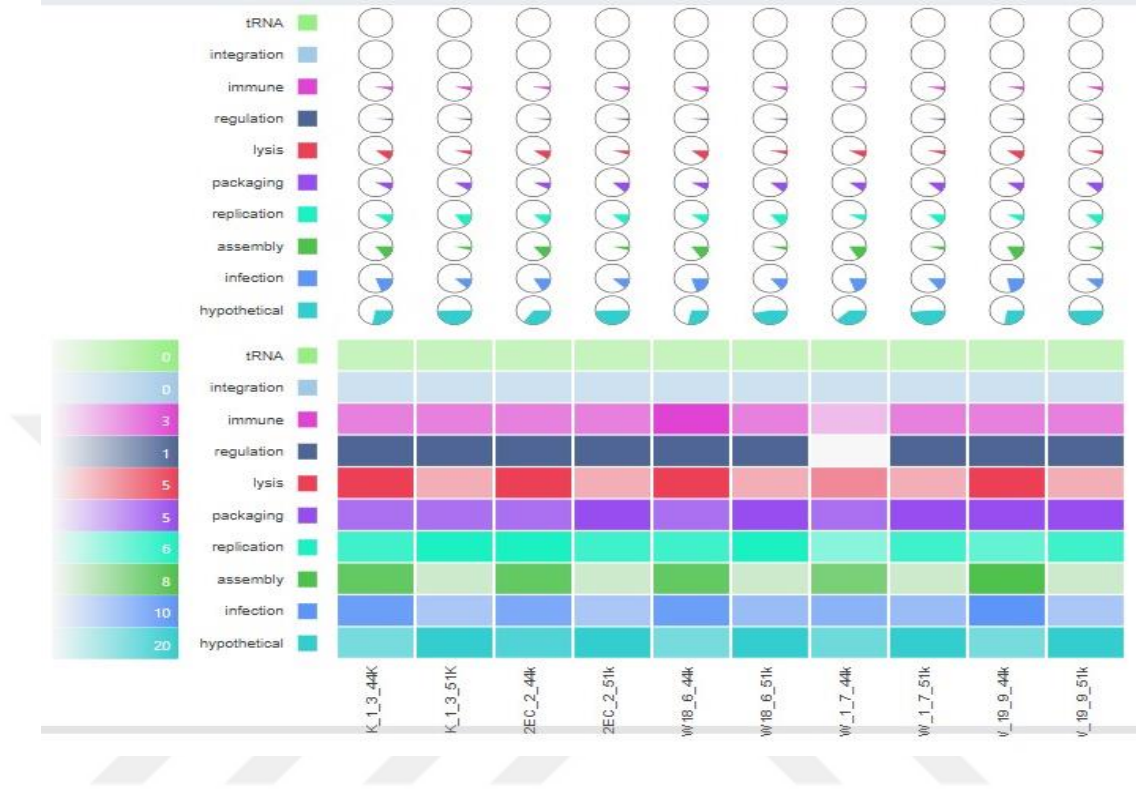
Şekil 54. W8'nin genomik haritası. Harita Proksee ile oluşturuldu.

Tahmin edilen CDS'ler yapısal proteinleri (ana kapsid, taban plakası ve kuyruk lifi), konak lizisini (endolizin, holin ve spanin) ve diğer işlevleri (DNA replikasyonu/transkripsiyonu, onarım/paketleme proteinleri) kodladığı tespit edildi ve her bir faj için çizilen sirküler genomik haritalarda tahmin edilen proteinler Şekil 50, Şekil 51, Şekil 52, Şekil 53, Şekil 54'te görselleştirildi. Ayrıca beş fajında genom yapılarında gp2.5 ss DNA bağlanma proteinine sahip olduğu belirlendi. Tüm faj genomlarında istenmeyen (antimikrobiyal direnç, virülans, toksinler, mobil genetik element) özellikleri kodlayan hiçbir gen tespit edilmedi.

Lizis genleri olarak, tüm fajlar, konakçının enfeksiyonu sırasında bakteri hücre duvarının parçalanmasından sorumlu proteinler olan endolizirlere ve holinlere sahip olduğu görüldü. Ayrıca W1, W8, W1/9 fajlarında da RS-like spanin proteini belirlendi.

Ayrıca, hiçbir genomda integraz, veya tRNA geni tanımlanmadı. Faj W1'de anti-CRISPR savunma sistemi proteinine rastlandı. Ayrıca, tüm faj genomlarında faj ekzonükleazları tanımlandı ve her bir faj için bu ekzonükleazları kodlayan CDS'ler belirlendi. Bununla birlikte, hiçbir faj genomunda bir integrazı kodlayan gen tespit edilmedi. Bu durum, fajların litik döngüde aktif ve virulan olduğunu, dolayısıyla

konak hücre genomuna entegre olmadığını göstermektedir. Ayrıca Phage Scope üzerinde yer alan Graphage aracılığı ile tarafından beş faj için de virülan olduğu doğrulandı.



Şekil 55. Tahmin edilen protein sınıflarının dağılımı. Görsel Phagescope ile oluşturuldu.

Faj genomları boyunca tahmin edilen varsayımsal proteinlerin dağılımı incelendiğinde; virion morfogenez (yeşil), DNA paketlenmesi ve replikasyonu (mor ve açık mavi), lizis (kırmızı), enfeksiyon (mavi) ile varsayımsal proteinlere (turkuaz) ait genlerin oluşturduğu belirgin bir modüler organizasyon gözlemlendi.

Genomik analizler sonucunda dağılım olarak; K-1 fajı genomunun %4,35'inin savunma, %2,17'sinin düzenleyici, %10,7'sinin lizis, %8,7'sinin paketlenme, %10,8'inin replikasyon, %15,22'sinin morfogenez, %19,57'sinin enfeksiyon ve %28,26'sının varsayımsal proteinlerden oluştuğu belirlendi. Benzer şekilde, T1/2 faj genomunun %4 savunma, %2 düzenleyici, %10 lizis, %8 paketlenme, %12 replikasyon, %14 morfogenez, %16 enfeksiyon ve %34 oranında varsayımsal protein içerdiği tahmin edildi.

W8 fajında bu oranlar sırasıyla %6,38 savunma, %2,13 düzenleyici, %10,64 lizis, %8,51 paketleme, %10,64 replikasyon, %14,89 morfogenez, %19,15 enfeksiyon ve %27,66 varsayımsal protein olarak hesaplandı. W1 fajının ise %2,63 savunma, düzenleyici gen içermeyen (%0), %7,89 lizis, %10,53 paketleme, %7,89 replikasyon, %15,97 morfogenez, %18,42 enfeksiyon ve %36,84 oranında varsayımsal protein taşıdığı tahmin edilmiştir. Son olarak, W1/9 faj genomunun %4,17 savunma, %2,08 düzenleyici, %10,42 lizis, %10,42 paketleme, %8,33 replikasyon, %16,67 morfogenez, %20,03 enfeksiyon ve %27,08 varsayımsal protein oranına sahip olduğu belirlendi.

Çoklu NGS genom karşılaştırmaları yoluyla 5 kolifajın taksonomik sınıflandırması yapılmıştır. ICTV yönergelerine göre, faj ailesi, alt ailesi ve cinsi genom benzerliğine dayalı olarak tahmin edilmiştir. Sonuçlar Tablo 19’ da gösterildi.

Tablo 19.Fajların taksonomik özellikleri

Örnek Adı	Blast Sonucu En Yakın Organizma	Blast Sonucu En Yakın Organizma Genbank ID	Query Coverage	Pairwise Identity
K_1_44k	Escherichia phage KS_S9	PP920551	93%	93.56%
K_1_51k	Shigella phage SH6	KX828710	93%	92.97%
T1/2_44k	Escherichia phage KS_S9	PP920551	95%	93.70%
T1/2_51k	Escherichia phage vB_EcoS_Chapo	MT682715	93%	92.43%
W8_44k	Escherichia phage KS_S9	PP920551	97%	93.70%
W8_51k	Escherichia phage vB_EcoS_Chapo	MT682715	92%	93.22%
W1_44k	Escherichia phage slur05	LN881730	88%	92.13%
W1_51k	Escherichia phage vB_EcoS_Chapo	MT682715	93%	93.22%
W1/9_44k	Escherichia phage KS_S9	PP920551	%93	%93.70
W1/9_51k	Escherichia phage vB_EcoS_Chapo	MT682715	%92	93.22%

4. TARTIŞMA

Bakterilerde antimikrobiyal direncin ortaya çıkması ve küresel olarak yayılması, insan ve hayvanlarda bulaşıcı hastalıkların tedavisinde mevcut antibiyotiklerin etkinliğini hızla sınırlamaktadır (Prestinaci ve ark 2015, WHO 2018). Neonatal buzağı ishali, sığır endüstrisinde önemli bir sağlık sorunu olarak öne çıkmakta ve genellikle *E. coli* çeşitli patotiplerinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca, Shiga toksini üreten *E. coli* (STEC) ve enterotoksijenik *E. coli* (ETEC) gibi hibrit suşların tespit edilmesi, bu suşların potansiyel halk sağlığı etkileri konusunda endişeleri artırmaktadır (Aref ve ark 2018; Kolenda ve ark 2015).

Buzağılarda çoklu ilaca dirençli *E. coli* suşlarının ortaya çıkması, veteriner saha uygulamalarında tedavi yaklaşımlarının dikkatli bir şekilde izlenmesini ve antibiyotiklerin akılcı kullanımını zorunlu kılmaktadır (Feuerstein ve ark 2021). Antimikrobiyal dirençteki hızlı artış, klasik antibiyotik tedavilerinin etkinliğini önemli ölçüde azaltmakta ve bu durum, faj terapisi gibi alternatif biyolojik yöntemlere olan ihtiyacı giderek daha belirgin hale getirmektedir. Fajların konakçıya özgü etki mekanizmaları, antibiyotiklere karşı gelişen direnç sorunlarına karşı daha hedefe yönelik ve seçici bir tedavi stratejisi sunmaktadır. Ancak, fajların bu özgüllüğünden tam anlamıyla yararlanılabilmesi için, in vitro ortamda faj-konakçı çoğalma dinamiklerinin ayrıntılı olarak belirlenmesi gerekmektedir. Bu test süreçleri, hem bireysel tedavi yaklaşımlarının başarısı hem de yüksek terapötik etki gösteren fajların geniş koleksiyonlar arasından seçilmesi açısından kritik öneme sahiptir (Kolenda ve ark., 2024).

Bu çalışmada, fajların bakterilerin bulunduğu tüm ortamlarda yaygın olarak bulunabildiği ve ekosistemlerin çoğunda bakteriyel ve arkeal konak hücrelerinin popülasyon dinamikleri ile gelişimi üzerinde önemli rol oynadığı (Suttle 2005) bilgisi temel alınarak, çeşitli çevresel örneklerden faj izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen 27 fajın çoğalma kinetiği ve moleküler karakterizasyonu detaylı olarak incelenmiştir. Elde edilen bulgular, çevresel kaynaklardan izole edilen fajların, enteropatojenik *E.coli* enfeksiyonlarına karşı potansiyel biyoterapötik ajanlar olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir. Ayrıca, bu fajların çoğalma kinetiği ve moleküler özelliklerinin ortaya konması, hem faj terapisi uygulamalarının etkinliğinin

artırılması hem de dirençli bakteri suşlarına karşı yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi açısından katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışma ile, neonatal buzağı ishallerinin etiyolojisinde rol oynayan farklı virulens profillerine sahip 102 *E. coli* suşlarının dağılımı, patogenezi ve bu suşlara karşı litik aktivite gösteren fajların morfolojik, çoğalma, konakçı etkileşimi ve genomik özelliklerine dair bulgular ortaya konulmuştur. Araştırmada, neonatal ishalleri buzağılardan izole edilen *E. coli* suşunun virulens gen profillerinin analizi gerçekleştirilmiştir. İncelenen 102 *E. coli* izolatının %43,1'inde (44 suş) en az bir virulens geni tespit edilmiştir. Elde edilen bulgular *E. coli*'nin virülansının toksin üretimi ve adezyon mekanizmalarının kombinasyonuna dayandığını gösteren Awad ve ark (2020) ve Belete ve ark (2022) yaptıkları çalışmalar ile uyumludur.

Çalışma kapsamında izole edilen *E. coli* suşlarında, multipleks PZR metodu ile (Stx1, Stx2, K99, F41, Intimin, STa) virulens genlerinin varlığı araştırılmış olup STa geni %17,6, Stx1 geni %17,6 ve Stx2 geni %14,7 oranında tespit edilmiştir. K99 (F5) fimbrial antijeni %10,8, intimin geni %4,9 ve F41 fimbrial antijeni %2 oranında belirlenmiştir. Ok ve ark (2009) yaptıkları çalışmada elde ettikleri STa (%18,9), Stx1 (%13,5) virulens gen oranları ile benzerlik göstermektedir.

Patojenite açısından değerlendirildiğinde ise bu çalışmada STEC suşları %29,4 oranı ile predominant patotip olarak belirlenmiştir. Fakih ve ark (2017) tarafından yapılan çalışmada, ishalleri buzağılarda, insanlarda ciddi hastalıklarla ilişkili olan çeşitli STEC serotipleri tanımlanmıştır. Bu çalışmada izole edilen suşların hem buzağılarda hem de insanlarda enfeksiyona neden olma potansiyelini vurgulayan Stx1 ve eae gibi virülans genlerinin varlığı gösterilmiştir.

Çalışmada tespit edilen %10,8'lik ETEC ve %2'lik EPEC oranları, Sobhy ve ark (2020) ile Khawaskar ve ark (2022) tarafından bildirilen çalışmalarla uyumlu olmakla birlikte, Güler ve ark (2008) ve Öztrürk ve ark (2024) tarafından yapılan farklı coğrafi bölgelerde veya farklı metodolojiler ile yürütülen araştırmalarla karşılaştırıldığında önemli düzeyde farklılıklar sergilemektedir. Konya ve çevresinde yürütülen Güler ve ark (2008) çalışması ile bu tez çalışması arasındaki farklılıkların örnekleme tarihleri ve mevsimsel değişkenlik gibi çevresel faktörlere bağlı olabileceği

düşünülmüştür. Yapılan bir çalışmada *E. coli* patotiplerinin, diğer hayvanlarla birlikte ahırlarda ve toprak zeminde barındırılan buzağılarda daha yüksek oranda tespit edildiği, ayrıca mevsimsel değişikliklerin *E. coli* patotiplerinin yaygınlığını etkilediği ve yılın belirli dönemlerinde daha yüksek oranlarda gözlemlendiği bildirilmiştir (Chekole ve ark 2023). Bu çalışmada tespit edilen *E. coli* patotiplerinin dağılımındaki farklılıkların, çevresel koşullar ve örnekleme zamanlaması gibi faktörlere bağlı değişkenlik gösterebileceği düşünülmektedir.

Cengiz ve Adıgüzel (2020) tarafından yapılan benzer bir çalışmada, *E. coli* suşlarında Stx1 (%3,03), Stx2 (%9,09), STa (%21,21) ve eae (%15,15) genlerinin varlığı raporlanmıştır. Aynı araştırmada, F41 ve F5 genleri tespit edilmezken, ETEC (F5 ve/veya F41 + STa) oranının %51,5, EHEC (Stx + eae) oranının %6,1, EPEC (eae) oranının %15,2 ve STEC (Stx + eae) oranının %12,1 olduğu bildirilmiştir. Sunulan bu çalışma ile Cengiz ve ark. (2020) verileri arasındaki farklılıkların; örneklemenin yapıldığı coğrafik bölge, çalışma gruplarının klinik özellikleri, çevre koşulları ve kullanılan metodolojik yaklaşımlardan kaynaklanan bir çeşitliliği yansıttığı düşünülmektedir. Bu durum, farklı coğrafyalarda ve farklı koşullar altında *E. coli* patotiplerinin popülasyon dinamiklerinin değişebileceğini, neonatal buzağı ishallerinin kontrolü için bölgeye özgü süzveyans ve kontrol programlarının geliştirilmesi gerekliliğini göstermektedir.

Çiftlik yönetimi uygulamalarının *E. coli* suşlarının dağılımı üzerindeki etkisinin incelendiği Engelen ve ark (2021) çalışmasında, *E. coli* O157 ve O26 prevalansının çiftliklerdeki yetiştirme ve besleme uygulamalarından etkilendiği rapor etmişlerdir. Araştırmacılar, daha yüksek hijyen standartlarına ve daha iyi yönetim uygulamalarına sahip çiftliklerde bu patojenik suşların daha düşük oranlarda bulunduğu, hayvan yetiştirme ve besleme koşullarının *E. coli* patotiplerinin dağılımında kritik bir rol oynadığını bildirmişlerdir. Benzer şekilde, yapılan bir derlemede, diyet ve barınma koşulları gibi çevresel faktörlerin çiftlik hayvanlarındaki mikrobiyal popülasyonları önemli ölçüde etkilediği, dolayısıyla patojenik *E. coli* suşlarının yaygınlığını da doğrudan şekillendirdiği bildirilmiştir (Pakbin ve ark 2021). Bu durum, hijyen ve yönetim uygulamalarının iyileştirilmesinin, neonatal buzağı ishallerinin kontrolünde önemli bir strateji olabileceğini göstermektedir.

Belete ve ark (2022), buzağılardan izole edilen *E. coli* suşlarının %13'ünün STEC olarak tanımlandığını ve Stx1 ile Stx2 virülans genlerinin büyük oranda tespit edildiğini bildirmiş olup, Browne ve ark (2018) genç buzağılarda STEC prevalansını %20,3 olarak rapor etmiştir. Bu bulgular sunulan çalışmada elde edilen bulguları desteklemektedir. Bu yüksek prevalans, buzağının STEC için önemli bir rezervuar olduğuna işaret ettiği düşünülmektedir.

Bu çalışmada dikkat çeken diğer bir bulgu ise, farklı patotiplere ait virülans genlerini eşzamanlı olarak taşıyan hibrit/heteropatojen suşların varlığıdır. Toplam 10 hibrit suş tespit edilmiş olup, bunların 7'si STEC/ETEC, 1'i ETEC/EPEC ve 2'si STEC/ETEC/EPEC kombinasyonuna sahip olduğu bulunmuştur. Patojenik *E. coli* suşları üzerinde kapsamlı çalışmalar başladığından beri, insan ve hayvan enfeksiyonlarından bazı hibrit ve hetero-patojenik suşlar izole edilmiştir (Santos ve ark 2020). Bu konu ile ilgili yürütülen araştırmalarda, hem STEC hem de ETEC için virülans geni taşıyan hibrit *E. coli* suşlarının varlığı gösterilmiştir (Awad ve ark 2020, Salama ve ark 2023). Yapılan başka bir çalışma da Aref ve ark (2018) yenidoğan buzağılardan izole edilen *E. coli* suşları arasında hibrit STEC-ETEC suşlarını tespit etmiş, izolatların %15'inin Stx2 geni için pozitif olduğunu ve bu hibrit suşların buzağılarda ishale katkı sağlayabileceğini bildirmiştir.

Bu çalışma kapsamında bölgede Shiga toksin üreten STEC suşları ile birlikte ısıya dayanıklı enterotoksin A (Sta) genini barındıran ETEC suşlarının önemli oranda saptanması, potansiyel olarak ciddi klinik sonuçlar doğurabileceğini düşündürmektedir. Algammal ve ark (2020) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, buzağılarda STEC/ETEC ve EPEC dahil olmak üzere hibrit *E. coli* suşlarının saptandığı belirtilmiştir. Hibrit suşların varlığının ve yaygınlığının farklı patotiplerden virülans genlerinin horizontal gen transferi yoluyla edinilmesi ile açıklanabileceği düşünülmektedir.

E. coli genomunun dinamik bir yapıya sahip olduğu iyi bilinmektedir; bu nedenle, hibrit ve hetero-patojenler muhtemelen ortaya çıkmaya devam edecektir ve mevcut tanınmış *E. coli* patotipleri kümesini genişletecektir. Hibrit/hetero-patojenlerin her zaman ebeveyn patotiplerinden daha virülan olup olmadığını doğrulamak için yeterli sayıda yayınlanmış veri bulunmamaktadır. Ancak bazı çalışmalar hastalık

prognozlarının daha kötü olduğuna işaret etmektedir (Bratoeva ve ark 1994, Kessler ve ark 2015, Navarro-Garcia 2015, Ang ve ark 2016, Soysal ve ark 2016, Wijnsma ve ark 2017). Ancak bu soru tüm hibrit/hetero-patojenik suşlarda yeterince ele alınmamış olup, bunların önemini daha iyi anlamak için konak semptomatolojisi hakkında (Santos ve ark 2020) daha fazla bilgi gerekli olduğu düşünülmektedir.

Hem beşeri hem de veteriner tıbbı için en büyük zorluk, sözkonusu patojenleri hızlı bir şekilde tespit etmek, ve yayılmalarını ve büyük salgınlara (2011 Almanya salgını) neden olmalarını engellemek olacaktır. Bu hibrit/hetero-patojenlerin virülansla ilişkili faktörlerin yanı sıra çoklu ilaç direnci genleri de taşıyabileceği göz önünde bulundurulduğunda, bunların tanımlanması ve uygun kontrol altına alma önlemlerinin ele alınması aciliyet arz etmektedir. Hibrit suşların varlığı, hem virülans faktörlerinin birleşimi hem de antimikrobiyal direnç profilleri açısından endişe verici bir duruma yol açmaktadır. STEC suşları arasında antimikrobiyal direnç giderek artan bir endişe kaynağı haline gelmiştir. Belete ve ark (2022) tarafından yapılan çalışmada buzağılardan izole edilen *E. coli* suşlarında yaygın olarak kullanılan antibiyotiklere karşı çeşitli derecelerde direnç olduğu bildirilmiştir.

Çalışma kapsamında elde edilen veriler; STEC/ETEC ve ETEC/EPEC dahil olmak üzere *E. coli*'nin hibrit suşlarının yenidoğan buzağılarda varolduğunu göstermektedir. Sonuçlar neonatal buzağı ishallerinin etiyolojisinde *E. coli*'nin farklı patotiplerinin ve hibrit suşlarının önemli rol oynayabileceğini düşündürmekte, hastalığın kontrolüne yönelik surveyans ve yönetim stratejilerinin gerekliliğini vurgulamaktadır.

Bu çalışmada, farklı çevresel örneklerden izole edilen 27 bakteriyofajın, neonatal ishalleri buzağılardan elde edilen beş farklı *E. coli* suşuna (O157:H7, EC, 11A, E-15, E-57) karşı enfeksiyon oranları ve faj-konakçı etkileşim dinamikleri değerlendirilmiştir. Önceki araştırmalarla tutarlı olarak, çeşitli kanalizasyon ve kentsel nehir kaynaklarından fajların başarılı bir şekilde izole edilebildiği bildirilmektedir (Elbahnasawy ve ark 2021, Fathy ve ark 2024). Özellikle Shiga toksin üreten *E. coli* (STEC) odaklı çalışmalarda, dışkı veya dışkı ile kirlenmiş ortamlardan faj izolasyonunun yaygın olduğu gözlenmiştir (Amarillas ve ark 2017, Liao ve ark 2018).

Bu bulgular, çevre kaynaklarının faj izolasyonu açısından STEC gibi önemli patojenlere karşı etkili fajların keşfinde potansiyel oluşturduğunu göstermektedir.

Bu çalışmada, izole edilen kolifajların konakçı bakteriler tarafından oluşturulan direnç mekanizmalarını aşarak adsorbsiyon, enfeksiyon, çoğalma, konakçı hücre lizisi, virion salınımı ve yeni konakçı hücrelerin yeniden enfeksiyonu gibi aşamalarda etkin olduğu gözlenmiştir.

Bulgular, izolatların büyük çoğunluğunun yalnızca tek bir *E. coli* suşunu enfekte edebildiğini, ancak on tanesinin iki farklı *E. coli* suşunu enfekte etme yeteneğine sahip olduğunu göstermektedir. Farklı patotiplere karşı gerçekleştirilen litik aktivite incelemeleri sonucunda, ETEC-1 (EC) için %29,6, ETEC-2 (11A) için %22,2, E-15 (EPEC+ETEC) için %14,8 ve E-57 (ETEC-3) için %7,4'lük enfeksiyon oranları tespit edilmiştir. Bu oranlar, izole edilen fajların çoğunlukla dar bir konak aralığına sahip olduğunu düşündürmektedir; zira hücre duvarı yapısı ve restriksiyon enzimlerinin varlığı gibi çeşitli bakteriyel faktörler faj-konakçı etkileşimini belirlemede kritik rol oynamaktadır (Roucourt ve Lavigne 2009). Ayrıca, çalışmada izole edilen fajların, konakçı yüzey reseptörleri ve faj bağlanma mekanizmalarındaki farklılıklar nedeni ile dar konakçı aralığına sahip olduğu düşünülmektedir. Aynı zamanda, bakteriyel faj direncinin birçok farklı mekanizmaya dayanması nedeniyle, pek çok fajın yalnızca belirli suşların bir alt kümesine özgü etki gösterdiği bilinmektedir (Hyman ve Abedon, 2010). Bu durumun, sunulan çalışmada bazı patotipler üzerinde daha sınırlı etki gözlenmesini açıklayabileceği düşünülmektedir.

Çalışmada tespit edilen, birden fazla patotipi enfekte edebilen 10 fajın varlığı, farklı *E. coli* patotiplerine yönelik kombine tedavi stratejilerinin geliştirilmesi açısından önemli bir avantaj sunabilmektedir. Bu fajların iki farklı suşu enfekte etme kapasitesi, geniş spektrumlu faj terapisi uygulamalarında kullanılabilecek potansiyel adaylar olduklarını göstermektedir.

Ayrıca, izole edilen bakteriyofajların konak aralığının incelenmesi sonucunda, toplam 27 izolat arasında Shiga toksin üreten *E. coli* (O157:H7) suşunda %69'luk enfeksiyon oranının gözlemlenmesi, bu serotipe karşı özellikle yüksek bir litik aktivite yeteneğine sahip olduğunu göstermektedir.

Fajların plak morfolojisi, faj izolasyon prosedürlerinin vazgeçilmez bir parçası olmasının yanı sıra, patlama boyutu, adsorpsiyon oranı ve lizis süresi gibi uygunluk özellikler (Chanishvili 2012, Abedon ve Katsaounis 2021, van Charante ve ark 2021) ve belirli bir ortamdaki faj difüzyon hızı (Hyman ve Abedon 2009) dahil olmak üzere faj fenotipik ölçümleri ile bağlantılıdır, hedeflenen bakterilere karşı faj varlığını ve litik aktivitelerini görsel olarak kanıtlamaktadır. Bu yöntem, tek bir örnekten izole edilen bakteriyofajların biyoçeşitliliğini göstermek açısından hızlı (de Jonge ve ark 2019) ve maliyet olarak uygun bir yol sunarak, faj izolasyonu ve karakterizasyonunu içeren ileri analizler için önemli bir temel oluşturmaktadır (Jurczak-Kurek ve ark 2016).

Sunulan çalışmada izole edilen W-1, W-2, W-8, KS E-57 ve T-2 fajlarının oluşturduğu plakların (Şekil 8, Şekil 10, Şekil 11) gerçek plak bölgesinden daha silik bir dış bölgeye sahip olduğu gözlemlenmiştir. İzolasyon alanlarında gözlenen bu yarı saydam (haleli) plaklar, ilgili fajların depolimeraz enzimi ürettiğine işaret etmektedir (Pires ve ark, 2016). Nitekim, depolimerazların varlığı, polisakkarit matrisinin bozulmasını ifade eden ve bakteri kültürlerinde haleli berrak plakların oluşumu ile karakterize edilmektedir (Guo ve ark, 2017).

Bu çalışmada elde edilen bulgular, izole edilen fajların depolimeraz üretme yeteneğine sahip olduğunu ve bu özelliklerinin, hem fajın bakteriyel konakçıya bağlanmasını kolaylaştırarak enfektivitesini artırabileceğini hem de antibiyotiklerin etkinliğini destekleyebileceğini göstermektedir. Dolayısıyla, çalışmada elde edilen fajların depolimeraz aktivitesine sahip olması, bu fajların biyofilm oluşturan veya kapsüllü bakterilere karşı potansiyel biyoterapötik ajanlar olarak kullanılabilme olasılığını güçlendirmektedir.

Bu çalışmada izole edilen *Miyoviridae* fajlarında ise daha küçük zon çapına sahip plaklar görülmüştür. *E. coli* bakteriyofajları için plak özelliklerinde gözlemlenen farklılıklar, önceki çalışmalarla uyumludur (Jamal ve ark 2015, Sjahriani ve ark 2021). Bakteriyofajlar plak morfolojisi ve karakterizasyonu açısından analiz edildiğinde boyut, morfoloji ve genomik organizasyon açısından büyük çeşitlilik gösterebilmektedirler (Hatfull ve Hendrix 2011, Doore ve Fane 2016).

Bu çalışmada, bakteriyofajların virölans karakterinin değerlendirilmesinde optik yoğunluk (OD) ölçüm yönteminin kullanılması, geleneksel yöntemlere kıyasla önemli avantajlar sağlamıştır. Kutter (2009) ve Adams (1959) tarafından da belirtildiği gibi, faj virölansı; adsorpsiyon, enfeksiyon etkinliği, latent periyot süresi, patlama büyüklüğü ve konak hücre büyüme kinetiği gibi çok sayıda faktörün etkileşimine bağlı olarak şekillenmektedir. Geleneksel olarak yaygın şekilde kullanılan spotting ve çift tabakalı agar yöntemleri, özellikle farklı faj ve bakteri kombinasyonlarının dinamiklerinin incelenmesinde sınırlı kalmaktadır (Kutter, 2009; Kropinski ve ark., 2013). OD ölçüm yöntemi ise, sıvı kültürlerde faj-bakteri etkileşimini zamana bağlı olarak izleme imkânı sunarak, hem daha hassas hem de kantitatif veri elde edilmesini sağlamıştır. Bu yaklaşım sayesinde, bu çalışmada fajların bakteriyel büyüme üzerindeki etkileri daha ayrıntılı şekilde gözlemlenerek, farklı fajların virölans potansiyelleri karşılaştırılabilmiş ve teröpotik olarak uygun fajlar seçilmiştir.

OD ölçümüne dayalı mikropılaka deneyleri, faj tedavisinde MOI'nin (multiplicity of infection) etkisini değerlendirmek ve optimal MOI'yi belirlemek amacıyla önceki çalışmalarda başarıyla kullanılmıştır (Benala ve ark., 2021). Faj enfeksiyonu sırasında eş zamanlı olarak izlenen OD değişimleri, bakteriyel çoğalmanın kontrol altına alınmasında etkili olan optimal faj dozunun belirlenmesine olanak sağlamaktadır. Ayrıca, enfekte ve enfekte olmayan bakteri kültürlerinin karşılaştırılması, tekil faj veya faj kokteyllerinin virölansının niceliksel olarak değerlendirilmesinde önemli bir yöntem olarak öne çıkmaktadır (Storms ve ark., 2020).

Bu çalışmada, faj kinetik ölçümlerinde deney sonunda elde edilen büyüme eğrileri, optimum ve daha yüksek MOI seviyelerine sahip kuyucuklarda OD₆₀₀ değerinde çok az artış olduğunu göstermiştir. Bu bulgu, *E. coli* çoğalmasının yeterli litik aktiviteyle baskılandığını ve fajların etkili olduğunu ortaya koymaktadır. *E. coli* kontrol gruplarında ise OD₆₀₀ değerinin zamanla düzenli olarak arttığı gözlenmiş, bu da bakterilerin uygun ortamda logaritmik faza geçerek çoğaldığını göstermiştir. Ortam kontrol ve faj kontrol kuyularında ise OD değerlerinde herhangi bir değişiklik olmamıştır. Elde edilen sonuçlar, litik fajların davranışının kolifajların beklenen kinetiği ile uyumlu olduğunu ve göstermektedir.

Yapılan çalışmada, izole edilen litik fajların varlığında bakteriyel çoğalma dinamiklerini ortaya koyan geniş ölçekli veri setinde, CI metriği kullanılarak fajların litik aktivitesi nicel olarak değerlendirilmiştir (Tablo 15, Tablo 16). Bu yöntem sayesinde bireysel fajların etkinlikleri doğrudan karşılaştırılabilir hale gelmiştir. Blazanin (2023), bu tür matematiksel yöntemlerin kullanılmasının bakteriyel büyümedeki varyasyonların etkilerini ortadan kaldırmaya yardımcı olabileceğini ve faj enfektivitesinin daha doğru bir şekilde değerlendirilmesine olanak sağlayabileceğini öne sürmüştür (Blazanin 2023).

CI, bakteri kültürlerinin faj tedavisine verdiği yanıtı büyüme eğrileri üzerinden analiz ederek bakteriyofaj etkinliğini ölçmek için geliştirilmiş yenilikçi bir metrik sistemdir. Temelini istatistikteki centroid (kütle merkezi) kavramından alan bu indeks, bakteri kültürlerinin optik yoğunluk (OD) değerlerinin zaman içindeki dağılımının merkezini hesaplayarak çalışmaktadır. Özellikle geleneksel yöntemlerle tespit edilemeyen yeniden çoğalma evrelerini bile hassasiyetle yakalayabilmesi, bu tekniği bakteriyel büyüme dinamiklerindeki değişimleri analiz etmede etkin kılmaktadır (Hosseini ve ark 2024).

Bu araştırmada, CI verilerindeki değerlendirmeler, K-1, K-3, W-3, W-8 ve KS fajlarının yüksek ve tutarlı litik etkinlik gösterdiğini, dolayısıyla *E. coli* kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde öncelikli adaylar arasında yer aldığını ortaya koymaktadır. Bu fajlar özellikle yüksek MOI seviyelerinde (MOI: 10) en yüksek CI değerlerine ulaşarak bakteriyel büyümeyi etkili bir şekilde inhibe etmiştir. Ayrıca, KS fajının düşük MOI seviyesinde dahi yüksek performans gösterebilmektedir. Söz konusu fajların tek başına veya kombinasyonlar halinde kullanımı, *E. coli* enfeksiyonlarının tedavisi ve profilaksisinde umut vadeden bir yaklaşım sunabileceği düşünülmektedir.

Bakteriyofajların değişen sıcaklık ve pH koşullarına direnci, faj terapisi ve biyokontrol stratejilerindeki uygulamaları için kritik öneme sahiptir. Wang ve ark (2016) tarafından yapılan bir çalışmada, *Myoviridae* ailesinden fajların, bakteriyel konakçıları tarafından oluşturulan biyofilmlerde ikamet ederek kendilerini aşırı sıcaklık dalgalanmalarından koruyabildiklerini belirtmiştir. Yapılan bir çalışmada Krasowska ve ark (2015) bakteriyofajların, birçok çevresel faj için tipik olan 4,0 ila 8,0 pH aralığında aktivitelerini koruyabildiklerini vurgulamıştır. Esmaeilzadeh ve ark

(2022) ayrıca bakteriyofajların genellikle 4,0 ila 9,0 pH aralığında stabil olduğunu, bu aralığın dışında önemli aktivite kaybı gözlemlendiğini vurgulamıştır. Sıcaklık ve pH arasındaki etkileşim de faj canlılığını etkileyebilmektedir. Alić ve ark (2017) çalışmalarında sıcaklık ve pH'ın bakteriyofaj stabilitesini etkileyen kritik faktörler olduğunu, sıcaklığın tüm replikasyon sürecini etkilediğini ve faj canlılığını düzenlediğini belirtmiştir. Kumar ve ark (2021) tarafından yapılan bir çalışmada bakteriyofajların 5,0 ila 8,0 pH seviyelerinde stabilite sergilediği ve 60°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda önemli aktivite kaybı olduğu belirtilmiştir.

Bu çalışma kapsamında farklı pH koşullarında yapılan faj-bakteri kültür deneylerinde, bakteriyel üremenin asidik ($\text{pH} < 6,0$) ve bazik ($\text{pH} > 8,0$) ortamlarda genel olarak sınırlı olduğu görülmektedir. Sánchez-Clemente ve ark (2018) yaptıkları çalışmada da benzer bulguları vurgulamaktadır. Özellikle pH 3,0 ve 4,5 gibi asidik koşullarda bakteriyel üreme oldukça sınırlı kalmaktadır ve OD_{600} değerleri düşük seyretmektedir. Bu durum, bu pH aralıklarında gözlenen düşük OD_{600} değerlerinin faj enfeksiyonundan ziyade asidik ortamın bakteriyel büyümeyi engellemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Benzer şekilde, pH 10 gibi bazik uç değerlerde de bakteriyel üreme kısıtlanmış ve faj etkisinin değerlendirilmesinde yanıltıcı değerlendirmelere yol açabilmektedir.

Buna karşılık, yaptığımız deneylerde pH 6,3–7,0 aralığında bakteriyel üremenin en yüksek seviyede olduğu görülmektedir ve faj etkinliği doğru şekilde değerlendirilebilmektedir. Bu pH aralığında, faj uygulanan gruplarda OD_{600} değerlerinde belirgin düşüşler gözlenmiş olup, bu düşüşler fajların litik aktivitesini göstermektedir. Nötre yakın pH koşullarında hem bakteriyel büyüme hem de faj enfeksiyonu için optimal bir ortam şartlarını sağlamaktadır. Bu çalışmada edilen bulgular, faj tedavisi çalışmalarında pH optimizasyonunun önemini vurgulamaktadır. Fajların sıcaklık ve pH toleransları, hem laboratuvar çalışmalarında hem de terapötik ve biyokontrol uygulamalarında dikkate alınması gereken temel parametreler olduğu ve fajların optimal sıcaklık ve pH aralıklarında yüksek aktivite göstermesi nedeni ile uygulama başarısı için çevresel koşulların dikkatle optimize edilmesi gerektiği düşünülmektedir.

Bu çalışmada izole edilen fajların, 30°C ile 60°C arasındaki farklı sıcaklıklarda litik aktivite gösterebildiği belirlenmiştir. Fajların sıcaklık toleransının, uygulama alanları açısından önemli bir parametre olduğu bilinmektedir. Esmacilzadeh ve ark (2022), fajların optimal sıcaklık aralıklarının üzerinde enfektivite kaybı yaşadığını ve yüksek sıcaklıklarda bakteriyel konak hücrelere genetik materyal aktarımının azaldığını rapor etmiştir. Mahmoud ve ark. (2021) ise, izole edilen bakteriyofajların 45°C’de stabil kaldığını, ancak 65°C’de aktivitelerini kaybettiklerini ve bu durumun termal stabilite açısından bir eşik oluşturduğunu göstermiştir. Bu bulgular, sunulan çalışmada elde edilen sonuçlarla uyumludur. Fajların 30°C ile 60°C arasında litik aktivite gösterebilmesi, çevresel koşullara uyum yeteneklerinin yüksek olduğunu ve potansiyel olarak farklı uygulama alanlarında kullanılma imkanı olduğunu göstermektedir.

Çalışmada fajların moleküler karakterizasyonu üç farklı viral familyayı hedefleyen primerler kullanılarak yapılan PZR analizleri ve P1 primeri kullanılarak uygulanan RAPD-PZR analizi ile genetik farklılıkların ortaya konması amacı ile iki yaklaşım üzerinden yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar, koleksiyonda baskın olarak T-4 benzeri fajların bulunduğunu, ancak bazı fajların T-7 benzeri veya her iki tipe de ait gen bölgelerine sahip olabileceğini göstermiştir (örneğin W-2 ve W-3 gibi).

Gutierrez ve ark (2011) tarafından yapılan çalışmada, RAPD- PZR ile fajların tiplendirilmiştir. Faj izolatları arasındaki genetik çeşitliliği değerlendirmek için P1 ve P2 dahil olmak üzere birden fazla primeri test etmişlerdir. Bu çalışmada, bu primerler kullanılarak fajların genetik farklılıkları gösterilmiştir. Bunun yanı sıra, bu çalışmada JK06 fajlarına spesifik primerlerden ise pozitif sonuç alınamamış olması, bu fajların incelenen koleksiyon içinde yer almadığını ya da kullanılan primer dizilerinin hedef bölgelerle uyuşmadığını düşündürmektedir. Çalışma kapsamında tiplendirilemeyen fajlar, mevcut primer setlerinin kapsamını genişletme ihtiyacını gösterdiği düşünülmektedir.

Çalışmada 27 adet faj izole edilmiş ancak aralarında litik aktivitesi ve teropotik potansiyeli yüksek 2 fajın geleneksel morfolojik incelemesi TEM kullanılarak yapılmıştır. TEM, faj morfolojisini görselleştirmek için yaygın olarak kullanılır ve tipik olarak kontrastı artırmak için negatif bir boyama tekniği içermektedir. Wintachai

ve ark (2020) faj örneklerini bakır ızgaralar üzerinde boyamak için uranil asetat kullanımını tanımlayarak faj yapısının net bir şekilde görselleştirilmesini sağlamıştır. Bu yöntem, kapsid şekli ve kuyruk yapısı gibi morfolojik özelliklerine dayanarak farklı faj aileleri arasında ayırım yapmak için gereklidir. Çalışmamızda da uranil asetat ile negatif boyama tekniği kullanılarak, seçilen fajların morfolojik özellikleri ortaya konmuş ve bu yöntemin etkinliği doğrulanmıştır.

Çalışmada tüm genom dizileme ve anotasyon sonuçlarıyla ilgili olarak, tüm fajların *Caudovirales* takımına ait olduğunu tespit edildi. Çeşitli çalışmalar, dsDNA kuyruklu fajların yeryüzünde en bol bulunan varlık olduğunu göstermiştir (Ackermann 2007, Zinke ve ark 2022). Elde edilen sonuçlar faj biyolojisi ve potansiyel terapötik uygulamalar açısından önemli bulgular ortaya koymuştur.

Lizis genleri göz önüne alındığında, tüm fajlar, konakçının enfeksiyonu sırasında bakteri hücre duvarının parçalanmasından sorumlu proteinler olan endolizirlere ve holinlere sahiptir. Endolizirlere hücre duvarındaki peptidoglikanın parçalanmasından sorumluyken, holinler hücre zarını geçirgen hale getirerek endolizirlere peptidoglikan tabakasına ulaşmasını sağlar (Cahill ve Young 2019). Bununla birlikte, Gram-negatif konaklarda lizis sürecinde yer alan bir protein olan RS-like spanin proteini içermesi ile W1,W8,W1/9 fajları farklılık göstermiştir. Faj W8, K1, T1/2 olmak üzere üç fajın genomlarında HNH homing endonükleazların varlığı gözlemlenmiştir.

Bu çalışmada faj genomlarına ait anotasyon verileri daha önce tüm fajların litik olduğunu ve integras, rekombinas ve gibi lizojenik genlerden yoksun olduğunu göstermiştir. Bu nokta, bu fajların faj terapisinde kullanımı için hayati önem taşımaktadır (Merabishvili ve ark 2017, Pirnay ve ark 2018) .

Faj enfeksiyonunda fajın genetik materyali, bakteri hücre içine girdikten sonra, bir dizi farklı bakteriyel ve viral savunma sistemine maruz kalır (Egido ve ark 2022). Bu konu ile ilgili yapılan son çalışmalar, anti-CRISPR'ler ve diğerleri gibi bu bakteriyel savunmalara karşı koyan faj kodlu mekanizmaları ortaya koymuştur ((Pawluk ve ark 2018, Srikanth ve ark 2022). Acr ve Aca proteinlerinden oluşan anti-CRISPR sistemi, ilk olarak 2013 yılında *Pseudomonas aeruginosa*'nın faj ve

profajlarında tanımlanmıştır (Bondy-Denomy ve ark 2013). Bu çalışmada incelenen W1 faj genomunda, konak bakterinin CRISPR-Cas savunma sistemini inhibe ederek faj enfeksiyonunu kolaylaştırabilecek potansiyel bir anti-CRISPR sistemi tespit edilmiştir.

Faj genomları, varsayımsal ve varsayılan işlevsel proteinleri kodlayan çok sayıda benzersiz gen barındırmaktadır. Faj genomlarında bulunan CDS'lerin ve ORF'lerin önemli bir kısmı, bilinmeyen işlevlere sahip varsayımsal proteinler olarak tahmin edilmiştir. Benzer gözlemler patojenik bakteri türlerini enfekte eden diğer fajlarda da rapor edilmiştir (Chinnadurai ve ark 2018, Imam ve ark 2019, Kim ve ark 2020, Korn ve ark 2021). Bu durum, faj genomlarının işlevleri henüz anlaşılmamış birçok gen taşıdığını göstermektedir. Bu nedenle, gelecekteki araştırmalar bu varsayımsal proteinlerin gerçek işlevlerini aydınlatmaya yönelik olmalıdır.

Fajlarının tümünün faj DNA replikasyonu, DNA sentezi ve paketlenmesi, yapısal proteinler (kapsid ve kuyruk) ve konak lizisi (lizozim ve endolizin) için kodlama yapan genleri içermesi önemli bir bulgudur. Ayrıca faj genomları taban plakası kuyruk lifi ve kuyruk sivri proteinlerini kodlayan genler içermektedir. Kuyruk lifi proteinleri faj reseptörünün tanınması için çok önemli olduğundan, bir faj genomunda yüksek miktarda taban plakası, kuyruk lifi ve kuyruk dikenli proteinleri enfeksiyon yeteneklerini ve konakçı aralığını artırabileceği bildirilmiştir (Nobrega ve ark 2018).

Çalışmada incelenen fajlarda integras geninin bulunmaması dikkat çekicidir; ayrıca, litik yaşam döngüsüne işaret eden ekzonükleaz varlığı da tespit edilmiştir. Bu özellik, fajların terapötik kullanım potansiyelini artıran önemli bir bulgudur, çünkü litik fajlar bakteriyel enfeksiyonların kontrolünde daha etkili olabilmektedir (Grami ve ark 2023).

Sunulan çalışmada izole edilen fajlar, genom yapılarında gp2.5 tek sarmallı DNA (ssDNA) bağlanma proteinine sahip olduğu belirlendi. Birçok genom koruyucu mekanizmanın merkezinde, ssDNA için olağanüstü yüksek afiniteye sahip her yerde bulunan moleküller olan tek sarmallı DNA bağlayıcı proteinler (SSB'ler) bulunmaktadır (Reuben ve Gefter 1974, Kim ve Richardson 1993). Geniş bir SSB sınıfının DNA replikasyonu, rekombinasyonu ve onarımı için çok önemli olan çeşitli

proteinlerle etkileşime girdiği ve koordine olduğu bilinmektedir (Chase ve Williams 1986, Xu ve ark 2023). Bu proteinler bağlanma dinamiklerini lokal ssDNA ortamının özelliklerine uyarlayarak, DNA replikasyonu süresince tek sarmallı DNA'yı (ssDNA) etkili bir şekilde koruma, stabilize etme ve düzenleme yeteneği kazandırır (Xu ve ark 2023).

Fajların tedavi için artan ilgisi ve kullanımıyla birlikte, bilinen virülans faktörlerini veya ARG'leri içermeyen fajların izolasyonu zorunludur. ARG'lerin ve virülans faktörlerinin varlığı faj tedavisi için büyük bir endişe kaynağıdır, çünkü bu tür genleri taşıyan fajların kullanımı, çoğalmaları engellenmeye çalışılan bakteri popülasyonlarını daha virülan veya antibiyotiklere dirençli hale getirebilir (Cook ve ark 2021).

Fajların antibiyotik direnç genlerini ne sıklıkla kodladığı çok tartışılan bir konudur (Enault ve ark 2017, Debroas ve Siguret 2019). Bu çalışmada fajlara ait herhangi bir antimikrobiyal direnç geni ve virülans faktörlerinin bulunmaması, bu fajların güvenli kullanım potansiyelini desteklemektedir. Bu durum, faj terapisi uygulamalarında önemli bir güvenlik kriteri olarak değerlendirilmektedir, çünkü fajların horizontal gen transferi yoluyla patojenik özellikleri aktarma riski bulunmamaktadır. Bu genomik özellikler bir arada değerlendirildiğinde, çalışmada incelenen fajların terapötik uygulamalar için uygun adaylar olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışmada izole edilen fajların E. coli suşları (O157:H7, EC, 11A, E-57, E-15) üzerindeki inhibisyon kapasiteleri ve terapötik potansiyelleri değerlendirilmiştir. Yüksek etkinlik gösteren fajlar, gelecekteki biyokontrol uygulamaları için umut verici adaylar olarak öne çıkarken, orta ve düşük etkinlik gösteren fajların optimizasyon çalışmalarıyla geliştirilebileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, buzağı ishallerinin tedavisinde faj terapisi, geleneksel antibiyotik tedavilerine alternatif olarak güvenli, etkili ve sürdürülebilir bir yaklaşım sunmaktadır. Özellikle antibiyotik dirençli suşların neden olduğu enfeksiyonlarda, faj terapisinin spesifik etki mekanizması ve düşük yan etki profili, bu yaklaşımı değerli bir tedavi seçeneği haline getirmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması, neonatal buzağı ishallerinin etiyolojisinde önemli rol oynayan *E. coli* suşlarının karakterizasyonu ve bu patojenlere karşı litik aktivite gösteren bakteriyofajların izolasyonu, moleküler sınıflandırması, konakçı spesifitesi ve büyüme kinetiklerinin analizini kapsamaktadır.

Çalışmada elde edilen başlıca sonuçlar; Çalışmada izole edilen 102 *E. coli* izolatinın %43,1'inde (44 suş) en az bir virülens geni tespit edilmiştir. Bu durum, neonatal ishallerin kompleks ve çoklu virülens faktörleriyle ilişkili patojenez mekanizmalarına işaret etmektedir. STEC suşlarının %29,4 oranla öne çıkan patotip olarak tespit edilmesi, bölgedeki STEC kaynaklı ishallerin önemini vurgulamaktadır. Farklı patotiplere ait virülens genlerini birlikte taşıyan hibrit suşların varlığı (STEC/ETEC, ETEC/EPEC, vb.), *E. coli*'nin dinamik gen transferi ile patojenite potansiyelini artırabileceğini göstermektedir.

Farklı çevresel örneklerden izole edilen 27 bakteriyofajın, başta *E. coli* O157:H7 olmak üzere beş farklı *E. coli* suşuna karşı litik aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan farklı in vitro yöntemler ile bazı fajların geniş konak aralığına ve yüksek litik potansiyele sahip olduğu saptanmıştır.

Genomik analiz sonucunda incelenen fajlarda litik döngüyü destekleyen ekzonükleaz geninin varlığı ve integras gen ve antimikrobiyal direnç geninin yokluğu bu fajların bakteriyel enfeksiyonların kontrolünde kullanılabilirliğini artıran önemli bir bulgu olarak öne çıkmaktadır.

Fajların konakçıya özgü etki mekanizmaları ve antibiyotik direncinin artış gösterdiği bir dönemde, özellikle *E. coli* kaynaklı ishallerin tedavisi için alternatif bir tedavi olarak öne çıkmaktadır. Literatürde yapılan çalışmalar, fajların hem mikrobiyal populasyon kontrolünde hem de probiyotik etkiyi destekleyici yönde olumlu sonuçlar sağladığını göstermektedir.

Bu çalışma bulgularında saptanan yüksek litik aktiviteye sahip fajların in vivo koşullarda (deney hayvanları modelinde ve saha koşullarında) etkinliği ve güvenliği araştırılmalı; doz, uygulama süresi ve formülasyon optimizasyonu yapılması gerektiği düşünülmektedir.

Fajların tekli veya çoklu kokteyller halinde kullanımının, özellikle hibrit-heteropatojen *E. coli* suşları ve yüksek antibiyotik direnç profiline sahip izolatlar üzerindeki etki seviyeleri karşılaştırmalı olarak belirlenmelidir. Çiftlik bazında hayvan yönetimi, beslenme koşulları ve hijyen uygulamalarının iyileştirilmesi, patojenik *E. coli* yayılımını kontrol altına almada kritik bir adımdır.

Faj terapisinin veteriner hekimlikte uygulanabilmesi için yasal düzenlemelerin yapılması, üretim standardizasyonu ve kalite kontrol yöntemlerinin belirlenmesi önem arz etmektedir.

Bu çerçevede, neonatal buzağı ishalleriyle mücadelede faj terapisi, klasik antibiyotik tedavilerini destekleyici ve/veya alternatif bir strateji olarak dikkate alınmalıdır. Yürütülecek kapsamlı in vivo çalışmalar, geniş çaplı sürveyans programları ve güvenlik değerlendirmeleri, fajların veteriner hekimlikte yaygın ve etkin bir kullanım alanı bulabilmesi için gerekli olduğu düşünülmektedir.

6. KAYNAKÇA

- Abdelrahman F, Rezk N, Fayez MS, Abdelmoteleb M, Atteya R, Elhadidy M, El-Shibiny A, 2022. Isolation, characterization, and genomic analysis of three novel *E. coli* bacteriophages that effectively infect *E. coli* O18. *Microorganisms*, 10, 3, 589.
- Abedon ST, 2008. Phages, ecology, evolution. In: *Bacteriophage Ecology: Population Growth, Evolution, and Impact of Bacterial Viruses*. Eds: Abedon ST. Cambridge: Cambridge University Press, p. 1-28.
- Abedon ST, 2012. Spatial vulnerability: bacterial arrangements, microcolonies, and biofilms as responses to low rather than high phage densities. *Viruses*, 4, 5, 663-87.
- Abedon ST, 2019. Look who's talking: T-even phage lysis inhibition, the granddaddy of virus-virus intercellular communication research. *Viruses*, 11, 10, 951.
- Abedon ST, Garcia P, Mullany P, Aminov R, 2017. Editorial: Phage Therapy: Past, Present and Future. *Frontiers in Microbiology*, 8, 981.
- Abedon ST, Katsaounis TI, 2021. Detection of Bacteriophages: Statistical Aspects of Plaque Assay. In: *Bacteriophages: Biology, Technology, Therapy*. Eds: Harper DR, Abedon ST, Burrowes BH, McConville ML. Cham: Springer International Publishing, p. 539-60.
- Abuelo A, 2017. Investigation of an outbreak of neonatal calf diarrhoea in a dairy herd. *Veterinary Record Case Reports*, 4, 2, e000372.
- Ackermann HW, 2007. 5500 Phages examined in the electron microscope. *Archives of Virology*, 152, 2, 227-43.
- Adams MH, 1959. *Bacteriophages*. Interscience Publishers.
- Albrycht K, Rynkiewicz AA, Harasymczuk M, Barylski J, Zielezinski A, 2022. Daily reports on phage-host interactions. *Frontiers in Microbiology*, 13, 946070.
- Algammal AM, El-Kholy AW, Riad EM, Mohamed HE, Elhaig MM, Yousef SAA, Hozzein WN, Ghobashy MOI, 2020. Genes Encoding the Virulence and the Antimicrobial Resistance in Enterotoxigenic and Shiga-Toxigenic *E. coli* Isolated from Diarrheic Calves. *Toxins (Basel)*, 12, 6.
- Alič Š, Naglič T, Tušek-Žnidarič M, Ravnika M, Rački N, Peterka M, Dreo T, 2017. Newly isolated bacteriophages from the Podoviridae, Siphoviridae, and Myoviridae families have variable effects on putative novel *Dickeya* spp. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1870.
- Alivisatos AP, Blaser M, Brodie EL, Chun M, Dangl JL, Donohue TJ, Dorrestein PC, Gilbert JA, Green JL, Jansson JK, 2015. A unified initiative to harness Earth's microbiomes. *Science*, 350, 6260, 507-8.
- Allen HK, Donato J, Wang HH, Cloud-Hansen KA, Davies J, Handelsman J, 2010. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 4, 251-9.
- Almeida GM, Leppänen M, Maasilta IJ, Sundberg L-R, 2018. Bacteriophage imaging: past, present and future. *Research in Microbiology*, 169, 9, 488-94.
- Alomari MMM, Dec M, Nowaczek A, Puchalski A, Wernicki A, Kowalski C, Urban-Chmiel R, 2021. Therapeutic and prophylactic effect of the experimental bacteriophage treatment to control diarrhea caused by *E. coli* in newborn calves. *ACS Infectious Diseases*, 7, 8, 2093-101.
- Altamirano FLG, 2021. Bacteriophage therapy against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections, thesis, Monash University.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ, 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215, 3, 403-10.
- Álvarez-Espejo DM, Rivera D, Moreno-Switt AI, 2023. Bacteriophage-Host Interactions and Coevolution. In: *Bacteriophages: Methods and Protocols*. Eds: Springer, p. 231-43.
- Amarillas L, Rubí-Rangel L, Chaidez C, González-Robles A, Lightbourn-Rojas L, León-Félix J, 2017. Isolation and characterization of phiLLS, a novel phage with potential biocontrol agent against multidrug-resistant *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1355.

- Aminov RI, 2009. The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environmental Microbiology*, 11, 12, 2970-88.
- Aminov RI, 2010. A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future. *Frontiers in Microbiology*, 1.
- Ang CW, Bouts AH, Rossen JW, Van der Kuip M, Van Heerde M, Bökenkamp A, 2016. Diarrhea, urosepsis and hemolytic uremic syndrome caused by the same heteropathogenic *Escherichia coli* strain. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 35, 9, 1045-7.
- Antaki-Zukoski EM, Li X, Pesavento PA, Nguyen TH, Hoar BR, Atwill ER, 2018. Comparative pathogenicity of wildlife and bovine *Escherichia coli* O157: H7 strains in experimentally inoculated neonatal Jersey calves. *Veterinary Sciences*, 5, 4, 88.
- Appelt S, Fancello L, Le Bailly M, Raoult D, Drancourt M, Desnues C, 2014. Viruses in a 14th-century coprolite. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 9, 2648-55.
- Archana A, Patel PS, Kumar R, Nath G, 2021. Neutralizing antibody response against subcutaneously injected bacteriophages in rabbit model. *Virusdisease*, 32, 1, 38-45.
- Aref NM, Abdel-Raheem AA, Kamaly HF, Hussien SZ, 2018. Clinical and sero-molecular characterization of *Escherichia coli* with an emphasis on hybrid strain in healthy and diarrheic neonatal calves in Egypt. *Open Veterinary Journal*, 8, 4, 351-9.
- Asheshov IN, Strelitz F, Hall E, Flon H, 1954. A survey of actinomycetes for antiphage activity. *Antibiot Chemother (Northfield)*, 4, 4, 380-94.
- Atterbury RJ, Barrow PA, 2021. The use of bacteriophages in veterinary therapy. *Bacteriophages: biology, technology, therapy*, 953-87.
- Awad WS, El-Sayed AA, Mohammed FF, Bakry NM, Abdou N-EM, Kamel MS, 2020. Molecular characterization of pathogenic *Escherichia coli* isolated from diarrheic and in-contact cattle and buffalo calves. *Tropical Animal Health and Production*, 52, 3173-85.
- Aydoğan DY, Hadımlı HH, 2016. Bakteriyofaj tedavisi. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 27, 1, 38-47.
- Aylward FO, Boeuf D, Mende DR, Wood-Charlson EM, Vislova A, Eppley JM, Romano AE, DeLong EF, 2017. Diel cycling and long-term persistence of viruses in the ocean's euphotic zone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114, 43, 11446-51.
- Aziz RK, Ackermann H-W, Petty NK, Kropinski AM, 2018. Essential steps in characterizing bacteriophages: biology, taxonomy, and genome analysis. *Bacteriophages: Methods and Protocols*, Volume 3, 197-215.
- Bai X, Zhang J, Ambikan A, Jernberg C, Ehrlich R, Scheutz F, Xiong Y, Matussek A, 2019. Molecular Characterization and Comparative Genomics of Clinical Hybrid Shiga Toxin-Producing and Enterotoxigenic *Escherichia coli* (STEC/ETEC) Strains in Sweden. *Scientific Reports*, 9, 1, 5619.
- Balcazar JL, 2014. Bacteriophages as vehicles for antibiotic resistance genes in the environment. *PLoS Pathogens*, 10, 7, e1004219.
- Belete MA, Demlie TB, Chekole WS, Sisay Tessema T, 2022. Molecular identification of diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes and their antibiotic resistance patterns among diarrheic children and in contact calves in Bahir Dar city, Northwest Ethiopia. *PLoS One*, 17, 9, e0275229.
- Benala M, Vaiyapuri M, Visnuvinayagam S, George JC, Raveendran K, George I, Mothadaka MP, Badireddy MR, 2021. A revisited two-step microtiter plate assay: Optimization of in vitro multiplicity of infection (MOI) for Coliphage and Vibriophage. *Journal of Virological Methods*, 294, 114177.
- Bernheim A, Sorek R, 2020. The pan-immune system of bacteria: antiviral defence as a community resource. *Nature Reviews Microbiology*, 18, 2, 113-9.
- Bernheim A, Millman A, Ofir G, Meitav G, Avraham C, Shomar H, Rosenberg MM, Tal N, Melamed S, Amitai G, 2021. Prokaryotic viperins produce diverse antiviral molecules. *Nature*, 589, 7840, 120-4.

- Bertoizzi Silva J, Storms Z, Sauvageau D, 2016. Host receptors for bacteriophage adsorption. *FEMS microbiology letters*, 363, 4, fnw002.
- Bicalho M, Machado V, Nydam D, Santos T, Bicalho R, 2012. Evaluation of oral administration of bacteriophages to neonatal calves: Phage survival and impact on fecal *Escherichia coli*. *Livestock Science*, 144, 3, 294-9.
- Blazantin M, 2023. *Methods and Complexity in Phage-Bacteria Ecology and Evolution*, Yale University.
- Bondy-Denomy J, Pawluk A, Maxwell KL, Davidson AR, 2013. Bacteriophage genes that inactivate the CRISPR/Cas bacterial immune system. *Nature*, 493, 7432, 429-32.
- Boros Á, Polgár B, Pankovics P, Fenyvesi H, Engelmann P, Phan TG, Delwart E, Reuter G, 2018. Multiple divergent picobirnaviruses with functional prokaryotic Shine-Dalgarno ribosome binding sites present in cloacal sample of a diarrheic chicken. *Virology*, 525, 62-72.
- Bouras G, Nepal R, Houtak G, Psaltis AJ, Wormald PJ, Vreugde S. (2023). Pharokka: a fast scalable bacteriophage annotation tool. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 39(1), btac776.
- Bozkurt F, 2024. *Escherichia coli*, rota ve coronavirus kombine aşısı ile immunize edilen tavuklarda kanda ve yumurta sarısında Ig Y'lerin elisa ile belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Bratoeva M, Wolf M, Marks J, Cantey J, 1994. A case of diarrhea, bacteremia, and fever caused by a novel strain of *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, 32, 5, 1383-6.
- Breitbart M, Thompson LR, Suttle CA, Sullivan MB, 2007. Exploring the vast diversity of marine viruses. *Oceanography*, 20, 2, 135-9.
- Breyton C, Flayhan A, Gabel F, Lethier M, Durand G, Boulanger P, Chami M, Ebel C, 2013. Assessing the conformational changes of pb5, the receptor-binding protein of phage T5, upon binding to its *Escherichia coli* receptor FhuA. *The Journal of Biological Chemistry*, 288, 42, 30763-72.
- Brockhurst MA, Rainey PB, Buckling A, 2004. The effect of spatial heterogeneity and parasites on the evolution of host diversity. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 271, 1534, 107-11.
- Browne AS, Midwinter AC, Withers H, Cookson AL, Biggs PJ, Marshall JC, Benschop J, Hathaway S, Haack NA, Akhter RN, 2018. Molecular epidemiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) on New Zealand dairy farms: application of a culture-independent assay and whole-genome sequencing. *Applied and Environmental Microbiology*, 84, 14, e00481-18.
- Brussaard CP, Wilhelm SW, Thingstad F, Weinbauer MG, Bratbak G, Heldal M, Kimmance SA, Middelboe M, Nagasaki K, Paul JH, 2008. Global-scale processes with a nanoscale drive: the role of marine viruses. *The ISME Journal*, 2, 6, 575-8.
- Brüssow H, 2012. What is needed for phage therapy to become a reality in Western medicine? *Virology*, 434, 2, 138-42.
- Buckling A, Wei Y, Massey RC, Brockhurst MA, Hochberg ME, 2006. Antagonistic coevolution with parasites increases the cost of host deleterious mutations. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273, 1582, 45-9.
- Bumunang E, McAllister T, Ortega Polo R, Ateba C, Stanford K, Schlechte J, Walker M, MacLean K, Niu Y, 2022. Genomic Profiling of Non-O157 Shiga Toxigenic *Escherichia coli* -Infecting Bacteriophages from South Africa. *PHAGE*, 3.
- Burnet FM, 1933. Recent work on the biological nature of bacteriophages. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 26, 5, 409-16.
- Cahill J, Young R, 2019. Phage Lysis: Multiple Genes for Multiple Barriers. *Advances in Virus Research*, 103, 33-70.
- Callanan J, Stockdale SR, Adriaenssens EM, Kuhn JH, Rumnieks J, Pallen MJ, Shkoporov AN, Draper LA, Ross RP, Hill C, 2021. Leviviricetes: expanding and restructuring the taxonomy of bacteria-infecting single-stranded RNA viruses. *Microbial Genomics*, 7, 11, 000686.
- Campbell A, 1961. Conditions for the existence of bacteriophage. *Evolution*, 153-65.

- Casjens SR, Hendrix RW, 2015. Bacteriophage lambda: Early pioneer and still relevant. *Virology*, 479, 310-30.
- Castellazzi M, George J, Buttin G, 1972. Prophage induction and cell division in *E. coli*: I. Further characterization of the thermosensitive mutation *tif-1* whose expression mimics the effect of UV irradiation. *Molecular and General Genetics MGG*, 119, 139-52.
- Castledine M, Sierocinski P, Inglis M, Kay S, Hayward A, Buckling A, Padfield D, 2022. Greater phage genotypic diversity constrains arms-race coevolution. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 834406.
- Cenens W, Makumi A, Mebrhatu MT, Lavigne R, Aertsen A, 2013. Phage–host interactions during pseudolysogeny: Lessons from the *Pid/dgo* interaction. *Bacteriophage*, 3, 1, e1003269.
- Cengiz S, Adıgüzel MC, 2020. Determination of virulence factors and antimicrobial resistance of *E. coli* isolated from calf diarrhea, part of eastern Turkey. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 67, 4, 365-71.
- Cepeda-Molero M, Berger CN, Walsham AD, Ellis SJ, Wemyss-Holden S, Schüller S, Frankel G, Fernández LÁ, 2017. Attaching and effacing (A/E) lesion formation by enteropathogenic *E. coli* on human intestinal mucosa is dependent on non-LEE effectors. *PLoS Pathogens*, 13, 10, e1006706.
- Chae J-B, Kim H-C, Kang J-G, Choi K-S, Chae J-S, Yu D-H, Park B-K, Oh Y-s, Choi H-J, Park J, 2021. The prevalence of causative agents of calf diarrhea in Korean native calves. *Journal of Animal Science and Technology*, 63, 4, 864.
- Chanishvili N, 2012. Literature review of the practical application of bacteriophage research, Nova Science Publishers.
- Chapeton-Montes D, Plourde L, Bouchier C, Ma L, Diancourt L, Criscuolo A, Popoff MR, Bruggemann H, 2019. The population structure of *Clostridium tetani* deduced from its pan-genome. *Scientific Reports*, 9, 1, 11220.
- Chase JW, Williams KR, 1986. Single-stranded DNA binding proteins required for DNA replication. *Annual Review of Biochemistry*, 55, 1, 103-36.
- Chatterjee A, Willett JL, Nguyen UT, Monogue B, Palmer KL, Dunne GM, Duerkop BA, 2020. Parallel genomics uncover novel enterococcal-bacteriophage interactions. *MBio*, 11, 2, 10.1128/mbio.03120-19.
- Chekole WS, Adamu H, Sternberg-Lewrein S, Magnusson U, Tessema TS, 2023. Occurrence of *Escherichia coli* Pathotypes in Diarrheic Calves in a Low-Income Setting. *Pathogens*, 12, 1, 42.
- Chen I, Christie PJ, Dubnau D, 2005. The ins and outs of DNA transfer in bacteria. *Science*, 310, 5753, 1456-60.
- Chevallereau A, Pons BJ, van Houte S, Westra ER, 2022. Interactions between bacterial and phage communities in natural environments. *Nature Reviews Microbiology*, 20, 1, 49-62.
- Chibani CM, Farr A, Klama S, Dietrich S, Liesegang H, 2019. Classifying the unclassified: a phage classification method. *Viruses*, 11, 2, 195.
- Chibani-Chennoufi S, Bruttin A, Dillmann M-L, Brüssow H, 2004. Phage-host interaction: an ecological perspective. *Journal of Bacteriology*, 186, 12, 3677-86.
- Chinnadurai L, Eswaramoorthy T, Paramachandran A, Paul S, Rathy R, Arumugaperumal A, Sivasubramaniam S, Thavasimuthu C, 2018. Draft genome sequence of *Escherichia coli* phage CMSTMSU, isolated from shrimp farm effluent water. *Microbiology Resource Announcements*, 7, 14, 10.1128/mra.01034-18.
- Clokier MRJ, Millard AD, Letarov AV, Heaphy S, 2011. Phages in nature. *Bacteriophage*, 1, 1, 31-45.
- Cohen D, Melamed S, Millman A, Shulman G, Oppenheimer-Shaanan Y, Kacen A, Doron S, Amitai G, Sorek R, 2019. Cyclic GMP–AMP signalling protects bacteria against viral infection. *Nature*, 574, 7780, 691-5.
- Collignon P, 2012. The importance of a One Health approach to preventing the development and spread of antibiotic resistance. *One Health: The Human-Animal-Environment Interfaces in Emerging*

- Infectious Diseases: Food Safety and Security, and International and National Plans for Implementation of One Health Activities, 19-36.
- Collignon P, 2015. Antibiotic resistance: are we all doomed? *Internal Medicine Journal*, 45, 11, 1109-15.
- Collignon PJ, McEwen SA, 2019. One Health-Its Importance in Helping to Better Control Antimicrobial Resistance. *Trop Med Infect Dis*, 4, 1.
- Cook R, Brown N, Redgwell T, Rihtman B, Barnes M, Clokie M, Stekel DJ, Hobman J, Jones MA, Millard A, 2021. INfrastructure for a PHAge REference database: identification of large-scale biases in the current collection of cultured phage genomes. *Phage*, 2, 4, 214-23.
- Cook R, Hooton S, Trivedi U, King L, Dodd CER, Hobman JL, Stekel DJ, Jones MA, Millard AD, 2021. Hybrid assembly of an agricultural slurry virome reveals a diverse and stable community with the potential to alter the metabolism and virulence of veterinary pathogens. *Microbiome*, 9, 1, 65.
- Costa P, Pereira C, Gomes AT, Almeida A, 2019. Efficiency of single phage suspensions and phage cocktail in the inactivation of *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium*: An in vitro preliminary study. *Microorganisms*, 7, 4, 94.
- Cuervo W, Sordillo LM, Abuelo A, 2021. Oxidative stress compromises lymphocyte function in neonatal dairy calves. *Antioxidants*, 10, 2, 255.
- Cui X, Du B, Feng J, Feng Y, Fan Z, Chen J, Cui J, Gan L, Fu T, Tian Z, 2023. A novel phage carrying capsule depolymerase effectively relieves pneumonia caused by multidrug-resistant *Klebsiella aerogenes*. *Journal of Biomedical Science*, 30, 1, 75.
- D'Herelle F, 2007. On an invisible microbe antagonistic toward dysenteric bacilli: brief note by Mr. F. D'Herelle, presented by Mr. Roux. 1917. *Research in Microbiology*, 158, 7, 553-4.
- Dąbrowska K, 2019. Phage therapy: What factors shape phage pharmacokinetics and bioavailability? Systematic and critical review. *Medicinal Research Reviews*, 39, 5, 2000-25.
- Danovaro R, Corinaldesi C, Dell'Anno A, Fuhrman JA, Middelburg JJ, Noble RT, Suttle CA, 2011. Marine viruses and global climate change. *FEMS Microbiology Reviews*, 35, 6, 993-1034.
- Davies J, Davies D, 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*, 74, 3, 417-33.
- Debroas, D., & Siguret, C. (2019). Viruses as key reservoirs of antibiotic resistance genes in the environment. *The ISME journal*, 13(11), 2856-2867.
- de Jonge PA, Nobrega FL, Brouns SJ, Dutilh BE, 2019. Molecular and evolutionary determinants of bacteriophage host range. *Trends in Microbiology*, 27, 1, 51-63.
- De Smet J, Hendrix H, Blasdel BG, Danis-Wlodarczyk K, Lavigne R, 2017. *Pseudomonas* predators: understanding and exploiting phage–host interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 15, 9, 517-30.
- Demerec M, Fano U, 1945. Bacteriophage-resistant mutants in *Escherichia coli*. *Genetics*, 30, 2, 119.
- Demina TA, Pietilä MK, Svirskaitė J, Ravantti JJ, Atanasova NS, Bamford DH, Oksanen HM, 2017. HCIV-1 and other tailless icosahedral internal membrane-containing viruses of the family Sphaerolipoviridae. *Viruses*, 9, 2, 32.
- Dennehy JJ, Abedon ST, 2021. Phage infection and lysis. In: *Bacteriophages: biology, technology, therapy*. Eds: Springer, p. 341-83.
- Díaz-Muñoz SL, Koskella B, 2014. Bacteria-phage interactions in natural environments. *Adv Appl Microbiol*, 89, 135-83.
- Dion MB, Oechslin F, Moineau S, 2020. Phage diversity, genomics and phylogeny. *Nature Reviews. Microbiology*, 18, 3, 125-38.
- Doore SM, Fane BA, 2016. The microviridae: Diversity, assembly, and experimental evolution. *Virology*, 491, 45-55.

- Doron S, Fedida A, Hernández-Prieto MA, Sabehi G, Karunker I, Stazic D, Feingersch R, Steglich C, Futschik M, Lindell D, 2016. Transcriptome dynamics of a broad host-range cyanophage and its hosts. *The ISME Journal*, 10, 6, 1437-55.
- Doron S, Melamed S, Ofir G, Leavitt A, Lopatina A, Keren M, Amitai G, Sorek R, 2018. Systematic discovery of antiphage defense systems in the microbial pangenome. *Science*, 359, 6379, eaar4120.
- Dubreuil JD, Isaacson RE, Schifferli DM, 2016. Animal enterotoxigenic *Escherichia coli*. *EcoSal Plus*, 7, 1, 10.1128/ecosalplus. ESP-0006-2016.
- Duckworth DH, 1976. "Who discovered bacteriophage?". *Bacteriological Reviews*, 40, 4, 793-802.
- Dy RL, Richter C, Salmond GP, Fineran PC, 2014. Remarkable mechanisms in microbes to resist phage infections. *Annual Review of Virology*, 1, 1, 307-31.
- Dybvig K, Maniloff J, 1983. Integration and lysogeny by an enveloped mycoplasma virus. *Journal of General Virology*, 64, 8, 1781-5.
- Eaton MD, Bayne-Jones S, 1934. Bacteriophage therapy: review of the principles and results of the use of bacteriophage in the treatment of infections. *Journal of the American Medical Association*, 103, 23, 1769-76.
- Egido JE, Costa AR, Aparicio-Maldonado C, Haas PJ, Brouns SJJ, 2022. Mechanisms and clinical importance of bacteriophage resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 46, 1.
- Egido JE, Toner-Bartelds C, Costa AR, Brouns SJ, Rooijakkers SH, Bardoel BW, Haas P-J, 2023. Monitoring phage-induced lysis of gram-negatives in real time using a fluorescent DNA dye. *Scientific Reports*, 13, 1, 856.
- Elbahnasawy MA, ElSayed EE, Azzam MI, 2021. Newly isolated coliphages for bio-controlling multidrug-resistant *Escherichia coli* strains. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 16, 100542.
- Ellis EL, Delbruck M, 1939. The growth of bacteriophage. *The Journal of General Physiology*, 22, 3, 365-84.
- Ely B, Lenski J, Mohammadi T, 2023. Structural and genomic diversity of bacteriophages. *Bacteriophages: Methods and Protocols*, 3-16.
- Enault F, Briet A, Bouteille L, Roux S, Sullivan MB, Petit M-A, 2017. Phages rarely encode antibiotic resistance genes: a cautionary tale for virome analyses. *The ISME Journal*, 11, 1, 237-47.
- Engelen F, Thiry D, Devleeschauwer B, Heyndrickx M, Mainil J, De Zutter L, Cox E, 2021. Pathogenic potential of *Escherichia coli* O157 and O26 isolated from young Belgian dairy calves by recto-anal mucosal swab culturing. *Journal of Applied Microbiology*, 131, 2, 964-72.
- Esmailzadeh MR, Sabzi S, Hajhossein Tabrizi A, 2022. Isolation and in Vitro Characterization of Specific Bacteriophages against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Infection Epidemiology and Microbiology*, 8, 2, 121-8.
- Estrella LA, Quinones J, Henry M, Hannah RM, Pope RK, Hamilton T, Teneza-Mora N, Hall E, Biswajit B, 2016. Characterization of novel *Staphylococcus aureus* lytic phage and defining their combinatorial virulence using the OmniLog® system. *Bacteriophage*, 6, 3, e1219440.
- Fairbrother JM, Nadeau É, 2019. Colibacillosis. *Diseases of Swine*, 807-34.
- Fakih I, Thiry D, Duprez J-N, Saulmont M, Iguchi A, Piérard D, Jouant L, Daube G, Ogura Y, Hayashi T, 2017. Identification of Shiga toxin-producing (STEC) and enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* in diarrhoeic calves and comparative genomics of O5 bovine and human STEC. *Veterinary Microbiology*, 202, 16-22.
- Fathy R, Eid AS, Hammad AA, El-Nour SAA, 2024. Isolation and characterization of coliphages from different water sources and their biocontrol application combined with electron beam irradiation for elimination of *E. coli* in domestic wastewater. *Annals of Microbiology*, 74, 1.
- Ferriol-González C, Domingo-Calap P, 2020. Phages for biofilm removal. *Antibiotics*, 9, 5, 268.

- Feuerstein A, Scuda N, Klose C, Hoffmann A, Melchner A, Boll K, Rettinger A, Fell S, Straubinger RK, Riehm JM, 2021. Antimicrobial resistance, serologic and molecular characterization of *E. coli* isolated from calves with severe or fatal enteritis in Bavaria, Germany. *Antibiotics*, 11, 1, 23.
- Fiers W, Contreras R, Duerinck F, Haegeman G, Iserentant D, Merregaert J, Min Jou W, Molemans F, Raeymaekers A, Van den Berghe A, 1976. Complete nucleotide sequence of bacteriophage MS2 RNA: primary and secondary structure of the replicase gene. *Nature*, 260, 5551, 500-7.
- Figuroa-Bossi N, Bossi L, 1999. Inducible prophages contribute to *Salmonella* virulence in mice. *Molecular Microbiology*, 33, 1, 167-76.
- Filée J, Tétart F, Suttle CA, Krisch H, 2005. Marine T4-type bacteriophages, a ubiquitous component of the dark matter of the biosphere. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102, 35, 12471-6.
- Finley RL, Collignon P, Larsson DJ, McEwen SA, Li X-Z, Gaze WH, Reid-Smith R, Timinouni M, Graham DW, Topp E, 2013. The scourge of antibiotic resistance: the important role of the environment. *Clinical Infectious Diseases*, 57, 5, 704-10.
- Frampton E, Restaino L, 1993. Methods for *Escherichia coli* identification in food, water and clinical samples based on beta-glucuronidase detection. *Journal of Applied Bacteriology*, 74, 3, 223-33.
- Franck SM, Bosworth BT, Moon HW, 1998. Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing, and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from calves. *Journal of clinical microbiology*, 36, 6, 1795-7.
- Frank JA, Lorimer D, Youle M, Witte P, Craig T, Abendroth J, Rohwer F, Edwards RA, Segall AM, Burgin Jr AB, 2013. Structure and function of a cyanophage-encoded peptide deformylase. *The ISME Journal*, 7, 6, 1150-60.
- Ganz T, Lehrer RI, 1999. Antibiotic peptides from higher eukaryotes: biology and applications. *Molecular Medicine Today*, 5, 7, 292-7.
- Gao L, Altae-Tran H, Böhning F, Makarova KS, Segel M, Schmid-Burgk JL, Koob J, Wolf YI, Koonin EV, Zhang F 2020. Diverse enzymatic activities mediate antiviral immunity in prokaryotes. *Science* (New York, N.Y.), 369(6507), 1077–1084.
- Garen A, Puck TT, 1951. The first two steps of the invasion of host cells by bacterial viruses. II. *The Journal of experimental medicine*, 94, 3, 177.
- Gaynes R, 2017. The discovery of penicillin—new insights after more than 75 years of clinical use. *Emerging infectious diseases*, 23, 5, 849.
- Gaze WH, Krone SM, Larsson DJ, Li X-Z, Robinson JA, Simonet P, Smalla K, Timinouni M, Topp E, Wellington EM, 2013. Influence of humans on evolution and mobilization of environmental antibiotic resistome. *Emerging infectious diseases*, 19, 7.
- Gembara K, Dąbrowska K, 2021. Phage-specific antibodies. *Current opinion in biotechnology*, 68, 186-92.
- Gembara K, Dąbrowska K, 2023. Interaction of bacteriophages with the Immune system: induction of bacteriophage-specific antibodies. In: *Bacteriophage Therapy: From Lab to Clinical Practice*. Eds: Springer, p. 183-96.
- Gibbons JF, Boland F, Buckley JF, Butler F, Egan J, Fanning S, Markey BK, Leonard FC, 2014. Patterns of antimicrobial resistance in pathogenic *Escherichia coli* isolates from cases of calf enteritis during the spring-calving season. *Veterinary Microbiology*, 170, 1-2, 73-80.
- Glonti T, Pirnay J-P, 2022. In vitro techniques and measurements of phage characteristics that are important for phage therapy success. *Viruses*, 14, 7, 1490.
- Gómez P, Buckling A, 2011. Bacteria-Phage Antagonistic Coevolution in Soil. *Science*, 332, 6025, 106-9.
- Gordillo Altamirano FL, Barr JJ, 2019. Phage Therapy in the Postantibiotic Era. *Clinical Microbiology Reviews*, 32, 2, e00066-18.

- Graham D, Collignon P, Davies J, Larsson D, Snape J, 2014. Underappreciated role of regionally poor water quality on globally increasing antibiotic resistance. *Environmental Science & Technology*, 48, 20, 11746-7.
- Grami E, Badawy S, Kiljunen S, Saidi N, Skurnik M, 2023. Characterization and genome analysis of *Escherichia* phage fBC-Eco01, isolated from wastewater in Tunisia. *Archives of Virology*, 168, 2, 44.
- Grant JR, Enns E, Marinier E, Mandal A, Herman EK, Chen CY, Graham M, Van Domselaar G, Stothard P. (2023). Proksee: in-depth characterization and visualization of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 51(W1), W484–W492.
- Gregory AC, Zablocki O, Zayed AA, Howell A, Bolduc B, Sullivan MB, 2020. The gut virome database reveals age-dependent patterns of virome diversity in the human gut. *Cell Host & Microbe*, 28, 5, 724-40. e8.
- Guo Y, Li J, Islam MS, Yan T, Zhou Y, Liang L, Connerton IF, Deng K, Li J, 2021. Application of a novel phage vB_SalS-LPSTLL for the biological control of *Salmonella* in foods. *Food Research International*, 147, 110492.
- Guo Z, Huang J, Yan G, Lei L, Wang S, Yu L, Zhou L, Gao A, Feng X, Han W, 2017. Identification and characterization of Dpo42, a novel depolymerase derived from the *Escherichia coli* phage vB_EcoM_ECOO78. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1460.
- Gutierrez D, Martin-Platero AM, Rodriguez A, Martinez-Bueno M, Garcia P, Martinez B, 2011. Typing of bacteriophages by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR to assess genetic diversity. *FEMS Microbiology Letters*, 322, 1, 90-7.
- Güler L, Gündüz K, Ok Ü, 2008. Virulence factors and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from calves in Turkey. *Zoonoses and Public Health*, 55, 5, 249-57.
- Hadas H, Einav M, Fishov I, Zaritsky A, 1997. Bacteriophage T4 development depends on the physiology of its host *Escherichia coli*. *Microbiology*, 143, 1, 179-85.
- Hadimli HH, Sakmanoğlu A, Gölen GS, 2021. Evaluation of the effectiveness of bacteriophage therapy against *Salmonella* infections in mice. *Eurasian Journal of Veterinary Sciences*, 37, 3, 151-6.
- Haines ME, Hodges FE, Nale JY, Mahony J, Van Sinderen D, Kaczorowska J, Alrashid B, Akter M, Brown N, Sauvageau D, 2021. Analysis of selection methods to develop novel phage therapy cocktails against antimicrobial resistant clinical isolates of bacteria. *Frontiers in microbiology*, 12, 613529.
- Hanlon GW, 2007. Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 30, 2, 118-28.
- Hanson CA, Marston MF, Martiny JB, 2016. Biogeographic variation in host range phenotypes and taxonomic composition of marine cyanophage isolates. *Frontiers in Microbiology*, 7, 983.
- Hantke K, 2020. Compilation of *Escherichia coli* K-12 outer membrane phage receptors - their function and some historical remarks. *FEMS Microbiology Letters*, 367, 2.
- Harshey RM, 2015. Transposable phage mu. *Mobile DNA III*, 669-91.
- Hatfull GF, Hendrix RW, 2011. Bacteriophages and their genomes. *Current Opinion in Virology*, 1, 4, 298-303.
- Hay ID, Lithgow T, 2019. Filamentous phages: masters of a microbial sharing economy. *EMBO Reports*, 20, 6, e47427.
- Heinrichs ME, Piedade GJ, Popa O, Sommers P, Trubl G, Weissenbach J, Rahlff J, 2023. Breaking the Ice: A Review of Phages in Polar Ecosystems. *Bacteriophages: Methods and Protocols*, 31-71.
- Hendrix RW, Hatfull GF, Ford ME, Smith MC, Burns RN, 2002. Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: all the world's a phage. In: *Horizontal gene transfer*. Eds: Elsevier, p. 133-VI.
- Hernandez CA, Koskella B, 2019. Phage resistance evolution in vitro is not reflective of in vivo outcome in a plant-bacteria-phage system. *Evolution*, 73, 12, 2461-75.

- Holmes AH, Moore LS, Sundsfjord A, Steinbakk M, Regmi S, Karkey A, Guerin PJ, Piddock LJ, 2016. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *The Lancet*, 387, 10014, 176-87.
- Homeier-Bachmann T, Kleist JF, Schütz AK, Bachmann L, 2022. Distribution of ESBL/AmpC-*Escherichia coli* on a dairy farm. *Antibiotics*, 11, 7, 940.
- Hong Y, Pan Y, Ebner PD, 2014. Meat Science and Muscle Biology Symposium: Development of bacteriophage treatments to reduce *Escherichia coli* O157:H7 contamination of beef products and produce. *The Journal of Animal Science*, 92, 4, 1366-77.
- Hosein H, Azzam R, Abo-Elwafa M, Menshawy A, Rouby S, 2019. Virulence profile of enteropathogenic *Escherichia coli* (epec) isolated from the cases of neonatal calf diarrhea. *Adv. Anim. Veterinary Sciences*, 7, 9, 756-61.
- Hosseini N, Chehrehgani M, Moineau S, Charette SJ, 2024. Centroid of the bacterial growth curves: a metric to assess phage efficiency. *Communications Biology*, 7, 1, 673.
- Houndt T, Ochman H, 2000. Long-term shifts in patterns of antibiotic resistance in enteric bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 12, 5406-9.
- Howard-Varona C, Hargreaves KR, Abedon ST, Sullivan MB, 2017. Lysogeny in nature: mechanisms, impact and ecology of temperate phages. *The ISME journal*, 11, 7, 1511-20.
- Huff W, Huff G, Rath N, Donoghue A, 2010. Immune interference of bacteriophage efficacy when treating colibacillosis in poultry1. *Poultry Science*, 89, 5, 895-900.
- Hutchings MI, Truman AW, Wilkinson B, 2019. Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*, 51, 72-80.
- Hyman P, Abedon ST, 2009. Practical methods for determining phage growth parameters. *Methods in Molecular Biology*, 501, 175-202.
- Hyman P, Abedon ST, 2010. Bacteriophage host range and bacterial resistance. *Advances in Applied Microbiology*, 70, 217-48.
- Imam M, Alrashid B, Patel F, Dowah AS, Brown N, Millard A, Clokie MR, Galyov EE, 2019. vB_PaeM_MIJ3, a novel jumbo phage infecting *Pseudomonas aeruginosa*, possesses unusual genomic features. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2772.
- Iriyanto FE, Yuliasari WC, Rahmawati A, Sholehuddin M, Ramadhan AA, Addy HS, 2016. A Simple bacteriophage-based detection kit for detecting *Escherichia coli* on post-harvest agricultural product. *Journal of Advanced Agricultural Technologies Vol*, 3, 3.
- Jamal M, Hussain T, Das CR, Andleeb S, 2015. Isolation and characterization of a Myoviridae MJ1 bacteriophage against multi-drug resistant *Escherichia coli* 3. *Jundishapur journal of Microbiology*, 8, 11, e25917.
- Jerne NK, Avegno P, 1956. The development of the phage-inactivating properties of serum during the course of specific immunization of an animal: reversible and irreversible inactivation. *The Journal of Immunology*, 76, 3, 200-8.
- Ji S, Jiang T, Yan H, Guo C, Liu J, Su H, Alugongo GM, Shi H, Wang Y, Cao Z, 2018. Ecological restoration of antibiotic-disturbed gastrointestinal microbiota in foregut and hindgut of cows. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, 79.
- Jurczak-Kurek A, Gasior T, Nejman-Falenczyk B, Bloch S, Dydecka A, Topka G, Necel A, Jakubowska-Deredas M, Narajczyk M, Richert M, Mieszkowska A, Wrobel B, Wegrzyn G, Wegrzyn A, 2016. Biodiversity of bacteriophages: morphological and biological properties of a large group of phages isolated from urban sewage. *Scientific Reports*, 6, 34338.
- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL, 2004. Pathogenic escherichia coli. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 2, 123-40.
- Kasman L, Porter L, (2019). *Bacteriophages*; StatPearls–NCBI Bookshelf, StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA.

- Kauffman KM, Hussain FA, Yang J, Arevalo P, Brown JM, Chang WK, VanInsberghe D, Elsherbini J, Sharma RS, Cutler MB, 2018. A major lineage of non-tailed dsDNA viruses as unrecognized killers of marine bacteria. *Nature*, 554, 7690, 118-22.
- Keen EC, 2015. A century of phage research: Bacteriophages and the shaping of modern biology. *Bioessays*, 37, 1, 6-9.
- Kessler R, Nisa S, Hazen TH, Horneman A, Amoroso A, Rasko DA, Donnenberg MS, 2015. Diarrhea, bacteremia and multiorgan dysfunction due to an extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strain with enteropathogenic *E. coli* genes. *Pathogens and Disease*, 73, 8, ftv076.
- Khan Mirzaei M, Nilsson AS, 2015. Isolation of phages for phage therapy: a comparison of spot tests and efficiency of plating analyses for determination of host range and efficacy. *PLoS One*, 10, 3, e0118557.
- Khawaskar DP, Sinha DK, Lalrinzuala MV, Athira V, Kumar M, Chhakchhuak L, Mohanapriya K, Sophia I, Abhishek, Kumar ORV, Chaudhuri P, Singh BR, Thomas P, 2022. Pathotyping and antimicrobial susceptibility testing of *Escherichia coli* isolates from neonatal calves. *Veterinary Research Communications*, 46, 2, 353-62.
- Kim G-H, Kim J-W, Kim J, Chae JP, Lee J-S, Yoon S-S, 2020. Genetic Analysis and Characterization of a Bacteriophage ØCJ19 Active against Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Food Science of Animal Resources*, 40, 5, 746-57.
- Kim HS, Whon TW, Sung H, Jeong Y-S, Jung ES, Shin N-R, Hyun D-W, Kim PS, Lee J-Y, Lee CH, 2021. Longitudinal evaluation of fecal microbiota transplantation for ameliorating calf diarrhea and improving growth performance. *Nat Commun*, 12, 1, 161.
- Kim N, Gu MJ, Kye YC, Ju YJ, Hong R, Ju DB, Pyung YJ, Han SH, Park BC, Yun CH, 2022. Bacteriophage EK99P-1 alleviates enterotoxigenic *Escherichia coli* K99-induced barrier dysfunction and inflammation. *Scientific Reports*, 12, 1, 941.
- Kim SG, Lee SB, Giri SS, Kim HJ, Kim SW, Kwon J, Park J, Roh E, Park SC, 2020. Characterization of novel *Erwinia amylovora* jumbo bacteriophages from *Eneladusvirus* genus. *Viruses*, 12, 12, 1373.
- Kim YT, Richardson CC, 1993. Bacteriophage T7 gene 2.5 protein: an essential protein for DNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90, 21, 10173-7.
- King AM, Lefkowitz E, Adams MJ, Carstens EB, 2011. Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Elsevier, p.
- Knezevic P, Adriaenssens EM, Consortium IR, 2021. ICTV virus taxonomy profile: inoviridae. *Journal of General Virology*, 102, 7, 001614.
- Kolenda C, Jourdan J, Roussel-Gaillard T, Medina M, Laurent F, 2024. Phage susceptibility testing methods or ‘phagograms’: where do we stand and where should we go? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 79, 11, 2742-9.
- Kolenda R, Burdukiewicz M, Schierack P, 2015. A systematic review and meta-analysis of the epidemiology of pathogenic *Escherichia coli* of calves and the role of calves as reservoirs for human pathogenic *E. coli*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5, 23.
- Kolmogorov M, Yuan J, Lin Y, Pevzner PA, 2019. Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs. *Nature Biotechnology*, 37, 5, 540-6.
- Korn AM, Hillhouse AE, Sun L, Gill JJ, 2021. Comparative genomics of three novel jumbo bacteriophages infecting *Staphylococcus aureus*. *Journal of virology*, 95, 19, 10.1128/jvi. 02391-20.
- Koskella B, Meaden S, 2013. Understanding bacteriophage specificity in natural microbial communities. *Viruses*, 5, 3, 806-23.
- Koskella B, Parr N, 2015. The evolution of bacterial resistance against bacteriophages in the horse chestnut phyllosphere is general across both space and time. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370, 1675, 20140297.

- Kostyuchenko VA, Chipman PR, Leiman PG, Arisaka F, Mesyanzhinov VV, Rossmann MG, 2005. The tail structure of bacteriophage T4 and its mechanism of contraction. *Nat Struct Mol Biol*, 12, 9, 810-3.
- Kotay SM, Choi J, Goel R. Phage therapy for sludge bulking using a novel bacteriophage infecting filamentous bacterium, *Sphaerotilus Natans*. *WEFTEC* 2010, 5586-94.
- Krasowska A, Biegalska A, Augustyniak D, Łoś M, Richert M, Łukaszewicz M, 2015. Isolation and characterization of phages infecting *Bacillus subtilis*. *BioMed Research International*, 2015, 1, 179597.
- Krishnamurthy SR, Janowski AB, Zhao G, Barouch D, Wang D, 2016. Hyperexpansion of RNA Bacteriophage Diversity. *PLoS Biol*, 14, 3, e1002409.
- Kropinski AM, Mazzocco A, Waddell TE, Lingohr E, Johnson RP, 2009. Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay. In: *Bacteriophages: methods and protocols*, volume 1: isolation, characterization, and interactions. Eds: Springer, p. 69-76.
- Kropinski AM, Waddell T, Meng J, Franklin K, Ackermann H-W, Ahmed R, Mazzocco A, Yates J, Lingohr EJ, Johnson RP, 2013. The host-range, genomics and proteomics of *Escherichia coli* O157: H7 bacteriophage rV5. *Virology journal*, 10, 1-12.
- Krueger AP, Scribner EJ, 1941. The bacteriophage: its nature and its therapeutic use. *Journal of the American Medical Association*, 116, 20, 2269-77.
- Krupovic M, Consortium IR, 2018. ICTV virus taxonomy profile: Plasmaviridae. *Journal of General Virology*, 99, 5, 617-8.
- Krupovic M, Prangishvili D, Hendrix RW, Bamford DH, 2011. Genomics of bacterial and archaeal viruses: dynamics within the prokaryotic virosphere. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75, 4, 610-35.
- Kumar V, Remers WA, Grulich R, 1977. The structure of akalvin. *The Journal of Antibiotics*, 30, 10, 881-2.
- Kumar P, Meghvansi MK, Kamboj D, 2021. Isolation, phenotypic characterization and comparative genomic analysis of 2019SD1, a polyvalent enterobacteria phage. *Scientific Reports*, 11, 1, 22197.
- Kurochkina LP, Vishnevskiy AY, Zhemaeva LV, Sykilinda NN, Strelkov SV, Mesyanzhinov VV, 2006. Structure, stability, and biological activity of bacteriophage T4 gene product 9 probed with mutagenesis and monoclonal antibodies. *Journal of Structural Biology*, 154, 2, 122-9.
- Kutter E, 2009. Phage Host Range and Efficiency of Plating. In: *Bacteriophages: Methods and Protocols*, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions. Eds: Clokie MRJ, Kropinski AM. Totowa, NJ: Humana Press, p. 141-9.
- Kutter E, De Vos D, Gvasalia G, Alavidze Z, Gogokhia L, Kuhl S, Abedon ST, 2010. Phage therapy in clinical practice: treatment of human infections. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 11, 1, 69-86.
- Kutter E, Bryan D, Ray G, Brewster E, Blasdel B, Guttman B, 2018. From host to phage metabolism: hot tales of phage T4's takeover of *E. coli*. *Viruses*, 10, 7, 387.
- Kutter E, Sulakvelidze A, 2004. *Bacteriophages: biology and applications*, CRC Press, p.
- Ledeboer A, Bezemer S, De Haard J, Schaffers I, Verrips C, Van Vliet C, Düsterhöft E-M, Zoon P, Moineau S, Frenken L, 2002. Preventing phage lysis of *Lactococcus lactis* in cheese production using a neutralizing heavy-chain antibody fragment from llama. *Journal of Dairy Science*, 85, 6, 1376-82.
- Leiman PG, Chipman PR, Kostyuchenko VA, Mesyanzhinov VV, Rossmann MG, 2004. Three-dimensional rearrangement of proteins in the tail of bacteriophage T4 on infection of its host. *Cell*, 118, 4, 419-29.
- Li H, 2018. Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences. *Bioinformatics*, 34, 18, 3094-100.
- Liao Y-T, Quintela IA, Nguyen K, Salvador A, Cooley MB, Wu VC, 2018. Investigation of prevalence of free Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC)-specific bacteriophages and its correlation

- with STEC bacterial hosts in a produce-growing area in Salinas, California. *PLoS One*, 13, 1, e0190534.
- Lindell D, Jaffe JD, Johnson ZI, Church GM, Chisholm SW, 2005. Photosynthesis genes in marine viruses yield proteins during host infection. *Nature*, 438, 7064, 86-9.
- Łobocka MB, Rose DJ, Plunkett III G, Rusin M, Samojedny A, Lehnher Hr, Yarmolinsky MB, Blattner FR, 2004. Genome of bacteriophage P1. *Journal of Bacteriology*, 186, 21, 7032-68.
- Lopatkin AJ, Sysoeva TA, You L, 2016. Dissecting the effects of antibiotics on horizontal gene transfer: Analysis suggests a critical role of selection dynamics. *Bioessays*, 38, 12, 1283-92.
- Lorenz I, 2021. Calf health from birth to weaning-an update. *Irish Veterinary Journal*, 74, 1-8.
- Lourenço M, Chaffrignon L, Lamy-Besnier Q, Titécat M, Pédrón T, Sismeiro O, Legendre R, Varet H, Coppée J-Y, Bérard M, 2022. The gut environment regulates bacterial gene expression which modulates susceptibility to bacteriophage infection. *Cell Host & Microbe*, 30, 4, 556-69. e5.
- Łusiak-Szelachowska M, Żaczek M, Weber-Dąbrowska B, Międzybrodzki R, Kłak M, Fortuna W, Letkiewicz S, Rogóż P, Szufnarowski K, Jończyk-Matysiak E, 2014. Phage neutralization by sera of patients receiving phage therapy. *Viral Immunology*, 27, 6, 295-304.
- Maffei E, Shaidullina A, Burkolter M, Heyer Y, Estermann F, Druelle V, Sauer P, Willi L, Michaelis S, Hilbi H, Thaler DS, Harms A, 2021. Systematic exploration of *Escherichia coli* phage-host interactions with the BASEL phage collection. *PLoS Biology*, 19, 11, e3001424.
- Mahmoud ES, Taha RM, Bassyouni RH, Ahmed FA, Samhan FA, 2023. Isolation and characterization of lytic bacteriophages specific for antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Labyrinth: Fayoum Journal of Science and Interdisciplinary Studies*, 1(2), 55-64.
- Mahony J, Randazzo W, Neve H, Settanni L, van Sinderen D, 2015. Lactococcal 949 group phages recognize a carbohydrate receptor on the host cell surface. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 10, 3299-305.
- Maier GU, Breitenbuecher J, Gomez JP, Samah F, Fausak E, Van Noord M, 2022. Vaccination for the prevention of neonatal calf diarrhea in cow-calf operations: a scoping review. *Veterinary and Animal Science*, 15, 100238.
- Majed QA, Alazemi MS, 2023. Studies on Neonatal Calf Diarrhea in Kuwait. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 53, 2, 411-6.
- Majewska J, Beta W, Lecion D, Hodyra-Stefaniak K, Kłopot A, Kaźmierczak Z, Miernikiewicz P, Piotrowicz A, Ciekot J, Owczarek B, 2015. Oral application of T4 phage induces weak antibody production in the gut and in the blood. *Viruses*, 7, 8, 4783-99.
- Majewska J, Kaźmierczak Z, Lahutta K, Lecion D, Szymczak A, Miernikiewicz P, Drapała J, Harhala M, Marek-Bukowiec K, Jędruchiewicz N, 2019. Induction of phage-specific antibodies by two therapeutic staphylococcal bacteriophages administered per os. *Frontiers in Immunology*, 10, 2607.
- Malik B, Bhattacharyya S, 2019. Antibiotic drug-resistance as a complex system driven by socio-economic growth and antibiotic misuse. *Scientific Reports*, 9(1), 9788.
- Malmuthuge N, Liang G, Griebel PJ, Guan LL, 2019. Taxonomic and functional compositions of the small intestinal microbiome in neonatal calves provide a framework for understanding early life gut health. *Appl Environ Microbiol*, 85, 6, e02534-18.
- Martiny AC, Huang Y, Li W, 2009. Occurrence of phosphate acquisition genes in *Prochlorococcus* cells from different ocean regions. *Environmental Microbiology*, 11, 6, 1340-7.
- Merabishvili M, Pirnay J-P, De Vos D, 2017. Guidelines to compose an ideal bacteriophage cocktail. In: *Bacteriophage therapy: from lab to clinical practice*. Eds: Springer, p. 99-110.
- McEwen SA, Collignon PJ, 2018. Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. *Microbiol Spectr*, 6, 2.
- McLeod SM, Kimsey HH, Davis BM, Waldor MK, 2005. CTX ϕ and *Vibrio cholerae*: exploring a newly recognized type of phage-host cell relationship. *Molecular Microbiology*, 57, 2, 347-56.

- Mellata M, 2013. Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends. *Foodborne Pathogens and Disease*, 10, 11, 916-32.
- Miller ES, Kutter E, Mosig G, Arisaka F, Kunisawa T, Rüger W, 2003. Bacteriophage T4 genome. *Microbiology and molecular biology reviews*, 67, 1, 86-156.
- Mirzaei MK, Nilsson AS, 2015. Correction: Isolation of phages for phage therapy: A comparison of spot tests and efficiency of plating analyses for determination of host range and efficacy. *PLoS One*, 10, 5, e0127606.
- Mirzaei MK, Maurice CF, 2017. Ménage à trois in the human gut: interactions between host, bacteria and phages. *Nature Reviews Microbiology*, 15, 7, 397-408.
- Modi SR, Lee HH, Spina CS, Collins JJ, 2013. Antibiotic treatment expands the resistance reservoir and ecological network of the phage metagenome. *Nature*, 499, 7457, 219-22.
- Mohteshamuddin K, Hamdan L, AlKaabi AB, Barigye R, 2020. *Cryptosporidium parvum* and other enteric pathogens in scouring neonatal dairy calves from the Al Ain region, United Arab Emirates. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 21, 100435.
- Muktar Y, Mamo G, Tesfaye B, Belina D, 2015. A review on major bacterial causes of calf diarrhea and its diagnostic method. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health*, 7, 5, 173-85.
- Nanda AM, Heyer A, Krämer C, Grünberger A, Kohlheyer D, Frunzke J, 2014. Analysis of SOS-induced spontaneous prophage induction in *Corynebacterium glutamicum* at the single-cell level. *Journal of Bacteriology*, 196, 1, 180-8.
- Nataro JP, Kaper JB, 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11, 1, 142-201.
- Naureen Z, Dautaj A, Anpilogov K, Camilleri G, Dhuli K, Tanzi B, Maltese PE, Cristofoli F, De Antoni L, Beccari T, 2020. Bacteriophages presence in nature and their role in the natural selection of bacterial populations. *Acta Bio Medica: Atenei Parmensis*, 91, Suppl 13.
- Navarro-Garcia F, 2015. *Escherichia coli* O104: H4 pathogenesis: an enteroaggregative *E. coli*/Shiga toxin-producing *E. coli* explosive cocktail of high virulence. *Enterohemorrhagic Escherichia coli and Other Shiga Toxin-Producing E. coli*, 503-29.
- Nguyen K, Simmons K, Tatarnikov I, 2014. Co-inoculation of *Escherichia coli* B23 by T4 and T7 bacteriophages results in competition shown by an overall drop in phage progeny. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 18, 156-61.
- Nguyen HM, Watanabe S, Sharmin S, Kawaguchi T, Tan X-E, Wannigama DL, Cui L, 2023. RNA and single-stranded DNA phages: unveiling the promise from the underexplored world of viruses. *International Journal of Molecular Sciences*, 24, 23, 17029.
- Nobrega FL, Costa AR, Santos JF, Siliakus MF, Van Lent JW, Kengen SW, Azeredo J, Kluskens LD, 2016. Genetically manipulated phages with improved pH resistance for oral administration in veterinary medicine. *Scientific Reports*, 6, 1, 39235.
- Nobrega FL, Vlot M, De Jonge PA, Dreesens LL, Beaumont HJ, Lavigne R, Dutilh BE, Brouns SJ, 2018. Targeting mechanisms of tailed bacteriophages. *Nature Reviews Microbiology*, 16, 12, 760-73.
- Ochoa TJ, Contreras CA, 2011. Enteropathogenic *Escherichia coli* infection in children. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 24, 5, 478-83.
- Oechslin F, 2018. Resistance development to bacteriophages occurring during bacteriophage therapy. *Viruses*, 10, 7, 351.
- Ofir G, Herbst E, Baroz M, Cohen D, Millman A, Doron S, Tal N, Malheiro DB, Malitsky S, Amitai G, 2021. Antiviral activity of bacterial TIR domains via immune signalling molecules. *Nature*, 600, 7887, 116-20.
- Ogilvie LA, Jones BV, 2015. The human gut virome: a multifaceted majority. *Frontiers in Microbiology*, 6, 918.

- Ok M, Guler L, Turgut K, Ok U, Sen I, Gunduz IK, Birdane MF, Guzelbektes H, 2009. The studies on the aetiology of diarrhoea in neonatal calves and determination of virulence gene markers of *Escherichia coli* strains by multiplex PCR. *Zoonoses Public Health*, 56, 2, 94-101.
- Oksanen HM, Consortium IR, 2017. ICTV virus taxonomy profile: Corticoviridae. *Journal of General Virology*, 98, 5, 888-9.
- Olszak T, Latka A, Roszniowski B, Valvano MA, Drulis-Kawa Z, 2017. Phage life cycles behind bacterial biodiversity. *Current Medicinal Chemistry*, 24, 36, 3987-4001.
- Öztrürk D, Kale M, Yapıcıer ÖŞ, Saltık HS, Atlı K, Yaman S, 2024. Diarrhea in Neonatal Calves- Bacterial and Viral Factors. *Acta Scientiae Veterinariae*, 52.
- Pakbin B, Bruck WM, Rossen JWA, 2021. Virulence Factors of Enteric Pathogenic *Escherichia coli*: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 18.
- Pawluk A, Davidson AR, Maxwell KL, 2018. Anti-CRISPR: discovery, mechanism and function. *Nature Reviews Microbiology*, 16, 1, 12-7.
- Payne LJ, Todeschini TC, Wu Y, Perry BJ, Ronson CW, Fineran PC, Nobrega FL, Jackson SA, 2021. Identification and classification of antiviral defence systems in bacteria and archaea with PADLOC reveals new system types. *Nucleic Acids Research*, 49, 19, 10868-78.
- Perron GG, Whyte L, Turnbaugh PJ, Goordial J, Hanage WP, Dantas G, Desai MM, 2015. Functional Characterization of Bacteria Isolated from Ancient Arctic Soil Exposes Diverse Resistance Mechanisms to Modern Antibiotics. *PLOS ONE*, 10, 3, e0069533.
- Pires DP, Oliveira H, Melo LD, Sillankorva S, Azeredo J, 2016. Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 100, 2141-51.
- Pires DP, Costa AR, Pinto G, Meneses L, Azeredo J, 2020. Current challenges and future opportunities of phage therapy. *FEMS Microbiology Reviews*, 44, 6, 684-700.
- Pirnay J-P, Merabishvili M, Van Raemdonck H, De Vos D, Verbeken G, 2018. Bacteriophage production in compliance with regulatory requirements. *Bacteriophage Therapy: From Lab to Clinical Practice*, 233-52.
- Poxleitner M, Pope W, Jacobs-Sera D, Sivanathan V, Hatfull G, 2018. *Phage Discovery Guide*. Howard Hughes Medical Institute.
- Prestinaci F, Pezzotti P, Pantosti A, 2015. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathogens and global health*, 109(7), 309–318.
- Rai S, Kumar M, Jas R, Mandal G, Samanta I, Rajendar M, Tripura S, Das S, Mondal M, Mandal D, 2023. Antibacterial effect of kitchen herbs against pathogenic multidrug-resistant *E. coli* isolates from calf diarrhoea. *Tropical Animal Health and Production*, 55, 3, 211.
- Rajagopala SV, Casjens S, Uetz P, 2011. The protein interaction map of bacteriophage lambda. *BMC Microbiology*, 11, 1-15.
- Rakonjac J, Bennett NJ, Spagnuolo J, Gagic D, Russel M, 2011. Filamentous bacteriophage: biology, phage display and nanotechnology applications. *Current Issues in Molecular Biology*, 13, 2, 51-76.
- Ravin NV, 2015. Replication and maintenance of linear phage-plasmid N15. *Microbiology Spectrum*, 3, 1.
- Renner ED, Krätz CE, Orange JS, Hagl B, Rylaarsdam S, Notheis G, Durandy A, Torgerson TR, Ochs HD, 2021. Class switch recombination defects: Impact on B cell maturation and antibody responses. *Clinical Immunology*, 222, 108638.
- Reuben RC, Gefer ML, 1974. A deoxyribonucleic acid-binding protein induced by bacteriophage T7: Purification and properties of the protein. *Journal of Biological Chemistry*, 249, 12, 3843-50.
- Ribeiro da Cunha B, Fonseca LP, Calado CR, 2019. Antibiotic discovery: where have we come from, where do we go? *Antibiotics*, 8, 2, 45.

- Robi DT, Mossie T, Temteme S, 2024. A comprehensive review of the common bacterial infections in dairy calves and advanced strategies for health management. *Veterinary Medicine: Research and Reports*, 1-14.
- Robinson TP, Bu DP, Carrique-Mas J, Fèvre EM, Gilbert M, Grace D, Hay SI, Jiwakanon J, Kakkar M, Kariuki S, Laxminarayan R, Lubroth J, Magnusson U, Thi Ngoc P, Van Boeckel TP, Woolhouse MEJ, 2016. Antibiotic resistance is the quintessential One Health issue. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 110, 7, 377-80.
- Rojas-Lopez M, Monterio R, Pizza M, Desvaux M, Rosini R, 2018. Intestinal pathogenic *Escherichia coli*: insights for vaccine development. *Frontiers in Microbiology*, 9, 440.
- Rostøl JT, Marraffini L, 2019. (Ph)ighting phages: how bacteria resist their parasites. *Cell Host & Microbe*, 25, 2, 184-94.
- Roucourt B, Lavigne R, 2009. The role of interactions between phage and bacterial proteins within the infected cell: a diverse and puzzling interactome. *Environmental Microbiology*, 11, 11, 2789-805.
- Roux S, Brum JR, Dutilh BE, Sunagawa S, Duhaime MB, Loy A, Poulos BT, Solonenko N, Lara E, Poulain J, Pesant S, Kandels-Lewis S, Dimier C, Picheral M, Searson S, Cruaud C, Alberti A, Duarte CM, Gasol JM, Vaqué D, Bork P, Acinas SG, Wincker P, Sullivan MB, 2016. Ecogenomics and potential biogeochemical impacts of globally abundant ocean viruses. *Nature*, 537, 7622, 689-93.
- Ruska H, Ruska H, 1943. Ergebnisse der Bakteriophagenforschung und ihre Deutung nach morphologischen Befunden. *Der Stand der Bakteriophagenforschung*, 437-98.
- Ruuskanen M, Muurinen J, Meierjohan A, Pärnänen K, Tamminen M, Lyra C, Kronberg L, Virta M, 2016. Fertilizing with animal manure disseminates antibiotic resistance genes to the farm environment. *Journal of Environmental Quality*, 45, 2, 488-93.
- Ryu J-H, Kim S, Park J, Choi K-S, 2020. Characterization of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from pre-weaned calves in the Republic of Korea. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 62, 1-7.
- Sada TS, Alemayehu DH, Tafese KM, Tessema TS, 2024. Genomic analysis and characterization of lytic bacteriophages that target antimicrobial resistant *Escherichia coli* in Addis Ababa, Ethiopia. *Heliyon*, 10, 22.
- Salama M, Younis W, Mohamed H, Sultan S, 2023. Microbiological and molecular characterization of *E. coli* and *Salmonella* isolated from diarrheic calves. *SVU-International Journal of Veterinary Sciences*, 6, 4, 1-14.
- Salmond GP, Fineran PC, 2015. A century of the phage: past, present and future. *Nature Reviews Microbiology*, 13, 12, 777-86.
- Sánchez-Clemente R, Igeño MI, Población AG, Guijo MI, Merchán F, Blasco R, (2018). Study of pH Changes in Media during Bacterial Growth of Several Environmental Strains. *Proceedings*, 2(20), 1297.
- Santos ACdM, Santos FF, Silva RM, Gomes TAT, 2020. Diversity of hybrid-and hetero-pathogenic *Escherichia coli* and their potential implication in more severe diseases. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 339.
- Scanlan PD, Hall A, Burlinson P, Preston G, Buckling A, 2013. No effect of host–parasite co-evolution on host range expansion. *Journal of Evolutionary Biology*, 26, 1, 205-9.
- Schatz A, Jones D, 1947. The production of antiphage agents by actinomycetes. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 9-19.
- Schmoeller E, de Matos AD, Rahal NM, Feijo JO, Brauner CC, Del Pino FAB, Correa MN, Rabassa VR, 2021. Diarrhea duration and performance outcomes of pre-weaned dairy calves supplemented with bacteriophage. *Canadian Journal of Animal Science*, 102, 1, 165-74.
- Sharma C, Rokana N, Chandra M, Singh BP, Gulhane RD, Gill JPS, Ray P, Puniya AK, Panwar H, 2017. Antimicrobial Resistance: Its Surveillance, Impact, and Alternative Management Strategies in Dairy Animals. *Frontiers in Veterinary Science*, 4, 237.

- Sharon I, Battchikova N, Aro E-M, Giglione C, Meinel T, Glaser F, Pinter RY, Breitbart M, Rohwer F, Béjà O, 2011. Comparative metagenomics of microbial traits within oceanic viral communities. *The ISME Journal*, 5, 7, 1178-90.
- Shousha A, Awaiwanont N, Sofka D, Smulders FJ, Paulsen P, Szostak MP, Humphrey T, Hilbert F, 2015. Bacteriophages isolated from chicken meat and the horizontal transfer of antimicrobial resistance genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 14, 4600-6.
- Silva YJ, Costa L, Pereira C, Cunha Â, Calado R, Gomes NC, Almeida A, 2014. Influence of environmental variables in the efficiency of phage therapy in aquaculture. *Microbial Biotechnology*, 7, 5, 401-13.
- Silver LL, 2011. Challenges of antibacterial discovery. *Clinical Microbiology Reviews*, 24, 1, 71-109.
- Simpkin VL, Renwick MJ, Kelly R, Mossialos E, 2017. Incentivising innovation in antibiotic drug discovery and development: progress, challenges and next steps. *The Journal of Antibiotics*, 70, 12, 1087-96.
- Singh BP, Chauhan R, Singhal LK, 2003. Toll-like receptors and their role in innate immunity. *Current Science*, 1156-64.
- Siringan P, Connerton PL, Cummings NJ, Connerton IF, 2014. Alternative bacteriophage life cycles: the carrier state of *Campylobacter jejuni*. *Open Biology*, 4, 3, 130200.
- Šivec K, Podgornik A, 2020. Determination of bacteriophage growth parameters under cultivating conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104, 8949-60.
- Sjahriani T, Wasito EB, Tyasningsih W, 2021. Isolation and identification of *Escherichia coli* O157:H7 lytic bacteriophage from environment sewage. *International Journal of Food Science*, 2021, 1, 7383121.
- Skaradzińska A, Śliwka P, Kuźmińska-Bajor M, Skaradziński G, Rząsa A, Friesse A, Roschanski N, Murugaiyan J, Roesler UH, 2017. The efficacy of isolated bacteriophages from pig farms against ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* from pig and turkey farms. *Frontiers in Microbiology*, 8, 530.
- Skippington E, Ragan MA, 2011. Lateral genetic transfer and the construction of genetic exchange communities. *FEMS Microbiology Reviews*, 35, 5, 707-35.
- Smith DH, 1967. R factor infection of *Escherichia coli* lyophilized in 1946. *Journal of Bacteriology*, 94, 6, 2071-2.
- Smith NM, Nguyen TD, Chin WH, Sanborn JT, de Souza H, Ho BM, Luong T, Roach DR, 2023. A mechanism-based pathway toward administering highly active N-phage cocktails. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1292618.
- Sobhy NM, Yousef SG, Aboubakr HA, Nisar M, Nagaraja KV, Mor SK, Valeris-Chacin RJ, Goyal SM, 2020. Virulence factors and antibiograms of *Escherichia coli* isolated from diarrheic calves of Egyptian cattle and water buffaloes. *PLoS One*, 15, 5, e0232890.
- Sorensen PE, Ng DYK, Duchateau L, Ingmer H, Garmyn A, Butaye P, 2021. Classification of In Vitro Phage-Host Population Growth Dynamics. *Microorganisms*, 9, 12.
- Soysal N, Mariani-Kurkdjian P, Smail Y, Liguori S, Gouali M, Loukiadis E, Fach P, Bruyand M, Blanco J, Bidet P, 2016. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* hybrid pathotype O80: H2 as a new therapeutic challenge. *Emerging Infectious Diseases*, 22, 9, 1604.
- Srikant S, Guegler CK, Laub MT, 2022. The evolution of a counter-defense mechanism in a virus constrains its host range. *Elife*, 11, e79549.
- Storms ZJ, Brown T, Cooper DG, Sauvageau D, Leask RL, 2014. Impact of the cell life-cycle on bacteriophage T4 infection. *FEMS Microbiology Letters*, 353, 1, 63-8.
- Strömsten NJ, Bamford DH, Bamford JK, 2005. In vitro DNA packaging of PRD1: a common mechanism for internal-membrane viruses. *Journal of Molecular Biology*, 348, 3, 617-29.
- Sui B, Han L, Ren H, Liu W, Zhang C, 2021. A novel polyvalent bacteriophage vB_EcoM_swi3 infects pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis*. *Frontiers in Microbiology*, 12, 649673.

- Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris Jr JG, 2001. Bacteriophage therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45, 3, 649-59.
- Sullivan MB, Coleman ML, Quinlivan V, Rosenkrantz JE, DeFrancesco AS, Tan G, Fu R, Lee JA, Waterbury JB, Bielawski JP, 2008. Portal Protein Diversity and Phage Ecology. *Environmental Microbiology*, 10, 10, 2810-23.
- Sullivan MB, Huang KH, Ignacio-Espinoza JC, Berlin AM, Kelly L, Weigele PR, DeFrancesco AS, Kern SE, Thompson LR, Young S, 2010. Genomic analysis of oceanic cyanobacterial myoviruses compared with T4-like myoviruses from diverse hosts and environments. *Environmental Microbiology*, 12, 11, 3035-56.
- Summers WC, 2001. Bacteriophage therapy. *Annual Reviews in Microbiology*, 55, 1, 437-51.
- Summers WC, 2021. History of Virology: Bacteriophages. In: *Encyclopedia of Virology*. Eds, p. 3-9.
- Suttle CA, 2005. Viruses in the sea. *Nature*, 437, 7057, 356-61.
- Suttle CA, 2007. Marine viruses—major players in the global ecosystem. *Nature Reviews. Microbiology*, 5, 10, 801-12.
- Tal N, Morehouse BR, Millman A, Stokar-Avihail A, Avraham C, Fedorenko T, Yirmiya E, Herbst E, Brandis A, Mehlman T, 2021. Cyclic CMP and cyclic UMP mediate bacterial immunity against phages. *Cell*, 184, 23, 5728-39. e16.
- Tesson F, Hervé A, Mordret E, Touchon M, d’Humières C, Cury J, Bernheim A, 2022. Systematic and quantitative view of the antiviral arsenal of prokaryotes. *Nature Communications*, 13, 1, 2561.
- Thompson LR, Zeng Q, Kelly L, Huang KH, Singer AU, Stubbe J, Chisholm SW, 2011. Phage auxiliary metabolic genes and the redirection of cyanobacterial host carbon metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 39, E757-E64.
- Tokman JI, Kent DJ, Wiedmann M, Denes T, 2016. Temperature significantly affects the plaquing and adsorption efficiencies of *Listeria* phages. *Frontiers in Microbiology*, 7, 631.
- Touchon M, De Sousa JAM, Rocha EP, 2017. Embracing the enemy: the diversification of microbial gene repertoires by phage-mediated horizontal gene transfer. *Current Opinion in Microbiology*, 38, 66-73.
- Tse VY, Liu H, Kapinos A, Torres C, Cayabyab BCS, Fett SN, Nakashima LG, Rahman M, Vargas AS, Reddi K, 2022. Exploring Genomic Conservation in Actinobacteriophages with Small Genomes. *bioRxiv*, 2022.02. 05.479200.
- Turner PE, Draghi JA, Wilpiseski R, 2012. High-throughput analysis of growth differences among phage strains. *Journal of Microbiological Methods*, 88, 1, 117-21.
- Turner D, Kropinski AM, Adriaenssens EM, 2021. A Roadmap for Genome-Based Phage Taxonomy. *Viruses*, 13, 3.
- Twort F. W. 1936. Further Investigations on the Nature of Ultra-Microscopic Viruses and their Cultivation. *The Journal of Hygiene*, 36(2), 204–235.
- van Charante F, Holtappels D, Blasdel B, Burrowes BH, 2021. Isolation of Bacteriophages. In: *Bacteriophages: Biology, Technology, Therapy*. Eds: Harper DR, Abedon ST, Burrowes BH, McConville ML. Cham: Springer International Publishing, p. 433-64.
- Vega CG, Bok M, Ebinger M, Rocha LA, Rivolta AA, González Thomas V, Muntadas P, D’Aloia R, Pinto V, Parreño V, 2020. A new passive immune strategy based on IgY antibodies as a key element to control neonatal calf diarrhea in dairy farms. *BMC Veterinary Research*, 16, 1-9.
- Ventola C. L. 2015) The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P & T : A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management*, 40(4), 277–283.
- Vidaver AK, Koski R, Van Etten JL, 1973. Bacteriophage $\phi 6$: a lipid-containing virus of *Pseudomonas phaseolicola*. *Journal of virology*, 11, 5, 799-805.

- Vipra A, Desai SN, Junjappa RP, Roy P, Poonacha N, Ravinder P, Sriram B, Padmanabhan S, 2013. Determining the minimum inhibitory concentration of bacteriophages: potential advantages. *Advances in Microbiology*, 3, 2, 181-90.
- von Mentzer A, Svennerholm A-M, 2024. Colonization factors of human and animal-specific enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *Trends in Microbiology*, 32, 5, 448-64.
- Von Wintersdorff CJ, Penders J, Van Niekerk JM, Mills ND, Majumder S, Van Alphen LB, Savelkoul PH, Wolffs PF, 2016. Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. *Frontiers in Microbiology*, 7, 173.
- Walsh TR, Weeks J, Livermore DM, Toleman MA, 2011. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *The Lancet Infectious Diseases*, 11, 5, 355-62.
- Wang Z, Zheng P, Ji W, Fu Q, Wang H, Yan Y, Sun J, 2016. SLPW: a virulent bacteriophage targeting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in vitro and in vivo. *Frontiers in Microbiology*, 7, 934.
- Wang RH, Yang S, Liu Z, Zhang Y, Wang X, Xu Z, Wang J, Li SC. (2024). PhageScope: a well-annotated bacteriophage database with automatic analyses and visualizations. *Nucleic Acids Research*, 52(D1), D756–D761
- Warwick-Dugdale J, Buchholz HH, Allen MJ, Temperton B, 2019. Host-hijacking and planktonic piracy: how phages command the microbial high seas. *Virology Journal*, 16, 1-13.
- Washizaki A, Yonesaki T, Otsuka Y, 2016. Characterization of the interactions between *Escherichia coli* receptors, LPS and OmpC, and bacteriophage T4 long tail fibers. *Microbiologyopen*, 5, 6, 1003-15.
- Wein T, Sorek R, 2022. Bacterial origins of human cell-autonomous innate immune mechanisms. *Nature Reviews Immunology*, 22, 10, 629-38.
- Weinbauer MG, 2004. Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiology Reviews*, 28, 2, 127-81.
- White A, Hughes JM, 2019. Critical importance of a one health approach to antimicrobial resistance. *EcoHealth*, 16, 404-9.
- Wishart DS, Han S, Saha S, Oler E, Peters H, Grant JR, Stothard P, Gautam V. (2023). PHASTEST: faster than PHASTER, better than PHAST. *Nucleic Acids Research*, 51(W1), W443–W450.
- WHO, 2019. No Time to Wait: Securing the future from drug-resistant infections. Report to the Secretary-General of the United Nations, World Health Organization.
- Wijnsma KL, Schijvens AM, Rossen JW, Kooistra-Smid A, Schreuder MF, van de Kar NC, 2017. Unusual severe case of hemolytic uremic syndrome due to Shiga toxin 2d-producing *E. coli* O80: H2. *Pediatric Nephrology*, 32, 1263-8.
- Wintachai P, Naknaen A, Thammaphet J, Pomwised R, Phaonakrop N, Roytrakul S, Smith DR, 2020. Characterization of extended-spectrum- β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* phage KP1801 and evaluation of therapeutic efficacy in vitro and in vivo. *Scientific Reports*, 10, 1, 11803.
- Winter M, Buckling A, Harms K, Johnsen PJ, Vos M, 2021. Antimicrobial resistance acquisition via natural transformation: context is everything. *Current Opinion in Microbiology* 64, 133-8.
- Wu Y, Nie C, Luo R, Qi F, Bai X, Chen H, Niu J, Chen C, Zhang W, 2022. Effects of multispecies probiotic on intestinal microbiota and mucosal barrier function of neonatal calves infected with *E. coli* K99. *Frontiers in Microbiology*, 12, 813245.
- Wozniak RA, Waldor MK, 2010. Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 8, 552-63.
- Xu L, Cabanas-Danés J, Halma MTJ, Heller I, Stratmann Sarah A, van Oijen Antoine M, Lee S-J, Peterman EJG, Wuite GJL, 2023. Regulation of T7 gp2.5 binding dynamics by its C-terminal tail, template conformation and sequence. *Nucleic Acids Research*, 51, 13, 6540-53.
- Xue H, Cordero OX, Camas FM, Trimble W, Meyer F, Guglielmini J, Rocha EP, Polz MF, 2015. Eco-evolutionary dynamics of episomes among ecologically cohesive bacterial populations. *MBio*, 6(3), e00552-15.

- Yehl K, Lemire S, Yang AC, Ando H, Mimee M, Torres MT, de la Fuente-Nunez C, Lu TK, 2019. Engineering Phage Host-Range and Suppressing Bacterial Resistance through Phage Tail Fiber Mutagenesis. *Cell*, 179, 2, 459-69.e9.
- Yin H, Li J, Huang H, Wang Y, Qian X, Ren J, Xue F, Dai J, Tang F, 2021. Microencapsulated phages show prolonged stability in gastrointestinal environments and high therapeutic efficiency to treat *Escherichia coli* O157: H7 infection. *Veterinary Research*, 52, 1-13.
- You J, Sun L, Yang X, Pan X, Huang Z, Zhang X, Gong M, Fan Z, Li L, Cui X, Jing Z, Jin S, Rao Z, Wu W, Yang H, 2018. Regulatory protein SrpA controls phage infection and core cellular processes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature Communications*, 9, 1, 1846.
- Young R, 2014. Phage lysis: three steps, three choices, one outcome. *Journal of Microbiology*, 52, 243-58.
- Yuan Y, Peng Q, Yang S, Zhang S, Fu Y, Wu Y, Gao M, 2018. Isolation of a novel *Bacillus thuringiensis* phage representing a new phage lineage and characterization of its endolysin. *Viruses*, 10, 11, 611.
- Zhu Y, Shang J, Peng C, Sun Y, 2022. Phage family classification under Caudoviricetes: A review of current tools using the latest ICTV classification framework. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1032186.
- Zinke M, Schröder GF, Lange A, 2022. Major tail proteins of bacteriophages of the order Caudovirales. *Journal of Biological Chemistry*, 298, 1.

7. EKLER

EK-A Analiz Sonuçları

K1		
Protein	Uzunluk	Fonksiyon
DNA helicase CDS	1389	DNA; RNA and nucleotide metabolism
DNA ligase CDS	465	DNA; RNA and nucleotide metabolism
DNA methyltransferase CDS	696	other
DNA methyltransferase CDS	486	other
DNA polymerase CDS	1734	DNA; RNA and nucleotide metabolism
DNA polymerase CDS	804	DNA; RNA and nucleotide metabolism
DNA repair exonuclease CDS	1002	DNA; RNA and nucleotide metabolism
DNA repair exonuclease CDS	153	DNA; RNA and nucleotide metabolism
endolysin CDS	315	lysis
exonuclease CDS	1398	DNA; RNA and nucleotide metabolism
Gp2.5-like ssDNA binding protein and ssDNA annealing protein CDS	474	DNA; RNA and nucleotide metabolism
head closure Hc1 CDS	354	connector
head morphogenesis CDS	1104	head and packaging
head scaffolding protein CDS	702	head and packaging
head-tail adaptor Ad1 CDS	531	connector
HNH endonuclease CDS	324	DNA; RNA and nucleotide metabolism
holin CDS	246	lysis
hypothetical protein CDS	1386	unknown function
hypothetical protein CDS	765	unknown function
hypothetical protein CDS	627	unknown function
hypothetical protein CDS	576	unknown function
hypothetical protein CDS	450	unknown function
hypothetical protein CDS	426	unknown function
hypothetical protein CDS	423	unknown function
hypothetical protein CDS	405	unknown function
hypothetical protein CDS	336	unknown function
hypothetical protein CDS	312	unknown function
hypothetical protein CDS	312	unknown function
hypothetical protein CDS	294	unknown function
hypothetical protein CDS	288	unknown function
hypothetical protein CDS	273	unknown function
hypothetical protein CDS	264	unknown function
hypothetical protein CDS	252	unknown function
hypothetical protein CDS	243	unknown function
hypothetical protein CDS	234	unknown function
hypothetical protein CDS	225	unknown function
hypothetical protein CDS	213	unknown function
hypothetical protein CDS	213	unknown function
hypothetical protein CDS	204	unknown function
hypothetical protein CDS	201	unknown function
hypothetical protein CDS	183	unknown function

K1		
Protein	Uzunluk	Fonksiyon
hypothetical protein CDS	171	unknown function
hypothetical protein CDS	171	unknown function
hypothetical protein CDS	171	unknown function
hypothetical protein CDS	162	unknown function
hypothetical protein CDS	153	unknown function
hypothetical protein CDS	150	unknown function
hypothetical protein CDS	147	unknown function
hypothetical protein CDS	141	unknown function
hypothetical protein CDS	132	unknown function
hypothetical protein CDS	132	unknown function
hypothetical protein CDS	123	unknown function
hypothetical protein CDS	117	unknown function
hypothetical protein CDS	117	unknown function
hypothetical protein CDS	114	unknown function
hypothetical protein CDS	111	unknown function
hypothetical protein CDS	108	unknown function
hypothetical protein CDS	102	unknown function
hypothetical protein CDS	102	unknown function
hypothetical protein CDS	99	unknown function
hypothetical protein CDS	99	unknown function
hypothetical protein CDS	96	unknown function
hypothetical protein CDS	90	unknown function
Lar-like restriction alleviation protein CDS	303	moron; auxiliary metabolic gene and host takeover
major head protein CDS	1101	head and packaging
major tail protein CDS	726	tail
membrane associated protein CDS	447	moron; auxiliary metabolic gene and host takeover
minor tail protein CDS	630	tail
minor tail protein CDS	546	tail
outer membrane protein CDS	303	other
portal protein CDS	1242	head and packaging
portal protein CDS	96	head and packaging
replicative helicase-primase CDS	2130	DNA; RNA and nucleotide metabolism
restriction endonuclease CDS	348	DNA; RNA and nucleotide metabolism
Rz-like spanin CDS	231	lysis
tail completion or Neck1 protein CDS	153	connector
tail fiber protein CDS	1605	tail
tail length tape measure protein CDS	2643	tail
tail length tape measure protein CDS	363	tail
tail protein CDS	3189	tail
tail protein CDS	612	tail
tail protein CDS	267	tail
tail terminator CDS	423	connector
terminase CDS	573	head and packaging
transposase CDS	330	integration and excision

T1/2		
Protein	Uzunluk	Fonksiyon
DNA helicase CDS	1218	DNA; RNA and nucleotide metabolism
DNA helicase CDS	252	DNA; RNA and nucleotide metabolism
DNA ligase CDS	459	DNA; RNA and nucleotide metabolism
DNA methyltransferase CDS	696	other
DNA methyltransferase CDS	399	other
DNA polymerase CDS	1551	DNA; RNA and nucleotide metabolism
DNA polymerase CDS	570	DNA; RNA and nucleotide metabolism
DNA repair exonuclease CDS	1143	DNA; RNA and nucleotide metabolism
endolysin CDS	315	lysis
endolysin CDS	195	lysis
endonuclease VII CDS	573	DNA; RNA and nucleotide metabolism
exonuclease CDS	1398	DNA; RNA and nucleotide metabolism
Gp2.5-like ssDNA binding protein and ssDNA annealing protein CDS	771	DNA; RNA and nucleotide metabolism
head morphogenesis CDS	939	head and packaging
head morphogenesis CDS	168	head and packaging
head scaffolding protein CDS	675	head and packaging
head-tail adaptor Ad1 CDS	531	connector
HNH endonuclease CDS	324	DNA; RNA and nucleotide metabolism
holin CDS	261	lysis
holin CDS	246	lysis
hypothetical protein CDS	1386	unknown function
hypothetical protein CDS	765	unknown function
hypothetical protein CDS	627	unknown function
hypothetical protein CDS	576	unknown function
hypothetical protein CDS	522	unknown function
hypothetical protein CDS	405	unknown function
hypothetical protein CDS	357	unknown function
hypothetical protein CDS	318	unknown function
hypothetical protein CDS	288	unknown function
hypothetical protein CDS	252	unknown function
hypothetical protein CDS	243	unknown function
hypothetical protein CDS	237	unknown function
hypothetical protein CDS	237	unknown function
hypothetical protein CDS	234	unknown function
hypothetical protein CDS	225	unknown function
hypothetical protein CDS	216	unknown function
hypothetical protein CDS	216	unknown function
hypothetical protein CDS	213	unknown function
hypothetical protein CDS	201	unknown function
hypothetical protein CDS	192	unknown function
hypothetical protein CDS	189	unknown function
hypothetical protein CDS	171	unknown function
hypothetical protein CDS	171	unknown function
hypothetical protein CDS	153	unknown function
hypothetical protein CDS	150	unknown function
hypothetical protein CDS	147	unknown function

T1/2		
Protein	Uzunluk	Fonksiyon
hypothetical protein CDS	144	unknown function
hypothetical protein CDS	144	unknown function
hypothetical protein CDS	135	unknown function
hypothetical protein CDS	132	unknown function
hypothetical protein CDS	132	unknown function
hypothetical protein CDS	126	unknown function
hypothetical protein CDS	123	unknown function
hypothetical protein CDS	120	unknown function
hypothetical protein CDS	117	unknown function
hypothetical protein CDS	117	unknown function
hypothetical protein CDS	111	unknown function
hypothetical protein CDS	108	unknown function
hypothetical protein CDS	108	unknown function
hypothetical protein CDS	102	unknown function
hypothetical protein CDS	102	unknown function
hypothetical protein CDS	102	unknown function
hypothetical protein CDS	99	unknown function
hypothetical protein CDS	96	unknown function
hypothetical protein CDS	90	unknown function
Lar-like restriction alleviation protein CDS	303	moron; auxiliary metabolic gene and host takeover
major head protein CDS	1101	head and packaging
major tail protein CDS	408	tail
major tail protein CDS	363	tail
membrane associated protein CDS	675	moron; auxiliary metabolic gene and host takeover
minor tail protein CDS	789	tail
minor tail protein CDS	741	tail
minor tail protein CDS	600	tail
outer membrane protein CDS	303	other
polynucleotide kinase CDS	486	other
portal protein CDS	837	head and packaging
portal protein CDS	543	head and packaging
portal protein CDS	96	head and packaging
replicative helicase-primase CDS	2130	DNA; RNA and nucleotide metabolism
Rz-like spanin CDS	231	lysis
tail completion or Neck1 protein CDS	195	connector
tail completion or Neck1 protein CDS	153	connector
tail fiber protein CDS	1605	tail
tail length tape measure protein CDS	2469	tail
tail length tape measure protein CDS	273	tail
tail protein CDS	3420	tail
tail protein CDS	618	tail
tail terminator CDS	423	connector
terminase CDS	513	head and packaging
transposase CDS	330	integration and excision

W8		
Protein	Uzunluk	Fonksiyon
DNA helicase CDS	1038	DNA; RNA and nucleotide metabolism
DNA ligase CDS	459	DNA; RNA and nucleotide metabolism
DNA methyltransferase CDS	486	other
DNA methyltransferase CDS	369	other
DNA methyltransferase CDS	330	other
DNA polymerase CDS	1554	DNA; RNA and nucleotide metabolism
DNA polymerase CDS	792	DNA; RNA and nucleotide metabolism
DNA repair exonuclease CDS	906	DNA; RNA and nucleotide metabolism
DNA repair exonuclease CDS	267	DNA; RNA and nucleotide metabolism
endolysin CDS	315	lysis
exonuclease CDS	924	DNA; RNA and nucleotide metabolism
Gp2.5-like ssDNA binding protein and ssDNA annealing protein CDS	771	DNA; RNA and nucleotide metabolism
head closure Hc1 CDS	354	connector
head morphogenesis CDS	939	head and packaging
head morphogenesis CDS	168	head and packaging
head scaffolding protein CDS	798	head and packaging
head-tail adaptor Ad1 CDS	531	connector
HNH endonuclease CDS	324	DNA; RNA and nucleotide metabolism
holin CDS	339	lysis
holin CDS	246	lysis
hypothetical protein CDS	1386	unknown function
hypothetical protein CDS	1005	unknown function
hypothetical protein CDS	588	unknown function
hypothetical protein CDS	576	unknown function
hypothetical protein CDS	522	unknown function
hypothetical protein CDS	402	unknown function
hypothetical protein CDS	402	unknown function
hypothetical protein CDS	348	unknown function
hypothetical protein CDS	336	unknown function
hypothetical protein CDS	318	unknown function
hypothetical protein CDS	288	unknown function
hypothetical protein CDS	264	unknown function
hypothetical protein CDS	246	unknown function
hypothetical protein CDS	243	unknown function
hypothetical protein CDS	243	unknown function
hypothetical protein CDS	237	unknown function
hypothetical protein CDS	225	unknown function
hypothetical protein CDS	225	unknown function
hypothetical protein CDS	225	unknown function
hypothetical protein CDS	213	unknown function
hypothetical protein CDS	204	unknown function
hypothetical protein CDS	198	unknown function
hypothetical protein CDS	183	unknown function
hypothetical protein CDS	174	unknown function
hypothetical protein CDS	171	unknown function

W8		
Protein	Uzunluk	Fonksiyon
hypothetical protein CDS	156	unknown function
hypothetical protein CDS	156	unknown function
hypothetical protein CDS	153	unknown function
hypothetical protein CDS	153	unknown function
hypothetical protein CDS	150	unknown function
hypothetical protein CDS	150	unknown function
hypothetical protein CDS	147	unknown function
hypothetical protein CDS	147	unknown function
hypothetical protein CDS	144	unknown function
hypothetical protein CDS	135	unknown function
hypothetical protein CDS	123	unknown function
hypothetical protein CDS	120	unknown function
hypothetical protein CDS	108	unknown function
hypothetical protein CDS	108	unknown function
hypothetical protein CDS	108	unknown function
hypothetical protein CDS	102	unknown function
hypothetical protein CDS	102	unknown function
hypothetical protein CDS	96	unknown function
hypothetical protein CDS	90	unknown function
hypothetical protein CDS	90	unknown function
Lar-like restriction alleviation protein CDS	129	moron; auxiliary metabolic gene and host takeover
major head protein CDS	1101	head and packaging
major tail protein CDS	408	tail
major tail protein CDS	363	tail
membrane associated protein CDS	447	moron; auxiliary metabolic gene and host takeover
minor tail protein CDS	600	tail
minor tail protein CDS	546	tail
minor tail protein CDS	336	tail
outer membrane protein CDS	303	other
polynucleotide kinase CDS	471	other
portal protein CDS	978	head and packaging
portal protein CDS	717	head and packaging
replicative helicase-primase CDS	2265	DNA; RNA and nucleotide metabolism
Rz-like spanin CDS	231	lysis
tail completion or Neck1 protein CDS	468	connector
tail fiber protein CDS	1605	tail
tail length tape measure protein CDS	1593	tail
tail length tape measure protein CDS	945	tail
tail length tape measure protein CDS	363	tail
tail protein CDS	3420	tail
tail protein CDS	618	tail
tail terminator CDS	423	connector
terminase CDS	573	head and packaging
transposase CDS	330	integration and excision

W1		
Protein	Uzunluk	Fonksiyon
DNA helicase CDS	1389	DNA; RNA and nucleotide metabolism
DNA ligase CDS	291	DNA; RNA and nucleotide metabolism
DNA methyltransferase CDS	696	other
DNA methyltransferase CDS	384	other
DNA polymerase CDS	2160	DNA; RNA and nucleotide metabolism
DNA polymerase CDS	135	DNA; RNA and nucleotide metabolism
DNA repair exonuclease CDS	666	DNA; RNA and nucleotide metabolism
DNA repair exonuclease CDS	267	DNA; RNA and nucleotide metabolism
DNA repair exonuclease CDS	165	DNA; RNA and nucleotide metabolism
endolysin CDS	393	lysis
endonuclease CDS	147	DNA; RNA and nucleotide metabolism
exonuclease CDS	1398	DNA; RNA and nucleotide metabolism
Gp2.5-like ssDNA binding protein and ssDNA annealing protein CDS	771	DNA; RNA and nucleotide metabolism
head morphogenesis CDS	1104	head and packaging
head scaffolding protein CDS	702	head and packaging
head-tail adaptor Ad1 CDS	501	connector
holin CDS	531	lysis
hypothetical protein CDS	1386	unknown function
hypothetical protein CDS	765	unknown function
hypothetical protein CDS	588	unknown function
hypothetical protein CDS	576	unknown function
hypothetical protein CDS	423	unknown function
hypothetical protein CDS	399	unknown function
hypothetical protein CDS	375	unknown function
hypothetical protein CDS	354	unknown function
hypothetical protein CDS	291	unknown function
hypothetical protein CDS	288	unknown function
hypothetical protein CDS	285	unknown function
hypothetical protein CDS	273	unknown function
hypothetical protein CDS	264	unknown function
hypothetical protein CDS	255	unknown function
hypothetical protein CDS	252	unknown function
hypothetical protein CDS	243	unknown function
hypothetical protein CDS	243	unknown function
hypothetical protein CDS	225	unknown function
hypothetical protein CDS	219	unknown function
hypothetical protein CDS	213	unknown function
hypothetical protein CDS	183	unknown function
hypothetical protein CDS	171	unknown function
hypothetical protein CDS	171	unknown function
hypothetical protein CDS	171	unknown function
hypothetical protein CDS	168	unknown function
hypothetical protein CDS	168	unknown function

W1		
Protein	Uzunluk	Fonksiyon
hypothetical protein CDS	165	unknown function
hypothetical protein CDS	156	unknown function
hypothetical protein CDS	153	unknown function
hypothetical protein CDS	153	unknown function
hypothetical protein CDS	150	unknown function
hypothetical protein CDS	147	unknown function
hypothetical protein CDS	144	unknown function
hypothetical protein CDS	144	unknown function
hypothetical protein CDS	135	unknown function
hypothetical protein CDS	135	unknown function
hypothetical protein CDS	135	unknown function
hypothetical protein CDS	117	unknown function
hypothetical protein CDS	117	unknown function
hypothetical protein CDS	111	unknown function
hypothetical protein CDS	108	unknown function
hypothetical protein CDS	102	unknown function
hypothetical protein CDS	102	unknown function
hypothetical protein CDS	99	unknown function
hypothetical protein CDS	96	unknown function
hypothetical protein CDS	90	unknown function
Lar-like restriction alleviation protein CDS	177	moron; auxiliary metabolic gene and host takeover
major head protein CDS	1101	head and packaging
major tail protein CDS	726	tail
membrane associated protein CDS	447	moron; auxiliary metabolic gene and host takeover
minor tail protein CDS	789	tail
minor tail protein CDS	600	tail
outer membrane protein CDS	303	other
polynucleotide kinase CDS	354	other
portal protein CDS	837	head and packaging
portal protein CDS	543	head and packaging
portal protein CDS	96	head and packaging
replicative helicase-primase CDS	2130	DNA; RNA and nucleotide metabolism
Rz-like spanin CDS	231	lysis
tail completion or Neck1 protein CDS	504	connector
tail fiber protein CDS	1605	tail
tail length tape measure protein CDS	2469	tail
tail length tape measure protein CDS	363	tail
tail protein CDS	3420	tail
tail protein CDS	618	tail
tail terminator CDS	387	connector
terminase CDS	573	head and packaging
transposase CDS	330	integration and excision

W1/9		
Protein	Uzunluk	Fonksiyon
DNA helicase CDS	1218	DNA; RNA and nucleotide metabolism
DNA helicase CDS	252	DNA; RNA and nucleotide metabolism
DNA ligase CDS	465	DNA; RNA and nucleotide metabolism
DNA methyltransferase CDS	696	other
DNA methyltransferase CDS	486	other
DNA polymerase CDS	3189	DNA; RNA and nucleotide metabolism
DNA repair exonuclease CDS	1143	DNA; RNA and nucleotide metabolism
endolysin CDS	315	lysis
endonuclease CDS	279	DNA; RNA and nucleotide metabolism
endonuclease VII CDS	663	DNA; RNA and nucleotide metabolism
exonuclease CDS	1398	DNA; RNA and nucleotide metabolism
Gp2.5-like ssDNA binding protein and ssDNA annealing protein CDS	771	DNA; RNA and nucleotide metabolism
head closure Hc1 CDS	360	connector
head morphogenesis CDS	1104	head and packaging
head scaffolding protein CDS	798	head and packaging
head-tail adaptor Ad1 CDS	531	connector
HNH endonuclease CDS	324	DNA; RNA and nucleotide metabolism
holin CDS	339	lysis
holin CDS	246	lysis
hypothetical protein CDS	1386	unknown function
hypothetical protein CDS	1005	unknown function
hypothetical protein CDS	627	unknown function
hypothetical protein CDS	576	unknown function
hypothetical protein CDS	336	unknown function
hypothetical protein CDS	318	unknown function
hypothetical protein CDS	288	unknown function
hypothetical protein CDS	264	unknown function
hypothetical protein CDS	243	unknown function
hypothetical protein CDS	237	unknown function
hypothetical protein CDS	231	unknown function
hypothetical protein CDS	222	unknown function
hypothetical protein CDS	219	unknown function
hypothetical protein CDS	213	unknown function
hypothetical protein CDS	204	unknown function
hypothetical protein CDS	198	unknown function
hypothetical protein CDS	195	unknown function
hypothetical protein CDS	183	unknown function
hypothetical protein CDS	171	unknown function
hypothetical protein CDS	162	unknown function
hypothetical protein CDS	156	unknown function
hypothetical protein CDS	153	unknown function
hypothetical protein CDS	144	unknown function
hypothetical protein CDS	141	unknown function

W1/9		
Protein	Uzunluk	Fonksiyon
hypothetical protein CDS	132	unknown function
hypothetical protein CDS	117	unknown function
hypothetical protein CDS	117	unknown function
hypothetical protein CDS	108	unknown function
hypothetical protein CDS	108	unknown function
hypothetical protein CDS	108	unknown function
hypothetical protein CDS	105	unknown function
hypothetical protein CDS	102	unknown function
hypothetical protein CDS	96	unknown function
hypothetical protein CDS	90	unknown function
hypothetical protein CDS	90	unknown function
Lar-like restriction alleviation protein CDS	174	moron; auxiliary metabolic gene and host takeover
major head protein CDS	1101	head and packaging
major tail protein CDS	726	tail
membrane associated protein CDS	447	moron; auxiliary metabolic gene and host takeover
minor tail protein CDS	777	tail
minor tail protein CDS	741	tail
minor tail protein CDS	600	tail
outer membrane protein CDS	303	other
portal protein CDS	1521	head and packaging
replicative helicase-primase CDS	2130	DNA; RNA and nucleotide metabolism
Rz-like spanin CDS	231	lysis
tail completion or Neck1 protein CDS	504	connector
tail fiber protein CDS	1605	tail
tail length tape measure protein CDS	1566	tail
tail length tape measure protein CDS	888	tail
tail length tape measure protein CDS	363	tail
tail length tape measure protein CDS	228	tail
tail protein CDS	2499	tail
tail protein CDS	483	tail
tail protein CDS	267	tail
tail protein CDS	135	tail
tail protein and host specificity CDS	570	tail
tail terminator CDS	423	connector
terminase CDS	573	head and packaging
transposase CDS	330	integration and excision